

Andrés Manuel Gómez Blasco

Soportes de biovidrios  
mesoporosos enriquecidos con  
osteostatina y células  
mesenquimales para la  
regeneración de defectos óseos.  
Modelo experimental en fémur  
distal del conejo

Director/es

Gil Albarova, Jorge

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**SOPORTES DE BIOVIDRIOS MESOPOROSOS  
ENRIQUECIDOS CON OSTEOSTATINA Y CÉLULAS  
MESENQUIMALES PARA LA REGENERACIÓN DE  
DEFECTOS ÓSEOS. MODELO EXPERIMENTAL EN  
FÉMUR DISTAL DEL CONEJO**

Autor

**Andrés Manuel Gómez Blasco**

Director/es

Gil Albarova, Jorge

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

2021





**Universidad**  
Zaragoza

# Tesis Doctoral

**Soportes de biovidrios mesoporosos enriquecidos con  
osteostatina y células mesenquimales para la regeneración  
de defectos óseos. Modelo experimental en fémur distal del  
conejo**

Autor

Andrés Manuel Gómez Blasco

Director

Jorge Gil Albarova

Facultad de Medicina  
Año 2020

# Agradecimientos

Al Dr. Jorge Gil Albarova por su supervisión constante y su gran implicación, así como su accesibilidad y disponibilidad en todo momento. Ha sido imprescindible para la realización de este proyecto.

A la Dra. Victoria Eugenia Gómez Palacio por su inestimable ayuda y apoyo, así como su guía y colaboración en muchos de los pasos de la realización de esta tesis.

Al Dr. Antonio Jesús Salinas Sánchez y a los miembros del Departamento de Química Orgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en especial a la Dra. Sandra Sánchez Salcedo, la Dra. Clara Heras Rubio y al Dr. Daniel Lozano Borregón, por habernos facilitado el biomaterial, la osteostatina y las células mesenquimales, todo ello material con el que se ha realizado este trabajo, sin esta colaboración no habría sido posible.

Al CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón), en especial al departamento de cirugía experimental, donde se realizaron las cirugías de nuestro trabajo, por todas las facilidades dadas para su consecución. También agradecer su ayuda en la conservación de los animales y la realización del estudio histológico.

A mis padres, por implicarse en mi formación tanto en valores como profesionalmente, no dejar que me descuidara nunca y porque les debo todo lo que soy.

A Patricia por su ayuda y apoyo constante, por darme esa serenidad necesaria en algunos momentos, así como su comprensión.

A ANA Y MANOLO porque  
también les pertenece a ellos



**Universidad Zaragoza**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Cirugía**

Jorge Gil Albarova, Profesor Titular del Área de Traumatología y Ortopedia,

**INFORMA:**

Que D. Andrés Manuel Gómez Blasco, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado *“Soportes biocerámicos mesoporosos enriquecidos con osteostatina y células mesenquimales para la regeneración de defectos óseos”*, para optar al Grado de Doctor.

La presente Tesis Doctoral ha sido revisada por mí, y la considero conforme y adecuada para ser presentada y optar al Grado de Doctor en Medicina ante la Comisión que en su día se designe.

Zaragoza a 10 de septiembre de 2020

# Índice

<b>JUSTIFICACIÓN DEL TEMA .....</b>	<b>12</b>
-------------------------------------	-----------

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
---------------------------	-----------

1- Función, composición y estructura ósea .....	16
Componentes celulares .....	17
Matriz ósea .....	20
Estructura microscópica .....	21
Estructura macroscópica .....	22
Osteogénesis .....	23
2- Mecanismo de reparación ósea .....	24
Tipos de consolidación ósea .....	25
Etapas de la reparación ósea .....	25
Principales factores .....	27
3- Defectos óseos .....	28
Definición y tipos .....	28
Defectos óseos críticos .....	30
Defectos óseos en modelos animales .....	31
4- Tratamiento de los defectos óseos .....	38
Generalidades .....	38
Regeneración tisular guiada .....	42
Transporte óseo .....	47
5- Biomateriales .....	50
Definición y clasificación .....	50
Antecedentes históricos .....	51
Propiedades principales .....	52
6- Sustitutos óseos naturales .....	54

Injertos .....	54
Factores de crecimiento .....	61
Plasma rico en plaquetas .....	66
Hormona paratiroidea (PTH) y proteínas relacionadas (PTHrP) .....	68
Células progenitoras .....	70
7- Sustitutos óseos sintéticos .....	74
Metales .....	75
Cerámicos .....	79
Polímeros .....	91
8- Ingeniería de tejidos .....	97
<i>Scaffolds</i> .....	99
Terapia celular .....	106
Biomoléculas estimulantes en ingeniería tisular .....	110

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....113**

1- Hipótesis .....	114
Hipótesis verdadera .....	114
Hipótesis nula .....	114
2- Objetivos .....	115
Objetivo general .....	115
Objetivos específicos .....	115

## **MATERIAL Y MÉTODO .....116**

1- Metodología y diseño experimental .....	117
--	-----

2- Material de experimentación .....	119
Material de implantación .....	119
Animal de experimentación .....	121
Anestesia, cuidados y eutanasia .....	123
3- Implantación quirúrgica .....	126
4- Estudios realizados .....	131
Evaluación macroscópica .....	131
Evaluación microscópica .....	132
Evaluación radiológica .....	133
Análisis estadístico .....	134

## **RESULTADOS .....135**

1- Hallazgos intraoperatorios .....	136
2- Seguimiento de los animales .....	137
3- Resultados macroscópicos .....	139
4- Resultados microscópicos .....	143
Animales con <i>scaffold</i> .....	144
Animales con <i>scaffold</i> + células mesenquimales.....	146
Animales con <i>scaffold</i> + osteostatina .....	150
Animales con <i>scaffold</i> + MSC + OST .....	154
5- Resultados radiológicos .....	157
Animales con <i>scaffold</i> .....	157
Animales con <i>scaffold</i> + células mesenquimales.....	158
Animales con <i>scaffold</i> + osteostatina .....	159
Animales con <i>scaffold</i> + MSC + OST .....	160
Análisis volumétrico .....	160

<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>164</b>
1- Análisis del estado actual .....	165
2- Análisis del defecto óseo .....	167
3- Análisis del modelo experimental .....	170
4- Análisis del material de implantación .....	175
Análisis del <i>scaffold</i> .....	175
Análisis del uso de células mesenquimales.....	179
Análisis del uso de osteostatina .....	180
5- Análisis histológico de la implantación del biovidrio .....	184
Análisis macroscópico .....	184
Análisis microscópico .....	186
6- Análisis radiológico de la implantación del biovidrio .....	192
Análisis micro-TAC .....	192
Análisis Volumétrico .....	196
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>199</b>
<b>RESÚMENES .....</b>	<b>201</b>
1- Resumen .....	202
1- Summary .....	204
<b>ANEXO .....</b>	<b>207</b>
1- Histogramas .....	208
<i>Scaffold</i> .....	208

<i>Scaffold</i> + células mesenquimales .....	209
<i>Scaffold</i> + osteostatina .....	211
<i>Scaffold</i> + MSC + OST .....	213
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>215</b>



# **Justificación del tema**

El tratamiento de los defectos óseos de grandes dimensiones en la traumatología actual, sigue representando un reto de difícil solución. Los cambios en la esperanza de vida y en las actividades que se realizan en la sociedad actual, han contribuido a aumentar el riesgo de padecer este tipo de lesiones (infecciones, tumores, accidentes de alta energía...).

La regeneración ósea es un proceso natural, por el cual se crea hueso nuevo durante el proceso de remodelado normal, así como después de una lesión. Sin embargo, existen ciertas situaciones clínicas, donde el hueso no puede curarse porque el defecto es demasiado grande o porque se ha perdido gran parte de su capacidad regeneradora, por ejemplo, en situaciones de osteoporosis y osteopenia.

Para tales situaciones ha emergido, la ingeniería de tejidos del hueso como una prometedora técnica para estimular la regeneración del hueso del huésped sin plantear los problemas encontrados en los métodos habituales de injerto óseo en los que el patrón oro es el propio hueso del paciente (1,2). La ingeniería de tejidos utiliza los andamios porosos tridimensionales de un biomaterial que actúan como un marco temporal que proporciona un medio conveniente para el crecimiento normal de las células y, por tanto, ayudan en la regeneración de los tejidos óseos (3).

Hace más de una década que se sabe que los biomateriales por si solos, aunque sean bioactivos y formen una fuerte unión al hueso, no son suficientes para este propósito. Por ello los investigadores en este campo hace tiempo que se dirigen hacia los tres pilares de la ingeniería de tejidos, es decir la fabricación de soportes fabricados de un biomaterial con la superficie cubierta con moléculas osteoinductoras y células. Esos conjuntos se denominan equivalentes tisulares y también “constructos” a partir de la palabra inglesa *constructs*.

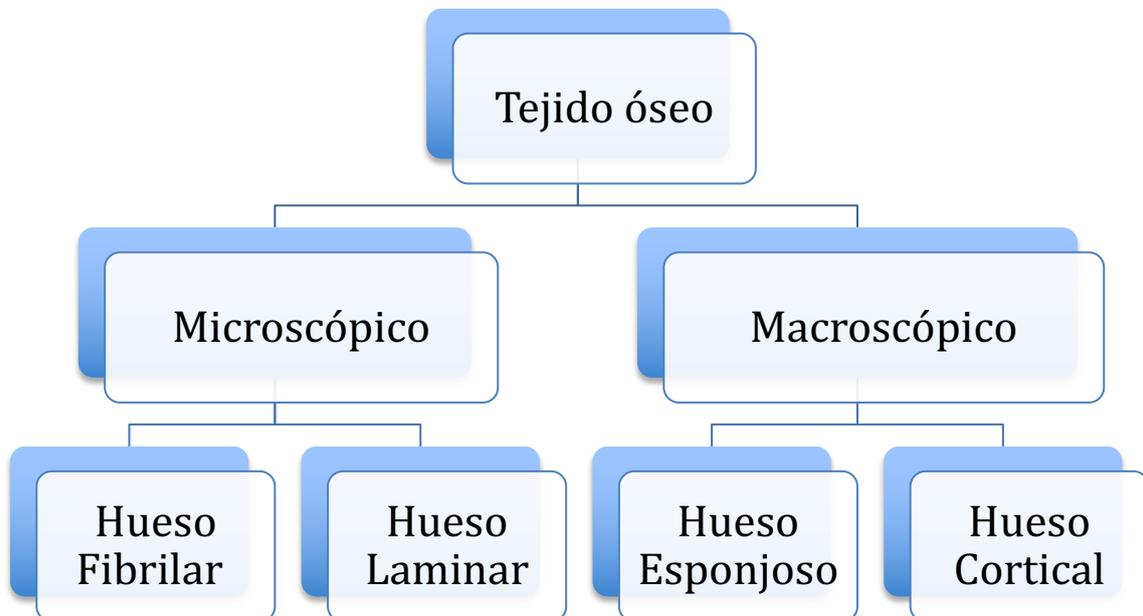
Por todo ello, debido a la actualidad y relevancia del tema, mi interés en realizar un proyecto de investigación experimental para alcanzar el Grado de Doctor, me han llevado a realizar este trabajo.

Este trabajo de Tesis Doctoral es fruto del proyecto competitivo financiado “Soportes biocerámicos enriquecidos con células mesenquimales y osteostatina para la regeneración de defectos óseos P115/00978” financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado con Fondos FEDER, Ministerio de Sanidad y Consumo (1-1-2016-31-12-2018). Se ha realizado en colaboración con los miembros del departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la facultad de farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en especial con los doctores Antonio Jesús Salinas Sánchez, Sandra Sánchez Salcedo, Clara Heras Rubio y Daniel Lozano Borregón.

# Introducción

## 1. Función, composición y estructura ósea.

El hueso es un órgano compuesto de diversos tipos de tejidos (óseo, conectivo, nervioso, vascular) que tienen una estructura microscópica y macroscópica concretas y claramente diferenciadas (4), como vemos en la imagen 1. Es un órgano cuyos tejidos se encuentran en proceso de constante de creación y destrucción de sus estructuras, conociendo este conjunto de procesos como remodelación ósea. Estos cambios son mediados por mecanismos biológicos (hormonas, vitaminas, factores de crecimiento) o como respuesta a estímulos físicos (presión, tracción) (5).



**Imagen 1:** Esquema de la estructuración ósea

El tejido óseo, tiene una composición de materia orgánica (células 2% y matriz ósea 98%) que representa hasta el 30% del total y el 70% restante sería la materia inorgánica: hidroxapatita 95% (concretamente carbonato de hidroxapatita nanocristalina y deficiente en calcio) y resto de minerales. (6).

Las funciones del hueso como órgano son variadas, pero de ellas, las más importantes son:

- Proteger los órganos internos.
- Alojar la médula ósea, con su función hematopoyética.
- Contribuir como regulador de la homeostasis del Calcio y otros iones, al actuar de depósito y permitir su almacenamiento y liberación.
- Dar soporte mecánico al cuerpo humano y para el aparato locomotor, gracias al sistema muscular permite los movimientos (4).

### **Componentes celulares**

Existen distintos tipos de células en el tejido óseo desde células adiposas, epiteliales o del sistema inmune (linfocitos, monocitos, macrófagos). La médula ósea es rica en células madre mesenquimales, cinco tipos distintos de células pueden diferenciarse a partir de estas (fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos), como respuesta a distintas señales celulares que inician la diferenciación (7), como vemos en la imagen 2. Si bien las células características de este tipo de tejido se dividen en dos grupos osteoformadoras (osteoblastos y osteocitos) y osteodestructoras (osteoclastos) (8). El proceso de diferenciación osteoblástica tiene en cuenta diversos factores como son los genéticos y los factores de crecimiento. La familia de genes Hedgehog, *Ihh* (Indian Hedgehog) y *Shh* (Sonic Hedgehog), el factor de transcripción *Cbfa1* (conocido también como *Runx2*) y sobretodo las BMPs (*Bone Morphogenetic proteins*- Proteínas óseas morfogenéticas) que son el principal regulador para la diferenciación osteoblástica (9,10).

#### **A) Osteoblastos**

Son células grandes (20-30  $\mu m$ ) con forma poliédrica que en su interior se componen de un importante retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, por ello su aspecto basófilo. Proviene de las células madre mesenquimales en la médula

ósea, el periostio, el endostio y los pericitos vasculares (11,12). Estas células se encuentran conectadas con otras del mismo tipo y con osteocitos, con expansiones citoplasmáticas mediante integrinas y proteínas transmembrana, lo cual permite el paso de mensajeros como las citoquinas, el calcio o las prostaglandinas (13). La vida media es de 1 a 10 semanas, al final de ellas pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis o convertirse en células en estadios más avanzado de maduración: osteocitos (15%) o en células de revestimiento (*lining cells*) (14). Las funciones de los osteoblastos son las siguientes (8):

1- Sintetizar el colágeno y las proteínas no colágenas de la parte orgánica de la matriz ósea, así como dirigir la unión de las fibrillas extracelulares de la matriz.

2- Sintetizar factores de crecimiento

3- Sintetizar citoquinas específicas (proteasas neutras) de los fenómenos de resorción mediados por osteoclastos.

4- Contribuir a la mineralización de la matriz osteoide, mediado por la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP).

## **B) Osteocitos**

Son las células maduras más abundantes en el hueso (10 veces más que los osteoblastos) y se encuentran en su interior, a diferencia de los osteoblastos, osteoclastos y *lining cells* que se encuentran en la superficie. Tienen forma estrellada y provienen de los osteoblastos que se quedan incluidos durante el proceso de mineralización de la matriz osteoide (14). Se encuentran en el interior de lagunas y se comunican entre ellas por canaliculos óseos, se organizan en sincitios de células interconectadas para garantizar el aporte de nutrientes y oxígenos. Cuando ocurren fracturas los osteocitos situados a más de 0,1 mm de un capilar sano, sufren procesos de hipoxia y necrosis (15). Los osteocitos intervienen en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, aunque su principal función es la de participar en el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas (7,16).

### C) Células de revestimiento (*lining cells*)

Son células planas y alargadas, con núcleos en forma de huso y escasos orgánulos en su citoplasma. Proviene de los osteoblastos, tras finalizar la síntesis de la matriz ósea. Se encuentran en la superficie endostal como una capa protectora de la superficie ósea e intervienen en el proceso de remodelado óseo. Tienen conexiones similares a las de los osteoblastos entre sí y con los osteocitos (14).

### D) Osteoclastos

Son células gigantes (100  $\mu\text{m}$ ) multinucleadas con un citoplasma rico en mitocondrias y vacuolas, tienen un reborde rugoso cuya superficie aumenta el área de contacto con el hueso para permitir su reabsorción. Se originan de las células madre conocidas como Unidades Formadoras de Colonias de Macrófagos-Granulocitos (GM-CFU: *Granulocyte-Macrophage Colony Forming Units*) (17). Se localizan en los espacios de la superficie ósea trabecular, en unas cavidades formadas por la reabsorción conocidas como lagunas de Howship. Su función es la de la reabsorción ósea, para ello se unen a la superficie ósea mediante integrinas y acidifican el medio (fosfatasa ácida tártaro resistente) para permitir la actividad de las proteasas ácidas. Requiere de los osteoblastos para su activación previa, gracias a la actuación del sistema RANK/RANK-L y la osteoprotegerina (OPG) (18,19).

Estroma de la médula ósea	Tejido óseo
Células madre hematopoyéticas	Osteoblastos
Células madre mesenquimales	Preosteoblastos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos
Células endoteliales	Células linfoides

**Imagen 2:** origen y diferenciación de las células del tejido óseo.

## **Matriz ósea**

### **A) Componente inorgánico**

Constituye alrededor del 70% del tejido óseo, si tenemos en cuenta el agua que representa entre el 5-7% del total. La mayoría de esta parte inorgánica, hasta el 85-90%, lo constituye el fosfato cálcico dispuesto en cristales como la hidroxiapatita (carbonato de hidroxiapatita nanocristalina), aunque con la edad disminuye este porcentaje. Otros compuestos presentes son los iones carbonato formando carbonato de hidroxiapatita e iones magnesio en la red de la fase cristalina tipo apatita (20).

### **B) Componente orgánico**

A este componente orgánico durante la fase de la formación ósea, se le conoce como osteoide hasta que tiene lugar el proceso de mineralización. Representa el 98% del total orgánico del tejido óseo, y está formado por distintos tipos de proteínas como vemos en la imagen 3. La mayoría lo forman las fibras de colágeno tipo I (90%) dispuesta en línea con una estructura de triple hélice, que aportan resistencia a la tracción, las fibras de colágeno tipo III, V y XII llegan en torno al 5% (21). También encontramos proteínas no colágenas, que actúan como reguladores del metabolismo óseo (22).

Los proteoglicanos son moléculas grandes que actúan en las fases iniciales de la morfogénesis y en las fases siguientes de la formación ósea. La osteocalcina es una pequeña proteína sintetizada por los osteoblastos y las plaquetas, sus niveles plasmáticos son considerados como un marcador de osteogénesis. Dentro de las glucoproteínas encontramos varias: la osteonectina es necesaria para la mineralización, tiene alta afinidad por el colágeno tipo I y juega un papel importante en la regulación de la adhesión entre la matriz y las células; la fosfatasa alcalina es una enzima necesaria para la mineralización, existen varias isoenzimas que pueden usarse como marcadores de la actividad osteoblástica; las proteínas con el grupo

RGD (el tripéptido Arginina-Glicina-Aspártico) participan de la adhesión a la matriz y son fundamentales para la regeneración y remodelado óseo, ya que la secuencia RGD es reconocida por los osteoblastos y por las integrinas de los osteoclastos. Por último los factores de crecimiento que son polipéptidos sintetizados en el hueso o en otros órganos que colaboran en el crecimiento y diferenciación celular (8).

<b>Colágeno</b>	•Tipo I, III, V y XII
<b>Proteoglucanos</b>	•Condroitín sulfato •Hialuronos
<b>Proteínas con ácido <math>\gamma</math>-carboxiglutámico</b>	•Osteocalcina
<b>Glucoproteínas</b>	•Osteonectina •Fosfatasa alcalina •Proteínas con el grupo RGD: fibronectina, osteopontina, vitronectina, sialoproteína óseas
<b>Factores de crecimiento</b>	•IGF-I-II, TGF- $\beta$ , PDGF
<b>Proteínas del plasma</b>	•Albúmina

**Imagen 3:** Proteínas de la matriz osteoide

### **Estructura microscópica**

#### **A) Hueso fibrilar, primario o inmaduro**

Ambos tipos de hueso presentan la misma composición; lo que los diferencia es la estructura microscópica que adquieren. En el hueso fibrilar las fibras de colágena no siguen una orientación uniforme y sus diámetros son variables, además existe mayor celularidad distribuida desordenadamente. Debido a esta disposición más desordenada es un tipo de hueso más flexible y deformable. Este tipo se encuentra principalmente en los estados de desarrollo (embrión, zona metafisaria de crecimiento) y en el callo de fractura, ya que lo que busca es la creación rápida de hueso (21).

### **B) Hueso laminar, secundario o maduro**

Se diferencia principalmente en la organización y mayor dispersión de las células, así como en la distribución de forma paralela de las fibras de colágeno. Gracias a esto posee una mayor resistencia cuando las fuerzas son paralelas al eje longitudinal de sus fibras. Este tipo se encuentra en el hueso maduro a partir de los 4 años (excepto la zona metafisaria de crecimiento).

## **Estructura macroscópica**

### **A) Hueso esponjoso**

Constituye entre el 50 y el 90% del hueso total. Tiene una disposición tridimensional que se orienta según las cargas de fuerza transmitidas, con ello también se obtiene una mayor disponibilidad para el intercambio y regulación del metabolismo óseo, es el tipo de hueso que presenta una mayor tasa de remodelamiento (8 veces más que el hueso cortical). Se localiza principalmente en las metáfisis y epífisis de los huesos largos, y en el interior de los huesos cortos y planos. Al disponerse ocupando una mayor superficie, su vascularización también es mayor, al igual que su flexibilidad; por el contrario su densidad y resistencia (en particular a la compresión y cizallamiento) es menor. A diferencia del hueso cortical en el que sus células se disponen formando sistemas Haversianos, en el hueso esponjoso siguen una disposición en láminas (23,24).

### **B) Hueso cortical o compacto**

Representa en torno al 10% del hueso total. Se encuentra en la diáfisis de los huesos largos y envolviendo a los huesos cortos y planos. Tiene una disposición densa para favorecer una mayor resistencia (en particular a la tensión y torsión), con lo que su superficie y vascularización es menor. Se organiza de una forma concreta, el Sistema Haversiano. Su unidad fundamental es la osteona: laminillas óseas que se

disponen de forma concéntrica formando cilindros, en su centro se encuentran unos conductos llamados conductos de Havers, por los que llega la vascularización e inervación. A su vez estos conductos se comunican entre sí, con la superficie externa del hueso y con la cavidad medular por otros conductos transversales (Conductos de Volkman) (23,24).

## **Osteogénesis**

### **A) Osificación membranosa o intermembranosa**

Es el tipo de osificación menos frecuente, ya que de forma primaria se da en pocos huesos (bóveda craneal, faciales y clavícula) aunque también puede verse como respuesta a fracturas que consolidan de forma primaria (estabilidad absoluta) o en la osteogénesis por mecanismo de distracción. En este tipo se produce la formación de hueso de manera directa, sin pasar por la fase cartilaginosa, sobre la membrana mesenquimal. Tiene un inicio central (centro de osificación primario) en el que, tras un aumento de la vascularización, se forma matriz osteoide en la que se deposita directamente cristales de hidroxapatita completando el proceso de mineralización (25,26).

### **B) Osificación endcondral o cartilaginosa**

Es la más frecuente y se da de forma primaria en la mayoría de los huesos (extremidades, base del cráneo, tórax), también lo encontramos en el crecimiento longitudinal de los huesos y en los callos de fractura (consolidación secundaria por estabilidad relativa). En un primer momento se parte del cartílago hialino, que es como un molde de menor tamaño del hueso que se va a formar, proliferan los condrocitos y se reduce la matriz cartilaginosa hasta la muerte de los condrocitos. Tras esto, los espacios dejados se rellenan de vasos sanguíneos y células precursoras óseas que inician el proceso de producción de matriz ósea y su calcificación (26).

## 2. Mecanismos de reparación ósea

La regeneración ósea es un proceso fisiológico complejo de formación de hueso, que puede verse tanto en situaciones de curación de fracturas, como durante el remodelado que tiene lugar durante la vida adulta. El tejido óseo es el único del organismo, con excepción del embrionario, que tiene la capacidad de regenerarse permitiendo su *restitutio ad integrum* tras sufrir una lesión (8).

El hueso posee la capacidad de regeneración por sí mismo como repuesta a las lesiones, este proceso involucra a distintos tipos de células, así como a un gran número de mediadores moleculares intra y extracelulares. Siguen una secuencia temporal y espacial definida con la que se trata de recuperar la función esquelética y su reparación de la manera más óptima (27). Este proceso de reparación cuando se da en fracturas se le conoce como consolidación ósea y se divide en distintas fases, y puede darse de una forma directa o indirecta, en función de las características de la fractura, el medio que la rodea y su estabilidad.

Esta actividad de reparación puede verse en distintas situaciones como tras una fractura, o para la osteointegración de implantes o de injertos. Cuando se lesiona el tejido óseo se pone en marcha una serie de mecanismos fisiológicos y biomecánicos, en los que pueden intervenir los procesos osteogénicos vistos anteriormente (osificación membranosa o endocondral). El objetivo de estos mecanismos es conseguir la regeneración del tejido óseo sin dejar una cicatriz, siendo imposible distinguir el hueso nuevo del preexistente en todas sus propiedades, aunque existen situaciones especiales en la práctica clínica, donde estos mecanismos son insuficientes (28).

## **Tipos de consolidación ósea**

### **A) Consolidación primaria o directa**

Constituye un intento directo de la cortical ósea de restablecer la continuidad entre los fragmentos de la fractura, para ello se requiere estabilidad absoluta del foco de fractura y la alineación de los fragmentos. En este tipo de consolidación suele darse una osificación del tipo membranosa. Los osteoblastos derivados de las células mesenquimales, se depositan en la superficie ósea expuesta y se restablecen los sistemas haversianos a través de la línea de fractura (29).

### **B) Consolidación secundaria o indirecta**

En ella participan los tejidos blandos que rodean al hueso, la osificación que se da es de tipo endondral y se dan varias fases que incluyen la formación de un callo óseo. La inestabilidad en el foco de fractura o la hipoxia son, entre otros, factores que favorecen que se de este tipo de consolidación. El periostio juega un papel fundamental, ya que las células progenitoras osteoblásticas de su capa más interna darán lugar a los osteoblastos como respuesta a las señales celulares (29).

## **Etapas de la reparación ósea**

La reparación ósea se puede ver como una serie de 4 fases (como pueden verse en la imagen 4) que ocurren de manera consecutiva y que a la vez se superponen (30), algunas fases como la formación del callo óseo es más típica de la consolidación secundaria.

### **1) Respuesta inflamatoria**

Comienza inmediatamente al producirse una disrupción de la superficie ósea y dura 3-4 días. Se produce una necrosis del tejido óseo que a nivel histológico se ve como un vacío lacunar a su vez, debido a la extravasación sanguínea por la rotura de los vasos se produce un hematoma y la migración de factores inflamatorios y células

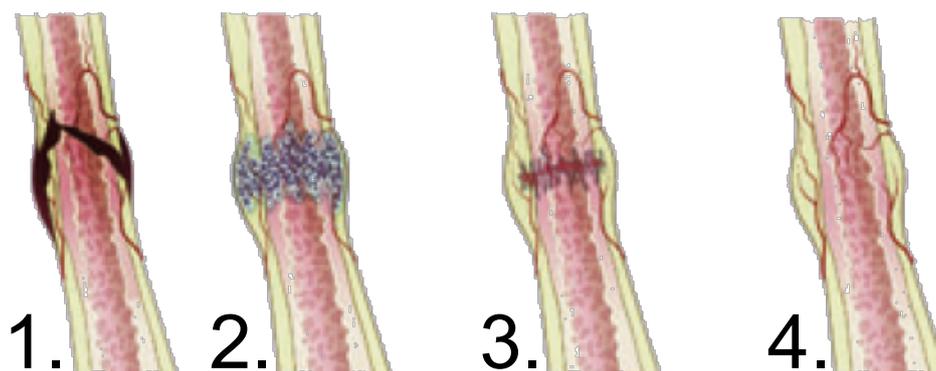
(polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos), conforme se agota esta fase los osteoblastos comienzan a producir matriz ósea (31).

## 2) Fase de reparación

Esta fase se compone a su vez de otras dos. Inicialmente ocurre la formación del callo blando que consiste en la transformación del hematoma en un tejido de granulación de tipo cartilaginoso, con predominio del colágeno tipo I. Tras esta etapa inicial comienza la formación del callo duro (osificación endocondral) que consistirá en la mineralización del callo previo, siendo este todavía un hueso inmaduro que no tiene las mismas propiedades que el hueso original (29,31).

## 3) Fase de remodelado

Esta última fase trata de transformar el hueso inmaduro en hueso maduro (laminar) con una adaptación morfológica a las propiedades y funciones óptimas del hueso previo a la lesión. Es un proceso lento que puede durar años y representa hasta el 70% del tiempo total de curación de una fractura.



**Imagen 4:** fases de la reparación ósea: 1. Fase inflamatoria. 2. Fase de reparación con formación del callo blando. 3. Fase de reparación con formación del callo duro. 4. Fase de remodelado. *Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures (29).*

## **Principales factores**

El proceso de reparación ósea es complejo e intervienen numerosos factores en ella, tradicionalmente se hablaba de un triángulo de factores biológicos e interrelacionados entre sí (32,33) que influían en la consolidación. Las células osteogénicas serán las encargadas de regenerar el hueso perdido, pero para ello necesitan un soporte o estructura con propiedades osteoconductoras como es la matriz ósea extracelular; además se necesitan elementos osteoinductores que estimulan la diferenciación celular hacia la osteogénesis como son los factores de crecimiento, interleucinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

Recientemente se ha introducido un cuarto factor biomecánico convirtiendo el triángulo en un diamante en el que todos los elementos se relacionan entre sí (34,35), como puede verse en la imagen 5. Este factor sería la estabilidad mecánica de la fractura y como ésta es necesaria para poder desarrollar el proceso de reparación ósea.



**Imagen 5:** factores principales que influyen en la reparación dispuestos en diamante.

### **3. Defectos óseos**

#### **Definición y tipos**

A pesar de la gran capacidad de regeneración, comentada en el punto anterior, que tiene el tejido óseo, permitiendo su curación por sí misma sin dejar cicatriz, existen situaciones en las que esto no es posible por exceder al potencial reparador que posee el hueso. Esta capacidad regeneradora puede verse superada por la gravedad de la lesión, las condiciones locales y/o las condiciones generales que la rodean.

Cuando esta capacidad regeneradora se ve superada se generan los defectos óseos, estos son favorecidos por distintas situaciones: la gravedad de la lesión (traumatismo de alta energía, fracturas abiertas), resecciones tumorales amplias, tratamiento de grandes deformidades óseas, los aflojamientos de implantes, condiciones locales como la pseudoartrosis, necrosis avasculares o las infecciones, y condiciones generales como la osteoporosis, alteraciones en el metabolismo óseo o desnutrición entre otras (36). A parte de estas situaciones especiales concretas, los factores biológicos como son la desvascularización excesiva durante el tratamiento (desperiostización, fresado intramedular), la pérdida de hueso, la edad o factores mecánicos como la inestabilidad, también influyen en estos problemas en la regeneración.

El tratamiento de este tipo de lesiones conlleva un elevado impacto económico y un manejo clínico complejo, por ello se ha intentado profundizar en su comprensión y caracterización. Los estudios a largo plazo sobre los resultados obtenidos en su manejo son limitados por las altas tasas de complicaciones, re-intervenciones y los pobres resultados funcionales obtenidos. Existe controversia en cuanto a su definición precisa, o en como determinar si un defecto óseo es considerado como crítico, con las

implicaciones que ello asocia. Por ello existe la necesidad de buscar una estandarización en su caracterización y en su manejo terapéutico integral basado en la evidencia (37).

Existen distintas formas de clasificar a este tipo de defectos (38), en función del tejido óseo que se ve afectado (esponjoso o cortical), de si produce un defecto crítico, de su relación con el hueso que lo rodea (defectos cavitarios son aquellos en los que se respeta la continuidad anatómica del hueso, frente a los defectos segmentarios en los que la ausencia de tejido óseo provoca una pérdida de la continuidad anatómica del hueso afecto) o de su localización (episifisarios, metafisarios y diafisarios).

En los defectos metafisarios se busca conseguir con su tratamiento varios objetivos tales como dar soporte mecánico a la superficie articular y mantener un stock óseo suficiente, en caso de que posteriormente se necesitara una artroplastia (39). Los defectos metafisarios suelen darse en hueso esponjoso, es una zona donde el entorno biológico es en general favorable para la regeneración por lo que suelen curar por sí mismos, aunque este proceso no es tan rápido ni se consigue volver al estado previo del que se parte. Se ha visto en estudios recientes sobre fracturas metafisarias de muñeca con pérdidas óseas importantes, como aunque sus resultados clínicos fueran satisfactorios, en estudios volumétrico de densidad ósea disminuía significativamente incluso a los 2 años de la resolución de la fractura (40).

Por otro lado los defectos diafisarios que se dan principalmente en hueso largos y tejido óseo de tipo cortical, tienen características distintas ya que suelen producirse por mecanismos de alta energía produciendo pérdida inicial de hueso, fracturas conminutas y afectación de las partes blandas circundantes. Los objetivos que se buscan aquí son mantener la continuidad anatómica de la extremidad. La situación biológica en esta localización es más desfavorable, con una peor

vascularización siendo más frecuente las situaciones de pseudoartrosis y retrasos de la consolidación (39).

### **Defectos óseos críticos**

Debido a que precisan un manejo terapéutico especializado y complejo, su identificación precoz puede evitar retrasos en su tratamiento y disminuir el riesgo de cirugías innecesarias. No existe una única definición y depende también del modelo en el que se aplican (humanos o animales) (37). Una definición inicial sería que son aquellos defectos en los que no habría curación espontánea, a pesar de la estabilización quirúrgica y requiere alguna intervención quirúrgica adicional para su restitución (41).

Una definición basada en el tiempo sería que los defectos óseos críticos son aquellos en los que no se produce su reparación de forma espontánea a pesar del tiempo que transcurra. Inicialmente, se definieron estos defectos como aquellos en los que transcurridas 52 semanas de la producción del defecto, no se había producido la regeneración completa del mismo (42). Son estos defectos que no curan por sí mismos, donde resultan especialmente necesarias medidas adicionales para ayudar a la restitución del tejido óseo, al no ser su capacidad regenerativa suficiente, existiendo múltiples opciones que veremos a continuación. Otras consideraciones como las anatómicas también han sido tenidas en cuenta para su caracterización, como la longitud del defecto fuera superior a 2 cm y mayor del 50% del diámetro del hueso (41,43); otros factores pueden modificar el tamaño necesario para que un defecto se convierta en crítico como son el estado de las partes blandas adyacentes y factores dependientes del paciente como la edad, enfermedades crónicas y comorbilidades previas (37).

La localización anatómica tiene influencia en la evolución del defecto, se ha descrito como defectos entre 6-15 cm, localizados en el fémur y con buen estado de las partes blandas adyacentes, han conseguido su consolidación (44). Por otro lado defectos en la tibia, mucho más pequeños, entre 1-2cm, con afectación mayor del 50% del diámetro del hueso y afectación de partes blandas, conseguían pobres resultados en su consolidación (45). Esto es un problema porque la mayoría de estas lesiones (hasta el 60%) se localizan en la tibia y en concreto en su zona diafisaria (41).

A pesar de los múltiples factores que pueden influir en la definición de un defecto óseo crítico se ha tratado de realizar una clasificación para tratar de unificar su manejo. Defectos menores: pérdida del 50% del diámetro del hueso y <2 cm de defecto. Defectos intermedios: pérdida >50% del diámetro del hueso y entre 2-6 cm de defecto. Grandes defectos: > 6 cm de defecto (46).

Es importante diferenciar la pseudoartrosis y los retrasos de la consolidación de los defectos óseos críticos. Las pseudoartrosis se deben a fallos biológicos y/o a fallos mecánicos (inestabilidad) del proceso de consolidación, y pueden asociar defectos óseos o no, por ello no siempre será necesario en estos casos el uso de injertos para su tratamiento, a diferencia de los defectos óseos críticos en los que para su resolución siempre se requerirá el aporte de algún tipo de injerto (47).

### **Defectos óseos en modelos animales**

Para determinar la seguridad de un nuevo material, y que cumple con los requerimientos necesarios en cuanto a biocompatibilidad y estabilidad mecánica, deber ser sometido a estudios *in vitro* e *in vivo*, previamente a su uso clínico en seres humanos. Como estudios preclínicos *in vivo* se usan modelos animales de manera habitual, permiten estudiar distintas situaciones como la carga o descarga sobre el hueso, trabajar con distintas calidades de hueso (fracturas, osteoporosis, sano) y

edades (48). Existen definiciones específicas para cada especie, pero algunos autores han definido el defecto óseo crítico en un modelo animal como: la lesión ósea del menor tamaño en un hueso y especie concretos, que no curaría durante la vida del animal o que durante su vida presentaría menos del 10% de regeneración (42).

Actualmente se utilizan una amplia variedad de especies para realizar estos estudios, si bien, los animales empleados de manera más habitual son: ratones, ratas, conejos, perros, ovejas, cabras, cerdos o caballos. No existe un modelo perfecto que replique de manera exacta el proceso de consolidación ósea humana (49). Cada especie tiene ventajas y desventajas características por su similitud a los humanos en la macro/microestructura, su composición y remodelación ósea (48), como puede verse en la imagen 6. Pero existen también otros factores a tener en cuenta como son los costes de adquisición y cuidado, la disponibilidad de los animales, tolerancia a la cautividad, facilidad para la estabulación; y un punto cada vez más importante es su implicación ética y la aceptación del uso de determinados animales para la experimentación por parte de la sociedad (50).

	<i>Perro</i>	<i>Oveja/cabra</i>	<i>Cerdo</i>	<i>Conejo</i>
<i>Macroestructura</i>	++	+++	++	+
<i>Microestructura</i>	++	+	++	+
<i>Composición ósea</i>	+++	++	+++	++
<i>Remodelado óseo</i>	++	++	+++	+

**Imagen 6:** similitudes en 4 propiedades entre el hueso animal y el humano (48).

Aunque las propiedades del hueso de los primates no humanos son las que mayor parecido presentan con los humanos, existen claras implicaciones éticas en

usar estos animales en experimentación médica, así como el coste económico, dificultad de manejo o riesgo de contraer zoonosis (enfermedades transmitidas de animales a humanos). Con los perros al ser animales en ocasiones de compañía las implicaciones éticas y emocionales son similares. Con las ovejas, cabras y cerdos las implicaciones emocionales son menores pero su estabulación, espacio necesario y cuidados presentan mayor complejidad que el uso de conejos, aunque sus propiedades difieran más de los humanos. Por todo lo mencionado anteriormente deberá elegirse el modelo animal más apropiado para cada estudio, teniendo en cuenta todos los factores (48). Los modelos *in vivo* más comunes para el estudio de los defectos óseos dependen del tipo de animal empleado y los objetivos que se persiguen (49). Son múltiples los modelos animales empleados en el estudio de variables que afectan a la curación ósea, como son los factores de crecimiento, el uso de sustitutivos óseos o los cambios histológicos producidos tras un tratamiento (51).

El modelo **canino** ha sido el más empleado para el estudio de las fusiones vertebrales, debido a que esta fusión se produce en los perros de forma natural en casi todos los casos, excepto en los segmentos lumbosacros más móviles. El uso de perros mestizos (sin pedigrí) permite obtener variaciones significativas inter-animal, debido a las diferencias en el peso, talla y características (52,53). La densidad ósea es la más parecida a los humanos, y suele emplearse el fémur para el estudio de los defectos diafisarios. Como desventaja principal está la consideración del perro como animal de compañía lo que implica una importante carga emocional en su uso; además debido a la estructura plexiforme ósea adyacente al periostio, puede aguantar mayores fuerzas de compresión que el hueso humano (49).

Los **ratones y ratas** constituyen el modelo más comúnmente usado en laboratorio debido a su bajo coste, la facilidad para su estabulación y cuidado, así como la menor carga emocional para la sociedad que produce su uso, en lugar de

animales mayores (51). Las localizaciones anatómicas disponibles están más limitadas por su reducido tamaño, suelen realizarse defectos óseos segmentarios en el fémur de unos 5 mm de longitud (54). Debido a su uso extendido en otros campos, el uso de roedores manipulados genéticamente para estudiar específicamente algún tipo celular o la ausencia de expresión de algún gen (ratones *Knock-out*) es más accesible que en otros animales y con menos coste económico. Entre sus principales defectos se encuentra la ausencia de sistemas Haversianos y que las placas de crecimiento permanecen abiertas de forma permanente (49).

Las **ovejas** tienen una edad y un peso similar a los humanos y las dimensiones de sus huesos permiten alojar implantes quirúrgicos. Como diferencias se observan que la distribución del peso en las extremidades es distinto debido a la marcha cuadrúpeda y que la densidad del hueso trabecular es 1,5-2 veces mayor que el hueso humano, lo cual le confiere una mayor resistencia (49). Se realizan defectos segmentarios en la tibia de hasta 50 mm de longitud y suelen requerir estabilización intramedular con agujas o externa con fijadores, su seguimiento suele ser de entre 3 y 4 meses (50,51). Las **cabras** son menos empleadas en estudios sobre regeneración ósea, en cambio es frecuente su uso en estudios sobre el cartílago, los meniscos o reparaciones ligamentarias. Tienen la ventaja al igual que las ovejas que al ser considerados animales productores de alimentos, su uso experimental tiene una percepción menos crítica por parte de la población (48).

Los **cerdos** se han empleado en una amplia variedad de estudios que incluyen la osteonecrosis de la cabeza femoral, fracturas óseas clásicas u osteocondrales, y de diseño de implantes. Los cerdos comerciales para alimentación no son los más deseables para la experimentación en ortopedia, debido a la prolongada tasa de crecimiento y el peso final excesivo. Por ello, el desarrollo de cerdos en miniatura o microcerdos, han contribuido a solucionar este problema. No obstante, los cerdos se

consideran de difícil manejo, ruidosos y agresivos, por lo que suelen emplearse otros modelos (48).

El modelo **equino** es el recomendado por la FDA (*Food and Drugs Administration*) para el estudio de la osteoartritis y la investigación comparativa de las articulaciones (55). Entre sus ventajas se encuentra el remodelado óseo similar al humano y una distribución mecánica de las cargas del aparato musculoesquelético similar. Entre sus defectos se encuentra su elevado coste a todos los niveles (estabulación, cuidados, precio o carga emocional) (49). Se han usado modelos de defectos segmentarios, de hasta 15 mm, en el 4º metacarpiano y suelen estabilizarse con placas de compresión dinámica y tornillos corticales (56).

Los **conejos** son uno de los animales más pequeños que tienen huesos largos y una anatomía espinal lumbar comparable a la de los seres humanos, así como suficiente cresta iliaca para poder proporcionar injerto autólogo para tratamientos (57). El uso de conejos como modelo animal para el estudio de los defectos óseos ha sido ampliamente utilizado, con múltiples estudios sobre defectos óseos críticos en fémures de conejo y el empleo de distintos materiales en su reparación.

En el estudio de los defectos óseos críticos existen modelos concretos sobre los que se han realizado múltiples estudios. El uso de controles en los estudios, ha permitido la correcta caracterización de estos defectos y permitir su comparación con otros trabajos como es el caso de los modelos con conejos (58–64). En nuestro grupo, se han utilizado dos modelos en fémur principalmente para el estudio de los tipos de defectos óseos en conejos, uno de ellos **epifisario** en la cara lateral de ambas epífisis femorales distales realizado con broca motorizada de 5 mm de diámetro, así como con una profundidad del defecto de 10 mm; el otro defecto fue de tipo **diafisario**, creado con una sierra motorizada, en el 1/3 medio de la diáfisis femoral, de 15 mm de longitud

y se incluía la cubierta perióstica. En los defectos diafisarios se asoció osteosíntesis con una placa anterior para evitar inestabilidad rotacional, y una aguja de Kirschner intramedular, para mejorar su rigidez. Los estudios radiográficos realizados en los controles mostraron escasos cambios, no se encontró relleno de la cavidad, en los defectos óseos creados a lo largo de los 4 meses de seguimiento en los defectos epifisarios y 6 meses en los diafisarios. Se observó la persistencia de la imagen radiográfica del defecto rodeada de un halo de esclerosis que contorneaba la cavidad ósea creada. A nivel macroscópico se pudo demostrar el recubrimiento del defecto óseo creado en todos los fémures intervenidos. A nivel microscópico se identificó una mínima reparación espontánea del interior del defecto óseo creado en todos los controles, pudiendo observarse la reparación del orificio en la cortical, pero sin acompañarse del relleno de la cavidad ósea por hueso esponjoso (58,62).

También se han estudiado estos defectos óseos críticos en conejos, pero en otros huesos como es el cúbito. Creados a través de un abordaje medial del antebrazo, se generó un defecto de 15 mm de longitud en el cúbito, mediante una osteotomía realizada conectando los orificios brocados con un taladro motorizado. Tras 12 semanas no se observó reparación ni signos de regeneración ósea, tras estudio con TAC-3D y en los cortes histológicos (65,66).

Existen modelos de defectos óseos críticos realizados en otros huesos y especies animales. El cráneo es una localización común para ellos, y un ejemplo sería en ratas. Mediante una exposición quirúrgica del hueso temporal del cráneo en una rata, y desperiostización del mismo, tras ello se realiza un defecto de 5 mm de diámetro usando un trócar de tejidos del mismo tamaño. Con un seguimiento de 56 días se comprobó, mediante estudio de micro-TAC, que los defectos generados en el grupo control mantenían su tamaño y no mostraban signos de regeneración (67). Otros estudios con seguimientos mayores, 12 semanas, y estudios por rayos X e

histología mostraban también la ausencia de curación en los controles de los defectos generados (68). En perros también se han practicado defectos críticos en el cráneo (hueso parietal) de mayor tamaño, 20 x 20 mm, y seguimiento mayor 12-24 semanas, obteniendo ausencia de relleno del defecto en los grupos control por TAC, rayos X e histología (69,70).

## 4. Tratamiento de los defectos óseos

### Generalidades

Cuando el potencial de reparación del tejido óseo se ve superado por el defecto óseo, son necesarios elementos adicionales que contribuyan a su curación. La planificación de la reconstrucción de estos defectos es compleja por todo lo explicado anteriormente. Su *gold standard* continúa siendo el injerto autólogo de hueso si bien presenta numerosas limitaciones, tales como: la morbilidad de la zona donante, el volumen limitado de injerto, el mayor consumo de recursos quirúrgicos y los pobres resultados obtenidos en un número significativo de los pacientes tratados (37). Es por ello que existe un interés elevado en el estudio y desarrollo de otros materiales que permitan tratar estos defectos de una manera adecuada, sin las limitaciones existentes en los injertos autólogos.

El tratamiento de estos defectos se basa en los mismos principios que son necesarios para la consolidación ósea, el concepto del diamante introducido por Giannoudis et al (34) donde existen 4 factores principales (estabilidad mecánica, osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción) y factores asociados como las condiciones del huésped y el aporte vascular.

La **estabilidad mecánica** en el proceso de consolidación normal de las lesiones óseas juega un papel clave, demostrando ser un factor que la favorece (34,71). La estabilidad absoluta en las fracturas simples permite una curación primaria del hueso, sin formación de callo, por un mecanismo de remodelado. Por el contrario, cuando no se da esta estabilidad en el foco de fractura, se retrasa el proceso de consolidación y se favorece la formación del callo óseo por un mecanismo de consolidación secundaria. En las fracturas que no tienen un trazo simple o son conminutas, se buscará una estabilidad relativa para contribuir al proceso de

consolidación (72). En los casos más complejos donde existen grandes defectos o alteraciones de la consolidación, como la pseudoartrosis o la no-uni6n 6sea, buscar la estabilidad mecánica tambi6n est6 considerado como uno de los pilares del tratamiento (35).

Para conseguir esta estabilidad mecánica en las lesiones 6seas existen una amplia variedad de t6cnicas que pueden ser conservadoras o quir6rgicas. Dentro de las primeras encontramos las inmovilizaciones con yesos, vendajes, cabestrillos, tracciones axiales entre otras opciones. Para la estabilidad quir6rgica tambi6n existen distintos medios: reducci6n abierta y fijaci6n con placas, fijaci6n con agujas de Kirschner de forma abierta o percutánea, uso de fijadores externos u enclavado endomedular 6seo. Todas estas t6cnicas buscan generar un ambiente de estabilidad mecánica para favorecer as6 el proceso de consolidaci6n (72).

Los otros tres factores principales que contribuyen al proceso de curaci6n 6sea y son claves para el tratamiento de los defectos 6seos son la osteog6nesis, osteoinducci6n y osteoconducci6n, que son caracter6sticas que buscan los materiales biocompatibles (biomateriales) m6s frecuentemente utilizados para el tratamiento de defectos 6seos en traumatolog6a (36,73,74).

La **osteog6nesis** es la capacidad de formaci6n 6sea y depende principalmente de las c6lulas (osteoblastos e indiferenciadas). Estas c6lulas si encuentran un entorno adecuado podr6n transformarse en osteoblastos y osteocitos, para contribuir a la creaci6n de hueso nuevo (36). La presencia de c6lulas con capacidad de generar hueso es considerada como el primer elemento necesario para la consolidaci6n y curaci6n de las lesiones 6seas. En el proceso natural, c6lulas madre mesenquimales son reclutadas al lugar de la lesi6n desde la m6dula 6sea, o transferidas al mismo desde la circulaci6n sangu6nea (34). Un material osteog6nico se define como aquel

que contiene células vivas que son capaces de diferenciarse en hueso (75). El hueso esponjoso al poseer una superficie mayor que el hueso cortical, posee un potencial osteogénico mayor. Un ejemplo sería el aspirado de médula ósea o el injerto óseo autólogo.

La **osteoinducción** es la capacidad para la estimulación de la transformación de las células progenitoras del huésped en osteoblastos. Un material osteoinductor proporciona un estímulo biológico que induce a las células locales o trasplantadas, a entrar en una vía de diferenciación que conducirá a la formación de células osteofomadoras adultas (75). En este proceso interviene una cascada molecular donde tiene un papel importante los factores de crecimiento, interleucinas (IL-1, IL-6) o el factor de necrosis tumoral alfa (36). De forma natural estos factores pueden ser secretados por células endoteliales, plaquetas, monocitos, macrófagos, células progenitoras mesenquimales, condrocitos y por las propias células óseas (osteocitos y osteoblastos). Esta cascada de eventos moleculares desencadena el inicio del proceso de curación (34). La matriz ósea desmineralizada o factores aislados (proteína morfogenética humana o plasma rico en plaquetas) serían ejemplos donde predomina esta propiedad.

La **osteoconducción** es la propiedad de un material para actuar como andamiaje para recibir y guiar el crecimiento óseo, permitiendo la colonización celular por parte del huésped y la proliferación vascular. Sus propiedades se determinan por su configuración tridimensional en el espacio y la capacidad de reabsorción, permitiendo su sustitución por matriz del hueso nuevo. Un material osteoconductor favorece el proceso de orientación de los nuevos vasos sanguíneos y sistemas Haversianos sobre los cuáles se asentarán y proliferarán las células con capacidad regenerativa y comenzarán el proceso de formación de hueso (36). Puede definirse como aquel material que promueve la aposición de hueso a su superficie, y que

funciona en parte como un soporte que facilita la formación de hueso (75). Un ejemplo son los compuestos de fosfato cálcico.

Existen otros dos conceptos en relación al tratamiento de los defectos óseos, que no se encuentran, propiamente, dentro del concepto del diamante, que son la osteopromoción y la osteodistracción, cada una de estas propiedades se asocia a una técnica específica de tratamiento.

La **osteopromoción** es la capacidad para la inducción de la formación de hueso mediante la utilización de barreras (membranas). Este mecanismo se le conoce como regeneración tisular guiada (RTG) o membranas inducidas (76). Se basa en el uso de membranas tipo barrera, para excluir ciertos tipos celulares (tejido conectivo o células epiteliales de rápido crecimiento) de una zona, para así favorecer el crecimiento de otras poblaciones celulares más lentas, capaces de formar hueso. Esta técnica se consigue cuando las células osteoprogenitoras son las encargadas exclusivamente de repoblar el defecto óseo, habiendo evitado previamente la entrada de otros tejidos no osteogénicos, suele emplearse en combinación al uso de injertos óseos (77). El empleo de esta técnica para el tratamiento de defectos óseos fue popularizada por Masquelet (78).

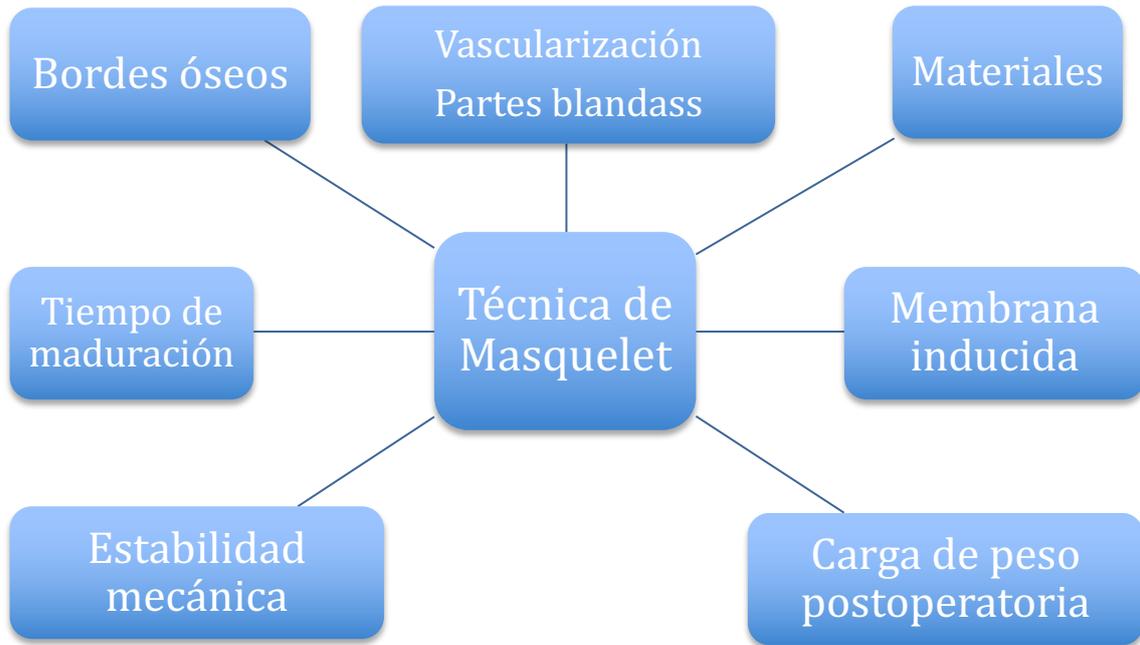
La **osteodistracción** es un proceso en el que se provoca una fractura en el hueso y se realiza una separación progresiva de los fragmentos, estando éstos estabilizados mediante el uso de osteodistractores. Con este proceso se busca la elongación del coágulo de fibrina con la intención de que se creen puentes óseos, consiguiendo con ello el alargamiento progresivo del hueso (79). El empleo de esta técnica para el tratamiento de defectos óseos fue popularizada por Ilizarov (80,81).

Para el tratamiento de los defectos óseos se han desarrollado una serie de técnicas (transporte óseo, regeneración tisular guiada) y de biomateriales (biológicos y sintéticos) que permiten un abordaje de los distintos factores que influyen en la reparación ósea. Generalmente se emplea una combinación de las distintas propiedades mencionadas anteriormente tanto en las técnicas, como en los biomateriales.

### **Regeneración tisular guiada**

Como mencionábamos anteriormente, gracias a la capacidad de osteopromoción, es posible el tratamiento de algunos defectos óseos críticos mediante la técnica popularizada por Masquelet, conocida también como de membrana inducida. Esta técnica representa una alternativa más en el tratamiento de estas lesiones complejas, habiendo demostrado ser clínicamente útil, si bien no se conoce claramente la fisiología del proceso de reparación (82). Presenta ventajas si la comparamos con otras empleadas en situaciones similares (transporte óseo). Ha demostrado ser un método más sencillo y que requiere de un menor tiempo quirúrgico, con un menor riesgo de complicaciones y una menor comorbilidad (83).

Se han descrito múltiples factores que parecen estar implicados en el éxito de esta técnica, pero ninguno ha demostrado ser únicamente determinante. Procederemos a describir algunos de estos factores que ya están presente en el concepto del diamante y algunos otros nuevos que son específicos de esta técnica (82), como vemos en la imagen 7:



**Imagen 7:** factores principales que influyen en la técnica de Masquelet.

**La vascularización y el estado de los tejidos blandos circundantes:** configuran el ambiente necesario para el proceso de reparación aportando nutrientes, marcadores y células osteogénicas(84).

**Los extremos óseos iniciales del defecto:** la correcta preparación de los bordes del defecto se relacionan con la correcta integración del injerto (85), por ello se debe realizar un desbridamiento adecuado, buscar bordes bien vitalizados y evitar la infección y necrosis de los mismos.

**Estabilidad mecánica:** forma parte del concepto del diamante como uno de los puntos necesarios para la reparación ósea y en esta técnica también debe buscarse una adecuada estabilidad en sus dos fases para permitir el desarrollo de la membrana y su posterior proceso de reparación (85,86). Inicialmente se realizaba mediante el uso de fijadores externos según la técnica descrita inicialmente (78), aunque se ha

demostrado también útil el uso de fijaciones internas con placas o clavos endomedulares (87).

**El tiempo:** la duración de la primera fase, en la que se produce la membrana, varía de unos autores a otros existiendo un periodo que puede ir desde las 2 hasta las 8 semanas inicialmente descritas por Masquelet. En función del tiempo transcurrido el grosor y tejido fibroso de la membrana aumenta, si bien parece que el tiempo óptimo sería de 4 semanas (86,88).

**Carga de peso postoperatorio:** no existe un consenso claro acerca del manejo inicial respecto a la carga o descarga tras la realización de esta técnica. Ambas opciones están contempladas y consiguen obtener buenos resultados, ejemplos con descarga mantenida durante un tiempo variable (hasta 24 meses) (89) y otros con apoyo desde el momento inicial y carga progresiva (90) presentan resultados similares.

**Material del implante:** tradicionalmente se ha utilizado el polimetilmetacrilato (PMMA), conocido como cemento óseo, como material para inducir la membrana vascularizada habiendo demostrado su capacidad para ello. Aunque se han descrito problemas asociados con su uso como reacciones alérgicas locales o sistémicas, y la necrosis ósea y daño a los tejidos blandos producido por el calor que se produce en la reacción exotérmica de fraguado (91). Por ello se investiga el uso de nuevos materiales para inducir la membrana como las siliconas (92) o *scaffolds* cilíndricos de fosfato tricálcico de hidroxapatita (93).

La técnica de regeneración tisular guiada se realiza en varias fases consecutivas, como puede verse en la imagen 8:

**a)** En un primer tiempo, se inicia colocando en la zona del defecto óseo un material inerte (generalmente polimetilmetacrilato también llamado cemento óseo, que puede incluir o no antibiótico en su composición si lo precisa), con ello se estimula la formación de una membrana biológica alrededor del material. Se debe asociar con una fijación ósea (interna o externa) que evite el colapso de la fractura y aporte estabilidad durante el proceso. Además, los extremos óseos deben estar libres de infección y de necrosis.

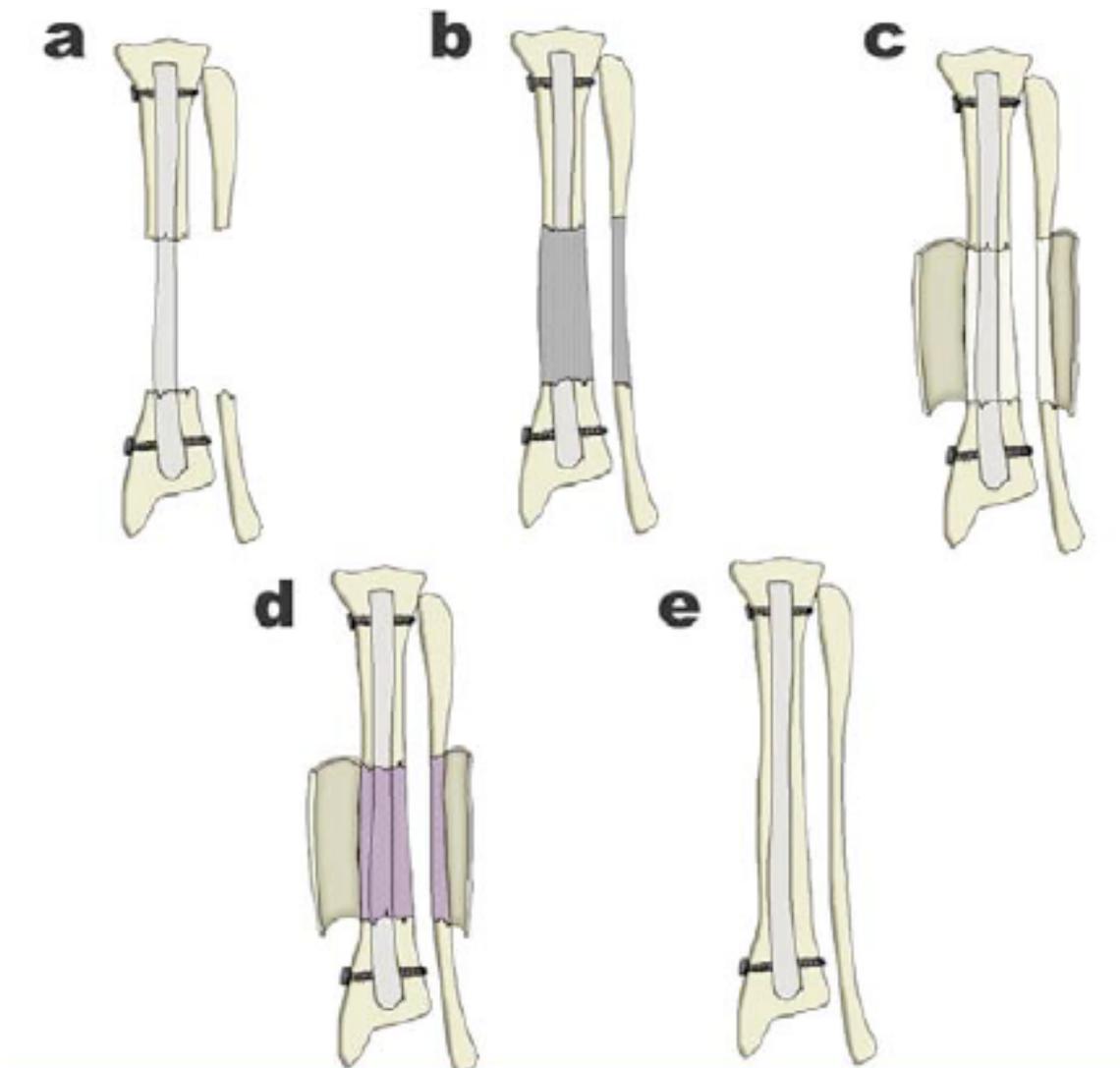
**b)** Alrededor del cemento se crea una membrana, interesa conseguir un grosor aproximadamente de 2 mm y con una consistencia suficiente para ser útil.

**c)** En un segundo tiempo transcurridas aproximadamente 6 semanas, se procede a retirar el material y se mantiene la membrana obtenida que posee la capacidad osteopromotora. Esta capacidad evitará la reabsorción del injerto o la formación de hueso ectópico.

**d)** Se procede a rellenar con injerto óseo (preferentemente autoinjerto óseo por poseer las propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras) la membrana y se realiza el cierre de la misma.

**e)** Crece hueso entre los bordes óseos del defecto, produciéndose la reparación del defecto (94).

Recientes estudios en modelos animales han utilizado para el tratamiento de defectos óseos críticos, la técnica de inducción de membranas combinada con el uso de injertos sintéticos (en lugar de injertos autólogos), en dos tiempos igual que la forma tradicional y en solo tiempo usando solo el injerto sintético y una membrana sintética. Se obtuvieron buenos resultados y demuestra cómo esta técnica puede combinarse con otros tratamientos de forma correcta (95).



**Imagen 8:** fases de la técnica de Masquelet. a) Colocación del cemento. b) Formación de la membrana inducida. c) Retirada del cemento con conservación de la membrana. d) Relleno con injerto. e) Curación (94).

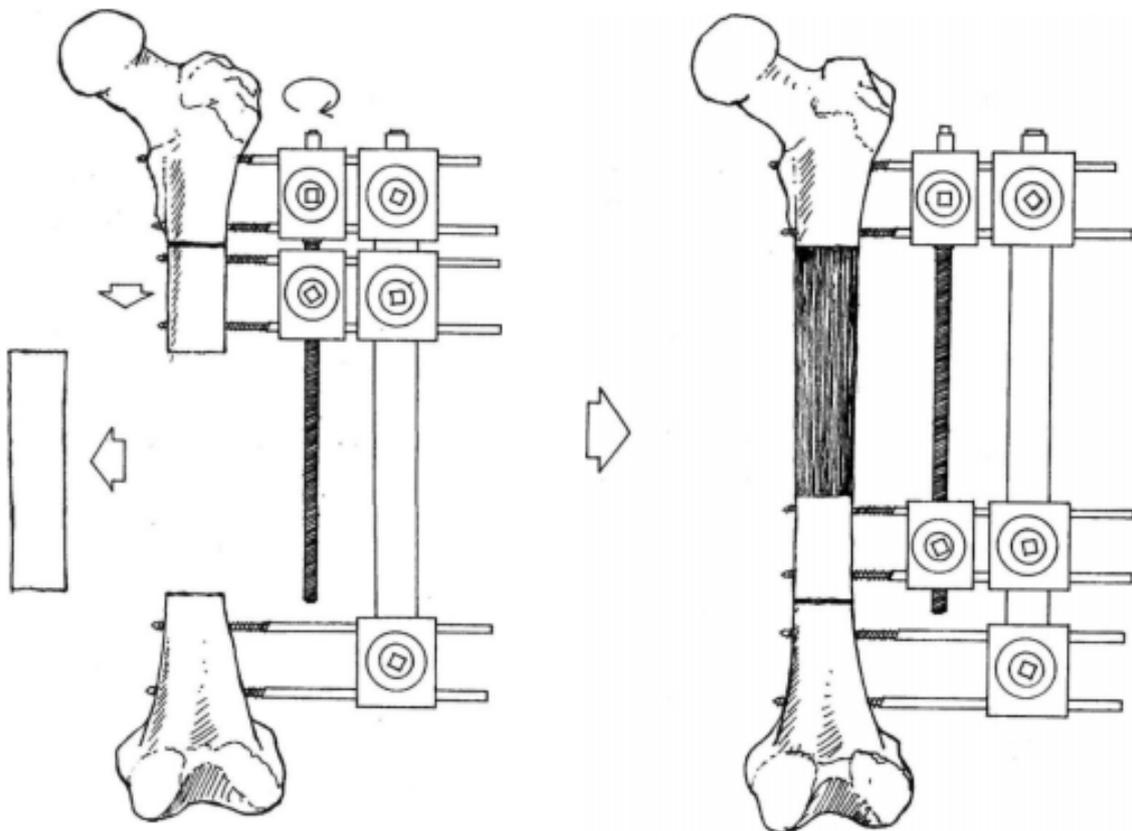
## **Transporte óseo**

El transporte óseo es una técnica, que se basa en la propiedad de osteodistracción, y está considerada como una opción para el tratamiento de los defectos óseos críticos. La principal ventaja de esta técnica es que permite la regeneración de tejido óseo vivo con la misma fuerza y anchura que la del hueso nativo. Es una técnica no exenta de problemas y complicaciones, derivados principalmente del uso prolongado de fijadores externos (infección, dolor o aflojamiento) y psicológicos por ser un proceso de larga evolución (79).

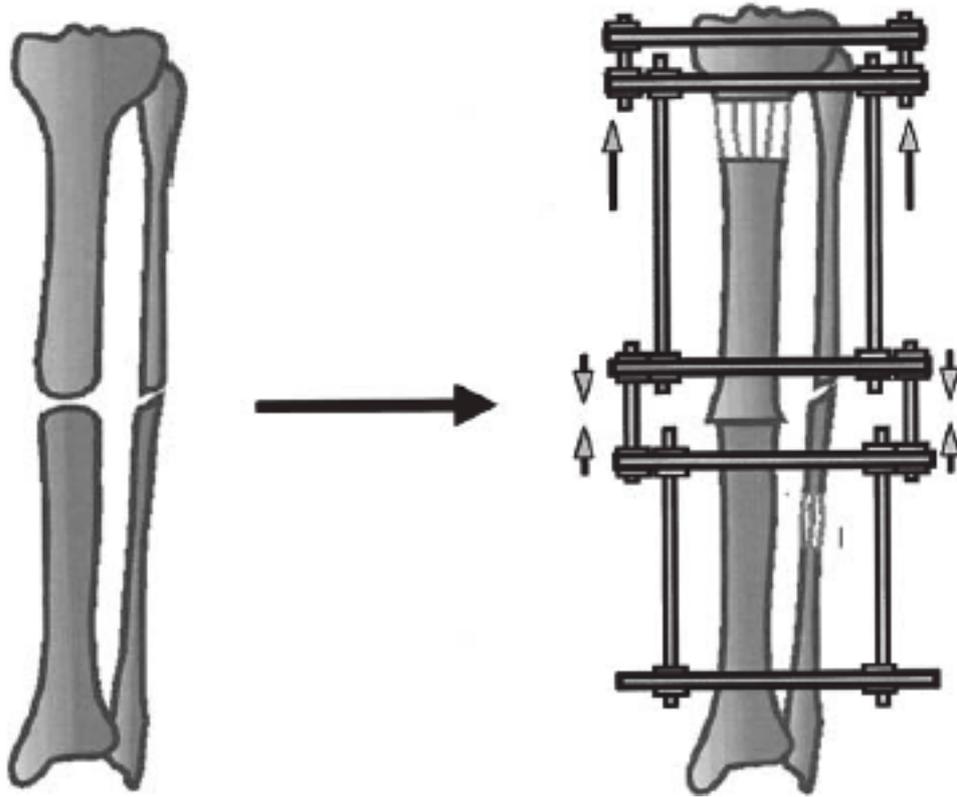
Se basa en los estudios realizados por Ilizarov, que posteriormente popularizó el uso de esta técnica. Realizó distintas pruebas hasta concluir que la elongación óptima era de 1 mm al día realizada en varias fases y la importancia del cuidado de las partes blandas para que se produjera a la vez la elongación de los músculos, fascia, nervios, vasos sanguíneos y piel (80,81). Inicialmente la fijación y distracción se realizaba con un fijador externo circular que fue el método clásico descrito por Ilizarov, aunque posteriormente se han utilizado otros sistemas de fijación como clavos endomedulares o fijadores monolaterales obteniendo buenos resultados igualmente (96).

El transporte óseo es un proceso que incluye varias intervenciones quirúrgicas, así como un proceso de elongación progresiva, en las imágenes 9 y 10 podemos observar dos esquemas del mismo. Hay que realizar una planificación adecuada de todo el proceso, presentando especial interés al estado de las partes blandas (problemas de cobertura cutánea, vascularización e inervación) y la prevención de la infección. Se inicia realizando una osteotomía del fragmento óseo sobre el que queremos realizar su transporte, tras ello se desplaza mediante distracción progresiva un fragmento óseo a lo largo del defecto óseo a tratar hasta hacer contactar el fragmento transportado con el otro extremo óseo. La osificación espontánea de la

zona distraída reconstruye el defecto óseo. En ocasiones puede ser necesario asociar el uso de injerto o realizar una decorticación de los bordes óseos para favorecer la consolidación (97).



**Imagen 9:** esquema de la técnica de transporte óseo en un fémur con un fijador externo de tipo distractor-compresor monolateral (97).



**Imagen 10:** esquema de la técnica de transporte óseo en un fémur con un fijador externo de tipo circular de Ilizarov (79).

## 5. Biomateriales

### Definición y clasificación

Se denominan biomateriales a los productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y fisiológicamente aceptable, que son temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y, en algún caso, conseguir la regeneración tisular (36,98).

Los biomateriales pueden estar constituidos de una gran variedad de componentes, con origen natural o sintético. Entre ellos se incluyen metales, aleaciones, cerámicas, vidrios, polímeros sintéticos, polímeros naturales, tejidos biológicos y las combinaciones de estos (99). A su vez su uso está ampliamente extendido por todas las ramas de la medicina, pudiendo usarse en angiología (implantes vasculares), traumatología y cirugía ortopédica (artroplastia de cadera o rodilla), odontología, cirugía general (mallas abdominales) como algunos ejemplos.

Dentro del conjunto de los biomateriales, se encuentra el grupo de los llamados **sustitutos óseos**, cuya característica específica es que una vez implantados en un ser vivo colaboran en el proceso de reparación o reemplazo del tejido óseo dañado, sin ocasionar perjuicios al organismo en su conjunto (100). Dado la amplia variedad existente de estos materiales pueden clasificarse de distintas maneras, en los materiales empleados para el tratamiento de lesiones óseas es frecuente clasificarlos por su origen: natural o sintético (101). Los de origen natural tienen la propiedad de ser biodegradables por el organismo, algunos ejemplos son el hueso (injerto autólogo, alogénico o xenogénico), derivados óseos (BMPs o matriz ósea desmineralizada), polímeros y cerámicas de origen natural (derivados de corales o caparazones de

crustáceos). Los de origen sintético pueden ser biodegradables o no, y se establecen en 4 grupos principales: metales, cerámicas, polímeros sintéticos y semiconductores.

### **Antecedentes históricos**

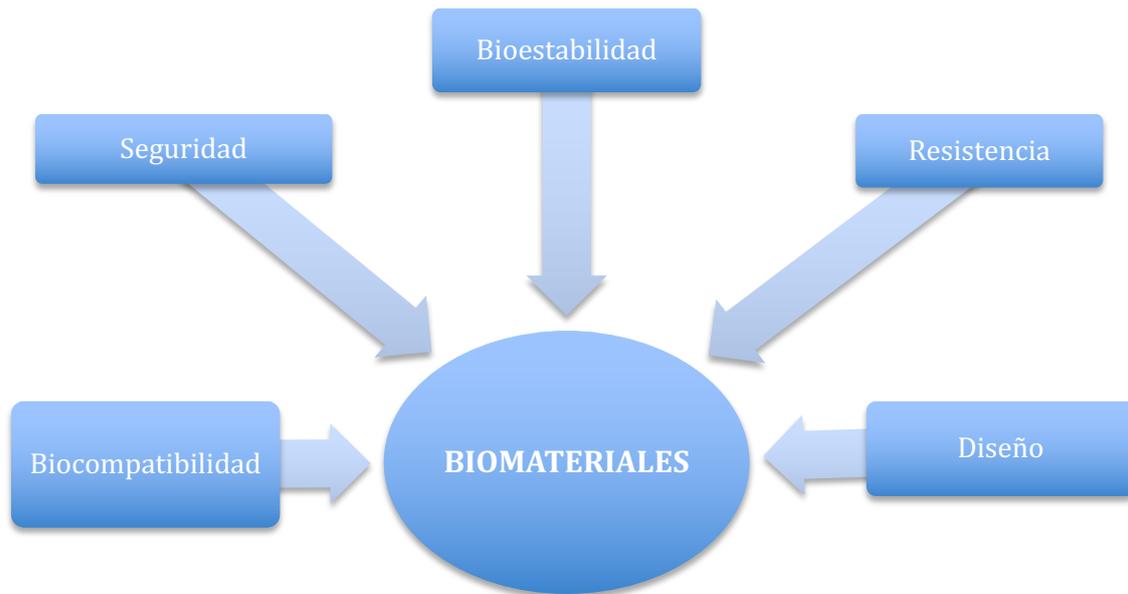
Históricamente se ha documentado el uso de materiales en la medicina para ayudar a la recuperación de tejidos dañados desde la época del antiguo Egipto y las civilizaciones clásicas de Roma y Grecia, desde que se inició el uso de algunos metales o productos naturales para dicha función. Posteriormente, a partir del siglo XVI, otros metales como el oro y la plata fueron utilizados en la restauración de piezas dentarias, o el hierro para inmovilización de algunas fracturas. Durante el siglo XIX se avanzó en la creación de aleaciones con mejores cualidades, con una mayor resistencia a la corrosión o propiedades mecánicas más útiles (102).

La investigación en polímeros se incrementó al inicio del siglo XX y tras las Guerras Mundiales se dio un gran avance en los materiales tolerables por el organismo para la fabricación de prótesis e implantes por las necesidades que presentaban las lesiones tras las guerras (103). A partir de los años 40-50, se vio un rápido progreso de estos biomateriales que contribuyeron al desarrollo de implantes que a día de hoy todavía son utilizados, trabajando los cirujanos en su desarrollo principalmente (104).

A partir de los años 60-70 el campo de los biomateriales, que tradicionalmente eran investigados desde la medicina, se incorporan otras ciencias como las ingenierías, las matemáticas, la física, la bioquímica o la biología, con la suma de ellas se ha conseguido hasta nuestros días un rápido avance y el desarrollo de técnicas como la ingeniería de tejidos o la biología molecular, todo ello aplicado al desarrollo de biomateriales (103).

## Propiedades principales

Para poder implantar con seguridad un biomaterial deben reunir una serie de propiedades, pueden verse en la imagen 11, que garanticen cumplir con la función para la que son diseñados, sin representar un riesgo para el huésped (36,103):



**Imagen 11:** propiedades principales de los biomateriales.

**1) Biocompatibilidad:** el biomaterial al contacto con los tejidos vivos no debe producir en ellos ningún tipo de alteración ni rechazo, siendo para ello bien tolerado, evitando que se pongan en marcha los mecanismos defensivos del huésped frente al biomaterial (99).

**2) Seguridad:** no deberán producir en el huésped efectos tóxicos ni carcinogénicos o cualquier otro tipo de lesión.

**3) Bioestabilidad:** ser químicamente estable a corto y a largo plazo, así como el mantenimiento de sus propiedades y estructura físico-química en el entorno

biológico durante el tiempo que permanezca en el organismo. Otra opción es que sea **biodegradable** tras cumplir su función durante el tiempo útil programado.

**4) Resistencia:** debe ser lo suficientemente resistente y poseer las propiedades mecánicas adecuadas para poder cumplir con su función, y durar el tiempo previsto soportando la fatiga.

**5) Diseño adecuado:** el tamaño, el peso y la forma del implante deben ser los adecuados. A todo ello debe añadirse que el precio debe ser reducido, su fabricación reproducible y su procesamiento fácil para su producción en gran escala.

Durante el proceso para el desarrollo de un nuevo biomaterial son necesarios una serie ensayos que preceden a las pruebas clínicas: simulaciones biomecánicas, modelos in vitro, ensayos toxicológicos y de biocompatibilidad, e implantación en animales de experimentación (105).

## 6. Sustitutos óseos de origen natural

### Injertos óseos

Se considera como injerto óseo a cualquier tipo de tejido óseo extraído e implantado en alguna zona del esqueleto con el fin de reparar una lesión ósea (106). El conocimiento acerca de ellos es un proceso dinámico, que ha ido evolucionando con el tiempo, inicialmente su éxito era medido por su capacidad para soportar el estrés aplicado sobre ellos. Actualmente, los injertos son considerados como estructuras biológicas y su éxito se mide por su capacidad de incorporación, revascularización y desempeño de la función y forma deseadas (102).

El uso de injertos óseos con interés médico para el tratamiento de las lesiones óseas ha sido descrito desde siglos atrás, en 1668 ya se publicó su utilización en la reparación una cráneo humano con un xenoinjerto de calota de perro, obteniendo un buen resultado (107).

Durante el siglo XIX su uso es donde presentó auténticos avances, Louis Léopold Ollier en 1867 en su “Tratado experimental y clínico de la regeneración del hueso y la producción artificial de tejido óseo”, realiza la clasificación clásica y todavía vigente de los injertos por su origen en autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto. Demostró también la utilidad de los autoinjertos, así como su viabilidad.

En el mismo siglo Macewen, que fue discípulo de Joseph Lister (introducir de la antisepsia) y James Syme (estudioso de las amputaciones), presentó en el año 1881 las primeras 6 conclusiones acerca del uso de injertos óseos, siendo la mayoría aun válidas a día de hoy: 1) El hueso trasplantado es capaz de vivir y crecer. 2) Los trasplantes interhumanos de hueso viven y crecen. 3) Los trasplantes interhumanos óseos pueden someterse a usos prácticos beneficiosos para la humanidad. 4) Todos

los elementos óseos deben incluirse en el trasplante. 5) La forma más exitosa de trasplantar el hueso es dividirlo en pequeños fragmentos, con un instrumento afilado, antes de introducirlo en su nueva localización. 6) Para garantizar el éxito del injerto, el trasplante debe realizarse antisépticamente (108).

Ya en el siglo XX continuó evolucionando el manejo de los injertos introduciendo nuevas técnicas como el uso del peroné vascularizado (109) o mejorando el conocimiento sobre ellos con conceptos como el fenómeno de resorción del injerto y determinando factores que influían en el éxito de la integración del injerto (110). A su vez también se definió la inmunogenicidad de los aloinjertos y su importancia para minimizar la respuesta inflamatoria contra el mismo, y como ésta disminuía tras someterse a un proceso de congelación, convirtiéndose en el método más frecuente de conservación (111,112).

### **A) Clasificación de los injertos**

Existen distintos criterios para clasificarlos como por su composición tisular (cortical o esponjoso), sus características anatómicas (zona de donde procede, tamaño o forma), su vascularización (vascularizado o libre), método de conservación (fresco, congelado, o liofilizado), tratamientos adicionales realizados (desmineralización o irradiación), lugar de implantación (ortotópico: en la misma región anatómica que la zona donante; heterotópico: distintos lugares) (94).

La clasificación basada en la disparidad genética donante-receptor (autoinjerto, isoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto (75)) es la más comúnmente empleada:

**Autoinjertos:** se realiza el trasplante de un lecho a otro del mismo individuo. Se puede injertar de inmediato o guardarlo en banco para su utilización posterior.

**Isoinjertos:** se trasplanta desde un gemelo a su idéntico monozigoto.

**Aloinjertos:** de un individuo a otro genéticamente distintos, pero de la misma especie. Requiere de un banco de hueso. Se debe reducir la antigenicidad del aloinjerto mediante la crioterapia, liofilizado o radioterapia. En general tienen mayor tendencia a la infección, fractura y no-unión que los autoinjertos.

**Xenoinjerto:** de una especie a otra especie. Alto número de rechazos (>50%). La investigación inmunológica debe contribuir a su desarrollo y disponibilidad. Actualmente apenas se utilizan.

### **B) injertos más frecuentes**

**Autoinjerto óseo esponjoso:** es considerado el patrón oro (*gold standard*) para el tratamiento de los defectos óseos. Sus principales virtudes son su histocompatibilidad completa y su capacidad osteogénica al tener presentes células mesenquimales y una gran superficie cubierta de osteoblastos; también es importante su papel como osteoinductor por los factores de crecimiento y por último su actividad osteoconductora que es menor, mediada por su estructura de hidroxiapatita y colágeno. Presenta una rápida incorporación al lecho receptor y revascularización precoz. Sus inconvenientes son la morbilidad en la zona de extracción y el escaso volumen disponible. La zona donante más frecuente es la cresta iliaca, se han descrito complicaciones hasta un 25-40% incluyendo hematomas, lesión nerviosa (nervio femorocutáneo), alteraciones estéticas o dolor crónico (94,113,114).

**Autoinjerto cortical no vascularizado:** existe un menor aporte celular (5%) disminuyendo su osteogenicidad, pero aporta un mayor soporte estructural, osteoconducción. Su revascularización e integración es más lenta por ser necesaria su reabsorción previa, para que puedan penetrar los vasos (94,113,115).

**Autoinjerto cortical vascularizado:** es un injerto con buena capacidad estructural, y a diferencia del avascular, su proceso de integración es rápido debido a que no

precisa del proceso de revascularización para su aporte sanguíneo. Hasta el 90% de los osteocitos presentes en este injerto sobreviven al trasplante (115,116). Una de sus indicaciones primarias son los defectos con un lecho que tiene una vascularización sub-óptima o grandes defectos óseos o de partes blandas. Las zonas donantes típicas son las costillas, pala iliaca, peroné (injerto peroné vascularizado), radio distal (tratamiento de la enfermedad de Kienböck o pseudoartrosis de escafoides) y escápula. Sus principales inconvenientes son la morbilidad de la zona donante, técnicamente son más complejos de realizar o la necesidad de estudio vascular preoperatorio (117).

**Aspirado de médula ósea (Sistema RIA):** mediante el aspirado óseo se obtiene un concentrado celular rico en células precursoras mesenquimales (MSC) cuya principal capacidad y casi exclusiva es osteogénica. Pueden obtenerse de distintas localizaciones como la cresta iliaca, el fémur o la tibia. El rendimiento obtenido mediante esta técnica se relaciona con la edad y el estado del paciente (94).

Existe una técnica específica que combina el aspirado con el fresado de la médula ósea en los huesos largos conocido como sistema **RIA (*reaming-irrigation-aspiration, fresado-irrigación-aspiración*)**. Este sistema es un dispositivo de un solo uso de fresado intramedular con irrigación y aspiración simultánea, que inicialmente se desarrolló para disminuir la presión durante el enclavado endomedular y con ello disminuir el riesgo de complicaciones pulmonares (embolia grasa, *distress* respiratorio agudo) (118). Pero se observó que con esta técnica se extraía autoinjerto esponjoso en un volumen importante, de media 40 cm<sup>3</sup> en fémur y 33 cm<sup>3</sup> en tibia, y en los estudios realizados sobre el material obtenido se comprobó que el injerto era rico en células precursoras y osteogénicas, en factores de crecimiento (119). Lo más importante era que se obtuvieron tasas de consolidación comparables a las obtenidas usando autoinjerto de cresta iliaca, con menor dolor inmediato y crónico en las escalas

de valoración (118–120). Las ventajas principales de este sistema al compararse con el *gold standard* sería que una técnica menos invasiva y con menos complicaciones; que permite la obtención de mayores volúmenes; y que las propiedades bioquímicas y celulares son similares a los del autoinjerto de cresta iliaca (121).

**Aloinjerto triturado – Matriz ósea desmineralizada:** aporta escaso soporte mecánico y su principal capacidad es actuar como osteoinductor, al preservar los factores de crecimiento. Al tener una estructura similar a la de la trabécula ósea (porosa), permite el crecimiento de los vasos desde el lecho receptor (94,113).

Un caso concreto es la **matriz ósea desmineralizada** (MOD o DBM *demineralized bone matrix* por sus siglas en inglés), cuyo uso está muy extendido desde el año 1968, que fue descrita por primera vez (122). El hueso se extrae de un donante único, se tritura y desmineraliza con ácido, posteriormente se tratan con óxido de etileno o radiación gamma para su esterilización. Con ello se consigue un producto que conserva la matriz de colágeno tipo I y otras proteínas y factores de crecimiento, pero carece de los componentes minerales. Para su uso precisa de un transportador de rápida absorción que suelen ser geles, pastas o sólidos moldeables (glicerol, ácido hialurónico o gelatinas). Sus principales usos son para rellenar defectos cavitarios, facilitar las artrodesis espinales y en el tratamiento de pseudoartrosis; también puede combinarse con otros sustitutos y usarse como un expansor de otros injertos (117). Uno de los inconvenientes es que se han encontrado diferencias apreciables en las concentraciones entre diferentes presentaciones comerciales e incluso entre distintos lotes de una misma presentación (123).

**Aloinjerto corticoesponjoso y cortical:** su principal capacidad es la de ofrecer soporte estructural, si bien su capacidad osteoinductora es limitada y no posee actividad osteogénica, al carecer de células vivas y ser sometido a un proceso de

esterilización. Sus usos son similares a los de la MOD y sus diferencias son que pueden almacenarse de forma indefinida y un ligero aumento del riesgo de transmisión de enfermedades. Su disponibilidad es amplia al proceder de donantes vivos o cadáveres en la mayoría de las ocasiones y suelen extraerse del hueso ilíaco, la tibia o el fémur. Su conservación puede realizarse de diversas formas que pueden modificar sus propiedades mecánicas y osteoconductoras: **en fresco**, actualmente en desuso por el mayor riesgo de contagio de enfermedades; **congelado** (entre -20°C y -70°C), mantiene mejor sus propiedades mecánicas y su incorporación y revascularización es más rápida, aunque debe calentarse previamente a su implantación; y **liofilizado**, por el que se someten a un proceso de desecación por congelación directa y luego se conservan a temperatura ambiente. Sus propiedades mecánicas pueden alterarse y su incorporación puede ser menos constante, y además, precisa de un proceso de rehidratado previo a su implantación (113,117).

**Aloinjerto masivo osteocondral:** se utilizan en cirugía tumoral y de rescate de extremidades, al ser capaces de reemplazar grandes segmentos óseos que incluyen la superficie ósea, evitando en ocasiones la amputación del miembro. Se conservan por un proceso de congelación a -70°C y el cartílago se trata con dimetil-sulfóxido para su conservación (115). Son injertos de manejo complejo y pueden presentar complicaciones variadas como cambios degenerativos articulares, inestabilidad o fallo en la unión con el lecho receptor(113,117,124).

		Resistencia compresión	Resistencia torsión	Osteo- conducción	Osteo- inducción	Osteo- génesis
<b>Autoinjerto</b>	Esponjosa	-	-	+++	++	+++
	Cortical	+++	+++	++	+	+
	Aspirado médula ósea	-	-	-	+	+++
	RIA	-	-	-	+	+++
<b>Aloinjerto</b>	Esponjosa	-	-	++	+/-	-
	Cortical	++	++	+	-	-
	MOD	-	-	-	++	-

**Imagen 12:** propiedades principales de los injertos óseo(94).

### **C) Incorporación de los injertos**

La incorporación de los injertos óseos al lecho receptor es un proceso que implica cinco fases que son comunes en todos ellos: inflamación, revascularización (invasión del injerto por los capilares sanguíneos), osteoinducción (diferenciación de las células pluripotenciales en osteoblastos), osteoconducción (sustitución del injerto mediado por el huésped) y finalmente el remodelado óseo. La correcta incorporación se define como el normal desempeño de la función del tejido original al que sustituye, manteniendo su integridad mecánica y funcional durante y después del proceso de incorporación (75,113,115,125).

El injerto autólogo de hueso esponjoso es que tiene una incorporación más completa y rápida seguido del cortical autólogo, esponjoso y cortical alogénico y por último el xenoinjerto. La velocidad de las fases y el proceso global de incorporación se ve afectado por diversos factores, como son la estructura o la vascularización del injerto. En los no vascularizados los vasos tienen que penetrar desde el lecho del receptor al injerto, con lo que se enlentece el proceso de revascularización; el hueso cortical también tiene un proceso de revascularización más lento, al tener que realizarse a través de los canales de Havers. Otras situaciones también pueden afectar de manera negativa a esta incorporación como son las infecciones, el exceso de micromovimientos en el área reconstruida (inestabilidad) o alteraciones locales o sistémicas de la vascularización. La inmunogenicidad (capacidad de estimular una respuesta por parte del sistema inmune) juega también un papel importante en los alo y xenoinjertos, ya que se produce una respuesta inmunitaria por parte del receptor frente al injerto durante la segunda y tercera fase de la incorporación. Para ello se evita su uso en fresco y se utilizan liofilizados o congelados porque disminuye su inmunogenicidad (126,127).

## **Factores de crecimiento**

Se conocen como factores de crecimiento a la amplia familia de moléculas de estructura proteica, que son secretadas por células a la matriz extracelular. Su función es la de iniciar una cascada de señalización, tras su unión a receptores de superficie, en otras células diana para inducir su división celular, promover la síntesis de matriz extracelular o la diferenciación de tejidos. Entre los principales factores de crecimiento implicados en el crecimiento óseo destacan: TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), BMPs (proteína morfogenética humana), FGFs (factor de crecimiento de fibroblastos), IGFs (factor de crecimiento parecidos a insulina), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), Wnt (*Wingless e Int* derivan de los primeros genes que codifican estas proteínas) y Shh (*Sonic Hedgehog*); y también algunos factores de transcripción con implicación en la osteogénesis como son TAZ, Runx-2 y osterix que de manera concomitante controlan la diferenciación mientras inhiben la adipogénesis (128).

Durante la curación ósea intervienen un número importante de moléculas de señalización, que inician y hacen progresar de la cadena de eventos que da lugar a la osificación endocondral y membranosa. Favorecen el reclutamiento de células mesenquimales indiferenciadas (MSCs) y células osteoprogenitoras; e inducen su proliferación y diferenciación en osteoblastos (129). La aplicación terapéutica de los factores de crecimiento como osteoinductores, favoreciendo la regeneración ósea en situaciones biológicamente comprometidas o aumentando la velocidad de recuperación de las fracturas, está creciendo en interés en la comunidad científica (130). Aunque se han descrito dificultades en su uso como son su vida corta media, su alto coste y problemas de seguridad como el potencial de crear hueso ectópico o la necesidad de concentraciones suprafisiológicas (hasta 6 veces) para obtener el efecto osteoinductivo. Los factores de crecimiento están presentes en la matriz ósea hasta que la remodelación o un traumatismo ocasionan su liberación por lo que el hueso

dispone de estos factores en el momento y en la cantidad adecuados. Su aporte externo es necesario únicamente en condiciones patológicas como pseudoartrosis, alteraciones de la vascularización, o en técnicas en las que se requiere aporte hueso extra, como en elongaciones o utilización de aloinjertos (36).

#### **A) Superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )**

Es una gran familia de factores de crecimiento que incluye a las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento transformantes (TGF- $\beta$ ), factores de diferenciación del crecimiento (GDFs), activinas, inhibinas y la sustancia inhibidora Mulleriana (131). Actúan como un importante estimulador quimiotáxico de las células mesenquimales y favorecen la proliferación celular y la síntesis de proteínas, los osteoblastos son las células con mayor número de receptores para estos factores (132).

#### **B) Proteína morfogenética ósea (BMPs, *bone morphogenetic protein*)**

Pertenece a la superfamilia de los TGF- $\beta$ , pero dada su especial relevancia los valoraremos de forma independiente. Desde su descubrimiento a finales del siglo XX, han contribuido de manera importante a mejorar la comprensión de la cascada biológica de la osteogénesis (133). Fue descrita por Urist por primera vez en 1965, al observar la formación de hueso y cartílago en músculo de roedores, tras implantar matriz ósea desmineralizada en dicho músculo, estableciendo la hipótesis del principio de inducción, por el que una proteína (proteína morfogenética humana) tenía la capacidad de inducir la formación de hueso y cartílago (134).

Las BMPs tienen como diana las células madre mesenquimales (MSCs), tienen la propiedad única de la estimulación de la formación de hueso ectópico in vivo. Son los únicos factores de crecimiento morfogénicos, ya que no solo estimulan la proliferación y diferenciación de las MSCs, sino que son capaces de inducir la

mitogénesis y transformación en células osteoprogenitoras (osteoblastos) de estas células indiferenciadas (36). Debido a la complejidad de la señalización en los procesos fisiológicos y de reparación en los que participan las BMPs, existen numerosas moléculas inhibitoras que regulan su función en el mantenimiento y regeneración óseos, o en el desarrollo embrionario. Estos efectos inhibitorios pueden ocurrir en varios niveles: compartimento extracelular, a nivel de los receptores, compartimento intracelular o en el núcleo; y pueden utilizar mecanismos inhibitorios que disminuyen la exposición celular a estas señales o regulan la actividad celular (129).

Existen más de 20 tipos distintos descritos, son proteínas pleiotrópicas con múltiples acciones biológicas, que han sido ampliamente estudiadas, implicadas en la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis de varios tipos de células: osteoblastos, condroblastos, células neurales y epiteliales (129). Se les reconoce como un factor importante en varios de los procesos condrogénicos y osteogénicos durante el desarrollo embrionario normal. Algunas juegan un papel crítico en la señalización, al intervenir en la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células osteoprogenitoras, de ahí su actividad osteoinductora, se consideran con dicha actividad a las BMP-2, 4, 6 y 7. También se ha descrito su función regulando tres de las etapas de la curación ósea (respuesta inflamatoria, fase condrogénica y fase osteogénica), si bien sus mecanismos moleculares continúan siendo objeto de estudio (130,135).

Actualmente existen dos tipos de BMPs disponibles comercialmente para su uso: rhBMP-2 y rh BMP-7 (*rh: human recombinant*, recombinantes humanas). Han sido probadas en estudios preclínicos primero, demostrando capacidad de inducir la regeneración ósea(136,137), y en estudios clínicos en el tratamiento de distintas patologías óseas (pseudoartrosis, osteonecrosis, artrodesis) (138,139). En julio de 2002 se aprobó el uso de rhBMP-2, por la Agencia Europea del Medicamento (AEM),

para el tratamiento de las artrodesis lumbares de un solo nivel y las fracturas abiertas y pseudoartrosis de tibia en adultos. En noviembre de 2002 la FDA (*American Food and Drug Administration*) aprobó el uso de rhBMP-2 para el tratamiento de las fracturas abiertas de tibia tras su enclavado endomedular. En 2004 la AEM aprobó el uso de rhBMP-7, como OP-1 (proteína osteogénica 1), para el tratamiento de las pseudoartrosis de tibia en pacientes adultos (esqueléticamente maduros), en las que ya se habían intentado tratar con autoinjerto (130).

### **C) Factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF)**

En conjunto promueven la síntesis de proteínas y colágeno, así como la proliferación celular. Existen dos familias principales la IGF-1 y la IGF-2. El tipo 1 con mayor potencial osteogénico, en estudios se ha observado que estimula la movilidad y actividad de los osteoblastos *in vitro*, y que incrementa la formación de hueso *in vivo*. A su vez, se ha demostrado un efecto sinérgico en presencia del TGF- $\beta$  en el proceso de consolidación ósea, concretamente en la mineralización del callo y mejorando la resistencia a la torsión (140). El IGF-2 actúa como regulador en la formación ósea, promoviendo la proliferación y la diferenciación de los precursores osteoblásticos. (141).

### **D) Factores de crecimiento fibroblásticos (FGF)**

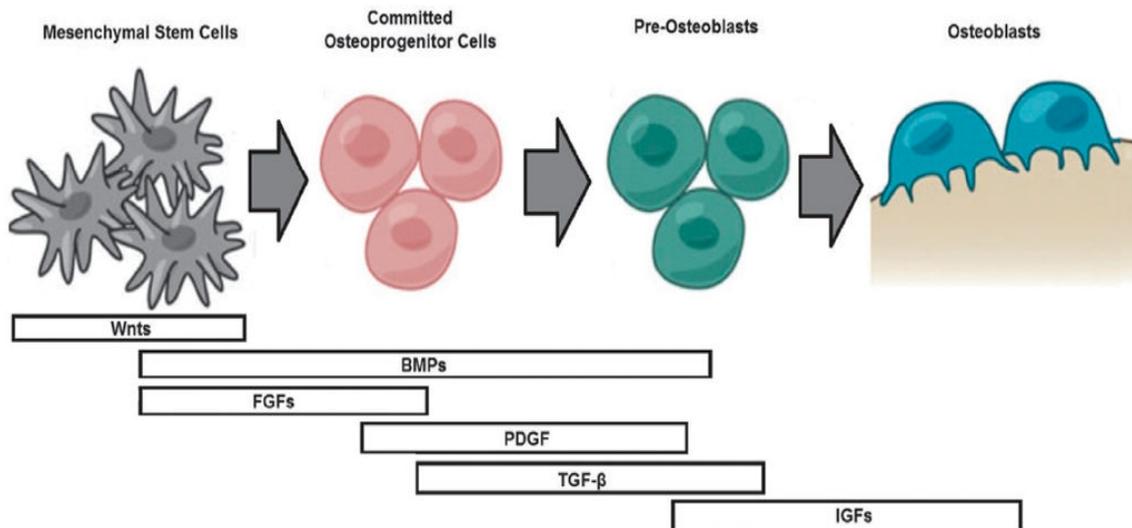
Su papel en la consolidación ósea está en estudio actualmente y los conocimientos sobre ellos son limitados. Colaboran promoviendo el crecimiento y diferenciación de los fibroblastos, miocitos, osteoblastos y condrocitos. Se les ha identificado en las etapas iniciales de la curación de las fracturas y tienen un papel importante en la angiogénesis y la proliferación de los condrocitos y células mesenquimales (132). Los tipos FGF-2,9 y 18 han sido más estudiados demostrado ser reguladores de las funciones de las células óseas, actuando como factores autocrinos/paracrinos para los osteocitos (142). El FGF-2 o beta estimula la proliferación de los osteoblastos, pero inhibe su diferenciación; tiene efecto sobre la

reabsorción, al actuar en la producción de prostaglandinas y estimular la proliferación de los precursores de los osteoclastos (94).

Aunque han demostrado su efecto beneficioso en ensayos clínicos controlados en el tratamiento de la pseudoartrosis y en la regeneración ósea existen controversias sobre la generalización de su uso. Actualmente presenta un coste elevado (superior a 1000€) y no se acepta su uso por algunas aseguradoras, además otras alternativas pueden resultar útiles con un mejor perfil de costo-efectividad (140). Otros inconvenientes son la necesidad de concentraciones de hasta 6 órdenes de magnitud superiores a los niveles fisiológicos para conseguir su efecto (128,143) o complicaciones que han sido descritas como la formación de hueso ectópico, hematomas en tejidos blandos y la resorción ósea alrededor de los implantes (144,145). Por todo ello son necesarios más estudios comparativos bien diseñados para optimizar su uso (130).

#### **E) Factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF)**

Estos factores parecen estar relacionados con el crecimiento óseo y aunque están sintetizados por células osteoprogenitoras y plaquetas no muestran propiedades osteoinductoras importantes, no han demostrado *in vivo* inducir la formación ósea. Se cree que actúan en la quimiotaxis de las células inflamatorias; estimulando la proliferación y migración de las células mesenquimales y los osteoblastos; y en la angiogénesis (129,146). Tienen estructura de dímero A y B, pudiendo existir 3 formas AA, BB y AB. Los estudios preclínicos PDGF-BB han demostrado tener efectos mitogénicos sobre células osteoprogenitoras mejorando la angiogénesis y estimulando la reparación de las fracturas. La PDGF-BB está actualmente disponible en su forma recombinante para el tratamiento de defectos óseos periodontales y para el uso en artrodesis de pie y tobillo (36,147,148).



**Imagen 13:** diferenciación de las células osteoprogenitoras y el papel de los factores de crecimiento durante la progresión temporal (128,146).

### **Plasma rico en plaquetas**

El plasma rico en plaquetas se ha convertido en una herramienta emergente en la medicina deportiva y la traumatología, se encuadra dentro del auge de la medicina regenerativa que trata de acelerar el proceso de curación fisiológico y regreso a la actividad. Puede definirse como una concentración de plaquetas humanas autólogas en un volumen pequeño de plasma, producido por la centrifugación de la propia sangre del paciente (149). Otra definición posible es cualquier fracción de plasma que contenga mayor concentración de plaquetas que las basales, que proporcionan un gran número de moléculas bioactivas en proporciones fisiológicas (150).

Actualmente existen más de 16 sistemas comerciales de PRP disponibles en el mercado, con una importante variación entre sus protocolos de recolección y preparación, lo cual hace que cada uno tenga propiedades distintas, lo que dificulta su estandarización y la comparación entre estudios (149).

Las plaquetas contienen un medio rico en mediadores y factores de crecimiento en sus gránulos alfa (TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, VEGF, EGF, IGF), que son concentradas por la centrifugación y depositadas en la zona lesionada para aumentar el potencial fisiológico de curación (149). La concentración de los factores de crecimiento es entre 3 y 5 veces superior en comparación con el plasma normal. Las plaquetas activadas liberan más de 300 moléculas y son responsables de coordinar numerosas interacciones celulares y entre células y la matriz extracelular (151).

El potencial osteogénico del PRP se ha estudiado en numerosos estudios *in vitro*: su adición en medios de cultivo promovió la proliferación y diferenciación de células mesenquimales humanas (152) o de células madre derivadas de adipocitos humanos (153); el PRP pueden mejorar la quimiotaxis y quimiocinesis de las células debido a la reorganización del citoesqueleto y acelerar la migración celular de los osteoblastos (154); se ha identificado un efecto antimicrobiano, lo cual resulta interesante a nivel de su aplicación quirúrgica en tejido óseo (155). En una revisión sistemática sobre el uso de PRP en el tratamiento de desórdenes óseos, se observaron en estudios pre-clínicos resultados que apoyaban el beneficio de su uso en un 91,1%, en un análisis más profundo teniendo en cuenta parámetros histológicos su éxito bajó al 84,4%, y aun fue todavía inferior cuando se tuvo en cuenta en el análisis resultados radiológicos 75% y biomecánicos 72,7% (156).

Aunque existan numerosos estudios *in vitro* que muestran resultados positivos y los potenciales beneficios en la proliferación, diferenciación, migración y protección celular para la reparación ósea, existe controversia en cuanto a su aplicación y su traslado en beneficios clínicos reales (156,157). En el uso clínico de PRP, actualmente no existe evidencia científica, basada en estudios clínicos de alta calidad, que apoye su uso de rutina para mejorar la curación ósea de fracturas agudas o pseudoartrosis (151,156).

## **Hormona paratiroidea (PTH) y proteínas relacionadas (PTHrP)**

La hormona paratiroidea tiene un efecto anabólico y catabólico en el hueso, por ello se ha estudiado su uso como potenciador de la regeneración ósea. Actualmente se encuentra aprobado el uso de inyecciones diarias para el tratamiento de la osteoporosis, que han demostrado aumentar la densidad mineral ósea, el volumen óseo y disminuir algunos tipos de fracturas. Es por ello que se está investigando en su uso y el de proteínas relacionadas con la PTH, de manera local, no solo sistémica, para el tratamiento de defectos óseos, como posible sustituto de las BMPs o como complemento al uso de injertos (158).

La PTH es una molécula sintetizada por el propio organismo, es una proteína compuesta por 84 aminoácidos y tiene un papel clave en la regulación de la homeostasis del calcio. Su secreción normal tiene un componente constante y otro pulsátil, 70% y 30% respectivamente, con una vida media de entre 2 y 5 minutos, el componente pulsátil es muy sensible a los cambios de las concentraciones séricas de calcio y fósforo (159). Las acciones clásicas de la PTH son estimular la resorción ósea y aumentar la reabsorción de calcio, estas funciones residen en la región N-terminal 1-34 de la proteína (160). Generalmente los niveles séricos elevados y mantenidos tienen un efecto catabólico en el hueso, y las elevaciones intermitentes producen un efecto anabólico. Esta actividad la realizan gracias a una cascada de procesos (activación de un receptor tipo proteína G, PTHR1) que conllevan a la activación de la formación osteoblástica de hueso, y pueden mediar como formadores óseo o favoreciendo la resorción (161).

A parte de estas acciones clásicas y bien conocidas, nuevas evidencias parecen mostrar que la PTH induce la diferenciación de las células madre mesenquimales en la línea osteoblástica, gracias a una cascada de señalización que refuerza el efecto de las BMPs. También parece tener un efecto local en los factores

de crecimiento (BMPs, Wnts o TGF-  $\beta$ ) a través del reclutamiento de sus receptores contribuyendo al efecto anabólico (162). Otra de las vías de esta función anabólica ósea se ha descrito en relación a los linfocitos T, estos expresan receptores PTHR1 que al unirse a la PTH incrementan la producción del factor de crecimiento: Wnt, con lo que se activa la vía de señalización del Wnt con los preosteoblastos (163).

El uso sistémico de la PTH y otras proteínas relacionadas como la rhPTH 1-34 (teiparatida), ha resultado exitoso en el tratamiento de la osteoporosis, actualmente se usan en la práctica clínica dos PTH análogas ya comercializadas, la PTH 1-34 y la 1-84, como agentes anabolizantes en el tratamiento de la osteoporosis severa (36). Por este motivo se ha planteado su uso para la regeneración y tratamiento de los defectos óseos (158). En modelos animales, el uso de inyecciones diarias ha demostrado resultados beneficiosos en la consolidación de fracturas, incorporación de injertos, fijación de implantes y fusión espinal (164–166). Sus efectos locales han sido mucho menos estudiados, y se trabaja en su uso para favorecer la consolidación ósea en defectos que por sí mismos no serían capaces (158).

### **Osteostatina**

Dentro de las proteínas relacionadas con la PTH, existe una secuencia que se corresponde con la osteostatina. Dicha proteína ha sido la elegida en nuestro proyecto para el enriquecimiento de los *scaffolds*, por sus interesantes propiedades en la regeneración ósea y el anabolismo del hueso.

Las PTHrP contienen una región N-terminal 1-37 homóloga a la PTH y una región C-terminal distinta de la PTH, pero que contiene una secuencia 107-111 conservada, conocida como **osteostatina** (167). Las PTHrP análogas de la secuencia N-terminal han sido ampliamente estudiadas y han demostrado inducir el anabolismo óseo en humanos y animales (168). Por otro lado, la secuencia C-terminal, en

concreto la osteostatina, ha sido menos estudiada, pero ha demostrado tener una actividad antiresortiva (169) y mostrar propiedades osteogénicas *in vitro e in vivo* (170,171). Estos resultados parecen sugerir que el uso local de osteostatina en el microambiente de lesiones óseas podría tener interés para su reparación (172), con numerosos estudios *in vivo* que parecen confirmar este efecto (167,173–175).

### **Células progenitoras**

En el proceso de reparación ósea son necesarias células que puedan regenerar el hueso en el lugar de la lesión, ya que estas son los únicos elementos que serán capaces de crear hueso de nuevo (176). El uso de estas células a nivel local, liberándolas en la lesión, se ha realizado de manera tradicional con el aspirado de médula ósea o la técnica RIA que contiene abundantes células osteoprogenitoras, si bien la concentración y calidad de las mismas es variable, y depende de factores individuales (edad, estado general), lugar de obtención y técnica empleada (36,177). Es por ello que se ha propiciado la investigación que trate de conseguir la multiplicación y diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales para luego implantarlas en el lugar de la lesión (176).

Las células madre y progenitoras están presentes en todos los tejidos adultos y tienen un importante papel en la curación de dichos tejidos, su mantenimiento y la respuesta ante agresiones o enfermedades. Las células madre dan lugar a las células progenitoras y se distinguen de estas segundas en ser autorrenovables de forma ilimitada, en cambio las células progenitoras tienen una capacidad limitada de renovación y dan lugar a células más diferenciadas (178). La renovación del tejido óseo es lenta si la comparamos con otros tejidos, los osteocitos y *lining cells* pueden vivir hasta 20 años en hueso cortical humano, pero el remodelado continuo precisa la formación de nuevos osteoblastos, que provienen de los preosteoblastos y estos de las células progenitoras. Este proceso de activación de las células madre y

progenitoras óseas se ve acelerado cuando ocurren fracturas u otras lesiones óseas (179). Las células progenitoras derivadas del hueso y médula ósea en el hueso esponjoso, periostio, cartílago, músculo, grasa y pericitos vasculares son capaces de diferenciarse un múltiples fenotipos celulares: hueso, cartílago, tendón, ligamento, grasa, músculo y nervios (180–182).

### **Células mesenquimales**

Dentro de las células progenitoras existen diferentes tipos con distintas propiedades. En nuestro caso, para el enriquecimiento del *scaffold* de nuestro proyecto, se eligieron células mesenquimales por sus interesantes propiedades en la regeneración ósea.

Existen una variedad de células progenitoras sobre las que se está investigando para el tratamiento de los defectos óseos, las que más ampliamente se han estudiado son las células mesenquimales de la médula ósea (*BM-MSC: bone marrow mesenchymal stromal cells*) (183). Aunque existen otras alternativas como las células progenitoras derivadas de tejido adiposo (*ASC: adipose tissue-derived stem cells*), las células mesenquimales derivadas de la cavidad oral (184), las células humanas derivadas del periostio (*PD cells: periosteum-derived cells*) (126), células endoteliales humanas y cultivos de osteoblastos humanos (185). Con similares propiedades se encuentran las células progenitoras multipotentes derivadas de la capa basal de la piel, muestran la capacidad de diferenciación y conversión en adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células nerviosas y pancreáticas (178,180).

Con el propósito de englobarlas para trabajos experimentales y clínicos, a las células madre y progenitoras aisladas de tejidos humanos y que crecen sin necesidad de expansión del cultivo, y poseen la capacidad de diferenciarse en uno o más fenotipos celulares del tejido conectivo distintos (hueso, grasa, cartílago...), se les

conoce como progenitoras del tejido conectivo. Por otro lado, la expansión *in vitro* de estos progenitores da lugar al término de células madre mesenquimales (MSC: *mesenchymal stem cell*), esta expansión modifica las características de la población cultivada pasando de una heterogeneidad inicial, a una mayor homogeneidad (179).

Todavía se desconoce cuántas células progenitoras son necesarias para influir en la curación de un defecto óseo, cuál debe ser el origen de éstas, en qué concentración o en qué vehículo deben repartirse. En cambio, existe la certeza de que estos progenitores no son capaces por sí mismos, sin la ayuda de un vehículo, de modificar el proceso de curación ósea; y que la concentración de estas células favorece la formación del callo óseo, al existir una relación entre el número de células progenitoras dentro de la médula ósea y la formación de callo (187,188).

Respecto a su lugar de extracción ofrecen distintas ventajas e inconvenientes. El aspirado de médula ósea ofrece una suspensión de células bien caracterizada, que puede ser utilizada de manera inmediata y requiere poco procesamiento; como desventajas son la morbilidad generada en la zona donante, la limitación de la cantidad disponible y que sus características varían con el estado del paciente. El tejido adiposo necesita un mayor procesamiento de las células obtenidas, en cambio su obtención es más sencilla y genera una menor morbilidad, a su vez mantienen una buena caracterización celular. Con las células derivadas de la cavidad oral tienen unas características similares a las del tejido adiposo, pero con una peor caracterización (179).

Las células progenitoras han demostrado su potencial reparador en un amplio número de estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, y se sigue investigando sobre sus aplicaciones prácticas para la clínica habitual. Uno de los campos con más desarrollo en este campo es su aplicación a la ingeniería de tejidos, incorporando estas células a

distintos vehículos para su uso a nivel local, tema que desarrollaremos más adelante en profundidad (28,126,128,184,189). Puede verse un resumen de los tipos de células progenitoras más estudiadas para el tratamiento de los defectos óseos, con sus ventajas, desventajas y capacidades en la imagen 14.

<b>Origen MSC</b>	<b>Capacidad potencial en hueso</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Médula ósea</b>	Osteogénicas Neovascularización	Fácil adquisición Reclutamiento <i>in situ</i> Bien caracterizadas	Morbilidad donante Potencial proliferativo limitado Menor celularidad Dependencia de edad y salud del donante
<b>Tejido adiposo</b>	Osteogénicas Neovascularización	Fácil adquisición Bien caracterizadas	Morbilidad donante (debido a anestesia) Necesidad de procesado
<b>Cavidad oral</b>	Osteogénicas	Fácil adquisición Abundantes	No bien caracterizadas
<b>Piel</b>	Neovascularización Apoyo de la diferenciación	Abundantes Mínima morbilidad en zona donante	No bien caracterizadas
<b>Periostio</b>	Osteogénicas	Bien diferenciadas Reclutamiento <i>in situ</i> Pueden co-sembrarse con BM-MSC	Número de células y actividad en relación a la edad del donante

**Imagen 14:** células progenitoras en el tratamiento de defectos óseos (184,190).

## 7. Sustitutos óseos sintéticos

La necesidad de materiales capaces de sustituir al hueso y suplir sus funciones en los casos en los que existe un gran defecto óseo, o una alteración de su mecanismo natural de reparación, ha ido incrementándose en las últimas décadas. Uno de los principales motivos es que el método de elección (*gold standard*) para el tratamiento de dichos casos, es el uso de autoinjerto óseo, y esta práctica no está exenta de comorbilidades para la zona donante y a su vez existe una limitación tanto en la cantidad disponible, como en su calidad (empeoramiento en edades avanzadas) y en la forma extraíble (191). A pesar de que la obtención de un autoinjerto de cresta ilíaca y el tratamiento de su morbilidad puede exceder de los 5.000 \$ por caso (192,193), continúa siendo la única opción clínica de injerto con propiedades osteogénicas, osteoinductoras y osteoconductoras, y que contenga células precursoras viables. Por ello se sigue investigando en alternativas que puedan ser clínicamente útiles y costo-efectivas (194).

Para tratar de aportar soluciones a estas situaciones, se han desarrollado distintos biomateriales sintéticos con capacidad de interactuar en un medio biológico, que pueden derivar de componentes orgánicos o inorgánicos, y cumplen con las propiedades anteriormente desarrolladas en el punto 5. El ideal sería aquel con propiedades osteogénicas, biocompatible, absorbible, con capacidad de dar soporte estructural y vehiculizar otras sustancias, así como ser de utilidad clínicas y un adecuado coste beneficio (195). Una propiedad adicional y de especial relevancia para el crecimiento de tejidos y la regeneración ósea con una forma tridimensional adecuada, tras su implantación es la porosidad. El tamaño de estos poros es variable, pero para su uso en tejido óseo se recomienda que estén entre 100 y 500  $\mu\text{m}$  (196). Sus usos en cirugía ortopédica son amplios: osteosíntesis, artrodesis, artroplastias,

osteotomías o relleno de defectos óseos. Para el relleno de cavidades pequeñas o de gran tamaño, pueden emplearse de manera aislada o mezclados con injerto óseo para aumentar su volumen (191).

Existe una amplia variedad de opciones disponibles, dentro de los sustitutivos óseos sintéticos distinguo dos grandes grupos: inorgánicos y orgánicos. Dentro de los inorgánicos tenemos los metales y las cerámicas principalmente; y en los orgánicos al variado grupo de los polímeros. Estos biomateriales presentarán distintas propiedades entre ellas, que dependerán del material y de su estructura. El material es la porción de un objeto que presenta propiedades uniformes, independientemente de su forma y tamaño. La estructura es la composición y diseño del material, y de ésta dependerá sus propiedades mecánicas (197).

Además de clasificarse por su origen, los sustitutivos óseos también pueden clasificarse en generaciones en función de su actividad biológica en el huésped. Los de primera generación serían bioinertes, los de segunda generación bioactivos y biodegradables, y los de tercera generación serían materiales diseñados para estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular. Estas generaciones no deben interpretarse de forma cronológica estricta, sino que cada una representa una evolución en los requerimientos y propiedades de los materiales implicados (198).

## **Metales**

El uso de materiales metálicos para tratar daños en la calota craneal o para la fijación de fracturas se ha realizado desde décadas antes de tener conocimientos sobre sus propiedades y comportamiento. Si bien se sabía que la inclusión de partículas metálicas en el cuerpo de soldados heridos era bien tolerada (103). La primera patente de un marco metálico para una raíz de un diente artificial para su fijación corresponde a Greenfield en el año 1909 (199), ya que reconoció las

limitaciones de la implantación de dientes naturales y por ello comenzó a experimentar con cilindros hechos con iridio-platino soldado con oro de 24 quilates (200). Otro avance importante que se produjo en el uso de los metales como biomaterial fue en el año 1971, por Galante y su equipo, que fueron los primeros en desarrollar fibras metálicas con poros abiertos para uso clínico, para su uso clínico como recubrimiento poroso de las prótesis de cadera y rodilla (201). En los últimos años se ha investigado en el uso de metales para crear *scaffolds* con microporos tridimensionales de níquel, titanio, magnesio o tantalio que permiten el depósito de hidroxiapatita u otras moléculas y estimulan la unión y proliferación celular (202,203).

Existen una serie de problemas comunes al uso de estos biomateriales metálicos como son la posibilidad de liberación tóxica de iones metálicos y/o de partículas debido a la corrosión o el desgaste por su uso. Esto puede producir reacciones inflamatorias (pseudotumor) o alérgicas, afectando a la biocompatibilidad y pérdida de partes blandas. Además, debido a su módulo de elasticidad, que no se corresponde con el mismo que el del tejido óseo, produce una pobre estimulación del crecimiento de hueso nuevo (128,204). Para el diseño de un implante metálico se deben tener en cuenta una serie de aspectos, como son las fuerzas que sobre él actuarán (su magnitud y transmisión de las mismas), las limitaciones de diseño por su localización anatómica, las propiedades físicas de los tejidos alrededor y la reacción que se puede producir entre el implante y el tejido (103,205).

### **A) Acero inoxidable**

A principios del siglo XX fue descubierto por Leon Guillet en 1904 el acero inoxidable, aunque no fue hasta 1926 cuando Strauss patentó el acero inoxidable 18Cr-8Ni que contenía un 2-4% de molibdeno y porcentaje muy bajo de carbono, con lo que tenía la suficiente resistencia a la corrosión para ser implantado en el ser humano. A partir de entonces el uso de este material en la cirugía ortopédica y la

traumatología abrió un amplio rango de posibilidades (206). Actualmente se usa en asociación con el níquel, cromo, molibdeno o carbono.

Sus ventajas principales son su bajo precio, maleabilidad y ductilidad. Sus desventajas son la tendencia a la corrosión en el interior del organismo (mayor que en otros metales), riesgo de rotura por fatiga, no pueden fabricarse superficies porosas, riesgo de reacciones alérgicas (sobre todo por las concentraciones de níquel) y mayor riesgo de infección que en otras aleaciones metálicas (197). Hoy en día es uno de los materiales más utilizados y su principal uso es en la osteosíntesis, aunque también han sido ampliamente usadas en prótesis de cadera, desde que a finales de la década de 1950 Charnley realizara la primera prótesis total de cadera usando un vástago cementado de acero inoxidable (207).

## **B) Aleaciones de cromo y cobalto**

Otras aleaciones se desarrollaron también desde los inicios del siglo XX con el mismo objetivo y distintas propiedades. En el 1920, Reiner Erdle y Charles Orange unieron sus conocimientos como dentista y metalúrgico respectivamente para desarrollar la aleación de cromo-cobalto conocida como Vitallium (65% cromo, 30% cobalto, 5% molibdeno). No fue hasta mediados de los años 60 cuando se introdujo esta aleación para las prótesis de cadera (208,209) y en 1982 cuando se desarrolló el SB Charité I, un disco vertebral artificial hecho con la combinación de polietileno y la aleación de cromo-cobalto (210,211).

Las principales ventajas son que presenta la máxima resistencia de las aleaciones metálicas a la fatiga, la fractura y el desgaste, también presenta una resistencia mayor a la corrosión que el acero inoxidable pero menor que el titanio. Entre sus desventajas encontramos su elevada rigidez (aumenta el riesgo de osteoporosis en vástagos no cementados por la transmisión de cargas), baja

ductilidad, elevado precio y mayor riesgo de infección que las aleaciones de titanio. Por todas estas propiedades los convierten en idóneos para su uso en prótesis e implantes cementados (197).

### **C) Titanio y sus aleaciones**

El titanio puro y sus aleaciones, originalmente fueron usados en el campo de la aeronáutica, pero pronto despertaron interés biomédico debido a sus interesantes propiedades. Fue a partir del año 1964, que gracias a que Brånemark descubrió, lo que él llamó fenómeno de osteointegración por implantes titanio, se produjo un crecimiento importante en sus usos y aplicaciones médicas (212). Su uso comercial más frecuente en la cirugía ortopédica es el titanio puro, que se usa principalmente en la osteosíntesis, y sus aleaciones con aluminio y vanadio, que se usan para la fabricación de prótesis (prótesis de cadera no cementada y bandejas tibiales en prótesis de rodilla). Aunque actualmente se está sustituyendo el vanadio por su riesgo citotóxico por niobio o hierro (197).

El titanio tiene el módulo de elasticidad más cercano al hueso, por lo que es más flexible y evita la osteoporosis por transmisión de cargas; presenta menor riesgo de infección que las aleaciones de cromo-cobalto o el acero inoxidable. Tiene una densidad baja, además es el metal con mayor resistencia a la corrosión (produce su propia capa de óxido, este fenómeno se conoce como autopasivación). Sus aleaciones resultan bioinertes, por lo que no generan respuesta inmune y tienen la capacidad de integrarse firmemente en el hueso, lo que mejora significativamente el comportamiento de los implantes a largo plazo, disminuyendo el riesgo de aflojamiento y fallo (mejor fijación secundaria, menor tasa de aflojamiento y mayor supervivencia en prótesis de cadera no cementada). Su principal desventaja es su baja resistencia a la fricción por lo que sufren un mayor desgaste, lo que impide su uso en zonas de fricción como son las cabezas femorales o los cóndilos (197,198).

## **D) Metal trabecular**

Se genera por un proceso multietapa que implica la generación de un esqueleto vítreo de carbono donde se deposita un metal, posteriormente se elimina el esqueleto, con ello se crea una estructura porosa metálica llamada metal trabecular. Esto permite el crecimiento rápido de trabéculas óseas a través de sus poros y favorece su integración (197). El primer metal usado para este proceso fue el **tantalio** que es un elemento denso, duro y químicamente estable, tiene propiedades mecánicas ventajosas para su uso como son su alta resistencia a la corrosión y elevada resistencia. Todo ello lo convierte en un material biocompatible e inerte, que ha sido usado de manera segura en la medicina desde mediados del siglo XX (213).

El tantalio poroso utilizado para aplicaciones de cirugía ortopédica, tiene una porosidad cercana al 80% y un rango de tamaño de sus poros 400 to 600  $\mu\text{m}$  (214). En el metal trabecular de tantalio existe un 1% de carbono y el 99% restante de tantalio; tiene un módulo de elasticidad muy bajo similar al del hueso esponjoso y alta resistencia a la fricción; su rigidez es similar a la del hueso, con lo que evita el deterioro por fatiga del material (214,215). Su principal uso es en prótesis de cadera y rodilla no cementadas, debido a su excelente integración y los buenos resultados obtenidos a corto y medio plazo (216). Pueden usarse otros metales como el titanio para producir metal trabecular, si bien su uso está mucho menos extendido (197).

## **Cerámicas**

En la década de los años 1920 de Jong observó las similitudes entre los patrones de difracción de los rayos X del mineral óseo y de un compuesto de fosfato cálcico, la hidroxiapatita (217). Años más tarde, en los años 60, Posner identificó la estructura cristalográfica del mineral óseo y la hidroxiapatita (218,219). Una de las primeras aplicaciones clínicas fue la de sustituir las cabezas femorales de las prótesis de cadera, tradicionalmente metálicas por alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de elevada pureza y

densidad (220). En 1971, Larry Hench desarrolló la primera cerámica bioactiva: el biovidrio 45S5, compuesto de 46.1% SiO<sub>2</sub>, 24.4% Na<sub>2</sub>O, 26.9% CaO and 2.6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, que está en uso clínico desde 1985 (221). Los materiales cerámicos comenzaron a usarse como material de las copas cerámicas, mostrando buenas tasas de desgaste, resistencia a la corrosión y buena biocompatibilidad, sin embargo presentaban riesgo de fallo por rotura debido a su dureza y fragilidad (222,223). Aunque durante una época se llegó a pensar en que podrían ser reemplazados por nuevos biomateriales más eficaces, a principios del siglo XXI experimentaron un nuevo crecimiento, cuando se observó su potencial en el diseño de implantes óseos porosos y como sistemas transportadores de fármacos y moléculas (103,224). Durante las últimas cinco décadas las cerámicas han mejorados sus propiedades y son usadas con aplicaciones médicas para reconstruir y reemplazar el esqueleto dañado.

Todas las cerámicas tienen en común que son materiales con una estructura altamente cristalina, similar a la parte mineral del hueso, ya que la fracción inorgánica del hueso está compuesta de hidroxiapatita y fosfato de calcio (225). Son creadas por el calentamiento a elevadas temperaturas (>1000°C) de sales minerales, que contienen elementos metálicos y no metálicos. Sus propiedades mecánicas son la gran resistencia a la compresión y menor a la tracción, gran resistencia al desgaste, buena biocompatibilidad, debido a su hidrofilia facilitan la lubricación. Son estables químicamente frente al oxígeno, los medios ácidos, alcalinos y salinos, así como a los disolventes orgánicos. Como sus principales defectos encontramos su rigidez, con un módulo de elasticidad alto; y que son quebradizos (197). Este tipo de materiales son excelentes para fabricar implantes, en particular, en superficies de fricción, pero presentan problemas por sus propiedades mecánicas (fatiga y fracturas) (226).

El conjunto de estas cerámicas se les conoce como biocerámicas, en función de la interacción con los tejidos del huésped, se clasifican en 2 grupos principales:

bioinertes y bioactivas, y estas segundas se dividen a su vez en reabsorbibles y no reabsorbibles (227). Otra clasificación complementaria de la anterior divide en 5 grupos a las cerámicas. Un primer grupo donde se sitúan los **carbones**, que son cerámicas densas e inertes, los cuales se emplean principalmente en los implantes vasculares y su principal ejemplo es el grafito, como ventaja presentan gran resistencia a la fatiga; un segundo grupo donde se encuentran las **cerámicas cristalinas bioinertes**, como la alúmina, que tienen gran resistencia a la corrosión y mayor resistencia mecánica; el tercer grupo lo compondrían las **cerámicas porosas**, que permiten el crecimiento de tejido adyacente, dentro se encuentra los corales y la alúmina tratada para tener porosidad; el cuarto grupo son las **cerámicas de superficie reactiva o bioactivas**, donde sus representantes más importantes son la hidroxiapatita y los vidrios bioactivos, que tienen reactividad frente a los tejidos. Finalmente, un último grupo de **composites o mezclas**, en las que encontramos distintos grupos para obtener propiedades de cada uno de ellos (103).

#### **A) Cerámicas cristalinas bioinertes**

Son cerámicas con una elevada densidad y pureza, su comportamiento en el huésped es casi como un material inerte. En este grupo encontramos la alúmina u óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ) y la circonia u óxido de zirconio ( $ZrO_2$ ). La **alúmina** ha sido usada durante más de 20 años, entre sus ventajas encontramos tener el mejor coeficiente de fricción en el par alúmina-alúmina, o con el polietileno (20 veces menor al cromo-cobalto-polietileno); baja tasa de desgaste con mínima producción de partículas, que además no son tóxicas; por ello son idóneas para superficies de fricción en las prótesis. Sus principales desventajas son su coste mayor de fabricación respecto a otros materiales, y su fragilidad, las de tercera generación presentan elevada pureza y un grano muy pequeño para tratar de disminuir este defecto (197). Al presentar un módulo de elasticidad entre 10 y 50 veces superior al del hueso

esponjoso, puede favorecer el aflojamiento del implante y la osteolisis, sobretodo en pacientes con osteoporosis o enfermedades reumáticas (198).

La **circonia** es uno de los materiales cerámicos con mayor resistencia y dureza disponibles para uso médico, con un desgaste extremadamente bajo (198). Suele usarse en combinación con la alúmina formando lo que se conocen como cerámicas de cuarta generación, con una proporción de circonia variable (entre el 15-30%) y el resto de alúmina. Con esta combinación se busca disminuir el riesgo de rotura y de liberación de cuerpos libres.

## **B) Cerámicas porosas**

Su principal característica es su porosidad, gracias a la cuál, se hace posible la adhesión de células al interior y el crecimiento de los tejidos que les rodean. También favorece su vascularización, por lo que son una excelente opción para usarse en procesos de osificación. Su desventaja es la mayor fragilidad, que aumenta de manera directa con su porosidad (103). Buscan promover el crecimiento del hueso alrededor del implante para fomentar la estabilización de las prótesis, aunque en función de la porosidad deberán usarse con baja o ninguna carga, para evitar su rotura (198).

Los **corales** tienen un exoesqueleto con propiedades interesantes para su uso biomédico, tienen una microestructura con poros de un tamaño controlado y que muestran interconexiones similares al hueso trabecular (228). Están formados de carbonato cálcico en la forma cristalina de aragonita, que es relativamente inestable y que sometida a calor, tiende a convertirse en una forma termodinámicamente más estable como la calcita, por lo que no se recomienda su esterilización al vapor, para evitar este proceso (192). Existen formas comerciales derivadas del coral natural y otras como hidroxapatita coralina (donde parte del carbonato cálcico es sustituido parcialmente por hidroxapatita).

Sus propiedades mecánicas se asemejan más a las del hueso esponjosos que a las del hueso cortical, por su porosidad e interconexiones entre los poros. La porosidad del material marcará su resistencia por lo que podrá elegirse la que más se adecue a cada situación clínica. La fragilidad del material permite su fácil modelado incluso de manera intraoperatoria para mejorar así su adaptación a la morfología deseada (191). *In vivo*, tienen la propiedad de ser invadidos por tejido fibrovascular, así como mostrar resistencia frente a las infecciones y tener capacidad osteoconductor. Esta osteoconducción viene condicionada por tres factores: la proximidad del implante al hueso que no debe superar 1 mm; la viabilidad del tejido óseo que rodea al implante; y la estabilidad del implante respecto al hueso, siendo beneficiosos los micromovimientos y perjudiciales los macromovimientos. Otra característica es la reabsorción del material, está inversamente relacionado con la proporción de fosfato de calcio, pureza y tamaño de los cristales, y directamente relacionado con la superficie y porosidad del implante (192). Dadas sus propiedades pueden utilizarse en el tratamiento de defectos óseos y como transportados de moléculas o células, adicionalmente a su función como injerto (94).

A mediados de la década de 1970, se introdujo el exoesqueleto natural de los corales como un sustitutivo óseo y fue usado en la práctica clínica para el tratamiento de defectos óseos (229). En el año 1991, Ripamonti presentó el primer estudio de la morfogénesis de hueso en una biocerámica porosa (coral-hidroxiapatita) con un tamaño medio de los poros de 600  $\mu\text{m}$ , demostrando su utilizada como injerto óseo para formación controlada de hueso (230). La adición de factores de crecimiento a los implantes coralinos ha mejorado su capacidad de osteoinducción en el campo experimental, tanto en monos como en perros, en fusiones de raquis y defectos óseos segmentarios (191,192). Más recientemente se está investigando en su uso como material con el que fabricar *scaffolds* debido a su porosidad, que permite la rápida vascularización y el transporte celular o de factores de crecimiento (128).

### **C) Cerámicas cristalinas bioactivas**

Su principal característica es mostrar una determinada reactividad del implante frente a los tejidos circundantes (231). Adicionalmente pueden presentar la propiedad de ser reabsorbidos con el tiempo, con lo que reduce los problemas derivados de la biocompatibilidad. Aunque este proceso no está exento de complicaciones, ya que puede producirse la liberación de iones, y debe controlarse las concentraciones alcanzadas por éstos, para evitar su toxicidad (232). Estos materiales suelen utilizarse para preparar implantes que induzcan o favorezcan la formación de tejido óseo (103).

#### **Biovidrios**

El primer biovidrio fue descubierto y desarrollado por Larry Hench en el año 1971, y se le conoce como Bioglass® 45S5 con una composición en la que predomina el silicio: 46.1% SiO<sub>2</sub>, 24.4% Na<sub>2</sub>O, 26.9% CaO and 2.6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (221). La investigación en estos nuevos materiales surge como una necesidad, durante la guerra de Vietnam debido al elevado coste de heridas y amputaciones que tuvieron lugar en aquella época, lo que estimuló la búsqueda de materiales que ayudaran a la reparación de tejidos. Desde entonces numerosos Biovidrios han sido desarrollados basándose en los sistemas de Hench (227). La modificación en las proporciones de la composición inicial del Bioglass® 45S5 o la incorporación de otros elementos como el niobio permite modificar propiedades biológicas y mecánicas del vidrio, como su resistencia mecánica o a la corrosión, y adaptarse a necesidades más específicas (67). Actualmente se investiga su uso para crear *scaffolds* cerámicos en base a estos vidrios (128).

Un cambio importante en su fabricación se produjo en los inicios de la década de 1990. Tradicionalmente los biovidrios se producían por las técnicas habituales para crear cristales, los componentes en forma de granos se mezclaban y fundían a

temperaturas altas (1200-1400°C), luego se separaban de los moldes de acero o grafito y se pulían hasta obtener el cristal deseado. Este proceso tenía varios inconvenientes que dificultaban mantener la máxima pureza necesaria para su bioactividad, ya que se podían generar contaminantes durante el pulido o el fundido por la alta reactividad de sus componentes a elevadas temperaturas. Por ello surgieron nuevos procesos para su fabricación como el método sol-gel, esta técnica se basa en la síntesis de una red inorgánica mezclando los componentes en una solución, tras ello se realiza una hidrólisis y gelificación, finalmente se calienta a menores temperaturas (600-700°C) para obtener el vidrio. Este método crea cristales con un área de superficie y porosidad elevada, aumentando su bioactividad. Además evita los problemas de las altas temperaturas y ofrece ventajas adicionales como mayor facilidad de producción, permitir cambios en la composición o controlar su microestructura (233). Numerosos estudios se han desarrollado usando materiales generados por este proceso mostrando excelentes resultados, en el tratamiento de defectos óseos y mostrándolos adecuados para el relleno de cavidades o el recubrimiento de la superficie de implantes (58,60,234)

Los estudios *in vivo*, mostraron que se generaba una reacción en la superficie de forma rápida, una reacción compleja y multietapa. En condiciones fisiológicas los cristales se disuelven lentamente liberando iones de calcio y fósforo, estos iones precipitan para formar una capa amorfa que cristaliza y crea una capa activa de hidroxicarbonato de apatita (HCA). Esta capa es química y estructuralmente similar a la fase mineral del hueso y le permite una unión directa del implante al huésped, por la formación de puentes (235). Debido a la complejidad de la micro/nano estructura de esta capa, permite la adsorción de proteínas adhesivas que actuarán de unión a células osteogénicas y permitirán la unión celular creando una nueva matriz ósea mineralizada. Progresivamente, el biovidrio desaparecerá lentamente hasta ser completamente sustituido por nuevo hueso formado (67,221). Se definió en

posteriores estudios el índice de bioactividad que es el tiempo requerido para que más del 50% de la superficie quede unida, que variaba en función de la composición y microestructura del material (228).

A partir del año 2004, se inició el desarrollo de una tercera generación de biovidrios: los vidrios mesoporosos. El grupo de Zhao propuso un método para la síntesis de vidrios de base de silicio mesoporosos, gracias a la combinación del método sol-gel de fabricación con conceptos de química supramolecular (236). Inicialmente fueron llamados cristales templados, pero actualmente son conocidos como **cristales bioactivos mesoporosos (Mesoporous Bioactive Glasses, MBG)**. Este grupo gracias a su proceso de síntesis permite un mejor control de la mesoestructura del material (poros ordenados y de un tamaño similar), así como un aumento del volumen de poros y del área de superficie, respecto a los biovidrios de generaciones previas (237,238). Este material ha sido el elegido, en nuestro proyecto, para la producción de los *scaffolds*, por las propiedades anteriormente mencionadas y sus características beneficiosas para la regeneración ósea.

Los biovidrios ofrecen ciertas ventajas como son el control de su tasa de degradación, una excelente osteoconducción, bioactividad y capacidad para transportar fármacos, factores de crecimiento o células, actuando a la vez como medio protector (63). Si bien presentan ciertas limitaciones por sus propiedades mecánicas como son su baja resistencia y dureza, lo que limita el soporte de cargas (239).

#### **D) Cerámicas no cristalinas bioactivas: fosfatos de calcio**

Son al igual que los biovidrios cerámicas con actividad biológica, y se diferencian principalmente en que están compuestos por fosfatos de calcio y en su estructura no cristalina. Los tres principales referentes de este grupo son las sales de fosfato tricálcico (TCP), la hidroxiapatita y los cementos fosfocálcicos. Estos materiales

han sido ampliamente utilizados en la investigación de la regeneración de tejidos óseos, ya sea solos, combinados con otros materiales (colágeno, alginato o quitosan) o más recientemente, en el desarrollo de *scaffolds* e ingeniería de tejidos (126,240).

Las propiedades de cada compuestos dependerán de su estructura y la proporción presente de iones de fosfatos cálcico (227). Entre sus propiedades comunes destacan la capacidad para formar matriz osteoide al ponerse en contacto con el hueso, que posteriormente se mineralizará para formar nuevo hueso, mientras se reabsorbe el material implantado. Pueden emplearse de distintas formas: sólidos en gránulos, pequeños bloques (cilindros, esferas, cuñas), como recubrimiento de implantes (tornillos, prótesis) o en forma de cemento (forma líquida que luego se endurece) (94).

### **Hidroxiapatita**

Es una forma mineral natural de apatita cálcica, tiene grandes similitudes con la fracción mineral del tejido óseo en su composición. Tiene una estructura hexagonal y su fórmula es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , su composición teórica es de un 39.68% de Ca, y un 18.45% de P, lo que deja una relación molar Ca/P de 1,667 (227). Esta relación Ca/P es muy importante ya que condicionará su biocompatibilidad, el fosfato monocálcico monohidrato ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) con un ratio de 0,5 Ca/P no es biocompatible debido a su naturaleza altamente ácida. Ratios Ca/P entre 1 y 2 han demostrado ser útiles para la viabilidad de los osteoblastos y la producción de fosfatasa alcalina (241). Hasta el 50% del peso seco del hueso está compuesto de hidroxiapatita en algunas de sus formas, también la encontramos formando parte del esmalte dental y la dentina, y en calcificaciones (126).

Entre sus características destaca su unión química en la interfase HA-hueso, lo que impide la interposición de material fibroso entre estas fases y con ello aumenta el

crecimiento de hueso. Con ello se consigue la mayor velocidad y fuerza de fijación para los implantes, si bien no han demostrado su superioridad a largo plazo frente a otros sistemas de fijación cementados o sin cementar. Además, la HA presenta la mayor estabilidad de todas las cerámicas fosfocálcicas en medio acuoso y a pH fisiológico.

En el año 1951, Ray y Ward describieron el uso de gránulos sintéticos de hidroxiapatita para reparar defectos óseos en diversos huesos y animales, demostrando que este material podía ser sustituido por hueso nuevo pasado un tiempo (242). A lo largo de los años 1980 y 1990 se desarrolló de forma importante los usos de la HA en el campo de la odontología y la cirugía ortopédica, con aplicaciones en el desarrollo de implantes (243–245). Actualmente su principal uso es como recubrimiento de implantes protésicos o de material de osteosíntesis, por el contacto directo que establece con el hueso; como relleno de la matriz de algunos polímeros o como cemento óseo (197,227). Aunque también se ha descrito su uso para crear *scaffolds* de HA con buenos resultados (126,246).

La estructura de los cristales de HA permite la sustitución por otros iones de los grupos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$ . Estos cambios pueden afectar a la morfología, su cristalinidad, solubilidad o la estabilidad térmica. Las sustituciones catiónicas se producen a nivel del ion calcio por parte de iones sodio, magnesio, potasio, estroncio o manganeso; las sustituciones aniónicas se producen a nivel de los iones fosfato e hidróxido por parte del silicio, flúor, cloro o carbonato habitualmente (247). Estos cambios buscan obtener propiedades más ajustadas a las necesidades particulares de cada caso. Un ejemplo es el carbonato de HA (CHA), la sustitución por carbonato es la más común en el mineral óseo (3-8%), entre sus ventajas encontramos que ha demostrado mejorar su bioactividad, al aumentar la aposición de hueso alrededor de los implantes en comparación a la HA pura, esto parece deberse la mayor solubilidad

del CHA (248). Otras sustituciones que aumentan la reactividad de la HA es la de los silicatos por el grupo fosfato (224).

Una de sus principales aplicaciones clínicas, debido a sus propiedades mecánicas inferiores en el soporte de cargas que otros materiales, ha sido como recubrimiento de implantes, el más común ha sido el de los vástagos femorales de las prótesis de cadera. Este recubrimiento de los implantes se realiza mediante la técnica plasma-spray, sus propiedades variarán en función del grosor del recubrimiento, la pureza, porosidad y adhesión. Han demostrado su utilidad principalmente en pacientes jóvenes, por la buena fijación que producen (249,250). Otro uso común de la HA es para rellenar defectos óseos, se inyecta en fase líquida y solidifica en el interior del defecto, sus propiedades físicas y químicas pueden ser moduladas para programar su biodegradación (61).

### **Fosfato tricálcico (TCP)**

Es una biocerámica biodegradable con la fórmula  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Fue utilizado por primera vez en el año 1920 por Albee, se utilizaba en fracturas con pérdida ósea en las que se inyectaba TCP en el hueco entre los extremos óseos, observándose crecimiento de hueso y unión de la fractura más rápidos que en los controles. También se demostró que este material, en conjunción con el microambiente de la fractura, estimulaba la osteogénesis (251).

Sus características principales son su alta resistencia a la compresión, aunque son muy frágiles a la flexión, torsión y a las fuerzas de cizallamiento; alta capacidad osteoconductora, pero sin capacidad osteoinductora. El TCP se disuelve de un medio fisiológico y puede ser sustituido por hueso, su degradación tiene lugar por procesos físicos (abrasión y rotura), químicos (disolución) y biológicos (fagocitosis); tiene una ratio Ca/P de 1,5, que favorece que se reabsorba más rápidamente que la HA. Se

presentan comercialmente en forma de polvo, cuñas o gránulos y principal uso actual es para el relleno de defecto óseos (197,227).

### **Cementos fosfocálcicos o biológicos**

Se describieron a partir de 1980, están formados por una variedad de distintas combinaciones de compuestos cálcicos (mono-, bi-, trifosfatos o HA entre otros). Son una pasta densa con potencial para ser inyectada para el fraguado *in situ* y moldeada en el lugar de la lesión durante la intervención quirúrgica si se precisa. Entre sus propiedades encontramos su resistencia a la compresión con baja resistencia al cizallamiento y tracción; en comparación con otros cementos empleados en cirugía ortopédica no son tóxicos ni desprenden calor durante el fraguado; tienen menor capacidad de reabsorción (lenta y variable) y porosidad que otros compuestos fosfocálcicos. Pueden ser utilizados como transportadores de factores de crecimiento y fármacos. Entre sus aplicaciones destacan mejorar la fijación de implantes mediante técnicas de aumentación en hueso osteoporótico, dar soporte en fracturas metafisarias y rellenar distintas cavidades óseas (94,197,227).

### **E) Cerámicas compuestas: *composites***

Su característica principal es el estar formada por dos fases diferentes en las que se consigue una conjunción de las propiedades de cada una de las fases por separado (103). Se han desarrollado para tratar de obtener un material con diferentes funcionalidades como reactividad de su superficie, bioactividad, resistencia mecánica o capacidad de transportar fármacos o factores de crecimiento. Toman las propiedades de distintos materiales para así obtener un efecto sinérgico en sus propiedades resultantes. Las combinaciones posibles son muy amplias, pero en conjunto se dividen en cerámica/cerámica, cerámica/polímero y cerámica/metal (128).

## **Polímeros**

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión repetida de una o varias moléculas unidas por enlaces covalentes. Las moléculas que se combinan para formar los polímeros se denominan monómeros y las reacciones a través de las cuales se obtienen se conocen como reacciones de polimerización. Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. Los sintéticos contienen entre 1 y 3 tipos distintos de unidades que se repiten, mientras que los naturales o biopolímeros presentan estructuras más complejas (252).

### **A) Polímeros naturales**

Los polímeros naturales tienen propiedades atractivas para la fabricación de *scaffolds*, como son la biocompatibilidad y biodegradabilidad, siendo reabsorbibles. Puede controlarse la porosidad, carga y resistencia mecánica modificando las concentraciones del polímero, las condiciones del proceso de polimerización o introduciendo distintos grupos funcionales en la cadena (253). Su bioactividad también puede modularse mediante la adición de sustancias químicas, proteínas, péptidos y células. Entre sus desventajas, respecto a los sintéticos, encontramos su mayor inmunogenicidad, que además es variable en función de la especie (126,254). Su uso principal es como transportadores de sustancias, si bien, estos polímeros naturales pueden utilizarse para la regeneración ósea, siendo modificados para mejorar sus propiedades, llegando incluso a conseguir capacidad osteogénica. Los principales biopolímeros utilizados en el campo de la bioingeniería son: colágeno, chitosan, seda, alginato, ácido hialurónico y algunos péptidos (128).

El colágeno tipo I es un componente primario del hueso, con buena capacidad de biocompatibilidad, biodegradable y estimulante de la proliferación y diferenciación de las células. Como material es buen transportador y estimula que se deposite la fracción mineral del tejido óseo, también, favorece la fijación de factores de

crecimiento y la angiogénesis. Por todo ello, ofrece un entorno favorable para la regeneración ósea. Sus principales usos como transportador son unidos a antibióticos como la gentamicina y a otras moléculas como BMP o DBM, para mejorar su osteoinductividad. Entre sus desventajas encontramos su potencial antigénico y que no ofrece soporte estructural (94,128).

El ácido hialurónico también ha demostrado su potencial con material para la fabricación de *scaffolds* óseos, es un componente natural del líquido articular con propiedades hidrófilas, no inmunogénico y que se ha encontrado en el citoplasma de las células osteoprogenitoras (255). Su uso suele realizarse en combinación de otros materiales, moléculas o fármacos para obtener actividad osteoregeneradora (128).

El quitosán es un polisacárido derivado del exoesqueleto de los crustáceos, además de sus propiedades de biocompatibilidad y ser biodegradable, tiene actividad antibacteriana, cicatrizante y propiedades bioadhesivas. Suele utilizarse en combinación de otros materiales para servir de andamiaje en la fabricación de *scaffolds* en la reparación ósea, o para administrar fármacos con actividad hemostática (94,256).

El alginato es otro polisacárido, en este caso, derivado de las algas. Es soluble en el agua, con la peculiaridad de que se expande y forma geles a temperatura ambiental en presencia de cationes, formando geles tridimensionales. Permite encapsular células u otros compuestos para posibilitar su implantación y liberación progresiva en el hueso (94,128).

La seda es un polímero natural fabricado en forma de fibras, por algunos tipos de arañas y gusanos del tipo Lepidóptero. Se le ha dado un uso extensivo en la ingeniería de tejidos óseos, cartilaginoso, tendinoso y ligamentario, así como en la

cicatrización de heridas. Esto es debido a que tiene propiedades mecánicas útiles, como su flexibilidad morfológica, estabilidad ambiental y biocompatibilidad. Además, su biodegradación es de tipo proteolítico y se realiza de una forma controlada. Pueden ser modificada químicamente, mediante el cambio de aminoácidos, para modificar las propiedades de su superficie o para englobar moléculas que transportar (257).

## **B) Polímeros sintéticos**

El inicio del uso de los polímeros sintéticos en el campo de los implantes médicos, se cree que se encuentra en la observación de que las astillas de las ventanas de los aviones fabricadas de polimetilmetacrilato (PMMA), que se clavaban en el ojo los pilotos durante la guerra, no les producían alteraciones de la función y eran bien toleradas. El PMMA fue de los primeros en tener aplicaciones en cirugía ortopédica, oftalmología y odontología (258). Posteriormente se introdujeron otros compuestos como el *Dacron*® y el poliuretano con usos cardiovasculares. Sus propiedades fisicoquímicas dependerán de su composición y del grado de entrecruzamiento entre los monómeros. Su forma, estructura, textura, rigidez y flexibilidad son propiedades que determinarán su uso y pueden ser modificadas en función de las necesidades, al igual que los biopolímeros, admiten la adición de moléculas y sustancias químicas para modificar sus propiedades. Entre sus principales usos encontramos el de rellenar huecos o facilitar la fijación de implantes (103).

### **Polimetilmetacrilato (PMMA)**

Se encuentra dentro de la familia de los cementos acrílicos y han jugado un papel fundamental en el anclaje de las prótesis cementadas al hueso que las rodea. Charnley introdujo la idea de auto-polimerización del cemento óseo de PMMA, tomada de los cementos dentales usados por los dentistas (207).

Este cemento esta formado por una fase sólida en polvo que consiste en un 87% de PMMA prepolimerizado; un 2,5% de iniciador, peróxido de benzoilo, que cataliza el proceso de polimerización; y un 10% de un marcador radiopaco ( $\text{BaSO}_4$  o  $\text{ZrO}_2$ ). Por otro lado, lo forma una fase líquida formada por un 97% de monómeros de metilmetacrilato (MMA); el resto lo forman un acelerador y un estabilizador de la reacción. Estos dos componentes se mezclan, con una proporción 2:1 (sólido:líquido) para iniciar un proceso de polimerización que consta de tres fases: fase de mezcla, de trabajo y de endurecimiento; tras lo cual pasa de ser una pasta moldeable a tener una estructura sólida (198).

La unión entre el cemento y el hueso no se produce por adhesividad, sino por interdigitación mecánica, por lo que distribuye las cargas de una manera homogénea y evita la creación de zonas de máxima tensión. Son frágiles a temperatura corporal, con mayor resistencia a la compresión que a la tracción o cizallamiento. Existen dos opciones comerciales de viscosidad alta y baja que son las más frecuentes. Estas propiedades dependen, en gran medida, de la forma en la que se prepare e implante el cemento, por ello se ha desarrollado la técnica de cementación a lo largo de 4 generaciones, que han ido mejorando progresivamente, al incorporar nuevos avances (uso de presurizadores, centralizadores, centrifugadoras o el uso de vacío).

Pueden producirse complicaciones locales derivadas de su uso por la elevación local de la temperatura durante su fraguado (hasta  $133^\circ\text{C}$ ), o complicaciones sistémicas como la hipotensión arterial o la diseminación de microémbolos(259). Además debido a la capacidad de las bacterias de adherirse al cemento y a que pueden disminuir la capacidad fagocítica de los leucocitos, parecen aumentar la susceptibilidad de padecer una infección (260).

Permite la incorporación de fármacos sin alterar sus propiedades, como los antibióticos y antifúngicos para el tratamiento y prevención de infecciones, o el metotrexate para el tratamiento de las metástasis óseas (261,262). En los últimos años se ha avanzado, en el desarrollo de cementos con propiedades bioactivas, buscando mejorar la interfase cemento-hueso, con las incorporaciones de cristales de fosfato de calcio (263). También se han incorporado otras moléculas como la vitamina E para actuar como antioxidante, o nanopartículas como nanotubos de carbono o silicio para mejorar su capacidad de flexión y su resistencia a la misma (264).

Actualmente son el sistema de fijación para prótesis de cadera y rodilla más utilizado, siendo su “*gold standard*” por sus tasas de supervivencia, osteolisis y aflojamiento mejores que otras alternativas. Aunque también es usado para el relleno de cavidades óseas o como espaciador de la articulación, en los recambios sépticos de prótesis en dos tiempos (197,260).

## **Polietileno**

Es un polímero termoplástico semicristalino, formado por cadenas lineales de un monómero de etileno ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ), unido consigo mismo de manera repetida, mediante enlaces covalentes. Hoy en día su uso biomédico está muy extendido como su forma de peso molecular ultra elevado, el conocido como *Ultra-high molecular weight polyethylene* (UHMWPE), también conocido como polietileno de grado quirúrgico (265).

La idea de reemplazar el cartílago dañado por un revestimiento de polímero, surgió en las primeras prótesis de cadera, Charnley utilizó el politetrafluoroetileno (PTFE) por su baja fricción, aunque pronto se vio que tenía un desgaste inaceptable (207). En 1962, el UHMWPE reemplazó al PTFE al presentar una fricción baja similar

pero una resistencia al desgaste mucho mayor. Actualmente sigue utilizándose con gran frecuencia como superficie de fricción de la mayoría de prótesis de cadera y otras articulaciones como la rodilla y el hombro (266).

La base de las propiedades físicas, químicas y mecánicas se la confieren su composición y su estructura, tanto micro como macroscópica. El UHMWPE, como la mayoría de los polietilenos, es un polímero semicristalino compuesto de al menos dos fases intercaladas: una fase cristalina, en la que las macromoléculas se pliegan en láminas cristalinas ordenadas, y en una fase amorfa y desordenada, ambas fases se encuentran intercaladas posiblemente por una interfase parcialmente ordenada (267). A finales de la década de los años 1990, se descubrió que mediante una irradiación controlada del material se conseguía un entrecruzamiento elevado de estas cadenas, con lo que se aumentaba la resistencia al desgaste (268). Los últimos avances en su diseño apuestan por añadir estabilizadores antioxidantes, como la vitamina E, para inhibir la degradación oxidativa, sin necesidad de tratamiento térmico, conservando así su morfología y propiedades mecánicas y resistencia al desgaste (269).

Sus principales propiedades mecánicas son su gran resistencia a la abrasión y el desgaste por rozamiento, asociado a un bajo coeficiente de fricción, también tiene capacidad de autolubricación y alta resistencia a la fatiga. Otras propiedades son su buena resistencia a la tracción y gran capacidad de atenuar la energía, absorbiendo bien los impactos. Algunos factores que influyen en su desgaste son la calidad y sistema de fabricación del polietileno, su grosor (se recomienda siempre que sea mayor de 6 mm), alteraciones en la superficie a la que deben adaptarse o distribución no homogénea de las cargas. Por estas propiedades se ha convertido en el material *gold standard* usado en las superficies de fricción de la mayoría de prótesis actualmente (197,270).

## 8. Ingeniería de tejidos

Existen múltiples definiciones de lo que se conoce como ingeniería de tejidos, puede entenderse como: “el proceso que afecta a la estructura y arquitectura de cualquier tejido viable o no viable, con el objetivo de aumentar la efectividad de construir entornos biológicos” (271). Aplicado a los defectos óseos, sería la opción final en el desarrollo de materiales capaces de tratar defectos que serían muy difíciles de solventar o incluso imposibles con los métodos convencionales, y puede implicar el uso de *scaffolds*, factores estimulantes de la curación y células progenitoras (202,272). Serían la tercera generación de sustitutivos óseos, que integran las propiedades de bioactividad y biodegradabilidad de las generaciones previas de materiales, con la capacidad de inducir respuestas celulares específicas a nivel molecular (198).

Esta necesidad de desarrollar nuevos materiales surge ya que la mayoría de las estrategias para la regeneración ósea disponibles obtienen buenos resultados, si bien, existen algunas limitaciones en su uso y disponibilidad, así como controversia sobre su eficacia y costoefectividad (lesión de la zona donante, rechazo del implante, transmisión de enfermedades o morbilidad postoperatoria) (28,273). Chanley en la década de los años 1950, ya afirmó que “prácticamente todas las cirugías clásicas han sido exploradas, y a menos que se haga algún descubrimiento revolucionario, que permita tener el control de la osteogénesis por parte del cirujano, no se realizarán grandes avances” (274). En la última década se han desarrollado numerosos estudios en animales e incluso los primeros estudios clínicos pilotos en humanos, utilizando materiales enriquecidos con células mesenquimales para el tratamiento de defectos óseo en huesos largos y en huesos faciales (28,275).

En esencia, el sustitutivo óseo perfecto sería la combinación de células progenitoras, como las células madre mesenquimales (MSC) o células maduras

(permitiendo la **osteogénesis**), sembradas en un soporte biocompatible, que idealmente tendría una estructura tridimensional similar a la de los tejidos vivos (para favorecer la **osteoconducción y el crecimiento vascular**), con los factores de crecimiento apropiados (para la **osteoinducción**), para generar y mantener el hueso. El cuarto factor deseable sería el de contribuir a la **estabilidad mecánica**, siendo este el cuarto pilar del concepto del diamante (28,34). Además, son necesarias dos condiciones fundamentalmente: una continuidad física a lo largo de la lesión para servir de guía al crecimiento óseo, y evitar la formación de un tejido cicatricial (202).

El campo con más desarrollo y estudios de la ingeniería de tejidos lo constituye el desarrollo de *scaffolds* sin aditivos o con la adición de distintas estirpes celulares, factores de crecimiento, otras moléculas o la distinta combinación de ellas. Aunque también existen otros campos como el de la nanomedicina, desarrollando nanopartículas con poder antibacteriano o transportadores de antibióticos de tamaño muy reducido (276). También se ha avanzado en la aplicación de campos magnéticos al desarrollo de nanopartículas magnéticas que permitirían la señalización de células o dirigir las hacia un objetivo (246), y la aplicación de los campos magnéticos estáticos, rotatorios o los electromagnéticos pulsados, combinados con factores de crecimiento y moléculas de señalización para mejorar la curación de los defectos óseos, la densidad mineral ósea y la fijación de implantes al hueso (189,277).

La ingeniería de tejidos busca crear materiales que aúnen las propiedades idóneas de los sustitutos óseos y puedan ser una alternativa al *gold standard* que sigue siendo el injerto autólogo. A día de hoy, no existe ningún sustituto heterólogo o sintético disponible, que tenga propiedades biológicas o mecánicas superiores o iguales a las del hueso (28). Constituye una estrategia prometedora en el campo de la medicina regenerativa ósea, cuyo objetivo es generar tejidos funcionales nuevos, mediado por células, en lugar de implantar materiales inertes; con ello se podría evitar

el uso de injertos y trasplantes desarrollando nuevos materiales, combinando los conocimientos actuales en cirugía ortopédica con otras ramas del conocimiento como la biología, la física, la ingeniería y la ciencia de los materiales (278). El resultado clínico perseguido es mejorar la rapidez y calidad de la consolidación de las fracturas, el relleno de cavidades y defectos óseos, y mejorar las interfases protésicas para prevenir el aflojamiento aséptico y mejorar su integración (279).

### **Scaffolds óseos**

Su traducción sería la de andamio o andamiaje, pero es un concepto más amplio, sería el de una matriz tridimensional que permite la unión, proliferación y diferenciación de células y tejidos, cuya función es la de permitir y estimular la formación de hueso sano para restaurar su función (280). Probablemente, el sembrado de células de cartílago en espículas óseas por Green en el inicio de los años 1970, sea el primer intento de generar un *scaffold* (281).

#### **A) Características**

Sus características principales recomendables son (198,202,282):

- Deben estar hechos de materiales biocompatibles y sus productos de degradación no deben ser citotóxicos. Seleccionando materiales no alérgicos ni carcinogénicos.
  
- Deben ser biodegradables y su reabsorción debe tener una tasa similar a la de la reparación del tejido. Aunque también pueden usarse no reabsorbibles.
  
- Deben poseer una red altamente interconectada de poros, formada por la combinación de macro y microporos, que permita al propio tejido crecer en su interior, el desarrollo de una vascularización y el aporte de nutrientes.

Esta porosidad e interconexión debe ser la suficiente para el sembrado de células, su migración y el depósito de matriz extracelular.

- Las propiedades mecánicas deben permitir la regeneración óseas en lugares de carga, manteniendo su volumen. Debe mantener su integridad estructural, forma y resistencia, durante las primeras etapas de la formación de nuevo tejido óseo. En el caso de materiales irreabsorbibles es fundamental la resistencia a la fatiga por la exposición continua y prolongada a ciclos de carga durante el resto de la vida del paciente.
- Las propiedades mecánicas prioritarias son el soporte de cargas, su rigidez, fuerza y resistencia a la fatiga. Que la rigidez sea la óptima es importante, porque su exceso puede producir un fallo en el hueso adyacente por una mayor concentración de fuerzas; y un defecto de rigidez conllevaría al fallo del implante y atrofia del hueso (283).

A estas características principales cabría añadirles otras adicionales, como la facilidad para su producción y adaptación a las necesidades tridimensionales de los defectos, siendo fácilmente moldeables y todo ello sin un coste excesivamente elevado. Así como una buena capacidad para la liberación controlada de los factores de crecimiento y moléculas, con un control de su cinética y estrategia de acción, y la misma capacidad para el transporte y liberación de células en condiciones óptimas (128).

## **B) Diseño**

En su diseño, las propiedades de la superficie que incluyen su topografía, composición química, bioactividad o su humectabilidad deben valorarse teniendo en

cuenta que en un *scaffold* tridimensional poroso, su superficie no es solo el exterior, sino también sus superficies internas. Estas superficies influirán en las interfases generadas con el tejido óseo adyacente a su lugar de implantación, y entran en juego a escala micro y nanométrica (202). La rugosidad de la superficie tiene influencia en la morfología celular y su crecimiento, así como que las superficies lisas tienen menos adhesión celular que las rugosas. También se ha demostrado que cambios en la topografía modifican la orientación y la unión celular (284).

La optimización de su arquitectura busca replicar la estructura natural del hueso, proporcionando un entorno similar *in vivo* para que las células óseas colonicen y regeneren el tejido óseo (285). El diseño controlado de la macro y micro porosidad se ha convertido en un elemento fundamental de su arquitectura, el tamaño e interconexión de los poros busca replicar la porosidad del hueso esponjoso o cortical. Existe una clasificación clásica de los poros en función de su tamaño, los microporos son <2 nm, los mesoporos se encuentran entre 2-50 nm y los macroporos son > 50 nm (286). Atendiendo a su función también encontramos 3 grupos distintos de poros: con un rango de diámetro entre 150-400  $\mu\text{m}$ , estos son necesarios para la colonización celular y la vascularización; otro grupo de poros <20  $\mu\text{m}$  son necesarios para el crecimiento de capilares en su interior y para las interacciones entre las células y la matriz extracelular; por último los mesoporos (2-50 nm) que permiten la incorporación de factores y moléculas al interior del *scaffold* (175).

Aunque algunos estudios parecen indicar que el tamaño idóneo de los poros, para el crecimiento óseo, se encuentra en un rango 100-500  $\mu\text{m}$ , no existen consenso claro acerca de ello (287,288). Un estudio comparaba la osteointegración de prótesis con poros de 700 y de 1500  $\mu\text{m}$  en tibias de oveja, con diseños de implantes sólidos ranurados sin microporos, obteniendo un mayor crecimiento óseo en la superficie en longitud, profundidad y área en los implantes porosos (289). La combinación de poros

de distinto tamaño también ha demostrado buenos resultados en mandíbulas de cerdo, al aportar espacio adicional para el crecimiento óseo y mejorar la transferencia de cargas (290,291). Otro caso sería el de los biovidrios mesoporosos que combinan macro y mesoporos, con una distribución uniforme del tamaño de los poros en la región mesoporosa (2-50 nm), y un sistema de canales porosos de mayor tamaño (macroporos) organizado de manera homogénea en disposiciones 2D o 3D, con lo que se consigue un área de superficie ( $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) y un volumen de poros ( $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ) muy elevado (175).

El hueso natural es un material complejo formado por distintos materiales con distinta arquitectura, esto hace que existan módulos de elasticidad distintos para el hueso cortical y para el hueso esponjoso, al igual que varía su porosidad. No existen materiales que por si mismos mimeticen estas características. Los materiales densos con módulos de elasticidad altos favorecen la tensión y el aflojamiento de implantes, en cambio los materiales porosos muestran módulos de elasticidad similares a los del hueso nativo (292).

### **C) Conformación**

Varios sistemas para la conformación de *scaffolds* a temperatura ambiente están disponibles, esto permite la inclusión de distintas moléculas en el material, que si se producen a altas temperaturas pueden perder sus propiedades (293). El diseño de implantes mediante tecnología tridimensional se ha incrementado en la última década. Existen varias formas principalmente de fabricación 3D de materiales: impresión tridimensional por depósito que es la más utilizada, y se basa en la aplicación de capas consecutivas de material siguiendo un diseño realizado previamente, hasta conseguir la forma deseada; por energía, que consiste en esculpir a partir de un bloque de material el diseño deseado mediante tecnología laser; y la combinación de ambos métodos (240). Sus costes siguen siendo elevados, aunque se

han reducido progresivamente en los últimos años. Pueden utilizarse como sistema de diseño estándar de implantes, aunque su indicación principal sería para la fabricación de materiales adaptados a los requerimientos del paciente (197).

Estas técnicas de diseño 3D fueron originalmente utilizadas para el desarrollo de otros materiales, si bien se han adaptado a la bioimpresión mejorando su precisión y resolución para conseguir replicar las micro/nanoarquitecturas que precisan. Además de los materiales, se han desarrollado biotintas que son mezclas de células, factores de crecimiento, biomoléculas, agentes terapéuticos o polímeros biodegradables, que pueden ser depositados capa a capa, preservando la función y viabilidad celular, con la estructura y localización deseada (240). Las principales ventajas del diseño e impresión tridimensional son que permite diseñar sustitutos óseos adaptados a la forma del tamaño del defecto óseo que se desea tratar, también permite un control más preciso de las propiedades mecánicas y sus parámetros estructurales. Esa mejor adaptación a situaciones concretas puede traducirse en una reducción del tiempo quirúrgico, al precisar una menor manipulación del implante, y una recuperación más rápida al adaptarse a las demandas funcionales de la zona lesionada (294). En el hueso, las células se encuentran en diferentes estados de proliferación, diferenciación y maduración, dentro de una matriz extracelular organizada en múltiples capas. Mediante la bioimpresión es posible imprimir células en un andamiaje apropiado, para crear materiales con la capacidad de mantener la funcionalidad celular apropiada y a la vez permitir el remodelado y curación ósea (295). En la imagen 15 puede verse un esquema que ejemplifica este tipo de técnicas.



**Imagen 15:** esquema de la impresión de tejidos, previo diseño asistido por ordenador utilizando cartuchos cargados de células y biomoléculas (295).

Uno de los sistemas es la impresión tridimensional por prototipado rápido, que permite el diseño basado en información obtenida por tomografía del tejido óseo a reparar, luego mediante un diseño asistido por ordenador se diseña el *scaffold* con la forma y porosidad deseados adaptado a la situación clínica. Finalmente se prepara una pasta del material seleccionado para formarlo y se coloca en un inyector, que creará el implante con las características deseadas (296). Una combinación de distintos métodos como el sol-gel, el doble templado de polímeros o el prototipado rápido ha permitido el desarrollo de los biovidrios mesoporos, que muestran una red jerárquica de poros de distintos tamaños (175).

## D) Materiales

Pueden emplearse una amplia variedad de materiales en el diseño de estos andamiajes, de origen natural como sintético. Los polímeros naturales tienen propiedades útiles para la construcción de *scaffolds*, como su biocompatibilidad y biodegradabilidad, además permiten el control de su porosidad y resistencia mecánica, mediante cambios en su proceso de producción (253). Su bioactividad también puede regularse y admiten la incorporación de sustancias químicas, proteínas, péptidos y células. Los más estudiados con aplicaciones para la ingeniería de tejidos óseos son colágeno, quitosán seda, alginato, ácido hialurónico y algunos péptidos (128,297). Los materiales de origen sintético pueden ser inorgánicos, donde encontramos los metales y las cerámicas, y orgánicos que tenemos a los polímeros; sus propiedades variarán en función de su composición y estructura principalmente (197).

Debido a las ventajas y desventajas específicas de cada tipo de material, el uso de *scaffolds* tipo *composite* (compuestos de más de un tipo de material) es cada vez más frecuente (184). Este tipo de compuestos buscan obtener un material que combine las propiedades beneficiosas de sus componentes potenciándolas al obtener un efecto sinérgico. Las combinaciones más frecuentes son polímeros/cerámicas, cerámicas/metales y polímeros/metales (298). Los *composites* mejoran las propiedades finales obtenidas en los *scaffolds* y permiten la degradación controlada, por ello se emplean para la ingeniería de tejidos (280). La combinación colágeno/biovidrio han demostrado una mineralización precoz, o la de polímeros con sales de calcio (hidroxiapatita con polietileno de alta densidad o con ácido poliláctico) genera compuestos con excelentes propiedades mecánicas y excelente osteoconductividad, al mimetizar la estructura del hueso y permitir su mineralización y diferenciación celular (299). El recubrimiento con fosfato cálcico de metales, vidrios, polímeros orgánicos u otras cerámicas inorgánicas pueden mejorar su biocompatibilidad o reforzar su bioreactividad (280).

## **Terapia celular**

Las estrategias basadas en el uso de células para el tratamiento de los defectos óseos, han surgido como una respuesta prometedora, para aquellos casos en los que el potencial regenerativo se encuentra disminuido, ya sea por la edad, la salud del paciente o factores dependientes del defecto. Aunque la investigación principal en ingeniería de tejidos se centra en la creación de andamiajes principalmente, se ha hecho evidente que estos materiales precisan de otros elementos que estimulen la curación ósea, fomentando la formación de osteoblastos y el proceso de vascularización. En los últimos años, un gran número de estudios han utilizado sistemas de cultivos celulares para mejorar las propiedades de los *scaffolds* tridimensionales, y para tratar de entender mejor el proceso de curación ósea *in vivo*. A pesar del esfuerzo en investigación en el desarrollo de este tipo terapias, solo unas cuantas han conseguido llegar a la práctica clínica actualmente (128).

La utilidad de incluir células en los constructos, ha quedado demostrada en estudios mediante análisis inmunohistoquímico, que permiten rastrear antígenos humanos específicos de las células implantadas en *scaffolds* en otras especies. Han permitido observar como estas células se encuentran principalmente en el callo cartilaginoso intermedio y en la matriz osteoide temprana; en cambio, las células del huésped, son reclutadas para el remodelado del hueso maduro. Esto casa con el comportamiento idóneo de un sustitutivo óseo, que favorece la reparación ósea, a la vez que permite la integración por parte del huésped (294).

### **A) Selección celular**

Los osteoblastos y osteocitos juegan un papel fundamental en el depósito de hueso y el proceso de curación y remodelado óseo, por tanto, sus precursores representan una excelente fuente para la terapia celular (184). El uso de células diferenciadas como los osteoblastos o los condrocitos es bastante restringido, debido

a su accesibilidad limitada y a la falta de capacidad de autorenovación; además su naturaleza más heterogénea las hace menos atractivas desde el punto de vista de la eficacia y su regulación (300).

El número requerido de células para la reparación de una fractura depende de las características de la fractura, de la fuente celular, el método de estimulación y el biomaterial empleado. Se estima que, para el tratamiento de un defecto en un hueso largo de 4 cm, se necesitan 600 millones de células. Es por ello que las células progenitoras representan una población celular más idónea para su uso en la ingeniería de tejidos, por permitir su recogida y expansión de una manera controlada (294). En la imagen 14 explicábamos las principales propiedades y tipos, de las células progenitoras más comúnmente utilizadas para el tratamiento de los defectos óseos: derivadas de la médula ósea, del tejido adiposo, de la cavidad oral, de la piel y del periostio. Cada una de ellas aporta unas ventajas y desventajas concretas por lo que su selección deberá realizarse adaptada a las necesidades concretas de cada caso, teniendo en cuenta el biomaterial y el defecto a tratar.

## **B) Manejo e implantación**

Para poder ser utilizadas se requiere de un proceso en varias etapas, en primer lugar, las células autólogas o alogénicas son aisladas y expandidas *in vitro*, para garantizar una población celular suficiente para su uso terapéutico. Después, las células pueden ser estimuladas para inducir una diferenciación osteogénica seguida del sembrado o encapsulamiento en un biomaterial; otra alternativa es el sembrado o encapsulamiento de las células en un biomaterial que contenga moléculas estimulantes de la diferenciación (factores de crecimiento); también se puede realizar una mezcla de ambas opciones, como sería la estimulación de las células expandidas en un ambiente tridimensional. Tras una de estas opciones, el constructo puede ser cultivado en laboratorio, en un sistema de biorreactor, para alcanzar un estado

madurativo superior; o puede ser implantado para su desarrollo *in vivo* (301,302). Finalmente, la combinación realizada de las distintas opciones, debería crear un entorno que condujera y estimulara a las células para formar un tejido nuevo y funcional, que se integrara en el defecto a tratar (294).

A día de hoy, los tratamientos que incorporan terapias celulares tienen una baja implantación en la práctica clínica, a pesar de los avances en bioingeniería. Actualmente, estas terapias son aplicables en una escala limitada, ya que son dependientes del personal que realiza el sembrado y expansión, consumen mucho tiempo y en ocasiones su eficiencia es escasa. El sembrado de células en *scaffolds* prefabricados no recrea la organización nativa de los tejidos, y lo mismo ocurre con su vascularización. Por ello se avanza en crear constructos que integren las células vivas y las biomoléculas en la estructura tridimensional deseada del biomaterial (184). Las nuevas técnicas de biofabricación e impresión 3D proporcionan los medios para controlar la distribución uniforme de las células o poder situarlas con precisión en la superficie del implante, y lo mismo ocurre con las biomoléculas, permitiendo controlar mejor su liberación (295,303).

Una vez implantado en el defecto, la viabilidad de las células presentes en el constructo, dependerá del tipo celular, su grado de diferenciación y los factores estimulantes asociados presentes. Existen una gran variación entre estudios, en un *scaffold* bifásico de fosfato cálcico sembrado con células progenitoras humanas derivadas de la médula ósea e implantadas en ratones, solo el 1,5% de la población celular permaneció después de 37 días (304). En cambio, un constructo similar donde las células progenitoras eran de origen perióstico, y habían sido sembradas previamente en una matriz fosfocálcica, la supervivencia fue cercana al 71% (305).

### **C) Interacciones células-biomaterial**

*In vivo*, las células están expuestas a una combinación de factores físicos y bioquímicos que regulan su comportamiento funcional (285). Los estímulos mecánicos juegan un papel importante, en la adaptación de los tejidos musculoesqueléticos, a su función, y por ello se deben optimizar las interacciones entre las células y los materiales. Algunas propiedades físicas, como la topografía, geometría, porosidad o dureza, pueden utilizarse para guiar respuestas celulares, similares a los obtenidos con biomoléculas (306).

La dureza del material ha demostrado tener relación con la diferenciación celular y la expresión de genes osteogénicos en células progenitoras derivadas de periostio. También se ha visto como la exposición a la hidroxiapatita acelera el proceso de diferenciación celular, especialmente a altas concentraciones de HA (307). Otros procesos para modificar la superficie, como la oxidación, anodización o el depósito electroquímico, se han utilizado para mejorar la biocompatibilidad y osteoconductividad de los materiales. Estos cambios topográficos, pueden ser un método para guiar la integración de materiales, al influir en el proceso de osteogénesis: mejoran la adhesión celular regulada por integrinas y favorecen la diferenciación celular osteoespecífica (308).

### **D) Traslación a la práctica clínica**

La mayoría de estas estrategias de terapias celulares, tienen dificultados en la traslación de los hallazgos *in vitro*, a estudios clínicos más relevantes *in vivo*. Se ha sugerido como una de las causas posibles, el mecanismo de acción del proceso natural de curación al aplicarse a una fractura en concreto, que es difícil de reproducir en los modelos *in vitro* (309). El éxito de un implante está en relación con la elección de una población potente de células progenitoras, asociadas a una estimulación correcta y un andamiaje que de soporte al conjunto; y para realizar de manera correcta

está elección deben tenerse en cuenta factores anatómicos y fisiológicos del defecto a tratar (294).

Por ello, los estudios *in vivo* en modelos animales, pueden aportar información relevante sobre el proceso de reparación de fracturas concretas y probar la efectividad de los constructos óseos. El uso de nuevas técnicas de microscopía han ayudado a mejorar la información obtenida de las interacciones entre los materiales y el huésped, y observar la viabilidad de las células implantadas (310). Otra herramienta utilizada es, la microtomografía computarizada, que permite también una evaluación de las interacciones del implante con el huésped y realizar reconstrucciones tridimensionales, si bien esta herramienta precisa de una gran potencia de computación y espacio de almacenamiento, como principal desventaja. A pesar de estos avances, existen pocos datos comparables en estudios a largo tiempo en la caracterización de scaffolds óseos, tanto *in vivo* como *in vitro* (184).

En cuanto a su aplicación clínica en pacientes, otros de los factores limitantes es la dificultad para su producción a gran escala, con el consiguiente abaratamiento del proceso que ello generaría. Esto es especialmente complejo, en el uso de células, al requerir un procesado en varias etapas, y en los casos en los que se utilizan material celular obtenido del paciente, todavía dificultan más el proceso de automatización de su producción. Para ello se debe conseguir que el proceso de producción sea reproducible, seguro para los pacientes y económicamente rentables, de acuerdo a los estándares de buenas prácticas clínicas (128).

### **Biomoléculas estimulantes en ingeniería tisular**

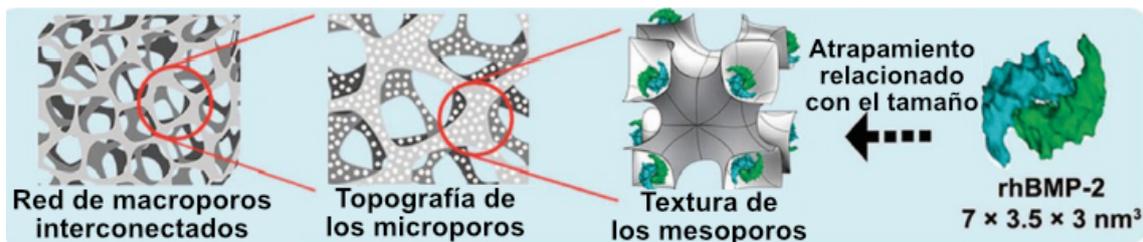
Ya hemos hablado anteriormente de las principales biomoléculas relacionadas con la diferenciación de los tejidos óseos, así como de sus principales propiedades. Estas son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento

transformantes (TGF- $\beta$ ), factores de diferenciación del crecimiento (GDFs), otros factores de crecimiento (parecidos a la insulina, fibroblásticos, derivados de las plaquetas) y los relacionados con la hormona paratiroidea. Uno de los objetivos principales en el diseño de sustitutivos para la regeneración ósea es generar materiales que puedan recrear el microambiente del tejido óseo, ya que éste, es el responsable de regular la función de las células progenitoras (MSCs) y mantener su homeostasis (311).

El uso de estas moléculas, aplicadas a la ingeniería de tejidos, que son esenciales en el microambiente del tejido óseo, busca promover y acelerar la curación ósea, para ello pueden implantarse de manera directa en el defecto o utilizarse embebiendo *scaffolds* enriquecidos previamente con MSCs o solos, para que se liberen durante el proceso de curación. Su uso le confiere propiedades osteoinductoras a biomateriales que de por sí no las presentarían, y con ello pueden inducir la diferenciación de las células mesenquimales del huésped o las que han sido sembradas previamente en el constructo (175,312). Como ya mencionamos, en el desarrollo de biomateriales que transporten MSCs, estos factores juegan un papel importante durante el desarrollo del implante definitivo, pudiendo usarse para acelerar el proceso de desarrollo y diferenciación celular en distintos momentos *in vitro* o *in vivo* (301,302).

Todavía se sigue estudiando acerca del uso combinado de varias de estas moléculas o de la dosis real que liberan los *scaffolds in vivo* en los defectos. Existen múltiples formas de empleo asociado a los constructos que buscan un mayor control en su proceso de liberación, ya sean recubriendo la superficie o mediante técnicas de impresión tridimensional, que permiten incorporar estas moléculas al constructo, con la distribución espaciotemporal deseada (184). Con la primera opción se consigue una liberación rápida de los factores de crecimiento, tras lo cual se diluye la presencia de

ellos en el microambiente, esta técnica tiene la ventaja de que proporciona un estímulo inmediato, pero su duración es más breve e impredecible, así como dependiente de la degradación del biomaterial. Para prolongar la duración de su efecto y controlar mejor su liberación se busca fomentar uniones covalentes entre las moléculas y el material del implante o encapsular los factores por medios físicos como mesoporos de su tamaño, como puede verse en la imagen 16 (313,314). Por otro lado, con la impresión 3D y el uso de biotintas que contengan dichas biomoléculas, se consiguen un patrón preciso en su distribución dentro del material, con lo que su liberación puede ser más controlada y prolongada, aunque también se ha descrito un reducción de su actividad biológica, que se cree debida al proceso de bioimpresión (315).



**Imagen 16:** representación esquemática de los macro, micro y mesoporos de un scaffold cargado con biomoléculas (314).

# Hipótesis y objetivos

# 1. Hipótesis

## **Hipótesis verdadera**

La combinación del vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) con la composición (mol %)  $82.2\text{SiO}_2-10.3\text{CaO}-3.3\text{P}_2\text{O}_5-4.2\text{ZnO}$ , enriquecido con células humanas mesenquimales (MSC) y cargado con osteostatina (OST), es capaz de generar la curación de un defecto óseo crítico realizado en el cóndilo femoral externo de hembras de conejos de raza Nueva Zelanda esqueléticamente maduras, con mejores resultados comparativos que su implantación de forma aislada, o que su implantación en combinación única con células humanas mesenquimales de médula ósea (MSC), o que su implantación en combinación única con osteostatina (OST).

## **Hipótesis nula**

La combinación del vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) con la composición (mol %)  $82.2\text{SiO}_2-10.3\text{CaO}-3.3\text{P}_2\text{O}_5-4.2\text{ZnO}$ , enriquecido con células humanas mesenquimales (MSC) y cargado con osteostatina (OST), no es capaz de generar la curación de un defecto óseo crítico realizado en el cóndilo femoral externo de hembras de conejos de raza Nueva Zelanda esqueléticamente maduras, sin mejores resultados comparativos que su implantación de forma aislada, o que su implantación en combinación única con células humanas mesenquimales de médula ósea (MSC), o que su implantación en combinación única con osteostatina (OST).

## 2. Objetivos

### Objetivo general

Estudiar comparativamente *in vivo* la regeneración del tejido óseo en un defecto crítico experimental en el cóndilo lateral externo del fémur de hembra de conejos adultos de raza Nueva Zelanda tras implantar en dichos defectos un vidrio bioactivo mesoporoso enriquecido con células humanas mesenquimales y cargado con osteostatina, en distintas combinaciones terapéuticas.

### Objetivos específicos

1. Comprobar que los biovidrios mesoporosos cargados con osteostatina y sembrados con células mesenquimales humanas pueden emplearse de manera sencilla bajo las condiciones de esterilidad que supone un quirófano.

2. Comprobar el manejo y comportamiento intraoperatorio de un implante de vidrio mesoporoso para el tratamiento del defecto óseo del estudio.

3. Evaluar histológicamente y de una manera cualitativa la eficacia del biovidrio mesoporoso enriquecido con MSC y cargados con OST como regenerador de defectos óseos de tamaño crítico, y compararlos con los grupos en los que no se enriqueció con MSC, en los que no se cargó con OST o en los que se utilizó el biovidrio solo sin carga ni enriquecimiento adicional.

4. Evaluar radiológicamente y de una manera cualitativa y cuantitativa la eficacia del biovidrio mesoporoso enriquecido con MSC y cargados con OST como regenerador de defectos óseos de tamaño crítico, y compararlos con los grupos en los que no se enriqueció con MSC, en los que no se cargó con OST o en los que se utilizó el biovidrio solo sin carga ni enriquecimiento adicional.

# **Material y Método**

## 1. Metodología y diseño experimental

Se eligió un diseño de tipo experimental, prospectivo y controlado para evaluar comparativamente la actividad biológica de los soportes biocerámicos enriquecidos con osteostatina y células mesenquimales. Consideramos que la realización de este trabajo de Tesis, puede aportar datos, resultados y conclusiones de interés para contribuir a la mejora del conocimiento y desarrollo de los materiales biocerámicos y su enriquecimiento con distintas señales y células.

Presentamos la evaluación *in vivo* del comportamiento de las biocerámicas enriquecidas con osteostatina y células mesenquimales en el papel de regenerar defectos óseos críticos en 12 hembras de conejos adultos de raza Nueva Zelanda.

Los procedimientos del presente trabajo, se han realizado englobados en el proyecto con licencia PI15/00978 que cuenta con la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

El cuidado y utilización de los animales se ha realizado de acuerdo con la Política Española de Protección de los Animales RD1201/05, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 86/609 relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros.

El proyecto experimental propuesto es fruto de la colaboración entre el Departamento de Química Orgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Forma parte como un subproyecto, de un proyecto mayor que aborda de manera integral el tema

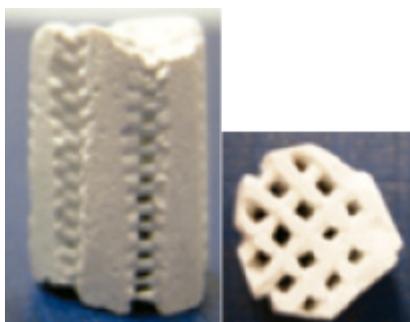
de la producción y utilización de las biocerámicas enriquecidas con moléculas señalizadores y células.

## 2. Material de experimentación

### Material de implantación

Hemos empleado para nuestro trabajo vidrios mesoporosos bioactivos con la siguiente composición, 82.2%SiO<sub>2</sub>–10.3%CaO–3.3%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–4.2%ZnO (mol %). Han sido diseñados y fabricados en el Departamento de Química Orgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, de manera que tuvieran un alto grado de porosidad y amplia área de superficie.

Los vidrios mesoporosos (MBG) (SiO<sub>2</sub>–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) fueron sintetizados utilizando la técnica de autoensamblaje inducido por evaporación (*evaporation induced self-assembly*: EISA), y los *scaffolds* tridimensionales, creados a partir de dicho material, mediante técnicas de prototipado rápido. Con poros gigantes de alrededor de 400 μm y canales de dos tipos entre 700-1000 μm y entre 1000-1500 μm, así mismo presentaba también macroporos entre 1-10 μm interconectados. Con este proceso, se obtiene un cilindro de 7mm de diámetro y 10 mm de alto, el resultado obtenido puede observarse en la imagen 17. Este proceso de síntesis y caracterización del *scaffold* ha sido descrito por nuestro grupo de investigación previamente (316).



**Imagen 17:** Fotografía del *scaffold*, vista longitudinal y vista de su sección.

Para el proceso de cargado del scaffold con osteostatina (OST), se incubaban en placas de 24 pocillos con 1 ml de tampón de fosfato salino (PBS: *phosphate-*

*buffered saline*) a un pH=7,4 que contenía 100 nM de OST (Bachem, Bubendorf, Suiza), como puede verse en la imagen 18. La carga media observada en el scaffold fue 0,71 µg de osteostatina/ g de *scaffold* y su liberación al medio fue buena, alrededor del 90% a las 24 horas y un 100% virtualmente a las 96 horas (316).



**Imagen 18:** Fotografía de varios *scaffolds* en sus pocillos durante el proceso de carga con osteostatina.

Las células mesenquimales elegidas para su sembrado en estos andamiajes y su posterior implantación en el modelo animal, fueron células mesenquimales humanas (hMSCs) procedentes de Lonza (Walkersville, EEUU). Estas células fueron cultivadas en el medio basal de células progenitoras mesenquimales (MSCBM: *mesenchymal stem cell basal medium*, Lonza, Walkersville, EEUU) que contenía 10 % suero fetal bovino, 1 mM de L-Glutamina y 1% de penicilina-estreptomina. Se añadieron gota a gota (100 µl) en cada *scaffold* ( $4 \cdot 10^5$  células/*scaffold*) en una placa con 24 pocillos, que se rellenaban con MSCBM, y se procedía a su incubación en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 2 días, con remplazo diario del medio. En estudios realizados por miembros del grupo de investigación, se pudo demostrar la

adecuada unión de las MSC al implante, así como, su correcto crecimiento, diferenciación y supervivencia (316).

### **Animal de experimentación**

Hemos elegido para la realización de los ensayos *in vivo*, como animal de experimentación, a hembras de conejo de raza Nueva Zelanda adultas (imagen 19). Es un animal ampliamente utilizado para este tipo de estudios, y nuestro grupo de trabajo tiene una amplia experiencia en la realización de estudios con dicha especie, así como en su manejo y cuidado (58–60,62,63).

El diseño experimental de nuestro trabajo implica la utilización de 12 hembras de conejo Nueva Zelanda esqueléticamente maduras de 6 meses de edad, para que el tamaño de sus extremidades permitiera la realización de la intervención quirúrgica propuesta. Todos los procedimientos realizados con dichos animales contaron con la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El origen de los animales, fue desde una granja homologada, proveedora habitual del Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. La estabulación, seguimiento y cuidados postoperatorios de los animales utilizados, se realizó en las dependencias de estabulación de pequeños animales del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), por parte del personal técnico y de los componentes del equipo de investigación.

Se trasladaron a las instalaciones del CIBA, con tres días de antelación a las intervenciones para su identificación y pesado, ( $3.9 \pm 0.3$  kg), así como para mejorar la adaptación a las instalaciones donde se realizaría la estabulación (imagen 20). La estabulación de los animales se realizó en jaulas individuales, donde tenía un suministro de agua *ad libitum* y eran alimentados con pienso homologado y específico para conejos (Nanta ®). Las condiciones en las que se encontraban las jaulas fueron

de temperatura ambiente de  $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa de  $55\% \pm 5\%$ , con periodos de luz y oscuridad alterantes cada 12 horas. La limpieza de las jaulas era realizada de forma diaria, y se permitió el movimiento sin restricciones de los animales en las jaulas, todo ello siguiendo la Política Española de Protección de los Animales RD1201/05, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 86/609 relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.



**Imagen 19:** hembra de conejo de la raza Nueva Zelanda.



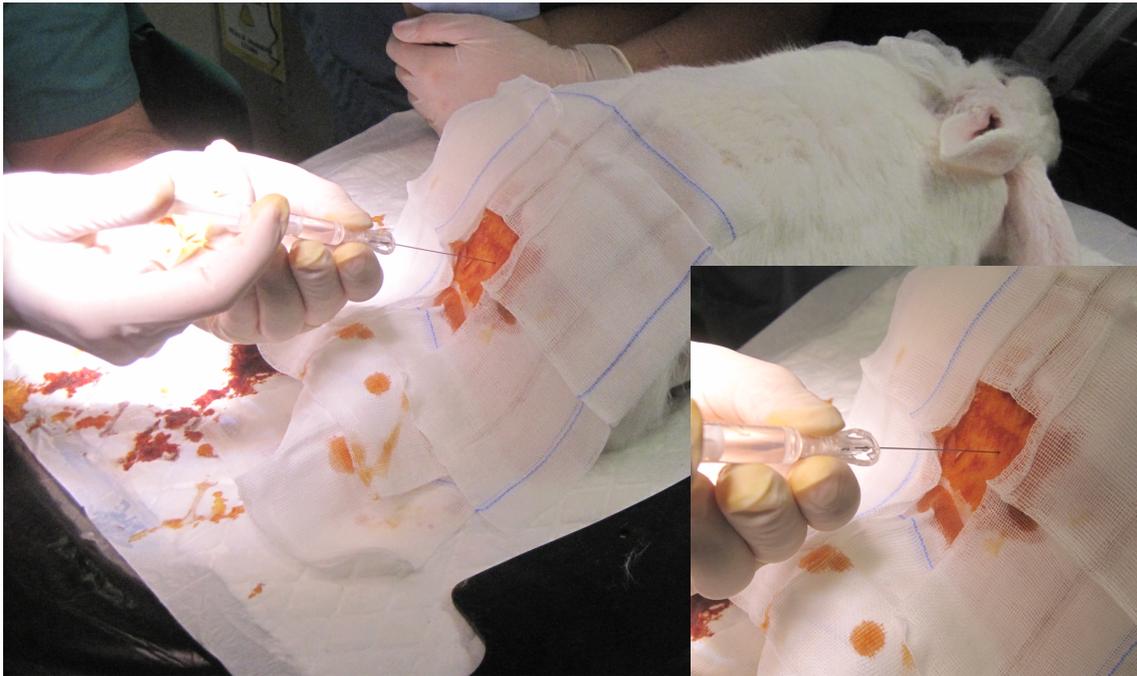
**Imagen 20:** jaulas de estabulación de los animales en el recinto destinado para ello del Centro de Investigación Biomédica de Aragón.

## **Anestesia, cuidados y eutanasia**

El manejo analgésico, el proceso de anestesia y cuidados veterinarios perioperatorios fueron supervisados y realizados por un anestesista veterinario del CIBA, con amplia experiencia en la realización de estas técnicas.

Tras la administración de la preanestesia (Ketamina a dosis de 25 mg/Kg + Medetomidina a dosis de 0,5 mg/Kg de manera subcutánea) se esperó a la claudicación del animal para el rasurado y su traslado a quirófano. Una vez en la sala, se situó en la mesa quirúrgica en decúbito prono y se canalizó la vena marginal de la oreja mediante un catéter Introcan Safety® de 22G. Se les colocó una mascarilla con oxígeno al 100% y se procedió a la monitorización constante del animal durante todo el proceso, mediante el uso de capnógrafo, pulsioxímetro, electrocardiograma y medición de la presión arterial.

Con el animal en decúbito prono, se colocaron las extremidades posteriores en dirección craneal para forzar al máximo la apertura de la articulación lumbo-sacra. Mediante el uso de una aguja espinal de punta Quincke con el bisel orientado en sentido craneal se accede al espacio epidural entre la última vértebra lumbar y el sacro, como puede verse en la imagen 21. Una vez atravesado el ligamento amarillo, se extrajo el fiador de la aguja verificando su posición en el espacio subaracnoideo al no observarse salida de líquido céfalo-raquídeo a través de la misma. Una vez realizadas dichas verificaciones, se inoculó el anestésico en el espacio epidural (Fentanilo + Lidocaína en suero salino fisiológico estéril hasta un volumen de 1 ml), y se estableció una espera de 3 minutos para permitir el efecto del mismo antes de iniciar el procedimiento quirúrgico. Durante la intervención se administró fluidoterapia con una solución de Ringer-Lactato a razón de 8 ml/Kg/H, a través de la vena marginal de la oreja del conejo.



**Imagen 21:** técnica de anestesia neuroaxial realizada en uno de los animales, y detalle de la zona de punción.

La intervención quirúrgica se realizó en condiciones quirúrgicas de asepsia y esterilidad utilizando profilaxis antibiótica con Cefazolina intramuscular (dos dosis a 50 mg/Kg/ día), administrando en el preoperatorio la primera dosis y las 8 horas la segunda. Tras el despertar del animal, se verificó la recuperación de sensibilidad y de movilidad en las extremidades posteriores del mismo. La analgesia postoperatoria se realizó con Meloxicam subcutáneo 0,2 mg/Kg cada 24 horas 5 días (prorrogable si se observaran signos de dolor a partir del sexto día). En caso de deterioro del estado del animal se sustituiría por una administración de 0,2 ml/Kg de buprenorfina subcutánea cada 12 horas. Finalmente, la eutanasia se realizó previa inducción anestésica del animal, tras lo que posteriormente se administró 0,5 g de Tiopental sódico intravenoso a través de la vena marginal de la oreja.

Durante el seguimiento de los animales, se siguió el protocolo de supervisión habitual de la Universidad de Zaragoza para los procedimientos experimentales. Este

protocolo debe incluirse en aquellos estudios con animales, especialmente en aquellos de severidad media o alta, y permite aplicar medidas paliativas de dolor, como la utilización de analgésicos o el sacrificio por razones humanitarias. El protocolo elegido por la Universidad de Zaragoza es el propuesto por Morton y Griffiths en el año 1985 (317), que permite cuantificar el dolor causado por un procedimiento. Se consideran 5 variables y a cada animal se le asigna una puntuación por variable:

### PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN

	<b>Variables a considerar y puntuación</b>	
<b>Pérdida de peso</b> (de 0 a 3)	Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente)	0
	Pérdida de peso inferior al 10%	1
	Pérdida de peso entre el 10 y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de las heces.	2
	Pérdida de peso superior al 20%. El animal no consume agua ni alimento.	3
<b>Aspecto</b> (de 0 a 3)	Normal	0
	Pelo en mal estado	1
	Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales	2
	Postura anormal	3
<b>Comportamiento espontáneo</b> (de 0 a 3)	Normal	0
	Pequeños cambios	1
	Inactividad	2
	Automutilación, vocalizaciones anormales, animales muy inquietos o inmóviles.	3
<b>Comportamiento en respuesta a la manipulación</b> (de 0 a 3)	Normal	0
	Cambios pequeños	1
	Cambios moderados	2
	Animal agresivo o comatoso	3
<b>Constantes vitales</b> (de 0 a 3)	Normal	0
	Pequeños cambios	1
	Cambios en la temperatura corporal de 1-2°C, incremento del 30% en frecuencia cardíaca o respiratoria	2
	Cambios en la temperatura corporal >2°C, incremento del 50% en frecuencia cardíaca o respiratoria	3

**PUNTUACIÓN TOTAL**.....de 0 a 20

Nota: cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro, todos los "3" pasan a "4".

Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:

de 0-4	Normal
de 5-9	Supervisar cuidadosamente (¿analgésicos?)
de 10-14	Sufrimiento intenso. Analgésicos (¿eutanasia?)
de 15-20	Eutanasia (¿suprimir el procedimiento?)

### 3. Implantación quirúrgica

Previamente a su utilización en el estudio, los *scaffolds* fueron esterilizados con luz ultravioleta durante 60 minutos, con rotaciones periódicas. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en condiciones quirúrgicas de asepsia y esterilidad utilizando profilaxis antibiótica con Cefazolina intramuscular (dos dosis a 50 mg/Kg/ día). Antes de la intervención se realizaron 3 grupos a los que se asignaron los animales de forma aleatoria (imagen 22):

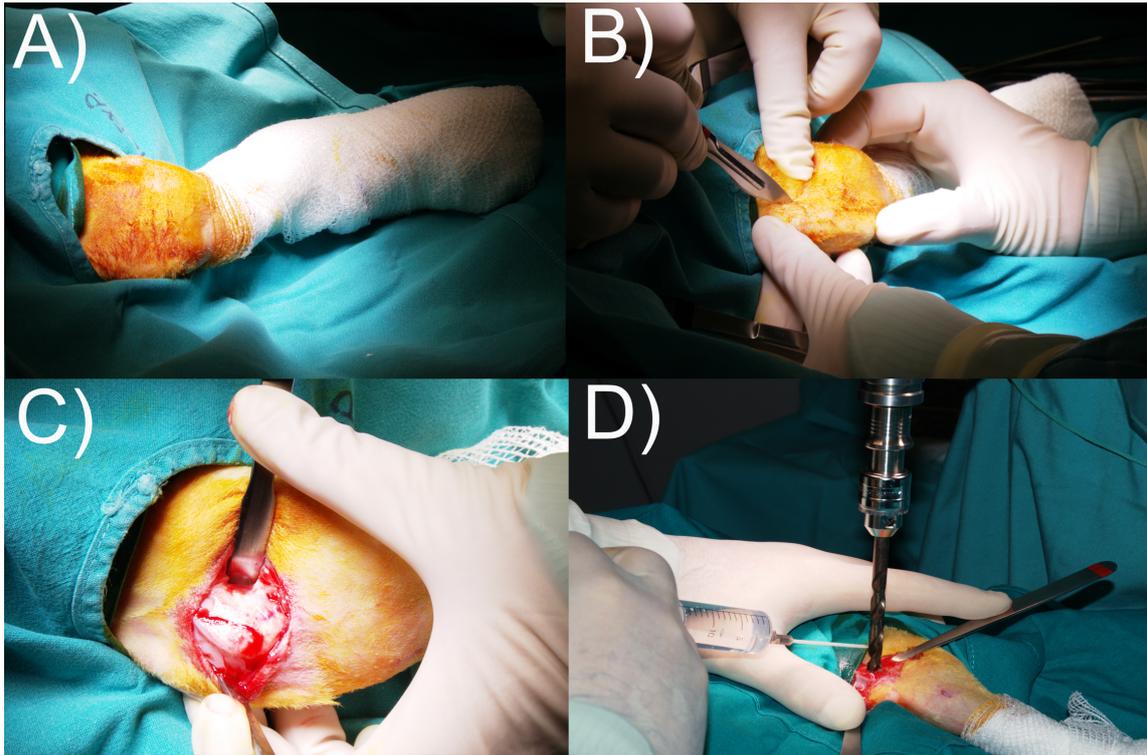
- Grupo A (4 conejos, 1,2,3,4)
  - 4 rodillas izquierdas *scaffold* y células mesenquimales (MSC)
  - 4 rodillas derechas *scaffold* y osteostatina (OST)
  
- Grupo B (4 conejos, 5,6,7,8)
  - 4 rodillas izquierdas *scaffold*
  - 4 rodillas derechas *scaffold* + MSC + OST
  
- Grupo C (4 conejos, 9,10,11,12):
  - 2 rodillas izquierdas *scaffold* + OST conejos 9 y 10
  - 2 rodillas izquierda *scaffold* + MSC (conejos 11 y 12)
  - 4 rodillas derechas *scaffold* + MSC + OST

	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo C</b>
<b>Animales</b>	1,2,3 y 4	5,6,7 y 8	9,10,11 y 12
<b>Rodillas izquierdas</b>	<i>Scaffold</i> + MSC	<i>Scaffold</i>	2 <i>Scaffold</i> + OST (9 y 10) 2 <i>Scaffold</i> + MSC (11 y 12)
<b>Rodillas derechas</b>	<i>Scaffold</i> + OST	<i>Scaffold</i> + MSC + OST	<i>Scaffold</i> + MSC + OST

**Imagen 22:** Distribución de los animales en los 3 grupos y material a implantar.

Consultado el Comité ético de experimentación animal, y dada la evidencia obtenida en la literatura y por nuestro propio grupo de investigación en anteriores trabajos experimentales (50,58–60,62–64,67), de que se los defectos óseos propuestos eran defectos óseos críticos, se juzgó conveniente no utilizar más animales experimentales a modo de “Grupo Control”.

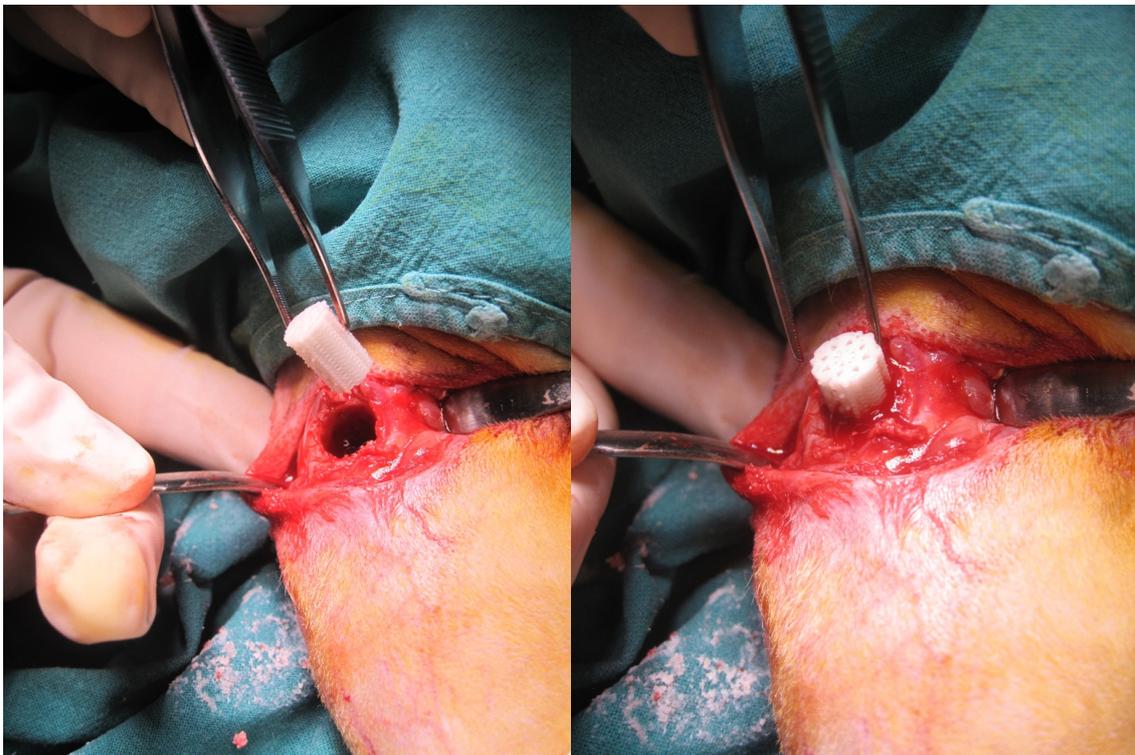
En todos los conejos, se llevó a cabo la misma intervención (imagen 23). Se colocó al animal en la mesa quirúrgica en posición de decúbito supino, la zona de intervención que había sido rasurada previamente se esterilizó con una solución de povidona yodada y se delimitó el campo quirúrgico con paños estériles, así como se vendó la zona distal de la extremidad intervenida para mejor manejo y control de la esterilidad. El abordaje quirúrgico realizado fue con una incisión longitudinal en la piel de entre 3-4 cm sobre el cóndilo femoral externo, se tomó la rótula como referencia anatómica para su localización y centrado de la incisión. Tras la disección del plano del tejido celular subcutáneo, se incidió la fascia muscular y se disecó el vasto externo, para así acceder a la zona metafisaria del fémur. El siguiente paso fue la separación del periostio de la cara externa de la metáfisis distal femoral.



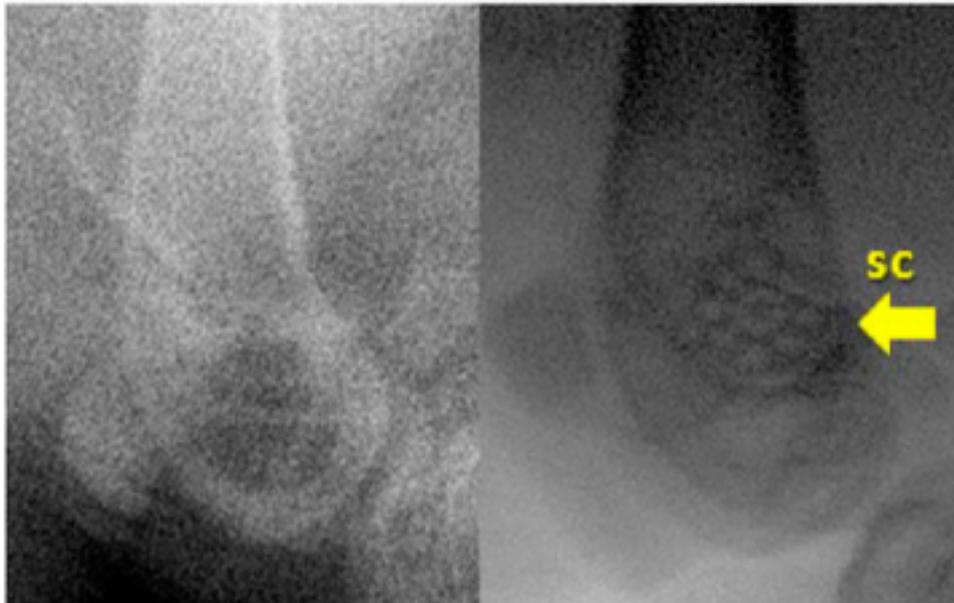
**Imagen 23:** imágenes intraoperatorias. A) preparación del campo esterilidad con la extremidad individualizada. B) incisión cutánea tomando la rótula como referencia. C) identificación y desperiostización del cóndilo femoral externo. D) fresa motorizada e irrigación con suero fisiológico sobre el cóndilo femoral externo.

Una vez localizada la parte central del cóndilo externo, se procedió a la creación de un defecto óseo estandarizado de morfología cilíndrica. El método inicialmente previsto consideraba unas dimensiones del defecto óseo de 5 mm de diámetro y 10 mm de profundidad. La elaboración de los implantes de cerámica en la impresora 3D condicionó un discreto incremento de su diámetro transversal (7 mm Ø), y de su altura (12 mm), superiores a los inicialmente previstos en la memoria (5 mm Ø, 10 mm altura). Esto hizo necesario aumentar tanto el diámetro de la broca quirúrgica inicialmente prevista, como la profundidad de la perforación ósea, y por lo tanto el volumen del defecto óseo crítico creado para alojar los implantes. El defecto se realizó mediante una broca motorizada (7,5 mm Ø) a bajas revoluciones irrigada con suero salino. Tras completar la creación del defecto óseo, se lavó con suero fisiológico para

eliminar los restos óseos, y se secó la cavidad con gasas, tras ello se procedió a posicionar en su interior el implante correspondiente a cada animal (imagen 24). Se comprobó su estabilidad en el lecho receptor de forma intrínseca, y se realizó un control radiológico por fluoroscopia intraoperatoria, para comprobar la correcta posición y morfología del defecto e implante (imagen 25). No se dejaron drenajes en el abordaje. Finalmente se realizó el cierre por planos de la herida, suturando la fascia muscular con puntos simples de material reabsorbible trenzado (Vycril 3/0) y la piel con material irreabsorbible trenzado, seda 3/0. La herida se limpió y curó con antiséptico local, y no se dejaron apósitos para su oclusión.



**Imagen 24:** imágenes intraoperatorias del defecto óseo y de la implantación y ajuste en él del *scaffold*.



**Imagen 25:** imágenes intraoperatorias de rayos X del defecto óseo antes y después de la implantación del *scaffold* (SC) en el cóndilo femoral.

## 4. Estudios realizados

Tras mantener a los animales estabulados durante el periodo de 3 meses fijado por el estudio, se les practicó una eutanasia farmacológica (0,5 g de Tiopental sódico intravenoso) previa sedación del animal. Tras su muerte, se extrajo el tercio distal de ambos fémures, siendo liberados previamente de las partes blandas que los rodeaban, para realizar el estudio histológico micro y macroscópico y el estudio radiológico mediante micro-TAC, todos ellos realizados en las instalaciones y por el personal del CIBA. De acuerdo a las distintas características de los implantes se analizaron con la siguiente distribución las muestra obtenidas (imagen 26):

<b>Micro-TAC</b>	<b>Implantación</b>	<b>Histología</b>
Fémures 5,6,7 izquierdos	<i>Scaffold</i>	Fémures 5,6,7 izquierdos
Fémures 1,2,3 izquierdos	<i>Scaffold</i> + MSC	Fémures 1,2,3 izquierdos
Fémures 9, 10 izquierdos 1 derecho	<i>Scaffold</i> + OST	Fémures 10 izquierdo, 2,3 derecho
Fémures 5,10,12 derechos	<i>Scaffold</i> + MSC + OST	Fémures 5,7,9 derechos

**Imagen 26:** Distribución de las piezas para sus estudios, en color rojo se muestran aquellas muestras coincidentes en ambos estudios.

### **Evaluación macroscópica**

Se realizó un registro fotográfico del aspecto externo de las piezas extraídas durante la necropsia (1/3 distal de ambos fémures) de cada animal. Se evaluó visualmente el aspecto de la zona de implantación en el defecto óseo, así como toda la pieza del fémur, describiendo su apariencia y posibles anomalías encontradas.

## **Evaluación microscópica**

El hueso extraído fijado con formaldehído fue sometido a un proceso de deshidratación en alcohol de forma seria (del 50 al 100%) y embebido en metilmetacrilato (Merck Schuchardt OHG, Alemania). Una vez realizado este proceso, se obtuvieron secciones sagitales mediante un sistema de corte y pulido (EXAKT Apparatebau GMBH, Norderstedt, Alemania). Los cortes obtenidos fueron teñidos con Hematoxilina/Eosina (H&E) y con la tinción Tricrómica de Masson-Goldner para su evaluación histológica. Estas secciones fueron examinadas con un microscopio Zeiss AxiokoP 40 (Oberkochen, Alemania) y las microfotografías fueron obtenidas con una cámara Zeiss AxioCam MRc5.

El sistema EXAKT utilizado para la obtención de los cortes histológicos se basa en un procedimiento de corte y pulido. Una vez obtenida una sección lo suficientemente delgada esta se puede teñir, pero siempre teniendo en cuenta que es el tipo de muestra el que determina el grosor final de pulido (para limitar la pérdida de información en la muestra por fricción en la fase de pulido fino). En general, las secciones de EXAKT tienen entre 5 y 50 micras, por lo que no son comparables con una sección de tejido incluido en parafina (sistema convencional). El procedimiento requiere varias semanas de procesado.

Las preparaciones con el sistema EXAKT presentan unas características específicas que pueden hacer variar la observación y evaluación de las tinciones en comparación con las características observadas en secciones desparafinadas o desplastificadas. Para la realización de tinciones se utilizan protocolos de tinción adaptados específicamente para esta técnica con ajustes de diferentes autores. Así, la penetración del colorante en las muestras no desplastificadas, podría dar alguna irregularidad en el aspecto de las tinciones en comparación con las muestras desparafinadas/desplastificadas, sin que debiera afectar la interpretación de las

mismas al poder diferenciarse como artefacto. Debido en general al grosor de las muestras procesadas con el sistema EXAKT, el montaje de las mismas es más complejo que en secciones "convencionales", por lo que se pueden apreciar burbujas, ocasionalmente, en alguna zona.

### **Evaluación radiológica**

Los fémures distales obtenidos fueron escaneados por microtomografía de rayos X de alta resolución, en un equipo BioScan nanoSPECT-CT (Dallas, EEUU), este proceso se realizó previamente al estudio histológico para evitar posibles artefactos por las técnicas de preparación a las que se les sometieron.

La fuente de rayos X es un tubo de rayos X de micro foco en miniatura que funciona continuamente con filtración de aire solamente. El detector es un dispositivo de formación de imágenes de radiación de alta resolución que presenta una matriz de fotodiodos de 1024 por 2048 píxeles con un espaciado de píxeles de 48  $\mu\text{m}$ . La pantalla del centellador está hecha de Gd<sub>2</sub>O<sub>12</sub>S. La adquisición de las imágenes se realizó con los siguientes parámetros: 65Kv de voltaje del tubo, 1300 ms de tiempo de exposición, 360 proyecciones y un pitch de 0,5. La resolución del detector de micro-TAC es de 2048 x 1024 pixels, cada pixel es de 48  $\mu\text{m}$ , con un tamaño de vóxel de 76x76x76  $\mu\text{m}$ . Un vóxel es cada elemento de la imagen del micro-TAC, este presenta un valor referido en unidades Hounsfield (HU) describiendo la densidad en el mismo punto. Cada vóxel contiene 12 bits de datos, y este oscila entre -1000 Hu (aire) y +3000 Hu (esmalte dental) (318). La escala de densidad de TC es cuantitativa y significativa para identificar y diferenciar estructuras y tejidos pudiéndose emplear para analizar la calidad del hueso. Para la realización del estudio cuantitativo, las micro-imágenes obtenidas fueron tratadas posteriormente con el programa informático de procesamiento de imagen Vivoquant 2.0<sup>®</sup> (Invicro).

En primer lugar, se realizó la generación de tres volúmenes tridimensionales centrados alrededor del *scaffold*, y sobre su zona periférica. Con ello se busca obtener información detallada de estas regiones de interés (ROI), generando 3 ROIs. La ROI *scaffold* detallado que corresponde a aquellos píxeles del implante. El *scaffold* detallado + 5 corresponde a la ROI *scaffold* agrandada en un 5% de su volumen. El *scaffold* detallado +10 que corresponde a la ROI *scaffold* agrandada en un 10% de su volumen. Se podrá evaluar la densidad ósea correspondiente al área más cercana del *scaffold* con las regiones + 5 y +10. Una vez definidas estas zonas de interés, el objetivo es generar histogramas de densidades para su estudio cuantitativo, al comparar la cantidad de píxeles de un determinado rango de densidades entre muestras.

### **Análisis estadístico**

Los resultados han sido expresados como su media  $\pm$  error estándar de la media. El análisis estadístico ha sido realizado a través del test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

# Resultados

## 1. Hallazgos intraoperatorios

Los cilindros del scaffold en sus distintas modalidades (con/sin OST y con/sin MSC) fueron de fácil manejo durante la intervención, tanto para su manipulación desde el medio de transporte hasta el defecto óseo, como durante la introducción y fijación intrínseca en el defecto. Los implantes que vehiculizaban células, osteostatina o ambas, presentaban una consistencia blanda, gelatinosa, antes de su implantación en el momento de ser extraídos de las celdillas donde habían sido mantenidas en condiciones de esterilidad en el servicio de cultivos celulares del CIBA. Los implantes sin células ni osteostatina, mantenían su consistencia sólida durante su manipulación quirúrgica.

Durante las intervenciones observamos un rápido reblandecimiento de los implantes de cerámica al embeberse de la sangre del lecho receptor tras su implantación, mejorando su fijación intrínseca en el defecto (imagen 27).



**Imagen 27:** Detalle intraoperatorio del scaffold embebido por sangre en el interior del defecto óseo, correctamente ajustado.

## 2. Seguimiento de los animales

- Grupo A (4 conejos, 1,2,3,4): 4 rodillas izquierdas *scaffold* y células mesenquimales (MSC) y 4 rodillas derechas *scaffold* y osteostatina (OST)
  - Los conejos 1, 2, 3 y 4 no presentaron incidencias durante su seguimiento.
- Grupo B (4 conejos, 5,6,7,8) 4 rodillas izquierdas *scaffold* y 4 rodillas derechas *scaffold* + MSC + OST
  - El conejo número 5 presentó dehiscencia parcial de la herida quirúrgica tras la retirada de la sutura en ambas rodillas, no presentando más complicaciones durante el resto del seguimiento, cicatrizando sin incidencias.
  - Los conejos 6 y 7 no presentaron incidencias durante su seguimiento.
  - Tuvo lugar la muerte espontánea de un conejo del Grupo B (conejo nº 8) a los 12 días del postoperatorio. La necropsia demostró una fractura de la diáfisis del fémur derecho y una fractura del cóndilo del fémur izquierdo.
- Grupo C (4 conejos, 9,10,11,12): 2 rodillas izquierdas *scaffold* + OST conejos 9 y 10, 2 rodillas izquierda *scaffold* + MSC (conejos 11 y 12) y 4 rodillas derechas *scaffold* + MSC + OST
  - Los conejos 9 y 10 no presentaron incidencias durante su seguimiento.
  - Uno de los animales del Grupo C, (conejo nº 11) fue sacrificado tras 2 semanas por presentar un deterioro progresivo que según los requerimientos veterinarios de bienestar animal obligó a su eutanasia. La necropsia demostró fracturas marginales de los cóndilos femorales

derecho e izquierdo, sin inestabilidad, y signos de artritis séptica en la rodilla derecha.

- El conejo 12 requirió la evacuación de un absceso purulento de 20 cc, de la rodilla izquierda bajo sedación y analgesia siguiendo los protocolos de bienestar animal, a las 3,5 semanas del postoperatorio. Posteriormente, continuó el seguimiento hasta el final del periodo establecido, sin otras complicaciones.

Salvo los dos animales que murieron, todos los demás completaron el seguimiento planteado al inicio del estudio de 3 meses. Los dos especímenes que no completaron el seguimiento por su muerte, se utilizaron para la puesta a punto del microTAC y el estudio histológico.

### 3. Resultados macroscópicos

Durante la realización de la necropsia se encontraron las siguientes fracturas femorales: en el conejo 4 (ambos fémures fractura epifisaria desplazada), 6 (ambos fémures fractura del cóndilo externo desplazada y en el derecho además conminuta), 7 (fractura cóndilo externo izquierdo no desplazada), 8 (cóndilo fémur izquierdo, imagen 28, y diáfisis del fémur derecho) y 11 (ambos fémures fractura marginal del cóndilo externo).



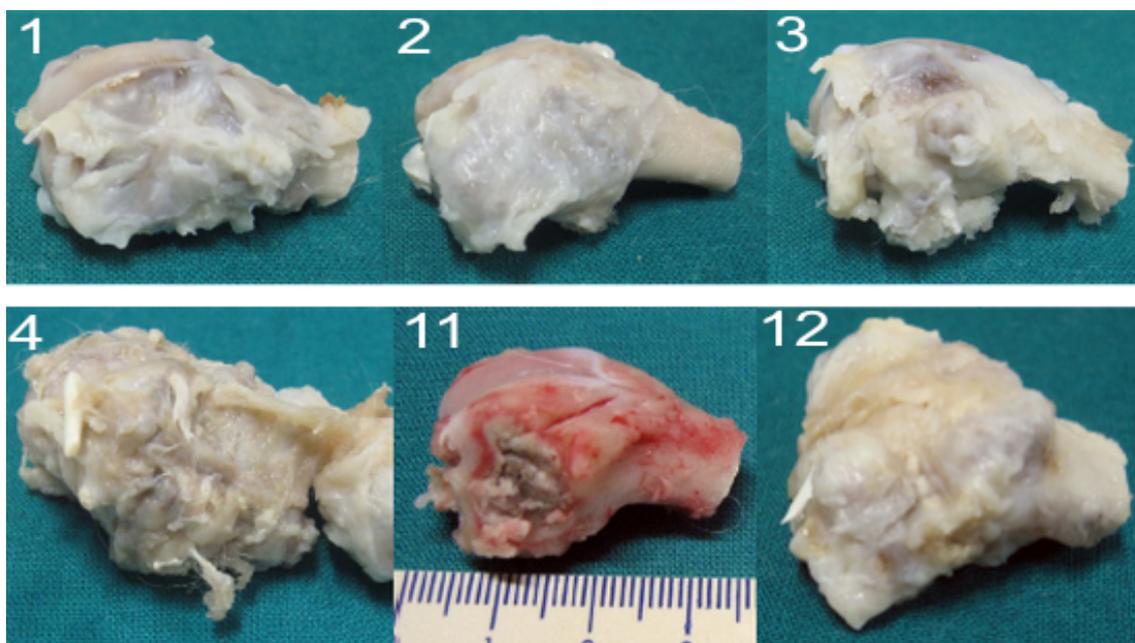
**Imagen 28:** fotografía macroscópica de la pieza femoral izquierda con implante, que presenta una fractura marginal del cóndilo externo, durante la necropsia del conejo número 8.

En las muestras tratadas con el *scaffold* sin enriquecimiento de OST ni MSC, el defecto óseo creado en el cóndilo femoral externo aparecía recubierto de hueso en todos los casos. Ocasionalmente, podía delimitarse el área circular de implantación recubierta de hueso neoformado (conejo nº5). Se observaron alteraciones de la morfología femoral normal en los especímenes 6 y 7 izquierdos, secundarias a la fractura del cóndilo femoral externo. No se observaron prominencias de los implantes o restos macroscópicos de los mismos (imagen 29).



**Imagen 29:** fotografías macroscópicas de las piezas femorales con implante de *scaffold* sin aditivos de los conejos 5, 6 y 7.

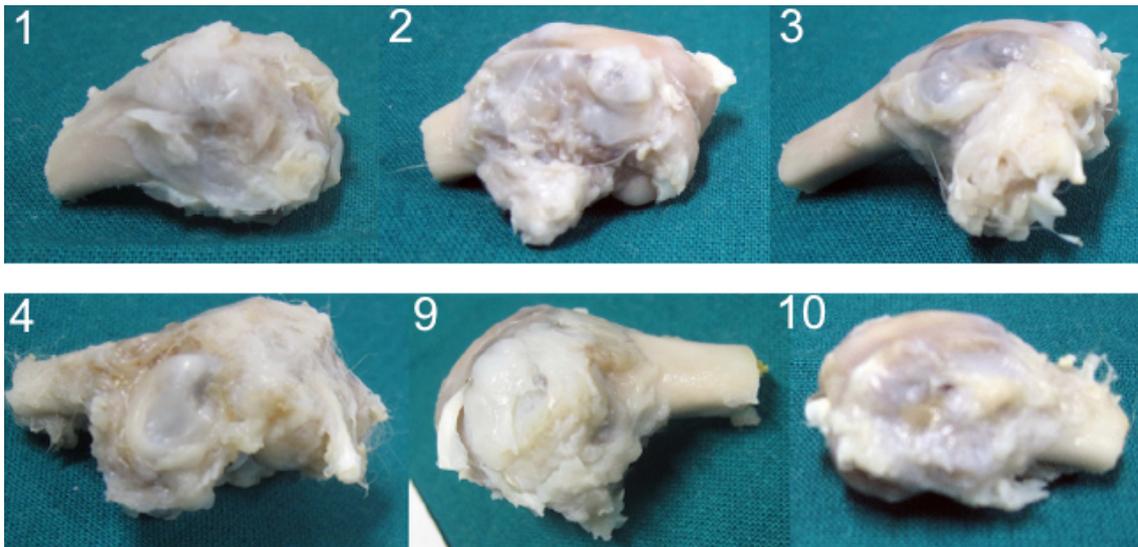
En los casos en los que se utilizó el *scaffold* y células mesenquimales (1,2,3,4,11 y 12 rodillas izquierdas), se observó, como en el grupo anterior, que el defecto óseo creado en el cóndilo lateral femoral aparecía recubierto de hueso en los especímenes 1,2,3,4 y 12. En el espécimen 11 izquierdo, que requirió eutanasia a las 2 semanas del postoperatorio por deterioro de su bienestar, era evidente el defecto óseo creado en la cara lateral del fémur observándose una transformación del aspecto del cilindro implantado con aspecto de masa densa. En los especímenes 1,2, y 12 no se observaron alteraciones macroscópicas. En el espécimen 3, se observó una prominencia ósea semiesférica que delimitaba el área circular de implantación. El espécimen 4 mostró una fractura del cóndilo femoral, ya curada en el momento de la necropsia, detectada desde el momento de la intervención, que alteró la morfología femoral final (imagen 30).



**Imagen 30:** fotografías macroscópicas de las piezas femorales izquierdas con implante de *scaffold* + MSC de los conejos 1,2,3,4,11 y 12.

En los animales en los que se implantó el *scaffold* enriquecido con osteostatina (1,2,3,4 rodillas izquierdas y 9, 10 rodillas izquierdas), pudimos observar, igual que los

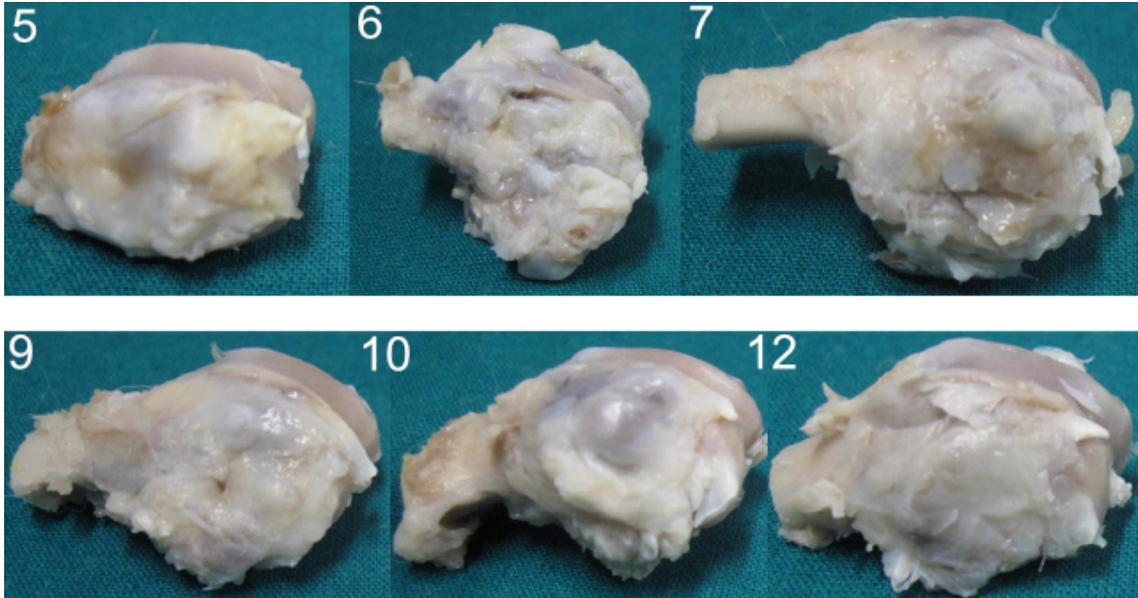
otros grupos, que el defecto óseo creado en el cóndilo externo femoral aparecía recubierto de hueso en todos los especímenes. En algunos especímenes (1,2,3 derecho y 10 izquierdo), se observaba una coloración marronácea subyacente al hueso neoformado que parecía delimitar la zona de implantación. En el espécimen 4, se observó una alteración de la morfología femoral secundaria a la fractura del cóndilo femoral que se encontraba curada en el momento de la necropsia (imagen 31).



**Imagen 31:** fotografías macroscópicas de las piezas femorales izquierdas de los conejos 9 y 10, y derechas de los animales 1,2,3 y 4 con implante de *scaffold* + OST.

En los casos en los que se utilizó el *scaffold* con células mesenquimales y osteostatina (5,6,7,8,9,10,11,12 rodillas derechas), como en los grupos anteriores, el defecto óseo creado en el cóndilo lateral femoral aparecía recubierto de hueso en todos los especímenes. En los especímenes 5,7,9 y 10 se observó una prominencia ósea semiesférica que delimitaba el área circular de implantación, similar a la observada en algunos casos del grupo de *scaffold* + MSC. En dos especímenes (7, y 10 derecho), se observaba una coloración marronácea subyacente al hueso neoformado que parecía delimitar la zona de implantación, similar también a lo encontrado en algunos fémures en los que se utilizó *scaffold* + OST. En el espécimen

8 (muerte a los 15 días del postoperatorio), se observó una alteración de la morfología femoral secundaria a la fractura de la diáfisis observada en la necropsia (imagen 32).



**Imagen 32:** fotografías macroscópicas de las piezas femorales derechas de los conejos 5,6,7,9,10 y 12 con implante de *scaffold* + OST + MSC.

## 4. Resultados microscópicos

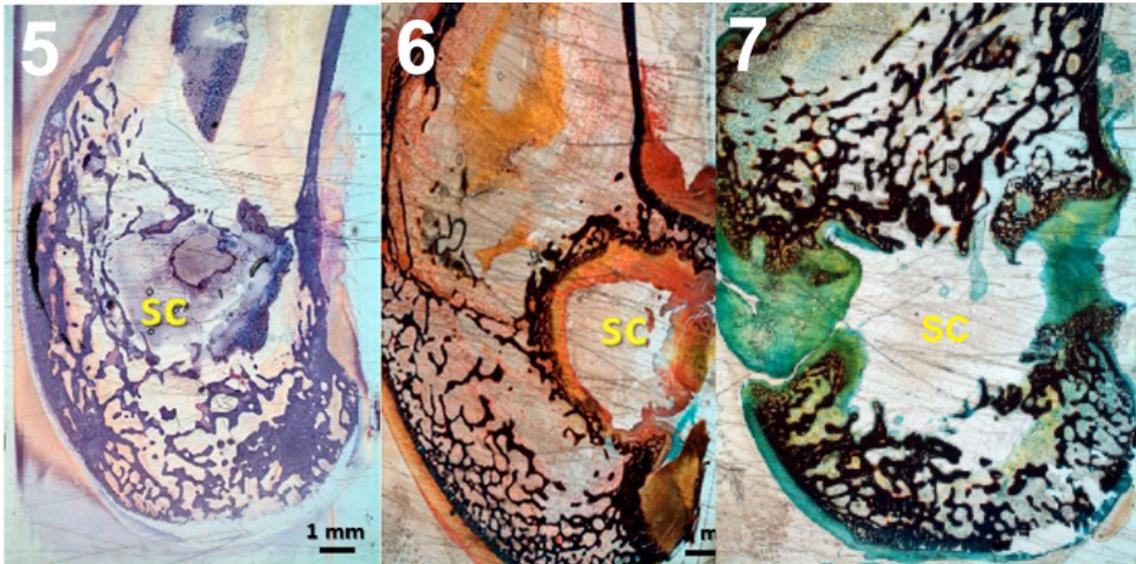
Los resultados se basan en las microfotografías tomadas de las secciones obtenidas por corte y pulido según la técnica EXAKT, posteriormente teñidas con Hematoxilina/Eosina (H&E) y Tricrómico de Masson-Goldner, y analizadas al microscopio. Algunas consideraciones generales de estos resultados son que, se ha dado alguna irregularidad en el aspecto de las tinciones en comparación con las técnicas clásicas sin que haya afectado la interpretación de las mismas al poder diferenciarse como artefacto. Lo mismo ha ocurrido con la aparición de burbujas aisladas en las muestras, derivadas del procesado y montaje de las piezas por el sistema EXAKT, y que tras la evaluación de las preparaciones obtenidas, no impidieron su estudio.

En todos los casos, los implantes eran reconocibles dentro de la pieza de fémur tras haber sido incluidas en metil-metacrilato, pero no siempre eran reconocibles en los cortes histológicos. Esto, podría deberse al procedimiento de pulido y lijado de las secciones histológicas del método EXAKT, realizado antes de la tinción los cortes. En general, los implantes estaban rodeados de tejido blando, el cual ha desaparecido tras la fase de pulido fino. Otra característica común a todas las muestras, ha sido la ausencia de signos de inflamación o cualquier tipo de reacción adversa tisular alrededor de los implantes.

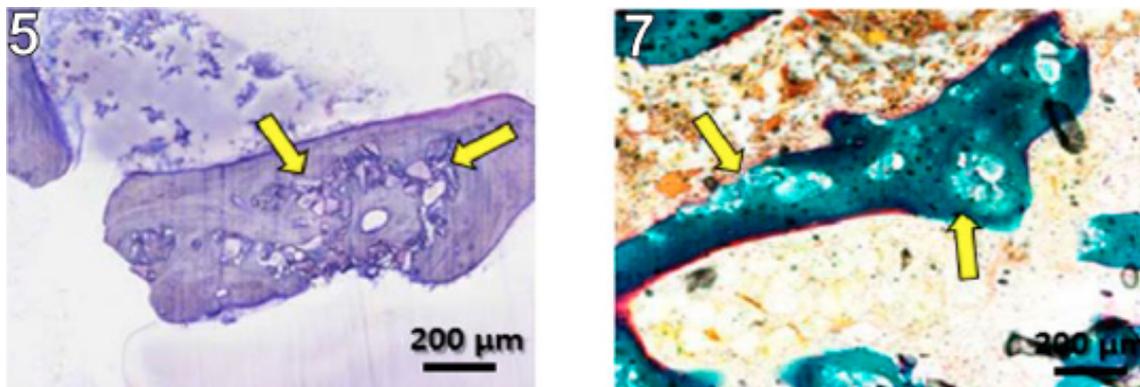
### **Animales con scaffold (5,6 y 7 rodillas izquierdas)**

En los cortes histológicos apreciables en la imagen 34, no se aprecian con claridad los implantes ni sus límites (posiblemente en relación con el procedimiento de “pulido y lijado” de las preparaciones). En ocasiones son reconocibles porciones sin reabsorber de los implantes, y una delimitación ósea periférica del defecto óseo, a modo de un “marco óseo delimitante”. Se observa una zona de transición de menor densidad sugerente de zona de reabsorción de los límites del implante, con trabéculas óseas delimitantes.

En algunas formaciones de hueso compacto se descubre en su interior elementos de morfología irregular y aspecto cristalino, que sugieren neoformación ósea sobre restos del material implantado, como puede verse en detalle en la imagen 35. No se identifica con claridad la estructura de los cilindros implantados en ninguno de los 3 especímenes, bien por una reabsorción de los mismos o por la eliminación de sus restos durante el procesado. En el fémur izquierdo del conejo nº 6, el marco óseo delimitante sugerente de bioactividad y osteointegración del implante es más reconocible, así como la zona de reabsorción periférica del cilindro (anillo anaranjado interior). En el fémur izquierdo del conejo nº 7, el marco óseo delimitante también resultó reconocible, y se observa la fractura del cóndilo femoral, sin observarse restos del implante.



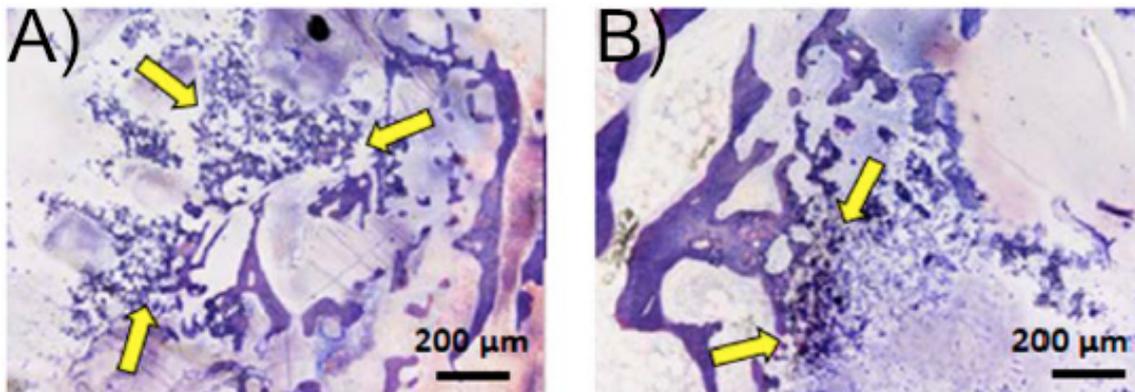
**Imagen 34:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* (SC) de las piezas femorales izquierdas de los conejos 5 con Hematoxilina/Eosina y 6 y 7 con Tricrómico de Masson. Contienen hueso neoforado tras a los 3 meses de la generación del defecto óseo.



**Imagen 35:** microfotografías de detalle del fémur izquierdo del conejo 5 con Hematoxilina/Eosina y del 7 con Tricrómico de Masson, las flechas señalan formaciones de hueso compacto envolviendo algunas fracciones del implante no reabsorbidas.

### Animales con scaffold + MSC (1,2 y 3 rodillas izquierdas)

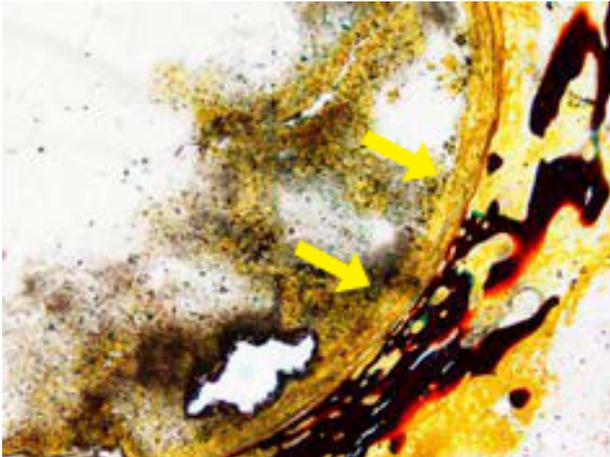
Se procesaron 3 especímenes (1, 2 y 3). Los cortes histológicos mostraron con claridad los límites de implantación, siendo reconocibles porciones de la estructura macroscópica del *scaffold*. Se ha observado la presencia de un marco fibroso, igual que el grupo anterior, pero de menor grosor. Estaban presentes espículas óseas de hueso compacto, alrededor del área de implantación, estas espículas y otras estructuras de hueso compacto habían incluido algunos fragmentos de material cristalino compatibles con el *scaffold*. (imagen 36). Estos hallazgos parecen sugerir una mayor bioactividad y osteointegración respecto al grupo previo.



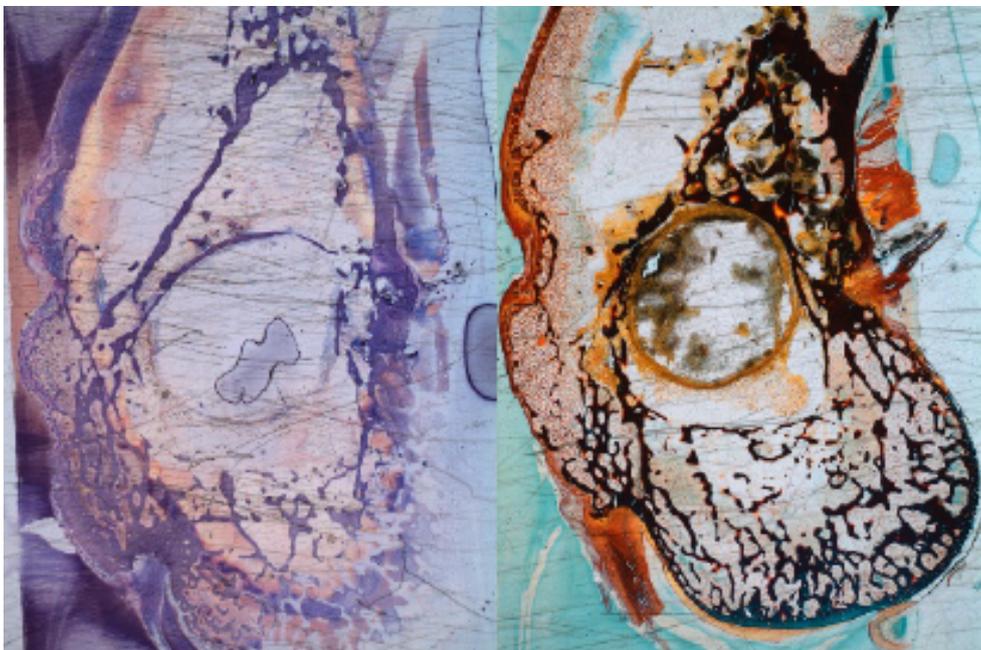
**Imagen 36:** microfotografías de detalle con tinción de Hematoxilina/Eosina de fémur izquierdo del animal nº 2 con implante de *scaffold* + MSC. Las flechas en A) señalan restos de material cristalino integrado en el hueso compacto. Las flechas en B) señalan material cristalino rodeado por una masa densa de células.

En el espécimen 1 rodilla izquierda, este límite estaba demarcado por una banda naranja de aspecto fibroso (compatible con fibroblastos y fibras colágenas) subyacente a la delimitación ósea periférica del defecto óseo, a modo de un “marco óseo delimitante” antes mencionado. En algunos puntos de esta banda naranja delimitante, se observaron agrupaciones de células de morfología linfoide, de macrófagos o células redondas indiferenciadas y en otras a modo de restos celulares

eosinófilos, mezclados con células gigantes multinucleadas, compatible con estructura de medula ósea. Estos hallazgos sugieren actividad ósea inflamatoria y de reabsorción en relación con la degradación del implante. En el interior de la banda naranja, se observaron áreas “vacías” de implante y tejido, como posible artefacto de la técnica de corte y pulido (imagen 37 y 38).

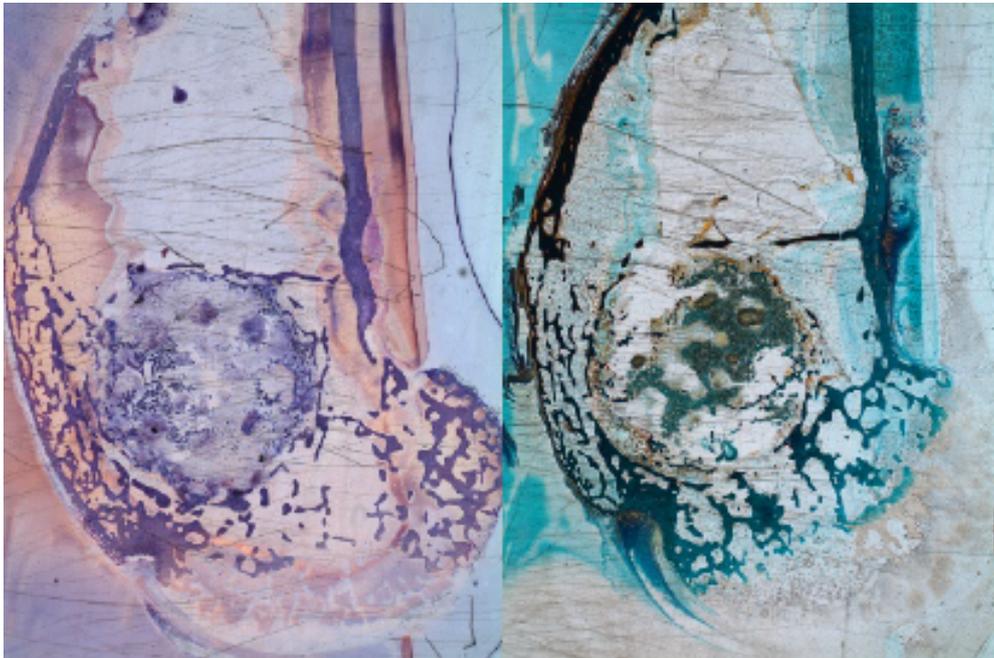


**Imagen 37:** microfotografías de detalle con tinción de Tricrómico de Masson de fémur izquierdo del animal nº 1 con implante de *scaffold* + MSC. Las flechas señalan la banda subyacente al marco de delimitado óseo.



**Imagen 38:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* con MSC de las piezas femorales izquierdas del conejo 1 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha). Contienen hueso neoforado tras los 3 meses de la generación del defecto óseo.

En el espécimen 2 rodilla izquierda, se aprecian espículas de hueso compacto que se introducen en la zona del implante. Estas espículas y en algunos puntos la estructura de hueso compacto engloba material fragmentado de tipo cristalino que no se corresponde con una estructura de hueso compacto normal. En otros puntos ese material cristalino parece integrado en el seno del hueso compacto y en otros aparece fragmentado sin relación con el hueso o delimitado por densas masas células redondas. Estos hallazgos hacen suponer una mayor bioactividad y osteointegración, que puede verse en la imagen y con más detalle en la imagen 39, ya mencionada previamente.



**Imagen 39:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* con MSC de las piezas femorales izquierdas del conejo 2 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha). Contienen hueso neoformado tras los 3 meses de la generación del defecto óseo.

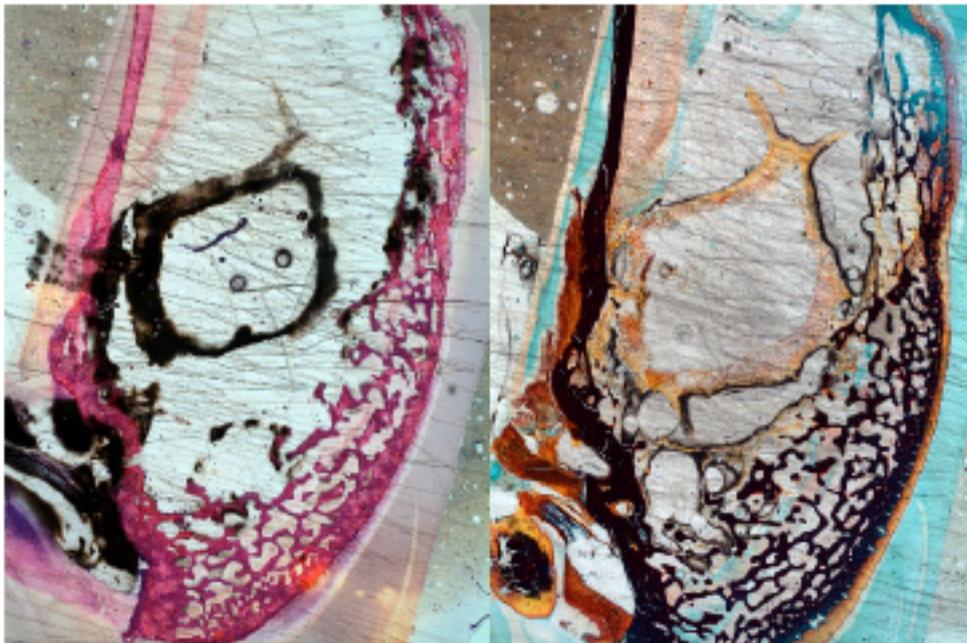
En el espécimen 3 rodilla izquierda, se observa una mala delimitación del defecto óseo creado, tanto por un marco óseo posterior como por la banda anaranjada de aspecto fibroso que parece delimitar lo que fue la zona del implante. Se observan posibles restos del implante en el interior de la banda fibrosa (imagen 40).



**Imagen 40:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* con MSC de las piezas femorales izquierdas del conejo 3 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha).

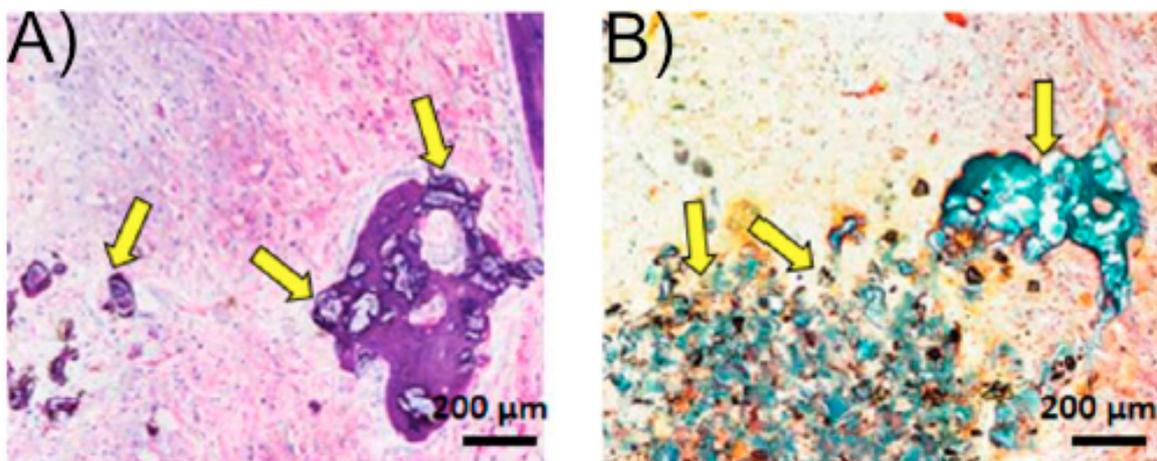
### **Animales con scaffold + OST (2 y 3 rodillas derecha y 10 izquierda)**

Se procesaron 3 especímenes (2,3 y 10). En los cortes histológicos, no se aprecian con claridad todos los implantes ni sus límites, salvo en uno de los casos. En los tres especímenes pudo reconocerse la banda anaranjada de aspecto fibroso (compatible con fibroblastos y fibras colágenas) que se encontraría delimitando el implante, observada en los grupos anteriores y siendo de menor tamaño que la presente en el grupo de *scaffold* sin aditivos. También se encontraron zonas de material cristalino en el interior del hueso compacto, por lo que parecería estimular este *scaffold* con OST la proliferación ósea y del tejido conectivo, similar a lo observado con el grupo con MSC. En el espécimen 2 rodilla derecha, no se observa el implante con claridad. Solo en la preparación de la tinción de Tricrómico de Masson se puede apreciar una zona donde hay una pequeña franja compatible con fibrosis. Próximo a esta banda se ve restos de lo que podría ser material cristalino de color verdoso (imagen 41).

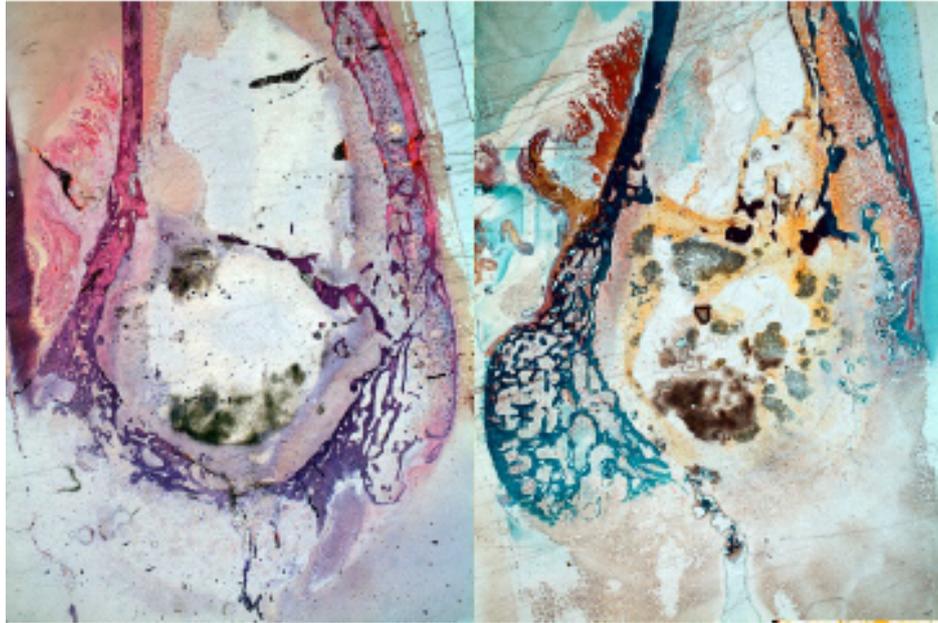


**Imagen 41:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* con OST de pieza de fémur derecho del conejo 2 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha).

En el espécimen 3 derecha, con tinción de Hematoxilina/Eosina se puede observar una zona que contiene bastantes espacios vacíos excepto la parte más periférica. En ella se aprecia una gruesa banda de tejido mixoide o fibroso que contiene islotes de material fragmentado de aspecto cristalino. Asimismo, se descubren algunos fragmentos de hueso compacto que engloban a ese mismo material, lo que se confirma en la Tinción de Tricrómico de Masson apareciendo material cristalino de color verdoso (imagen 42 y 43).

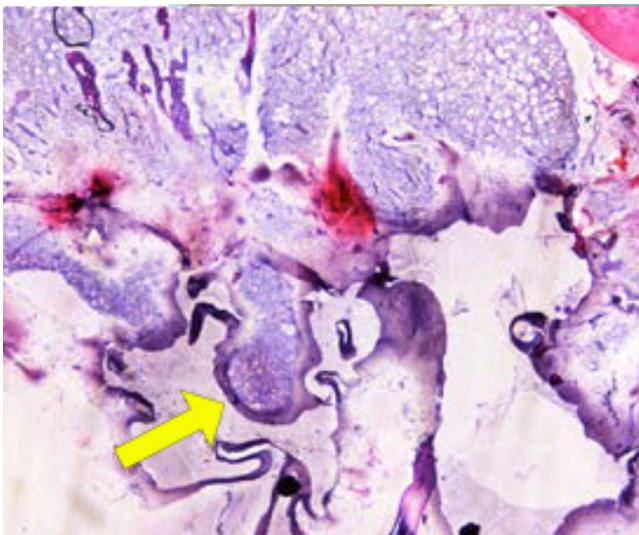


**Imagen 42:** microfotografías de detalle con tinción de Hematoxilina/Eosina (A) y Tricrómico de Masson (B) de fémur derecho del animal nº 3 con implante de *scaffold* + OST. Las flechas en A) señalan restos de material cristalino integrado en el hueso compacto. Las flechas en B) señalan material cristalino rodeado por una masa densa de células.



**Imagen 43:** microfotografías de las secciones óseas y del *scaffold* + OST del fémur derecho del conejo 3 con tinción de HE (izquierda) y con T. de Masson (derecha).

En el espécimen 10 Izquierda, no se aprecia con claridad la presencia de material cerámico, pero hay una zona donde se ha incrementado el tejido fibroso formando bandas de diferente grosor. En el interior de este tejido se pueden observar fragmentos o material calcificado fragmentado, en probable relación con procesos de degradación del implante y neoformación ósea (imagen 44 y 45).



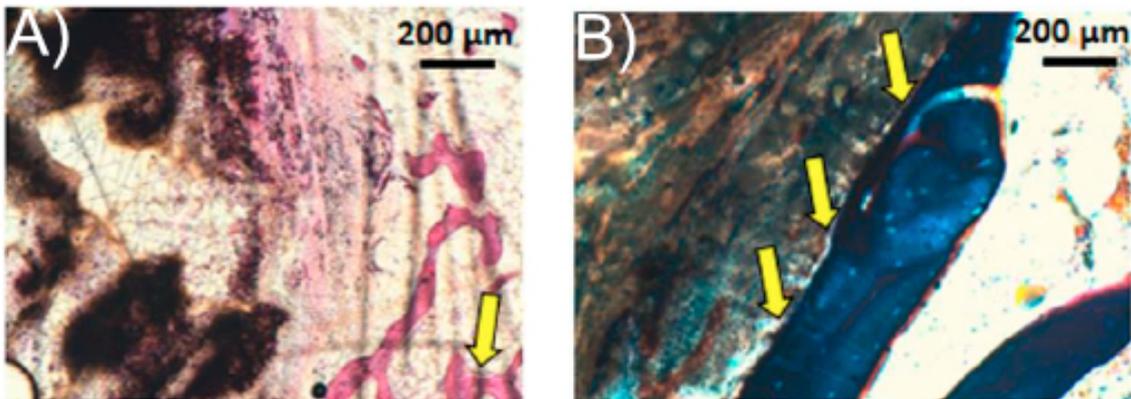
**Imagen 44:** microfotografías de detalle con tinción de HE de fémur derecho del animal n° 10 con implante de *scaffold* + OST. La flecha señala fragmentos de material implantado rodeado de tejido fibroso, en relación con procesos de degradación del implante y neoformación ósea.



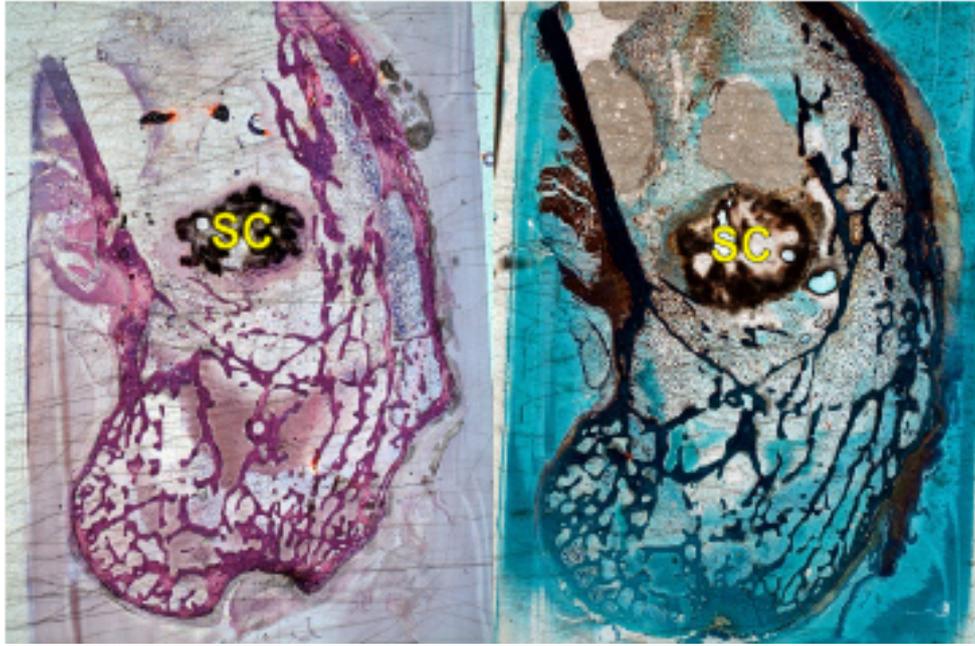
**Imagen 45:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* con OST de pieza de fémur izquierdo del conejo 10 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha).

### Animales con scaffold + MSC + OST (5,7 y 9 rodillas derechas)

Se procesaron 3 especímenes (5,7 y 9). En los cortes histológicos, se aprecia con claridad los restos del implante con unos bordes menos afilados. Persiste la banda de aspecto fibroso (compatible con fibroblastos y fibras colágenas) que podría haber delimitado el implante, observada en los grupos anteriores, aunque en este grupo presentaría el menor grosor, en el n° 5 tiene un color rosado. En los tres se observan restos de la cerámica en degradación, con trabéculas óseas neoformadas en íntimo contacto con el material degradado, éstas, se observan más claramente en el conejo n°5 (imágenes 46 y 47).



**Imagen 46:** microfotografías de detalle con tinción de Hematoxilina/Eosina (A) y Tricrómico de Masson (B) de fémur derecho del animal n° 5 con implante de *scaffold* + MSC + OST. Las flechas señalan las trabéculas óseas en íntimo contacto con el material en degradación, sugiriendo osteointegración.

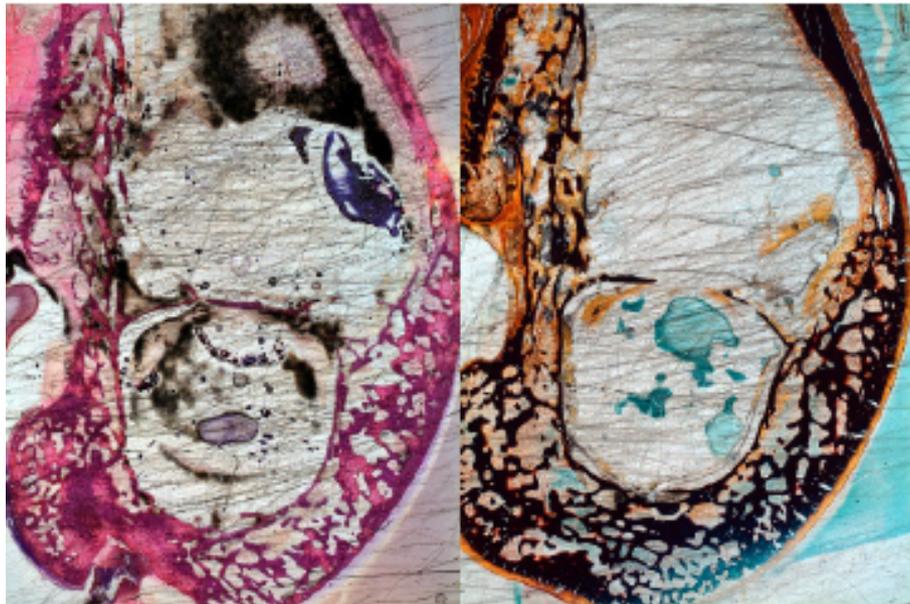


**Imagen 47:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* + MSC + OST de pieza de fémur derecho del conejo 5 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha). Se observan la presencia de trabéculas óseas que llegan a contactar con el *scaffold* (SC).

La banda de aspecto fibrosa en los especímenes nº 7 y 9 se observó con un tono anaranjado (imágenes 48 y 49), a diferencia del tono rosado visto en el nº5. En ambos se observan cerámica en degradación, que entra en contacto con trabéculas nuevas. Por todo lo observado, la combinación del *scaffold* con OST y MSC parece inducir la neoformación de hueso trabecular, sugiriendo un proceso de osteointegración.



**Imagen 48:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* + MSC + OST de pieza de fémur derecho del conejo 7 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha).



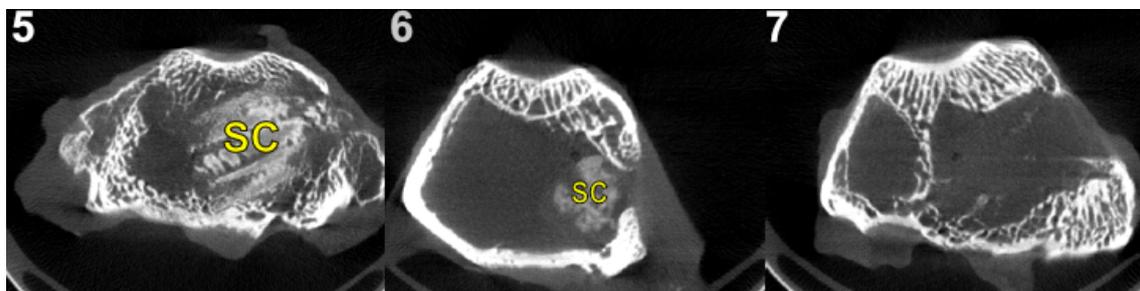
**Imagen 49:** microfotografías de las secciones óseas que rodean al *scaffold* + MSC + OST de pieza de fémur derecho del conejo 9 con tinción de Hematoxilina/Eosina (izquierda) y con Tricrómico de Masson (derecha).

## 5. Resultados radiológicos

La reparación ósea, así como, la respuesta de los tejidos a los *scaffolds* implantados solos o en combinación con osteostatina y/o células mesenquimales, fue examinada por micro-TAC evaluando principalmente la interfase entre el *scaffold* y el tejido circundante, y el área periférica que rodeaba al implante.

### Animales con *scaffold* (5,6 y 7 rodillas izquierdas)

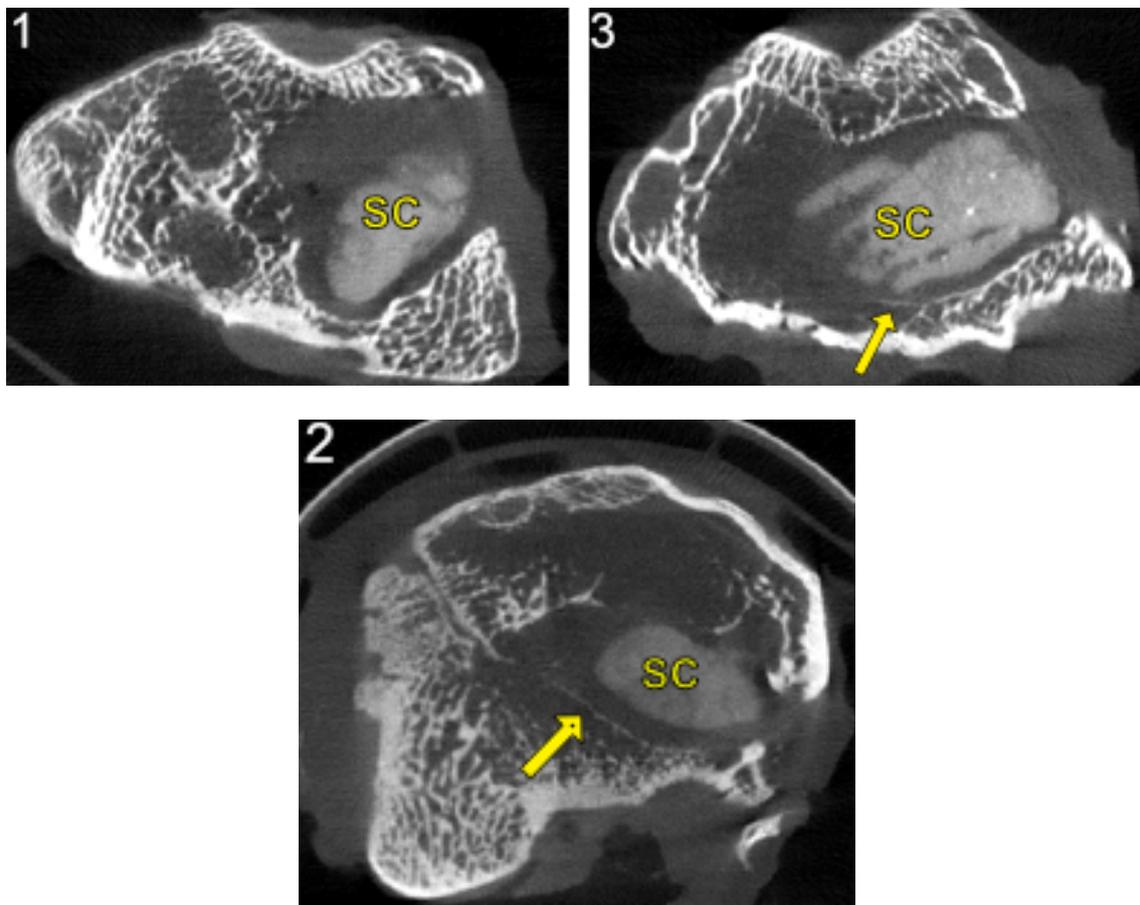
En el espécimen 5 en su fémur izquierdo se observó con claridad los restos del implante de cerámica, rodeados de una zona de menos densidad probablemente por la reabsorción periférica. Se observó la aparición de trabéculas óseas contorneando el implante en algunas áreas, principalmente en la zona lateral, superior e inferior. En la rodilla izquierda del nº 6, se reconoce la estructura central del implante que parece estar rotado 90° respecto a la posición original de implantación. Hay una zona periférica de menor densidad probablemente por la reabsorción centrípeta de los implantes. Y en el fémur izquierdo del conejo 7, no se reconoció el implante de cerámica, detectándose bandas óseas que cruzan el lugar de implantación, que pueden corresponder a una degradación completa del *scaffold* (imagen 50).



**Imagen 50:** imágenes representativas de los cortes sagitales del área alrededor del implante, *scaffold* sin aditivos (SC), de los fémures izquierdos de los animales 5,6 y 7, obtenidas por micro-TAC.

### Animales con scaffold + MSC (1,2 y 3 rodillas izquierdas)

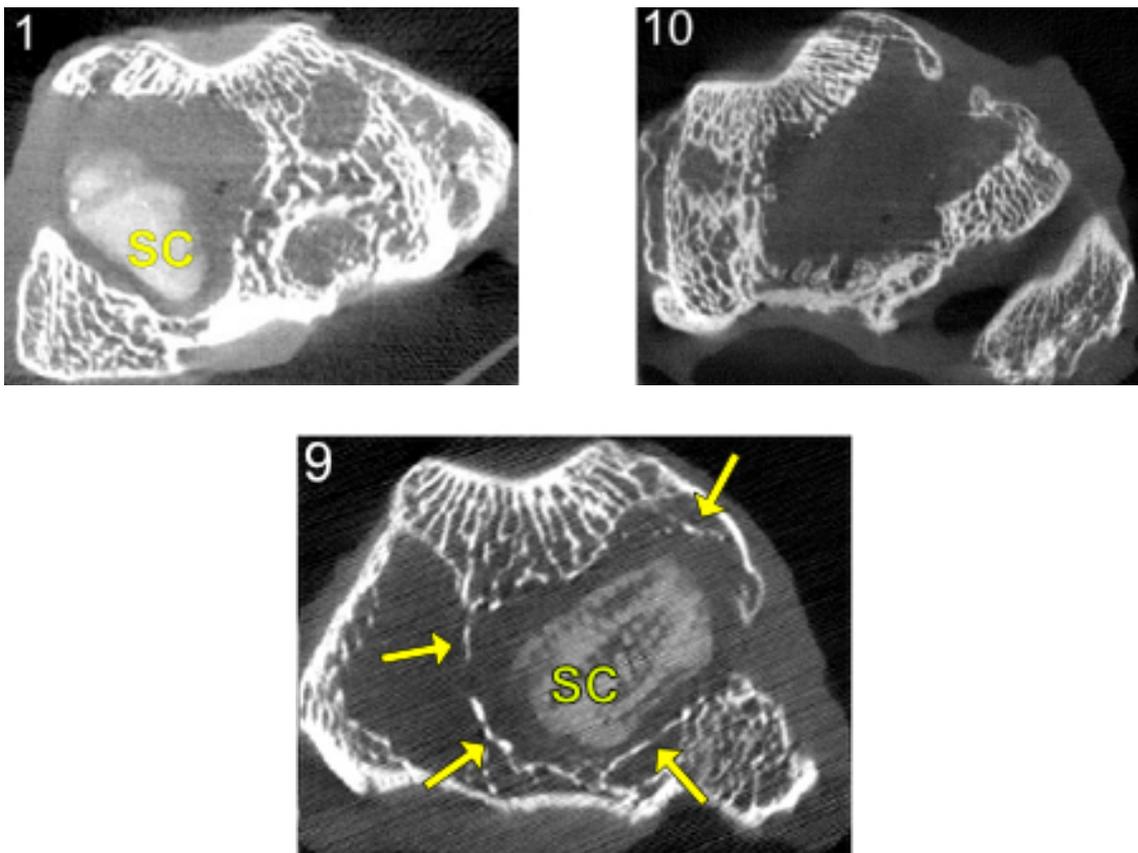
En los tres especímenes se reconocieron los restos del implante en degradación con un comportamiento más homogéneo intragrupo, que en el observado en el grupo anterior. En los tres existía una zona de menor densidad periférica a la cerámica que parece corresponder a la reabsorción centrípeta de los implantes. En el fémur del animal nº 3, se observaron imágenes blancas puntiformes posiblemente por depósito de sales cálcicas. Y en los animales 2 y 3, se observó una zona de “enmarcación ósea” de los implantes rodeando a la zona de degradación centrípeta (imagen 51).



**Imagen 51:** imágenes representativas de los cortes sagitales del área alrededor del implante, *scaffold* + MSC (SC), de los fémures izquierdos de los animales 1, 2 y 3 obtenidas por micro-TAC. Las flechas señalan la zona de marco óseo.

### Animales con scaffold + OST (9 y 10 rodillas izquierdas y 1 derecha)

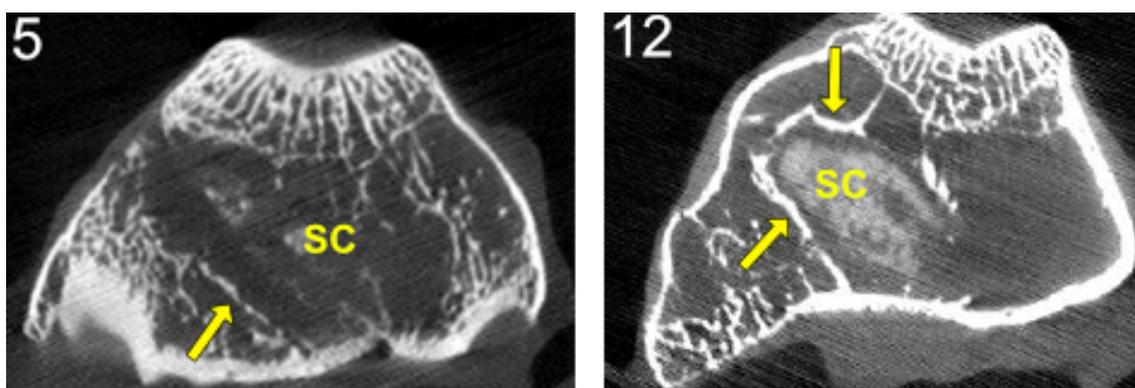
En los micro-TAC de los fémures de los especímenes 1 y 9 se reconocen los restos del implante en degradación con un comportamiento similar al observado en el grupo anterior. En el conejo nº1 se observan imágenes blancas puntiformes posiblemente por depósito de sales cálcicas, como en el grupo anterior (conejo nº 3). Hay también una zona de menor densidad periférica a la cerámica que parece corresponder a la reabsorción centripeta de los implantes. En el 9 se observa una zona de “enmarcación ósea” que delimita la zona de reabsorción periférica, que parece más clara e intensa que la observada en los conejos 3 y 2 del grupo anterior. En el 10 derecho, no se reconocen restos del implante, pero el defecto creado parece estar ocupado por una masa de densidad homogénea, que pudo deberse a la degradación completa del cilindro (imagen 52).



**Imagen 52:** imágenes representativas de los cortes sagitales del área alrededor del implante, *scaffold* + OST (SC), de los fémures izquierdos de los animales 9 y 10 y derecho del 1, obtenidas por micro-TAC. Las flechas señalan la zona de marco óseo.

### **Animales con scaffold + MSC + OST (5,10 y 12 rodillas derechas)**

En los 3 especímenes se reconocieron los restos del implante en degradación, que estaba más avanzada en el espécimen 5 respecto a los otros dos, con un comportamiento similar al observado en el grupo anterior. En los tres fémures se observó con claridad el implante degradado, con una zona menos densa periférica, delimitada muy claramente por una “enmarcación ósea” más densa, en el nº 12 es dónde más claramente e intensa se observó. En el 5 se observaron bandas de depósito de sales cálcicas que pudieran corresponder a hueso neoformado, con una zona de menor densidad periférica a los restos de la cerámica que parece corresponder a la reabsorción centripeta de los implantes (imagen 53).



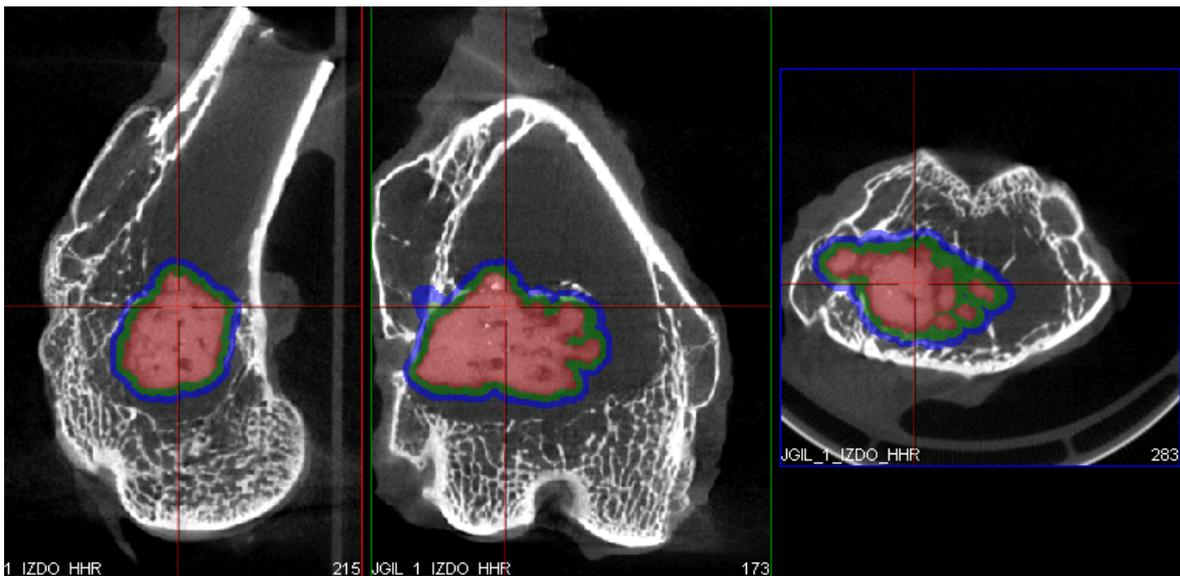
**Imagen 53:** imágenes representativas de los cortes sagitales del área alrededor del implante, *scaffold* + MSC + OST (SC), de los fémures derechos de los animales 5 y 12, obtenidas por micro-TAC. Las flechas señalan la zona de marco óseo.

### **Análisis volumétrico**

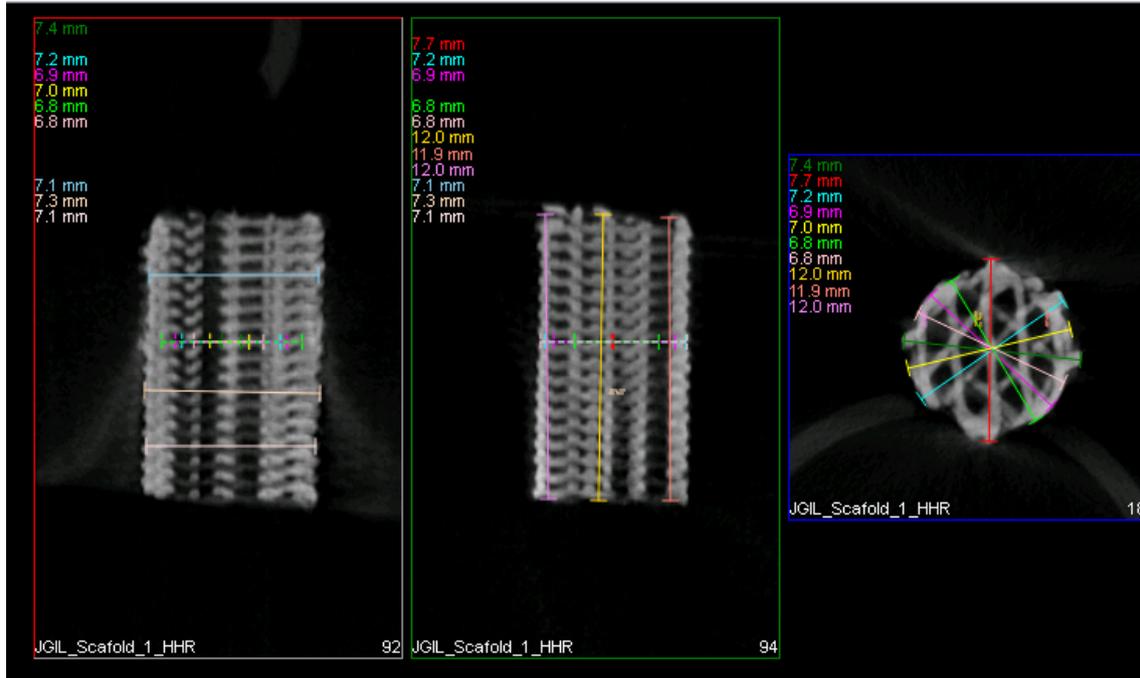
Mediante el micro-TAC apoyado en software (Vivoquant 2.0<sup>®</sup>, imagen 54 y 55) de procesamiento de datos se llevó a cabo la cuantificación del porcentaje de volumen óseo respecto al volumen total alrededor del *scaffold* (BV/TV), en los 9 especímenes en los que se realizó el micro-TAC. Se compararon dichos porcentajes entre los cuatro grupos a estudio: *scaffold* sin aditivos (4ZN), *scaffold* + células mesenquimales (4ZN +

MSC), *scaffold* + osteostatina (4ZN + OST) y *scaffold* con células mesenquimales y osteostatina (4ZN + MSC +OST).

Se generaron los 3 volúmenes en las zonas definidas previamente como regiones de interés (ROI) (imagen 54). Para poder determinar de una forma más clara el volumen y realizar un análisis de densidad correspondiente al *scaffold*, se realizó un estudio previo de las densidades del material antes a su implantación en el animal, para evitar posibles artefactos. En dicho estudio se confirmaron las medidas del biomaterial por esta técnica, con 7 mm de diámetro y 12 mm de largo (imagen 55), y se obtuvieron histogramas de densidades en unidades Hounsfield (HU). Se observan dos áreas de densidades, una hasta los 1500 HU y otra de los 1500 a los 6000 con un pico máximo en las 3000 HU. Dichos histogramas se encuentran en las tablas anexas, donde puede consultarse (página 207 y siguientes). Teniendo la información sobre el material y de las regiones de interés, el objetivo es generar histogramas de densidades para su estudio cuantitativo, al comparar la cantidad de píxeles de un determinado rango de densidades entre muestras.



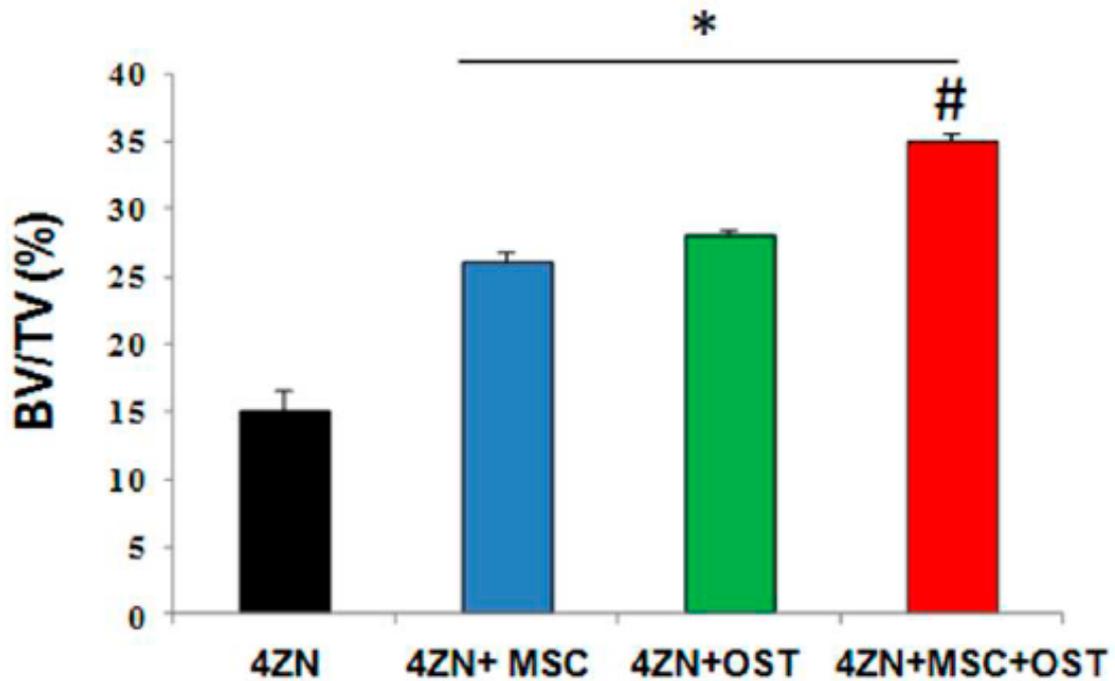
**Imagen 54:** capturas de imagen realizadas durante el proceso de cálculo volumétrico a partir de las imágenes obtenidas por micro-TAC. Se observan en color rojo la RIO correspondiente al *scaffold*, en verde *scaffold* + 5 y en azul *scaffold* +10.



**Imagen 55:** capturas de imagen realizadas durante el proceso de cálculo volumétrico a partir de las imágenes obtenidas por micro-TAC para la definición de los parámetros del *scaffold*.

Con los histogramas obtenidos por este método, pudieron realizarse los estudios comparativos cuantitativos entre los distintos grupos, pueden consultarse en las tablas anexas. Una vez analizados estos resultados pueden observarse, de una manera más gráfica, en la imagen 56. Encontramos que los *scaffolds* cargados con OST o que contenían MSC incrementaban significativamente su porcentaje BV/TV, en comparación con el grupo 4ZN. Este efecto positivo fue más evidente cuando se combinaban OST + MSC juntas, que resultaba significativamente mayor al uso no combinado de la OST y las MSC. En término porcentuales se observó el mayor dato, 35% BV/TV, en el implante 4ZN + MSC + OST, seguido del 4ZN + OST 28%, luego

4ZN + MSC 26%, y finalmente el porcentaje más bajo se advirtió en el implante sólo, 15%.



**Imagen 56:** gráfica que representa los distintos porcentajes de volumen óseo respecto al volumen total (BV/TV) entorno a los distintos implantes estudiados, medidos por micro-TAC. Los resultados son medias  $\pm$  desviación estándar. El \* indica  $p < 0,05$  frente al *scaffold* 4ZN. # indica  $p < 0,05$  frente a 4ZN + MSC y frente a 4ZN + OST.

# Discusión

## 1. Análisis del estado actual

El tratamiento de las fracturas y de los defectos óseos, especialmente, aquellos que requiere de la sustitución del tejido óseo para su reparación, constituyen una línea de investigación importante a nivel mundial. Existen numerosas líneas de investigación, que implican a un número amplio de ramas del conocimiento (medicina, odontología, física, ingeniería, química o biología entre otras), que buscan resolver los problemas causados por los defectos óseos graves (infecciones, tumores, malformaciones o fracturas). Dentro de esta búsqueda de soluciones, se ha avanzado en todas las direcciones posibles, mejorando el tratamiento de las infecciones y los tumores, se han desarrollado prótesis cada vez más avanzadas y se ha mejorado y desarrollado nuevas técnicas en el tratamiento de las fracturas y las pseudoartrosis. A pesar de ello, se sigue buscando el sustituto óseo ideal, siendo este uno de los principales objetivos de la investigación.

Existe un consenso claro, en que las propiedades idóneas de cualquier sustitutivo óseo, para conseguir la regeneración ósea son la capacidad de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, a la que se le suma el concepto de estabilidad mecánica, aportada por Giannoudis (28,34,35). El injerto de hueso esponjoso autólogo sigue considerándose, a día de hoy, como el método *gold standard* de tratamiento de los defectos óseos, con las limitaciones y complicaciones derivadas de su uso existentes, ya explicadas previamente (37,94,113,114,189). Por ello, en las últimas décadas, se ha avanzado en el estudio de distintas alternativas a este injerto, como ha sido el desarrollo de nuevos biomateriales (cerámicos, metálicos, polímeros, nanomateriales, *scaffolds*), nuevas técnicas de producción (impresión tridimensional, con campos magnéticos) o la incorporación de elementos biológicos como las células progenitoras o diversos factores de crecimiento a los sustitutivos

óseos (28,126,184,189,280,294). A pesar de los esfuerzos realizados en dichas investigaciones, todavía se persigue la búsqueda del sustitutivo óseo ideal que sea capaz de desbancar al *gold standard* actual.

Los biomateriales desarrollados, utilizados en el tratamiento de los defectos óseos, tienen una actividad principalmente osteoconductora y aportan el soporte estructural necesario para su estabilidad mecánica, en cambio presentan escasa capacidad osteoinductora y casi nula osteogénica, por sí mismos. Los elementos biológicos utilizados en terapias de sustitución ósea, como son las células progenitoras (capacidad osteogénica) y los factores de crecimiento (capacidad osteoinductora), tiene escasa función de soporte estructural. Se han desarrollado estrategias basadas en la unión de biomateriales con elementos biológicos, para la creación de nuevos constructos, en las que los primeros actúan de andamiaje (*scaffold*) y soporte, para el transporte y desarrollo de los segundos. Esta unión se basa en la combinación de una matriz osteoconductora, que proporcione una estructura en las tres dimensiones, permitiendo así el crecimiento óseo en su interior, y sea capaz de transportar células progenitoras con capacidad de diferenciación en hueso neoformado; y de manera sinérgica estar asociado a factores osteoinductores favorecedores del proceso de diferenciación y regeneración ósea. Con dicha estrategia, en la que se basa la ingeniería de tejidos, se busca acercarse al objetivo deseado de crear nuevos materiales, que cumplan todos los requisitos deseados para un sustitutivo óseo (126,128,130,184,189,280,294).

Nuestro grupo de investigación se ha dedicado, durante más de una década, al estudio y desarrollo de biomateriales, para tratar de proporcionar nuevas soluciones al tratamiento de los grandes defectos óseos, con diversos proyectos en este campo (58–60,63,174,319,320).

## 2. Análisis del defecto óseo

Existen un número amplio de grupos de investigación y de entidades comerciales que trabajan en el desarrollo de nuevos materiales para el tratamiento de estas lesiones, mediante el uso de ingeniería de tejidos. Por ello, existe un especial interés en poder evaluar estos nuevos materiales y elementos desarrollados, en modelos preclínicos de defectos óseos críticos, constituyendo los modelos animales, en muchas ocasiones, su primer escalón. Para poder permitir las comparaciones entre los resultados obtenidos de los distintos estudios y que estos sean reproducibles, es fundamental una adecuada estandarización de los procedimientos realizados y definiendo de una manera precisa el defecto a tratar (50). Ya hemos mencionado previamente, que existen múltiples definiciones de estos defectos óseos críticos, en los que esta capacidad de reparación se ve sobrepasada, pero una de las más aceptadas sería: defectos en los que no habría curación espontánea, a pesar de la estabilización quirúrgica y requiere alguna intervención quirúrgica adicional para su restitución, y si nos basamos en el tiempo sería aquel defecto que pasadas 52 semanas todavía persistiese (41,42), según el concepto dado por Hollinger.

El defecto óseo, realizado de la metáfisis distal del fémur en nuestro modelo animal (conejo), corresponde a un defecto óseo de tamaño crítico, llegando a ser incluso de mayor tamaño (7,5 mm Ø) al de otros defectos realizados por nuestro grupo de investigación que eran entre 5 y 6 mm de diámetro y hasta un máximo de 10 mm de profundidad (59,60,63,174,320). Aunque los estudios de regeneración ósea en defectos en conejos, han sido criticados por la capacidad osteoformadora de estos animales, el conejo como modelo animal, ha sido ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación, así como por otros grupos (57,65–67,320). Dicho modelo experimental está basado en el descrito por Katthagen ya en 1986, en el que se

consiguió demostrar que, incluso transcurridos 8 meses, no se daba reparación ósea en defectos de 6 mm Ø realizados en la metafisis del fémur distal de conejos adultos de raza Nueva Zelanda. Por ello, se puede atribuir, en este modelo, la presencia de regeneración al material implantado, resultando un modelo experimental válido de estudio para este tipo de lesiones y materiales (321).

En nuestro trabajo, no hemos considerado necesario la utilización de un grupo de control que demostrase que la ausencia de material generaba un defecto óseo irreparable, por dos motivos principales: por la ya existencia de trabajos en los que en nuestro modelo (defectos óseos metafisarios en fémur distal de conejos de la raza Nueva Zelanda) había utilizado grupos de control en los que no se observaba regeneración en los defectos de 6 mm de diámetro, existiendo solo la regeneración en los grupos en los que en los defectos se trataron con algún material, quedando demostrado el modelo (59,60,63,322), además en nuestro caso el defecto final fue de 7,5 mm Ø, por lo que aun haría más compleja la regeneración de dicho defecto; y en segundo lugar, reducir el número de animales a estudio, basándonos en los principios actuales de bioética en la experimentación animal y con ello mejorar también la costo-eficiencia del proyecto.

Este tamaño de defecto óseo metafisario, ha sido el de mayor tamaño descrito en esta localización y en este tipo de modelo de experimentación animal, lo cual puede tener relación con el mayor número de fracturas observado en esta ocasión, respecto a los trabajos previos. En algunos trabajos anteriores realizados por nuestro grupo, se ha trabajado con discos de 5-6 mm Ø y 5 mm de profundidad, realizando defectos de tamaño 5-6 mm Ø y hasta un máximo de 5 mm de profundidad (60,63,172,319,320), o por otros equipos con defectos de 2-3mm de diámetro y 10 mm de profundidad (323), siendo estos de una profundidad menor a los de nuestro estudio. Los defectos más similares que se llegaron a realizar, son defectos en la

misma localización de 6 mm Ø y 10 mm de profundidad, encontrando en este la presencia de un 7,6 % de fracturas (59). Otros trabajos que realizan defectos de mayor tamaño en el mismo tipo de animal, de hasta 15 mm de longitud y del diámetro completo del hueso, los realizan en localización diafisaria en el cúbito (65) o en el radio (324), y cuando se realizan en el fémur también se realizan en zona diafisaria y asociando el uso de osteosíntesis con placa y fijación intramedular del implante con una aguja de Kirschner (58).

### **3. Análisis del modelo experimental**

En los estudios preclínicos, realizados en modelos animales experimentales, para el estudio de los defectos óseos y la investigación de biomateriales en su tratamiento, observamos en la literatura un variado número de modelos animales: ratones-ratas, perros, ovejas, cabras, conejos, cerdos o caballos entre otros (48,50–56,68,69). Hemos podido comprobar que existen numerosos estudios que tratan de englobar los distintos modelos animales existentes en el tratamiento de lesiones óseas, para exponer las ventajas y desventajas que presentan cada uno de ellos y tratar de elegir el modelo idóneo en cada caso (48,50,51,54), atendiendo como vemos en la imagen 6 a propiedades como su composición, su estructura (macro y microscópica) o su tasa de remodelado óseo.

Aunque, como ya hemos mencionado existe una variedad de animales que pueden ser utilizados para la experimentación, el uso de conejos como modelo animal ha sido utilizado ampliamente, en los últimos años, en estudios experimentales sobre el tratamiento de defectos óseos críticos con biomateriales reabsorbibles, tanto en fémur (58–64) como en cúbito (65,66). En la literatura, se recoge que hasta el 35% de los estudios experimentales realizados en la investigación de patología musculoesquelética se realiza en conejos (325). El uso de este modelo respecto a otros presenta ventajas como su coste reducido, su facilidad para el manejo y cuidados, debido a su tamaño no precisa de grandes instalaciones y puede trabajarse con ellos en instalaciones cerradas, sin necesidad de espacios abiertos que dificulten y encarezcan su mantenimiento. Para su intervención no precisan de instalaciones especialmente acondicionadas y pueden realizarse en casi cualquier quirófano preparado para la cirugía experimental, y su intervención resulta rápida y sencilla. Además, alcanzan la maduración ósea rápidamente tras la maduración sexual,

alrededor de los 6 meses de edad y son uno de los animales más pequeños que tienen huesos largos que permitan su estudio (326). La utilización de animales esqueléticamente maduros permite la creación de defectos de mayor tamaño en las metáfisis, que se encontrarían ocupadas del cartílago de crecimiento en animales inmaduros, así mismo, se evitar posibles alteraciones del crecimiento posteriores a la intervención derivadas de las alteraciones producidas si las fisis estuvieran todavía con potencial de crecimiento. En cuanto a la composición del hueso, se han descrito algunas similitudes entre la densidad mineral ósea entre conejos y humanos, y de la resistencia a las fracturas en huesos largos (327).

Uno de los puntos más criticados del uso de conejos, para evaluar nuevos biomateriales en la regeneración ósea, es su elevada capacidad osteoformadora, pero como ya hemos comentado en el punto anterior, los defectos óseos críticos generados de 6 mm Ø en la metáfisis distal del fémur, no presentaban regeneración espontánea, sin que fuera utilizado ningún biomaterial (321). Otro punto a tener en cuenta, es que debido a su pequeño tamaño el número de implantes que pueden ser empleados en cada espécimen y el tamaño de los mismos, es más limitado que en otros animales de mayor tamaño (48); si bien, en nuestro caso, el tamaño del implante y el número a emplear en cada animal era el adecuado y se adaptaban bien a nuestras necesidades. También, existen diferencias macroscópicas claras entre la anatomía ósea del conejo y los seres humanos, empezando por el tamaño y la forma de algunos huesos, o la diferencia de distribución de cargas por la diferencia de la marcha entre las especies (48). En su microestructura también encontramos algunas diferencias, los conejos tienen estructuras longitudinales vasculares, que discurren paralelas al eje de los huesos largos, y rodean el canal medular y la superficie perióstica (328).

Existen otros modelos experimentales con conejos que realizan sus estudios en el cúbito, aunque por el tamaño menor del hueso permite crear defectos e implantar

materiales de inferior tamaño y existe la diferencia de ser un hueso de carga en los conejos a diferencia de los humanos (65,66). Hemos mencionado la existencia de diferencias en el tamaño y la morfología de los huesos, en el caso del fémur, presenta una adecuada semejanza anatómica entre ambas especies. Otra ventaja que presenta el uso del fémur distal es su sencillez para el abordaje quirúrgico y para la creación del defecto, siendo una técnica fácilmente reproducible, siendo algo más complejo el abordaje del cúbito. Hay que añadir que el fémur en ambas especies es un hueso que soporta carga, y por su tamaño permite crear defectos e implantar materiales de un tamaño superior al de otros huesos en el mismo animal.

El conejo albino de raza Nueva Zelanda es uno de los modelos más ampliamente utilizados en los estudios de investigación musculoesquelética, y más concretamente en los estudios de regeneración ósea de defectos con materiales reabsorbibles. Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de la elección del modelo, fue la amplia experiencia del grupo de investigación en este modelo animal y en el defecto óseo crítico generado en la metáfisis distal del fémur, al haber realizado ya numerosos estudios y publicaciones con resultados satisfactorios al respecto (58–64).

El periodo de tiempo de seguimiento tras la intervención, se estableció en 12 semanas, tras las cuales se les practicó de manera programada su eutanasia. Este periodo se basa en estudios anteriores en los que se demostró que durante las primeras 4 semanas tienen lugar los fenómenos de neoformación ósea más significativos, y en las 4-8 semanas siguientes se producen los fenómenos de remodelación. El modelo propuesto por Roshan-Ghias de regeneración ósea en torno a la implantación de *scaffolds*, demostró que la formación ósea comenzaba a partir de las 2 semanas y como a partir de las 7 semanas se observaba crecimiento en el interior del implante, disminuyendo a partir de entonces la tasa de formación ósea (329). A su vez, periodos inferiores a 4 semanas permiten valorar solamente la

biocompatibilidad de los materiales, y periodos superiores a las 12 semanas no mejoran la información la información de interés obtenida. Durante este tiempo se les permitió la carga sin limitaciones para favorecer la osteogénesis (321).

Por todo lo anteriormente mencionado, para nuestro proyecto fueron utilizadas 12 hembras albinas de conejo adultas (6 meses), con las fisis de crecimiento cerradas, de la raza Nueva Zelanda y de un peso similar ( $3.9 \pm 0.3$  kg). Buscando que la muestra fuera lo más homogénea posible, para que las diferencias que pudieran ser observadas se debieran al material implantado y no a cambios o variaciones en los especímenes. Durante el periodo perioperatorio se realizó profilaxis antibiótica con cefazolina, buscando cubrir los gérmenes habituales de las infecciones quirúrgicas en este tipo de intervenciones: gérmenes Gram positivos, como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*.

La distribución de los distintos grupos y el material implantando en cada animal puede verse la imagen 22, donde puede verse que se realizó el implante del material aislado sin ningún enriquecimiento en 4 cóndilos femorales; *scaffold* + Osteostatina en 6 cóndilos femorales y *scaffold* + Células mesenquimales en 6 cóndilos femorales también; y *scaffold* + MSC + OST en 8 fémures. Esta distribución desigual se decidió de esta forma, en previsión de posibles pérdidas, poder obtener un grupo de muestras del grupo de *scaffold* + MSC + OST suficiente que permitiera realizar las determinaciones previstas y para la obtención de resultados, ya que la hipótesis del proyecto era determinar la capacidad del *scaffold* combinado con la osteostatina y las células mesenquimales en la regeneración de los defectos óseos. Las otras combinaciones de materiales correspondían a objetivos secundarios y por ello su número de casos fue menor. Además, ya existían trabajos en los que se había estudiado la capacidad regeneradora de biovidrios mesoporos de manera aislada o enriquecidos con osteostatina para el tratamiento de defectos óseos

(60,167,172,234,316,319,320). Por ello en nuestro estudio lo más relevante era la incorporación de las células mesenquimales al constructo y ver los efectos que estas producían.

Se les sometió al seguimiento postoperatorio de 12 semanas, durante el cual observamos un caso de infección aguda que tras la evacuación del absceso producido en la zona de la herida que presentó una evolución posterior sin incidencias. Uno de los conejos tuvo una muerte espontánea objetivándose durante la necropsia fractura diafisaria del fémur derecho, que pudo ser la causa de la muerte, y otra fractura del cóndilo femoral izquierdo; y otro de los animales tuvo que ser sacrificado a las 2 semanas, por deterioro del estado general según los protocolos de supervisión del proyecto, en su necropsia se hallaron signos de artritis séptica de rodilla derecha, la cual también podría ser la causa del deterioro del estado general, y fracturas no desplazadas de ambos cóndilos. El número de pérdidas es similar al encontrado en otros proyectos realizados por nuestro grupo (58–64). El resto de animales completaron el periodo de estabulación sin presentar incidencias relevantes, permitiendo así poder estudiar de manera idónea y reproducible los resultados obtenidos posteriormente.

## 4. Análisis del material de implantación

El uso de *scaffolds* para el tratamiento de los defectos óseos, es un campo que ha experimentado un avance muy importante en las últimas décadas, y gracias al desarrollo de la ingeniería de tejidos permite englobar numerosas ramas del conocimiento para su progreso. Existen ya trabajos que ante la gran cantidad de nuevos materiales existentes en la actualidad y las distintas formas de combinarse han tratado de realizar sumarios de los mismos (28,29,113,126,128), en todos ellos la ingeniería de tejidos y los *scaffolds* van cobrando cada vez mayor importancia y son vistos como el futuro cercano de este tipo de tratamientos. Lo mismo ocurre con el uso cada vez más frecuente de biomoléculas de señalización y de las terapias biológicas celulares, que inicialmente comenzaron a usarse de forma aislada y en los últimos años han pasado a asociarse con otros biomateriales, para buscar crear sustitutos óseos cada vez más cercanos al hueso nativo (179,184).

### **Análisis del scaffold**

Existe una amplia variedad de materiales para la fabricación de andamiajes (polímeros, metales, cerámicas y compuestos) como hemos descrito previamente, pudiendo ser de origen natural o sintético, reabsorbibles o irreabsorbibles. Con esta variabilidad las propiedades que tienen los *scaffolds* diferirán mucho unos de otros, en función de su composición y estructura, por ello es importante elegir el que mejor se adecúa a una situación concreta, en nuestro caso la reparación de los defectos óseos críticos. Para el tratamiento de estas lesiones buscaremos las propiedades que debería tener cualquier sustituto óseo como son la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora (34). También al ser un biomaterial deberá cumplir con los requisitos necesarios como son la biocompatibilidad, seguridad, bioestabilidad, resistencia y un diseño adecuado (36,103).

En cuanto a sus propiedades como biomaterial para ser utilizado como sustitutivo óseo, buscaremos una serie de características que resulta especialmente útiles para este propósito: que sean biodegradables, una red conectada de poros, resistencia mecánica suficiente y mantenimiento su integridad estructural (198,202,282). Los biovidrios con base de silicio han demostrado ya excelentes propiedades como la capacidad de regeneración ósea, mesoporos altamente ordenados que permiten transportar y liberar agentes bioactivos; y una amplia área de superficie y de volumen de poro que favorece respuestas rápidas en el huésped. Estudios experimentales con este tipo de biovidrios han sido realizados tanto por nuestro grupo como por otros investigadores, existiendo una amplia experiencia en su uso (58,63,67,175,234,330). El tamaño del poro también es el recomendado para tejidos en los que se desee su regeneración y vascularización, como el tejido óseo, al ser de  $>300 \mu\text{m}$  y presentar una arquitectura interconectada (331).

Este tipo de materiales permite la adición de otras partículas como iones metálicos (Zinc, magnesio, cobre, cobalto, niobio, galio...), permitiendo así mejorar algunas de sus propiedades bioactivas o la incorporación de otras nuevas no presentes previamente (angiogénesis, regeneración ósea o capacidades antimicrobianas). Esta vía tiene la ventaja de ser sencilla y poderse controlar el tipo y cantidad de iones que se incorporan, buscando rangos seguros y las concentraciones idóneas para obtener los efectos deseados con la menor toxicidad posible. El uso de estos iones en la composición de los biovidrios ha demostrado incrementar la concentración intracelular de dichos iones en el huésped, desencadenando vías de señalización que pueden desembocar en diversos procesos, como la regeneración ósea (67,332). Respecto a cuál puede ser el ion idóneo en la literatura encontramos revisiones y estudios de las distintas opciones posibles. El zinc ha demostrado su capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano formando parte de un vidrio

mesoporoso sin aumentar con ello la citotoxicidad (238,333), también se ha comprobado su influencia en la evolución y cierre de heridas favorable (334). Así mismo existen trabajos donde se pone de manifiesto los efectos en el desarrollo, formación y metabolismo del tejido óseo, y en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (335–337). Su concentración idónea ha sido estudiada también, encontrando que se obtenían la mejor relación entre sus potenciales beneficios y la mínima citotoxicidad con concentraciones del 4% (167,238,316), que han sido las utilizadas en nuestro proyecto.

Las propiedades de los vidrios mesoporosos con base de sílice como transportadores de biomoléculas y células, se encuentran actualmente en constante desarrollo, no solo para el tratamiento de defectos óseos, sino también para la liberación controlada en otras patologías como el cáncer, las infecciones o la osteoporosis, entre otras. Debido a su estructura que crea una red altamente interconectada de poros, formada por la combinación de macro y microporos, les confiere alta capacidad de carga para el sembrado de células y biomoléculas (fármacos, péptidos, proteínas o ácidos nucleicos), y han demostrado que puede controlarse su liberación de forma controlada y dirigirse a tejidos especialmente seleccionados, para evitar así, una liberación prematura o en un lugar no deseado (338,339).

Existen evidencia acerca del uso de cilindros sintéticos implantados para el tratamiento de defectos óseos, quedando demostrada su degradación y absorción, utilizándolos como un sustitutivo óseo sintético, siguiendo las condiciones propuestas por Bauer (75), para su estudio. Observando el mismo tipo de crecimiento de tejido óseo y tejido fibroso para curar el defecto, el mismo tipo de crecimiento y remodelado se ha obtenido *in vivo* por nuestro grupo (59,60,174,320), con otros materiales y tipos de defectos, sugiriendo un proceso de reclutado de células mesenquimales de los

tejidos próximos a la lesión y su consiguiente diferenciación a células osteoformadoras.

Por todo lo anteriormente mencionado, para nuestro proyecto hemos utilizado un vidrio bioactivo mesoporoso de composición  $82.2\%SiO_2-10.3\%CaO-3.3\%P_2O_5-4.2\%ZnO$ , que parte de los biovidrios con base de silicio ( $SiO_2-CaO-P_2O_5$ ). Los estudios realizados para la caracterización de nuestros biovidrios, que han sido diseñados y fabricados en el Departamento de Química Orgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, han demostrado cumplir con las características de seguridad y biocompatibilidad, tanto del material como de sus productos de degradación, que se precisan a través de pruebas de citotoxicidad y crecimiento celular en torno al implante; también se estudió la estabilidad del material estudiando la liberación de iones al medio, y la tasa de hinchado (316).

La parte relativa al diseño adecuado del material, al estar fabricado mediante impresión tridimensional, que actualmente son las técnicas más empleadas en la fabricación de nuevos biomateriales por sus ventajas (240), puede ser adaptado a las necesidades y dimensiones que sean precisas, dichas técnicas de impresión 3D ya han sido utilizados en otros estudios obteniendo resultados adecuados (59). Este tipo de diseños tridimensionales que permiten su adaptación a los requerimientos concretos a cada caso, así como el control de su micro y macroestructura, se considera un pilar fundamental en el diseño de nuevos sustitutivos óseos en el campo ingeniería tisular, según Cavo (331). En nuestro caso se buscaba un material de tipo cilíndrico de unos 5-6 mm de diámetro y 10 mm de alto, ya que por el modelo de estudio animal elegido y la técnica quirúrgica de brocado del cóndilo femoral se generaba un defecto de esas características. Finalmente, el *scaffold* creado fue un cilindro de 7 mm de diámetro por 12 mm de alto, que cumplían con las características

estructurales, de porosidad y morfología deseadas para el tratamiento de la lesión propuesta.

### **Análisis del uso de células mesenquimales**

En la introducción hemos hablado de la incorporación de las terapias celulares para el tratamiento de los defectos óseos, inicialmente de forma aislada y posteriormente siendo las células incorporadas a distintos sistemas de transporte, entre ellos los *scaffolds*. Con ello se pretende suplir una de las principales desventajas que presentan los sustitutivos óseos sintéticos, ya que la capacidad de osteogénesis, depende fundamentalmente de las células y con la excepción del injerto autólogo, el resto de biomateriales existentes no poseen dicha capacidad (94,179,191,312). Se encuentran disponibles, para su uso, distintos tipos de células progenitoras, cada una con distintas propiedades y ventajas como se describen en la imagen 14. Existen un debate acerca de cuales deben ser el tipo celular seleccionado, así como sobre la concentración que la que deben utilizarse o sobre que tipo de transportador. Sí que parece existir acuerdo, respecto a la necesidad de utilizar algún vehículo para esta terapia con células progenitoras, teniendo su uso aislado una menor repercusión en la regeneración ósea; también se ha visto que aunque existen diversas opiniones respecto a las concentraciones idóneas, parece existir relación entre el número de células progenitoras dentro de la médula ósea y la formación de callo (187,188,294). El uso de *scaffolds*, del tipo biovidrio mesoporos similares a los utilizados en nuestro proyecto, como vehículos en el sembrado celular permiten: la preservación del volumen tisular hasta la creación de nuevos tejidos; su porosidad permite la carga, transporte y soporte de una gran cantidad de células; dicha porosidad favorece la migración hacia los tejidos del huésped de las células y su proliferación (179).

Respecto al tipo celular seleccionado, el uso de células humanas en la experimentación del tratamiento de defectos óseos formando parte de biomateriales,

ha sido ya estudiada utilizando células mesenquimales humanas, osteoblastos humanos o células de la cavidad oral humana, de manera *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación, demostrando ser una herramienta prometedora en el tratamiento de dichos defectos, al mostrar mejorar la proliferación y regeneración ósea en los distintos estudios (67,128,184,275,340,341). Las células mesenquimales humanas presentan la ventajas como su facilidad de adquisición, que se encuentran bien caracterizadas y son conocidas su propiedades osteogénicas y angiogénicas, si bien presentan inconvenientes como ser preciso su procesado y manipulado para su implantación (179).

En nuestro caso las mesenquimales elegidas para su sembrado en el *scaffold*, fueron células mesenquimales humanas (hMSCs) procedentes de Lonza (Walkersville, EEUU), con una concentración en cada *scaffold* de  $4 \cdot 10^5$  células/*scaffold* con una posterior incubación durante 2 días, con remplazo diario del medio. En estudios realizados por miembros del grupo de investigación, se pudo demostrar la adecuada unión de las MSC al implante, así como, su correcto crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células (316).

### **Análisis del uso de osteostatina**

Se encuentran disponibles, para su uso, múltiples biomoléculas (péptidos, proteínas, ácidos nucleicos), para promover la regeneración óseas, la osteostatina, que es una secuencia C-terminal análoga de la PTHrP ha demostrado tener una actividad antiresortiva y mostrar propiedades osteogénicas (169–171), al igual que la capacidad osteoregeneradora que ya había demostrado tener previamente la PTH (158). Por ello se comenzó a estudiar su uso como biomolécula que podría ser incorporada a distintos biomateriales para el tratamiento de los defectos óseos.

Se han utilizado otro tipo de péptidos y moléculas combinadas con biomateriales para la regeneración ósea. El modelo descrito por Mendes utiliza un péptido de crecimiento con actividad osteogénica (OGP: osteogenic growth peptide, ALKRQGRTLYGFGG) con hidroxapatita en un vidrio mesoporoso (SBA-15), encontrando *in vitro* bioactividad y degradación del material, si bien precisarían de más estudios (342). Otros equipos como el de He utilizaron un péptido derivado de la proteína morfogenética ósea (BMP-2) (KIPKASSVPTELSAISTLYL) asociado a la dexametasona (glucocorticoide con actividad anabólica), ambos transportados en nanopartículas de base de sílice mesoporosas. Demostraron de forma *in vitro*, como aumentaba la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales óseas en las que fueron estudiadas. *In vivo*, tras su implantación intramuscular en ratas durante 3 semanas, mediante estudio por TAC e histología se pudo observar diferenciación osteoblástica efectiva (343).

La osteostatina como péptido en el tratamiento de la regeneración ósea y su relación con el metabolismo óseo, ha sido menos estudiada que otros miembros de la familia de las proteínas relacionados con la hormona paratiroidea (PTHrP), pero ha demostrado tener una actividad antiresortiva (169) y mostrar propiedades osteogénicas *in vitro e in vivo* (170,171). Miao demostró que los ratones con una delección de las regiones media y C-terminal de PTHrP presentaban retraso del crecimiento, envejecimiento prematuro, disminución de la proliferación y aumento de la apoptosis de las células óseas (344). Parece inhibir la resorción osteoclástica, al actuar a nivel del crecimiento y diferenciación de los osteoclastos (345) y posee capacidad mitogénica y favorecedora de la diferenciación celular (170,173,320).

Su utilidad en *scaffolds* con un péptido cargado, inicialmente, se demostró *in vitro*, al comprobar como biomateriales cargados con osteostatina desarrollaban propiedades osteogénicas y osteodiferenciadoras de las células osteoblásticas. Se

observó como *scaffolds* cargados en medios de cultivo eran capaces de promover la función osteoblástica, incluso tras 12 días de incubación (172). También de manera *in vitro*, se pudo comprobar como la capacidad osteogénica de biomateriales enriquecidos con zinc aumentaba con el uso de osteostatina (175). Posteriormente, estos mismos hallazgos fueron demostrados de forma *in vivo* en modelos animales, similares a los utilizados en nuestro estudio (defecto crítico cavitario en fémur distal de conejos). Se observó por estudios histológicos, de micro-TAC y la expresión de marcadores específicos de crecimiento óseo, que biocerámicas cargadas de OST mostraban una clara acción regeneradora ósea, así como una alta actividad osteoconductora y osteoinductora, al promover la llegada de células precursoras osteogénicas y la formación de tejido conectivo en la lesión (320).

Otros estudios se han centrado en la fase inicial (2 semanas) de esta actividad osteogénica, con marcadores específicos obtenidos por inmunohistoquímica y su estudio histológico, mostrando un efecto significativamente mayor en los conejos osteoporóticos respecto a los conejos sanos (174). Esto último concuerda con las propiedades antiresortivas y para el tratamiento de la osteoporosis que se conocen en la familia de PTHrP (36,158). También se ha observado en dichos estudios *in vivo*, que la capa fibrosa generada durante la curación del defecto era más delgada en los casos en los que se había cargado el *scaffold* con OST, al compararlos con el grupo control, concordando con los hallazgos de nuestro estudio.

Algunos de los principales factores limitantes del uso de factores de crecimiento y otras moléculas a nivel local son la inestabilidad que presentan estos péptidos, y la dificultad para su depositado en la localización diana deseada. Ambos factores pueden minimizarse mediante la carga de dichos factores en transportadores, como los *scaffolds*, que permiten la protección y la liberación controlada en el lugar del organismo deseado (346,347). En concreto los biovidrios mesoporosos son los

nanotransportadores ideales por sus propiedades únicas como son su forma y tamaño, composición química, su micro-macro estructura (canales, poros y cavidades de tamaño adecuado para el transporte de la OST) (237,338,348). Uno de los primeros usos de los biovidrios mesoporosos como transportadores fue por parte del equipo de Lin, se sintetizó un sistema de administración de fármacos a base de nanopartículas de sílice mesoporoso funcionalizado con ácido borónico (BA-MSN) para la liberación controlada de insulina y monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) sensible a la glucosa, aunque este sistema nunca llegó a probarse *in vivo* (349). Este campo ha continuado con un amplio desarrollo, y concretamente en el campo de la traumatología se está trabajando para su uso en enfermedades óseas complejas como el cáncer de tejidos óseos, el tratamiento de infecciones, defectos óseos y la osteoporosis, con el uso combinado de nanopartículas de sílice mesoporosas con distintos fármacos y moléculas bioactivas (339).

Miembros de nuestro equipo de investigación han realizado estudios, a lo largo de más de 10 años, investigando el uso de la osteostatina cargado en biovidrios mesoporosos de base de silicio para el tratamiento de grandes defectos óseos (167,172–174,320). Se ha podido comprobar, de forma experimental, que se conseguían cargas de OST de 0.9 µg/g en un *scaffold* de composición similar (80% SiO<sub>2</sub> –15% CaO–5% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> conteniendo en 4% de ZnO) al de biovidrio utilizado en nuestro estudio, y se conseguía la completa liberación de la OST a las 96 horas (167). Resultados similares fueron corroborados durante la caracterización del implante que hemos utilizado (316), quedando con ello demostrado su viabilidad como vehículo en el transporte de la OST. En dicho estudio, también se demostró de forma *in vitro* el efecto sinérgico del zinc y la osteostatina en potenciar el crecimiento y la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales, por lo que el siguiente paso ha sido su demostración *in vivo* en nuestro trabajo actual.

## 5. Análisis histológico de la implantación del biovidrio

### Análisis macroscópico

En el estudio macroscópico realizado durante la necropsia se observó, en todos los grupos (*scaffold*, *scaffold* + OST, *scaffold* + MSC y *scaffold* + OST + MSC), como el defecto óseo en el cóndilo femoral externo estaba recubierto por tejido óseo neoformado. En ninguno de los especímenes se objetivó la persistencia macroscópica del defecto. En cambio, si se había podido observar en otros de los trabajos realizados con grupos control en los que el defecto se dejaba sin relleno, la ausencia de curación del mismo o incluso la presencia de pseudoartrosis (58–60,63,322). En los estudios realizados por Xie en defectos diafisarios de hasta 15 mm, no se observó macroscópicamente el relleno completo del defecto en los casos en los que se utilizó el scaffold sin carga de BMP-2, en cambio si que se pudo observar dicho relleno en aquellos en los que el BMP-2 se encontraba adicionado al implante (324).

En otros estudios realizados con un seguimiento menor de tiempo desde la implantación hasta el sacrificio de los animales, pudo verse a las 2 semanas como los biovidrios mesoporosos con y sin osteostatina, se encontraban dentro del defecto creado intactos y encapsulados por un tejido fibroso (174), sin encontrar el recubrimiento de tejido óseo presente en nuestro estudio. De forma similar en este trabajo se observaba biovidrios mesoporosos con y sin OST a las 4 y a las 8 semanas, existiendo a las 8 semanas una neoformación ósea sobre el defecto similar a la observada en nuestro proyecto, que no se encontraba presente a las 4 semanas (320).

La composición del material con la inclusión de iones como el zinc o su enriquecimiento con factores de crecimiento, también parecen influir en los resultados macroscópicos. Estudios en los que se han utilizado vidrios bioactivos que no

contenían zinc, aunque el resto de su composición era similar a nuestro *scaffold*, mostraban partes del implante todavía visibles y con una cobertura de tejido óseo parcial, tras 4 (63) y 6 meses de la implantación del material (58). Xie llegó a encontrar que los defectos rellenos de un biovidrio sin zinc en su composición mostraban una cobertura parcial por tejido óseo, que llegaba a ser casi completa cuando se asociaba con la carga de BMP-2 (324). Sin embargo, en aquellos materiales en los que se utilizaba zinc en su composición, se consiguió la cobertura completa del implante (174,320,323), tanto en los grupos que asociaban la carga con factores de crecimiento en el implante, como en los grupos en los que el implante no asociaba elementos adicionales, al igual que lo observado en nuestro trabajo.

Una característica macroscópica observada en nuestro estudio fue la presencia de coloración marronácea subyacente al hueso neoformado que parecía delimitar la zona de implantación. No se ha encontrado en los demás trabajos revisados que utilicen BMP-2 (323,324) u osteostatina (174,320); no obstante en uno de ellos se menciona que existen diferencias en la cicatriz entre los grupos con y sin OST, si bien su seguimiento fue de solo 2 semanas y no menciona la coloración marronácea (174). De forma similar, se encontró en nuestros grupos que tenían células mesenquimales prominencia ósea semiesférica que delimitaba el área circular de implantación, sin describirse como tal este hallazgo en otros estudios (65).

Aunque el número de casos perdidos es similar al encontrado en otros proyectos realizados por nuestro grupo (58–64), el número de fracturas encontrado, 37,5% (9 fracturas en 24 fémures), es algo superior al visto en otros de nuestros estudios, si bien un 33% de estas fracturas fueron marginales o sin desplazamiento.

Este número de fracturas es superior a la descrita en la serie de Katthagen, que se encuentra en torno al 1,2% (321) y a los observado en proyectos anteriores realizados por nuestro grupo que oscila entre el 7,6% y el 0% (59,60,63,174,320). La

explicación de la presencia de fracturas en este modelo, está relacionada con la destrucción de más del 50% del tejido óseo en la zona metafisaria distal del fémur al crear el defecto óseo de tipo crítico, asociada a la ausencia de descarga de la extremidad tras la intervención, ambos factores contribuyen a aumentar el riesgo de fractura.

Debemos considerar que, en nuestro caso, el necesario aumento del defecto óseo crítico creado (7,5 mm Ø), debido al aumento del tamaño inicialmente previsto del implante que finalmente fue un cilindro de 7 mm Ø por 12 mm de alto, pudo favorecer la mayor incidencia de fracturas observada en el cóndilo femoral tanto en el momento de la intervención como de la necropsia, ya que en los estudios anteriormente mencionados los defectos óseos en la localización del fémur distal eran entre 5-6 mm Ø máximo. En los trabajos realizados con discos de 5-6 mm Ø y 5 mm de profundidad, realizando defectos de tamaño 5-6 mm Ø y hasta un máximo de 10 mm de profundidad (60,63,172,319,320,323), la presencia de fracturas es excepcional. En cambio, cuando se aumenta la profundidad y tamaño del material implantado y del defecto en la misma localización de 6 mm Ø y 10 mm de profundidad, la presencia de aumenta hasta un 7,6 % (59).

### **Análisis microscópico**

Como hemos mencionado previamente las principales características que debe reunir un nuevo material que pretenda cumplir una función de sustitutivo óseo debe tratar de reunir las siguientes propiedades: biocompatibilidad, seguridad, bioestabilidad, ser biodegradables, y resistencia con un diseño adecuado (36,103,105,198,202,282,283). También son importantes los criterios de Shors, que considera necesarios para la actividad osteoconductora de los implantes coralinos, y para el crecimiento óseo sobre un implante bioactivo bajo condiciones ideales, que se conoce como la “triada de osteoconducción”: estabilidad, viabilidad y proximidad. Así

mismo, Shors también propuso que la formación ósea, se inicia sobre la superficie de un implante si este es bioactivo, y en condiciones ideales cuando se da la triada mencionada, este crecimiento será de tipo membranoso (192).

La formación de tejido óseo alrededor del cilindro implantado es del tipo de osificación membranosa, con una cicatriz de tejido fibroso circundante y la ausencia de células de tipo condral. La cerámica implantada ha demostrado su bioactividad *in vivo* mediante la creación de un marco óseo de tejido fibroso delimitante, su mayor grosor la alcanza en el grupo del implante sin aditivos, y este grosor disminuye en el resto de grupos siendo el menor en el grupo del *scaffold* con OST y MSC, a favor de una mayor formación de tejido óseo en lugar de fibroso. Esto sugiere que nuestro *scaffold*, se comporta de la manera esperada según los criterios de Shors, para la formación ósea alrededor del implante, indicando que se darían las condiciones de su triada de osteoconducción: estabilidad, viabilidad y proximidad (192). Estos hallazgos parecen indicar que el uso de un biovidrio mesoporoso, con zinc al 4% enriquecido con MSC y cargado con OST, mejora la regeneración ósea reduciendo la capa fibrosa inducida por el *scaffold*, lo que aporta una visión novedosa en el campo de investigación de la regeneración de defectos óseos.

Existen también signos de viabilidad, la curación del defecto óseo crítico en todos los grupos, demuestra la viabilidad del hueso metafisario en el que fue implantado. La proximidad, se observó en zonas remanentes de implante en las que se objetivó el crecimiento de tejido óseo englobando los restos del material, traduciéndose en un crecimiento próximo (<1 mm) en torno al *scaffold*. Ambas condiciones fueron también observadas en otros proyectos del mismo equipo, encontrando como todos los implantes distaban menos de 1 mm al lecho óseo receptor en todas las mediciones practicadas en el estudio histomorfométrico, cumpliendo así el criterio de proximidad (58–60,63). En un estudio previo de nuestro

grupo, que evaluaba el *scaffold* con y sin OST, se comprobó esta proximidad, de neoformación ósea en torno al implante, se observó desde las 4 semanas, en un estudio previo, y como aumentaba hasta las 8 semanas, observándose como en ese tiempo, el grupo con OST se rompía la capsula fibrosa permitiendo el contacto del tejido osteoide con el material de forma íntima (320).

Se observaron agrupaciones de células de morfología linfoide, de macrófagos o células redondas indiferenciadas y en otras a modo de restos celulares eosinófilos, mezclados con células gigantes multinucleadas, compatible con estructura de medula ósea. Estos resultados se vieron de forma más clara en los grupos en los que se incluyeron células mesenquimales en el *scaffold*, aunque en menor medida y sin diferencias significativas también se observaron en el resto de grupos. En el estudio que realiza el equipo de Gu, en defectos en el cúbito tratados con matriz ósea desmineralizada con y sin células madre derivadas de tejido adiposo (ASC), se pudo observar como en los casos en los que se adicionó ASC se encontró una estructura de hueso maduro y la regeneración de la cavidad medular, similar a la médula ósea (65). En el trabajo, más reciente, de Begam se comprobó como la carga de BMP-2 en biovidrios de una composición similar a los nuestros (también contenían zinc), aumentaba el relleno de las cavidades medulares de células osteoprogenitoras, al compararse con los mismos implantes sin la carga de factores de crecimiento (323). Estos hallazgos podrían indicar la mayor regeneración medular asociada al uso de células y/o la carga de factores de crecimiento en los implantes, similar a lo que hemos podido observar, si bien a nivel histológico en nuestro estudio estas diferencias no fueron significativas.

El proceso por el que se consiguió el crecimiento de tejido óseo sobre la superficie del implante en todos los grupos, parece estar en relación con la actividad del biovidrio utilizado, el cual pudo funcionar como estimulador de osteogénesis

mediante el reclutamiento de células de tipo mesenquimal del lecho receptor, con diferenciación posterior a células formadoras de hueso sobre su superficie, lo que demostraría la bioactividad del implante (175). Resultados similares fueron observados en trabajos con biovidrios implantados en modelos experimentales similar al nuestro, obteniendo conclusiones similares respecto a lo observado (58–60,63).

Comprobamos en nuestras muestras fenómenos de neoformación ósea y osteointegración, con zonas de hueso compacto en todos los grupos y se objetivó también la neoformación de hueso trabecular en el grupo del *scaffold* con OST y MSC. Estas zonas de hueso trabecular con contenido de médula ósea, han sido de igual forma identificados en los trabajos previos, tanto utilizando factores de crecimiento o células mesenquimales, como sin su uso e incluso sin emplear implantes que contuvieran zinc, ni ningún tipo de enriquecimiento en su composición (59,63,65,174,324). Solo encontramos la ausencia de hueso de tipo trabecular en el estudio de Begam, en el que en el grupo del *scaffold* sin BMP-2, es en el único en el que no aparece este tipo de hueso, apareciendo en el resto de grupos en el que si lo emplean (323). Se observa también, en el estudio llevado a cabo a las 4 y 8 semanas, como la formación de hueso trabecular no comienza a observarse hasta las 8 semanas (320). Por todo ello, parece existir relación entre el uso de scaffolds de biovidrios mesoporos y la neoformación de hueso compacto y trabecular, no dependiendo la creación de este último tipo de hueso de los aditivos del implante.

La biocompatibilidad y seguridad del material también se comprobó en los cortes histológicos realizados, en todas las muestras analizadas, independientemente del grupo estudiado, no se encontraron en signos de inflamación o reacción tisular adversa alrededor de los implantes. Observaciones similares se obtuvieron en estudios realizados con biovidrios con zinc (323), con osteostatina (174,320) o con células mesenquimales (179,186,340). Al no observar signos adversos en nuestras

muestras se confirma la seguridad tanto del material testado como de sus combinaciones con osteostatina, células mesenquimales o ambas, sin que estas modifiquen su perfil de seguridad y compatibilidad.

La resistencia del material, dando soporte estructural al defecto durante el proceso de curación inicial, se comprobó, dado que la estructura ósea se ha conservado tras su implantación, cubriéndose de hueso el orificio de creación del defecto óseo. Así mismo, coexisten zonas de degradación del implante, en todos grupos en las zonas de transición entre el biomaterial y el tejido óseo donde se observan procesos de degradación, con zonas de reabsorción incompleta de los implantes y zonas de inclusión de residuos procedentes de la biocerámica en el espesor de hueso neoformado. Estos hallazgos sugieren actividad ósea y de reabsorción en relación con la biodegradación del implante. Esto último es un factor importante de acuerdo las condiciones propuestas por Bauer, para la remodelación ósea en torno a un sustitutivo óseo sintético, permitiendo el crecimiento de tejido neoformado, a la vez que va desapareciendo el implante (75). Estos hallazgos son similares y concuerdan con lo ya observado in vivo en otros trabajos de nuestro grupo (59,60,174,320), confirmando las propiedades de biodegradación y resistencia del material.

Una de las debilidades del presente estudio, fue que el análisis histológico no ha permitido en ocasiones comprobar las diferencias entre los distintos grupos, consideramos que es debido a la destrucción de la parte más delicada del corte (el implante y su entorno inmediato) durante el procesado (pulido y lijado). Para la preparación de las muestras histológicas se utilizó el sistema de corte EXAKT y las tinciones de Hematoxilina/Eosina y Tricrómico de Masson-Goldner, lo que permitió obtener unas muestras satisfactorias para su análisis con escasos artefactos. Las ventajas principales de la técnica EXAKT, para la preparación de muestras de tejido

óseo, son que permiten trabajar con muestras sin que sea necesaria su descalcificación y observar procesos con la interfase entre el hueso y el implante o la aposición de tejido óseo neoformado. Es por ello que se considera idónea para la investigación en la regeneración ósea relacionada con el uso de implantes (350), como fue nuestro caso. Se observaron restos del material implantado en los especímenes óseos incluidos en los bloques en metil metacrilato, si bien en los cortes histológicos se apreció la ausencia completa del *scaffold* en algunos especímenes, que puede atribuirse a las técnicas de corte y pulido empleadas en la preparación de las muestras. Aparte de las posibles alteraciones producidas por la preparación de las muestras histológicas, el pequeño tamaño muestral en cada grupo, que se exige actualmente buscando la reducción, al máximo, del número de animales experimentales para el estudio *in vivo*, han podido condicionar estas observaciones y no encontrar por ello diferencias significativas histológicas entre los grupos.

## **6. Análisis radiológico de la implantación del biovidrio**

### **Análisis micro-TAC**

Se decidió el uso del micro-TAC como prueba de evaluación de los resultados obtenidos por las ventajas que aporta respecto a otros medios tradicionales como la radiografía simple convencional, que se había utilizado en otros estudios previos por nuestro equipo (58–60,63). Si bien, en estudios del grupo de investigación realizados sobre el biovidrio con zinc y enriquecido con OST, ya se habían realizado evaluaciones de los resultados con micro-TAC (320), y en otros grupos es cada vez más frecuente su uso para el estudio de biomateriales en el tratamiento de defectos óseos, quedando relegada la evaluación con radiografía simple (65,324,329,351).

Las pruebas de imagen radiológicas permiten la evaluación de la formación de tejido óseo nuevo de una manera no invasiva, evitando la destrucción de las muestras si se comparan con técnicas como las histológicas. Las técnicas más tradicionales como la radiografía, presentan limitaciones a la hora de evaluar la formación ósea, cuando se utilizan implantes con una densidad alta similar a la del hueso cortical, como es el caso de algunos biomateriales utilizados como sustitutivos óseos (351). Los primeros estudios realizados con TAC convencionales, como el dirigido por Nolf, compararon el TAC estándar con las radiografías tradicionales. Se realizó un defecto de 25 mm en mandíbulas de 10 ovejas y se reconstruyeron con una placa y un biomaterial poroso radiopaco, cada una de las lesiones. Para su evaluación, a las 16 semanas tras la necropsia del animal, se les realizó a las piezas un estudio de TAC convencional y un estudio radiográfico. Se determinó que el TAC no permitían la adecuada diferenciación entre el implante y el tejido óseo neoformado, o la interfase entre ambos materiales, además de tener una resolución insuficiente para diferenciar materiales según su microestructura (trabecular, compacta o porosa) (352).

El micro-TAC es otro avance respecto al TAC convencional, ya que además de la adquisición de imágenes clásicas, permite el estudio de la microestructura de los materiales, con un uso amplio en la ingeniería de tejidos actualmente (353). Permite proporcionar información cualitativa y cuantitativa de la morfología y arquitectura tridimensional del material y espécimen a estudio, siendo la cuantificación de parámetros más fácilmente comparable entre distintos grupos o estudios, y una ventaja respecto a la información cualitativa obtenida por la radiografía simple. Esta prueba se puede realizar *in vivo* como estudio de seguimiento seriado, aunque presenta el inconveniente de que precisa sedación de los animales, o puede hacerse también sobre especímenes de necropsia al término del estudio una vez ya sacrificado el animal. Roshan-Guias realizó un estudio monitorizando la formación de hueso en defectos de 3 mm de diámetro en fémures de ratas, a los que se les implantó un *scaffold*. De forma seriada, se realizó su escaneado por micro-TAC en 7 ocasiones desde su implantación hasta las 35 semanas. Con ello pudo obtener información acerca de la relación entre el tamaño, microestructura y la porosidad del biomaterial, y la formación de hueso, u obtener información acerca del tiempo requerido para la mineralización del *scaffold*, que con medios como la radiografía no podría haberse obtenido (329).

Otra ventaja importante es que, tras el escaneado de las piezas, éstas permanecen intactas y pueden ser utilizadas para otros estudios contribuyendo con ello a reducir el problema de la limitación de muestras, como fue en algunos especímenes de nuestro estudio, que se realizó su estudio histológico posterior. Como principales desventajas encontramos el coste económico superior, el tiempo de adquisición del estudio y en caso de realizar el estudio *in vivo* la necesidad de sedación del animal. No se recomienda su utilización en *scaffolds* de tipo metálicos, ya que los rayos X pueden ser atenuados por estos metales y crean artefactos (354).

Por todo lo anteriormente explicado, en nuestro estudio se decidió complementar la valoración histológica, con la realización previa de un estudio por micro-TAC con cuantificación volumétrica asociada. Se decidió realizar tras el sacrificio del animal, por minimizar el número de pruebas a realizar, tanto por su coste económico como en tiempo, así como por evitar la radiación, sedación y traslado de los animales para la realización de la prueba, con el consiguiente estrés para los animales.

En los estudios previos, realizados por nuestro grupo en el tratamiento de defectos óseos con biovidrios, en un modelo animal similar, y monitorizados por estudio radiológico, se pudo observar la estabilidad del implante y la ausencia de migración del mismo en la mayoría de ellos. La estabilidad, como hemos mencionado anteriormente, es uno de los criterios de Shors de su triada de la osteoconducción, la cual contribuye a la formación ósea (192). También se observó que en la mayoría de materiales testados se producían el crecimiento de tejido óseo desde la periferia, y posteriormente el remodelado del hueso neoformado alrededor del defecto óseo, pudiendo observar distintas fases al realizarse de forma seriada las radiografías, y como en los grupos de control sin material persistía el defecto, dando validez al modelo de defecto crítico óseo (58–60,63).

En un trabajo realizado en el año 2010, en el que se utilizaron *scaffolds* cargados con OST en un modelo experimental similar, gracias al estudio con micro-TAC se pudo comprobar como existía también neoformación ósea que parecía ser entorno al implante, y se observó también la zona de interfase entre el hueso formado y el material como una zona bioactiva. En el mencionado estudio, se realizaron mediciones por micro-TAC a las 4 y a las 8 semanas, y en ambas mediciones se comprobó una mayor actividad osteoformativa en los implantes que contenían OST (320). Los resultados vistos por Xie, también utilizando técnicas de micro-TAC van a

favor de una mayor formación de hueso y curación del defecto, en los implantes enriquecidos con BMP-2, respecto a los que no tenían aditivos (324). El uso de células en implantes para tratar defectos óseos, ha sido también evaluado por micro-TAC, en el estudio de Gu, realizado en diáfisis cubitales de conejos con un defecto segmentario de 15 mm. En dicho estudio, a las 12 semanas de la implantación, pudo observarse como los defectos tratados con el *scaffold* y células progenitoras derivadas de tejido adiposo (Adipose-derived stem cells: ASC) presentaban una reparación completa, por tejido compacto, y se encontraban estructuralmente conectados al tejido óseo, por el contrario en los casos en los que no se utilizaron dichas células la reparación fue incompleta y no se observó dicha conexión estructural (65).

En el trabajo de Roshan-Ghias anteriormente mencionado, se propone que la formación de hueso se inicia en la proximidad del *scaffold* y que este crecimiento puede predecirse. Se observó como existían patrones de crecimiento óseo a lo largo del tiempo, en las zonas alejadas del implante existían un periodo de latencia prolongado con un crecimiento inicial muy bajo, y en cambio en las zonas próximas al material no existía casi periodo de latencia con un crecimiento inicial rápido, que luego disminuía (329). Este modelo de crecimiento, también concuerda con las observaciones realizadas por Sengers prediciendo la expansión de células estromales de la médula ósea (Human bone marrow stromal cell: HBMSC) en estructuras trabeculares óseas, tras el sembrado de HBMSC en hueso trabecular obtenido de cabezas femorales, y su posterior escaneado por micro-TAC (355).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio por micro-TAC, parecen confirmar este patrón de crecimiento, ya sugerido por los trabajos previos y concordando con lo observado en los cortes histológicos. Se ha demostrado la presencia de una zona de transición entre el hueso y el implante en su periferia que parece corresponder a la zona de bioactividad reabsorción-formación ósea, apareciendo trabéculas óseas

contorneando los límites del implante. Esta zona de mayor actividad, aparece como un marco de densidad ósea en torno al material, y se observa con claridad en todos los grupos, aunque algo menos definida en el grupo del *scaffold* sin aditivos, esto concuerda con las observaciones histológicas, donde el marco fibroso era mayor en este grupo y disminuía a favor de la formación ósea en el resto. Por otro lado, se pudo comprobar en la zona periférica del implante, fenómenos de reabsorción, que sería de tipo centrípeto, lo cual se demuestra por una menor densidad en la zona periférica de los implantes. En el estudio de Miño-Fariña, realizado en un modelo experimental similar, utilizando como material un cemento óseo macroporoso de fosfato cálcico, mediante estudio radiográfico, pudo objetivarse un resorción de la zona periférica del implante mayor a la observada en otras zona, siguiendo dicho patrón centrípeto (64). De igual forma, en otro trabajo de nuestro grupo de investigación, pudo verse durante el estudio radiológico dicho patrón de reabsorción y crecimiento (59).

### **Análisis volumétrico**

Además del micro-TAC de alta resolución, se realizó el análisis cuantitativo mediante el uso de software (Vivoquant 2.0®) de procesado de los datos obtenidos por esta prueba, con el que se cuantificó el porcentaje de volumen óseo respecto al volumen total alrededor del *scaffold* (Bone volumen / Total volumen: BV/TV). Esto se realizó, principalmente, para obtener no solo un estudio de imagen cualitativo, sino resultados cuantitativos que permitiesen la comparación entre los grupos y entre otros posibles materiales. Esta información cuantitativa, a pesar del incremento del coste, no podía obtenerse mediante la radiografía simple tradicional, o el TAC convencional, que habían sido utilizados en estudios previos (58–60,63).

Hounsfield, galardonado con el premio Nobel por su descubrimiento de la tomografía axial, describe la calibración cuantitativa de esta prueba en unidades Hounsfield. El valor de 0 Hu corresponde al agua, 40 Hu corresponde a tejido

muscular, el aire son -1000 Hu y el hueso va de 50 Hu a 2500 Hu, en función del tejido óseo estudiado. Con lo que se permite valorar la densidad ósea mediante un TAC de forma objetiva y cuantitativa (318,356). El desarrollo de técnicas más avanzadas de tomografía y el análisis de las imágenes obtenidas, mediante herramientas de software han permitido medir de forma cuantitativa, el volumen de un tejido, permitiendo con ello el estudio volumétrico óseo, siendo utilizado incluso en estudios con en humanos (357). Con las técnicas de computación volumétrica (VCT), se determinó que se conseguía una resolución entre 8 y 16 veces superior a la del TAC estándar (358).

Su utilización en el campo de la ingeniería de tejidos permite la cuantificación y comparación entre estudios y materiales distintos, así como poder cuantificar el proceso de formación ósea si se realizan mediciones en distintos momentos, como realizó Roshan-Ghias en el estudio mencionado anteriormente (329). Utilizó la fracción de volumen óseo (Bone volumen fraction: BVF), para esta cuantificación, la cual demostró que dependía de la porosidad y del área de superficie del implante. Con esto no solo consiguió una forma de medir los resultados de formación ósea de forma objetiva, sino también valorar como características del implante influían en la osteoformación. En el único estudio realizado con micro-TAC y cálculo volumétrico por nuestro grupo, se obtuvo información acerca del BV/TV en un modelo experimental similar y un *scaffold* con y sin carga de osteostatina. En dicho estudio se pudo cuantificar y confirmar el mayor efecto osteoinductor de la OST (320), lo cual está en relación con nuestros hallazgos.

En nuestro estudio aparte del escaneado por microtomografía de rayos X de alta resolución, las imágenes obtenidas fueran tratadas para realizar dicho análisis. Mediante el cálculo volúmetrico porcentual: BV/TV, se obtuvo una mayor actividad respecto al *scaffold* no enriquecido (15% BV/TV), si al *scaffold* se cargaba osteostatina

(28 % BV/TV) o CMH (26% BV/TV) y todavía aumentaba más si se añadía ambos dos (35% BV/TV), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados están en concordancia, con lo ya comentado sobre los resultados obtenidos tanto a nivel histológico como en el estudio del micro-TAC, y permiten plasmar de una manera cuantitativa, las observaciones cualitativas.

Con estos datos, se puede confirmar los estudios *in vitro*, ya realizados en nuestro *scaffold* (biovidrio tridimensional meso-macroporoso enriquecido con zinc), donde se observó que al ser cargados de osteostatina y células progenitoras mesenquimales humanas, se aumenta el efecto que podían tener la OST y las hMSC por separado. Pudo comprobarse como mejoraban el desarrollo y diferenciación osteogénica, y abrir la puerta para el estudio, más amplio, de la relación de sinergia del zinc y la OST al potenciar el efecto de las hMSC en el crecimiento óseo (316). Los resultados obtenidos *in vivo* en el presente trabajo, permiten confirmar y cuantificar ese efecto de potenciación, y contribuir a estimular su desarrollo en el campo de la ingeniería de tejidos. Como ya se ha mencionado anteriormente, una debilidad del presente estudio, radica en el pequeño tamaño muestral en cada grupo, que se exige actualmente buscando la reducción, al máximo, del número de animales experimentales para el estudio *in vivo*, lo que puede condicionar estas observaciones.

# Conclusiones

1. La combinación del vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) con la composición (mol %)  $82.2\text{SiO}_2-10.3\text{CaO}-3.3\text{P}_2\text{O}_5-4.2\text{ZnO}$ , enriquecido con células humanas mesenquimales (MSC) y cargado con osteostatina (OST), formando un *scaffold* 3D, ha demostrado tener una biocompatibilidad adecuada en el modelo experimental desarrollado.

2. El *scaffold* cargado con OST y enriquecido con MSC es capaz de generar la curación y regeneración ósea cuando se implanta en un defecto óseo crítico como el del modelo experimental desarrollado.

3. La reparación ósea del defecto óseo crítico creado en este estudio experimental es superior con la implantación del *scaffold* con MSC y OST, que con la implantación del *scaffold* de forma aislada, y también superior a su implantación en combinación única con osteostatina o con células mesenquimales humanas.

4. El *scaffold* utilizado resulta adecuado para su manejo quirúrgico.

# Resúmenes

## 1. Resumen

La ingeniería de tejidos constituye actualmente un campo prometedor, para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan la creación de sustitutos óseos y puedan ser utilizados para el tratamiento de defectos óseos. El uso de andamiajes para la creación de estos materiales ha experimentado grandes avances en las últimas décadas, pudiendo convertirse en una alternativa al *gold standard* actual que sigue siendo el injerto autólogo de hueso, con las limitaciones que ello implica. El sustitutivo óseo ideal debe tener capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora.

Las cerámicas han sido utilizadas, durante décadas, en el campo de la traumatología y la ortopedia por sus adecuadas capacidades de biocompatibilidad y osteoconducción, si bien no poseen *per se* la capacidad osteogénica y su capacidad osteoinductora es limitada. Por otro lado, los factores de crecimiento y en concreto la osteostatina, poseen capacidad osteoinductora contribuyendo a la diferenciación celular hacia líneas osteoformadoras, existiendo estudios en los que se demuestra como mejoran los resultados, tanto *in vivo* como *in vitro*, cuando se incorporan a distintos materiales que buscan la regeneración ósea. De forma similar, el uso en la ingeniería tisular de células mesenquimales de origen variado, ha demostrado aportar la capacidad de osteogénesis, si bien al igual que los factores de crecimiento carecen de función estructural. Por todo ello, la creación de un biomaterial, que reúna los 4 vértices del diamante propuesto por Giannoudis (osteogénesis, osteoinducción, osteoconducción y soporte mecánico), en los que se basa la regeneración ósea, podría convertirse en un sustitutivo óseo ideal.

En el presente estudio, describimos la utilización de vidrios mesoporosos bioactivos con la siguiente composición, 82.2%SiO<sub>2</sub>-10.3%CaO-3.3%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-4.2%ZnO (mol %). Fueron sintetizados utilizando la técnica de autoensamblaje inducido por evaporación (*evaporation induced self-assembly*: EISA), y los *scaffolds* tridimensionales, creados a partir de dicho material, mediante técnicas de prototipado rápido de 7 mm Ø x 12 mm de altura. Creándolos con una microestructura y arquitectura porosa controlada, y la forma macroscópica deseada para el tratamiento del defecto. Las células mesenquimales elegidas para su sembrado en estos andamiajes y su posterior implantación en el modelo animal, fueron células mesenquimales humanas (MSC). Se cargó el implante con osteostatina (OST), que se corresponde con el grupo de las proteínas relacionadas con la hormona paratiroidea. Ya se habían realizado trabajos *in vivo*, estudiando el uso de este material enriquecido con OST en el tratamiento de los defectos óseos, con prometedores resultados. Igualmente se había comprobado de forma *in vitro*, la actividad sinérgica del implante con zinc cargado con OST y las MSC, para la regeneración ósea.

Para comprobar el potencial de regeneración ósea *in vivo* del scaffold, se realizó un defecto óseo crítico de 7,5 mm Ø y 12 mm de profundidad en la cara externa del cóndilo de ambos fémures en 12 conejas adulta de raza Nueva Zelanda. El defecto se realizó, mediante el abordaje lateral del fémur, con una broca motorizada se creó el defecto y posteriormente se rellenó con el *scaffold* a estudio. Se hicieron 4 grupos: *scaffold* sin aditivos, *scaffold* + MSC, *scaffold* + OST, *scaffold* + MSC + OST. Los animales fueron mantenidos en estabulamiento controlado y sacrificados a los 3 meses de la intervención. Tras la cual, se extrajo el tercio distal de ambos fémures para su estudio histológico y radiológico mediante micro-TAC y cálculo volumétrico.

Una vez analizados los resultados obtenidos, pudimos comprobar el relleno del defecto óseo de forma completa en todos los casos. En todos ellos se comprobó la

formación de un marco alrededor del implante y la creación de hueso neoformado en torno al mismo, lo cual pudo observarse tanto de forma histológica como radiológica. Quedó demostrada también su biocompatibilidad y capacidad de osteointegración, al crecer el hueso sobre su superficie, y la capacidad de degradación controlada del implante. Por último, pudo comprobarse como mejoraban el desarrollo y diferenciación osteogénica, debido a la relación de sinergia del zinc y la OST al potenciar el efecto de las hMSC en el crecimiento óseo.

Finalmente, se puede concluir que el *scaffold* estudiado constituye un material adecuado para el desarrollo de sustitutos óseos y que cumple con los requisitos para ello. Los resultados obtenidos *in vivo* en el presente trabajo, permiten confirmar y cuantificar el efecto sinérgico de la OST y las MSC de potenciación de la regeneración ósea, y contribuir a estimular su desarrollo en el campo de la ingeniería de tejidos.

## **2. Summary**

Tissue engineering is currently a promising field for the development of new strategies that allow the creation of bone substitutes and can be used for the treatment of bone defects. The use of scaffolds to create these materials has undergone great advances in recent decades, being able to become an alternative to the current gold standard that continues to be the autologous bone graft, with the limitations that this implies. The ideal bone substitute should have the properties of osteogenicity, osteoinductivity and osteoconductivity .

Ceramics have been used for decades in the field of traumatology and orthopedics due to their adequate biocompatibility and osteoconduction capabilities, although they do not have osteogenic capacity *per se* and their osteoinductive capacity

is limited. On the other hand, growth factors, and specifically osteostatin, have osteoinductive capacity, contributing to cell differentiation towards bone-forming lines, and there are studies that show how results improve, both *in vivo* and *in vitro*, when they are incorporated into different materials that seek bone regeneration. Similarly, the use in tissue engineering of mesenchymal cells of varied origin has been shown to provide the capacity for osteogenesis, although, like growth factors, they lack structural function. Therefore, the creation of a biomaterial that brings together the 4 vertices of the diamond proposed by Giannoudis (osteogenesis, osteoinduction, osteoconduction and mechanical support), on which bone regeneration is based, could become an ideal bone substitute.

In the present study, we describe the use of bioactive mesoporous glasses with the following composition, 82.2% SiO<sub>2</sub>–10.3% CaO – 3.3% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–4.2% ZnO (mol%). They were synthesized using the evaporation induced self-assembly (EISA) technique, and the three-dimensional scaffolds, created from said material, using rapid prototyping techniques 7 mm Ø and 12 mm height. Creating them with a controlled porous microstructure and architecture, and the desired macroscopic shape for the treatment of the defect. The mesenchymal cells chosen to be seeded in these scaffolds and their subsequent implantation in the animal model were human mesenchymal cells (MSC). The implant was loaded with osteostatin (OST), which corresponds to the group of proteins related to parathyroid hormone. *In vivo* work had already been carried out, studying the use of this OST-enriched material in the treatment of bone defects, with promising results. Likewise, the synergistic activity of the implant with zinc loaded with OST and MSCs for bone regeneration had been verified *in vitro*.

To check the scaffold's potential for bone regeneration *in vivo*, a 7.5 mm Ø and 12 mm deep critical bone defect was made on the external face of the condyle of both femurs in 12 adult New Zealand breed female rabbits. The defect was made during a

surgical intervention, by means of the lateral approach of the femur, with a motorized drill the defect was created and later it was filled with the scaffold under study. 4 groups were made: scaffold without additives, scaffold + MSC, scaffold + OST, scaffold + MSC + OST. The animals were kept in controlled housing and sacrificed 3 months after the intervention. After which, the distal third of both femurs was extracted for histological and radiological study using micro-CT and volumetric calculation.

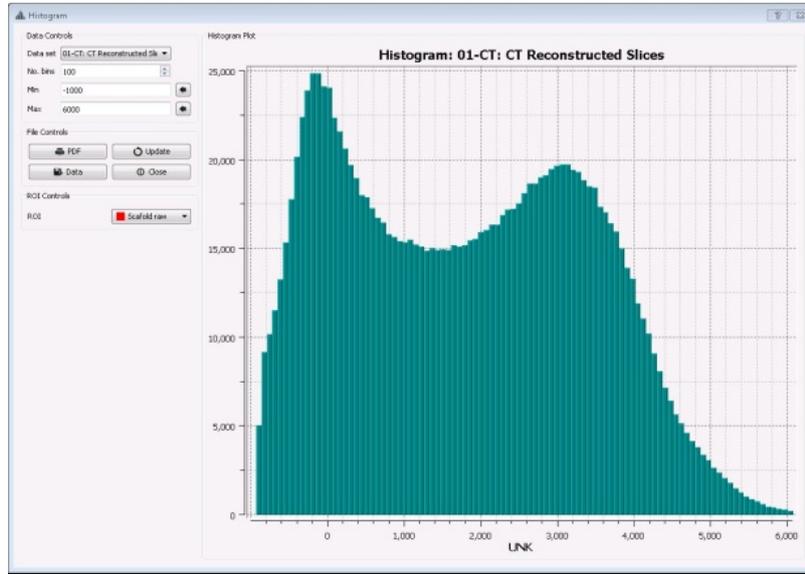
Once the results obtained were analyzed, we were able to verify the regeneration of the bone defect completely in all cases. In all of them, the formation of a frame around the implant and the creation of newly formed bone around it was verified, which could be observed both histologically and radiologically. The biocompatibility and capacity for osseointegration, as the bone grows on its surface, and the capacity for controlled degradation of the implant were also demonstrated. Lastly, it was possible to verify how osteogenic development and differentiation were improved, due to the synergy relationship between zinc and OST by enhancing the effect of hMSC on bone growth.

Finally, it can be concluded that the studied scaffold constitutes a suitable material for the development of bone substitutes. The results obtained *in vivo* in the present work allow us to confirm and quantify the synergistic effect of OST and MSC to enhance bone regeneration, and contribute to stimulate its development in the field of tissue engineering

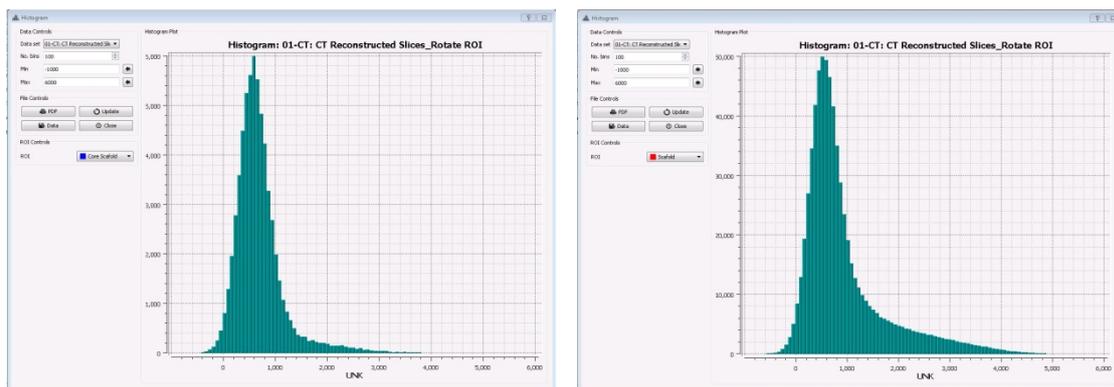
# Anexo

# 1. Histogramas

## Scaffold

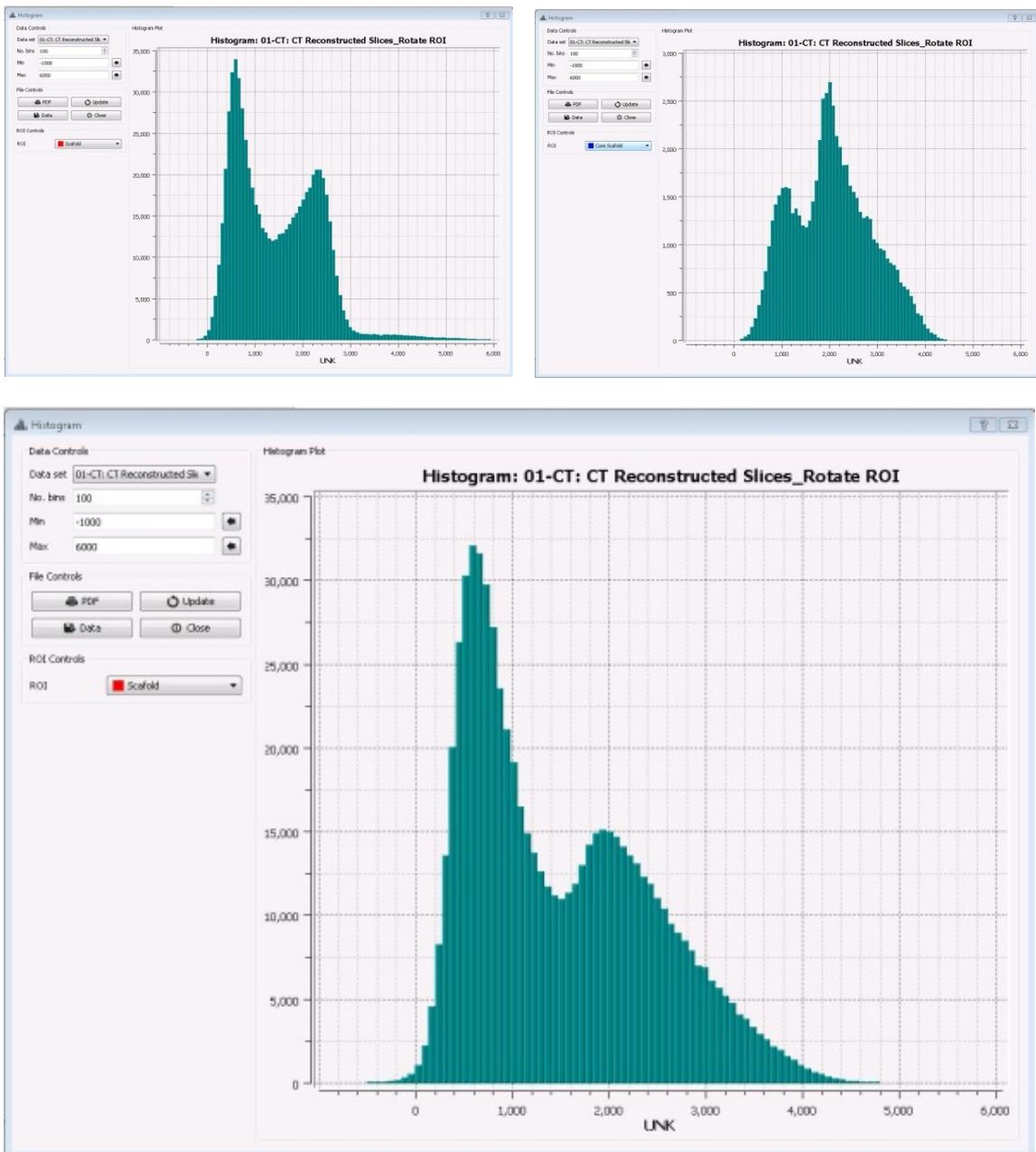


**Imagen 57:** Histograma que corresponde al *scaffold* solo, sin haber sido implantado. Se observan dos áreas de densidades, la primera hasta los 1500 HU y otra de los 1500 a los 6000, con un pico máximo en las 3000 HU.

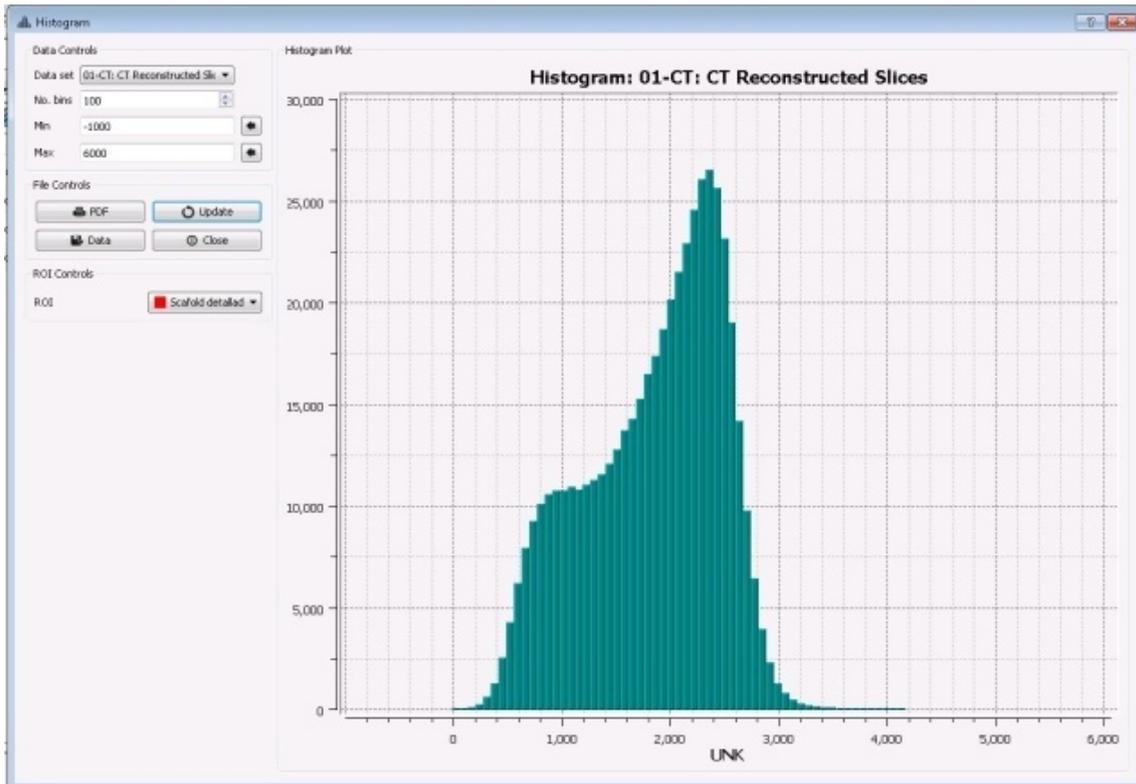


**Imagen 58:** Histogramas que corresponden a las piezas a los que se les implantó el *scaffold* sin aditivos, en a los fémures distales izquierdos de los animales 5,6 y 7. Se observa, en ambos, un área de máxima densidad próxima a las 1000 HU.

## Scaffold + MSC

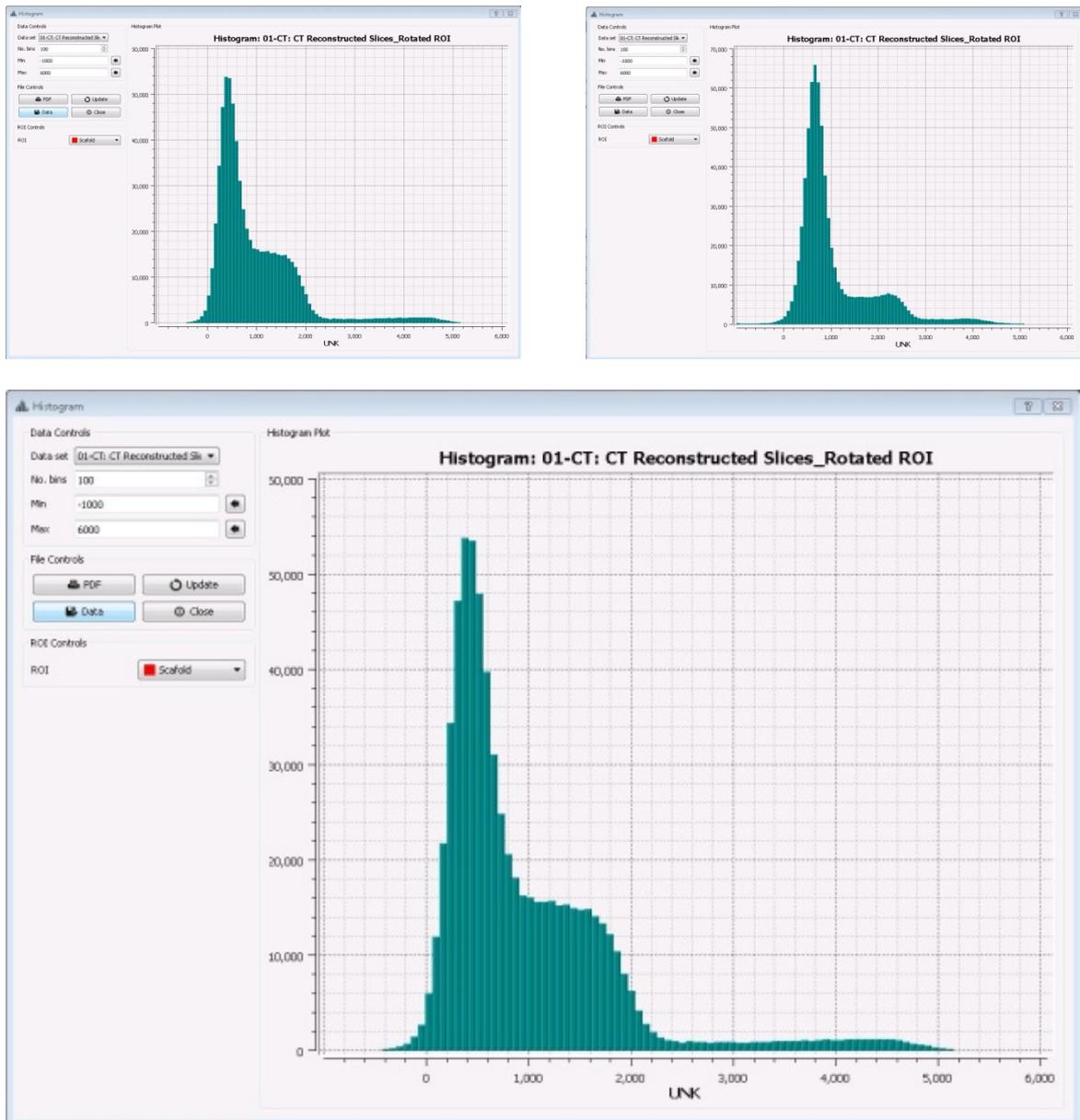


**Imagen 59:** Histogramas que corresponden a las piezas a los que se les implantó el *scaffold* con MSC, en a los fémures distales izquierdos de los animales 1,2 y 3. Se observa, en todos ellos, dos áreas de mayor densidad próxima a las 1000 HU y a las 2000 HU.

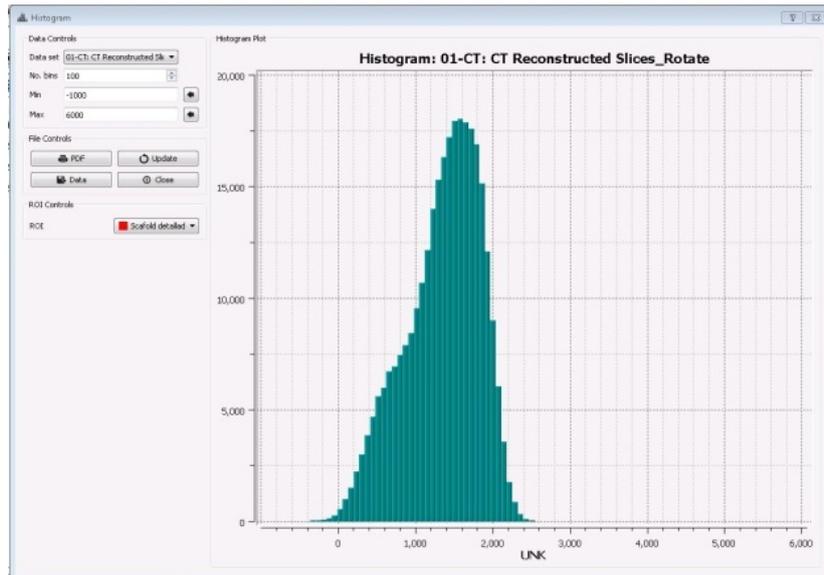


**Imagen 60:** Histograma que corresponde al volumen del *scaffold* con MSC analizado de forma detallada, calculando un volumen estimado de 195,858 mm<sup>3</sup>. Se observan unas áreas de mayor densidad en 1000 HU y en 2500 HU.

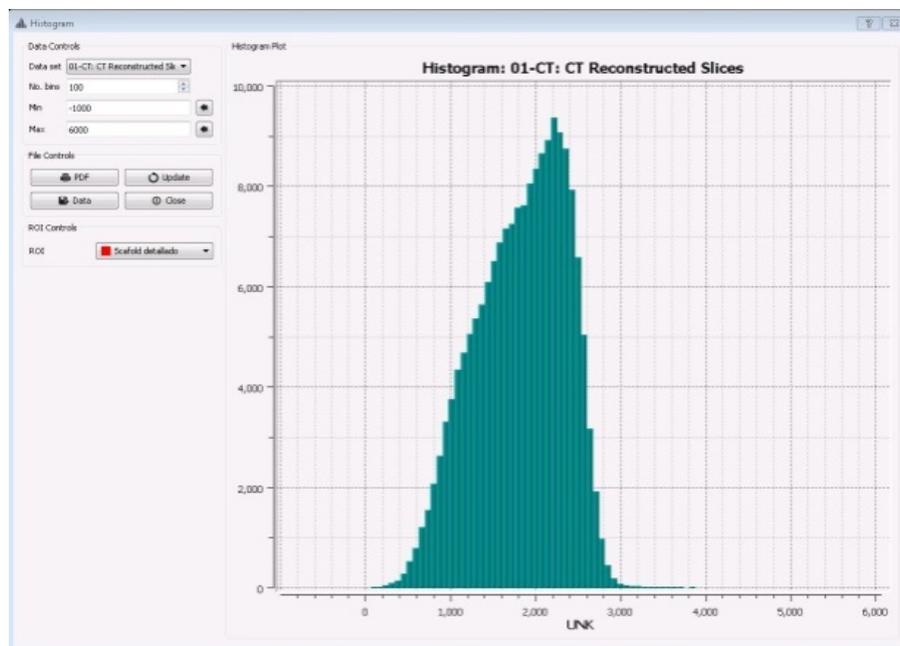
## Scaffold + OST



**Imagen 61:** Histogramas que corresponden a las piezas a los que se les implantó el *scaffold* con OST, en a los fémures distales izquierdos de los animales 9 y 10, y en el fémur derecho del 1. Se observa, en todos ellos, un área de mayor densidad próxima a las 1000 HU y una segunda área de menor densidad próxima a las 2000 HU.

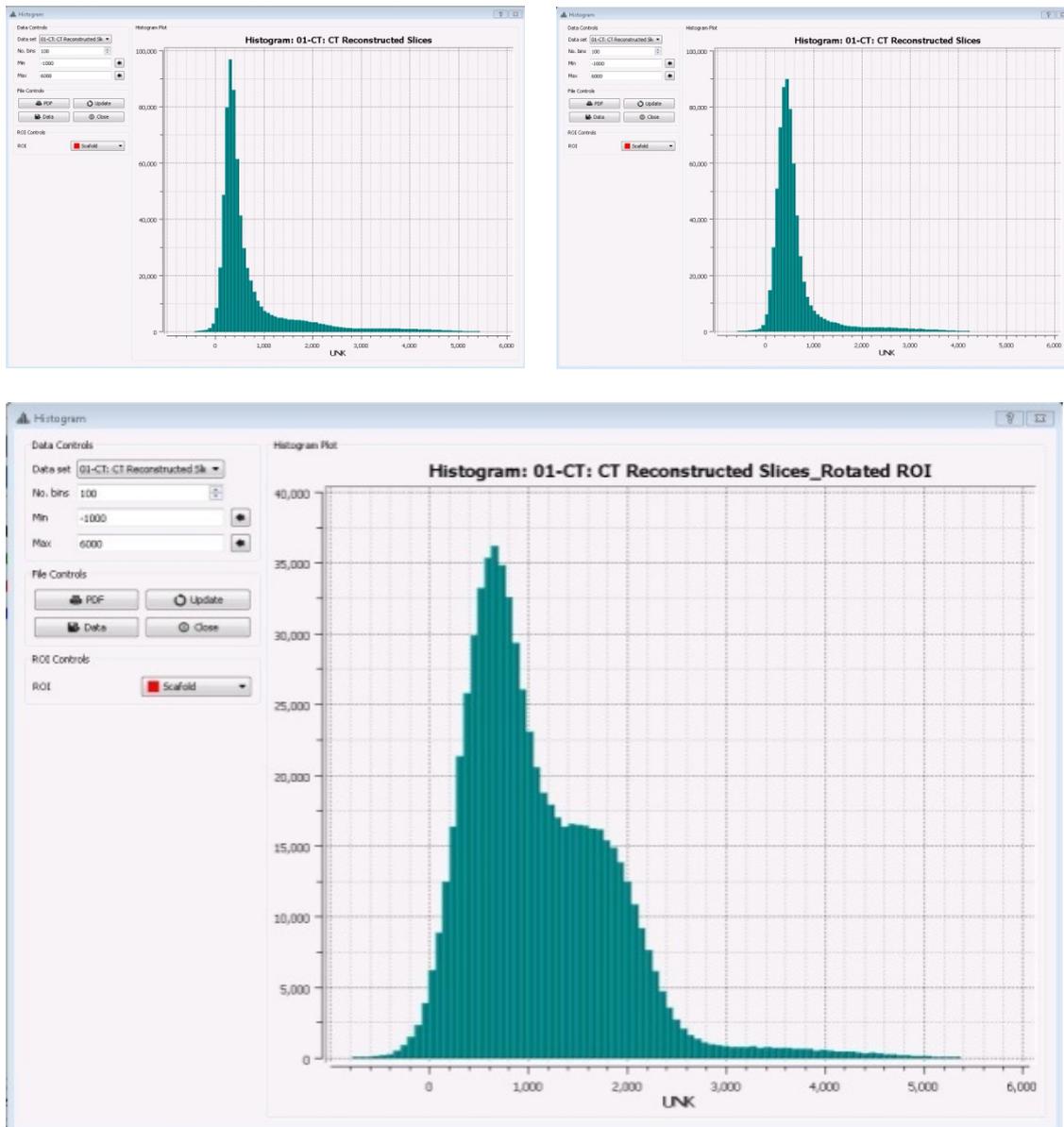


**Imagen 62:** Histograma que corresponde al volumen del *scaffold* con OST analizado de forma detallada, calculando un volumen estimado de 116,801 mm<sup>3</sup>. Se observan unas áreas de mayor densidad en 500 HU y en 1750 HU. Corresponde al fémur izquierdo del animal 9.

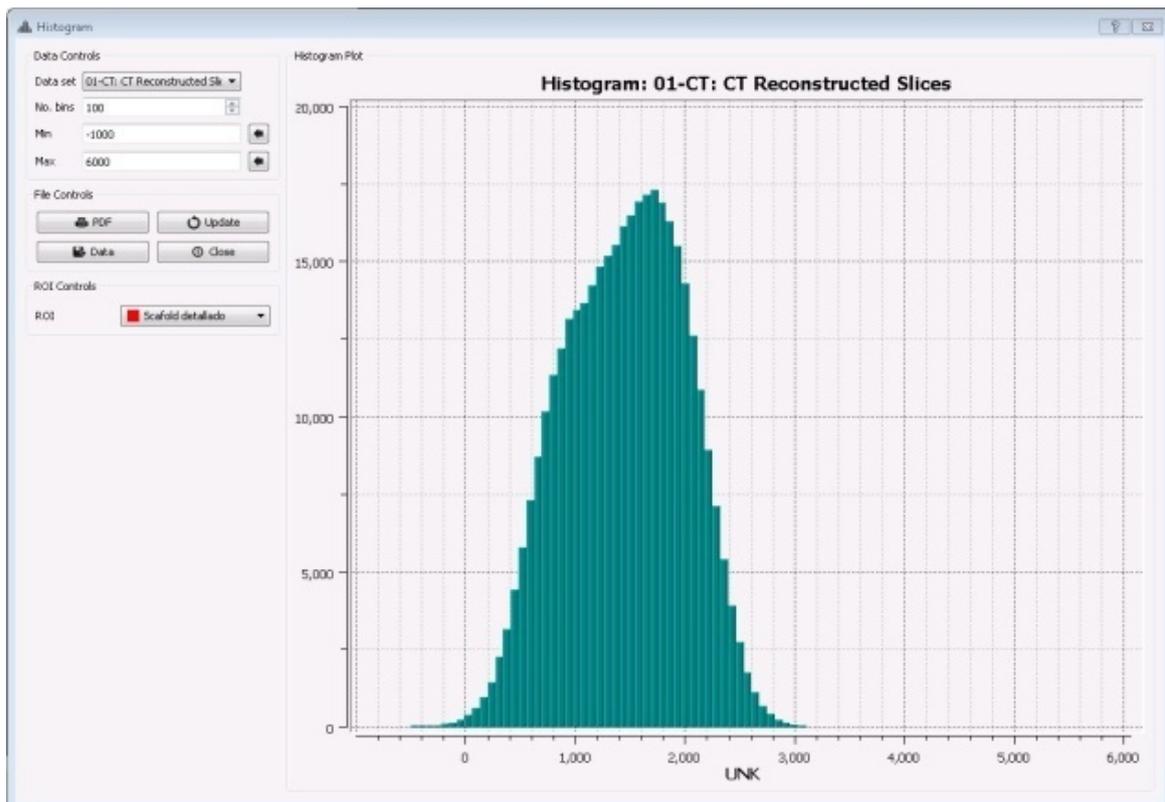


**Imagen 63:** Histograma que corresponde al volumen del *scaffold* con OST analizado de forma detallada, calculando un volumen estimado de 69,688 mm<sup>3</sup>. Se observa un área de mayor densidad entre 1000 HU y las 2500 HU. Corresponde al fémur derecho del animal 1.

## **Scaffold + MSC + OST**



**Imagen 64:** Histogramas que corresponden a las piezas a los que se les implantó el *scaffold* + MSC + OST, en a los fémures distales derechos de los animales 5,10 y 12. Se observa, en todos ellos, un área de mayor densidad próxima a las 1000 HU y una segunda área de menor densidad próxima a las 2000 HU.



**Imagen 64:** Histograma que corresponde al volumen del *scaffold* + MSC + OST analizado de forma detallada, calculando un volumen estimado de 371,955 mm<sup>3</sup>. Se observa un área de mayor densidad entre 1000 HU y las 2500 HU. Corresponde al fémur derecho del animal 12.

# Bibliografía

1. Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1009–14.
2. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*. 2009;25(6):1539–60.
3. Vallet-Regí M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chim*. 2010 Jan 1;13(1–2):174–85.
4. Gonzalez Macías J, Serrano Figueras S. Enfermedades Óseas. In: Farreras P Ed *Medicina Interna*. 1995. p. 1064–89.
5. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996;45:371–86.
6. Buck DW, Dumanian GA. Bone Biology and Physiology. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Jun;129(6):1314–20.
7. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976;47:327–59.
8. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(1):32–6.
9. Hoshi K, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone*. 1999 Dec;25(6):639–51.
10. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*. 2000 Aug;21(4):393–411.
11. Decker B, Bartels H, Decker S. Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic. *Anat Rec*. 1995 Jul;242(3):310–20.
12. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE.

- Vascular Pericytes Express Osteogenic Potential In Vitro and In Vivo. *J Bone Miner Res.* 1998 May 1;13(5):828–38.
13. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest.* 1993 May 1;91(5):1888–96.
  14. Aubin J, Liu F. The osteoblasts lineage. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. *Principles of bone biology.* San Diego: Academic Press; 1996. p. 51–67.
  15. HAM AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg Am.* 1952 Jul;24 A(3):701–28.
  16. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993;53(Suppl 1):102–6.
  17. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec 3;8 Suppl 2(S2):S505-10.
  18. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):165–76.
  19. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999 May 3;145(3):527–38.
  20. Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury.* 2011 Jun;42(6):569–73.
  21. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone.* 1992;13 Suppl 1:S3-6.
  22. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Feb;(263):30–48.
  23. Osterhoff G, Morgan EF, Shefelbine SJ, Karim L, McNamara LM, Augat P. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury.* 2016 Jun;47 Suppl 2(Suppl 2):S11-20.
  24. Yavropoulou MP, Yovos JG. The molecular basis of bone mechanotransduction.

- J Musculoskelet Neuronal Interact. 2016;16(3):221–36.
25. Hooper G. Bone as a tissue. In: Hughes S, Benson M, Colton C, editors. The principles and practice of musculoskeletal surgery and fractures. London: Churchill Livingstone; 1987. p. 1–14.
  26. Karaplis A. Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. Principles of Bone Biology. San Diego; 2002. p. 33–58.
  27. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily During Murine Fracture Healing. *J Bone Miner Res.* 2002 Mar 1;17(3):513–20.
  28. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration : current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;9:66.
  29. Bigham-Sadegh A, Oryan A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *Int Wound J.* 2015;12(3):238–47.
  30. Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Dec;(249):265–84.
  31. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am.* 1991 Jul;73(6):832–47.
  32. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S7-21.
  33. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978 May;60-B(2):150–62.
  34. Giannoudis P V, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6.
  35. Andrzejowski P, Giannoudis P V. The ‘diamond concept’ for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol.* 2019 Dec 11;20(1):21.
  36. Ballester Alfaro J, Sueiro Fernández J, Goberna Pseudo R, Domínguez

- Bermúdez J, Valero Lanau J. Regeneración ósea . Biomateriales , sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo. 2011. 11–26 p.
37. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! J Orthop Trauma. 2017;31(10):S20–2.
  38. Cornell CN. Regeneration of bone in critical defects. J Orthop Trauma. 13(7):523–4.
  39. Blokhuis TJ. Management of traumatic bone defects: Metaphyseal versus diaphyseal defects. Injury. 2017;48:S91–3.
  40. de Jong JJ, Heyer FL, Arts JJ, Poeze M, Keszei AP, Willems PC, et al. Fracture Repair in the Distal Radius in Postmenopausal Women: A Follow-Up 2 Years Postfracture Using HRpQCT. J Bone Miner Res. 2016 May;31(5):1114–22.
  41. Keating JF, Simpson AHRW, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. J Bone Jt Surg - Ser B. 2005 Feb;87(2):142–50.
  42. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. J Craniofac Surg. 1990 Jan;1(1):60–8.
  43. Nauth A, McKee MD, Einhorn TA, Watson JT, Li R, Schemitsch EH. Managing bone defects. J Orthop Trauma. 2011 Aug;25(8):462–6.
  44. Hinsche AF, Giannoudis P V., Matthews SE, Smith RM. Spontaneous healing of large femoral cortical bone defects: Does genetic predisposition play a role? Acta Orthop Belg. 2003 Oct;69(5):441–6.
  45. Blick SS, Brumback RJ, Lakatos R, Poka A, Burgess AR. Early prophylactic bone grafting of high-energy tibial fractures. Clin Orthop Relat Res. 1989;(240):21–41.
  46. Haines NM, Lack WD, Seymour RB, Bosse MJ. Defining the Lower Limit of a “Critical Bone Defect” in Open Diaphyseal Tibial Fractures. J Orthop Trauma. 2016 May;30(5):e158-63.
  47. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. Bone.

- 2015 Jan 1;70:93–101.
48. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cells Mater.* 2007;13:1–10.
  49. Ball AN, Donahue SW, Wojda SJ, McIlwraith CW, Kawcak CE, Ehrhart N, et al. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis. *J Orthop Res.* 2018;36(6):1559–72.
  50. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegler ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials.* 2009;30(12):2149–63.
  51. Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials.* 2004;25(9):1697–714.
  52. Hurley L, Stinchfield F, Bassett A, Lyon W. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am.* 1959 Oct;41 A:1243–54.
  53. Tsuang YH, Yang RS, Chen PQ, Liu TK. Experimental allograft in spinal fusion in dogs. *J Formos Med Assoc.* 1989 Oct;88(10):989–94.
  54. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone.* 2015 Jan;70:73–86.
  55. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res.* 2012 Nov;1(11):297–309.
  56. Harrison SM, Whitton RC, Kawcak CE, Stover SM, Pandy MG. Evaluation of a subject-specific finite-element model of the equine metacarpophalangeal joint under physiological load. *J Biomech.* 2014 Jan 3;47(1):65–73.
  57. Oikarinen J. Experimental spinal fusion with decalcified bone matrix and deep-frozen allogeneic bone in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1982;162:210–8.
  58. Gil-Albarova J, Salinas AJ, Bueno-Lozano AL, Román J, Aldini-Nicolo N, García-Barea A, et al. The in vivo behaviour of a sol–gel glass and a glass-ceramic

- during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials*. 2005 Jul;26(21):4374–82.
59. Gil-Albarova J, Vila M, Badiola-Vargas J, Sánchez-Salcedo S, Herrera A, Vallet-Regi M. In vivo osteointegration of three-dimensional crosslinked gelatin-coated hydroxyapatite foams. *Acta Biomater*. 2012;8(10):3777–83.
  60. Gil-Albarova J, Garrido-Lahiguera R, Salinas AJ, Román J, Bueno-Lozano AL, Gil-Albarova R, et al. The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects. *Biomaterials*. 2004;25(19):4639–45.
  61. Gil Albarova J, Montón Martínez I, Clement J, Castiella T, Esteva F, Planell JA, et al. Desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea. Implantación subcutánea en conejos. *Mapfre Med*. 2002;13(4):252–7.
  62. Gil Albarova J, Gil Albarova R, Montón I, Clément J, Aldini-Nicolo N, Fini M, et al. Materiales biodegradables compuestos como posibles sustitutos óseos. Implantación experimental en conejos. *Patol del Apar Locomot*. 2003;1(2):101–7.
  63. Garrido Lahiguera R, Gil Albarova J, Gil Albarova R, Bueno Lozano A, Salinas Sánchez A, Melgosa Gil M, et al. Bone defect healing by using a new bioactive glass . An experimental study in rabbits . Estudio experimental en conejos de un nuevo vidrio bioactivo en la reconstrucción de defectos óseos. *Rev Española Cir Osteoartic*. 2002;37(1):125–37.
  64. Miño-Fariña N, Muñoz-Guzón F, López-Peña M, Ginebra MP, del Valle-Fresno S, Ayala D, et al. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. *Vet J*. 2009;179(2):264–72.
  65. Gu H, Xiong Z, Yin X, Li B, Mei N, Li G, et al. Bone regeneration in a rabbit ulna defect model: use of allogeneic adipose-derivedstem cells with low

- immunogenicity. *Cell Tissue Res.* 2014;358(2):453–64.
66. Galanis V, Fiska A, Kapetanakis S, Kazakos K, Demetriou T. Effect of platelet-rich plasma combined with demineralised bone matrix on bone healing in rabbit ulnar defects. *Singapore Med J.* 2017 Sep 1;58(9):551–6.
  67. de Souza LPL, Lopes JH, Ferreira F V., Martin RA, Bertran CA, Camilli JA. Evaluation of effectiveness of 45S5 bioglass doped with niobium for repairing critical-sized bone defect in in vitro and in vivo models. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2019;(October):1–12.
  68. Cowan CM, Shi Y-Y, Aalami OO, Chou Y-F, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004 May;22(5):560–7.
  69. Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, et al. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials.* 2007 Dec;28(36):5477–86.
  70. Liu G, Zhang Y, Liu B, Sun J, Li W, Cui L. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials.* 2013;34(11):2655–64.
  71. Ode A, Duda GN, Geissler S, Pauly S, Ode J-E, Perka C, et al. Interaction of age and mechanical stability on bone defect healing: an early transcriptional analysis of fracture hematoma in rat. *PLoS One.* 2014;9(9):e106462.
  72. Buckley R, Moran C, Apivatthakakul T. *AO Principles of Fracture Management.* 2018.
  73. Harris MB. Perspectives on Modern Orthopaedics Recent Developments in the Biology of Fracture Repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16(11):619–25.
  74. Giannoudis P V, Chris Arts JJ, Schmidmaier G, Larsson S. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? *Injury.* 2011 Sep;42 Suppl 2:S1-2.
  75. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: An overview of the basic science.

- Clin Orthop Relat Res. 2000;371:10–27.
76. Kenney EB, Jovanovic SA. Osteopromotion as an adjunct to osseointegration. *Int J Prosthodont.* 6(2):131–6.
  77. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(5):315–37.
  78. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2000 Jun;45(3):346–53.
  79. Tsuchiya H, Tomita K. Distraction osteogenesis for treatment of bone loss in the lower extremity. *J Orthop Sci.* 2003;8(1):116–24.
  80. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Jan;(238):249–81.
  81. Kumar G, Narayan B. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Class Pap Orthop.* 2014;523–5.
  82. Tarchala M, Harvey EJ, Barralet J. Biomaterial-Stabilized Soft Tissue Healing for Healing of Critical-Sized Bone Defects: the Masquelet Technique. *Adv Healthc Mater.* 2016 Mar;5(6):630–40.
  83. Motsitsi NS. Masquelet's Technique for Management of Long Bone Defects: From Experiment to Clinical Application. *East Cent African J Surg.* 2012;43–7.
  84. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci.* 2010 Jan 11;10(1):12–27.
  85. Makridis KG, Theocharakis S, Fragkakis EM, Giannoudis P V. Reconstruction of an extensive soft tissue and bone defect of the first metatarsal with the use of Masquelet technique: a case report. *Foot Ankle Surg.* 2014 Jun;20(2):e19-22.
  86. Wong TM, Lau TW, Li X, Fang C, Yeung K, Leung F. Masquelet technique for

- treatment of posttraumatic bone defects. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:710302.
87. Chotel F, Nguiabanda L, Braillon P, Kohler R, Bérard J, Abelin-Genevois K. Induced membrane technique for reconstruction after bone tumor resection in children: a preliminary study. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2012 May;98(3):301–8.
  88. Henrich D, Seebach C, Nau C, Basan S, Relja B, Wilhelm K, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016 Oct;10(10):E382–96.
  89. Karger C, Kishi T, Schneider L, Fitoussi F, Masquelet A-C. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2012 Feb;98(1):97–102.
  90. O'Malley NT, Kates SL. Advances on the Masquelet technique using a cage and nail construct. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2012 Feb 11;132(2):245–8.
  91. Gerber A, Gogolewski S. Reconstruction of large segmental defects in the sheep tibia using polylactide membranes. A clinical and radiographic report. *Injury*. 2002 Aug;33:43–57.
  92. Zadegan SA, Firouzi M, Nabian MH, Zanjani LO, Kamrani RS. Two-Stage Nerve Graft Using a Silicone Tube. *Front Surg*. 2015 Apr 23;2:12.
  93. Bosemark P, Perdikouri C, Pelkonen M, Isaksson H, Tägil M. The masquelet induced membrane technique with BMP and a synthetic scaffold can heal a rat femoral critical size defect. *J Orthop Res*. 2015 Apr;33(4):488–95.
  94. Lajara Marco F, Ojeda Thies C, Gómez Vallejo J. Fracturas: concepto, proceso de consolidación. Injertos y sustitutos óseos. In: *Curso COT-SECOT 2019-2021. 5ª*. Madrid: Fundación SECOT; 2018.
  95. DeBaun MR, Stahl AM, Daoud AI, Pan CC, Bishop JA, Gardner MJ, et al. Preclinical induced membrane model to evaluate synthetic implants for healing

- critical bone defects without autograft. *J Orthop Res.* 2019;37(1):60–8.
96. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Trivella G. Limb lengthening by callus distraction (callotaxis). *J Pediatr Orthop.* 1987 Mar;7(2):129–34.
  97. Gil-Albarova J, De Pablos J. Técnicas de elongación ósea. *Rev Española Cirugía Osteoartic.* 1992;27(9):243–9.
  98. Williams DF. Biomaterials and biocompatibility. *Med Prog Technol.* 1976 Jul 20;4(1–2):31–42.
  99. Hench L. Biomaterials. *Science (80- ).* 1980 May 23;208(4446):826–31.
  100. Proubasta I, Gil Mur J, Planell J. *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales.* ERGON SA; 1997.
  101. Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Jun;(207):290–305.
  102. Blitch EL, Ricotta PJ. Introduction to bone grafting. *J Foot Ankle Surg.* 35(5):458–62.
  103. Antonia Lizarbe M. Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *CiencExactFísNat (Esp).* 2007;101(1):227–49.
  104. Binyamin G, Shafi BM, Mery CM. Biomaterials: A primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg.* 2006 Nov;15(4):276–83.
  105. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007 May 1;12(3):E258-66.
  106. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1983 Apr;(174):28–42.
  107. Van Meekeren J. *Heel-en Geneeskunstige Aanmerkingen.* Commelijjn. Amsterdam; 1668.
  108. Macewen W. IV. Observations concerning transplantation of bone. Illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored. *Proc R Soc London.* 1881 Dec 31;32(212–

- 215):232–47.
109. Huntington TW. VI. Case of Bone Transference: Use of a Segment of Fibula to Supply a Defect in the Tibia. *Ann Surg.* 1905 Feb;41(2):249–51.
  110. Phemister D, Brand RA. Repair of bone in the presence of aseptic necrosis resulting from fractures, transplantations and vascular obstruction. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 May;466(5):1020–1.
  111. Bonfiglio M, Jeter W, Smith C. The immune concept: its relation to bone transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 1955 Jan 24;59(3):417–33.
  112. Burwell R, Gowland G, Dexter F. Studies in the transplantation of bone. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg Br.* 1963 Aug;45:597–608.
  113. Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R. Estado actual de los injertos óseos: Biología, función, conservación, riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad e incorporación. *Rev Esp Cir Osteoartic.* 2001;36(205):23–32.
  114. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3(3):192–5.
  115. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1999;30(4):543–52.
  116. Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S239-46.
  117. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics.* 2004;27(5):488–95.
  118. Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous bone graft: Donor sites and techniques. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2011;93(23):2227–36.
  119. Belthur M V, Conway JD, Jindal G, Ranade A, Herzenberg JE. Bone graft harvest using a new intramedullary system. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Dec;466(12):2973–80.
  120. McCall TA, Brokaw DS, Jelen BA, Scheid DK, Scharfenberger A V, Maar DC, et al. Treatment of large segmental bone defects with reamer-irrigator-aspirator

- bone graft: technique and case series. *Orthop Clin North Am.* 2010 Jan;41(1):63–73.
121. Dawson J, Kiner D, Gardner W, Swafford R, Nowotarski PJ. The reamer-irrigator-aspirator as a device for harvesting bone graft compared with iliac crest bone graft: Union rates and complications. *J Orthop Trauma.* 2014;28(10):584–90.
122. Urist MR, Dowell TA. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. *Clin Orthop Relat Res.* 61:61–78.
123. Bae HW, Zhao L, Kanim LEA, Wong P, Delamarter RB, Dawson EG. Intersubject variability and intrasubject variability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006 May;31(12):1299–308.
124. Cara J, Gil-Albarova J, Amillo S, Cañadell J. Utilización de aloinjertos masivos en la cirugía reconstructiva tumoral. *Rev Ortop y Traumatol.* 1992;36 (1):8–16.
125. Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;371:38–45.
126. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: Classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014;9(1):1–27.
127. Yazar S. Onlay Bone Grafts in Head and Neck Reconstruction. *Semin Plast Surg.* 2010 Aug;24(03):255–61.
128. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology.* 2014;14(1):15–56.
129. Dimitriou R, Tsiridis E, Carr I, Simpson H, Giannoudis P V. The role of inhibitory molecules in fracture healing. *Injury.* 2006;37(1):20–9.
130. Krishnakumar GS, Roffi A, Reale D, Kon E, Filardo G. Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. *Int Orthop.* 2017;41(6):1073–83.

131. Ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BAJ. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Jt Surg.* 2003 Aug 1;85(SUPPL. 3):34–8.
132. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone biology and clinical applications. *J Bone Jt Surg.* 2002;84(6):1032–44.
133. Dimitriou R, Giannoudis P V. Discovery and development of BMPs. *Injury.* 2005 Nov;36 Suppl 3:S28-33.
134. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science (80- ).* 1965;150(3698):893–9.
135. Yu YY, Lieu S, Lu C, Miclau T, Marcucio RS, Colnot C. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. *Bone.* 2010 Mar;46(3):841–51.
136. Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, et al. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng - Part A.* 2011 May 1;17(9–10):1389–99.
137. Keskin DS, Tezcaner A, Korkusuz P, Korkusuz F, Hasirci V. Collagen-chondroitin sulfate-based PLLA-SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(18):4023–34.
138. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2002 Dec 1;84(12):2123–34.
139. Giannoudis P V, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury.* 2005 Nov;36 Suppl 3:S47-50.
140. Simpson AHRW, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2006 Jun;88(6):701–5.
141. Prisell PT, Edwall D, Lindblad JB, Levinovitz A, Norstedt G. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcif Tissue Int.* 1993

- Sep;53(3):201–5.
142. Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K, et al. Regulation of Osteoblast , Chondrocyte , and Osteoclast Functions by Fibroblast Growth Factor ( FGF ) -18 in Comparison with Regulation of Osteoblast , Chondrocyte , and Osteoclast Functions by Fibroblas. *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7493–500.
  143. Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science.* 2000 Sep 1;289(5484):1498–500.
  144. Carlisle E, Fischgrund JS. Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine J.* 5(6 Suppl):240S-249S.
  145. Robinson Y, Heyde CE, Tschöke SK, Mont MA, Seyler TM, Ulrich SD. Evidence supporting the use of bone morphogenetic proteins for spinal fusion surgery. Vol. 5, *Expert Review of Medical Devices.* 2008. p. 75–84.
  146. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000.* 2006;41:48–72.
  147. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Feb;90 Suppl 1:48–54.
  148. Daniels T, DiGiovanni C, Lau JTC, Wing K, Younger A. Prospective clinical pilot trial in a single cohort group of rhPDGF in foot arthrodeses. *Foot ankle Int.* 2010 Jun;31(6):473–9.
  149. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-rich plasma: A milieu of bioactive factors. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2012 Mar;28(3):429–39.
  150. Di Matteo B, Filardo G, Kon E, Marcacci M. Platelet-rich plasma: evidence for the treatment of patellar and Achilles tendinopathy—a systematic review. *Musculoskelet Surg.* 2015 Apr 1;99(1):1–9.
  151. Le ADK, Enweze L, DeBaun MR, Dragoo JL. Platelet-Rich Plasma. *Clin Sports*

- Med. 2019;38(1):17–44.
152. El Backly RM, Zaky SH, Muraglia A, Tonachini L, Brun F, Canciani B, et al. A platelet-rich plasma-based membrane as a periosteal substitute with enhanced osteogenic and angiogenic properties: a new concept for bone repair. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jan;19(1–2):152–65.
  153. McLaughlin M, Gagnet P, Cunningham E, Yeager R, D’Amico M, Guski K, et al. Allogeneic platelet releasate preparations derived via a novel rapid thrombin activation process promote rapid growth and increased BMP-2 and BMP-4 expression in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7183734.
  154. Casati L, Celotti F, Negri-Cesi P, Sacchi MC, Castano P, Colciago A. Platelet derived growth factor (PDGF) contained in Platelet Rich Plasma (PRP) stimulates migration of osteoblasts by reorganizing actin cytoskeleton. *Cell Adh Migr*. 2014;8(6):595–602.
  155. Mariani E, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, et al. Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro *Clinical microbiology and vaccines*. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):149.
  156. Roffi A, Di Matteo B, Krishnakumar GS, Kon E, Filardo G. Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. *Int Orthop*. 2017;41(2):221–37.
  157. Perut F, Filardo G, Mariani E, Cenacchi A, Pratelli L, Devescovi V, et al. Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytherapy*. 2013 Jul;15(7):830–9.
  158. Wojda SJ, Donahue SW. Parathyroid hormone for bone regeneration. Vol. 36, *Journal of Orthopaedic Research*. John Wiley and Sons Inc.; 2018. p. 2586–94.
  159. Chiavistelli S, Giustina A, Mazziotti G. Parathyroid hormone pulsatility:

- physiological and clinical aspects. *Bone Res.* 2015;3:14049.
160. Potts JT, Kronenberg HM, Rosenblatt M. Parathyroid hormone: chemistry, biosynthesis, and mode of action. *Adv Protein Chem.* 1982;35:323–96.
  161. Karaplis AC, Goltzman D. PTH and PTHrP Effects on the Skeleton. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000;1(4):331–41.
  162. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007 Jun;40(6):1434–46.
  163. Pacifici R. Role of T cells in the modulation of PTH action: physiological and clinical significance. *Endocrine.* 2013 Dec;44(3):576–82.
  164. Hamann C, Picke A-K, Campbell GM, Balyura M, Rauner M, Bernhardt R, et al. Effects of parathyroid hormone on bone mass, bone strength, and bone regeneration in male rats with type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology.* 2014 Apr;155(4):1197–206.
  165. Tsunori K, Sato S, Hasuike A, Manaka S, Shino H, Sato N, et al. Effects of intermittent administration of parathyroid hormone on bone augmentation in rat calvarium. *Implant Dent.* 2015 Apr;24(2):142–8.
  166. Daugaard H, Elmengaard B, Andreassen T, Bechtold J, Lamberg A, Soballe K. Parathyroid hormone treatment increases fixation of orthopedic implants with gap healing: A biomechanical and histomorphometric canine study of porous coated titanium alloy implants in cancellous bone. *Calcif Tissue Int.* 2011 Apr;88(4):294–303.
  167. Pérez R, Sanchez-Salcedo S, Lozano D, Heras C, Esbrit P, Vallet-Regí M, et al. Osteogenic effect of ZnO-mesoporous glasses loaded with osteostatin. *Nanomaterials.* 2018;8(8):592.
  168. Esbrit P, Alcaraz MJ. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol.* 2013 May 15;85(10):1417–23.
  169. Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ, et

- al. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107–111]. *Endocrinology*. 1991;129(6):3424–6.
170. Cornish J, Callon KE, Lin C, Xiao C, Moseley JM, Reid IR. Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res*. 1999 Jun;14(6):915–22.
171. Lozano D, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Alvarez-Arroyo MV, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology*. 2009 May;150(5):2027–35.
172. Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M, Gómez-Barrena E, et al. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater*. 2010;6(3):797–803.
173. Doadrio JC, Salinas AJ, Esbrit P, Lozano D, Vallet-Regí M, Manzano M, et al. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater*. 2009;6(3):797–803.
174. Lozano D, Trejo CG, Gómez-Barrena E, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, et al. Osteostatin-loaded onto mesoporous ceramics improves the early phase of bone regeneration in a rabbit osteopenia model. *Acta Biomater*. 2012;8(6):2317–23.
175. Salinas AJ, Esbrit P, Vallet-Regí M. A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. *Biomater Sci*. 2013;1(1):40–51.
176. Guerado E, Cerván AM, Ortega JA, Rodríguez-Solera M, Andrades JA, Zamora P, et al. Diseño de un programa de investigación sobre utilización de terapia celular y BMP en artrodesis lumbar. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2010 May;54(SUPPL. 1):11–8.
177. Pountos I, Georgouli T, Kontakis G, Giannoudis P V. Efficacy of minimally invasive techniques for enhancement of fracture healing: Evidence today. *Int*

- Orthop. 2010 Jan;34(1):3–12.
178. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(395):66–80.
  179. Patterson TE, Kumagai K, Griffith L, Muschler GF. Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Feb;90 Suppl 1:111–9.
  180. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001;7(6):259–64.
  181. Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X, Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 May;26(5):613–24.
  182. Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol.* 2004 Apr;12(3–4):311–9.
  183. Dawson JI, Kanczler J, Tare R, Kassem M, Oreffo ROC. Concise review: bridging the gap: bone regeneration using skeletal stem cell-based strategies - where are we now? *Stem Cells.* 2014 Jan;32(1):35–44.
  184. Orciani M, Fini M, Di Primio R, Mattioli-Belmonte M. Biofabrication and bone tissue regeneration: Cell source, approaches, and challenges. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5(MAR):1–15.
  185. Buschmann J, Welti M, Hemmi S, Neuenschwander P, Baltes C, Giovanoli P, et al. Three-dimensional co-cultures of osteoblasts and endothelial cells in degradable foam: Histological and high-field magnetic resonance imaging analyses of pre-engineered capillary networks in bone grafts. *Tissue Eng - Part A.* 2011 Feb 1;17(3–4):291–9.
  186. Orciani M, Di Primio R, Ferretti C, Orsini G, Salvolini E, Lazzarini R, et al. In vitro evaluation of mesenchymal stem cell isolation possibility from different intra-oral tissues. *J Biol Regul Homeost Agents.* 26(2 Suppl):57–63.
  187. Saxer F, Scherberich A, Todorov A, Studer P, Miot S, Schreiner S, et al.

- Implantation of Stromal Vascular Fraction Progenitors at Bone Fracture Sites: From a Rat Model to a First-in-Man Study. *Stem Cells*. 2016;34(12):2956–66.
188. Jungbluth P, Hakimi AR, Grassmann JP, Schneppendahl J, Betsch M, Kröpil P, et al. The early phase influence of bone marrow concentrate on metaphyseal bone healing. *Injury*. 2013 Oct;44(10):1285–94.
189. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Prog Biomater*. 2019;8(4):223–37.
190. Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL, Oreffo ROC. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*. 2016 Mar 1;83:363–82.
191. Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M. Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Mapfre Med*. 2003;14(1):51–65.
192. Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*. 1999;30(4):599–613.
193. Mehta S, Blagg R, Willcockson J, Gociman B, Yamashiro D, Siddiqi F. Cost-effectiveness analysis of demineralized bone matrix and rhBMP-2 versus autologous iliac crest bone grafting in alveolar cleft patients. *Plast Reconstr Surg*. 2018 Sep 1;142(3):737–43.
194. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*. 2007;38(SUPPL. 1):2–7.
195. Lane JM, Tomin E, Bostrom MPG. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;367:107–17.
196. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;(324):55–65.
197. Vaquero Picado A, Delgado Martínez A, Cordero Ampuero J. Biomateriales en cirugía ortopédica y traumatología. In: *Curso COT-SECOT 2019-2021*. 5ª. Madrid: Fundación SECOT; 2018.

198. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 2008;5(27):1137–58.
199. Greenfield EJ. Mounting for artificial teeth. USA; 478360, 1909. p. 1–3.
200. Rudy RJ, Levi PA, Bonacci FJ, Weisgold AS, Engler-Hamm D. Intraosseous anchorage of dental prostheses: an early 20th century contribution. *Compend Contin Educ Dent*. 2008 May;29(4):220–8.
201. Galante J, Rostoker W, Lueck R, Ray RD. Sintered fiber metal composites as a basis for attachment of implants to bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1971;53(1):101–14.
202. Alvarez K, Nakajima H. Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials (Basel)*. 2009;2(3):790–832.
203. Wu S, Liu X, Hu T, Chu PK, Ho JPY, Chan YL, et al. A biomimetic hierarchical scaffold: natural growth of nanotitanates on three-dimensional microporous Ti-based metals. *Nano Lett*. 2008 Nov;8(11):3803–8.
204. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):1728–34.
205. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals: Preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Feb;15(2):99–107.
206. Disegi JA, Eschbach L. Stainless steel in bone surgery. *Injury*. 2000;31(4):2–4.
207. CHARNLEY J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br*. 1960 Feb;42 B:28–30.
208. Walker PS, Gold BL. The tribology (friction, lubrication and wear) of all-metal artificial hip joints. *Wear*. 1971;17(4):285–99.
209. McKee GK, Watson-Farrar J. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *J Bone Jt Surg - Ser B*. 1966 May;48(2):245–59.
210. Link HD. History, design and biomechanics of the LINK SB Charité artificial disc. *Eur Spine J*. 2002 Oct;11(S2):S98–105.
211. Punt IM, Visser VM, Van Rhijn LW, Kurtz SM, Antonis J, Schurink GWH, et al.

- Complications and reoperations of the SB Charité lumbar disc prosthesis: Experience in 75 patients. *Eur Spine J.* 2008 Jan;17(1):36–43.
212. Brånemark PI, Breine U, Johansson B, Roylance PJ, Röckert H, Yoffey JM. Regeneration of bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 1964;59(1–2):1–46.
213. Black J. Biologic performance of tantalum. *Clin Mater.* 1994;16(3):167–73.
214. Levine BR, Sporer S, Poggie RA, Della Valle CJ, Jacobs JJ. Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopedic surgery. *Biomaterials.* 2006 Sep;27(27):4671–81.
215. Sagherian BH, Claridge RJ. The Use of Tantalum Metal in Foot and Ankle Surgery. *Orthop Clin North Am.* 2019;50(1):119–29.
216. Hanzlik JA, Day JS, Klein GR, Levine HB, Hartzband MA, Parvizi J, et al. Bone ingrowth in well-fixed retrieved porous tantalum implants. *J Arthroplasty.* 2013 Jun;28(6):922–7.
217. de Jong WF. La Substance Minérale Dans les Os. *Recl des Trav Chim des Pays-Bas.* 2010 Sep 3;45(6):445–8.
218. Posner AS. Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev.* 1969;49(4):760–92.
219. Kay MI, Young RA, Posner AS. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature.* 1964;204(4963):1050–2.
220. Boutin P. Total arthroplasty of the hip by fritted alumina prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2014;100(1):15–21.
221. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med.* 2006 Nov;17(11):967–78.
222. Hench LL. An introduction to bioceramics, second edition. *An Introduction to Bioceramics, Second Edition.* Imperial College Press; 2013. 1–600 p.
223. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res.* 1971 Nov;5(6):117–41.

224. Vallet-Regí M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalt Trans.* 2006;(44):5211–20.
225. Doremus RH. Bioceramics. *J Mater Sci.* 1992 Jan;27(2):285–97.
226. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012 Oct;30(10):546–54.
227. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *J Eur Ceram Soc.* 2008;28(7):1319–27.
228. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc.* 1991 Jul;74(7):1487–510.
229. Eskandar H, Zulmi W, Suzina AH, Samsudin AR. The use of coral as a graft in a large cortical bone defect. *Nat Preced.* 2008 Sep 10;
230. Ripamonti U. The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 1991;73(5):692–706.
231. Välimäki V V., Aro HT. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scand J Surg.* 2006;95(2):95–102.
232. Jones JR, Ehrenfried LM, Saravanapavan P, Hench LL. Controlling ion release from bioactive glass foam scaffolds with antibacterial properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2006 Nov;17(11):989–96.
233. Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater.* 1991;2(4):231–9.
234. Giardino R, Giavaresi G, García-Barea A, Salinas AJ, Aldini-Nicolo N, Fini M, et al. The in vivo behaviour of a sol–gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials.* 2004;26(21):4374–82.
235. Ogino M, Hench LL. Formation of calcium phosphate films on silicate glasses. *J Non Cryst Solids.* 2012;38–39(PART 2):673–8.
236. Yan X, Yu C, Zhou X, Tang J, Zhao D. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. *Angew Chemie - Int Ed.*

- 2004 Nov 12;43(44):5980–4.
237. Shruti S, Salinas AJ, Ferrari E, Malavasi G, Lusvardi G, Doadrio AL, et al. Curcumin release from cerium, gallium and zinc containing mesoporous bioactive glasses. *Microporous Mesoporous Mater.* 2013;180:92–101.
238. Sánchez-Salcedo S, Shruti S, Salinas AJ, Malavasi G, Menabue L, Vallet-Regí M. In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO. *J Mater Chem B.* 2014 Aug 14;2(30):4836–47.
239. Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C.* 2011 Oct 10;31(7):1245–56.
240. Balla VK, Bodhak S, Datta P, Kundu B, Das M, Bandyopadhyay A, et al. Biointegration of three-dimensional–printed biomaterials and biomedical devices. In: *Biointegration of Medical Implant Materials.* Elsevier; 2020. p. 433–82.
241. Liu H, Yazici H, Ergun C, Webster TJ, Bermek H. An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2008 Sep;4(5):1472–9.
242. RAY RD, WARD AA. A preliminary report on studies of basic calcium phosphate in bone replacement. *Surg Forum.* 1951;429–34.
243. DeGroot K. Calciumhydroxylapatite. *J Oral Implantol.* 1986;12(3):485–9.
244. Jarcho M. Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications. *Dent Clin North Am.* 1992 Jan;36(1):19–26.
245. Bonfield W. Composites for bone replacement. *J Biomed Eng.* 1988;10(6):522–6.
246. Panseri S, Cunha C, D’Alessandro T, Sandri M, Russo A, Giavaresi G, et al. Magnetic hydroxyapatite bone substitutes to enhance tissue regeneration: evaluation in vitro using osteoblast-like cells and in vivo in a bone defect. *PLoS One.* 2012;7(6):e38710.

247. De Maeyer EAP, Verbeeck RMH. Possible Substitution Mechanisms for Sodium and Carbonate in Calciumhydroxyapatite. *Bull des Sociétés Chim Belges*. 2010 Sep 1;102(9):601–9.
248. Porter A, Patel N, Brooks R, Best S, Rushton N, Bonfield W. Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Oct;16(10):899–907.
249. de Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res*. 1987 Dec;21(12):1375–81.
250. Furlong RJ, Osborn JF. Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Jt Surg - Ser B*. 1991;73(5):741–5.
251. Albee FH. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg*. 1920 Jan;71(1):32–9.
252. Beltrán M, Marcilla A. Estructura y propiedades de los polímeros. In: *Tecnología de polímeros: procesado y propiedades*. UNIVERSIDAD DE ALICANTE. SERVICIO DE PUBLICACIONES; 2012. p. 3–54.
253. Lee KY, Yuk SH. Polymeric protein delivery systems. *Prog Polym Sci*. 2007 Jul;32(7):669–97.
254. Liu M, Yu X, Huang F, Cen S, Zhong G, Xiang Z. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. *Orthopedics*. 2013 Nov;36(11):868–73.
255. Pavasant P, Shizari TM, Underhill CB. Distribution of hyaluronan in the epiphysial growth plate: Turnover by CD44-expressing osteoprogenitor cells. *J Cell Sci*. 1994 Oct;107(10):2669–77.
256. Costa-Pinto AR, Reis RL, Neves NM. Scaffolds based bone tissue engineering: The role of chitosan. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2011 Oct 1;17(5):331–47.
257. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci*. 2007;32(8–9):991–1007.
258. Frazer RQ, Byron RT, Osborne PB, West KP. PMMA: An essential material in

- medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15(6):629–39.
259. Kühn KD. What is bone cement? In: *The Well-Cemented Total Hip Arthroplasty: Theory and Practice*. Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 52–9.
260. Bistolfi A, Ferracini R, Albanese C, Vernè E, Miola M. PMMA-based bone cements and the problem of joint arthroplasty infections: Status and new perspectives. Vol. 12, *Materials*. MDPI AG; 2019. p. 4002.
261. Martínez-Moreno J, Merino V, Náchter A, Rodrigo JL, Bonet Yuste BB, Merino-Sanjuán M. Bioactivity of Ceftazidime and Fluconazole Included in Polymethyl Methacrylate Bone Cement for Use in Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2017;32(10):3126-3133.e1.
262. Wang J, Zhu C, Cheng T, Peng X, Zhang W, Qin H, et al. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. *PLoS One*. 2013 Dec 12;8(12):e82745.
263. Howard J, Gardner L, Saifee Z, Geleil A, Nelson I, Colombo JS, et al. Synthesis and characterization of novel calcium phosphate glass-derived cements for vital pulp therapy. *J Mater Sci Mater Med*. 2020 Jan 1;31(1):12.
264. Arora M, Chan EKS, Gupta S, Diwan AD. Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature. *World J Orthop*. 2013 Apr 18;4(2):67–74.
265. Khalil Y, Hopkinson N, Kowalski A, Fairclough JPA. Characterisation of UHMWPE polymer powder for laser sintering. *Materials (Basel)*. 2019;12(21):3496.
266. Kurtz SM. The origins of UHMWPE in total hip arthroplasty. In: *UHMWPE biomaterials handbook : ultra-high molecular weight polyethylene in total joint replacement and medical devices*. 2016. p. 33–44.
267. Barron D, Birkinshaw C. Ultra-high molecular weight polyethylene - Evidence for a three-phase morphology. *Polymer (Guildf)*. 2008 Jun 23;49(13–14):3111–5.
268. Costa L, Bracco P. Mechanisms of Cross-Linking, Oxidative Degradation, and

- Stabilization of UHMWPE. In: UHMWPE Biomaterials Handbook: Ultra High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement and Medical Devices: Third Edition. Elsevier Inc.; 2016. p. 467–87.
269. Bracco P, Oral E. Vitamin E-stabilized UHMWPE for total joint implants: A review. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(8):2286–93.
270. Bracco P, Bellare A, Bistolfi A, Affatato S. Ultra-high molecular weight polyethylene: Influence of the chemical, physical and mechanical properties on the wear behavior. A review. *Materials (Basel).* 2017;10(7):791.
271. Rose FRAJ, Oreffo ROC. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 22;292(1):1–7.
272. Moshiri A, Oryan A. Role of tissue engineering in tendon reconstructive surgery and regenerative medicine: Current concepts, approaches and concerns. *Hard Tissue.* 2012;1(2):11.
273. Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC, Edwards CC, Levine AM. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 1992;17(12):1474–80.
274. Schantz J-T, Hutmacher DW. *Advanced Therapies in Regenerative Medicine.* Vol. 2. WORLD SCIENTIFIC; 2015. 188–214 p.
275. Chatterjea A, Meijer G, Van Blitterswijk C, De Boer J. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int.* 2010;2010:1–12.
276. Banerjee I, Pangule RC, Kane RS. Antifouling coatings: Recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Adv Mater.* 2011 Feb 8;23(6):690–718.
277. Xia Y, Sun J, Zhao L, Zhang F, Liang XJ, Guo Y, et al. Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials.* 2018 Nov 1;183:151–70.
278. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art

- and future trends. *Macromol Biosci.* 2004 Aug 9;4(8):743–65.
279. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, et al. Tissue engineered ceramic artificial joint—ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials.* 2005 Aug;26(22):4654–61.
280. Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. *Arch Bone Jt Surg.* 2018;6(2):90–9.
281. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006;10(3):569–76.
282. Boccaccini AR, Roelher JA, Hench LL, Maquet V, Jrme R. A composites approach to tissue engineering. In: Hau-Tay L, Mrityunjay S, editors. 26th Annual conference on composites, advanced Cceramics, materials, and structures: ceramic engineering and science proceedings, Volume 23. 2002. p. 805–16.
283. Sumner DR, Turner TM, Igloria R, Urban RM, Galante JO. Functional adaptation and ingrowth of bone vary as a function of hip implant stiffness. *J Biomech.* 1998 Oct;31(10):909–17.
284. Boyan B, Hummert TW, Kieswetter K, DM S, Dean D, Schwartz Z. Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblasts in vitro. *Cells Mater.* 1995 Jan 1;5:323–35.
285. Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Apr 1;84:1–29.
286. Ahuja G, Pathak K. Porous carriers for controlled/modulated drug delivery. *Indian J Pharm Sci.* 2009 Feb 1;71(6):599–607.
287. Freyman TM, Yannas I V., Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog Mater Sci.* 2001;46(3–4):273–82.

288. Mishra S, Knothe Tate ML. Effect of lacunocanalicular architecture on hydraulic conductance in bone tissue: Implications for bone health and evolution. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003 Aug 1;273(2):752–62.
289. Mumith A, Coathup M, Chimutengwende Gordon M, Aston W, Briggs T, Blunn G. Augmenting the osseointegration of endoprostheses using laser-sintered porous collars an in vivo study. *Bone Jt J*. 2017 Feb 1;99-B(2):276–82.
290. Polak SJ, Levengood SKL, Wheeler MB, Maki AJ, Clark SG, Johnson AJW. Analysis of the roles of microporosity and BMP-2 on multiple measures of bone regeneration and healing in calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater*. 2011 Apr;7(4):1760–71.
291. Rustom LE, Boudou T, Nemke BW, Lu Y, Hoelzle DJ, Markel MD, et al. Multiscale porosity directs bone regeneration in biphasic calcium phosphate scaffolds. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017 Nov 13;3(11):2768–78.
292. Balla VK, Bose S, Bandyopadhyay A. Understanding compressive deformation in porous titanium. *Philos Mag*. 2010 Jul;90(22):3081–94.
293. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 2001;7(6):679–89.
294. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018;180:143–62.
295. Fedorovich NE, Schuurman W, Wijnberg HM, Prins H-J, van Weeren PR, Malda J, et al. Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 Jan;18(1):33–44.
296. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng*. 2002;8(1):1–11.
297. Vagaská B, Bačáková L, Filová E, Balík K. Osteogenic cells on bio-inspired

- materials for bone tissue engineering. *Physiol Res*. 2010;59(3):309–22.
298. Liu Y, Lim J, Teoh S-H. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 31(5):688–705.
299. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2133–51.
300. Martínez ME, Del Campo MT, Medina S, Sánchez M, Sánchez-Cabezudo MJ, Esbrit P, et al. Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif Tissue Int*. 1999;64(4):280–6.
301. Lenas P, Moos M, Luyten FP. Developmental engineering: a new paradigm for the design and manufacturing of cell-based products. Part I: from three-dimensional cell growth to biomimetics of in vivo development. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009 Dec;15(4):381–94.
302. Ingber DE, Mow VC, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, et al. Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue Eng*. 2006 Dec;12(12):3265–83.
303. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*. 2010 Oct;31(28):7250–6.
304. Brennan MÁ, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther*. 2014 Oct 13;5(5):114.
305. Eyckmans J, Roberts SJ, Schrooten J, Luyten FP. A clinically relevant model of osteoinduction: A process requiring calcium phosphate and BMP/Wnt signalling. *J Cell Mol Med*. 2010 Jun;14(6 B):1845–56.
306. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater*. 2009;8(1):15–23.
307. Mattei G, Ferretti C, Tirella A, Ahluwalia A, Mattioli-Belmonte M. Decoupling the

- role of stiffness from other hydroxyapatite signalling cues in periosteal derived stem cell differentiation. *Sci Rep*. 2015 Jun 2;5(1):10778.
308. Biggs MJP, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Oreffo ROC, Dalby MJ. The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1+ enriched skeletal stem cells. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(28):5094–103.
309. Heathman TRJ, Nienow AW, McCall MJ, Coopman K, Kara B, Hewitt CJ. The translation of cell-based therapies: clinical landscape and manufacturing challenges. *Regen Med*. 2015;10(1):49–64.
310. Vielreicher M, Schürmann S, Detsch R, Schmidt MA, Buttgerit A, Boccaccini A, et al. Taking a deep look: Modern microscopy technologies to optimize the design and functionality of biocompatible scaffolds for tissue engineering in regenerative medicine. *J R Soc Interface*. 2013;10(86):20130263.
311. Voog J, Jones DL. Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo. *Cell Stem Cell*. 2010 Feb 5;6(2):103–15.
312. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15(4):718–46.
313. Mouriño V, Cattalini JP, Roether JA, Dubey P, Roy I, Boccaccini AR. Composite polymer-bioceramic scaffolds with drug delivery capability for bone tissue engineering. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013 Oct;10(10):1353–65.
314. Yi H, Ur Rehman F, Zhao C, Liu B, He N. Recent advances in nano scaffolds for bone repair. *Bone Res*. 2016;4:16050.
315. Vorndran E, Klammert U, Ewald A, Barralet JE, Gbureck U. Simultaneous Immobilization of Bioactives During 3D Powder Printing of Bioceramic Drug-Release Matrices. *Adv Funct Mater*. 2010 May 25;20(10):1585–91.
316. Heras C, Sanchez-Salcedo S, Lozano D, Peña J, Esbrit P, Vallet-Regi M, et al. Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn<sup>2+</sup> ions in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater*. 2019;89:359–71.

317. Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec.* 1985;116(16):431–6.
318. Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography): I. Description of system. *Br J Radiol.* 1973;46(552):1016–22.
319. Vallet-Regí M, García-Honduvilla N, Esbrit P, Gómez-Barrena E, Lozano D, Buján J, et al. Osteostatin-loaded onto mesoporous ceramics improves the early phase of bone regeneration in a rabbit osteopenia model. *Acta Biomater.* 2012;8(6):2317–23.
320. Trejo CG, Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Dapía S, et al. The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model. *Biomaterials.* 2010;31(33):8564–73.
321. Katthagen B-D, Katthagen B-D. Experimental Section. In: *Bone Regeneration with Bone Substitutes.* Springer Berlin Heidelberg; 1987. p. 51–136.
322. Roche Albero A. Estudio y desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea. Universidad de Zaragoza; 2011.
323. Begam H, Nandi SK, Chanda A, Kundu B. Effect of bone morphogenetic protein on Zn-HAp and Zn-HAp/collagen composite: A systematic in vivo study. *Res Vet Sci.* 2017;115:1–9.
324. Ren L, Xie E, Zhang Z, Li D, Chen X, Hu Y, et al. In vivo bone regeneration using a novel porous bioactive composite. *Appl Surf Sci.* 2008;255(2):545–7.
325. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998;18:118–23.
326. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1988;255(4):416–21.
327. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng.* 1998;8(1):1–9.

328. Martiniaková M, Omelka R, Chrenek P, Ryban L, Parkányi V, Grosskopf B, et al. Changes of femoral bone tissue microstructure in transgenic rabbits. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51(5):140–4.
329. Roshan-Ghias A, Vogel A, Rakotomanana L, Pioletti DP. Prediction of spatio-temporal bone formation in scaffold by diffusion equation. *Biomaterials*. 2011;32(29):7006–12.
330. Izquierdo-Barba I, Ruiz-González L, Doadrio JC, González-Calbet JM, Vallet-Regí M. Tissue regeneration: A new property of mesoporous materials. *Solid State Sci*. 2005 Aug;7(8):983–9.
331. Cavo M, Scaglione S. Scaffold microstructure effects on functional and mechanical performance: Integration of theoretical and experimental approaches for bone tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C*. 2016;68:872–9.
332. Hench LL. Genetic design of bioactive glass. *J Eur Ceram Soc*. 2009 Apr 1;29(7):1257–65.
333. Atkinson I, Anghel EM, Predoana L, Mocioiu OC, Jecu L, Raut I, et al. Influence of ZnO addition on the structural, in vitro behavior and antimicrobial activity of sol–gel derived CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–SiO<sub>2</sub> bioactive glasses. *Ceram Int*. 2016 Feb 1;42(2):3033–45.
334. Lansdown ABG, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Ågren MS. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen*. 2007 Jan;15(1):2–16.
335. Kaya S, Cresswell M, Boccaccini AR. Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications. *Mater Sci Eng C*. 2018 Feb 1;83:99–107.
336. Chou J, Hao J, Hatoyama H, Ben-Nissan B, Milthorpe B, Otsuka M. Effect of biomimetic zinc-containing tricalcium phosphate (Zn-TCP) on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Jul 1;9(7):852–8.

337. Yu Y, Jin G, Xue Y, Wang D, Liu X, Sun J. Multifunctions of dual Zn/Mg ion co-implanted titanium on osteogenesis, angiogenesis and bacteria inhibition for dental implants. *Acta Biomater.* 2017 Feb 1;49:590–603.
338. Castillo RR, Lozano D, Vallet-Regí M. Mesoporous silica nanoparticles as carriers for therapeutic biomolecules. *Pharmaceutics.* 2020;12(5):432.
339. Gisbert-Garzarán M, Manzano M, Vallet-Regí M. Mesoporous silica nanoparticles for the treatment of complex bone diseases: Bone cancer, bone infection and osteoporosis. *Pharmaceutics.* 2020;12(1):83.
340. Trubiani O, Marconi GD, Pierdomenico SD, Piattelli A, Diomedede F, Pizzicannella J. Human oral stem cells, biomaterials and extracellular vesicles: A promising tool in bone tissue repair. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 2;20(20):4987.
341. Paduano F, Marrelli M, Amantea M, Rengo C, Rengo S, Goldberg M, et al. Adipose tissue as a strategic source of mesenchymal stem cells in bone regeneration: A topical review on the most promising craniomaxillofacial applications. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 13;18(10):2140.
342. Mendes LS, Saska S, Martines MAU, Marchetto R. Nanostructured materials based on mesoporous silica and mesoporous silica/apatite as osteogenic growth peptide carriers. *Mater Sci Eng C.* 2013 Oct 1;33(7):4427–34.
343. Zhou X, Feng W, Qiu K, Chen L, Wang W, Nie W, et al. BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015 Jul 29;7(29):15777–89.
344. Miao D, Su H, He B, Gao J, Xia Q, Zhu M, et al. Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 23;105(51):20309–14.
345. Zheng MH, McCaughan HB, Papadimitriou JM, Nicholson GC, Wood DJ. Tartrate resistant acid phosphatase activity in rat cultured osteoclasts is inhibited

- by a carboxyl terminal peptide (osteostatin) from parathyroid hormone-related protein. *J Cell Biochem.* 1994 Feb;54(2):145–53.
346. Catenacci L, Dorati R, Sandri G, Rossi S, Genta I, Torre ML, et al. Controlled delivery systems for tissue repair and regeneration. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2015;32:206–28.
347. Caramella C, Conti B, Modena T, Ferrari F, Bonferoni MC, Genta I, et al. Controlled delivery systems for tissue repair and regeneration. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016 Apr 1;32:206–28.
348. Baeza A, Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. Recent advances in mesoporous silica nanoparticles for antitumor therapy: Our contribution. *Biomater Sci.* 2016 May 1;4(5):803–13.
349. Zhao Y, Trewyn BG, Slowing II, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticle-based double drug delivery system for glucose-responsive controlled release of insulin and cyclic AMP. *J Am Chem Soc.* 2009 Jun 24;131(24):8398–400.
350. Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10(Suppl 1):74–87.
351. Mankani MH, Kuznetsov SA, Avila NA, Kingman A, Robey PG. Bone Formation in Transplants of Human Bone Marrow Stromal Cells and Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate: Prediction with Quantitative CT in Mice. *Radiology.* 2004;230(2):369–76.
352. Nolff MC, Kokemueller H, Hauschild G, Fehr M, Bormann KH, Spalthoff S, et al. Comparison of computed tomography and microradiography for graft evaluation after reconstruction of critical size bone defects using  $\beta$ -tricalcium phosphate. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2010 Jan;38(1):38–46.
353. Cengiz IF, Oliveira JM, Reis RL. Micro-computed tomography characterization of tissue engineering scaffolds: effects of pixel size and rotation step. *J Mater Sci*

- Mater Med. 2017;28(8):1–11.
354. Ho ST, Hutmacher DW. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8):1362–76.
  355. Sengers BG, Please CP, Taylor M, Oreffo ROC. Experimental-computational evaluation of human bone marrow stromal cell spreading on trabecular bone structures. *Ann Biomed Eng*. 2009 Jun;37(6):1165–76.
  356. Hounsfield GN. Computed medical imaging. *Med Phys*. 1980 Jul 1;7(4):283–90.
  357. Ito M, Matsumoto T, Enomoto H, Tsurusaki K, Hayashi K. Effect of nonweight bearing on tibial bone density measured by QCT in patients with hip surgery. *J Bone Miner Metab*. 1999;17(1):45–50.
  358. Schaaf H, Streckbein P, Obert M, Goertz B, Christophis P, Howaldt HP, et al. High resolution imaging of craniofacial bone specimens by flat-panel volumetric computed tomography. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2008 Jun;36(4):234–8.