

Jara Badiola Vargas

# Estudio experimental en conejos de una espuma de hidroxiapatita en la reparación de defectos óseos

Departamento  
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es  
Jorge Gil Albarova  
Antonio Herrera Rodríguez

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

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CONEJOS DE UNA ESPUMA  
DE HIDROXIAPATITA EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS  
ÓSEOS

Autor

Jara Badiola Vargas

Director/es

Jorge Gil Albarova  
Antonio Herrera Rodríguez

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2016



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CONEJOS  
DE UNA ESPUMA DE HIDROXIAPATITA  
EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS**

***JARA BADIOLA VARGAS***

**Directores:**

**DR. JORGE GIL ALBAROVA**

**PROF. ANTONIO HERRERA RODRÍGUEZ**

**ZARAGOZA, NOVIEMBRE 2015**



DON JORGE GIL ALBAROVA, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Zaragoza y Médico Adjunto del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Miguel Servet

**INFORMA:**

Que Doña Jara Badiola Vargas ha realizado el presente trabajo de Investigación titulado: “ Estudio experimental en conejos de una espuma de hidroxapatita en la reparación de defectos óseos críticos”, bajo mi dirección.

Que el presente trabajo cumple los criterios de originalidad, que la hipótesis de trabajo, material y métodos, resultados, discusión y conclusiones son correctas, y que la bibliografía revisada se considera suficiente.

Por tanto el presente trabajo de Investigación es conforme y adecuado para ser presentado y optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Lo que firmo en Zaragoza a nueve de Noviembre de dos mil quince

Fdo: Dr. D. Jorge Gil Albarova

DON ANTONIO HERRERA RODRIGUEZ, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático Emérito de Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Universidad de Zaragoza.

**INFORMA:**

Que Doña Jara Badiola Vargas ha realizado el presente trabajo de Investigación titulado: “ Estudio experimental en conejos de una espuma de hidroxapatita en la reparación de defectos óseos críticos”, bajo mi dirección.

Que el presente trabajo cumple los criterios de originalidad, que la hipótesis de trabajo, material y métodos, resultados, discusión y conclusiones son correctas, y que la bibliografía revisada se considera suficiente.

Por tanto el presente trabajo de Investigación es conforme y adecuado para ser presentado y optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Lo que firmo en Zaragoza a nueve de Noviembre de dos mil quince

Fdo: Prof. D. Antonio Herrera Rodríguez



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jorge Gil Albarova por su gran implicación y estrecha supervisión, destacando su disponibilidad, constancia y rigor científico. Ha sido imprescindible para la realización de este trabajo.

Al Prof. Antonio Herrera Rodríguez, por su constante estímulo, su incesante apoyo y sus numerosas facilidades. Sin él no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la Prof. María Vallet Regí y a los miembros del Departamento de Química inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme facilitado el biomaterial que ha sido objeto de estudio en este trabajo y por el apoyo económico al proyecto.

Al Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza por su inestimable ayuda en el estudio histológico.

Al Servicio de Radiodiagnóstico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza por su colaboración en el estudio radiológico.

Al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza por su colaboración en la estabulación y mantenimiento los animales utilizados en el trabajo.

Al Servicio de Cirugía Experimental de la Universidad de Zaragoza, por colaborar en la manipulación, intervención y estabulación de los animales de experimentación.

A mis padres por ser parte de este proyecto.

A Juan porque por su ayuda incesante por su apoyo, por su colaboración y por su estímulo.

A IRENE y PABLO por cederme parte

del tiempo de sus primeros años de vida.

# ÍNDICE

<b><u>CAPÍTULO 1:</u></b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL TEMA</b> .....	13
<b><u>CAPÍTULO 2:</u></b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
1.	FISIOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO.....	17
1.1.	Fracción inorgánica .....	18
1.2.	Fracción orgánica .....	19
1.3.	Estructura microscópica del tejido óseo .....	21
1.4.	Estructura macroscópica del tejido óseo .....	22
1.5.	Osificación membranosa y encondral .....	24
1.6.	Remodelado óseo .....	26
2.	REPARACIÓN O CONSOLIDACIÓN ÓSEA .....	28
2.1.	Fases de la consolidación ósea .....	28
2.2.	Pilares básicos de la reparación ósea .....	29
3.	DEFECTOS ÓSEOS .....	32
3.1.	Defecto óseo: clasificación .....	33
3.2.	Defecto óseo crítico .....	34
4.	SUSTITUTOS ÓSEOS.....	35
5.	BIOMATERIALES DE ORIGEN NATURAL.....	36

5.1. INJERTOS ÓSEOS.....	36
5.1.1. Antecedentes históricos.....	36
5.1.2. Definición y clasificación.....	40
5.2. MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA (MOD) .....	43
5.3. PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA (BMP) .....	45
5.4 FACTORES DE CRECIMIENTO.....	47
6. BIOMATERIALES SINTÉTICOS.....	50
7. METALES.....	52
8. CERÁMICAS.....	55
8.1. Antecedentes históricos.....	55
8.2. Definición y clasificación de las cerámicas.....	60
8.3. Cerámicas tipo 1 ó cerámicas cristalinas inertes.....	62
8.4. Cerámicas tipo 2 ó cerámicas porosas inertes.....	63
8.5. Cerámicas tipo 3 o cerámicas cristalinas bioactivas.....	65
8.6. Cerámicas tipo 4 ó cerámicas porosas bioactivas.....	67
8.6.1. Cerámicas de fosfatos de cálcico.....	68
8.6.1.1.Hidroxiapaita.....	73
8.6.1.2. Fosfato tricálcico poroso.....	77

8.6.2. Cerámicas de sulfato de calcio.....	79
9. POLÍMEROS.....	80
10. COMPOSITOS O MATERIALES COMPUESTOS.....	84
11. INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	88
11.1. Scaffolds (andamios) .....	90
11.2. Porosidad.....	97
11.3. Métodos de fabricación de cuerpos porosos.....	102
11.4. Espumas cerámicas .....	106
<b><u>CAPÍTULO 3:</u>  HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>109</b>
1. Hipótesis.....	110
2. Objetivos.....	111
<b><u>CAPÍTULO 4:</u>  MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>112</b>
1. Metodología y diseño experimental.....	113
2. Material de experimentación.....	114
2.1. Espuma de hidroxiapatita.....	114
2.1.1. Estudios preliminares in vitro.....	119

2.2. Animal de experimentación.....	120
3. Anestesia y Analgesia de los animales.....	122
4. Técnica quirúrgica.....	123
5. Defecto óseo.....	124
6. Estudio radiográfico.....	126
7. Eutanasia y realización de estudio anatomopatológico.....	128
<b><u>CAPÍTULO 5: RESULTADOS</u></b> .....	131
1. Caracterización de la espuma de hidroxiapatita.....	132
2. Hallazgos intraoperatorios.....	132
3. Animales de experimentación.....	133
4. Hallazgos radiográficos.....	136
5. Resultados anatomopatológicos.....	143
5.1. Análisis macroscópico.....	143
5.2. Análisis microscópico.....	144
<b><u>CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN</u></b> .....	152
1. Concepto de defecto óseo y soluciones.....	156
2. Análisis del modelo experimental.....	158
3. Análisis del material HABP y de los resultados histopatológicos de los fémures en los que se implantó.....	161
4. Análisis del estudio radiológico.....	190
<b><u>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES</u></b> .....	195

<b><u>CAPÍTULO 8:</u></b>	<b>RESÚMENES</b> .....	197
1. Resumen.....		198
2. Summary.....		200
<b><u>CAPÍTULO 9:</u></b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	202



# **CAPÍTULO 1:**

## **JUSTIFICACIÓN DEL TEMA**

“En gran número de operaciones ortopédicas es necesario utilizar injertos óseos. En ocasiones no es posible extraerlos del propio enfermo (hueso autógeno o autólogo), y resulta útil el hueso de otro ser humano (homogéneo u homólogo) o de otro animal (heterogéneo o heterólogo)“ . Más de medio siglo tras la publicación de estas palabras por el profesor Sanchís Olmos, la pérdida de estructura ósea continúa siendo uno de los problemas más frecuentes a los que nos enfrentamos a diario en Cirugía Ortopédica y Traumatología, ya sea para rellenar o sustituir defectos óseos producidos por una diversidad de causas, o para favorecer la consolidación tras fracturas o pseudoartrosis (1).

El desarrollo de la sociedad actual ha permitido el aumento de la esperanza de vida, hecho que nos expone a una mayor posibilidad de padecer fracturas de alta energía, lesiones tumorales, infecciones etc. Los grandes defectos óseos producidos debido a dichas causas es un tema de difícil resolución. En todas estas situaciones, existe un compromiso del tejido óseo que hemos de intentar reparar. Hasta el momento la solución para solventar la pérdida de *stock* óseo producida, sólo es susceptible de tratamientos de sustitución siendo el *gold* estándar, aún actualmente, el autoinjerto de esponjosa con resultados satisfactorios en ocasiones pero con los problemas de cuantía y morbilidad del sitio donante. Como alternativa a los autoinjertos disponemos de aloinjertos óseos, pero esta opción también tiene sus limitaciones como la necesidad de contar con un banco de tejidos bien establecido y el potencial riesgo de transmisión de enfermedades del donante al receptor, además de las dificultades de incorporación de este injerto , al tejido óseo circundante .

Por todo ello, desde hace más de un siglo numerosos grupos de trabajo han puesto en marcha diversas líneas de investigación para el desarrollo, formulación y elaboración de múltiples biomateriales que pudieran tener utilidad como sustituto óseo.

Mi interés por este tema de gran actualidad, y mi deseo de realizar un trabajo de investigación experimental, para alcanzar el Grado de Doctor me han llevado a realizar este trabajo.

# **CAPÍTULO 2:**

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

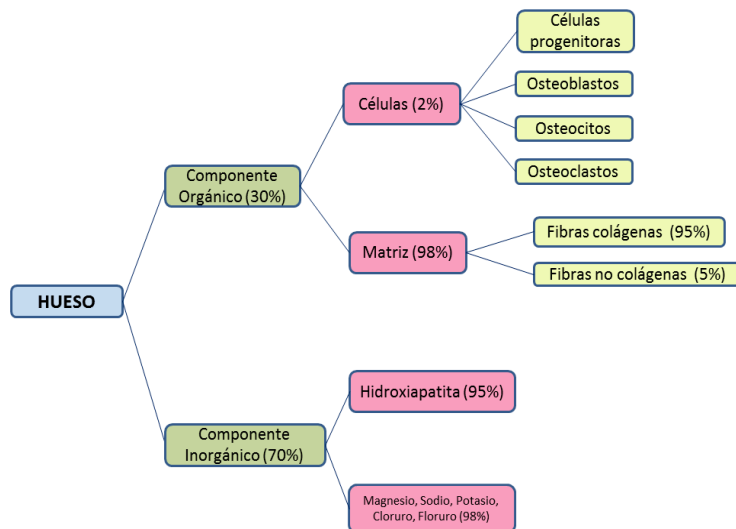
# 1. FISIOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es el constituyente principal del esqueleto, sirve de soporte a las partes blandas y protege órganos vitales como los contenidos en el cráneo, el tórax y la columna vertebral. Aloja y protege la médula ósea, generadora de células sanguíneas. Proporciona apoyo a los músculos esqueléticos, transformando sus contracciones en movimientos útiles, constituyendo un sistema de palancas que amplía las fuerzas generadas en la contracción muscular. Además de cumplir estas funciones, los huesos actúan como depósitos de calcio, fosfato y otros iones, almacenándolos o liberándolos de forma controlada para mantener constante su concentración en los líquidos orgánicos.

Los huesos son auténticos órganos y están dotados de una importante vitalidad. En ellos se producen continuos cambios tisulares y de manera constante se establecen procesos de formación y destrucción a cargo de los elementos celulares presentes en su tejido, que responden a señales mecánicas y hormonales (2). Este proceso se conoce como “remodelación ósea” y en él, la formación y destrucción (resorción) están sintonizadas y acopladas de tal manera que la masa ósea no experimenta cambios importantes hasta la etapa post-menopáusica en la mujer y hasta edades más avanzadas en los hombres.

La composición del hueso varía según el lugar, antecedentes alimenticios, actividad física y patología de la persona a estudio.

En general se considera que el hueso está formado por una fracción orgánica (1/3 de la masa, principalmente colágeno), una fracción mineral o inorgánica y agua (Fig. 1):



**Figura 1:** Esquema composición tejido óseo

## 1.1. FRACCIÓN INORGÁNICA

La fracción inorgánica supone el 60-70% del tejido y consta principalmente de varios tipos de fosfatos de calcio hidratados (85-90%), siendo el principal la hidroxiapatita (90-95%); otros minerales que componen la fracción inorgánica son el carbonato cálcico (8-10%), el fosfato de magnesio (1,5%), el fluoruro de calcio (0,3%) y minerales en forma de cristales de apatita (3,4).

La fracción inorgánica aparece como consecuencia del proceso de mineralización que se establece en el seno de la matriz.

## 1.2. FRACCIÓN ORGÁNICA

La fracción orgánica corresponde al 30 % de la composición del hueso seco y está formada por elementos celulares (en una proporción de aproximadamente el 2%) y por sustancia intercelular.

### 1.2.1. ELEMENTOS CELULARES DEL TEJIDO ÓSEO

Se distinguen cinco tipos de células óseas: las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos, las células de revestimiento y los osteoclastos. Se considera que las cuatro primeras podrían ser estadios funcionales distintos de un mismo tipo celular. Los osteoclastos, en cambio, tienen un origen diferente ya que provienen de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea. En el tejido óseo también existen otras células como monocitos, macrófagos, linfocitos, adipocitos y células epiteliales.

Los *osteoblastos* son células de forma cúbica y citoplasma basófilo. Son los encargados de producir la parte orgánica de la matriz, denominada osteoide, que posteriormente experimentará el proceso de mineralización. Se localizan en superficies donde se produce la formación activa de hueso en forma de grupos de una capa de espesor. Tienen una vida media de entre 1 y 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células de revestimiento (lining cells) o quedar gradualmente envueltas por la propia matriz y convertirse en osteocitos (un 15%) (5).

Los *osteocitos* son las células maduras y más abundantes del hueso. Tienen forma estrellada y derivan de los osteoblastos que se transforman en ellos al quedar incluidos en la matriz calcificada tras el proceso de mineralización de la sustancia

osteóide. Se localizan en cavidades o lagunas en el interior de la matriz y se comunican entre sí por medio de prolongaciones que emiten y que discurren por los conductos calcóforos formando una red celular cuya función es la de participar en el remodelado óseo (5,6).

Como no hay difusión de sustancias a través de la matriz calcificada del hueso, la nutrición de los osteocitos depende de estos canalículos existentes en la matriz ya que les permiten el intercambio de moléculas y de iones con los capilares sanguíneos.

Las *células de revestimiento* son células aplanadas, con escasas organelas y corresponden a osteoblastos que han concluido la síntesis de matriz ósea, por lo que se encuentran en reposo sobre las superficies óseas inactivas. En el adulto pueden cubrir hasta el 80.0 % de las superficies trabeculares y endocorticales y están separadas del límite mineralizado del hueso por una fina capa de tejido conectivo. Al igual que los osteocitos, están conectadas entre sí y con los osteocitos mediante uniones comunicantes (7).

Los *osteoclastos* proceden de células madre hematopoyéticas medulares. Son células gigantes, móviles y multinucleadas, pudiendo contener entre 6 y 50 núcleos, que se localizan en unas cavidades denominadas lagunas de Howship y formadas debido a su actividad resortiva sobre el hueso subyacente. La superficie del osteoclasto que queda enfrentada a estas cavidades muestra un borde “en cepillo” que traduce la actividad de la célula en el proceso de resorción del hueso; este borde es más pronunciado cuanto mayor es la acción resortiva. Su función es reabsorber el tejido óseo participando en los procesos de remodelación de los huesos. Los osteoclastos también intervienen en la homeostasis de la calcemia.



### **1.2.2. SUSTANCIA INTERCELULAR**

Constituye el 98% del componente orgánico del tejido óseo. Está compuesto principalmente por colágeno dispuesto en forma de fibras y una cantidad pequeña (5-10%) de proteínas no colágenas (8). El colágeno constituye el principal componente de la fracción orgánica y es la estructura proteica más importante del hueso proporcionando al hueso una elevada resistencia a la tracción. Las proteínas no colagénicas son segregadas por los osteoblastos; entre ellas podemos destacar la osteocalcina que es la más abundante y los factores de crecimiento que aunque sólo constituyen el 1% de las proteínas no colagénicas, actúan como principales reguladores del metabolismo óseo (9).

### **1.3. ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DEL TEJIDO ÓSEO**

Desde el punto de vista microscópico distinguimos dos tipos de tejido óseo: a) el tejido óseo inmaduro o primario y b) el tejido óseo maduro, secundario o laminar. Los dos poseen las mismas células y los mismos componentes de la matriz pero mientras que en el tejido óseo primario las fibras colágenas se disponen en varias direcciones sin organización definida, en el tejido óseo secundario o laminar se organizan en láminas que adoptan una disposición peculiar.

El tejido óseo primario, debido a la disposición irregular de sus fibras colágenas y a un mayor contenido de células y agua, resulta más flexible y débil y se deforma más fácilmente (10).

El hueso maduro se organiza en forma de sistemas laminares ordenados y las fibras colágenas se orientan en función de la carga que han de soportar.

El hueso primario se localiza en la mayor parte del esqueleto durante la edad embrionaria y en el recién nacido, en algunas localizaciones del esqueleto adulto, en algunas situaciones patológicas y también lo encontramos durante la primera fase del proceso de formación del callo de fractura. El hueso maduro lo encontramos a partir de los cuatro años de edad salvo en las excepciones anteriores.

#### **1.4. ESTRUCTURA MACROSCÓPICA DEL TEJIDO ÓSEO**

Desde el punto de vista macroscópico se pueden considerar dos tipos de hueso: el hueso cortical o compacto y el hueso esponjoso o trabecular. Ambos están formados por laminillas de tejido mineralizado que forman osteonas.

Esta clasificación es macroscópica y no histológica ya que el tejido óseo compacto y los tabiques que separan las cavidades del tejido óseo esponjoso tienen la misma estructura histológica básica.

Las cavidades del hueso esponjoso y el conducto medular de la diáfisis de los huesos largos están ocupados por la médula ósea.

##### **1.4.1. HUESO TRABECULAR**

El hueso trabecular está conformado por laminillas óseas ramificadas o trabéculas que forman una red tridimensional que delimita un sistema laberíntico de espacios intercomunicados, ocupados por la médula ósea o en su defecto, tejido graso.

Se encuentra sobre todo en el esqueleto axial, las epífisis y metáfisis de los huesos largos y en los huesos planos y orienta sus trabéculas de modo que ofrezcan resistencia a las cargas que tienen que recibir. El hueso esponjoso o trabecular cuenta con un área de superficie 20 veces mayor por unidad de volumen que el hueso

cortical y con una actividad metabólica 8 veces superior a la de dicho hueso; así mismo, responde más rápidamente que el hueso cortical a los cambios provocados por las cargas mecánicas (11).

Muchas de las alteraciones metabólicas que afectan al hueso se reflejan con más intensidad en los segmentos con más abundancia de tejido esponjoso.

#### **1.4.2. HUESO COMPACTO**

El hueso compacto o cortical está compuesto por laminillas óseas de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de espesor paralelas unas a otras y que se disponen concéntricamente formando tubos o cilindros. Cada uno de estos sistemas laminares de disposición concéntrica recibe el nombre de osteona o sistema haversiano y se considera como la unidad funcional fundamental del hueso cortical. En el centro de cada osteona se halla un conducto revestido de endostio denominado conducto de Havers, por el que discurren vasos y nervios. Los canales de Havers se comunican entre sí, con la cavidad medular y con la superficie externa del hueso por medio de conductos transversales u oblicuos, los conductos de Volkman. Entre cada una de las osteonas existen espacios también ocupados por láminas que corresponden a los sistemas laminares intersticiales. Los sistemas circunferenciales interno y externo como sus nombres indican, están constituidos por laminillas óseas paralelas entre sí que forman dos bandas: una situada en la parte interna del hueso alrededor del conducto medular y la otra en la parte más externa, próxima al periostio. Sobre las láminas de los sistemas osteónicos quedan alojados los osteocitos, que establecen conexiones entre ellos a través de las prolongaciones que emiten. Estas conexiones solamente se observan entre los osteocitos de una misma osteona. El hueso cortical comprende aproximadamente

alrededor del 10% del tejido óseo, mientras que el hueso esponjoso constituye entre el 50 y el 90% (12).

En los huesos largos, los extremos o epífisis están formados por hueso esponjoso con una delgada capa superficial compacta. La diáfisis (región del hueso localizada entre ambas epífisis) está casi totalmente formada por tejido óseo compacto, con pequeñas cantidades de hueso esponjoso en su parte más interna, que delimita el canal medular.

Con pocas excepciones, los huesos están recubiertos por el periostio, que es una capa de tejido conjuntivo especializado, dotada de potencia osteogénica, es decir que tiene la capacidad de formar hueso. El revestimiento perióstico está ausente en aquellas áreas de los extremos de los huesos largos que están cubiertas por cartílago articular y en las zonas donde los ligamentos y los tendones se insertan en el hueso. En las áreas donde falta el periostio, el tejido conjuntivo en contacto con la superficie del hueso carece de actividad osteogénica y no contribuye, por tanto, a la curación de las fracturas.

La cavidad medular de la diáfisis y las cavidades del hueso esponjoso están revestidas por el endostio, que es una fina capa celular que también posee capacidad osteogénica.

## **1.5. OSIFICACIÓN MEMBRANOSA Y ENCONDRALE**

En primer lugar cabe diferenciar la calcificación de la osificación. La primera consiste en el depósito de sales de calcio en un tejido, mientras que la osificación corresponde al proceso de la formación de hueso (13).

En el proceso de la osteogénesis hay que distinguir dos vías diferentes a través de las cuales el hueso completa su osificación. La primera se conoce con el nombre de “osificación membranosa o intramembranosa” y afecta a un número reducido de huesos como son los huesos de la bóveda craneal, la clavícula y el maxilar inferior. La segunda vía de osificación se denomina “encondral o cartilaginosa”, está es la vía por la cual la mayor parte de los huesos del cuerpo se osifican.

### **1.5.1. OSIFICACIÓN MEMBRANOSA O INTRAMEMBRANOSA**

Se denomina así porque se realiza mediante la producción directa de hueso sobre la primitiva membrana o maqueta mesenquimatosas. El lugar de la cubierta conjuntiva donde comienza la osificación se denomina centro de osificación primario. El proceso se inicia con un incremento de la vascularización en la parte más central de la maqueta; a continuación se produce la diferenciación de células mesenquimatosas que se transforman en grupos de osteoblastos. Éstos sintetizan osteoide (matriz todavía no mineralizada) que se mineraliza mediante el depósito de cristales de hidroxiapatita, englobando algunos osteoblastos que se van transformando en osteocitos. Como varios de estos grupos aparecen casi simultáneamente en el centro de osificación, hay confluencia de las trabéculas óseas formadas, lo que confiere al hueso un aspecto esponjoso. Entre las trabéculas se forman cavidades que son atravesadas por vasos sanguíneos. A través de estos vasos penetran células mesenquimatosas indiferenciadas que darán origen a la médula ósea. Los diversos centros de osificación crecen radialmente y de manera excéntrica sustituyendo finalmente la cubierta conjuntiva preexistente. La parte de la cubierta conjuntiva que no sufre osificación pasa a formar el endostio y el periositio. De esta manera

consideramos a este tipo de osificación como una osificación directa del tejido conjuntivo.

### **1.5.2. OSIFICACIÓN ENCONDRALE O CARTILAGINOSA**

A través de ella se osifican la mayor parte de los huesos del organismo (huesos de las extremidades, las vértebras, el esternón, las costillas y la base del cráneo). Comienza sobre una pieza de cartílago hialino que presenta una forma similar a la del hueso que se va a constituir, aunque de menor tamaño. La osificación endcondral consta esencialmente de dos procesos, en primer lugar el cartílago hialino sufre modificaciones produciéndose una hipertrofia de los condrocitos, con reducción de la matriz cartilaginosa a finos tabiques, su mineralización y la muerte de los condrocitos. En segundo lugar, las cavidades previamente ocupadas por los condrocitos son invadidas por capilares sanguíneos y células osteogénicas procedentes del tejido conjuntivo adyacente. Estas células se diferencian en osteoblastos que depositarán matriz ósea sobre los tabiques de cartílago calcificado. Aparece así tejido óseo donde antes había tejido cartilaginoso, sin que se produzca la transformación de éste en aquel; los tabiques de matriz calcificada de cartílago sirven sólo de punto de apoyo a la osificación (3,5).

### **1.6. REMODELADO ÓSEO**

El tejido óseo es el único tejido del organismo capaz de regenerarse, formar un callo de fractura y conseguir la “restitutio ad integrum” tras un traumatismo. Esto es debido a que es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción dando lugar a un fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado que en condiciones normales permite la renovación de entre un 5 y un 15% del hueso total al año (un 3-4% del hueso cortical y un 25-30% del trabecular) (14).

Las expresiones “modelado” y “remodelado óseo” se refieren a aspectos distintos de la actividad ósea. El modelado corresponde a la forma que el hueso adquiere a lo largo del crecimiento, mientras que el remodelado óseo es un proceso mediante el cual el hueso laminar va renovándose una vez que ha adquirido su forma. Ambos difieren en que el modelado es un proceso general y continuo y el remodelado es un proceso local y cíclico.

El remodelado óseo es un proceso complejo que consta de dos fases, una primera de reabsorción, llevada a cabo por los osteoclastos y otra de formación de hueso nuevo mediante la síntesis y mineralización del osteoide, llevada a cabo por los osteoblastos. Los osteocitos se encargan de mantener la matriz ósea. Este fenómeno tiene lugar en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular denominadas “unidades básicas de remodelado óseo”. Este proceso es regulado por factores sistémicos de tipo hormonal (parathormona, calcitonina, estrógenos, vitamina D, hormonas tiroideas y glucocorticoides) y por factores locales como los factores de crecimiento y las prostaglandinas; y está caracterizado por el acoplamiento de las funciones del osteoclasto y el osteoblasto. Aproximadamente 5 a 10% del esqueleto adulto es remodelado cada año (15).

El remodelado óseo es el proceso celular que utilizan los vertebrados para mantener una masa ósea constante entre el fin del crecimiento y la edad en la que cesa la función gonadal. El remodelado permite el recambio de hueso viejo por nuevo para mantener la resistencia biomecánica y así frenar el envejecimiento excesivo del hueso. El remodelado óseo tiene lugar durante toda la vida, aunque muestra diferencias según la edad, siendo el balance positivo a edad infantil y negativo en el anciano (16).

## **2. REPARACIÓN Ó CONSOLIDACIÓN ÓSEA**

El hueso posee una capacidad intrínseca de regeneración permitiendo la “restitutio ad integrum” tras una fractura no complicada y en las condiciones adecuadas, durante el desarrollo esquelético, o en el proceso de remodelado fisiológico normal de la vida adulta (17,18).

La regeneración ósea consiste en la formación de hueso nuevo tras un proceso de reparación y remodelado y constituye un fenómeno complejo (8).

En el escenario clínico, la forma más evidente de regeneración ósea se produce en el proceso de reparación de las fracturas. Cuando se lesiona el tejido óseo, cuando se produce una fractura, se pone en marcha una complicada cascada donde intervienen factores moleculares, fisiológicos y biomecánicos, de forma que el hueso dañado es regenerado con la restauración de las propiedades previas a la lesión, en lugar de crear un tejido básico cicatricial como sucede con otros tejidos del organismo, consiguiendo en la mayoría de las ocasiones una excelente reparación (8). Incluso, en condiciones ideales, al cabo del tiempo, la forma del hueso reparado es indistinguible del hueso adyacente que no fue dañado por el traumatismo.

### **2.1. FASES DE LA CONSOLIDACIÓN ÓSEA**

La consolidación ósea se desarrolla en tres etapas secuenciales que se superponen en el tiempo, fase de inflamación, fase de reparación y fase de remodelación (19,20).

La primera fase corresponde a la formación de un hematoma fracturario que es la base del proceso de consolidación. La liberación de mediadores de la inflamación por las células lesionadas, produce un fenómeno de vasodilatación que



conlleva la aparición de un exudado plasmático. Numerosas células inflamatorias migran al foco de fractura entre las que se encuentran PMN, macrófagos y linfocitos. A medida que va desapareciendo la reacción inflamatoria los osteoblastos se encargan de producir una nueva matriz ósea (19,21).

Es en este momento en el que comienza la fase de reparación, y que concluye con la osificación del callo que envuelve los extremos fracturarios, el cual contiene cantidades elevadas de hueso inmaduro. Finalmente es en la última fase, la fase de remodelación, cuando se produce la sustitución del hueso inmaduro del callo óseo por hueso maduro laminar (19,22).

## **2.2. PILARES BÁSICOS DE LA REPARACIÓN ÓSEA**

Para que se produzca una adecuada reparación del tejido óseo, se debe desarrollar un complejo triangular de interacciones entre la capacidad osteogénica de las células osteocompetentes o diferenciables a la línea osteogénica, los estímulos osteoinductores, y la existencia de una matriz osteoconductora que sirva de estructura ó andamiaje para la formación del hueso nuevo (22).

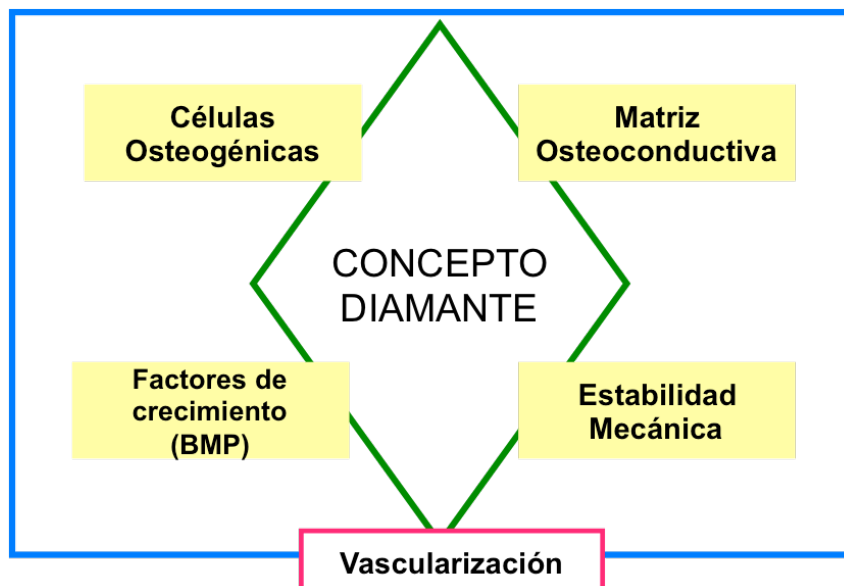
En este triángulo clásico de interacciones se acepta, y no debemos olvidar, que las células son las únicas capaces de formar hueso. Sin ellas no puede existir osteogénesis, aunque inundemos el foco de fractura de factores osteoinductores y osteoconductores.

Así, el concepto triangular de la reparación de las fracturas se sustenta en la existencia de tres elementos fundamentales: Los factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) que actúan estimulando e induciendo, la

aparición y proliferación de células osteogénicas que iniciarán los procesos reparativos a través de andamiajes osteoconductivos.

Pero a este esquema triangular de la reparación ósea es imprescindible añadir un cuarto vértice, el correspondiente a la estabilidad mecánica. Giannoudis et al. (23). construyen el “concepto del diamante”, señalando que los anteriores factores serán efectivos si se encuentran en un entorno mecánico adecuado.

El concepto del diamante (Fig. 2) nos recuerda entonces que la reparación ósea se conseguirá con la conjugación de cuatro factores decisivos: disponer de células con potencial osteogénico, de un sustrato o matriz que aporte un soporte estructural, de unos factores de crecimiento que actuarán como señales que inducirán la diferenciación celular, y de un entorno biomecánico adecuado. Y no sólo esto anterior es suficiente, también es necesaria una correcta vascularización local.



**Figura 2:** El concepto del “diamante”, modificado por Giannoudis y col.(23).

Los avances en las nuevas terapias giran en torno a acelerar el proceso de reparación de las fracturas o potenciar la capacidad intrínseca de regeneración del hueso en casos de grandes defectos óseos y pseudoartrosis. Surgen los denominados productos “ortobiológicos” o potenciadores biológicos, con distintas capacidades osteoconductoras, osteoinductivas, y osteogénicas (24).

A la hora de emplear un biomaterial es importante tener en cuenta las siguientes propiedades esenciales que ha de tener cualquier material sustituto del hueso (22,25):

- **OSTEOGENICIDAD**

Es la propiedad de regenerar o formar hueso nuevo.

Sólo el injerto óseo autólogo, del cual hablaremos más adelante, posee esta propiedad ya que se integra y produce formación ósea desde el primer instante sin ser eliminado. Depende fundamentalmente de las células (osteoblastos y células indiferenciadas).

Es necesario la existencia de células en el sustituto óseo, que si encuentran unas condiciones óptimas podrán transformarse en osteoblastos y/u osteocitos, y de esta forma participar en la formación de hueso nuevo.

- **OSTEOCONDUCTIVIDAD:**

Propiedad pasiva de un material o tejido de recibir y guiar el crecimiento óseo, por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor (7). Este material osteoconductor facilitaría el proceso de orientación de los nuevos vasos sanguíneos y sistemas de canales de Havers sobre los cuales se asentarán y proliferarán las células con capacidad regenerativa y comenzarán el

proceso de formación de hueso. Como vemos, a diferencia de la osteogénesis, en la cual el injerto por sí mismo es capaz de formar hueso, la osteoconducción implica que deben existir células formadoras de hueso además del injerto o sustituto óseo. Este andamiaje es fundamental en la regeneración del hueso y permitirá la sustitución gradual de la matriz implantada por hueso nuevo y vivo. Sus propiedades se determinarán por su configuración tridimensional y su reabsorbibilidad.

- **OSTEOINDUCCIÓN:**

La osteoinducción, es el proceso de estimulación de células mesenquimales u osteocompetentes del huésped para que se diferencien en osteoblastos. Para ello debe desarrollarse una cascada molecular donde tiene un papel importante la superfamilia del factor TGF- $\beta$ . Esta capacidad la aportan la médula ósea, el plasma rico en plaquetas o los factores bioactivos.

### **3. DEFECTOS ÓSEOS**

Existen situaciones clínicas complejas en las que el proceso de regeneración y reparación ósea se ven afectados por la gravedad del traumatismo o por las condiciones locales y generales del esqueleto dañado. Son situaciones en las que la capacidad de reparación ósea se ve superada y en las que se requiere una cantidad de regeneración del hueso tal que excede el propio potencial del tejido óseo.

Las condiciones que pueden superar la capacidad de regeneración ósea y que cada vez aparecen de forma más frecuente en nuestra práctica clínica son los grandes defectos de huesos largos provocados por traumatismos de alta energía, infecciones, resecciones tumorales amplias, estados de pseudoartrosis atrófica, necrosis avascular,

osteoporosis grave o durante el tratamiento de determinadas deformidades esqueléticas (22). Otra causa por la que la capacidad de regeneración ósea se puede ver comprometida es el caso de los defectos óseos graves provocados por aflojamientos protésicos, situación cada vez más frecuente (26).

### **3.1. DEFECTO ÓSEO: clasificación**

Los defectos óseos se clasifican según cuatro categorías (27):

- Defectos óseos según el tipo de tejido óseo afectado:
  - Defecto óseo esponjoso: defecto de tejido óseo que afecta a un área de tejido esponjoso.
  - Defecto óseo cortical: defecto de tejido óseo que afecta a un área de tejido cortical.
- Defectos óseos según su localización:
  - Defecto óseo epifisario: Ausencia de tejido óseo a nivel de la epífisis del hueso; por lo que suelen ser defectos óseos esponjosos.
  - Defecto óseo metafisario: Ausencia de tejido óseo a nivel de la metáfisis del hueso; por lo que suelen ser defectos óseos esponjosos.
  - Defecto óseo diafisario: Ausencia de tejido óseo a nivel de la diáfisis del hueso; por lo que suelen ser defectos óseos corticales.
- Defectos óseos según su relación con el tejido óseo circundante:
  - Defecto óseo cavitario: Ausencia localizada de tejido óseo que respeta la continuidad anatómica del hueso.

- Defecto óseo segmentario: Falta de tejido óseo que provoca una solución de continuidad anatómica del hueso afecto.

- Defectos óseos según su tamaño:

- Defecto óseo de tamaño no crítico: son aquellos defectos óseos que con el transcurso del tiempo tienden a la reparación espontánea.

- Defecto óseo de tamaño crítico: son aquellos defectos óseos que a pesar del transcurso del tiempo no se produce su reparación espontánea.

### **3.2. DEFECTO ÓSEO CRÍTICO**

Como ya hemos comentado previamente, el hueso presenta un potencial de reparación muy elevado a través del proceso de remodelación ósea y que se caracteriza por la casi ausencia de cicatriz. A pesar de ello, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea a lo largo de la vida del individuo, necesitando factores que estimulen su reparación (28); son los denominados defectos óseos de tamaño crítico y fueron descritos por primera vez por Schmitz y Hollinger. Estos autores establecieron que si no se producía la regeneración ósea completa en las 52 semanas siguientes a la realización del defecto óseo, podemos considerar que éste nunca ocurriría (29,30) .

Así un defecto óseo de tamaño crítico es aquel que no presenta reparación espontánea con el transcurso del tiempo.

Para intentar superar estas situaciones clínicas complejas que afectan la capacidad de regeneración ósea o en las que ésta es insuficiente, disponemos

actualmente de una gran cantidad de métodos de tratamiento que al mismo tiempo suponen un desafío clínico importante. Es necesario conocer las limitaciones de estas técnicas, sus indicaciones adecuadas, qué buscamos y que podemos esperar con su utilización, que expectativas damos al paciente, y el coste económico de nuestras decisiones.

## **4. SUSTITUTOS ÓSEOS**

Los biomateriales son todos aquellos materiales, elementos, sustancias o compuestos biocompatibles, elaborados con componentes naturales o artificiales, que pueden implantarse en un organismo vivo para reemplazar o reparar una región de tejido óseo natural lesionado o irreversiblemente dañado, sin afectar de forma adversa a los constituyentes biológicos del conjunto del organismo (31).

Hollinger y Battistone, en 1986, clasificaron los materiales de reparación ósea como, aquellos fabricados por el hombre y aquellos de origen natural. Los agentes fabricados por el hombre incluyen ciertos metales, aleaciones, cerámicas y polímeros sintéticos. Los de origen natural consisten en hueso (autogénico, alogénico o xenogénico), derivados óseos (por ejemplo el colágeno, las BMP y otras proteínas de la matriz ósea) y polímeros naturales. Los materiales de reparación fabricados por el hombre pueden ser biodegradables o no biodegradables, mientras que los compuestos de origen natural serán biodegradados completamente en el organismo (32,33).

Siguiendo con esta clasificación nosotros describiremos a continuación los sustitutos óseos diferenciándolos en biomateriales de origen natural y biomateriales sintéticos.

## **5. BIOMATERIALES DE ORIGEN NATURAL**

### **5.1. INJERTOS ÓSEOS**

#### **5.1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

El primer caso de injerto óseo conocido se le atribuye al cirujano holandés Job Janzoon Van Meekeen. En 1668 publica su obra en la que en el capítulo inicial describe el que podría ser el primer procedimiento de sustitución ósea. Se trataba de un xenoinjerto obtenido de la calota de un perro para reparar el defecto craneal de un soldado ruso. Tras la intervención, el paciente logró una recuperación completa y empezó a divulgarlo hasta que llegó a conocimiento de la Iglesia, que excomulgó al soldado por considerar que “la cabeza humana era demasiado pura para recibir el hueso de un animal”. El soldado deseando ser nuevamente acogido en el seno de la Iglesia, solicitó al cirujano que le retirara el fragmento óseo trasplantado, lo cual resultó imposible debido que al intentar explantarlo observó que el injerto estaba totalmente integrado (34,35) .

Sin embargo no es hasta finales del siglo XIX cuando comienzan los verdaderos avances en el tratamiento de las soluciones de continuidad óseas.

En 1820, Von Walter (36) publicó el primer caso de injerto autólogo de hueso. Durante el transcurso de una trepanación quirúrgica craneal recogió los fragmentos de hueso desprendidos y los utilizó para solventar el defecto óseo creado produciéndose la reparación del mismo.

En 1867, Ollier , cirujano francés, publica el “Tratado experimental y clínico de la regeneración del hueso” (37) en el que demuestra la viabilidad de los autoinjertos óseos. El primer resultado parcialmente satisfactorio lo obtiene con un



conejo de ocho meses en el que trasplanta el radio derecho al lado izquierdo y viceversa, obteniendo la consolidación en el lado derecho y la infección y reabsorción del injerto en el lado izquierdo. Es Ollier quien acuñó los conceptos de autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto (7).

James Syme fue conocido por la introducción de alternativas conservadoras a las amputaciones mayores que se realizaban en su tiempo. En 1831 publica un libro (38) donde detalla casos en los que detalla alternativas conservadoras a las amputaciones radicales.

Joseph Lister en 1853, se convirtió en cirujano interno de Syme y es conocido por la introducción de la antisepsia.

En 1878, McEwen tuvo a Syme y Lister como profesores. La nueva era de la antisepsia le permitió hacer muchas contribuciones a la cirugía. El principal interés investigador de este cirujano escocés se centró en el crecimiento óseo y en 1879 realizó el primero de sus injertos óseos, que hasta hoy se considera el primer aloinjerto óseo con éxito publicado. McEwen realizó en un niño de 3 años con osteomielitis humeral con pseudoartrosis, la resección del tejido infectado y la reposición del defecto con injerto óseo de tibia obtenido de un niño con raquitismo. A los 7 años se produjo la curación total del cuadro, lo que reavivó el interés de la comunidad científica internacional por los injertos óseos (35,39).

Mc Ewen postula las siguientes conclusiones que, salvo la primera, son coincidentes con el conocimiento actual relativo a la incorporación de los injertos óseos (39):

- Los injertos óseos entre humanos viven y crecen.

- Todos los elementos óseos deben ser incluidos en el injerto.
- La división del hueso en fragmentos pequeños mejora la incorporación del injerto.
- El injerto debe ser implantado en condiciones de asepsia.

En 1893, dos autores de manera independiente publican sus resultados sobre injertos óseos (40). Barth, en Alemania, es el primero en observar el proceso de necrosis de los injertos óseos en sus estudios histológicos, determinando el concepto de "*schleichenden ersatz*". Este corresponde a la necrosis del injerto, la reabsorción del hueso necrótico y la subsecuente neoformación ósea. De esta forma, considera que los injertos no tienen propiedades osteogénicas. Por su lado, Curtis (41) en EEUU presenta sus experiencias con injertos óseos en cuatro pacientes. En tres casos utiliza hueso descalcificado para tratar defectos cavitarios y en el cuarto caso resuelve una pseudoartrosis de tibia con autoinjerto de peroné. Postula que los injertos óseos proporcionan una estructura de soporte temporal que permite la neoformación ósea, definiendo, de esta manera, el concepto de osteoconducción (7).

En 1905, Huntington (42) publica por primera vez el aloinjerto de peroné vascularizado haciendo hincapié en las dificultades inherentes al empleo de los injertos óseos. Sin embargo, esta opción sólo tiene utilidad para resolver lesiones específicas, y la posibilidad de ampliar sus indicaciones se presenta seis décadas después con el desarrollo de la microcirugía (7).

En 1908, Lexer (43) presenta el caso de un trasplante de una hemiarticulación, lo que despierta un interés creciente en el ámbito de la cirugía ortopédica de comienzos del siglo XX por el uso de los aloinjertos masivos para la reconstrucción de grandes defectos esqueléticos. Casi 20 años más tarde este autor publica la primera serie clínica de aloinjertos con un seguimiento de 20 años

exponiendo unos resultados satisfactorios en la mitad de los 23 pacientes a los que les realizó un trasplante osteoarticular fresco procedente de pacientes amputados o de cadáveres (44).

Axhausen fue quizás el primero en examinar detalladamente la reparación del hueso necrótico. Describió el proceso de “simultaneidad de la absorción del hueso necrótico y su sustitución incompleta e irregular por hueso neoformado” . Phemister amplió los resultados de Axhausen y acuñó el término de “*creeping substitution*” confirmando el fenómeno que antes Barth había denominado “*schleichenden ersatz*”, y que podríamos traducir como sustitución por arrastre (45). Con este término hace alusión a la sustitución gradual mediante la absorción del hueso necrótico y su sustitución por hueso neoformado de tal manera que en el curso de meses o incluso años, las áreas de hueso necrótico son más o menos totalmente sustituidas por hueso vivo. Phemister considera que una parte de las células del injerto óseo siguen vivas, lo que le otorga propiedades osteogénicas. Afirma, además que la cantidad de hueso neoformado depende en gran medida de la superficie de hueso vivo con la que el hueso necrótico está en contacto (46) .

En 1914 Horak relata en su publicación la necesidad de que el donante de un órgano ha de estar completamente sano y no debe presentar ninguna clase de infección que pudiera ser transmitida al receptor (35).

En 1955, Bonfiglio define la inmunogenicidad de los aloinjertos realizando estudios en conejos, determinando que un segundo aloinjerto en el mismo animal genera una respuesta inflamatoria mayor (7,47).

En 1963, Burweil demuestra que el hueso almacenado durante una semana a una temperatura de -20°C tiene menor inmunogenicidad. De esta forma, la

congelación se transforma en el método más utilizado para la conservación de los injertos óseos (7,48).

En la década de 1940 se funda en EEUU el banco de huesos del Hospital for Special Surgery de Nueva York, planteándose la necesidad de organizar un banco de huesos con una metodología adecuada de selección de donantes y receptores y de conservación de los injertos. Una década más tarde se establece el primer banco de huesos en España (1,49).

### **5.1.2. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN**

Los injertos óseos son fragmentos de tejido óseo que se implantan en una parte del esqueleto para reparar una lesión ósea específica (50–52).

Los injertos óseos se clasifican de acuerdo con su origen y las características del receptor, de tal manera que los diferentes tipos quedan definidos por la relación genética existente entre el donante y el receptor (53,54).

Así tenemos:

- **AUTOINJERTO ÓSEO:** injerto óseo obtenido del propio individuo.

Es considerado como el sustitutivo óseo que posee las mejores características biológicas. Los autoinjertos pueden ser esponjosos o corticales según el tipo de hueso de donde lo extraigamos. El que posee mayor poder osteogénico es el autoinjerto óseo esponjoso.

- **ALOINJERTO ÓSEO:** Injerto extraído de un donante que se implanta en un receptor perteneciente a la misma especie, pero con distinto genotipo. Se puede obtener de donantes vivos, recién fallecidos o de un banco de donación de tejidos.

Para su conservación se pueden emplear los métodos de congelación, criopreservación o liofilización (7).

- **ISOINJERTO ÓSEO:** Injerto óseo que se obtiene e implanta entre individuos genéticamente idénticos, como es el caso de los gemelos univitelinos o animales de laboratorio procedentes de un mismo ovocito (55).
- **XENOINJERTO ÓSEO:** Injertos que se implantan entre individuos de especies diferentes.

De todos ellos, el **autoinjerto de esponjosa**, es el único material que tiene propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras y que carece de problemas de histocompatibilidad y riesgos de transmisión de enfermedades lo que le hacen ser un material de injerto ideal, por lo que actualmente se considera el *gold estándar* con el que son comparados el resto de materiales (56,57).

La fuente más común de autoinjerto es el hueso esponjoso de la cresta ilíaca. Aunque los autoinjertos de esponjosa no proporcionan ninguna estabilidad mecánica, son rápidamente incorporados en el lugar de acogida (58) favoreciéndose la regeneración ósea y por lo tanto la estabilidad local. Esta incorporación se debe a sus propiedades osteogénicas, la abundancia de factores de crecimiento, y a la gran superficie que proporciona para que se produzca la formación de hueso. Las células presentes en el injerto del donante son capaces de responder a los estímulos locales y de liberar factores de crecimiento por lo que aceleran la angiogénesis y la formación de hueso.

Los **injertos de hueso cortical** tienen propiedades similares. Tienen la ventaja de que proporcionan mayor estabilidad mecánica; sin embargo, el número de células contenidas en el injerto es mucho más baja y la revascularización más lenta,

lo que hace que la resorción ósea y la remodelación necesiten un periodo de tiempo significativamente más largo (58). Este proceso se puede acelerar mediante el uso de injertos óseos vascularizados corticales, pero se usan poco debido a la complejidad del procedimiento quirúrgico (59).

Los principales inconvenientes del autoinjerto óseo son su disponibilidad limitada y la problemática asociada con su obtención, es decir, afectación de estructuras anatómicas indemnes, morbilidad quirúrgica añadida, prolongación del tiempo quirúrgico, riesgo de infección y dolor postoperatorio.

El **aloinjerto óseo** representa una alternativa interesante al hueso autógeno, dado que evita la morbilidad del sitio donante y es relativamente abundante por lo que es ampliamente utilizado.

Se puede conservar mediante métodos de congelación, criopreservación o liofilización. El método de preparación está diseñado para minimizar la respuesta inmune del huésped, es por esto, que en la mayoría de los aloinjertos no hay células viables que le confieran propiedades osteogénicas.

Los aloinjertos en fresco son rara vez utilizados debido a la respuesta inmune y el riesgo de transmisión de enfermedades. Los tipos criopreservado y liofilizado son fundamentalmente osteoconductivos y poseen escasa osteoinductividad debido a que sólo conservan una cantidad variable de proteínas osteoinductivas.

Existen aloinjertos corticales y aloinjertos esponjosos. Los corticales confieren al injerto gran estabilidad mecánica pero escasas propiedades osteoconductivas y osteoinductivas; por el contrario los injertos esponjosos presentan gran osteoconductividad y osteoinductividad y escasa estabilidad mecánica (60).

Los aloinjertos pueden procesarse como polvo, fragmentos esponjosos o corticales.

Presentan como inconvenientes un comportamiento biológico inferior al del autoinjerto óseo, un elevado costo de manutención, el riesgo de infección, una mayor incidencia de fracturas y la posibilidad de transmisión de enfermedades.

## **5.2. MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA (M.O.D.)**

Se trata de una sustancia que favorece la osteoinducción, es decir, sustancias que favorecen la diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas hacia la formación de células osteoprogenitoras con capacidad para formar hueso nuevo.

En 1965, Urist describió el fenómeno de la osteoinducción al comprobar como, tras implantar cilindros de hueso desmineralizado en roedores, se formaba cartílago y hueso de forma heterotópica con una secuencia de eventos idéntica a la que tiene lugar durante el proceso de osificación endondral. Este fenómeno fue atribuido a la presencia de una sustancia en la matriz ósea desmineralizada, a la que ese autor denominó proteína morfogenética ósea (BMP), capaz de promover la formación de tejido óseo (61).

Es un aloinjerto de hueso de un donante cadáver. A partir de un proceso de extracción mediante ácido, se obtiene un producto que carece de los componentes minerales del donante pero conserva su matriz de colágeno tipo I y otras proteínas no colágenas como la BMP.

Aproximadamente existe un microgramo de estas proteínas por kilogramo de tejido óseo, aunque la concentración varía según el hueso del que se extrae y el procesamiento.

La MOD tiene poca resistencia mecánica y su actividad osteoinductiva no es siempre la misma sino que depende de una serie de variables.

Presentan desventajas con respecto a las BMPs recombinantes. La primera es que en el ser humano no inducen la formación de hueso heterotópico (que parece ser la prueba principal para demostrar la eficacia osteoinductora) y la segunda es que se han encontrado diferencias apreciables en las concentraciones entre diferentes presentaciones comerciales e incluso entre distintos lotes de una misma presentación (62).

Se encuentra disponible en forma de gel, pasta o tiras moldeables.

En cuanto a su aplicación clínica, se utiliza principalmente como inductor de formación de hueso, gracias a que el proceso de desmineralización al que es sometido permite que las proteínas morfogenéticas se expongan y cumplan con su función osteoinductora. En un estudio prospectivo que incluyó a 120 pacientes que se sometieron a fusión espinal posterolateral instrumentada, se comparó la eficacia del autoinjerto de cresta en un lado de la artrodesis frente al autoinjerto mezclado con MOD en el otro lado, observándose tasas de fusión similares; los autores concluyeron que la MOD era un buen extensor del injerto de cresta en la artrodesis vertebral. Concluyen que la adición de MOD al injerto permite el uso de una menor cantidad del mismo, por lo que al ser requerida una menor cantidad se reduce la morbilidad del sitio donante (63). Para el resto de las indicaciones (relleno de cavidades o defectos óseos, consolidación de artrodesis del retropié, etc.), se han publicado series de casos demostrando eficacia clínica pero, a diferencia de las BMPs recombinantes, no se han publicado estudios con evidencia científica de suficiente nivel I (64,65).



La MOD precisa de un transportador que suelen ser geles, sólidos, pastas... y que se reabsorben durante los primeros días de su utilización. Esta MOD se puede combinar con sangre, médula ósea, materiales osteoinductores, materiales osteopromotores o células cultivadas... y la eficacia vendrá determinada por la cantidad de proteína morfogenética ósea presente.

### **5.3. PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA (B.M.P.):**

La proteína morfogenética ósea fue descrita por primera vez en 1965 por Urist. Urist, tras observar la formación de cartílago y hueso de forma heterotópica tras la implantación de MOD en músculos de roedores, establece la hipótesis de la existencia de una proteína responsable de la inducción de formación de hueso y cartílago. A este proceso lo denomina “principio de inducción” y a la responsable de ello proteína morfogenética ósea (61).

Las BMP tienen como diana las células mesequimales indiferenciadas y tienen la propiedad única de la estimulación de la formación de hueso ectópico in vivo. Desde su descubrimiento se han descrito al menos 20 isoformas distintas (66).

Estas proteínas tienen fundamentalmente una función autocrina y paracrina y participan en el proceso de reparación de las fracturas mediante dos vías. Por una parte reclutando médula ósea, vasos sanguíneos y células madre mesenquimales de los tejidos circundantes hacia el foco de fractura; y por otra parte estimulando la proliferación y diferenciación celular hacia células óseas o hacia células condrales y de estas hacia células óseas, la síntesis de matriz y la diferenciación tisular (67).

Estos efectos están mediados por la unión de las BMP a receptores transmembrana de las células madre mesenquimales, los osteoblastos y los condrocitos desencadenando señales intercelulares (24).

Los estudios han demostrado que la cantidad de tejido óseo formado es mayor en presencia de BMP, encontrándose además que ésta es dosis dependiente. En la actualidad el objetivo es determinar la dosis mínima de BMP capaz de inducir la osteogénesis, para limitar los riesgos de su acción a distancia (68–70).

A pesar de haber más de 20 descritas, sólo la BMP-2, BMP-4 y BMP-7 han demostrado estimular, en estudios in vitro, todos los pasos de la diferenciación de células madre a células osteoblásticas adultas y sólo BMP-2 y BMP-7 están actualmente aprobados para uso clínico por la FDA (71).

Debido a la dificultad para la extracción de concentrados purificados de BMP, actualmente se obtienen mediante tecnología de recombinación del ADN (72).

Según un metaanálisis publicado recientemente sugieren que el uso de BMP en fractura de tibia es más eficaz para favorecer la consolidación y reducir la tasa de revisiones quirúrgicas por retardo de consolidación. En el tratamiento de pseudoartrosis de tibia, los resultados con el uso de BMP es similar al producido con el implante de autoinjerto óseo (73).

Se están llevando a cabo numerosos estudios sobre nuevas aplicaciones y sobre la dosis y el tipo de transportador más idóneos.

Como desventaja cabe destacar su coste elevado y la producción de hueso heterotópico.

En conclusión, las BMP son proteínas básicas de bajo peso molecular que se pueden aislar desde el hueso cortical, la dentina y algunos tumores óseos. Pertenecen a la superfamilia de factores transformadores de crecimiento beta y debido a sus propiedades osteoinductoras son potencialmente útiles para su aplicación en el campo de la Traumatología y Cirugía Ortopédica en la curación de fracturas (74).

#### **5.4. FACTORES DE CRECIMIENTO**

Los factores de crecimiento son moléculas proteicas localizadas en la matriz celular que son capaces de iniciar una cascada de señalización a través de la unión a receptores específicos de la superficie celular (75). Esto conduce a la transducción de señales en el núcleo donde se activan factores de transcripción, que afectan a la expresión de genes, que influyen en las funciones críticas, tales como la división celular, la síntesis de matriz y la diferenciación de tejidos.

Entre los factores de crecimiento que intervienen en la osteogénesis cabe destacar lo siguientes: TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), BMP ( ya descritas en el apartado anterior), FGF (factor de crecimiento de fibroblatos), IGF (factor de crecimiento insulínico), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) y Wnt (de la contracción en inglés del término *Wingless e Int* que son los primeros genes identificados que codifican estas proteínas). Por otra parte aunque hay muchos factores de transcripción implicados en la osteogénesis, los más importantes son TAZ, Runx-2 y osterix, que controlan el compromiso y la diferenciación al mismo tiempo que inhiben el proceso de adipogénesis.

Los patrones de expresión de genes de transcripción y los factores de crecimiento están interrelacionados. Por ejemplo, se cree que los factores de transcripción activan la expresión de factores de crecimiento en respuesta a la señal de factores de crecimiento producidos a partir del tejido adyacente, regulando así el crecimiento tisular (75).

En las primeras etapas de la formación ósea durante la curación de una fractura, los TGF- $\beta$  reclutan y estimulan la proliferación de las células osteoprogenitoras proporcionando un pool de pre-osteoblastos (76). Más tarde durante la diferenciación de los osteoblastos, los TGF- $\beta$  inhiben la diferenciación y mineralización, tal vez mediante la inhibición de la expresión de los genes Runx-2 y OCN, cuya expresión está controlada por Runx-2 y mediada por las vías MAPKs y Smad 2/3 (77).

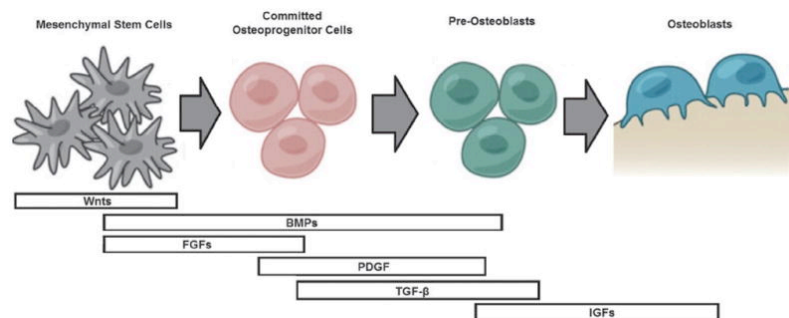
La mayoría de las BMP pertenecen a la superfamilia TGF- $\beta$ , de los cuales, BMP-2, -4, -6 y -7 se sabe que tienen un papel clave en la diferenciación de osteoblastos. Estas regulan los factores de transcripción TAZ, Runx-2 y osterix. Estudios recientes han demostrado la relación entre las vías de señalización de las BMP y las de los factores Wnt, Notch, FGF y Shh en la diferenciación de los osteoblastos y en la osteogénesis (78).

Un problema a la hora de implantar andamios biodegradables para la liberación controlada de BMPs es que para que éstas sean efectivas se requieren concentraciones de alrededor de seis veces superiores a su concentración fisiológica (79). Aunque la señalización de FGF y su papel en la curación del hueso es actualmente un área activa de investigación, FGF-2, FGF-9, FGF-18 han demostrado ser reguladores de las funciones celulares de médula ósea, que parecen

actuar como factores autocrinos y paracrinos de las células óseas (80). Aún así, todavía no está claro ni el mecanismo de acción ni la compleja función que realizan las señales moleculares de los FGF en el proceso de reparación de las fracturas, lo que limita su uso como medidas terapéuticas en el campo de la regeneración ósea (81).

Hay dos miembros de la familia IGF a destacar, IGF-1 e IGF-2, el primero es el de mayor potencial osteogénico y el segundo es el más abundante en el tejido óseo. Aunque el papel de IGF-2 no está claro, es conocido que el IGF-1 parece estimular la movilidad y la actividad de los osteoblastos in vitro, y aumentar la formación de hueso in vivo. Además, el IGF-1 ha demostrado un efecto sinérgico en la curación de fracturas cuando se encuentra ante la presencia de TGF- $\beta$ , específicamente en la mineralización del callo y en la mejora de la rigidez a la torsión del hueso después de producirse un daño (82).

Aunque el PDGF se sintetiza por las células osteoprogenitoras, no ha mostrado tener fuertes propiedades osteoinductivas. Se cree que el papel de PDGF en la curación del hueso se relaciona con el reclutamiento celular y la angiogénesis (75).



**Figura 3:** Diferenciación de las células osteoprogenitoras y el rol de los

factores de crecimiento durante el proceso (75,83,84).

## **6. BIOMATERIALES SINTÉTICOS**

En el área de la Cirugía Ortopédica y Traumatología se requiere el uso regular de injertos óseos para contribuir a la curación oportuna de las lesiones musculoesqueléticas. El injerto autólogo esponjoso de cresta ilíaca continúa siendo el patrón de referencia. La morbilidad relacionada con su obtención ha instado a que los profesionales busquen métodos para conseguir la curación de defectos óseos críticos con materiales distintos a los injertos óseos.

Pese a todos los avances descritos en cuanto a injertos, la sustitución del hueso continúa siendo un problema pendiente hasta nuestros días. Por lo anterior, en la década de los setenta comienzan a desarrollarse en diferentes laboratorios de ingeniería de materiales, numerosas líneas de investigación que ensayan la formulación y caracterización de variados biomateriales que puedan tener utilidad para promover la regeneración del tejido óseo.

Se denomina biomaterial a una sustancia biocompatible, natural o sintética, o combinación de sustancias que puesta en contacto con los tejidos vivos o con los fluidos biológicos, no afecta de forma adversa a los constituyentes biológicos del conjunto del organismo; ha sido diseñado para ser implantado temporal o permanentemente dentro de un sistema vivo y su función es la de tratar de restaurar, aumentar o reemplazar la función de los tejidos o de los órganos vivos (85).

En un principio, el objetivo por el cual se comenzaron a desarrollar biomateriales, era el conseguir sustitutos óseos capaces de soportar la carga mecánica que debía soportar el hueso dañado en su estado original sin que provocaran reacción de rechazo por parte del huésped al que se le implantaba. Así es como se empezaron

a desarrollar materiales como el acero inoxidable y aleaciones de titanio para uso como sistemas de fijación de huesos que presentaban fracturas.

Fue más tarde y principalmente en el siglo pasado y en el actual cuando se comenzaron a desarrollar biomateriales para cumplir requerimientos específicos en distintos ámbitos clínicos.

Además de las propiedades y exigencias propias de cada material según su destino y aplicaciones particulares, cualquier biomaterial, para poder ser implantado, debe cumplir unos requisitos generales (86–89):

1. Ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor, y no provocar que éste desarrolle mecanismos de rechazo
2. No ser tóxico, ni carcinógeno
3. Ser químicamente estable o biodegradable en productos no tóxicos
4. Tener una adecuada resistencia mecánica, tiempo de fatiga, y características superficiales

Deben ser capaces de resistir la carga mecánica del hueso en el que se va a implantar. Las propiedades mecánicas como el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga y porcentaje de elongación, entre otros, deben ser lo más cercanas posibles a las del tejido que se reemplaza (compatibilidad mecánica) para evitar la osteopenia que se asocia al uso de implantes óseos o "*stress shielding*".

5. Tener una densidad y peso adecuados
6. Tener un diseño de ingeniería adecuado en cuanto a tamaño y forma

7. A todo ello debe añadirse que su precio debería ser reducido, su fabricación reproducible, y su procesamiento fácil para su producción a gran escala

El principal requisito es la **biocompatibilidad** que definimos como la tolerancia biológica local de un determinado material, manifestada por la ausencia de respuesta inflamatoria aguda o crónica, o por su incorporación durante un periodo de tiempo tras su implantación, así como la ausencia de efectos deletéreos sobre los tejidos distantes al lugar de implantación (31,90–92).

El desarrollo de la ingeniería de tejidos en el área de biomateriales ha dado lugar a numerosos productos que cumplen en mayor o menor grado estas propiedades. Existen familias de materiales con características que les hacen útiles para un rango específico de aplicaciones clínicas, por lo que según sea la aplicación se debe seleccionar el biomaterial.

Los biomateriales sintéticos se pueden clasificar en metales, cerámicas, polímeros y composites.

## **7. METALES**

Los metales vienen siendo usados en el campo de la cirugía desde la década de 1920 cuando Erdle y Orange desarrollaron el “Vitallium”, el primer biomaterial metálico biocompatible y que presentaba una resistencia a la corrosión aceptable para su uso como implante. A partir de entonces se abre un gran campo de investigación y se comienzan a poder plantear alternativas a pacientes con grandes defectos óseos.

Los principales requisitos para el uso de metales en el campo de los sustitutos óseos son la biocompatibilidad y la resistencia a la corrosión (93,94).



En 1909, E.J. Greenfield crea la primera patente de un implante dental metálico. Se trataba de unas cestas fabricadas a base de iridio y oro de 24 kilates. En 1913 publica sus resultados y describe el proceso de su técnica haciendo mención a evitar la carga hasta que “las células óseas rellenen los intersticios y se logre la fijación”, comenzando a describir el concepto de osteointegración . Greenfield intuye el concepto de osteointegración (95).

Como los metales son materiales con alta resistencia mecánica, se utilizan con frecuencia en los campos de la Odontología y la Cirugía Ortopédica y Traumatología con el objetivo de reemplazar defectos óseos y ofrecer soporte estructural al hueso para favorecer su curación (96,97).

Los metales más comunes que se utilizan como implantes quirúrgicos estándar son de acero inoxidable, aleaciones con base de cobre y aleaciones de titanio. Sin embargo, estos biomateriales metálicos presentan desventajas como la posible liberación de iones y / o partículas metálicas tóxicas a través de los procesos de corrosión o desgaste que dan lugar a reacciones inflamatorias y alérgicas, afectándose la biocompatibilidad de los mismos y produciendo finalmente mayor pérdida de tejido óseo. Además, producen pobre estimulación de crecimiento de hueso nuevo, debido a sus módulos de elasticidad, que no se corresponden el hueso natural (98).

A pesar de esto, se ha publicado que los metales a base de titanio se pueden utilizar como sustitutos óseos debido a su elasticidad, a sus propiedades mecánicas y a su biocompatibilidad (99,100).

Desde hace años es objeto de estudio la obtención de materiales porosos desarrollados por vía pulvimetalúrgica para la fabricación de implantes.

Los recubrimientos porosos de los metales se empezaron utilizar en artroplastia de cadera y rodilla en 1971, por Galante y cols (101).

Se han diseñado andamios microporosos fabricados a base de níquel y titanio que ofrecen una superficie hidrófila que facilita la deposición de HA estimulando la unión y proliferación celular (102).

Autores como Haugen han investigado el comportamiento biológico y las propiedades osteoconductoras del titanio y de los andamios de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) en defectos óseos peri-implante producidos en la tibia de conejos mostrando su buena osteoconductividad y osteointegración (103).

Autores como Tiainen han fabricado andamios cerámicos con óxido de titanio con una excelente resistencia mecánica con el fin de promover la adhesión de fibroblastos y osteoblastos a la superficie del andamio (104).

Li por su parte, utilizó el  $\text{Ti}_6\text{Ta}_4\text{Sn}$  para la fabricación de andamios observando que la densidad de adhesión celular era directamente proporcional al tamaño de poro en el rango de 25-75% e inversamente proporcional en el rango de 75-900  $\mu\text{m}$ . La modificación de la superficie con diferentes tratamientos mejora la adhesión de osteoblastos (105).

En los últimos años se han introducido los materiales fabricados con tantalio, también denominados metal trabecular, que proporcionan una buena resistencia mecánica, y que se emplean fundamentalmente en artroplastias. El porcentaje de porosidad de estos materiales es del 80-85% y el tamaño de poro mayor a 500  $\mu\text{m}$  (106).

## **8. CERÁMICAS**

Existe una gran diversidad de materiales en investigación o ensayados y disponibles hasta la fecha, sin embargo, los que han resultado más promisorios como potenciales sustitutivos óseos continúan siendo los biomateriales cerámicos.

La utilización de cerámicas para la reconstrucción ósea se basa en su semejanza estructural respecto a la fase mineral del hueso lo que hace que presenten una buena compatibilidad y capacidad de osteointegración. Poseen una gran dureza que los hace muy resistentes a la fricción y al desgaste; sin embargo, son rígidas y quebradizas lo que dificulta su utilización en áreas que deban soportar cargas (7,107).

### **8.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

Los primeros antecedentes históricos del uso de un material cerámico (sulfato de calcio (SC)) se remontan al periodo de los ancestrales egipcios, los cuales lo usaban para cubrir los vendajes con los que envolvían a las momias. En el área médica, el SC ya era utilizado desde el siglo XII para contener las partes del cuerpo.

A comienzos del siglo XVIII se realizaron tentativas para el desarrollo de materiales que pudieran usarse como sustitutos óseos temporales que estimularan, o al menos permitieran, el crecimiento de hueso adyacente a medida que el material era gradualmente reabsorbido.

El uso del yeso, también conocido como “Plaster of Paris” (yeso de París), como sustituto óseo se produjo por primera vez en 1892 por el Dr. Dreesmann del Hospital Johannes en Bonn (Alemania). El yeso de París se trataba de un material cerámico compuesto por sulfato de calcio hemihidratado, que era mezclado con una

solución de fenol al 5%. Usó este material para rellenar cavidades de huesos largos tras resección de tumores y como tratamiento de osteomielitis de metatarso. En 6 de los 8 pacientes en los que usó el material, evolucionaron a la curación sin problemas, siendo el defecto óseo correctamente rellenado; en dos pacientes hubo que extraer el material debido a la formación de pus (108).

Peltier y Lillo en 1955, publican su experiencia con la utilización clínica del yeso de París en el tratamiento de diferentes defectos óseos, describiendo los efectos locales y sistémicos del mismo. Los autores implantaron cilindros de SC, en defectos óseos de tamaño crítico creados en 14 perros. Dichos defectos fueron evaluados mediante análisis radiográfico e histológico a los 45 y 72 días postoperatorios, evidenciándose una completa reabsorción del material. Los autores concluyeron que existió reparación ósea completa de los defectos que recibieron el SC a los tres meses postoperatorios (109).

La primera publicación respecto del uso satisfactorio de una cerámica de fosfato cálcico en polvo en humanos con el fin de acelerar la formación de callo óseo, es realizada por Albee y Morrison en 1920 (110). Sin embargo, la utilización efectiva de las cerámicas fosfocálcicas tarda más de 60 años en hacerse efectiva (111–118).

Jarcho, en 1981, revisó trabajos relativos a la permanencia o reabsorción, de implantes tisulares de cerámicas de fosfato cálcico. Concluyó que gracias a la naturaleza química de los materiales de fosfato cálcico (ya sea en su forma porosa o densa) al estar compuestos principalmente por iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{P}^{3+}$ , los mismos iones que están presentes en la mayor parte del mineral óseo natural, al implantarlos en el hueso, son capaces de participar en su superficie en el equilibrio sólido-líquido del

fosfato cálcico. Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{P}^{3+}$  que son necesarios para establecer este equilibrio pueden derivar del implante o del hueso de alrededor (119).

La Universidad de Clemson, a principios de la década de 1970, estableció que el diámetro de la interconexión de los poros, dirige el tipo de tejido que crece en el interior de un implante, localizado próximo al hueso (33).

Los requisitos esenciales para el crecimiento de nuevo hueso en el interior de un material son, que este sea poroso y que estos poros estén interconectados. Klawitter y Hulbert en 1971, mostraron que el tamaño mínimo de poro requerido para el crecimiento efectivo del hueso en las estructuras porosas de cerámica, es de  $100\ \mu\text{m}$ . Una manera de obtener materiales porosos con interconexión entre poros, es usar un coral ó una réplica del mismo (33,120).

En 1970 el Instituto de Investigación Ortopédica de Garches en Francia, inició una línea de investigación para definir la arquitectura más apropiada para la colonización por tejido óseo, con la finalidad de mejorar el anclaje de las prótesis no cementadas. Hallaron que la estructura más similar era la de ciertos esqueletos corales, debido a que poseen una estructura porosa con una morfología del poro abierta y con un tamaño del mismo de unas  $150\ \mu\text{m}$ . Observaron que el esqueleto de estos corales era osteoconductor ya que permitía la invasión del material por componentes celulares y la organización de una neovascularización (33).

En 1974, Roy y Linnehan describen la obtención de hidroxiapatita desde el esqueleto carbonatado de algunos géneros de coral por medio de un proceso de intercambio hidrotermal. Esto ha permitido el posterior uso clínico de este biomaterial cerámico, que cuenta con numerosas publicaciones de su empleo como sustitutivo óseo, tanto exclusivo o como aumentador de injertos óseos (121).

En EEUU, en la Universidad de Pensilvania fue donde se comenzaron a desarrollar técnicas de replicación para la producción de unas cerámicas derivadas del coral natural. Estos implantes denominados coralina no son coral natural pero si son derivados del mineral contenido en los mismos (33).

Bucholz, publicó en 1987 que no existía evidencia de que todos los biomateriales de fosfato cálcico fueran osteoinductivos. Por lo que postula, que a aquellos que no tengan propiedades inductivas habrá que añadirles factores con tal propiedad (122).

Tras su publicación son muchos los autores que estudian la eficacia del colágeno, proteínas osteoinductivas, aspirado de médula ósea y estimulación eléctrica como favorecedores de la regeneración ósea en cerámicas porosas (123,124).

Una vez conocido y estudiado el concepto de osteoconductividad, comenzaron a realizarse experimentos para aclarar cómo algunos materiales implantados la promovían. Okumura publica en 1991 cómo la osteogénesis comienza a existir en la superficie de los poros del implante y crece en el espacio disponible en ellos por lo que recalca la importancia de la existencia de una adecuada densidad de poros (125).

La medición de las propiedades mecánicas de los implantes *in vivo* fue estudiada por Trécant, quien en 1994 diseñó un estudio que mostró que aunque los implantes de fosfato de calcio tienen bajas propiedades mecánicas al momento de implantarse en el organismo, posteriormente estas mejoran debido al crecimiento de tejido óseo y gracias a la formación de colágeno y apatita biológica (126).

Si bien diferentes tipos de fosfatos de calcio o variaciones de la HA pueden tener diferentes grados de biodegradabilidad, Kitsugi y cols mostraron que no hay cambios significativos en las propiedades osteoinductivas del material aunque sean diferentes los grados de biodegradabilidad de los diferentes tipos de fosfatos de calcio o variaciones de la HA (127).

En 1996 Yang y cols. realizaron implantes en distintos animales y demostraron que la hidroxiapatita y el fosfato de calcio pueden generar procesos de osteogénesis aun cuando el implante no se coloque en tejido óseo, sino de manera intramuscular o subcutánea (128).

La reactividad en la superficie del implante fue estudiada por Ducheyne y Qiu (129). Ésta afecta a la fijación, proliferación, diferenciación y mineralización de las células del tejido óseo. Cerroni y cols. llevaron a cabo estudios con hidroxiapatitas sintéticas y expusieron cómo se generaba el tejido óseo en los poros de la cerámica sintética (130).

A pesar de publicaciones a lo largo del siglo pasado por autores como Ray, Ward, Bhaskar (114,115) etc a favor del uso de esos materiales como sustitutos óseos, no es hasta la década de 1980, cuando se comienza la utilización efectiva de las cerámicas fosfocálcicas (20–22,116–118).

En 1981 la hidroxiapatita fue introducida comercialmente, en forma de gránulos, para aplicaciones médicas en cirugía maxilofacial. Numerosos estudios clínicos, radiográficos e histológicos demostraron su oteointegración evidente así como la ausencia de reacciones adversas.

En 1986 , Brown y Chow desarrollaron un cemento de fosfato cálcico (CPC) compuesto por una mezcla de fosfato tetracálcico (TECP) ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ) y fosfato dicálcico anhidrico (DCPA) ( $\text{CaHPO}_4$ ). Estos materiales forman como producto final una pasta de HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Los andamios formados a base de fosfato cálcico son osteoconductivos, bioactivos y reabsorbibles debido a su composición química (relación Ca/P) y a sus propiedades físicas tales como la estructura cristalográfica y la porosidad (131,132)

## **8.2. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS CERÁMICAS**

Las cerámicas son estructuras altamente cristalinas creadas calentando sales minerales no metálicas a temperaturas mayores de  $1000^\circ\text{C}$ , un proceso conocido como incrustación.

A pesar de su alta fragilidad, algunas de ellas poseen propiedades físicas iguales o mejores que algunas aleaciones metálicas como, por ejemplo, resistencia al calor, corrosión, desgaste y una gran dureza entre otras.

Teniendo en cuenta las características de la respuesta que generan en el tejido circundante, los biomateriales cerámicos se pueden clasificar en tres grandes grupos (133).

- Cerámicas bioinertes.

Poseen una elevada estabilidad in vivo, son muy resistentes a la corrosión con una gran dureza y presentan una óptima biocompatibilidad. Tienen una influencia nula o muy pequeña en el tejido óseo adyacente. Bioquímicamente corresponden a



óxidos metálicos. Su principal representante es la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) o la circonia ( $\text{ZrO}_2$ ). Se utilizan sobre todo en la fabricación de superficies articulares protésicas (134).

- Cerámicas bioactivas

Denominadas así porque se enlazan químicamente al hueso vivo. Tienen además propiedades osteoconductoras, dirigiendo el proceso tridimensional de crecimiento óseo. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes. A este grupo pertenecen los vidrios bioactivos y las cerámicas de fosfatos de calcio (de los que se usan básicamente dos tipos: el fosfato tricálcico y la hidroxiapatita sintética que tienen propiedades biológicas muy distintas).

- Cerámicas biorreabsorbibles

Tras su implante en el defecto óseo del receptor son progresivamente sustituidas por tejido óseo neoformado. Para ello debe existir una adecuada correlación entre las velocidades de reabsorción del biomaterial y de regeneración del hueso. En este grupo se puede clasificar los cementos de fosfatos de calcio (7).

Se describen cuatro tipos de fijación de la cerámica al tejido óseo (31):

- Fijación morfológica: La cerámica se fija al hueso mediante el crecimiento de tejido óseo a través de las irregularidades de la biocerámica. Este método de fijación es el que usan las cerámicas cristalinas inertes, especialmente la alúmina.
- Fijación biológica: Se produce crecimiento de tejido óseo a través de la estructura porosa del biomaterial. Se produce en las cerámicas porosas inertes, especialmente la hidroxiapatita coralina.

- Fijación bioactiva: Se produce la fijación mediante enlaces químicos entre el tejido óseo y el biomaterial, como ocurre con las cerámicas cristalinas bioactivas, como los vidrios bioactivos y las vitrocerámicas.
- Fijación sustitutiva: Se produce la sustitución progresiva del material por hueso neoformado. Ocurre en las cerámicas porosas bioactivas, principalmente los fosfatos y sulfatos cálcicos.

Considerando lo anterior, podemos clasificar los biomateriales cerámicos como cerámicas cristalinas inertes, cerámicas porosas inertes, cerámicas cristalinas bioactivas y cerámicas porosas bioactivas.

### **8.3. CERÁMICAS TIPO 1 Ó CERÁMICAS CRISTALINAS INERTES**

Las materiales de este grupo son cerámicas densas no porosas, casi inertes, y su fijación al hueso deriva del crecimiento del mismo sobre las irregularidades de superficie (fijación morfológica).

Este grupo de biomateriales cerámicos está conformado por óxidos metálicos como la alúmina u óxido de aluminio ( $Al_3O_2$ ) y la zircona u óxido de zirconio ( $ZrO_2$ ). Su representante principal es la alúmina que fue la primera biocerámica utilizada en clínica y que se caracteriza por tener una gran resistencia mecánica y química, lo que le confiere una excelente biocompatibilidad y probada resistencia a la corrosión y el desgaste. La alúmina de alta densidad y pureza se utiliza en el campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología sobre todo en cirugía protésica.

La biocompatibilidad de la alúmina es el resultado de su fijación morfológica, es decir, del crecimiento óseo que se genera en las irregularidades de la superficie del material. El desgaste de una prótesis en el que se usa un par cerámica-cerámica es 10 veces inferior a una en el que se usa un par metal-polietileno. El problema principal de la alúmina es que tiene un módulo elástico que es entre 10 y 50 veces superior al del hueso, hecho que puede inducir osteolisis y aflojamiento del implante (7,135,136).

#### **8.4. CERÁMICAS TIPO 2 Ó CERÁMICAS POROSAS INERTES**

Los materiales de este grupo son cerámicas porosas e inertes cuya fijación al hueso deriva de la colonización de éste, permitiendo una fijación mecánica.

Las cerámicas porosas inertes permiten la colonización del biomaterial por células mesenquimales y vasos al interior de sus poros favoreciendo la fijación biológica del material; para ello el diámetro de poro ha de ser superior a 100  $\mu\text{m}$  (137). La porosidad de estos biomateriales limita su utilización en áreas de carga.

Así vemos que las cerámicas porosas inertes se comportan como buenos materiales osteoconductores pero presentan como mayor inconveniente su debilidad a la hora de ser implantados en zonas de carga.

Las mejores representantes de este grupo son las cerámicas de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) derivadas del coral.

El coral natural es una exoestructura de carbonato de calcio cristalino elaborado por los invertebrados a partir de la extracción del calcio y fósforo del mar

(coralina). Estructuralmente el coral es muy similar al hueso esponjoso por lo que es considerado como un adecuado sustituto óseo osteoconductor.

El género del coral determina el tamaño final del poro; el género *Porites* de la familia Poritidae produce estructuras porosas de tamaño de poro pequeño (190  $\mu\text{m}$ ), con un grosor de las paredes de 95  $\mu\text{m}$  y con sus poros interconectados, el género *Goniopora* de la misma familia, produce estructuras porosas con un tamaño de poro grande (500-600  $\mu\text{m}$ ), un grosor de pared de 95  $\mu\text{m}$ , y también con sus poros interconectados (138). Ambos materiales tienen una estructura similar a la del hueso esponjoso siendo *Goniopora* la que tienen una arquitectura de mayor semejanza. Existen otros géneros de coral como *Favites* (de la familia Merulinidae) o *Lobophyllia* (de la familia Lobophylliidae) cuya estructura esquelética se asemeja al hueso compacto (139).

Los sustitutos óseos coralinos pueden ser naturales o sintéticos.

La forma natural de coral, el exoesqueleto del coral se extrae directamente de su hábitat natural, es limpiado, esterilizado y manufacturado en forma de bloques o gránulos (Biocoral<sup>®</sup>). Corresponde a un biomaterial químicamente inalterado que se obtiene del esqueleto mineral del coral de la familia Scleractinia y que se encuentra compuesto por carbonato cálcico. Se trata de un material osteoconductor que se reabsorbe lentamente y se utiliza en clínica desde 1979 (139,140).

Se utiliza el término de “coral natural” para distinguirlo de los biomateriales coralinos en los que el carbonato cálcico es convertido en hidroxapatita (HA).

Así la hidroxapatita coralina es la forma sintética del coral. Se trata de un biomaterial poroso que se obtiene a partir de corales marinos, en los que mediante calentamiento y presurización de los mismos en una solución acuosa de fosfato se

induce un proceso de intercambio hidrotermal, transformándose el carbonato cálcico de sus esqueletos en fosfato de calcio (7,141). Se trata de un material osteoconductor que es escasamente reabsorbible; tiene una alta resistencia a la compresión, pero es frágil, con baja resistencia a la tracción (141).

La mayoría de los derivados coralinos sintéticos disponibles en el mercado se basan en corales del género *Porite* con un diámetro de poro de unas 200  $\mu\text{m}$  y una porosidad del 50% o del género *Goniopora* con un diámetro de poro de 500  $\mu\text{m}$  y una porosidad de 65% cuyo uso se reserva como sustituto de hueso esponjoso (Interpore 200<sup>®</sup> and Interpore 500<sup>®</sup>, Interpore International, Irvine, CA, USA).

La hidroxiapatita coralina se ha utilizado en el tratamiento de fracturas de la meseta tibial como un material de relleno y los resultados han sido comparables a los obtenidos con autoinjerto de hueso. Recientemente, la HA coralina ha sido utilizada como vehículo de transporte para diferentes tipos de factores de crecimiento (142,143).

## **8.5. CERÁMICAS TIPO 3 Ó CERÁMICAS CRISTALINAS BIOACTIVAS**

Las cerámicas de este grupo son materiales de superficies reactivos, densas y no porosos cuyo acoplamiento al hueso se lleva a cabo mediante enlaces químicos, produciéndose una unión directa con el hueso sin interposición de tejido fibroso, formando una fijación bioactiva. Entre ellos están los vidrios bioactivos y las vitrocerámicas bioactivas.

### 8.5.1. VIDRIOS BIOACTIVOS

Desde el punto de vista de su microestructura, los vidrios bioactivos corresponden a sólidos amorfos, es decir, a materiales poseedores de un elevado desorden estructural determinado por la carencia de una periodicidad atómica tridimensional. Son por lo tanto estructuras no cristalinas (7).

Podemos diferenciar dos grupos dentro de los biovidrios, los que presentan base de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) y los que presentan base de óxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

Los **vidrios de base silicio** fueron desarrollados en los años 70 por Hench principalmente (144), y han demostrado ser altamente bioactivos. Se ha demostrado que al utilizarlos como relleno de defectos óseos dan lugar a la formación de una capa apatítica activa en la interfase entre el biomaterial y el hueso de gran similitud con la fase mineral del hueso (145). Sin embargo su tasa de reabsorción resulta ser muy baja para algunas aplicaciones.

Los **vidrios de base fosfato** comenzaron a desarrollarse en la década de los 80 por Burnie y Gilchrist (146). La composición de estos vidrios es muy semejante a la fase mineral del hueso, y además presentan una solubilidad que, aunque varía según la composición del vidrio, suele ser elevada. Esta elevada solubilidad es la que proporciona al material la propiedad de ser biodegradable.

Las principales características de los biovidrios bioactivos son: excelente osteoconductibilidad y bioactividad, capacidad de ser vehículo de células y una biodegradabilidad controlable.

### 8.5.2. VITROCERÁMICAS

Son cerámicas policristalinas conseguidas por cristalización controlada de vidrios, donde coexisten fases amorfas y cristalinas. Se obtienen por medio de un

tratamiento térmico que permite cristalizar el 90,0% de la masa vítrea para que el tamaño de los cristales esté comprendido entre 0,1 y 1  $\mu\text{m}$ . Para facilitar su síntesis se suelen añadir precipitados metálicos, lo que favorece la nucleación y cristalización de fases con tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ .

Las vitrocerámicas poseen mejores propiedades mecánicas respecto a los vidrios, que son sus precursores, sin que el tratamiento térmico o la adición de precipitados metálicos, afecten a su bioactividad. Además de su capacidad como sustitutivos óseos, los vidrios bioactivos y vitrocerámicas pueden tener utilidad para la eliminación de células cancerígenas en el tejido óseo, mediante el método de hipertermia, que consiste en el calentamiento selectivo de determinadas áreas óseas por encima de los 43 °C (147).

## **8.6. CERÁMICAS TIPO 4 Ó CERÁMICAS POROSAS BIOACTIVAS**

Corresponden a cerámicas no cristalinas. Son cerámicas que además de favorecer el proceso tridimensional de crecimiento óseo, tienen la capacidad de formar hueso directamente en su superficie uniéndose químicamente a ésta. Se han usado con la esperanza de que actúen como sustitutos óseos biodegradables, es decir, que el material a la vez que va siendo degradado sea reemplazado por tejido óseo neoformado.

A este grupo pertenecen dos materiales basados en sales de calcio, las cerámicas de fosfatos de calcio y las de sulfatos de calcio.

### 8.6.1. CERÁMICAS DE FOSFATOS DE CÁLCICO

La composición del hueso varía según el lugar, antecedentes alimenticios, actividad física y patología de la persona a estudio. En general se considera que el hueso está formado por una fracción orgánica (1/3 de la masa, principalmente colágeno), una fracción mineral o inorgánica y agua (5-8%). La fracción inorgánica supone el 60-70% del tejido y consta principalmente de varios tipos de fosfatos de calcio hidratados (85-90%), siendo el principal la hidroxiapatita (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Otros fosfatos cálcicos presentes en la fracción inorgánica del hueso son el carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) (8-10%), el fosfato de magnesio ( $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (1,5%), el fluoruro de calcio ( $\text{CaF}$ ) (0,3%) y minerales en forma de cristales de apatita (3,4).

La hidroxiapatita (HA)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  es por lo tanto el componente principal de la fase mineral del tejido óseo.

Las cerámicas de fosfato de calcio se utilizan como sustitutos óseos desde hace 40 años. Principalmente se usan dos tipos, el fosfato tricálcico y la hidroxiapatita sintética.

Las cerámicas fosfocálcicas son compuestos con una estructura de poros interconectados que actúan como soporte estructural y que permite su colonización por sangre y médula ósea del huésped hacia el interior de la matriz de la misma. A través de los microporos se produce un flujo de fluidos y una difusión de sustancias que mejoran el ambiente metabólico permitiendo el desarrollo de las células productoras de hueso. Los macroporos permiten el crecimiento de nuevas osteonas que darán lugar a la creación de hueso sobre dicha estructura cerámica. La



colonización del implante comienza a las 2-3 semanas por ello la resorción del implante no debe ser excesivamente rápida (72).

La bioactividad de cada material depende de la capacidad de formación de hidroxiapatita carbonada en la superficie del sustituto óseo (72), lo que a su vez va a depender del proceso de disolución del material que ponga a disposición del medio iones calcio y fósforo. La bioactividad es mayor cuanto mayor sea la disolución del material (72).

La estructura y la relación Ca/P de los diferentes tipos de cerámicas (HA 1,67, TCP 1,5) es similar a la que presenta la fracción mineral del hueso. Debido a esto tanto la hidroxiapatita como el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), establecen una unión directa con el hueso, produciéndose osteoide sobre su superficie cuando ésta se deposita en contacto con hueso sano, confirmando su condición de cerámicas bioactivas, lo que da lugar a una relación indefinible entre la cerámica y el hueso (*bonding osteogenesis*). El tejido óseo se acumula directamente sobre la superficie de la cerámica sin la existencia de una capa de tejido conectivo convirtiéndose en hueso lamelar (4). Este enlace se demuestra por la imposibilidad de separar el implante del hueso circundante, sin romper uno o ambos.

El proceso de degradación de estos materiales puede producirse por resorción o por disolución. La resorción es un proceso celular activo llevado a cabo por los osteoclastos que consiguen disolver el fosfato cálcico. La disolución viene condicionada por la solubilidad de la matriz del implante, por la proporción entre el volumen y el área del implante, por el pH local, por el flujo de fluidos y por la temperatura (72,119).

El grado y la tasa de **bioresorción** de los materiales fosfocálcicos es uno de los principales puntos de interés y sobre el que todavía existe controversia. Aunque desde un punto de vista cristalino, la HA es más semejante a la HA natural de los tejidos óseos que el TCP, la velocidad de resorción de la HA es extremadamente lenta comparada con el TCP y por lo tanto el hueso neoformado a través de la red porosa de la HA no puede experimentar la carga mecánica que necesita para remodelarse (Ley de Wolff) mientras la HA permanezca resistente (148,149)

El factor más influyente en la tasa de resorción es el área de la superficie del material implantado, normalmente cuanto más denso y menor grado de porosidad presente el material tanto menor es la tasa de resorción. Esta también puede verse afectada por la distinta composición de los diferentes materiales y por las técnicas de fabricación. La HA es quebradiza y sigue un mecanismo de reabsorción más lento; los implantes de este material pueden suponer un foco mecánico de estrés por lo que a menudo la HA se combina con otros materiales (HA/TCP sólo o con hueso autógeno) para mejorar la funcionalidad y aumentar la velocidad de reabsorción. La superficie en capas de TCP-cerámica, mejora la vinculación con el hueso receptor adyacente. Esto estimula la actividad resortiva de los osteoclastos y la formación de hueso nuevo por parte de los osteoblastos. La velocidad de eliminación de las cerámicas de TCP porosas es similar a la velocidad de crecimiento óseo, mientras que las cerámicas de HA son no reabsorbibles o lo son a una velocidad tan lenta que no es medible (141,150).

Por lo tanto las cerámicas de HA suelen ser utilizadas como materiales compuestos con otras cerámicas.

En cuanto al **proceso de disolución**, hemos dicho que viene condicionado entre otras por la solubilidad de la matriz del implante, por la proporción entre el volumen y el área del implante, es decir la porosidad, por el pH local, por el flujo de fluidos y por la temperatura (72,119).

La solubilidad de las cerámicas de fosfato cálcico en agua o en soluciones fisiológicas depende de la relación atómica Ca: P. En general, la solubilidad aumenta a medida que la relación Ca:P disminuye. En consecuencia, la HA pura con una relación Ca: P de 1,67 es muy escasamente soluble, pero diferentes TCPs con Ca:P menores si lo son (141).

La solubilidad en agua en orden decreciente que presentan las cerámicas más conocidas es: Fosfato tetracálcico ( $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ ) < Fosfato cálcico amorfo <  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) <  $\beta$ - fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) << Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (151).

El tamaño de los poros es una de las características más importantes de los andamios de cerámica. La porosidad debe ser similar a la del hueso esponjoso. Tamaños de poro entre 300-500  $\mu\text{m}$  parecen ser ideales para el crecimiento óseo dentro de los mismo (152). Además, la presencia de interconexión entre poros es esencial para evitar callejones sin salida, con baja presión de oxígeno que pudiera evitar la diferenciación osteoblástica (153). Son necesarias técnicas de fabricación especiales para garantizar la presencia de poros interconectados en materiales cerámicos.

En conclusión las cerámicas fosfocálcicas son materiales osteoconductores, que son capaces de aportar la estructura necesaria para la formación de hueso a

través de permitir la proliferación, migración y expresión fenotípica de las células que participan (72).

Es esta estructura tridimensional, el determinante crítico es la velocidad de incorporación y remodelación del injerto: una estructura más porosa con menor densidad proporciona mayor superficie total para el aporte de nutrientes, vascularización y aposición ósea (72).

El comportamiento in vivo de estos implantes constituidos depende de varios factores: la relación Ca/P que determina su solubilidad, la estructura cristalográfica y la porosidad. La cerámica ideal de este grupo sería aquella que con menor densidad proporcione una estructura más porosa y soluble.

Las principales ventajas de las biocerámicas de este grupo son: su osteoconductividad, osteointegración, larga durabilidad, no presentan riesgos biológicos de contagios, están disponibles en distintas formas, con distinta porosidad y distinta composición y podemos tener toda cuanto queramos (154).

La desventaja más importante de los andamios cerámicos de fosfato cálcico para su uso clínico es su baja resistencia mecánica y fragilidad. Si se producen en un diseño poroso adecuado son insuficientes como sustitutos en áreas que deban soportar carga. En general se considera que carecen de propiedades osteoinductivas y osteogénicas por sí mismas (119,122,155,156), a a menos que se les agreguen factores de crecimiento, BMP u otras sustancias osteoinductivas para crear un injerto compuesto. Producen la osteogénesis al suministrar una matriz osteoconductiva para que las células osteogénicas del huésped sinteticen hueso bajo la influencia de los factores osteoinductivos del huésped (157).

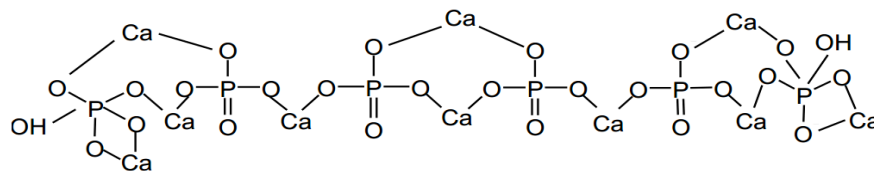
Las podemos encontrar en el mercado en forma de gránulos, cemento, pasta y con formas preconformadas. En general se presentan como implantes pequeños que no tengan que soportar cargas.

### 8.6.1.1. HIDROXIAPATITA

Como ya se ha dicho anteriormente la hidroxiapatita es la cerámica de fosfato cálcico más utilizada como sustituto óseo artificial.

La hidroxiapatita es el componente mineral predominante de los huesos de los vertebrados, así como del esmalte dentario, constituyendo el 60,0 % del esqueleto humano calcificado y el 90,0 % de la matriz ósea inorgánica. Los cristales de hidroxiapatita ósea presentan impurezas de carbonatos y una estequiometría (relación cuantitativa) pobre en Ca (Ca:P: 1,5).

La hidroxiapatita pura tiene la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Fig. 4) y presenta una estructura cristalina hexagonal. Su relación Ca:P es de 1,67 (corresponde a una proporción 10:6). Este exceso de calcio en relación con la hidroxiapatita ósea facilita los enlaces químicos con el hueso. En la fase de contacto entre ambas hidroxiapatitas, se produce una sobresaturación de calcio que reacciona con el carbonato del hueso.



**Figura 4:** Estructura de la composición química de la Hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

El término "Apatita" deriva de la palabra griega "Απαταω" (apatao) que significa "engañar". El término apatita hace referencia a distintos compuestos minerales, que tienen una similar estructura tridimensional de sus iones constituyentes (por ejemplo, hidroxapatita, fluorapatita, y clorapatita) (158).

Probablemente, la similitud estructural de las diferentes composiciones minerales posibles pudo engañar o inducir a error a los antiguos investigadores griegos.

Los distintos tipos de HA sintéticas han mostrado ser química y cristalográficamente similares (159), a pesar de lo cual ninguna de ellas llega a ser idéntica a la HA natural (160). Al ser la hidroxapatita el componente fundamental del tejido óseo, los materiales fabricados a base de ella no provocan reacción inmunológica apreciable al ser implantados en el organismo receptor. Varios estudios han demostrado que los implantes biológicos de HA no producen toxicidad local ni sistémica ni la producción de reacciones inflamatorias con formación de células a cuerpo extraño (119). El hueso neoformado presenta contacto directo con la HA sin la existencia de capa intermedia de tejido fibroso inflamatorio; es decir, tiene la propiedad de ser un material bioactivo (161,162). Sin embargo, como describen Kitsugi y col. (163) la fase inflamatoria subsiguiente al implante de la HA provoca la invasión de varios tipos celulares, macrófagos entre ellos, que fagocitan las células muertas y los productos de desecho presentes en las superficies de la HA.

Este contacto íntimo es la principal ventaja del uso de HA como sustituto óseo.

Sin embargo, si lo que se pretende, no es sólo la integración sino la regeneración del tejido óseo, es decir, la sustitución del biomaterial por tejido neoformado, es necesario contar con un material que además de ser bioactivo sea reabsorbible.

Su utilización en aplicaciones clínicas comenzó en 1981, debido a que es la cerámica fosfocálcica químicamente más cercana a los cristales de las apatitas biológicas y que presenta una proporción Ca/P de 1.67 que corresponde al valor estequiométrico de la hidroxiapatita pura.

Se caracteriza por ser un material biocompatible, inmunocompatible y bioactivo (137). Esta cerámica se comporta fundamentalmente como material osteoconductor, sin embargo, estudios recientes sugieren que determinadas geometrías podrían aportar capacidad osteoinductiva.

La hidroxiapatita es el menos soluble de los fosfatos de calcio y algo menos que la hidroxiapatita ósea. La reabsorción de la hidroxiapatita se lleva a cabo mediante un proceso celular mediado por los osteoclastos. Se reabsorbe lentamente en aproximadamente un 1,0 % de su volumen por año desde su implantación. Se caracteriza por ser un material rígido, frágil y difícil de adaptar a los defectos óseos y para su utilización en clínica se dispone de presentaciones en forma de gránulos y bloques (7,164–166)

#### **8.6.1.1.1. Características mecánicas de la hidroxiapatita**

El objetivo crucial en el uso de fosfatos de calcio como sustitutos óseos, es establecer cuál es el tipo de porosidad que hace el implante más eficaz, de tal manera que favorezca el crecimiento de tejido óseo y que por otra parte sea capaz de resistir las fuerzas de compresión del lugar donde va a ser implantado. Es conocido que

cuanto mayor es la porosidad del implante, mayor es el crecimiento de tejido óseo a su través y menor es la resistencia mecánica del mismo. Por otra parte implantes con una escasa porosidad no serán susceptibles de riesgos mecánicos pero se rellenarán exclusivamente de tejido fibroso (167).

Las características mecánicas de estos implantes son esenciales para su uso en aplicaciones clínicas.

Tanto la porosidad total como el tamaño de poro parecen influir en la resistencia mecánica. La resistencia a las fuerzas de compresión disminuye cuanto mayor es la porosidad de los implantes de HA. Le Huecet demostró por otra parte que la resistencia de los implantes dependía también de las dimensiones de los poros (168). No sólo eso, sino que otro factor que influye en la resistencia a la compresión es la proporción de macroporos ( $< 100 \mu\text{m}$ ) y de microporos ( $< 10 \mu\text{m}$ ) en el global de la porosidad del implante; implantes con la misma porosidad pero con una mayor proporción de microporos son más resistentes a la compresión. En último término cabe decir que la resistencia y la capacidad de absorción de energía dependen también de la orientación de los canales de los implantes de HA en relación con la carga aplicada, es decir del ángulo formado por el eje de carga y el eje de los canales de HA (169). La máxima resistencia a la compresión se alcanza con un ángulo de eje de canal - eje de carga de  $0^\circ$ , y la resistencia es mínima cuando este ángulo es de  $90^\circ$ .

Para concluir, es deseable minimizar la porosidad o el tamaño de los poros para aumentar la resistencia de los implantes de HA, pero la porosidad debe ser adecuada para permitir la invasión del material por tejido óseo. Para conseguir un implante óptimo de HA la orientación de su poro debe ser paralelo con la del eje mecánico del hueso huésped.



### 8.6.1.1.2. Composites de hidroxiapatita

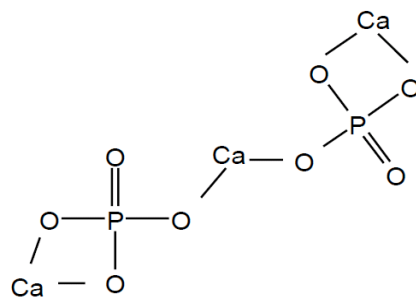
En los últimos años existe una fuerte tendencia hacia el desarrollo de andamios para ingeniería de tejidos con materiales compuestos.

Los materiales cerámicos tienen excelentes propiedades osteoinductivas; a pesar de su lenta cinética de reabsorción, baja resistencia mecánica y dificultad para su conformación a las características físicas y geométricas requeridas por el sitio o defecto óseo. Por otra parte, los biopolímeros presentan baja osteoinductividad, pero mejores propiedades mecánicas y de degradabilidad. De ahí que la preparación de materiales compuestos de fosfatos de calcio y biopolímeros, permita la incorporación de propiedades favorables de ambos componentes (170).

Los materiales compuestos más comunes son aquellos en los que se combina la hidroxiapatita con polímeros biodegradables como el ácido láctico o glicólico (171–173).

### 8.6.1.2. FOSFATO TRICÁLCICO POROSO (TCP)

El fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Fig. 5) está disponible en dos formas cristalográficas diferentes,  $\alpha$ -TCP and  $\beta$ -TCP.



**Figura 5:** Estructura de la composición química del fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$ )

El fosfato tricálcico no es un componente natural del tejido óseo y tiene la característica de ser una cerámica más soluble en los fluidos corporales que la hidroxiapatita, por lo que su reabsorción es entre 10 a 20 veces más rápida. Sin embargo, el volumen de hueso neoforado que se encarga de sustituirlo es menor que el de fosfato tricálcico degradado. Su alta capacidad de remodelación debilita precozmente su resistencia mecánica, razón por la cual para su utilización en clínica se le debe asociar con otros materiales menos reabsorbibles o que posean potencial osteoinductivo (174).

La solubilidad y la reabsorción de los distintos TCP depende de la posible incorporación de iones y del tamaño de las partículas del cristal. Cuanto más pequeño es el tamaño, mayor es la solubilidad (175).

Todas las cerámicas de fosfato de calcio como los TCP que tienen una alta bioreabsorción, muestran también grandes áreas de superficie. Por otra parte, se asume que cuanto mayor es el área de la superficie, mayor es la capacidad de ésta para adsorber proteínas endógenas de tejidos adyacentes, como factores de crecimiento etc.

Al igual que la hidroxiapatita es preparado por medio de un proceso de sinterización y la proporción Ca/P que presenta es de 1.5.

Se presenta en forma de gránulos o bloques prefabricados y en función de su composición química y estructura bioquímica tendrán una resistencia y un tiempo de reabsorción mayor o menor, así matrices más densas tendrán mayor resistencia

mecánica pero mayor tiempo de reabsorción. Se reabsorbe por un proceso celular similar al mineral del hueso.

El TCP puede ser utilizado como sustitutos óseo, pues la interacción entre la cerámica y el tejido óseo permite cambios químicos y biológicos específicos. La porosidad media de la cerámica, entre 150-400  $\mu\text{m}$ , tiene capacidad osteoconductora, permitiendo la invasión celular y tisular.

### **8.6.2. CERÁMICAS DE SULFATOS DE CALCIO**

Estos materiales se forman a partir de sulfato cálcico hemihidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) en proporción 1/2, comúnmente conocido como yeso, el que al ser mezclado con agua forma una pasta moldeable, que mediante una reacción exotérmica da lugar a un compuesto sólido microcristalino de sulfato de calcio dihidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Las cerámicas de sulfatos de calcio, tienen una historia más larga de uso clínico que la mayoría de los biomateriales disponibles en la actualidad. Los primeros antecedentes históricos de su uso se remontan al periodo egipcio, los cuales lo usaban para cubrir los vendajes que envolvían las momias. La primera publicación en la que se menciona su uso como sustituto óseo data de 1892 por el profesor Dressman (108).

Es un material bien tolerado, que se reabsorbe casi totalmente in vivo sin provocar una significativa respuesta inflamatoria y es relativamente barato (176).

Se ha usado ampliamente como relleno para defectos óseos y como vehículo de factores de crecimiento o fármacos entre otros (177,178).

Hoy en día su uso en la clínica es limitado, ya que presentan una escasa resistencia mecánica a la compresión, y en el medio acuoso tienden a formar grumos que las hacen perder sus características estructurales.

A pesar de ello recientemente se han publicado experiencias clínicas que evalúan su empleo como sustitutivos óseos en Cirugía Ortopédica y Traumatología con resultados bastante alentadores (179,180).

## **9. POLÍMEROS**

Los polímeros son sustancias de naturaleza orgánica tanto de origen animal como artificial que están constituidos por la aposición o suma de moléculas de relativo bajo peso molecular, denominadas monómeros, para construir macromoléculas. Si la macromolécula esté constituida por una única unidad repetitiva estaríamos ante un homopolímero; si, en cambio, está constituida por dos o más unidades repetitivas nos encontrarnos ante un copolímero.

El peso molecular de los polímeros es siempre alto, ya que en su composición pueden intervenir cientos o miles de monómeros. Se admite, en términos muy generales, que a mayor peso molecular suele corresponder mayor rigidez y dureza así como intervalos de fusión y ablandamientos más elevados (181).

Pueden ser tanto naturales como sintéticos y, en cualquier caso, se pueden encontrar formulaciones bioestables, esto es, con carácter permanente, particularmente útiles, para sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos lesionados o destruidos, y biodegradables, es decir, con carácter temporal, por tanto, con una

funcionalidad adecuada durante un tiempo limitado, el necesario mientras el problema subsista. Estos últimos son materiales biocompatibles, biodegradables y fácilmente procesables. Por lo tanto, son un material con gran potencial para la fabricación de andamios de regeneración ósea(4).

Una de las características de los polímeros es su degradación biológica progresiva lo que permite la transferencia gradual de la carga mecánica desde el implante sintético al tejido natural, con el propósito de optimizar la regeneración y la remodelación tisular.

Los polímeros se degradan principalmente mediante reacciones químicas de hidrólisis y sólo ligeramente por rutas enzimáticas y celulares. Por lo tanto, la previsible degradación puede ser modificada a través de copolimerización y cambios en la hidrofobicidad y en la estructura cristalina (4). La reacción de degradación no se limita únicamente a la superficie sino que tiene lugar en todo el volumen del andamio (*BULK-degradation*) debido a la rápida difusión de agua en el material. Los polímeros hidrófobos sólo se degradan desde la superficie (*surface-degradation*) (182).

Desafortunadamente, en ocasiones, algunos de los productos de degradación, como micro cristales, pueden causar reacciones inmunológicas y reacciones de cuerpo extraño. Las partículas procedentes de la de polímeros inertes son capaces de activar macrófagos y osteólisis sin causa química adicional reacciones. Estudio *in vivo* en conejos demostraron que después de implantación de tornillos de polímero, a pesar de su degradación completa, los defectos provocados por los mismos no se rellenaron con hueso trabecular tras de 54 meses de seguimiento (183).

Los polímeros elastoméricos como poliuretanos muestran incluso menor módulo de elasticidad en comparación con el hueso nativo y por lo tanto son demasiado flexibles para soportar cargas. La incorporación de una cerámica de alto módulo de elasticidad al polímero puede ayudar a resolver este problema (184).

El compuesto polímero/cerámica más comúnmente investigado es el compuesto de poliéster con Hidroxiapatita. Además de la dureza, la HA proporciona como propiedades osteogenicidad y biocompatibilidad (185).

Los biomateriales poliméricos, ampliamente utilizados en clínica se han convertido en una fuente muy importante para la obtención de biomateriales debido a varias razones: por una parte debido a las enormes posibilidades que presentan, tanto en variedad de compuestos, como en cuanto a la gran flexibilidad de diseño, lo que permite adecuar su composición y estructura a necesidades específicas. Además, presentan características bien determinadas, permiten una transferencia gradual y progresiva de tensiones al hueso y son eliminados completamente del organismo, promoviendo el restablecimiento de los tejidos originales y reduciendo el riesgo de migración posterior y las complicaciones a largo plazo relacionadas con la presencia de materiales extraños. Finalmente y no menos importante tienen en general un bajo coste (91,186,187).

Los polímeros se pueden clasificar en reabsorbibles y no reabsorbibles.:

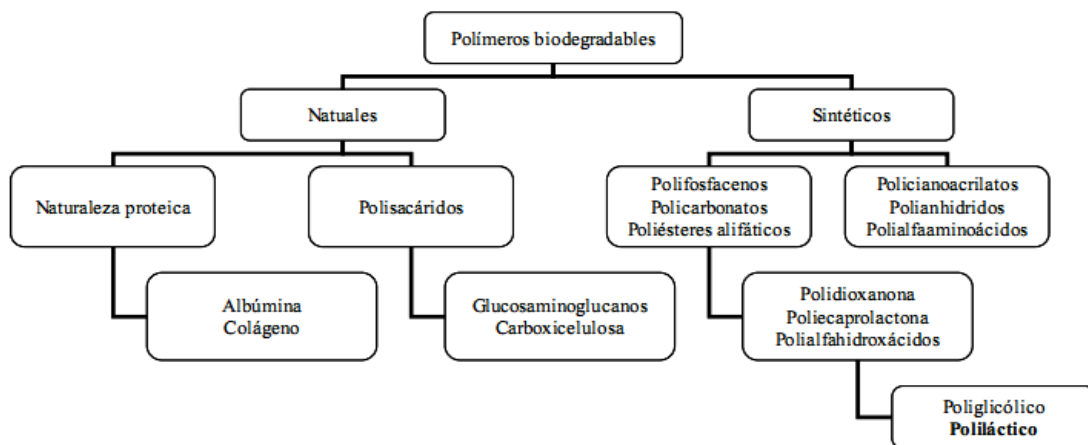
- Los no reabsorbibles son el polietileno de alto peso molecular y el polimetilmetacrilato (PMMA), empleados principalmente en recambios articulares.

- Los polímeros reabsorbibles o biodegradables son aquellos, que presentan la propiedad de degradarse, un cierto tiempo después de su implantación, en productos

no tóxicos que son eliminados del organismo o metabolizados en su interior. Estos son los que nos interesan en el área de los sustitutos óseos (188).

Para la utilización de estos polímeros como sustitutos óseos se requiere una rápida reabsorción del implante que permita su sustitución gradual por hueso sin interferir en la neoformación ósea. Estas propiedades las poseen los polímeros con más bajo peso molecular y con proporciones de formas isoméricas adecuadas.

Los polímeros absorbibles se clasifican en polímeros naturales, polímeros sintéticos y materiales compuestos que combinan partículas biodegradables (por ejemplo, el almidón) con polímeros sintéticos biodegradables (por ejemplo, el copolímero de almidón y alcohol vinílico) (Fig 6).



**Figura 6:** Clasificación de los polímeros

Los polímeros naturales son los polisacáridos como el almidón y la celulosa, las proteínas como la lana, la seda el colágeno etc y los polímeros naturales modificados preparados mediante la modificación biológica y/o química, como el acetato de celulosa o los polialcanoatos, de los cuales destaca el copolímero polihidroxitirato/valerato (PHBV).

Los polímeros sintéticos se crearon hace aproximadamente 65 años. Desde entonces se han desarrollado un gran número de ellos gracias a su gran variedad de composiciones y propiedades que cubren un amplio rango de aplicaciones tanto bioestables como biodegradables (189,190).

Los polímeros sintéticos biodegradables que actualmente se usan o están siendo investigados para su posible aplicación en la regeneración ósea, son los poli- $\alpha$ -hidroxiésteres, la polidioxanona, el polipropilénfumarato, el polietilenglicol, los polioroésteres, los polianhídridos y los poliuretanos.

Los más conocidos y ampliamente utilizados son los hidroxiésteres tanto el ácido poliglicólico como el ácido poliláctico y sus homo y copolímeros (7).

## **10. COMPOSITES Ó MATERIALES COMPUESTOS**

Una alternativa para obtener implantes con las características idóneas para cubrir la necesidad deseada es construir materiales compuestos que reúnan las mejores características biológicas y mecánicas de los materiales de origen.

Tanto los biomateriales cerámicos como los poliméricos pueden combinarse para constituir materiales compuestos o composites que se puedan emplear como sustitutos óseos. Así estos composites poseerán las propiedades osteoconductoras de las cerámicas y las mejores propiedades mecánicas y de degradabilidad de los segundos. A esto se agrega, más recientemente, la posibilidad de asociar biomateriales con células osteoformadoras cultivadas que pueden ser capaces de otorgar un verdadero aporte osteogénico para la reparación de los defectos óseos.



Se entiende por materiales compuestos aquellos formados por dos o más materiales distintos con el objetivo de obtener una **combinación de propiedades** que no puede ser obtenida por los materiales originales.

En todo material compuesto se distinguen dos componentes:

- *MATRIZ*, componente que se presenta en fase continua, actuando como ligante

Según el material utilizado tendremos composites de matriz metálica, de matriz cerámica o de matriz polimérica

- *REFUERZO*, en fase discontinua, que es el elemento resistente. Hay de dos tipos: fibras y cargas.

Uno de los materiales poliméricos naturales que más se ha empleado en asociación con otros para obtener biomateriales compuestos es el colágeno. Así, en distintas experimentos se ha combinado colágeno liofilizado que puede conformar una red de aldehídos como soporte para hidroxapatita granulada. Tras su implantación este compuesto se comporta como un biomaterial osteoconductor (7).

En 1977, Mittelmeier y col., desarrollaron la idea de un nuevo material, como sustituto óseo biodegradable, basado en los principales componentes del hueso, el colágeno y la hidroxapatita, lo denominó Collopat<sup>®</sup>. Esperaba que estos materiales sintéticos y semisintéticos, al igual que los trasplantes óseos, estimularan tejido de granulación para formar hueso, y de esta forma reemplazar al implante con tejido óseo endógeno (33,191). En 1984 este autor y sus colaboradores evaluaron este producto implantándolo en un defecto óseo en el fémur distal de conejos comprobando que se regeneraba hueso nuevo, hasta cinco veces más que en los cóndilos sin implante (33,192).

La principal ventaja del uso de implantes de matriz ósea desmineralizada (BMP) es que se evita el procedimiento de extracción del injerto, pero como desventaja no proporcionan rigidez intrínseca; por esto sería de gran utilidad los composites de hueso desmineralizado osteoinductivo y materiales con propiedades estructurales (33). En 1988, Johnson y Urist publican sus experiencias en el tratamiento de pacientes con pseudoartrosis y defectos óseos segmentarios de fémur tratados con éxito mediante una combinación de desbridamiento, fijación interna o externa y aporte de injerto autólogo o implante de BMP (193).

Burwell, en 1961, utilizó el potencial osteogénico de la médula ósea roja autóloga, para favorecer la osteogénesis en un injerto de hueso esponjoso alogénico, que sólo por sí mismo, no puede contribuir directamente a dicha función. La evidencia de una interacción entre hueso y médula ósea roja fue resumida por Burwell en 1969 (194), examinada por Patt y Maloney en 1972 (195) de nuevo por Urist en 1989. La médula ósea roja es difícil de trasplantar como un injerto libre a los tejidos porque se absorbe rápidamente. Su reabsorción se puede retrasar mediante la adición de colágeno; por otra parte la adición de gránulos de cerámica es beneficiosa, probablemente por proporcionar un espacio tridimensional que favorezca el crecimiento de hueso nuevo (33)(196).

En 1999, las bondades del uso de compuestos de HA y ácido poliláctico se muestran en el estudio de Shikinami (196) quien realiza compuestos de estos materiales que son conformados por presión. Los materiales obtenidos muestran propiedades mecánicas cercanas a las del hueso cortical además de reabsorbibilidad, bioactividad y osteoconductividad. En 2004 Ignjatovic y Uskokovic (197) desarrollaron compuestos de HA y ácido poliláctico que conformaron por presión en

caliente. Al variar la presión del proceso, se obtuvo diferentes grados de porosidad en los materiales que se implantaron en ratones, con buena biocompatibilidad y adhesión del tejido al implante.

A medida que se profundiza en la literatura se observa una fuerte tendencia en los últimos años en el desarrollo de scaffolds hechos de materiales compuestos cerámico/polímero (198,199)

Ya hemos comentado que los materiales cerámicos como los fosfatos de calcio tienen excelentes propiedades osteoconductoras (200), pero una baja degradabilidad, baja resistencia mecánica y dificultad en sus procesos de conformación para controlar las características físicas y geométricas requeridas del andamio. Los polímeros en cambio, tienen la desventaja de poseer una baja osteoinductividad pero presentan mejores propiedades mecánicas y de degradabilidad, además de que se pueden conformar mediante varios procesos que permiten controlar mejor sus características geométricas. El desarrollo de composites cerámico/polímero permite obtener un material biodegradable, de buena resistencia mecánica, osteoinductivo, osteoconductor y conformable al combinar las propiedades de los materiales base que lo componen (201).

En este sentido, una alternativa es la fabricación de espumas de HA por la técnica gel-casting. Este proceso consiste en la polimerización de una solución acuosa de polvo cerámico con monómeros orgánicos para formar una espuma, obteniéndose cuerpos con porosidad abierta e interconectada que posibilitan el crecimiento celular y la vascularización en su interior al momento de ser implantados, mejorando así la osteointegración del material (202).

Además, debido a la adición de los polímeros se forma una red tridimensional, que confiere al material mayor resistencia mecánica que la de aquellos fabricados sólo de cerámica, ampliando así las posibilidades para sitios de implantación.

## **11. INGENIERÍA DE TEJIDOS**

En la última década se ha ampliado el abanico de opciones terapéuticas para solventar el problema de los defectos óseos. Sin embargo, a pesar de estos avances, el curso del tratamiento sigue siendo prolongado, cargado de frecuentes complicaciones y en ocasiones resulta dificultoso determinar la estrategia terapéutica óptima para cada caso. Afortunadamente, gracias al mayor conocimiento actual de la biología de la reparación-regeneración ósea, cada día se abren nuevas líneas de investigación basadas en el empleo de materiales biocompatibles sintéticos asociados a técnicas de terapia celular con la finalidad de hacerlos biológicamente activos en el sitio de su implantación.

La ingeniería de tejidos es una vía de investigación clínica y básica cuyo objetivo es recrear tejidos u órganos similares a los tejidos y órganos originales con ayuda de células y matrices utilizadas como soporte de adhesión y que además pueden vehiculizar moléculas biológicamente activas. Este tipo de terapia ha sido estudiada para la regeneración de diferentes tejidos como lo son el tejido cutáneo, hepático, cardiovascular y más recientemente, el cartilaginoso y el tejido óseo (203).

El objetivo de las investigaciones llevadas a cabo en ingeniería tisular ósea, es el de reparar las pérdidas de sustancia ósea mediante un sistema biológico que permita reconstruir o reproducir un hueso natural sin tener que recurrir a la

extracción de un injerto óseo autólogo, es decir, reconstruir el stock óseo gracias a la asociación de matrices, factores osteoinductores y células osteogénicas aisladas del paciente.

En términos generales, el diseño de un implante para restaurar o modificar un función o un órgano, normalmente está compuesto de la asociación de materiales biocompatibles y componentes biológicos de los tejidos. Estos materiales o matrices (biomateriales) tienen varios papeles clave que incluyen, el facilitar la migración celular o colonización del material implantado, guiando el proceso de reparación del tejido. Estas acciones están mediadas por señales moleculares específicas que facilitan el reclutamiento, mitosis, y diferenciación de células progenitoras a osteoblastos y factores locales en el lugar de la lesión que inician e incrementan el proceso de neovascularización local para facilitar el aporte de oxígeno y nutrientes a estas células

Un punto importante en el diseño de biomateriales es la estructura que presentan y la forma con la que se van a implantar, que variará en función de la aplicación para la cual lo vamos a crear. Para cada tejido y aplicación, el implante se debe diseñar con la arquitectura física y las propiedades mecánicas y químicas apropiadas (204). Entre las formas que se pueden encontrar los biomateriales se encuentran las espumas, microesferas, microtubos o nanopartículas.

En el campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología, los nuevos materiales de síntesis (biomateriales) de composición y porosidad variable han sido utilizados con éxito para rellenar cavidades en donde han mostrado una excelente capacidad osteoconductora y osteointegración, constituyendo hoy en día, una modalidad de tratamiento pasivo de un defecto óseo.

## 11.1. SCAFFOLDS (ANDAMIOS)

Los mamíferos producen y regeneran sus tejidos óseos mediante el depósito de fosfato de calcio junto con una matriz orgánica consistente principalmente de colágeno tipo I, proteínas no colágenas (NCP) y glicosaminoglicanos (GAG) en una disposición laminar concéntrica. Son las fibras colágenas las encargadas de producir el armazón tridimensional sobre el cual se depositarán los cristales de hidroxiapatita carbonatada (205).

El término "andamio" se refiere a estructuras artificiales capaces de soportar el crecimiento de tejidos vivos en tres dimensiones. Se trata de materiales porosos cuya función principal es la de soportar la adhesión, proliferación y migración celular, así como su diferenciación y maduración en un fenotipo osteoblástico (en el caso de andamios de regeneración ósea), actuando como molde para la regeneración de tejido óseo nuevo. Con las condiciones fisiológicas adecuadas, se logra que las células produzcan o regeneren el nuevo tejido óseo de modo que, a medida que el andamio se degrada, es reemplazado por la nueva estructura ósea (206).

El objetivo de los andamios no es el reemplazar el defecto de tejido óseo por material sintético, sino el de actuar como una fase intermedia, servir como guía para estimular el crecimiento de hueso nuevo. Estos andamios actúan fundamentalmente, como redes osteoconductoras, que permiten la invasión vascular y el desarrollo de hueso a partir del hueso vivo adyacente; poco a poco mientras la matriz se va reabsorbiendo con mayor o menor facilidad según sus composición, el defecto óseo va siendo sustituido progresivamente por el hueso neoformado (*creeping-substitution* ó sustitución por arrastre) (207).

Además de la función osteoconductor, los andamios pueden servir como vehículos de entrega de las citocinas como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento tipo insulina (IGF) y factores de crecimiento (TGF) que transforman células precursoras del huésped a células productoras de matriz ósea, proporcionando así osteoinducción (208).

Por último, la osteogénesis se produce por la migración de células a través del tejido colindante o por el sembrado de los andamios antes de la implantación con células que crearán nuevos centros de formación ósea, como osteoblastos y células mesenquimales que tienen el potencial de diferenciarse a un linaje osteoblástico.

La combinación de andamios, citocinas y células en ingeniería tisular para generar tejido óseo proporciona hipotéticamente una regeneración ósea *in vivo* más efectiva que la utilización del biomaterial sin más.

El andamio sintético ideal debería presentar una superficie biomimética, tener una microestructura porosa que permita el crecimiento de hueso en su interior, pero siendo lo bastante resistente para soportar la carga estructural del hueso en el que se implanta. Además debería ser biodegradable a una velocidad acorde con la remodelación, y presentar capacidad de promover cambios en el microambiente que ayuden a la consolidación ósea, por lo que tanto la composición del material como la arquitectura intrínseca del mismo juegan un papel crítico en el éxito del andamio (206).

Los andamios para la regeneración ósea deben cumplir ciertas propiedades para poder realizar esta función como la biocompatibilidad y la biodegradabilidad a una velocidad acorde con la remodelación; además el andamio a implantar debe

cumplir una serie de propiedades mecánicas similares a las que tiene el hueso del lugar donde se implantará (207).

El andamio ideal para la regeneración ósea debe cumplir las siguientes propiedades (4,209).

1. Debe favorecer la osteogénesis: **OSTEOGENICIDAD**
2. Debe crear una interfaz estable con el hueso receptor sin interposición de tejido fibroso (**OSTEOINTEGRACIÓN**)
3. Debe posibilitar una respuesta biológica específica en su interfaz con el hueso receptor, favoreciendo el enlace de ambos y sin formación de tejido cicatricial (**BIOACTIVIDAD**) (210)
4. Debe tener una estructura tridimensional que sirva de plantilla para la regeneración del hueso: **OSTEOCONDUCTIVIDAD**
5. Ser biocompatible y no dar lugar a productos tóxicos y ser fácilmente excretado por las vías normales de eliminación del cuerpo humano: **BIOCOMPATIBILIDAD**
6. Debe tener propiedades mecánicas similares a las del hueso huésped y/o facilitar la transferencia de cargas para el desarrollo del hueso: **RESISTENCIA MECÁNICA**
7. Cinética de reabsorción similar a la velocidad de osteoformación: **DEGRADABILIDAD**
8. Promover la adhesión y la diferenciación celular hacia la síntesis de matriz ósea mineralizada, mediada por los factores locales de crecimiento (**OSTEOINDUCCIÓN**)
9. Debe presentar una forma óptima para el facilitar el relleno de defectos (**MANEJABILIDAD**)



10. Debe tolerar las medidas de esterilización requeridas internacionalmente para uso clínico.

Todas estas propiedades de los andamios, dependen en primer lugar de la naturaleza del biomaterial y en segundo lugar del proceso de fabricación del mismo (209).

Las propiedades y los requerimientos para la creación de andamios en ingeniería de tejido óseo se han examinado de forma exhaustiva, cabe destacar el interés que existe en cuanto a la demandas mecánicas y la capacidad de degradación.

La tasa de degradación del andamio se ve influenciada por la porosidad y por el tamaño de poro. Un área de superficie de poro mayor mejora la interacción de los materiales de andamio con el tejido del huésped y de este modo se puede acelerar la degradación por los macrófagos a través de la oxidación y / o hidrólisis (207).

En cuanto a la resistencia, el andamio debe soportar las demandas mecánicas del sitio lesionado durante todo el proceso de regeneración, lo que implica que las propiedades y mecanismos de degradación deben trabajar en equilibrio con la formación de tejido nuevo. Esta es un área que le ha costado mucho esfuerzo a la comunidad científica, de hecho, todavía no está claro si este equilibrio implica que la tasa de formación de tejido y de degradación del material deben ser iguales, o si alguna debería ir más avanzada que la otra. Esto dependerá principalmente de las propiedades del material, de la zona por regenerar y del paciente como tal (209,211).

Son muchos los materiales que han sido estudiados para su uso en ingeniería del tejido óseo. Estos pueden tener origen natural o sintético y de composición

variable. Para su fácil comprensión, se han dividido en dos grandes grupos: sistemas acelulares y celulares. El primero, lo constituyen materiales reabsorbibles, orgánicos e inorgánicos, para relleno de cavidades facilitando la migración de células madres mesenquimales y su posterior diferenciación a osteoblastos permitiendo el crecimiento óseo en su interior y sin componentes celulares adicionales. Destacan por su frecuente aplicación clínica la cerámicas de fosfato (hidroxiapatita, fosfato cálcico y compuestos), biovidrios, polímeros y carbonato cálcico. Por el contrario, los segundos son andamios que previamente al implante han sido sembrados con células precursoras aisladas del mismo paciente.

Entre los diversos tipos de biomateriales existentes para la fabricación de andamios de tejido óseo, son las cerámicas bioactivas las que cada vez atraen mayor atención, debido a la excelente biocompatibilidad, degradabilidad y osteoconductividad así como por tener una influencia positiva en la respuesta biológica celular favoreciendo entre otros aspectos la diferenciación de las células (212). Tienen además, características muy similares a la hidroxiapatita biológica que compone el hueso natural, es decir, presentan carácter nanocristalino, no son estequiométricas, son deficientes en calcio y son capaces de incorporar diferentes iones en función de la naturaleza de los reactivos y del medio, y además están caracterizadas como materiales biocompatibles, bioactivos y osteoconductivos (206).

Son materiales muy versátiles que permiten la modificación de su composición química obteniendo propiedades biológicas cada vez mejores (7). Cabe destacar la capacidad común que presentan todos estos biomateriales para establecer enlaces directos con el hueso, sin interposición de cápsula fibrosa, concepto definido como bioactividad (212), proporcionando un andamiaje seguro que favorece la

neoformación ósea.

Algunas cerámicas bioactivas tales como la hidroxiapatita (HAP), el fosfato tricálcico (TCP), el vidrio bioactivo (BG) y el sulfato de calcio (CS) se han investigado profundamente como biomateriales debido a su capacidad para formar enlaces directos con el hueso vivo después de su implantación en defectos óseos (212).

Dentro de la amplia variedad de compuestos cerámicos, la efectividad como sustituto óseo de los materiales de fosfato cálcico y en concreto de la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ha sido ampliamente demostrada (213–215).

El problema principal que plantea la HA es que posee pobres propiedades mecánicas debido a que es frágil y quebradiza, lo que ha reducido sus aplicaciones; por lo que si se desea que el implante se pueda someter a carga más elevada, es necesario modificar sus propiedades mecánicas. Se han generado técnicas de procesamiento innovadoras que han mejorado las propiedades mecánicas del producto final (75). Un método simple y eficaz para mejorar la resistencia es combinar la estructura básica de andamio cerámico con un recubrimiento de polímeros o mediante la formación de microestructuras interdigitadas de cerámica-polímero. Al añadir el polímero se ocupan las microfisuras existentes en la estructura cerámica aumentando la resistencia global del andamio y en algunos casos incluso proporcionando efecto de refuerzo. El mecanismo se cree que es análogo al proceso de fractura del hueso y la dentina, en donde las fibras de colágeno proporcionan un elemento de fortaleza (216). El alcance real de este efecto de refuerzo dependerá de las propiedades mecánicas del polímero, la calidad de la infiltración y las condiciones en la interfaz polímero-cerámica (217).

Para describir la arquitectura de los andamios óseos distinguimos tres niveles (201,218):

La macroescala, que se suele cuantificar en milímetros, describe la geometría del andamio. Entre sus características distinguimos la forma externa del *scaffold* según el sitio donde va a ser implantado, las propiedades mecánicas, la densidad y la porosidad. A mayor porosidad mayor facilidad de proliferación y migración celular además de mayor transporte de nutrientes.

La microescala describe parámetros del orden de  $\mu\text{m}$  como el tamaño del poro, la interconexión de poros y la degradabilidad.

La nanoescala: mide características en nanómetros. Valora características como la topología de la superficie de los poros y la fisicoquímica superficial.

Para conseguir la síntesis de andamios con propiedades determinadas en las distintas escalas se usan distintos métodos. Estos procedimientos se clasifican en convencionales y de prototipado rápido que se describirán más adelante.

En cuanto a su estructura, los andamios pueden ser inyectables o prefabricados. Los inyectables, cuyo ejemplo más representativo son los hidrogeles, pueden ser introducidos en forma líquida en la lesión y llevan a cabo el proceso de entrecruzamiento (*cross-linking*) in situ, por lo tanto, la forma del defecto no es una limitación para este tipo de estructuras. Sin bien es cierto que su implantación es poco invasiva, también puede resultar citotóxica. En muchos casos, para poder llevar a cabo el entrecruzamiento es necesaria la presencia de iniciadores o la aplicación de luz ultravioleta. Esto, aunado a que el entrecruzamiento es generalmente un proceso exotérmico, puede ir en detrimento del tejido circundante. Otro aspecto que limita el

alcance de los andamios inyectables es que sus propiedades mecánicas son inferiores a las de los prefabricados, y por ello sólo se aplican a ciertas estructuras maxilofaciales o de otras zonas que soportan poca carga (209,219,220).

Los andamios prefabricados son aquellos que se construyen antes de ser implantados en el defecto óseo. Estas estructuras tridimensionales poseen diversas ventajas sobre las inyectables, entre las que se encuentran propiedades mecánicas mejores y facilidad de obtención de macroporosidad, que permita un buen nivel de conducción y mejor control de la morfología estructural. Estos tipos de andamios se prestan para aplicaciones en la regeneración de hueso en zonas de alta demanda mecánica. Las arquitecturas y morfologías son muy variadas, pero las más comúnmente utilizadas para hueso son las esponjas porosas (209).

## **11.2. POROSIDAD**

Las células son sensibles a las señales químicas y mecánicas de su entorno, de tal forma que las propiedades del medio en el que se encuentran influyen en el metabolismo celular y en el caso del tejido óseo en el proceso de osteogénesis (137).

La estructura definitiva del hueso, aunque resistente, no es un material compacto sino que posee porosidades que se intercomunican. La estructura porosa del hueso esponjoso representa un volumen del 50-90% (densidad medida en el hueso cortical del fémur  $1,85 \pm 0,006 \text{ g/cm}^3$ ) (3). El hueso cortical es una estructura sólida con una serie de canales denominados haversianos, con un área de sección transversal de 2500-12.000  $\text{mm}^2$  que da como resultado una porosidad del 3-12% (221). El diámetro de los poros es distinto en el hueso cortical que en el esponjoso,

siendo en el primero de un tamaño de 100-150  $\mu\text{m}$ , y en el segundo de 500-600  $\mu\text{m}$  (222).

Para conseguir el éxito de un sustituto óseo, éste ha de favorecer la regeneración del tejido óseo en las tres dimensiones, para lo cual, es imprescindible que el andamio sea poroso y que presente unas características en cuanto a tamaño de poro e interconexión entre poros que facilite la colonización y la migración celular a su través y el desarrollo de una neovascularización que permita la difusión y transporte de nutrientes y productos de desecho dentro y fuera del mismo.

La eficiencia de los andamios depende de la porosidad y del tamaño de los poros del material (137). Estudios *in vivo* de biomateriales han comprobado que una mayor porosidad favorece una mayor neoformación ósea mientras que materiales con densidad escasa de porosidad la impiden (137,207). Por otra parte la porosidad debe estar interconectada. Sin conexiones entre poros, la migración celular y la vascularización se detienen, aún en andamios altamente macroporosos (137,223).

La porosidad se define como el porcentaje de espacio vacío en un sólido (224). Es una propiedad morfológica independiente del material. Los poros son necesarios para la formación del tejido óseo, ya que permiten la migración y la proliferación de osteoblastos y células mesenquimales, así como la creación de neovascularización (225). Además, una superficie porosa mejora el acoplamiento mecánico entre el biomaterial implantado y el hueso circundante, proporcionando una mayor estabilidad mecánica a esta interfaz crítica (226).

La necesidad de la existencia de porosidad en la regeneración ósea ha sido demostrada por Kuboki y col. utilizando un modelo de rata ectópico al que implantó partículas de hidroxiapatita sólidas y porosas para el desarrollo de BMP-2: no hubo

crecimiento de hueso en el caso de las ratas a la que se les implantaron partículas sólidas, mientras que en los andamios porosos de hidroxiapatita se produjo osteogénesis (225).

Es en este momento es donde desde el punto de vista de la ingeniería de materiales se plantea un conflicto: la proporcionalidad inversa entre los requerimientos biomecánicos del implante con el grado de porosidad y el tamaño de poro del mismo; y una proporción directa entre el grado de porosidad y la biocompatibilidad del material.

Este fenómeno se puede explicar al observar el gráfico de estas dos curvas y observar la resistencia que posee un cubo de HA carbonatada (composición inorgánica similar a la del hueso) al aumentar gradualmente el número y tamaño de los poros (Figura 7) (205,227).



**Figura 7:** Tamaño de poro versus biocompatibilidad versus respuesta mecánica.

El tamaño de los poros y la porosidad son características importantes de los sustitutos de injerto óseo. No existe un tamaño o intervalo de tamaños de poro común para regenerar los diversos tejidos, sino que depende del tamaño de las células involucradas en el proceso específico de regeneración (228).

En general se describen las siguientes tendencias (7,223,229):

- Poros menores a 40  $\mu\text{m}$  favorecen el crecimiento de fibroblastos. No se observa formación ósea.
- Poros entre 40 y 100  $\mu\text{m}$  estimulan el crecimiento de osteoide (matriz ósea).
- Poros entre 100 y 500  $\mu\text{m}$  permiten la formación directa de hueso mineralizado. Los poros de 300 a 500  $\mu\text{m}$  son ideales para la invasión ósea .
- Poros mayores a 500  $\mu\text{m}$  permiten la rápida vascularización, a lo que se suma una mayor penetración de tejido óseo si los poros se encuentran interconectados (230,231)..

Aunque la macroporosidad (tamaño de poro > 50  $\mu\text{m}$ ), también tiene un fuerte impacto en la respuesta osteogénica la microporosidad (tamaño de poro < 10  $\mu\text{m}$ ) y la porosidad/rugosidad de las paredes del poro. La microporosidad resulta en una mayor superficie que contribuye a una mayor adsorción de proteína ósea inductora, así como al intercambio de iones y la formación de una apatita similar al hueso mediante disolución - precipitación. La rugosidad de la superficie a nivel submicrométrico y nanométrico favorece la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células formadoras de hueso. En conjunto ambos factores favorecen la adsorción de mayor número de células, mayor intercambio iónico y mayor formación de apatita similar al hueso natural (232–234).

Yuan demostró como barras recubiertas de hidroxapatita con tamaño de poro medio de 200  $\mu\text{m}$  de poro y paredes lisas o con porosidad mínima fracasan en la



inducción de formación de hueso ectópico en los perros al contrario que lo que ocurría con implantes hechos del mismo material con tamaño de poro medio de 400  $\mu\text{m}$  y de superficie rugosa y porosa (232).

Tras el estudio de Hulbert y col, se considera que el tamaño mínimo de poro que se requiere para regenerar hueso mineralizado es de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  (120).

Un tamaño de poro mayor (100-150  $\mu\text{m}$  y 150-200  $\mu\text{m}$ ) favorece un mayor crecimiento óseo en su interior. Por el contrario un tamaño de poro menor (75-100  $\mu\text{m}$ ) resultó en un crecimiento de tejido osteoide no mineralizado y utilizando un tamaño de poro todavía menor (10-44 y 44-75  $\mu\text{m}$ ) resultó en que estos fueran invadidos únicamente por tejido fibroso (120). Estos resultados se correlacionan con el diámetro normal de los sistemas haversianos sistemas normales que es de aproximadamente 100-200  $\mu\text{m}$  (120). Sin embargo, usando técnicas de perforación con láser y titanio, fueron testados en defectos femorales de conejos, en condiciones de no carga, cuatro tamaños diferentes de poro (50, 75, 100 y 125  $\mu\text{m}$ ). El crecimiento óseo fue similar en todos los tamaños de poro, lo que sugiere que 100  $\mu\text{m}$  puede no ser el tamaño de poro crítico para situaciones de no-carga (235).

Sin embargo, algunos autores han comunicado que el tamaño de los poros quizá sea menos crucial que la presencia de interconexión entre poros para facilitar la invasión de células mesenquimales que posteriormente se transformen en células de la estirpe ósea. La interconexión entre poros evita la formación de callejones sin salida, que se asocia con baja tensión de oxígeno; ésta impide que las células osteoprogenitoras se diferencien a osteoblastos (236).

En general se considera que el contenido mínimo de porosidad que favorece el crecimiento óseo es cercano al 60 %, mientras que el mínimo de tamaño de poro donde se ha formado hueso nuevo se sitúa entre 90 y 100  $\mu\text{m}$ . No obstante, se recomienda que el tamaño de poro sea mayor a 300  $\mu\text{m}$  para estimular simultáneamente el crecimiento de hueso y la formación de vasos sanguíneos (7,207,223,229).

### **11.3. MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE CUERPOS POROSOS**

Existen diversos métodos para fabricar cuerpos porosos de HA, los cuales presentan diferencias en factores como el tamaño de los poros obtenidos, interconectividad de los mismos, porcentaje de porosidad y resistencia mecánica. Entre estas técnicas cabe destacar: la utilización de corales y/o esponjas marinas, la producción de cuerpos porosos por bloques con porosidad inducida, la infiltración de espumas poliméricas, la técnica de gel-casting, la liofilización, el moldeo por bartonita y el prototipado rápido (231).

La utilización de corales y/o esponjas marinas para la fabricación de cuerpos porosos se realiza mediante la preparación de los corales eliminando impurezas y materia orgánica, para luego someterlos a un proceso de transformación química mediante una reacción de intercambio hidrotermal, en un reactor a presión y temperatura controlada, en presencia de una disolución de iones fosfatos . Estudios publicados por varios autores demuestran la eficacia de la técnica, consiguiendo espumas hidroxiapatíticas con diferentes grados de porosidad, tamaño del poro y tasa de interconectividad entre poros (230,231,237–239).

La técnica de **Bloques con porosidad inducida consiste en producir** bloques porosos mediante la incorporación a la solución precursora de HA de un agente porogénico (240,241).

La técnica de **Infiltración de espumas poliméricas** consiste en impregnar completamente una espuma polimérica utilizada como base con una suspensión cerámica, una vez impregnada, se retira el exceso de suspensión y se lleva a secado en horno para eliminar el exceso de humedad, posteriormente se realiza un tratamiento térmico en el que se elimina la matriz polimérica y por último se sinteriza la pieza para la consolidación de la estructura; de tal manera que el material cerámico toma la forma de la espuma polimérica, siendo posible controlar el tamaño del poro con las dimensiones que tengan las paredes de dicha espuma (231).

Autores como Saiz y col. (242) utilizaron esta técnica y sinterizaron cuerpos que presentaron poros entre 100 y 200 $\mu\text{m}$ , cuya interconectividad se da a través de ventanas con tamaños que van de 10 a 80 $\mu\text{m}$ . Teixeira y col. (243) obtuvieron cuerpos con porosidad interconectada con un tamaño de poro promedio de 200 $\mu\text{m}$ , con una resistencia a la compresión de 0,07MPa (231).

La **Liofilización** es un proceso que consiste en el vaciado a moldes de una suspensión del material que se desea obtener, para el posterior congelamiento y sublimación del solvente presente, dando como resultado la formación de una estructura laminar, con poros orientados paralelamente y alineados en la dirección de movimiento del frente de congelamiento (244).. Para el caso de los materiales cerámicos debe realizarse una etapa final de sinterización, con el objetivo de consolidar la estructura del bloque obtenido. La porosidad, el espesor de pared, el

tamaño y la orientación del poro están fuertemente correlacionados con los parámetros del proceso, incluyendo la reología de la suspensión y las condiciones de congelamiento (231). Autores como Lee (245), Zhang y col. (246) y McNamara y col. (247) han utilizado esta técnica.

El **Moldeo por barbotina** consiste en la preparación de una suspensión cerámica, que es vertida en moldes fabricados de un material que absorbe la humedad; por lo cual el cerámico queda adherido a las paredes del molde hasta formarse el espesor deseado, luego se someten a un tratamiento térmico de secado a temperatura ambiente y por último un proceso de sinterización. Una de las desventajas del moldeo por barbotina es que sólo permite la obtención de piezas huecas. Generalmente se consiguen cuerpos en verde muy débiles y densos, permitiendo alcanzar porcentajes de porosidad máximo del 63% (248) buscando atenuar estos inconvenientes, se ha variado la técnica mediante la adición de agentes porogénicos a la suspensión antes del vaciado (231).

Autores como Liu (249) mediante esta técnica consigue cuerpos porosos con tamaño de poro entre 160 y 200 $\mu\text{m}$  y con porcentajes de porosidad desde 32 hasta 78%. Cyster y col (227) obtuvo bloques con alta interconectividad de los poros, con un tamaño promedio entre 200 y 500 $\mu\text{m}$ , para una porosidad del 85% pero con baja resistencia mecánica.

La técnica de **Prototipado rápido** es el nombre que recibe un conjunto de tecnologías cuyo objetivo es la elaboración de capas superpuestas que finalmente conforman un prototipo o pieza tridimensional. La reproducción física capa a capa ofrece una gran libertad de formas, difíciles o imposibles de ser obtenidas por tecnologías industriales establecidas. Entre ellas, la técnica de impresión

tridimensional (*3D printing o 3DP*) puede ser empleada para la fabricación de andamios, que pueden ser usados en la ingeniería de tejidos (250,251).

Para la elaboración de cuerpos porosos de HA se parte de una matriz construida por prototipado rápido a partir de materiales poliméricos en estado líquido, la cual es diseñada usando Diseño Asistido por Computador (CAD), teniendo en cuenta que sus paredes proporcionarán el tamaño de poro y la interconectividad necesarios para que se genere la proliferación celular. Posteriormente, la matriz polimérica es infiltrada por la suspensión cerámica de HA, haciendo que ésta penetre por los canales generados en el prototipado rápido, y tras los procesos de secado y sinterización, se logra consolidar la estructura deseada (231). Sin embargo, utilizando la tecnología de prototipo rápido, es difícil fabricar andamios que posean poros de tamaño dentro del rango de varios nanómetros a varias micras; por lo tanto, no cumplen los requisitos para el crecimiento de tejido óseo (231).

### **La técnica Gel- Casting**

La fabricación de espumas de HA por la técnica gel-casting que es la técnica mediante la que se ha sintetizado nuestra espuma consiste en la polimerización de una solución acuosa de polvo cerámico con monómeros orgánicos añadiendo un agente tensioactivo no iónico para formar una espuma, obteniéndose cuerpos con porosidad abierta e interconectada que posibilitan el crecimiento celular y la vascularización en su interior al momento de ser implantados, mejorando así la osteointegración del material (214).

Sepúlveda y col. en 2000 (252) fabricaron mediante esta técnica cuerpos

altamente porosos. En sus primeras experimentaciones consiguieron poros entre 20 y 1000  $\mu\text{m}$ , con resistencia a la compresión de 4,7MPa para una porosidad del 80,7%, lo cual es un resultado óptimo, ya que en la literatura correspondiente a la patente del método de gel-casting.

Más recientemente Zhao y col. (253) combinaron las técnicas de gel-casting y lixiviación de partículas y extrusión; utilizando quitina para dispersar las partículas de HA y esferas de cera como agente porogénico. Los resultados mostraron que los cuerpos preparados con diferentes tamaños de esferas de cera, presentaron poros interconectados con porosidad volumétrica aproximada del 86%, mientras que la resistencia a la compresión disminuyó a medida que el tamaño de poro aumentó.

#### **11.4. ESPUMAS CERÁMICAS**

Existen numerosos tipos de andamios prefabricados con arquitectura y morfología variada. De todos ellos las espumas porosas son las más utilizadas.

Una espuma es una dispersión coloidal en la que un gas en forma de burbujas está disperso en un líquido o un sólido continuo. En las espumas líquidas las burbujas tienden a una geometría poliédrica, sin embargo, al referirse al tamaño de las mismas se hace referencia al diámetro de la burbuja como si fuera esférica (137).

Los principales métodos de espumado de líquidos son:

- El burbujeo de un gas dentro de un líquido
- Dirigir un flujo líquido hacia un líquido estable para que la turbulencia genere burbujas de aire en el interior de ambos líquidos.

- Reducir la presión o incrementar la temperatura de una disolución líquida de gas, generando la rápida nucleación y crecimiento de burbujas dentro de la solución.
- Agitar turbulentamente un líquido para propiciar la incorporación de aire, con la ayuda de una pala, una propela, un ciclón, un mezclador, etc.
- La inyección conjunta de un líquido y un gas dentro de un dispositivo que a través de patrones de flujo genere la incorporación del gas en el líquido en forma de burbujas dispersas.

La estabilidad de la espuma no necesariamente depende del tamaño de las burbujas contenidas en ella, pero sí existe un tamaño óptimo de burbuja para cada espuma. Además, las espumas no poseen un tamaño único de burbuja, sino que poseen una distribución de tamaños, de acuerdo a las características de cada una de ellas (137).

Es sabido que en general los líquidos puros no forman espumas estables. En la mayoría de los casos espumas líquidas “estables” pueden obtenerse con la incorporación de surfactantes en la disolución. Los surfactantes se adsorben en la interfaz líquido/gas reduciendo la energía interfacial y por tanto facilitan la creación y el mantenimiento de áreas superficiales extensas, asociadas con la dispersión de burbujas en el líquido (137).

Además, la incorporación del surfactante también puede incrementar la viscosidad de la película líquida, lo que evita el drenado e incrementa la estabilidad de la espuma (137).





# ***CAPÍTULO 3:***

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

# **1. HIPÓTESIS**

## **1.1. HIPÓTESIS VERDADERA**

La espuma de hidroxiapatita recubierta por un biopolímero compatible (HABP) creada por la Dra Vallet Regí y colaboradores, es capaz de provocar la curación de un defecto óseo crítico realizado en el cóndilo femoral de conejos machos de la raza Nueva Zelanda esqueléticamente maduros.

## **1.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA / NULA**

La espuma de hidroxiapatita recubierta por un biopolímero compatible (HABP) creada por la Dra Vallet Regí y colaboradores, no es capaz de provocar la curación de un defecto óseo crítico realizado en el cóndilo femoral de conejos machos de la raza Nueva Zelanda esqueléticamente maduros.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Para desarrollar esta Tesis Doctoral nos hemos propuesto el siguiente objetivo general:

- Estudiar in vivo la regeneración del tejido óseo en un defecto cavitario crítico experimental en el cóndilo lateral externo del fémur de conejos machos adultos de raza Nueva Zelanda tras implantar en dichos defectos una espuma de hidroxiapatita recubierta por un biopolímero compatible.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para lograr el objetivo general antes descrito nos hemos formulado los siguientes objetivos específicos:

1. Comprobar que las espumas de HA pueden ser preparadas de forma sencilla bajo las condiciones de esterilidad que supone un quirófano.
2. Comprobar el manejo y comportamiento intraoperatorio de un implante de espuma de HA tallado en función del defecto óseo del estudio.
3. Evaluar histológicamente y de una manera cualitativa la eficacia de la espuma HABP como regenerador de defectos óseos de tamaño crítico y compararla con el grupo control en el que no se implantó material alguno.
4. Evaluar radiológicamente y de una manera cualitativa la eficacia de la espuma HABP como regenerador de defectos óseos de tamaño crítico y compararla con el grupo control en el que no se implanto material alguno.

# **CAPÍTULO 4:**

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

# 1. METODOLOGÍA Y DISEÑO

## EXPERIMENTAL

Hemos diseñado un trabajo experimental, prospectivo, comparativo y controlado para evaluar la actividad biológica de una espuma de hidroxiapatita. Consideramos que el presente trabajo de tesis puede aportar información, resultados y conclusiones de interés para contribuir al desarrollo y mejor conocimiento de los biomateriales cerámicos.

Presentamos la evaluación in vivo del comportamiento de la espuma de hidroxiapatita recubierta por un polímero compatible (HABP) como regenerador de hueso en 15 conejos adultos de raza Nueva Zelanda.

Todos los procedimientos se han llevado a cabo bajo el marco del proyecto Proyecto de Licencia PI45/10, que cuenta con la aprobación por el 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 Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y el Departamento de Patología Animal y el Servicio de Radiodiagnóstico, ambos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

## **2. MATERIAL DE EXPERIMENTACIÓN**

En nuestro trabajo, se describe una espuma tridimensional de hidroxiapatita recubierta por un biopolímero compatible (HABP) diseñada por la Dra. M. Vallet-Regí y cols.. Ha sido diseñada para ser una espuma macroporosa con alto grado de porosidad (70%) y gran área de superficie y presenta un diámetro de poro en el rango de 100-400  $\mu\text{m}$ .

### **2.1. ESPUMA DE HIDROXIAPATITA**

La espuma de hidroxiapatita se ha sintetizado por el Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Se trata de una espuma porosa (70%) de porosidad interconectada con poros esféricos de tamaño en el rango 100-400  $\mu\text{m}$ .

El material utilizado en nuestro trabajo es una espuma de HA obtenida mediante la reacción de tetrahidrato de nitrato cálcico y trietilfosfito (TIP) (Aldrich, Steinheim, Alemania) con una relación molar de F127: TIP = 11.

La espuma macroporosa de hidroxiapatita a estudio se obtiene mediante el método sol-gel combinado con la introducción del surfactante Pluronic F127 ( $\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$ ) como agente director de la macroprosidad (254). Las espumas resultantes son recubiertas de un polímero biocompatible, que las dota de resistencia y flexibilidad para poder adaptarlas al tamaño del defecto óseo como se ha descrito

en un trabajo publicado previamente por el grupo que ha desarrollado la espuma (255).

El método de obtención de la espuma macroporosa HABP consta de tres etapas:

La primera etapa consiste en la síntesis del sol precursor de la hidroxiapatita empleando el método sol-gel, donde se utilizan precursores de fósforo, de calcio y se añade, además, un copolímero como agente director de la macroporosidad. Una vez obtenido el sol, se deja envejecer.

El reactivo precursor de fósforo, trietilfosfito  $P(OCH_2CH_3)_3$  (TIP) se hidroliza en agua destilada durante 24 horas. Paralelamente se mezcla el surfactante no iónico Pluronic F127 ( $EO_{106}PO_{70}EO_{106}$ ) en etanol durante 30 minutos bajo agitación, este surfactante se usará como inductor de macroporo (254). El TIP hidrolizado se añade a la disolución de F127 en etanol y tras 15 minutos de agitación, se añade una disolución acuosa 4M de nitrato de calcio tetrahidratado ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) como fuente de calcio. Se mantiene la relación molar Ca/P en 1,67. Una vez el sol resultante es agitado durante 15 minutos, se introduce en una estufa a  $60^\circ C$  durante 6 horas en reposo para proceder al envejecimiento del sol. Después de estas horas, se diluye el sol en etanol de tal forma, que el etanol total utilizado en toda la reacción mantenga la proporción sol/etanol 1:2. Tras 15 minutos de agitación, se introduce de nuevo el sol en la estufa para proceder a un segundo envejecimiento durante 72 horas, no siendo limitantes ya que el sol tiene un tiempo de vida para obtener hidroxiapatita pura sin otras fases de entre 48 y 72 horas (255,256).

En una segunda etapa, el sol obtenido se conforma para dar lugar a las espumas macroporosas de hidroxiapatita. Para ello, se procede a la evaporación de la fase líquida del sol envejecido, obteniéndose así estructuras en forma de espuma que son posteriormente calcinadas para obtener una espuma macroporosa de fase pura hidroxiapatita. La espuma así obtenida está formada por cristales de hidroxiapatita de tamaño nanométrico (256).

Una vez el sol ha envejecido el tiempo necesario, se procede al vertido de 37,6 ml del sol en placas Petri de vidrio o, para obtener una espuma más uniforme, en una bandeja de aluminio. De esta manera se facilita la evaporación de la fase líquida por el método EISA (Evaporation Induced Self Assembly).

Se introducen los soles en bandejas o placas en una estufa ya preparada a 100°C, y se mantienen a esa temperatura durante una hora para generar la estructura en forma de espuma. Tras dicha obtención, se procede al corte de las espumas en cubos de aproximadamente 1x1 cm (este tamaño se puede modificar a más grande o más pequeño sin variar el producto final) y se procede a su calcinación en aire a 550°C durante una hora para formar la fase de hidroxiapatita nanocristalina.

Finalmente, en una tercera etapa, y con el objetivo de aportar flexibilidad y manejabilidad, las espumas fueron recubiertas mediante inmersión con una solución polimérica aprobada por la Food and Drug Administration de EEUU (FDA) de Gelatina tipo A 1,2%w/v entrecruzada con 0,05% w/v de Glutaraldehído (Glu). Se dejan en agitación durante 1 hora a 20°C. Finalmente se seca al aire quedando ya preparadas para su utilización (255,256).

La cantidad de biopolímero presente en la espumas se determinó en estudios



previos mediante análisis termogravimétrico mostrando un contenido del mismo en la espuma HABP de 20 +/- 2 % (255,256).

Las espumas recubiertas resultantes se pueden cortar en trozos del tamaño y forma que se requiera.

La caracterización de las espumas antes del recubrimiento polimérico, mediante difracción de rayos X, indica la presencia de máximos de difracción correspondientes solamente a la fase cristalina pura de la hidroxiapatita.

La espuma obtenida (antes del recubrimiento polimérico) está formada por cristales de hidroxiapatita de tamaño nanométrico, como se ha determinado por microscopía electrónica de transmisión.

La espuma presenta una estructura macroporosa con poros esféricos interconectados con tamaño en el rango de 10-500  $\mu\text{m}$  antes, y 100-400  $\mu\text{m}$  después del recubrimiento polimérico. El porcentaje de porosidad de la espuma es del 70%.

La espuma recubierta con el polímero presenta flexibilidad tras su inmersión en agua durante 3-8 minutos produciéndose un ligero hinchamiento de la misma.

Las mediciones de porosimetría se llevaron a cabo en un porosímetro AutoPore III (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA, E.E.U.U.), y las de difracción de rayos X (DRX) en un difractómetro Philips X'Pert usando radiación  $\text{Cu}\alpha\text{K}$ . Más detalles de la caracterización de espumas se han publicado anteriormente (255,257).

El material a estudio fue finalmente tallado con bisturí aportándole una morfología cilíndrica de 10 mm de profundidad y 6 mm de diámetro (Fig. 8).



**Figura 8:** Espumas de HABP

Antes de proceder al estudio experimental *in vivo* se realizó una prueba de esterilización de la espuma HABP con óxido de etileno en la central de esterilización del Hospital Universitario Miguel Servet. La espuma sometida a esterilización se envió al Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, para que se comprobara la no modificación de las características físico-químicas de la espuma HABP tras ser sometida al proceso de esterilización, observándose una conservación intacta de la tasa de porosidad y el tamaño de poro.

Estas espumas han sido propuestas previamente por el grupo del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid como material para el tratamiento de la intoxicación por metales pesados tras la ingestión y como purificadores de metales pesados de aguas (255,258).

### 2.1.1 ESTUDIOS PRELIMINARES IN VITRO

La combinación HA - biopolímero que hemos utilizado se obtuvo tras un trabajo previo. En él, Vallet y col, obtuvieron una espuma macroporosa de HA nanocristalina sintetizada mediante la técnica de sol - gel desarrollada por Brinker y col. (254,259) utilizando un surfactante no iónico, el Pluronic F127 como agente espumante o modelador de poros. Se prepararon unos soles acuosos hidrolizando trietilfosfito  $P(OCH_2CH_3)_3$  (TIP) y se añadieron a una solución de etanol de Pluronic F127 ( $EO_{106}PO_{70}EO_{106}$ ).

Cuatro relaciones molares diferentes de F127/TIP entre 0 y 14 fueron utilizadas para dilucidar su influencia en la macroporosidad resultante de la espuma de hidroxiapatita, manteniendo siempre constante la concentración de tensioactivo en etanol. Esos compuestos se denominaron  $HA_0$ ,  $HA_{2.6}$ ,  $HA_{11}$  y  $HA_{14}$ .

Con el fin de seleccionar la espuma de HA con estructura macroporosa tridimensional óptima, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido y estudios de difracción de rayos X y de intrusión en Hg. Como conclusión de este estudio se obtuvo, que la espuma  $HA_{11}$  era la muestra con mayor macroporosidad interconectada y con la estabilidad mecánica suficiente para ser manipulados para aplicaciones biomédicas.

Debido a la debilidad inherente de la HA, ésta fue recubierta por un polímero compatible y aprobado por la FDA.

La gelatina es un polímero natural altamente biodegradable en medio acuoso y muy hidrófilo. Al mezclarlo con glutaraldehído (G / Glu), su rápida degradabilidad en soluciones acuosas disminuye. (260,261). La gelatina fue elegida como polímero

de endurecimiento ya que es una forma hidrolizada del colágeno, que es un constituyente principal de la matriz extracelular de todos los tejidos (262) y por ser una proteína biocompatible que al introducirla en un cuerpo vivo muestra una baja antigenicidad y muy elevada bioabsorción (263,264).

Tras observar que los resultados de los estudios *in vitro* de la respuesta de las células osteoblásticas-like tras ser sembradas en las espumas de HA mostraban un excelente rendimiento. Y que los estudios *in vitro* sobre el proceso de degradación de dichas espumas mostraban una tasa de degradación adecuada con productos de degradación no citotóxicos; se propuso la realización de un estudio *in vivo* del potencial de estas espumas como regeneradores de hueso. Este estudio se realizó sólo para la espuma de HA recubierta con gelatina reticulada con glutaraldehído (HA G/Glu).

## 2.2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se eligió como animal de experimentación el conejo macho adulto de raza Nueva Zelanda (Fig. 9) por ser un animal usado habitualmente para este tipo de estudios y por la gran facilidad para la obtención de una muestra homogénea. El grupo de trabajo posee amplia experiencia en el manejo y cuidados de este animal (186,187,265–268).



**Figura 9:** Conejo macho de la raza albina Nueva Zelanda

El Diseño experimental comprende la utilización de 15 conejos de raza Nueva Zelanda esqueléticamente maduros de nueve meses de edad y un peso promedio de 3,751 g (3,231-4,450 g). El tamaño de las extremidades permitió la realización de la intervención quirúrgica que se describe a continuación.

Los animales de experimentación procedían de una granja de cría homologada, proveedora del Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza. Los animales fueron trasladados a las dependencias del Servicio de Biomedicina y Biomateriales tres días antes de la intervención para su adaptación a las instalaciones. Allí fueron convenientemente identificados y pesados.

Los animales fueron estabulados en jaulas individuales (Fig. 10), en condiciones normales (temperatura ambiente de  $20 \pm 0,5$  ° C, humedad relativa de  $55 \pm 5\%$ ) y con periodos alternantes de luz-oscuridad de 12 h/12 h. Los animales fueron alimentados con pienso homologado especial para conejos (Nantas<sup>®</sup>), ingesta de agua *ad libitum*, y sin restricción en cuanto a su movimiento en las jaulas de estabulación según la normativa europea (directiva 86/609/CEE, regulada en España por el Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos). El día anterior a la intervención se procedió a rasurar ambas rodillas del animal, donde estaba prevista la intervención quirúrgica.



**Figura 10:** Estabulación de los animales en los recintos destinados para ello en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

### **3. ANESTESIA Y ANALGESIA DE LOS ANIMALES**

Las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo en condiciones asépticas y bajo anestesia general con cumplimiento estricto del protocolo del servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza.

La inducción anestésica se realizó mediante inyección intramuscular de hidrocloreuro de medetomidina (Domtor<sup>®</sup>) 5 mg/Kg junto con Ketamina IM 75 mg / Kg (Ketolar<sup>®</sup>). La sedación profunda del animal fue inhalatoria, mediante mascarilla (oxígeno e isoflurano a 2,5 l/minuto y 0,8-1,5 l/minuto respectivamente). Para la analgesia, se empleó Buprenorfina (0,001-0,05 mg/Kg) de forma subcutánea o intravenosa.

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).

La esterilización de los implantes se realizó mediante gases (óxido de etileno), por lo que se abrieron los envases de esterilización en la mesa del instrumental durante 15 minutos antes de la implantación. De esta forma se evita la toxicidad del óxido de etileno en los tejidos si se implantase directamente (269,270).

Las incisiones se suturaron con Vycril 3/0 y seda trenzada de calibre 3/0.

#### **4. TÉCNICA QUIRÚRGICA**

El animal se colocó en la mesa quirúrgica en decúbito supino. El campo quirúrgico se delimitó con paños estériles.

El abordaje quirúrgico se realizó mediante una incisión cutánea longitudinal de aproximadamente 3 cm sobre el cóndilo femoral lateral. La rótula proporciona una referencia para la localización del cóndilo medial. A continuación se incidió la fascia muscular y el vasto lateral, lo que nos permitió acceder a la región metafisaria del fémur distal.

Una vez localizado el hueso, se desperiostizó la cara lateral de la metafisis distal del fémur. Tras la localización de la parte central de cóndilo lateral y mediante una broca maciza de 6 mm de diámetro montada en un motor eléctrico estéril, se realizó un defecto óseo de 6 mm de diámetro y 1 cm de profundidad.

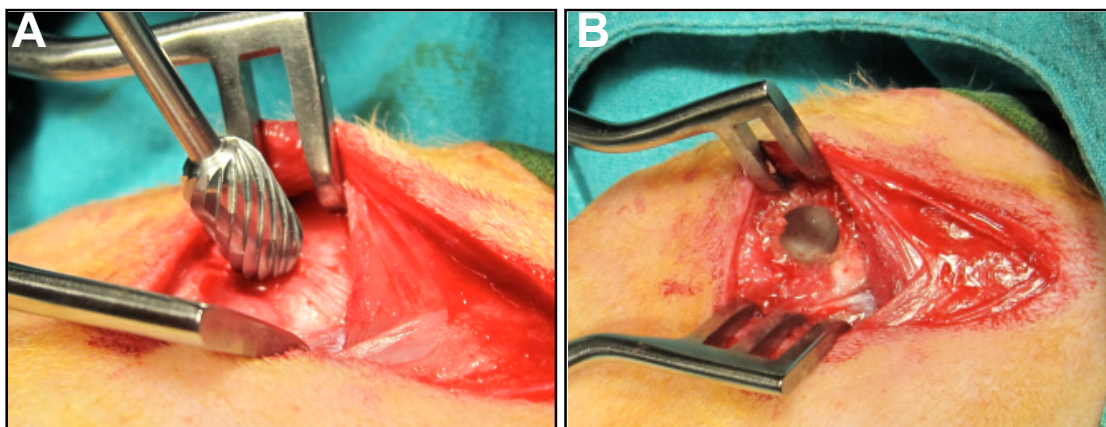
Una vez que se completó el defecto cavitario, se lavó con abundante suero fisiológico para eliminar los detritus, se secó el área con una gasa y luego se colocó el implante correspondiente, comprobándose su estabilidad intrínseca primaria en el lecho receptor.

Finalmente se suturó la fascia muscular con puntos simples de Vycril 3/0 y la piel con seda de 3/0. No se dejaron drenajes ni apósitos.

## 5. DEFECTO ÓSEO

Se escogió el fémur del conejo por su semejanza anatómica con el fémur humano y su fácil accesibilidad.

Utilizando irrigación continua con solución salina fisiológica para evitar la necrosis del hueso, se practicó un defecto óseo con broca motorizada en la cara lateral de ambas epífisis femorales distales. Dicho defecto óseo presentaba una morfología cilíndrica de 10 mm de profundidad y 6 mm de diámetro. (Fig. 11)



**Figura 11:** Defecto óseo realizado en el cóndilo lateral externo de ambos fémures con una broca motorizada de 6 mm de diámetro.

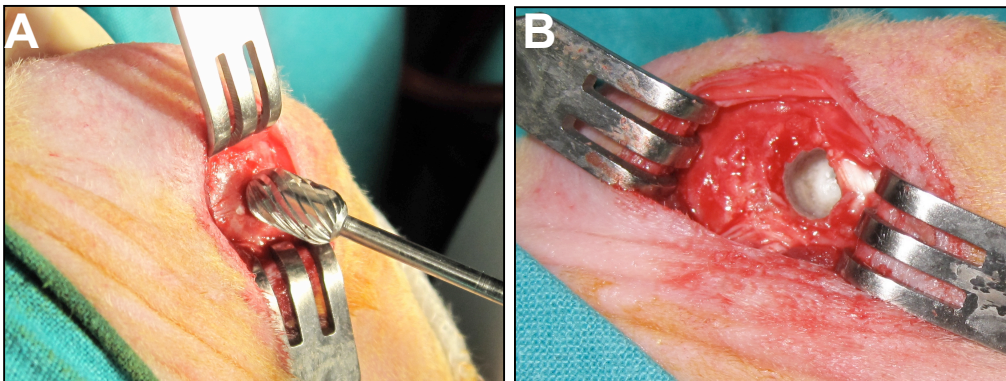
En el defecto óseo realizado en la epífisis del fémur izquierdo (Fig. 12) se introdujo un cilindro de la espuma HABP de las mismas medidas, que había sido previamente tallado con bisturí. El defecto óseo realizado en la extremidad contralateral (Fig. 13), se cerró sin haber sido rellenarlo con material alguno, sirviendo así como defecto óseo control.

El defecto óseo diseñado y sus proporciones corresponden a un defecto óseo crítico, según los requisitos de la norma (140,182,266,271,272)





**Figura 12:** Defecto óseo realizado en el fémur IZQUIERDO. A) Puede observarse el defecto óseo y la espuma tallada con el mismo tamaño. B) Defecto óseo con la espuma HABP introducida que se adapta perfectamente al defecto. C) Puede observarse como la espuma rellena el defecto óseo creado por imbibición de la sangre de las paredes óseas.



**Figura 13:** Defecto óseo realizado en el Fémur DERECHO. A) Realización del defecto óseo con broca motorizada de 6 mm de diámetro. B) Puede observarse el defecto óseo de idénticas características al realizado en el fémur izquierdo.

## 6. ESTUDIO RADIOGRÁFICO

Tras la intervención se realizó un estudio radiológico digitalizado (tubo de alta ionización Sedecal.: 400 mA, 500 mAs, 150 kV. Radiografía digital indirecta, lector digital Fujifilm, FCR Prima).

En el postoperatorio inmediato y bajo sedación se realizaron radiografías digitales en proyección lateral estandarizada de la extremidad distal de ambos fémures (Fig. 14). Dicho estudio se repitió de forma mensual hasta el 4º mes de seguimiento, momento en el que estaba previsto la eutanasia de los animales.

Sólo decidimos realizar una proyección radiográfica por economía y radioprotección del doctorando y directores que mantuvimos inmovilizado el animal bajo sedación durante la realización de la misma.

Para minimizar el sufrimiento del animal durante la realización de las radiografías, se utilizó sedación con Domtor ® (0,5 mg/Kg) y Ketamina (25 mg/Kg) vía IM



**Figura 14:** Imagen de la realización de las imágenes radiográficas

En este trabajo utilizamos la escala de Lane y Sandhu (273) para la valoración radiológica. Esta escala asigna una puntuación de 0 a 4 en función de la neoformación ósea porcentual. Debido a la variabilidad interobservador se estimó por la Doctorando y por los Directores realizar una valoración inicial de forma individual y posteriormente consensuada para unificar criterios.

<b><i>Formación ósea</i></b>	<b>Puntuación</b>
No evidencia de formación ósea	0
Formación ósea que ocupa el 25 % del defecto	1
Formación ósea que ocupa el 50 % del defecto	2
Formación ósea que ocupa el 75 % del defecto	3
Formación ósea que ocupa el 100 % del defecto	4
<b><i>Remodelación:</i></b>	
No evidencia de remodelación	0
Indicios de remodelación en canal intramedular	2
Remodelación completa hasta la cortical	4

**Tabla 1.** Criterios de Lane y Sandhu para la valoración radiológica (273).

## **7. EUTANASIA Y REALIZACIÓN DE ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO**

Los animales se mantuvieron estabulados durante 4 meses, periodo tras el cual fueron sacrificados farmacológicamente bajo anestesia general.

Llegado el momento de la muerte de los animales, se les administró 5 ml de Tiobarbital por vía intravenosa, previa sedación con Ketamina intramuscular (25 mg/Kg).

El estudio necrópsico e histológico se realizó en las dependencias del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Tras la muerte de los animales se extrajo el tercio distal de ambos fémures, liberándolos de partes blandas, para su estudio anatomopatológico micro y macroscópico. Las piezas fueron fotografiadas realizando un estudio macroscópico comparativo entre los dos grupos.

Posteriormente se conservaron en formol hasta su ulterior procesamiento histológico.

### **7.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA**

La apariencia de la zona de implantación fue evaluada visualmente tras la extracción de los fémures de los animales una vez eutanasiados. Así mismo se tomó un registro fotográfico del aspecto del tercio distal de ambos fémures.

## **7.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA**

Se realizó un estudio histológico cualitativo del defecto óseo tras 4 meses de su creación, con la intención de analizar si la espuma HABP era eficaz en la regeneración de la lesión ósea creada con un tamaño crítico.

### **7.2.1. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO**

Las muestras fueron procesadas para su estudio histológico con técnica para hueso decalcificado realizándose los pasos siguientes:

#### **7.2.1.1. Fijación**

El objetivo de la fijación es la conservación del tejido en condiciones tan naturales como sea posible. La fijación evita los cambios autolíticos y de putrefacción de los tejidos, el crecimiento bacteriano y su desecación.

De cada animal incluido en el experimento se obtuvieron tres secciones longitudinales de 3 mm de espesor de ambos fémures, se introdujeron en una solución tamponada de para-formaldehído (10%) para la fijación por inmersión durante 15 días.

#### **7.2.1.2. Descalcificación**

Tras la fijación, las muestras fueron lavadas en solución y descalcificadas en ácido nítrico al 5% durante 10 días.

#### **7.2.1.3. Deshidratación**

Los tejidos fijados húmedos, no pueden ser directamente inmersos en parafina. En primer lugar el agua de los tejidos ha de ser eliminada y esto se lleva a

cabo mediante el proceso denominado de deshidratación que consiste en pasar el tejido por alcoholes de concentración ascendente.

Para el estudio histológico, las muestras fueron deshidratadas a través de una serie graduada de alcoholes (70, 96 y 100%) y se aclararon con xileno, antes de ser incluidas en parafina.

#### **7.2.1.4. Inclusión**

Consiste en colocar el tejido en un recipiente con parafina líquida dentro de una estufa de temperatura fija. Posteriormente se procede a la elaboración de bloques.

En nuestro caso las muestras fueron incluidas en parafina en un procesador de Leica TP 1050 con el objetivo de realizar bloques para su sección en el micrótopo.

#### **7.2.1.5. Cortes histológicos**

Una vez finalizado el correspondiente proceso de decalcificación e inclusión en parafina los bloques se cortaron en secciones sagitales de 4  $\mu\text{m}$ . mediante el MicrotopoShandon Finesse 325, posteriormente se desparafinaron y se rehidrataron.

#### **7.2.1.6. Tinciones**

Las muestras fueron teñidas mediante dos métodos de tinción diferentes, la técnica de tinción hematoxilina-eosina (H / E) y el método de tinción del tricrómico de Masson-Goldner.

Las secciones histológicas fueron examinadas con un microscopio Zeiss AxiokoP 40 y se obtuvieron microfotografías con la cámara Zeiss AxioCam MRC5.

# **CAPÍTULO 5:**

# **RESULTADOS**

# 1. CARACTERIZACIÓN DE LA ESPUMA HIDROXIAPATITA

Como se ha informado previamente, la espuma HABP a estudio tienen una relación de hinchamiento de 400W% cuando es sumergida en una solución acuosa debido a la naturaleza hidrofílica de gelatina entrecruzada con glutaraldehído (255). Esta capacidad de hinchamiento de las espumas permitió llenar la cavidad del defecto óseo perfectamente, tras ésta haberse hidratado mediante la sangre circundante, lo que condujo a una buena fijación primaria dentro de las paredes óseas (Fig 15).

## 2. HALLAZGOS INTRAOPERATORIOS

Los cilindros de espuma HABP esculpidos fueron de fácil manejo durante la cirugía, manteniéndose estables en el defecto óseo. Una vez implantados, se observó como los cilindros de espuma HABP tallados se hidrataron progresivamente por la sangre desde el hueso circundante, aumentando su estabilidad durante la operación, por medio de una adaptación elástica de su forma y contorno a las paredes de los defectos óseos del receptor (Fig. 15).



**Figura 15:** defecto óseo relleno con las espuma HABP. Puede observarse como se adapta de tal manera que prácticamente no hay espacio entre el material y el hueso.

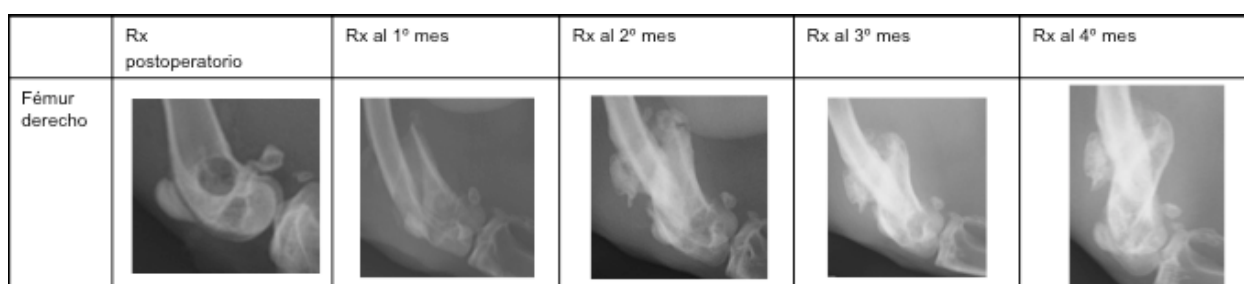


### 3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

De los 15 animales que participaron inicialmente en el estudio dos murieron de manera prematura. El espécimen tipificado como 7170607 murió al mes y 6 días día tras la intervención; en el estudio necrópsico se concluyó que la causa de la muerte fue una gastroenteritis hemorrágica. El espécimen tipificado como 71721 murió al mes y 5 días tras la intervención, los hallazgos postmortem concluyeron que falleció de una enteritis catarral. Por lo que finalmente el número total de conejos que concluyeron el estudio fue 13.

En la radiografía realizada al mes de la intervención del conejo 7170607 se observó una luxación de la rótula en el fémur control. Al morir prematuramente no se le tuvo en cuenta en los resultados.

En la radiografía realizada al mes de la intervención del conejo 71715 se observó la presencia de una fractura supracondílea de fémur derecho. Dicha fractura evolucionó hacia la consolidación y el animal pudo completar el seguimiento previsto (Fig. 16).



**Figura 16:** Imágenes digitales radiográficas en proyección lateral del cóndilo femoral derecho del conejo número 7170607. Obsérvese en rx postoperatoria como no se observa ninguna imagen que predisponga a la fractura. En la imagen rx al mes: fractura supracondílea de fémur que evoluciona hacia una consolidación viciosa.

En varios de los fémures de los animales (fémur derecho de los especímenes 71703, 71704, 71706 y 71708 y fémur izquierdo de los conejos 71705, 71706 y 71720) se produjo una fractura de la pared posterior del cóndilo femoral que pasó desapercibida durante el acto quirúrgico pero que se insinúa en las radiografías postoperatorias. Creemos que pudo ocurrir debido a un mal centrado de la broca y al pequeño diámetro del fémur. Consideramos estas lesiones como fracturas marginales que no alteraron la evolución de la cicatrización del defecto óseo.

La tabla 2 recoge el número con el que se identificó a los animales, el peso de cada uno ellos, los días de la intervención y del éxitus y las incidencias a destacar durante el periodo a estudio.

De los 13 animales que finalmente sobrevivieron todos cumplieron el tiempo de seguimiento previsto. No se observaron efectos locales de irritación tisular, supuración o drenaje desde el lugar de implantación durante todo el seguimiento de los animales.

## ANIMALES DEL ESTUDIO POR ORDEN NUMERICO

Conejo	Peso (Kg)	IQ	Rx postop	Rx 1 m	Rx 2 m	Rx 3 m	Rx 4 m	Éxitus
71702 (jaula 2)	3,983	14/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71703 (jaula 3)	3,760	14/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71704 (jaula 4)	3,884	14/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71705 (jaula 5)	3,665	14/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71706 (jaula 6)	3,231	15/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
7170607 (jaula 7)	4,094	15/02/11	18/02/11	18/03/11 Pérdida de peso. Luxación rótula en FC	✚	✚	✚	✚ 21/3/11 Gastroenteritis hemorrágica en la necropsia
71708 (jaula 8)	3,502	15/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71709 (jaula 9)	3,463	15/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71720 (jaula 10)	3,320	15/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71721 (jaula 11)	3,766	17/02/11	18/02/11	18/03/11	✚	✚	✚	✚ 21/3/11 Enteritis catarral en la necropsia
71712 (jaula 12)	4,106	17/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71717 (jaula 13)	3,628	17/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71714 (jaula 14)	3,504	17/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11
71715 (jaula 15)	3,922	17/02/11	18/02/11	18/03/11 Fractura supracondílea FC	14/04/11 Fractura consolidada	17/05/11 Fractura consolidada	23/06/11 Fractura consolidada	23/06/11
71716 (jaula 16)	4,450	17/02/11	18/02/11	18/03/11	14/04/11	17/05/11	23/06/11	23/06/11

**Tabla 2.** Tipificación, peso y fechas de la realización de las intervenciones quirúrgicas, radiografías y eutanasia de los animales. Se hace constar la fecha y la causa de los animales fallecidos antes de la finalización del estudio experimental.

## **4. HALLAZGOS RADIOGRÁFICOS**

La implantación de biomateriales basados en fosfatos de calcio hace que las imágenes radiológicas presenten, desde el principio, un aumento de densidad que no debe ser confundido con regeneración ósea. (7,157,274,275)

Para la valoración radiológica de la incorporación de los injertos óseos, se han descrito diferentes escalas que ponderan principalmente el aspecto de su área central (7). Sin embargo, no existen baremos específicos de evaluación radiológica para el estudio de los defectos óseos cavitarios tratados con injertos óseos o biomateriales (273,276,277). Nosotros utilizamos la escala de de Lane y Sandhu (273).

### **4.1. FÉMURES IZQUIERDOS**

En el estudio radiográfico seriado no se observaron datos que sugirieran la migración o inestabilidad de los cilindros de la espuma de HABP.

En las imágenes radiográficas laterales realizadas durante todo el seguimiento postoperatorio a las epífisis de los fémures izquierdos donde estaban colocados los cilindros de espuma HABP, se observó que en la radiografía realizada en el postoperatorio inmediato resultaba posible distinguir someramente la morfología del defecto óseo con el material implantado, mientras que en la radiografía realizada a los cuatro meses del postoperatorio, la osificación sobre el material implantado impedía reconocer con claridad los límites del defecto óseo tratado con el material compuesto.

Cabe destacar el incremento significativo de densidad de la imagen radiográfica del defecto donde estaba localizado el cilindro de espuma HABP, en la radiografía realizada al primer y segundo mes postoperatorio. En las radiografías realizadas en los meses 3º y 4º el aumento de densidad fue menor. Sin embargo, en la mayoría de las muestras, la zona central de la espuma mostró menos densidad radiográfica, quizás como expresión del límite centrípeto del crecimiento óseo sobre la espuma. Éste área central de menor densidad se redujo en el tercer mes y casi desapareció al cuarto.

La reparación de la cortical donde se realizó la perforación, colaboró en el aumento de densidad ósea aparente en la proyección radiográfica lateral, lo que pudo comprobarse en el estudio necrópsico postmortem que expondremos a continuación.

Los límites del defecto óseo creado y el contorno del cilindro de espuma HABP fueron más evidentes durante los primeros dos meses de seguimiento, con una densidad radiográfica más pronunciada que el hueso receptor, mostrando una progresiva difuminación durante los meses tercero y cuarto. Este hecho sugiere una reabsorción progresiva centrípeta del cilindro de espuma HABP, en este período del seguimiento.

Esta reabsorción de la espuma HABP, iría acompañado por un proceso simultáneo de crecimiento óseo en la estructura macroporosa de la espuma HABP, en la misma dirección centrípeta, como una sustitución progresiva verdadera, lo que explicaría estas imágenes radiográficas.

Por otra parte y apoyando a esta observación, hubo un desdibujamiento de la densidad radiográfica de la espuma en los últimos dos meses del estudio, sugiriendo que la cicatrización ósea en la espuma estaba casi completa, debido a su porosidad y la interconectividad entre poros.

El estudio radiológico sugiere que la curación del hueso no siguió un patrón convencional de formación de callo, sino un proceso simultáneo de reabsorción de la espuma de HABP y sustitución por hueso nuevo (Fig. 17, 18 y 19); en cambio como veremos a continuación aunque también se produjeron cambios radiológicos en los fémures control, estos se produjeron más lentamente sin observarse imagen de cicatrización radiológica a final del estudio.

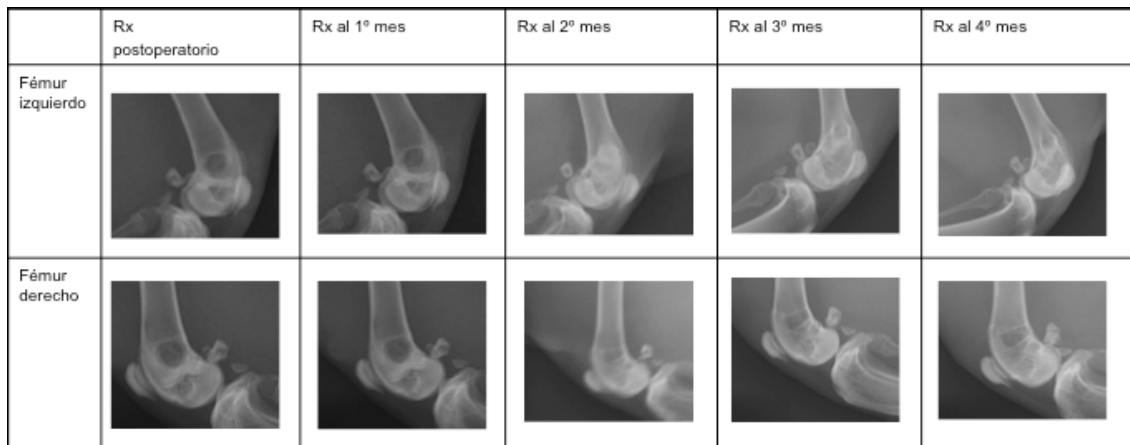
En las imágenes podemos observar como hay una formación ósea más llamativa en los dos primeros meses y una remodelación más acusada en los dos últimos meses.

Los cambios radiológicos en el espécimen 71715 pueden no ser valorables debido a que la fractura produjo una alteración de la proyección radiográfica; al no afectar el trazo de fractura el defecto óseo producido si se pudo valorar la histología en este animal.

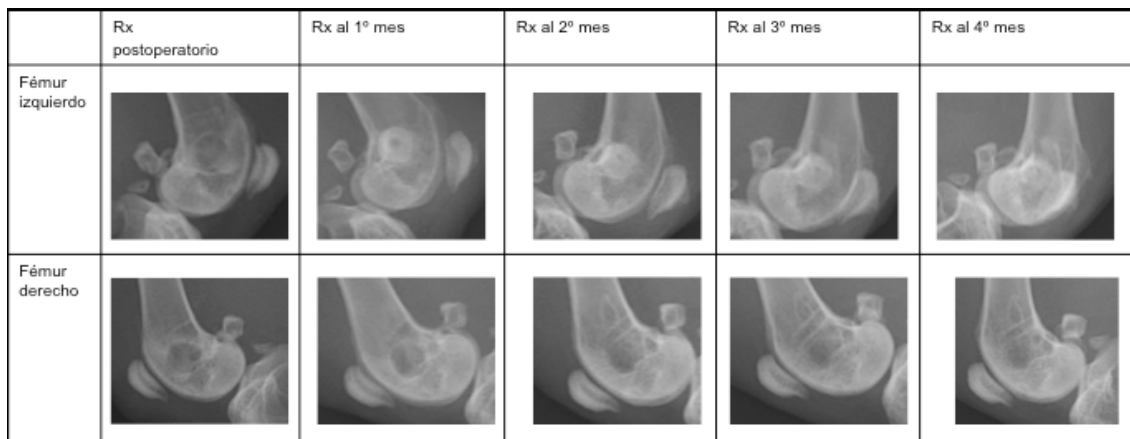
<b>Jaula</b>	<b>Epecímenes</b>	<b>Rx postop</b>	<b>Rx 4ª semana</b>	<b>Rx 8ª semana</b>	<b>Rx 12ª semana</b>	<b>Rx 16ª semana</b>
<b>2</b>	71702	F0 R0	F1 R0	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>3</b>	71703	F0 R0	F1 R0	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>4</b>	71704	F0 R0	F1 R0	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>5</b>	71705	F0 R0	F1 R2	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>6</b>	71706	F0 R0	F1 R2	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>8</b>	71708	F0 R0	F1 R2	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>9</b>	71709	F0 R0	F2 R2	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>10</b>	71720	F0 R0	F1 R2	F2 R2	F3 R4	F4 R4
<b>12</b>	71712	F0 R0	F1 R2	F3 R2	F4 R2	F4 R4
<b>13</b>	71717	F0 R0	F2 R2	F3 R2	F3 R4	F3 R4
<b>14</b>	71714	F0 R0	F2 R2	F3 R2	F4 R4	F4 R4
<b>15</b>	71715	F0 R0	F1 R2	F2 R2	F3 R4	F4 R4
<b>16</b>	71716	F0 R0	F2 R2	F3 R2	F4 R4	F4 R4

**Tabla 3. Resultados radiológicos del grupo a estudio a las 4, 6, 12 y 16 semanas**

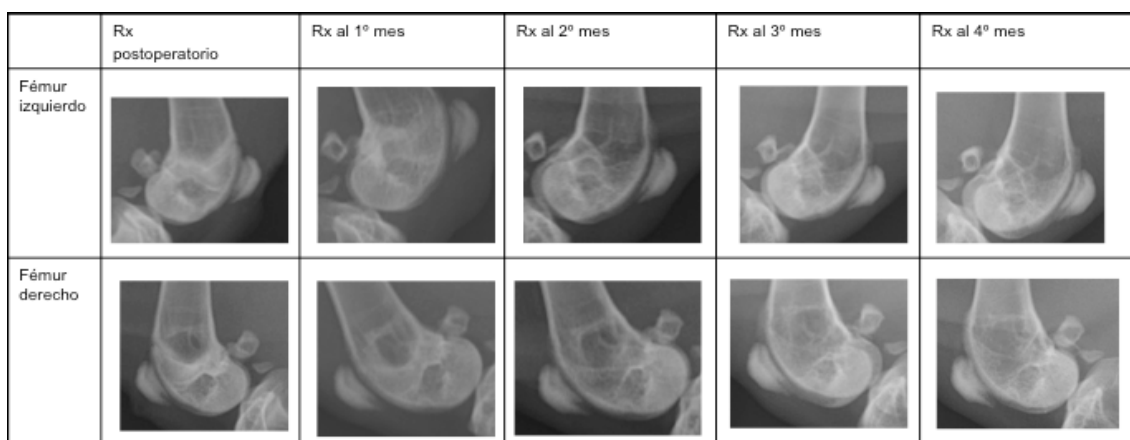
(Criterios de Lane y Sandhu para la valoración radiológica)



**Figura 17:** Imágenes digitales radiográficas en proyección lateral del cóndilo femoral del conejo número 71702. Obsérvese la evolución que experimentan los defectos óseos tallados en el cóndilo femoral del fémur izquierdo (arriba) y derecho (abajo) a lo largo de los 4 meses.



**Figura 18:** Imágenes digitales radiográficas en proyección lateral del cóndilo femoral del conejo número 71709. Obsérvese la evolución que experimentan los defectos óseos tallados en el cóndilo femoral del fémur izquierdo (arriba) y derecho (abajo) a lo largo de los 4 meses.



**Figura 19:** Imágenes digitales radiográficas en proyección lateral del cóndilo femoral del conejo número 16. Obsérvese la evolución que experimentan los defectos óseos tallados en el cóndilo femoral del fémur izquierdo (arriba) y derecho (abajo) a lo largo de los 4 meses.



## **4.2. FÉMURES DERECHOS (CONTROL)**

El estudio radiográfico seriado mostró escasos cambios en los defectos óseos creados en los fémures derechos (controles) a lo largo del seguimiento. La imagen radiográfica del defecto óseo creado no demostró signos de relleno espontáneo de la cavidad, sino que se observó la persistencia de la imagen radiográfica del defecto rodeado de un halo de esclerosis que contorneaba la cavidad ósea creada.

Como se muestra en la figuras 17 a 19 los límites del defecto óseo de los fémures control, sin cilindro de espuma de HAB, pueden verse claramente en las radiografías realizadas los meses primero y segundo tras la intervención; estos límites muestran un borramiento progresivo en las radiografías realizadas a los meses tercero y cuarto tras la intervención. Sin embargo, durante todo el seguimiento, la cavidad cilíndrica de las epífisis derechas, mostraron una densidad ósea más baja que el hueso circundante, lo que sugiere una curación parcial de las paredes laterales del defecto cilíndrico, pero no la reparación ósea suficiente del defecto. Al igual que en los fémures izquierdos, la reparación de la cortical donde se realizó la perforación, participó del aumento de densidad ósea aparente en la proyección radiográfica lateral, lo que pudo comprobarse en el estudio necrópico postmortem.

<b>Jaula</b>	<b>Epecímenes</b>	<b>Rx postop</b>	<b>Rx 4ª semana</b>	<b>Rx 8ª semana</b>	<b>Rx 12ª semana</b>	<b>Rx 16ª semana</b>	
<b>2</b>	71702	F0	F0	F1	F1	F1	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>3</b>	71703	F0	F0	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>4</b>	71704	F0	F1	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>5</b>	71705	F0	F1	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>6</b>	71706	F0	F1	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>8</b>	71708	F0	F0	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>9</b>	71709	F0	F0	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>10</b>	71720	F0	F1	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>12</b>	71712	F0	F0	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>13</b>	71717	F0	F1	F2	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>14</b>	71714	F0	F1	F1	F2	F2	
		R0	R0	R2	R2	R2	
<b>15</b>	71715	F0	No valorable por existencia de fractura				
		R0					
<b>16</b>	71716	F0	F1	F2	F2	F3	
		R0	R0	R2	R2	R2	

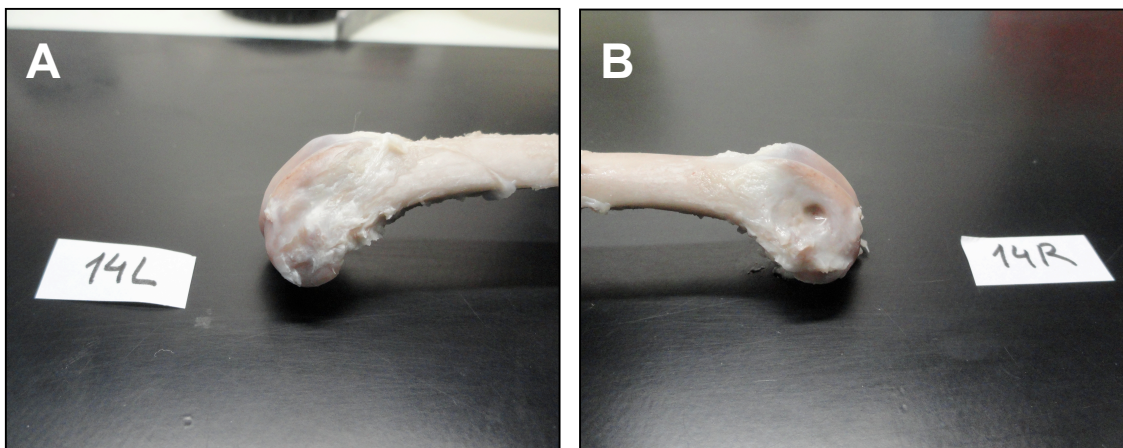
**Tabla 4. Resultados radiológicos del grupo control a las 4, 6, 12 y 16 semanas**  
(Criterios de Lane y Sandhu para la valoración radiológica)

## 5. RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

### 5.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

El estudio necrópsico demostró el recubrimiento del defecto óseo creado en todos los fémures intervenidos. El defecto creado aparecía oculto por una nueva cortical recubierta de periostio. No se observaron signos de infección ni inflamación regional ni otras reacciones adversas en los tejidos circundantes al cilindro implantado.

Mientras que la cortical reparada en el lugar de perforación de los fémures que recibieron el implante de espuma de HA presentaba un aspecto convexo, los fémures control presentaban cierta depresión en concavidad sobre la zona de reparación. (Fig 20).



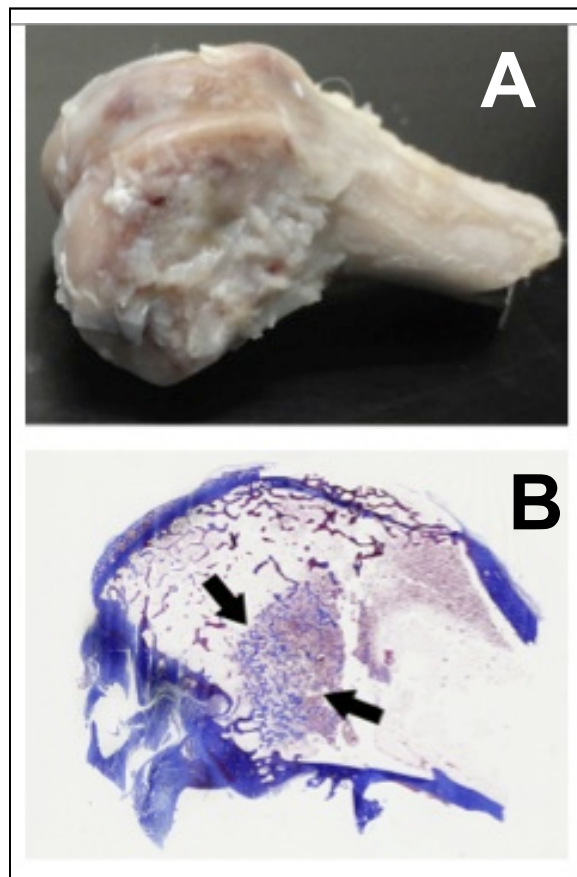
**Figura 20** Estudio necrópsico. Animal 14. A) Fémur izquierdo (con implante de espuma HPBP). Obsérvese la aparición de una nueva cortical recubierta de periostio a través de la superficie ósea del defecto en el fémur izquierdo. B) Fémur derecho (control). Obsérvese la depresión en concavidad a nivel del defecto óseo.

## 5.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Los defectos óseos producidos en los fémures izquierdos de los conejos mostraron un grado de reparación satisfactoria no siendo así en el caso de los fémures derechos (grupo control), según el concepto de defecto crítico óseo (257,278–280).

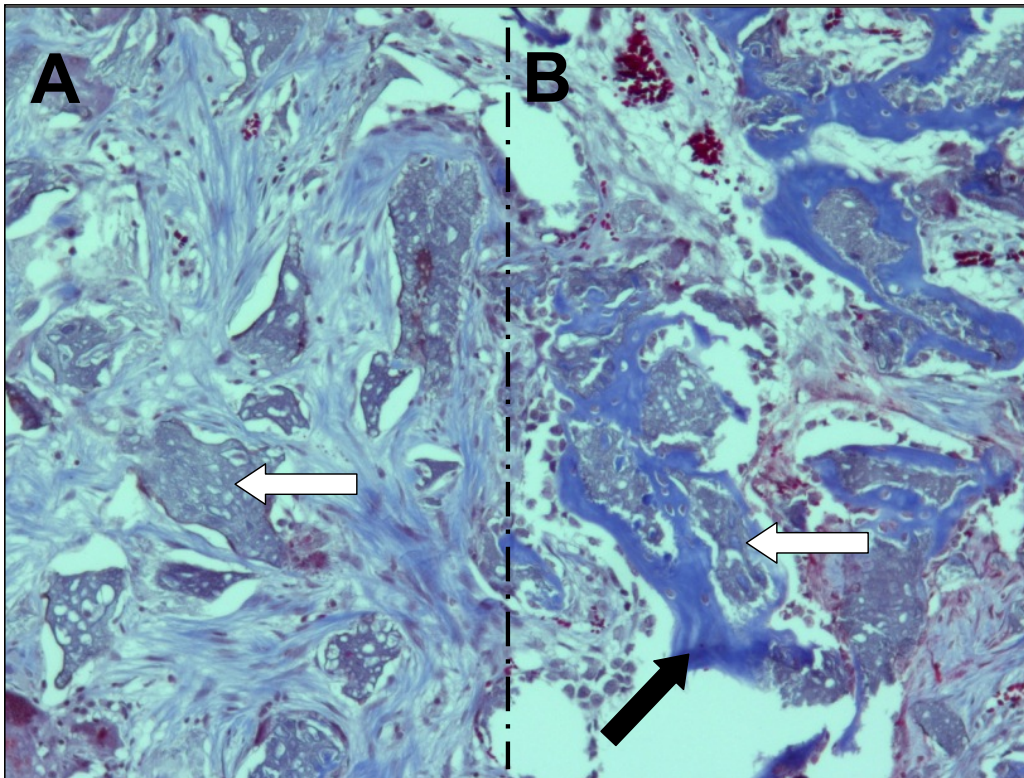
### 5.2.1. FEMUR IZQUIERDO

El estudio histológico mostró una curación adecuada de todos los defectos óseos tratados, con la integración ósea de los cilindros de espumas HABP y la conducción ósea sobre su superficie (Fig 21).



**Figura 21.** Conejo 9. Fémur Izquierdo. Aspecto macroscópico del segmento distal del fémur izquierdo tras la necropsia. B). Imagen histológica con baja magnificación de la misma muestra a los 4 meses de seguimiento en la que se puede observar la integración ósea de los cilindros de HABP (flechas). H&E.

En la mayoría de las muestras estudiadas se observó en mayor o menor grado un proceso de neoformación ósea en la epífisis del fémur izquierdo, principalmente siguiendo un patrón de osificación membranosa (Fig. 22).



**Figura 22:** Muestra del defecto óseo del fémur izquierdo del conejo 16 (5x). En la mitad izquierda de la imagen señalada con la letra A se observa el material a estudio (flecha blanca) alrededor del cual existe todavía abundante tejido conectivo. En la mitad derecha de la imagen señalada con la letra B se observa el comienzo de la formación de trabéculas óseas (flecha negra) alrededor del material a estudio. H&E.

Estos procesos de neoformación ósea consistían en la formación de trabéculas óseas, de morfología variable, que se disponían habitualmente en torno a un material característico, bien diferenciado, de morfología habitualmente triangular y diferente a la estructura típica del tejido óseo (Fig 22).

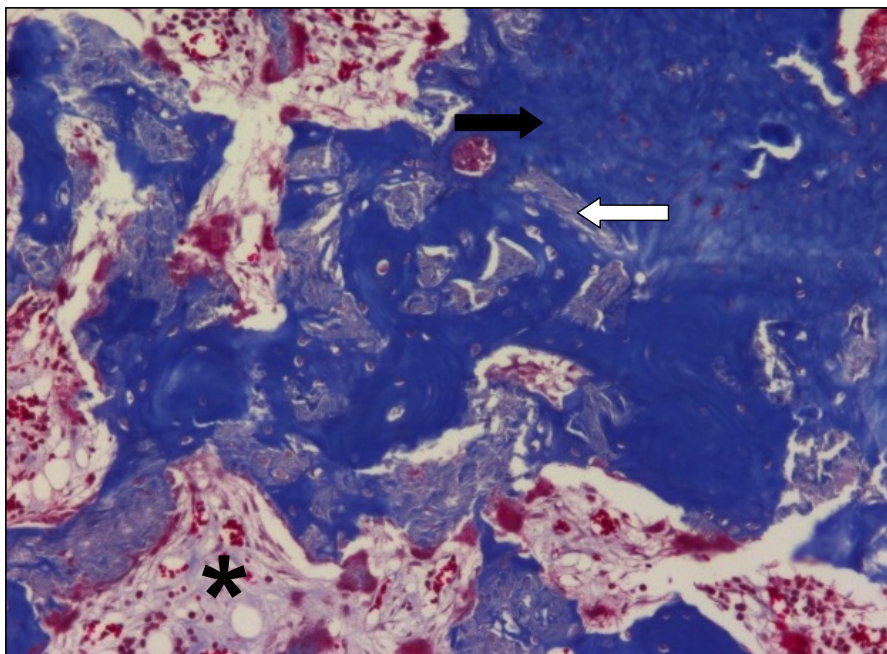
Las trabéculas óseas neoformadas tenían un tamaño y forma variables, eran en parte confluentes, adoptando habitualmente una morfología reticular. Su

estructura se correspondía con la de un tejido óseo joven, en el que se observaba en su periferia un ribete de osteoblastos y algunos osteoclastos (Fig 23, 24, 25 y 26).

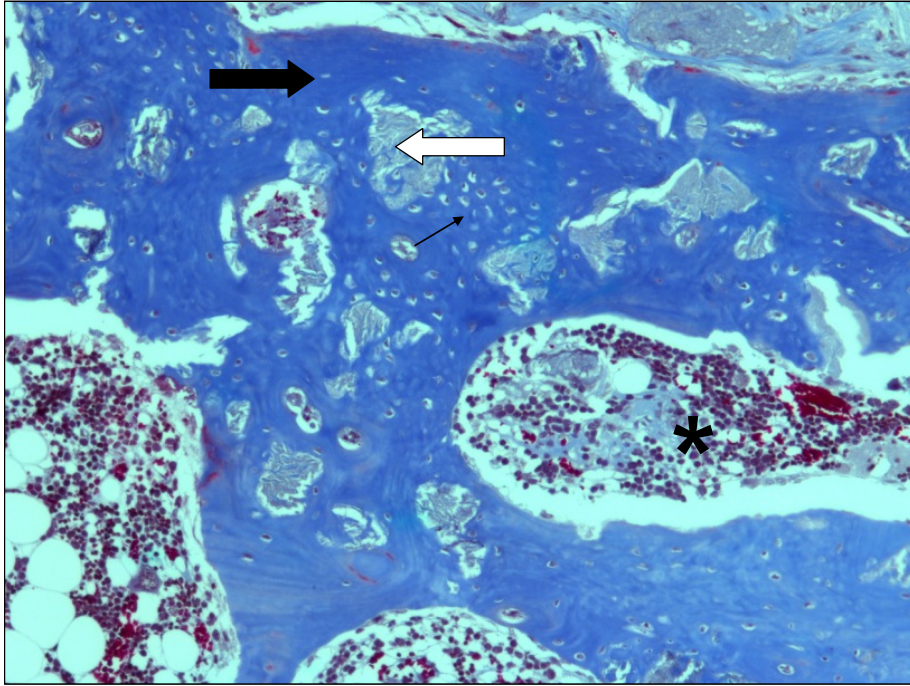
En algunas de las preparaciones se observan fenómenos de osificación membranosa, es decir formación de hueso a partir de células precursoras sin que intervenga la formación de cartílago como intermedio (Fig 26).

La reparación y la formación de hueso nuevo que se observa en todos los defectos óseos tratados, son el resultado de un fenómeno anterior de angiogénesis sobre la superficie porosa del andamio que sirve como una guía para la formación de hueso en una dirección centripeta.

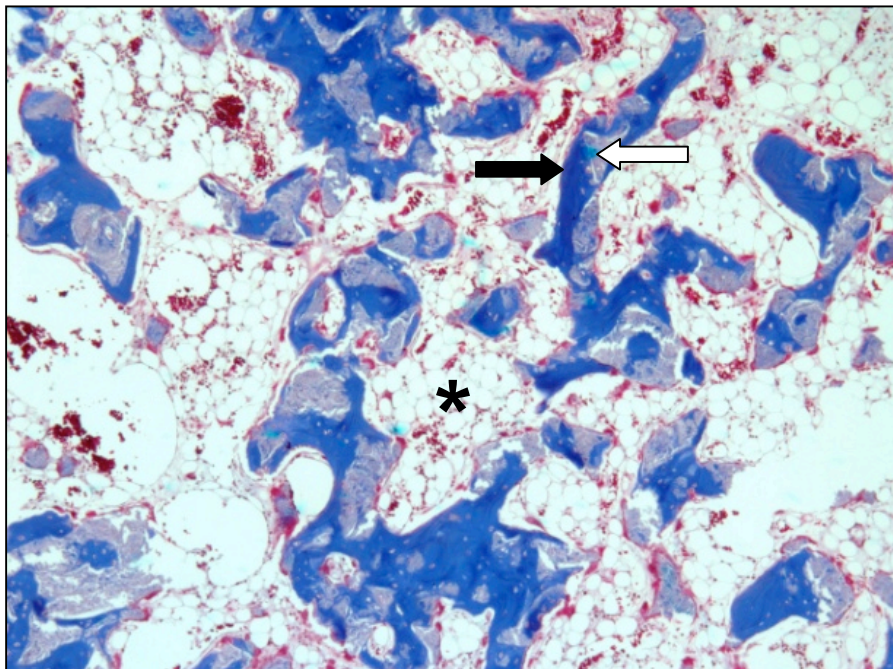
Alrededor y entre las trabéculas óseas neoformadas se observó la presencia de médula ósea, en su mayoría formada por el tejido adiposo, vasos sanguíneos y tejido hematopoyético (Fig 23, 24, 25).



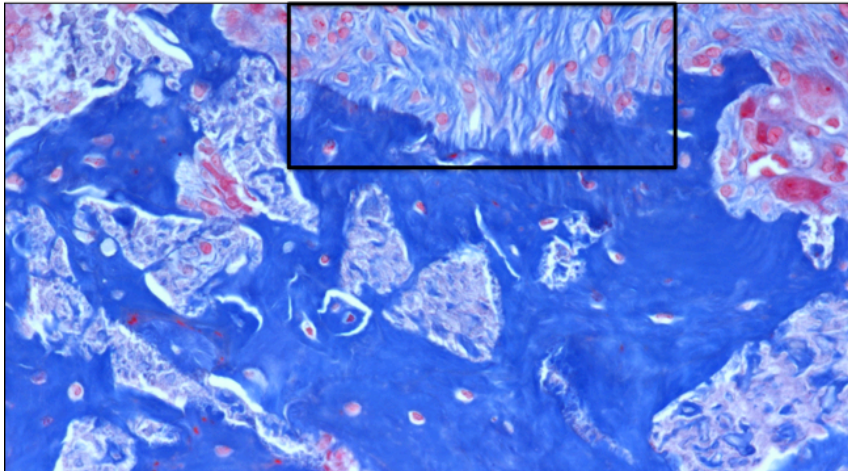
**Figura 23:** Muestra del defecto óseo del fémur izquierdo del conejo 12 (10x). Se observan las trabéculas (flecha negra) que engloban al material a estudio (flecha blanca). Entre ellas, abundante médula ósea (asterisco). H&E.



**Figura 24** Muestra del defecto óseo del fémur izquierdo del conejo 16 (10x). Se observan las trabéculas (flecha negra) con osteocitos en sus lagunas (flecha delgada) que engloban al material a estudio (flecha blanca). Entre ellas, abundante médula ósea (asterisco). H&E.



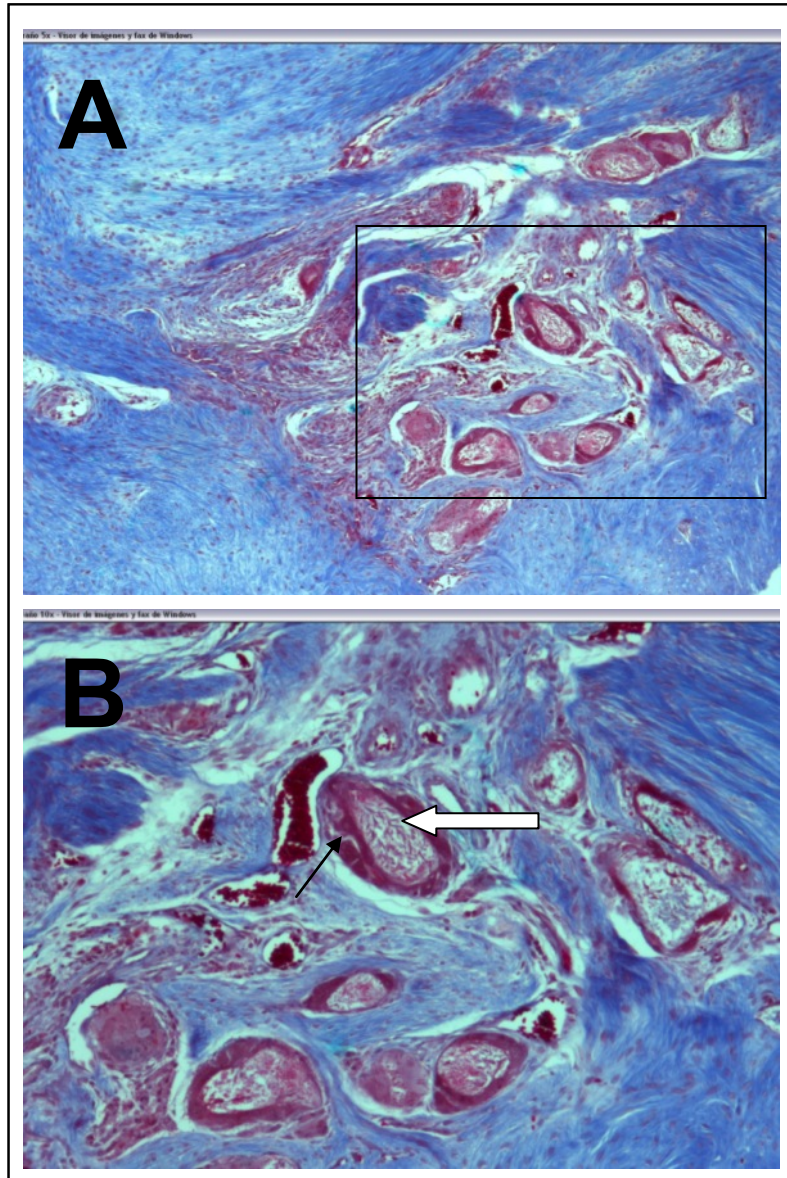
**Figura 25:** Muestra del defecto óseo del fémur izquierdo del conejo 9 (5x). Se observa neoformación ósea en forma de trabéculas (flecha negra) que engloban al material a estudio (flecha blanca). Entre ellas, abundante médula ósea (asterisco). H&E.



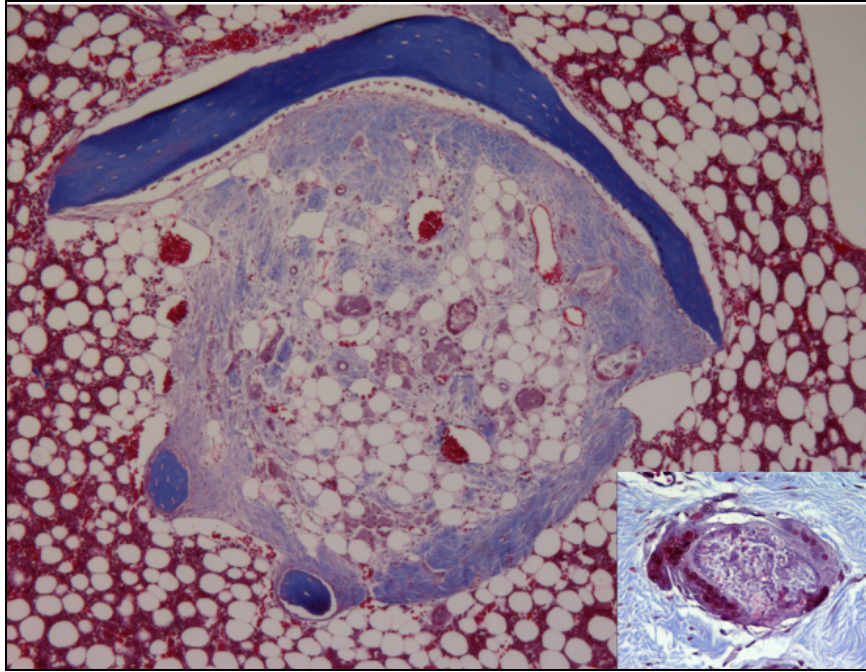
**Figura 26:** Muestra del defecto óseo del fémur izquierdo del conejo 9 (20x). Se observa neoformación ósea mediante el proceso de osificación membranosa (imagen dentro del rectángulo). H&E.

En la mayoría de las muestras analizadas se ha observado la presencia de reacciones de cuerpo extraño bien delimitadas, en las que destaca la existencia de células gigantes multinucleadas de gran tamaño, que con frecuencia contenían en su citoplasma el material antes descrito (Fig 27 y 28). Acompañando a éstas se observaba un proceso de fibrosis reactiva.





**Figura 27:** Muestra del defecto óseo del fémur izquierdo del conejo 16. A) Se observan varios granulomas a cuerpo extraño (5x). B) Detalle de la imagen A donde se aprcia con más detalle (10x) la imagen de un granuloma a cuerpo extraño; puede observarse como varias células gigantes multinucleadas (flecha delgada) envuelven al material a estudio (flecha blanca). H&E.

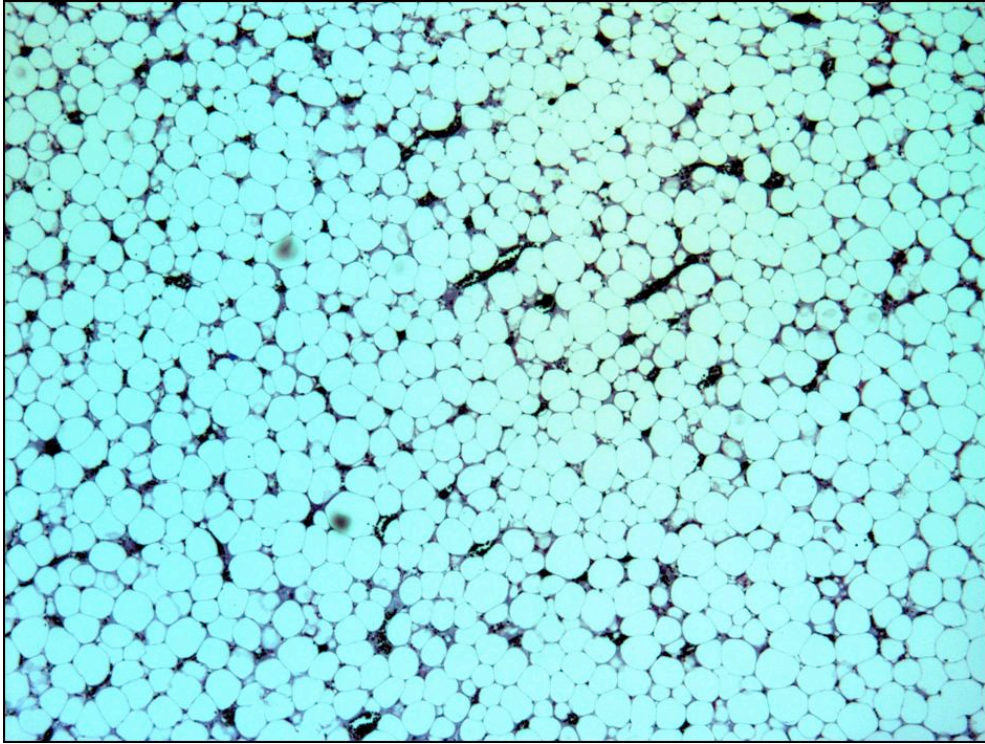


**Figura 28:** Muestra del defecto óseo del fémur izquierdo del conejo 14 (5x). Granuloma a cuerpo extraño. Detalle en el que se observa una célula multinucleada con material a estudio en su interior. H&E.

En torno a las neoformaciones óseas descritas se aprecia la presencia de médula ósea, constituida por tejido adiposo, vasos sanguíneos y tejido hematopoyético.

### 5.2.2. FÉMUR DERECHO

En las muestras control correspondientes a las epífisis de los fémures de la extremidad derecha apenas se observaron procesos de neoformación ósea. Se pudo observar la reparación del orificio en la cortical, rellenándose el espacio vacío en su mayor parte de tejido adiposo y vasos sanguíneos, con evidencia muy pobre de cicatrización ósea. (Fig 29).



**Figura 29:** Muestra del defecto óseo del fémur derecho del conejo 1 (5x). (HE). Puede observarse relleno de tejido adiposo. H&E.

# **CAPÍTULO 6:**

# **DISCUSIÓN**

La sustitución del tejido óseo ha sido motivo de numerosas líneas de investigación por parte de la comunidad científica internacional, debido a la necesidad de solventar el problema que plantea la existencia de defectos óseos producidos como consecuencia de traumatismos, infecciones, tumores y malformaciones, que suponen graves problemas tanto para el paciente como para el cirujano.

El objetivo del tratamiento de los defectos óseos es facilitar la restauración adecuada del mismo siendo de suma importancia intentar minimizar el riesgo de debilitamiento del hueso ya que podría conducir a la producción de una fractura secundaria. La búsqueda del sustituto óseo ideal continúa siendo la meta a alcanzar.

En las últimas décadas se han estudiado diferentes alternativas al tejido óseo: aloinjertos óseos de cortical y esponjosa, biomateriales cerámicos, matriz ósea desmineralizada, materiales biológicos de médula ósea (células madre y progenitoras), diversos compuestos y materiales osteoinductivos químicos o físicos (factores de crecimiento, estimulación eléctrica y ultrasónica), etc. Sin embargo, ninguna de ellas proporciona los tres componentes necesarios para la regeneración ósea: osteogénesis, osteoconducción, osteoinducción (202).

La mayor parte de los biomateriales utilizados como sustitutos óseos actúan únicamente como agentes osteoconductivos. No presentan propiedades osteoinductivas por si solos salvo que se les añade otro material, como médula ósea autóloga, aloinjerto desmineralizado o factores de crecimiento recombinantes (281).

Actualmente todavía no se ha descrito el material que cumpla todas estas condiciones y por lo tanto que actúe como sustituto óseo ideal. Hoy en día el sustituto óseo que mejor se ajusta a las condiciones descritas es el autoinjerto de esponjosa ya que además de cumplir las exigencias que se le exigen a un biomaterial, ampliamente comentadas en la introducción de la tesis, proporciona los tres elementos requeridos para la regeneración ósea citados previamente. A pesar de ello su empleo no está exento de complicaciones. Sin embargo, si revisamos la literatura disponible, parece ser que éste no es el tratamiento elegido en la mayoría de los estudios (282,283), principalmente debido a que el autoinjerto de esponjosa presenta una serie de limitaciones como es su limitada disponibilidad, la morbilidad de la región donante (tanto complicaciones graves en un 8,6% como leves en un 20,6 %) y cierta limitación en cuanto a la cantidad de tejido que se puede obtener, especialmente si lo que necesitamos es sustituir una pérdida masiva ósea (284–286).

Debido a la gran dificultad para obtener un biomaterial que cumpla con todas las propiedades hueso autólogo, se ha planteado la combinación de una matriz osteoconductora que proporcione una estructura tridimensional adecuada que permita el crecimiento óseo en su interior, con células osteogénicas con capacidad de diferenciarse a células óseas y poder así formar hueso, y con agentes osteoinductivos que favorezcan el proceso de regeneración ósea (287).

Existen numerosos grupos de trabajo que con esta idea han desarrollado biomateriales con distintas características que lo diferencian del resto, pero hasta ahora ninguno de ellos ha conseguido igualar al hueso propio del individuo (186,187,266–268) .

Hoy en día se habla de tres generaciones de biomateriales (288). La primera generación es aquella cuyo objetivo es sustituir un órgano o tejido dañado; se trata de materiales como el acero inoxidable, el titanio y aleaciones, cerámicas como la alúmina y la zirconia y polímeros como el caucho de silicona el polipropileno y el polimetilmetacrilato (75).

Los sustitutos óseos de segunda generación tienen como objetivo reparar el tejido lesionado. Estos presentan interfases bioactivas que son capaces de provocar una respuesta biológica específica (es decir, son osteoconductivos) mejorándose la osteointegración del material y evitando la formación de la capa fibrosa que habitualmente se forma alrededor de los biomateriales de primera generación y que es debida a una respuesta inmune del organismo hacia el material (75).

Finalmente los biomateriales de tercera generación son aquellos que son capaces de inducir respuestas celulares específicas a nivel molecular mediante la integración de la bioactividad y la biodegradabilidad de los biomateriales de segunda generación. La meta es la regeneración de los tejidos (289).

Con esta tercera generación se abre una nueva disciplina en el mundo de la creación de biomateriales: la biología, que reorganiza conceptos e incluye otros nuevos (290) .

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo diversos estudios sobre distintos biomateriales con el fin de solventar algunos aspectos del problema que plantean los grandes defectos óseos.

# 1. CONCEPTO DE DEFECTO ÓSEO Y SOLUCIONES

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, el hueso presenta un potencial de reparación muy elevado a través del proceso de remodelación ósea y que se caracteriza por la casi ausencia de cicatriz. A pesar de ello, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea a lo largo de la vida del animal, necesitando factores que estimulen la reparación (28), son los denominados defectos óseos de tamaño crítico y fueron descritos por primera vez por Schmitz y Hollinger. Estos autores establecieron que si no se producía la regeneración ósea completa en las 52 semanas siguientes a la realización del defecto óseo, podemos considerar que éste nunca ocurriría (29,30).

Así un defecto óseo de tamaño crítico es aquel que no presenta regeneración espontánea con el transcurso del tiempo.

Los estudios de regeneración ósea en defectos óseos metafisarios, particularmente en el conejo, son siempre criticados, ya que estos animales tienen una gran capacidad osteoformadora. El modelo experimental empleado en este trabajo es similar al modelo descrito por Nizard, y Katthagen (291,292) que demostraron que un defecto óseo de 6 mm de diámetro realizado en la metáfisis femoral distal del conejo adulto de raza Nueva Zelanda no presentan reparación espontánea, incluso a los 8 meses, por lo que la regeneración ósea que se puede observar, debe ser necesariamente atribuida al sustitutivo óseo implantado. Nuestros hallazgos reafirman la validez de este modelo experimental y aseguran que la regeneración ósea que se produce al colocar un implante no es debida al lecho receptor sino al implante.



El defecto óseo realizado en el fémur distal de los animales de experimentación de nuestro estudio corresponde a un defecto óseo de tamaño crítico. Este defecto óseo experimental ha sido utilizado con éxito por otros autores y por nuestro equipo de investigación (266,278).

El diámetro de nuestro defecto óseo fue de 6 mm; se observó al final del seguimiento que en los fémures derechos (a los que, para que sirvieran de control, se practicó dicho defecto sin ser rellenado con material alguno) no se produjo la regeneración completa espontánea, tan solo mostraron una reparación del orificio cortical pero no del defecto óseo epífiso-metafisario. Observaciones muy similares se han constatado por el equipo investigador en anteriores trabajos experimentales (186,187,265,266,268).

Una de las complicaciones que se describe en el trabajo de Katthagen es el riesgo de fractura que en su serie ocurre en del 1,2% de los casos. Esto es debido a que la creación del defecto cavitario metafisario distal destruye más del 50% del tejido óseo de ese segmento, modificándose las condiciones biomecánicas del cóndilo femoral medial del conejo y aumentando por tanto el riesgo de fractura. Para evitar esta complicación se debe efectuar un correcto centrado del orificio (292). En nuestro serie ocurrió un caso de fractura supracondílea lo que representa un 7,6%, al contrario que en el resto de trabajos realizados por nuestro grupo en el que no se observó ningún caso de fractura (186,187,265,266,268).

## 2. ANÁLISIS DEL MODELO EXPERIMENTAL

Al revisar la literatura que existe respecto a estudios experimentales con biomateriales en animales, podemos observar la no concordancia respecto al modelo animal, encontrando distintos modelos como la rata (293), el conejo (294), el perro (295), la oveja (296), el minicerdo etc. Coincidimos con autores como Meseguer Olmo y Roche que es importante que aspectos como el modelo animal, la técnica quirúrgica y los sistemas de cuantificación sean estandarizados para poder comparar los diferentes estudios y sus resultados y poderlos así tomar como base para el desarrollo de posteriores trabajos (268,297).

A pesar de la variabilidad de animales de experimentación utilizados en los múltiples estudios, parece ser que en los últimos años el empleo del conejo es el más ampliamente aceptado en estudios experimentales sobre biomateriales reabsorbibles, debido a que supone un coste aceptable, requiere una infraestructura disponible en la mayoría de los quirófanos de cirugía experimental y su intervención resulta sencilla.

En nuestro estudio hemos elegido al conejo albino Nueva Zelanda por ser el más utilizado, junto con la rata, en estudios de reparación y regeneración ósea en las publicaciones más destacadas (297,298). así como por la experiencia acumulada por el equipo investigador con este modelo experimental (186,187,265,266,268).

En nuestro trabajo se utilizó una muestra de 15 conejos machos albinos adultos de la raza Nueva Zelanda debido a la gran facilidad de obtención de una muestra homogénea. De los 15 animales 2 murieron durante el seguimiento por causas ajenas al procedimiento. Se utilizaron conejos adultos para que sus cartílagos de crecimiento estuvieran cerrados. La intervención quirúrgica de animales maduros ha permitido practicar los defectos cavitarios femorales en huesos de mayor tamaño,

evitando la creación de los mismos sobre la zona ocupada anteriormente por el cartílago de crecimiento, previniendo así las posibles alteraciones derivadas de un crecimiento alterado en un animal esqueléticamente inmaduro. Además, el equipo investigador ha utilizado este modelo experimental en anteriores trabajos (186,187,265,266,268)..

La fácil accesibilidad de la metáfisis distal del fémur de estos conejos y su semejanza anatómica al fémur humano son otros argumentos que justifican la utilización de este animal como modelo experimental.

Establecimos un periodo de estabulación de 16 semanas antes de la eutanasia teniendo en cuenta tanto los estudios de defectos óseos en conejos de Nueva Zelanda realizados por Katthagen (292) que demuestran que durante las primeras 4 semanas se produce la neoformación ósea cuantitativamente más importante y que entre las 4 y las 8 semanas se desarrollan fundamentalmente fenómenos de remodelación ósea por lo que la cuantía global de formación ósea entre estos dos periodos no es significativamente distinta. Por otro parte, se ha establecido para el conejo de la raza Nueva Zelanda, que periodos menores de 4 semanas sólo permiten valorar la biocompatibilidad de los materiales y tiempos de estabulación mayores de 12 semanas no aportan información relevantemente distinta (7,292) .Durante el periodo de estabulación de los animales no se les sometió a límite de carga para que de acuerdo con la ley de Wolff se favoreciera una respuesta osteogénica (149).

Tras las consideraciones anteriores, en nuestro trabajo se utilizaron 15 animales de experimentación a los que se les realizó un defecto cavitario en ambas metáfisis femorales distales; de los 15 animales finalmente pudieron concluir el estudio 13 animales que permanecieron estabulados durante 16 semanas hasta la

eutanasia, realizándose un estudio radiográfico de ambas rodillas de manera mensual. Todo esto ha permitido valorar la evolución del biomaterial a estudio en el tiempo y conseguir resultados más fiables.

No registramos ningún caso de infección postoperatoria inmediata o tardía, demostrando la eficacia de la profilaxis antibiótica y de la asepsia quirúrgica empleadas.

El espectro antibiótico con cefazolina cubre gérmenes Gram positivos, como el *Estafilococo Aureus* y el *Estreptococo*, responsables habituales de infecciones quirúrgicas en el área de la Cirugía Ortopédica y Traumatología.

Un punto de controversia respecto al animal de experimentación utilizado es su posición en la escala filogenética. En general, se cree que la capacidad de regeneración ósea de los mamíferos es inversamente proporcional a su posición en dicha escala (299). Es por esto que muchos de los trabajos que utilizan el conejo como animal de experimentación, plantean la duda de la validez de la extrapolación de los resultados obtenidos a la especie humana debido a que el proceso de regeneración ósea es más rápido en los conejos. Nosotros consideramos que nuestros resultados tienen validez debido al empleo del fémur contralateral del animal de experimentación como control, asegurándonos así que las diferencias observadas en ambos grupos están relacionadas con las propiedades biológicas del implante utilizado. Es por ello que consideramos se pueden obtener conclusiones fiables.

### **3. ANÁLISIS DEL MATERIAL HABP Y DE LOS RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DE LOS FÉMURES EN LOS QUE SE IMPLANTÓ**

La selección del material del andamio y la optimización de su estructura son aspectos de vital importancia para conseguir imitar lo más fielmente posible la estructura tridimensional ósea.

Recordando lo citado en la introducción, el andamio de regeneración ósea ideal debe cumplir las siguientes características:

1. Debe favorecer la osteogénesis (OSTEOGENICIDAD)
2. Debe posibilitar una respuesta biológica específica en su interfaz con el hueso receptor, favoreciendo el enlace de ambos y sin formación de tejido cicatricial (BIOACTIVIDAD)
3. Debe crear una interfaz estable con el hueso receptor sin interposición de tejido fibroso (OSTEOINTEGRACIÓN)
4. Debe tener una estructura tridimensional que sirva de plantilla para la regeneración del hueso (OSTEOCONDUCCIÓN)
5. Ha de ser biocompatible y no dar lugar a productos tóxicos y ser fácilmente excretado por las vías normales de eliminación del cuerpo humano (BIOCOMPATIBILIDAD)
6. Debe tener propiedades mecánicas similares a las del hueso huésped y/o facilitar la transferencia de cargas para el desarrollo del hueso (RESISTENCIA MECÁNICA)

7. Debe tener una cinética de reabsorción similar a la velocidad de osteoformación (DEGRADABILIDAD)
8. Debe promover la adhesión y la diferenciación celular hacia la síntesis de matriz ósea mineralizada, mediada por los factores locales de crecimiento (OSTEOINDUCCIÓN)
9. Debe presentar una forma óptima para el facilitar el relleno de defectos (MANEJABILIDAD)
10. Debe tolerar las medidas de esterilización requeridas internacionalmente para uso clínico

A continuación discutiremos punto por punto las ventajas y desventajas de nuestra espuma HABP haciendo hincapié en el estudio histopatológico.

Antes de continuar debemos comentar que las grandes ventajas que ofrece el análisis histológico; éste sigue siendo el método más adecuado para la evaluación de la reacción del tejido receptor frente al biomaterial y la formación de nuevo tejido extracelular en los poros interconectados de los andamios. La combinación de la excepcional resolución en plano y el detalle celular proporcionado por la histología es difícilmente igualable. El análisis histológico puede, por ejemplo, identificar fácilmente el reclutamiento de macrófagos y otras células asociadas con la respuesta inflamatoria a biomateriales implantados; también como en nuestro trabajo, se pueden apreciar las diferencias entre fenómenos diferentes de osificación.

A pesar de las capacidades únicas que ofrece el análisis histopatológico, por desgracia como la gran mayoría de las técnicas también presenta limitaciones. La evaluación de la interfaz biomaterial-tejido es a menudo difícil debido a desajustes físicos o químicos que pueden producir artefactos, distorsiones o separación de

tejidos durante la sección. Por otra parte las secciones en dos dimensiones proporcionan una representación de un tejido de tres dimensiones incompleta y potencialmente engañosa en los poros de los andamios. El análisis histológico, además, no proporciona un significado eficiente de la cuantificación de formación de tejido 3D en muchos modelos de biomateriales y por ello no es idóneo para la comparación estadística entre diferentes grupos experimentales (268).

Tras estas consideraciones evaluaremos las condiciones descritas previamente que ha de cumplir un andamio para ser considerado ideal.

### **3.1. OSTEOGENICIDAD Y BIOACTIVIDAD**

En este estudio, la espuma HAPB a prueba permite la curación de los defectos óseos críticos epifisarios en conejos.

Se ha de tener en cuenta que la ubicación de los cilindros de espuma HAPB en hueso epifisario y metafisario implica un proceso continuo de remodelación ósea que mostró una íntima relación con el hueso.

No limitamos la carga a los animales ya que consideramos que la carga del hueso en reparación es importante para poderse producir la curación del mismo y poder restaurar su resistencia mecánica original, ya que la carga mecánica promueve una respuesta osteogénica (149,182,300).

La comparación experimental mostró diferencias significativas en la cicatrización ósea y formación de hueso nuevo entre el defecto óseo tratado con el implante de HAPB y el defecto óseo control.

La espuma HABP a estudió mostró evidencias de osteointegración, crecimiento óseo sobre su superficie y remodelación posterior lo que coincide con la mayor parte de los estudios respecto a este material (296,301–305).

La formación ósea sobre la superficie de los cilindros de espuma HABP fue predominantemente de tipo membranoso, con escaso tejido fibroso, y sin evidencia de células condrales lo que confirma la capacidad de la HABP de ser osteogénica (recordemos la definición de osteogenicidad como la capacidad de formar hueso);

La osteogénesis de la HABP se produce por medio de un proceso de reclutamiento de células mesenquimales de los tejidos circundantes sobre el material y la transformación subsiguiente en células formadoras de hueso, dando lugar como defendió Loty y cols (306) a la osteogénesis por contacto

Esta observación ha sido publicada por nuestro grupo de trabajo en estudios experimentales anteriores en el que se analizó el efecto de implantes de materiales de vidrio sol gel y cristales de cerámica en un defecto óseo crítico creado en conejos (266,267).

Por otra parte no se observó la interposición de tejido fibroso entre la cerámica y el tejido óseo recién formado lo que confirma su capacidad de ser bioactiva (recordemos la definición de bioactividad como la capacidad común que presentan todos estos biomateriales para establecer enlaces directos con el hueso sin interposición de cápsula fibrosa) (212).

Ambas observaciones sugieren que la espuma HABP funciona como un andamio de acuerdo con los criterios de Shors (140) para el crecimiento óseo a través de un implante bioactivo en condiciones ideales (estabilidad, viabilidad y proximidad). Este autor afirma que el tejido óseo crece sobre la superficie de un



implante si éste es bioactivo, y en condiciones ideales este crecimiento óseo es de tipo intramembranoso como hemos observado en las imágenes histológicas de nuestro estudio.

El comportamiento bioactivo de la HA ha sido ampliamente demostrado por numerosos estudios. La capacidad de formación de microcristales de apatita carbonatada sobre la superficie de muestras de HA, tanto in vitro como in vivo, se cree que es la consecuencia de un proceso de disolución-precipitación en dicha superficie. Estos cristales se han visto siempre íntimamente asociados a la formación de una matriz orgánica, sin estar esto totalmente explicado hasta ahora (307,308).

En los defectos óseos tratados observamos como se produce una reabsorción de la estructura macroporosa de la espuma HABP y el crecimiento de hueso de manera centrípeta, como si se tratase de una sustitución progresiva real o lo que es lo mismo *creeping substitution*, término en inglés acuñado por Plemister ya en 1914 y que podríamos traducir por sustitución por arrastre (46) . Estas observaciones pueden explicar el patrón de cicatrización ósea y la remodelación, que fue casi completa después de un periodo de seguimiento de 4 meses. El crecimiento de hueso y la remodelación ósea observada en los defectos óseos que contenían el cilindro de la espuma HABP es difícil de explicar por un implante inerte.

Este patrón de regeneración ósea ha sido observado por otros autores en estudios similares en conejos a los que se les implantó un cemento de fosfato de calcio (278) y un b-fosfato tricálcico (309) en un defecto óseo.

El crecimiento de tejido nuevo y la integración y degradación del material de manera centrípeta es acorde con el concepto de Regeneración Ósea Guiada definido por Retzepi (310).

Aunque la reparación ósea se ha realizado correctamente, el remodelado en los defectos óseos tratados con el material a estudio no se ha producido de manera completa tras 4 meses de seguimiento. Quizás, con un periodo de seguimiento mayor, podría producirse la completa remodelación del hueso como ocurre en el trabajo publicado recientemente por Barbeck (309). Este autor realiza un estudio in vivo en 12 conejos con una metodología similar a la de nuestro trabajo; inyecta un compuesto de fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)-hialurónico en el defecto óseo de un fémur, utilizando el defecto óseo del otro fémur de control. Ellos al igual que nosotros describen un crecimiento óseo de manera centrípeta desde la periferia al centro observando la *restitutio ad integrum* del defecto óseo con el material implantado tras 6 meses de seguimiento. Quizás este tiempo mayor de seguimiento hubiera sido necesario para observar en nuestro estudio la curación completa del defecto, inclusive en el centro del mismo. Este autor sacrifica a los animales de manera escalonada, un grupo al mes, otro a los 3 meses y otro a los 6 meses pudiendo observar las diferencias histológicas con el transcurso del tiempo.

El estudio de nuestras muestras histológicas concuerda con lo observado en los hallazgos radiológicos observados durante todo el seguimiento postoperatorio en las epífisis de los fémures izquierdos donde estaban colocados los cilindros de espuma HABP; demostraron una sustitución progresiva por tejido óseo, con crecimiento y remodelación ósea de dicho defecto, a diferencia de los defectos óseos controles, en los que solo se observó la reparación de la cortical a expensas del periostio circundante (311–316).

En los huesos control, en cambio, no se observa una curación del defecto óseo, en comparación con los defectos óseos tratados. Se observa formación parcial de hueso sobre la superficie lateral del cóndilo perforado, pero sin acompañarse del

relleno de la cavidad ósea por hueso esponjoso, esto lo valoramos como un intento de reparación, que es insuficiente. Al final del periodo de seguimiento, en el defecto óseo sólo se observaba tejido adiposo y vasos sanguíneos. En el trabajo de Barbeck antes mencionado, describen que en los defectos óseos control, en los animales sacrificados el primer mes se observa una estructura ósea trabecular periférica muy similar al patrón de regeneración ósea que ocurre en los defectos tratados con el compuesto. Sin embargo en los animales sacrificados a los 3 y 6 meses, mientras que en los defectos con el material a estudio se iba produciendo la regeneración ósea completa, en los del grupo control sólo se observó el crecimiento de hueso observado en el primer mes, estando el resto del defecto ocupado por tejido adiposo al igual que ocurre en nuestras muestras (309).

Esta escasa respuesta osteogénica en los controles apoya la evidencia de que la espuma HABP en nuestro modelo experimental ofrece unas condiciones óptimas de porosidad interconectada, química de biosuperficie, y adecuada tasa de reabsorción que favorecen la reparación ósea.

Respecto a esta capacidad de regeneración de tejido óseo hay autores que describen que la capacidad de regeneración se podría aumentar con distintos métodos.

Parece ser que la HA presente en los huesos y la dentina es una HA carbonatada. Los iones de carbonato aumentan la solubilidad y disminuyen la cristalinidad de las cerámicas. Hay estudios que demuestran que los compuestos a base de HA carbonatada dan lugar a una mejor proliferación y diferenciación de los osteoblastos en comparación con la HA sin estar carbonatada. Todavía hay poca información acerca de estudios in vitro con este tipo de HA, pero parece ser que los

estudios publicados hasta el momento, concluyen de manera unánime que la adición de CHAP afecta a la bioactividad de los materiales compuestos aumentando la adhesión y diferenciación de osteoblastos, la expresión de osteocalcina y colágeno y la deposición de mineral (302,317).

Leszek publica recientemente un nuevo material elástico de alta manejabilidad quirúrgica compuesto a base de gránulos de hidroxiapatita carbonatada (CHAP) y el polímero polisacárido ( $\beta$ -1,3-glucano). En su trabajo realizan un defecto óseo crítico en las metafisis proximales de las tibias de 24 conejos blancos Nueva Zelanda. Sacrificaron a los animales de manera escalonada a los 1, 3 y 6 meses. Analizaron los resultados mediante TAC, densitometría histología e histomorfometría. El TAC indicó el efecto estimulante del biomaterial sobre la formación ósea y la mineralización. La densitometría sugirió que la biomineralización de los huesos fue precedida por reabsorción y desaparición gradual de gránulos cerámicos porosos. Los hallazgos sugieren que el compuesto de material-CHAP glucano permite la regeneración del tejido óseo y podría servir como relleno de defecto óseo (302).

Otro método para mejorar la regeneración ósea es añadir sustancias osteoinductoras a los andamios. La fase polimérica puede servir, además, como un vehículo para factores de crecimiento y fármacos terapéuticos, añadiendo así funciones biológicas (318,319).

### **3.2. OSTEointegración**

En nuestro estudio no hemos observado fibrosis en la interfase cerámica-hueso huésped ni la presencia de tejido conectivo que rodee al material implantado, lo que junto al hecho de observar crecimiento óseo tanto en la periferia como en el interior de los implantes y la unión de las trabéculas del hueso huésped a las trabéculas neoformadas, confirma la capacidad de osteointegración de la espuma HABP.

Ya se ha comentado previamente que según Shors, los implantes para su correcta osteointegración y osteoconducción han de cumplir unos criterios (criterios de Shors) denominados “triada de osteoconducción” (140), que comprende los conceptos de proximidad, viabilidad y estabilidad. En cuanto a la proximidad del implante al hueso del lecho se admite que no debe ser mayor de 1 mm (268) .

Las características físicas de la espuma HABP, con capacidad de expansión producida tras la humidificación con la sangre derivada de la realización del defecto óseo, permite un contacto íntimo entre las paredes del defecto óseo y la espuma HABP (incluso < de 1mm); por otra parte este contacto tan estrecho a su vez favorece la estabilidad del implante en el lecho receptor. La observación en las muestras histológicas de la clara unión entre las trabéculas neo-formadas y las del hueso huésped, lo que se ha traducido en nuestro estudio, en la ausencia de tejido fibroso alrededor del implante confirma la viabilidad del lech receptor (tercer criterio de Shors). Esto demuestra que el diseño de la HABP cumple las condiciones ideales de proximidad, viabilidad y estabilidad, descritas por Shors (140), para el crecimiento óseo e integración de un implante en el tejido óseo, produciéndose un

crecimiento osteonal directo a través de la unión implante-hueso lo que demuestra la perfecta osteointegración de la espuma HABP.

La capacidad de osteointegración de otras formas de hidroxapatita ya había sido definida previamente, en estudios sucesivos por distintos autores (119,202,301,320–323).

Hay estudios publicados sobre todo en el área de la Odontología que valoran el porcentaje de osteointegración con el índice B.I.C. (*bone implant contact*), siendo este el cociente entre el perímetro total del implante y el perímetro en contacto directo con el tejido óseo (324). En los estudios en los que utilizan este índice lo hacen por medio de histomorfometría, método no utilizado en nuestro trabajo, porque aunque actualmente si estamos en disposición de su uso, en el momento de la realización de este trabajo no se disponía de la técnica. Debido a no poseer esta herramienta no hemos podido cuantificar ni medir parámetros para evaluar superficies de contacto hueso-implante, áreas de tejido óseo ó áreas de implante en la sección histológica. La histología simple empleada en este trabajo permite observaciones cualitativas pero no cuantitativas. La histología simple presenta como ventajas su accesibilidad y economía, pero como desventajas principales la de ser un método cualitativo no medible y por lo tanto sujeto a la dificultad para realizar comparaciones entre distintos especímenes.

### **3.3. OSTEOCONDUCCIÓN**

En nuestro trabajo y coincidiendo con una gran cantidad de autores hemos podido demostrar la capacidad osteoconductora de las cerámicas fosfocálcicas. La espuma HABP se comportó como un material osteoconductor cumpliendo los criterios de la “ triada de osteoconducción” descrita por Shors ya explicados en el apartado anterior. La espuma HABP actuó como un andamiaje para las células óseas permitiendo la regeneración de tejido óseo a través de su estructura (200,296,315,325–330).

Boyde en 1999 (296) realiza un trabajo en el que implanta cilindros de HA con forma anatómica en un defecto óseo segmentario realizado en las tibias de 2 ovejas con tamaño de 2 cm de diámetro y 35 mm de longitud; este defecto es mucho mayor al defecto crítico habitualmente usado en estos estudios en las tibias de ovejas. Los cilindros están fabricados exclusivamente por HA porosa por lo que debido a la escasa resistencia mecánica de ésta, durante los 5 primeros meses las ovejas llevaron un fijador externo (F.E.). Una de las ovejas se sacrificó a los 2 meses de la intervención cuando aún portaba el F.E. y la otra a los 9 meses, 4 meses después de haber retirado el F.E. Los resultados sobre la osteointegración se evaluaron por SEM. La cerámica se integró ampliamente en el hueso, que creció sobre y fuera de la totalidad de los cilindros, así como en los espacios de poros. En la estructura de HA antes de su implante se comprobó la no existencia de grietas o fragmentos sueltos. En cambio si que observaron “fracturas “ en la estructura de HA tras el estudio, lo que ellos creen que es debido en parte, a que éstas se produjeron in vivo como fracturas por fatiga, debido a mecanismos de torsión y tracción aplicados sobre la HA a través

del hueso recién formado. Por otra parte el hallazgo de grandes huecos sin HA lo atribuyen a la desintegración de la misma. El autor llega a la conclusión de que la adaptación del hueso a la HA conduce a su fractura y que éstas microfracturas proporcionan superficies recién generados igualmente osteoconductoras.

Nosotros a diferencia de Boyde no podemos valorar el hecho de la capacidad de que microfracturas en el espesor del andamio puedan favorecer la mayor osteoconducción, esto es debido a que en el procesamiento histológico, las secciones se evalúan en dos dimensiones y proporcionan una representación de un tejido de tres dimensiones incompleta y potencialmente engañosa en los poros de los andamios. Nuestro modelo permite el paso de cargas a través del implante mientras que el empleo de un fijador externo como Boyde condiciona el “puenteo” de cargas a través del fijador, disminuyendo el estímulo mecánico sobre el lecho receptor y el implante.

Para reemplazar el andamio insertado por tejido óseo nuevo son necesarias células osteoprogenitoras. Estas células pueden provenir del periostio localizado en el lugar de la fractura, o entrar en el andamio mediante quimiotaxis en la sangre del hematoma (331). En nuestro modelo experimental, los cilindros de espuma HBP absorbieron la sangre del hueso sano circundante, permitiendo la colonización de células posterior. Además, este hecho implicó un aumento intraoperatorio de la estabilidad primaria de la espuma por medio de la adaptación elástica de su forma y contorno a las paredes del defecto óseo. Posteriormente, estímulos específicos mecánicos y biológicos hacen que las células se diferencien en osteoblastos (331). De esta forma, este ambiente promueve unas condiciones adecuadas de crecimiento óseo sobre un andamio bioactivo, por medio de un proceso de atracción de células



del hueso circundante y oseointegración progresiva posterior una vez que los vasos sanguíneos y los fibroblastos proliferen en el coágulo de fibrina.

### **3.1. TAMAÑO PORO Y PORCENTAJE DE POROSIDAD**

A la hora de diseñar un andamio cerámico para su uso como un sustituto óseo con adecuadas condiciones de osteogenicidad y osteoconductividad, han de tenerse en cuenta una serie de características en cuanto a la porosidad.

Nuestra espuma HABP presenta poros esféricos con tamaño en el rango 100-400  $\mu\text{m}$ . que es un tamaño que ha sido ampliamente demostrado como óptimo para favorecer la osteogénesis. Hulbert et al ya describían en los años 70 que el tamaño de poro de los andamios de regeneración ósea debía tener un tamaño mínimo de 100  $\mu\text{m}$  (120). Trabajos posteriores aconsejan diámetros mayores a 300  $\mu\text{m}$  (332–334).

Sin embargo autores como Klawitter (24), Eggli (25) y Galois y Lax (26) afirman que es posible la regeneración ósea en andamios con tamaño de poros inferior a 50  $\mu\text{m}$  (301,327–329), lo cual a nosotros nos parece difícil debido a que la mayor parte de la literatura publicada aboga por diámetros mayores que por otra parte coinciden con los sistemas haversianos sistemas normales que es de aproximadamente 100-200  $\mu\text{m}$  (115).

El porcentaje de porosidad es otro aspecto importante en el momento de diseñar cuerpos porosos para regeneración ósea.

Los valores de porosidad presentes en el hueso trabecular varían entre el 30 y 90% (335) con una porosidad interconectada entre el 50 y 90% (189,231). El

material utilizado en nuestro trabajo es una espuma de HA porosa con un porcentaje de poros del 70% que es una cifra que presentan la mayoría de las espumas hidroxiapatíticas que hemos revisado (302,336–339).

Cabe destacar que los andamios fabricados a partir de biomateriales con una alta tasa de degradación no deben tener porosidades muy elevadas (> 90%) con el fin de evitar comprometer la integridad mecánica y estructural del andamio antes de que se haya producido la sustitución adecuada del mismo por el tejido óseo recién formado (234).

Durante los estudios previos realizados por el equipo de la Dra. Vallet para determinar la estructura macroporosa tridimensional óptima para la fabricación de la espuma que ha dado lugar a este trabajo, se observó que la macroporosidad de las muestras aumentaba proporcionalmente a la relación molar F127/TIP, mostrando la evolución de una pieza cuasidensa a una espuma 3D. Esta macroporosidad aumentaba del 60% al 93% para la HA0 y HA11 respectivamente. Teniendo en cuenta el rango de macroporosidad de 1 a 300  $\mu\text{m}$ ., la cantidad de esta porosidad interconectada aumenta pero cuando la relación molar F127/TIP es de 14 la espuma 3D se destruye debido a la alta fragilidad de su estructura.

Durante la búsqueda bibliográfica una de las espumas de hidroxiapatita con mayor porcentaje de porosidad es la que describe Lax Pérez y que denomina HA-09. Se trata de una espuma con poros esféricos de 50  $\mu\text{m}$  y un porcentaje de porosidad de casi el 90%. Utilizan como animal de experimentación 12 conejos albinos raza Nueva Zelanda a los que le realizan un defecto óseo crítico en la metáfisis proximal de las tibias. Ellos informan la capacidad osteoconductora de su espuma que actúa como un sistema de andamiaje para las células óseas, lo cual llama la atención ya que

la gran mayoría de estudios señalan la necesidad de un tamaño de poro mayor a 100  $\mu\text{m}$ . Quizás ese tamaño de poro menor hace aumentar la resistencia mecánica de la espuma, ya que muchos de los estudios que han intentado llegar a porcentajes de porosidad tan elevados con un tamaño de poro mayor al que describe Lax han concluido con la destrucción del sistema debido a la baja resistencia mecánica. Ejemplo de ellos son los trabajos previos para la obtención de la espuma objeto de este trabajo (301).

Estamos de acuerdo con autores como Klawitter y Hulbert (340), Schepers (341), Lax (301), Bohner (342) y otros muchos autores quienes consideraban que la existencia de conexiones interporo facilita el crecimiento óseo en su interior.

La disposición de los poros y su interconectividad son un factor importante que contribuye a la buena integración del tejido óseo en el cuerpo poroso; Bohner y col (342) indicaron que el crecimiento del hueso está directamente afectado si hay una interconexión a través de ventanas con tamaños mayores de 50  $\mu\text{m}$ . Esta interconectividad entre los poros es la que promueve la circulación del fluido corporal y la migración celular al núcleo del implante (227) y según Mastrogiacomo y col. (345) la interconectividad incompleta puede representar una limitación del sistema sobre todo biológico, restringiendo la invasión de vasos sanguíneos (231).

Es conocido que valores superiores al 10% de porosidad en los materiales cerámicos, indican interconectividad (243), por lo tanto, ésta se deduce directamente de altos niveles de porosidad (231,242,344). Así cuanto más alta sea la porosidad mayor será la probabilidad de interconexión entre los poros.

De lo anterior se deduce que nuestra espuma HABP con un porcentaje de

porosidad del 70% presenta interconexión entre poros, hecho por otra parte comprobado en nuestro experimento, al observar crecimiento óseo no solo en los poros de la superficie sino en los poros del interior del implante lo cual no sería posible si no la espuma HABP no presentara dichas ventanas entre poros.

La interconexión limitada entre poros adyacentes ha sido reportado como causa de la penetración incompleta del tejido óseo en la parte central del implante tanto con el uso de la HA como con el uso de otros biomateriales (271,278,345).

Hallazgos similares se han encontrado en estudios experimentales previos del grupo en conejos con otros materiales como un vidrio y una vitrocerámica en el tratamiento de defectos óseos. En estos trabajos se observó la disolución de la superficie periférica y la fragmentación de los implantes, con crecimiento óseo sobre superficies como prueba de la osteointegración excelente, pero sin crecimiento de los huesos en el interior debido a la ausencia de porosidad de los implantes probados en esos estudios (266,267).

Así vemos que un porcentaje elevado de porosidad y un tamaño grande de poro facilitan el crecimiento del hueso en el interior del andamio pero hasta un límite, debido a que a partir del cual se compromete la integridad estructural del andamio afectándose de manera negativa las propiedades mecánicas del mismo (346)

Aunque no se pueden definir cifras exactas ideales de porcentaje de porosidad y tamaño de poro debido a la amplia gama de características de hueso in vivo y a la diversidad de biomateriales existentes (207), se puede decir que cuanto mayor es el porcentaje de porosidad y el tamaño de poro, se favorece el crecimiento óseo a través del andamio y la osteointegración del mismo.

Para finalizar este apartado vemos como se cumple la capacidad de la espuma HABP de favorecer la osteoconducción, definida ésta previamente en la introducción, como propiedad pasiva de un material o tejido de recibir y guiar el crecimiento óseo, por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor.

### **3.4. BIOCOMPATIBILIDAD**

En general, tras el implante de un andamio se desencadena una serie de respuestas en el huésped que en conjunto se denominan “reacción a cuerpo extraño”. Esta reacción está caracterizada por la adsorción de proteínas no específicas a la superficie del andamio y por la adhesión de células como monocitos / macrófagos , leucocitos y plaquetas. Si el proceso inflamatorio continúa, los macrófagos se fusionan entre ellos formando células gigantes multinucleadas, para finalmente formar una cápsula colágena que rodea al implante (347). Para que el andamio induzca con éxito la formación de tejido *in vivo*, el andamio debe ser capaz de controlar la respuesta biológica que produce.

Este fenómeno se puede observar en las muestras histológicas de nuestro trabajo. Se advierten reacciones a cuerpo extraño con células gigantes multinucleadas que contienen el material en el interior del citoplasma, consideramos que podrían tratarse de una incompleta reabsorción del andamio cerámico de HABP durante los cuatro meses que ha durado del estudio *in vivo*, sugiriendo que quizás podría desaparecer si se hubiera realizado un periodo de seguimiento mayor. A esta misma conclusión llega Barbeck en su trabajo, él también observa un tejido de granulación en el que abundan principalmente los monocitos, los macrófagos y células gigantes

multinucleadas; ellos informan de que se trata de una degradación del material guiada por las células del huésped.

Esta leve respuesta inflamatoria evidencia la biocompatibilidad de la espuma HABP cumpliendo una de las primeras premisas que debe cumplir un sustituto óseo (roche).

Los hallazgos observados concuerdan con los artículos publicados sobre las cerámicas fosfocálcicas y en concreto con la HA (278,309,348).

Esta reacción inflamatoria también se ha observado con el uso de otros materiales. Miño-Fariña N. evaluaron el comportamiento in vivo de un cemento de TCP en 36 conejos de Nueva Zelanda inyectado en el cóndilo femoral. Evaluaron histológicamente los resultados a la semana, a las 4 semanas y a los 3 meses. Ellos describen una mínima reacción inflamatoria al final de seguimiento caracterizada por la presencia de muy escasas células gigantes multinucleadas(278) .

Lax Pérez describe resultados similares; ellos utilizan una espuma de hidroxiapatita y la implantan en un defecto óseo crítico realizado en las tibias de 12 conejos de nueva Zelanda. Quizás una ventaja de su trabajo es que sacrifican los animales de manera escalonada a la semana, al mes, a los 5 meses y a los 8 meses; de esta manera pueden valorar de una manera más precisa la evolución de la regeneración ósea debida a la espuma. Ellos describen una respuesta inflamatoria poco relevante que es mas acusada en la primera semana. No observan en ninguna de las muestras presencia de fibrosis entre la cerámica y el huésped (202).

Cabe señalar que muchos de los artículos de la bibliografía revisada no hace mención de esta respuesta inflamatoria frente al material (349).

Una de las estrategias más investigadas para hacer frente al problema de la reacción a cuerpo extraño ha sido la modificación de las propiedades superficiales de los andamios porosos para conseguir guiar la adsorción de proteínas (350). La interacción inicial de la proteínas con el andamio es crucial, ya que es esa unión la que controla y guía los procesos de acercamiento y adhesión celular. La adhesión celular a las proteínas adsorbidas es un proceso que se lleva a cabo mediante integrinas y otros receptores locales localizados en la membrana celular (351). Así, es aceptado de manera universal que el control de la adsorción de la proteínas a la superficie de los biomateriales es crucial para el control de la respuesta celular (350).

Se han desarrollado muchas técnicas con el fin de modificar las características superficiales de los andamios para mejorar la regeneración tisular que producen; por ejemplo mediante sustancias químicas, mediante la modificación de la humedad de la superficie o variando la estructura de la superficie (350). Zheng demostró en su trabajo la mejora de la funcionalidad de la policaprolactona en un injerto vascular mediante su recubrimiento con RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) (352). Los implantes resultantes presentaban menor tasa de oclusión, mejor hemocompatibilidad y una distribución más homogénea que los mismos implantes sin estar recubiertos por RGD. Aunque este enfoque sigue siendo popular debido a su relativa sencillez, su eficacia requiere un estrecho control sobre la composición de la capa de proteína adsorbida para poder estimular una adecuada respuesta celular que favorezca la reparación de heridas y la regeneración tisular. Por el contrario cuando las proteínas se encuentran en un estado irreconocible pueden simular ser materiales extraños que tenderán a ser aisladas o retiradas (75). Vale la pena señalar, que la eficacia *in vivo* de estos enfoques aún no ha sido demostrada, siendo necesario la existencia de nuevos estudios experimentales *in vivo*, que relacionen la función de la superficie de

los andamios y su respuesta *in vivo* a corto plazo, así como para demostrar que este enfoque puede ser también útil para el control de la respuesta celular a largo plazo (75).

Por otra parte en nuestro estudio no hemos detectado toxicidad frente a la HABP a estudio. Dos animales fueron excluidos del estudio a causa de su fallecimiento, que nada tuvo que ver con el material implantado. El resultado necrópsico reveló que la causa del fallecimiento del espécimen 7170607 fue debida a una gastroenteritis hemorrágica y la del espécimen 71721 a una enteritis catarral. Ninguna de las dos causas de muerte tuvo que ver con una probable toxicidad de la HABP.

### **3.5. RESISTENCIA MECÁNICA**

El problema principal que plantea la hidroxiapatita pura es que posee pobres propiedades mecánicas debido a que es frágil y quebradiza, lo que ha reducido sus aplicaciones. En algunos casos al ser sumergida en diferentes fluidos biológicos ha mostrado una desagregación total y una elevada solubilidad a valores de pH ácidos o básicos a respectivamente. Si se desea que el implante se pueda someter a carga más elevada, es necesario modificar sus propiedades mecánicas. Se han generado técnicas de procesamiento innovadoras que han mejorado las propiedades mecánicas del producto final (231).

La manera que hemos utilizado en nuestro caso para aportar resistencia mecánica a la hidroxiapatita es la adición de un polímero. Éste, es un método simple y eficaz ampliamente utilizado por muchos autores. Al añadir el polímero se ocupan



las microfisuras existentes en la estructura cerámica aumentado la resistencia global del andamio y en algunos casos incluso proporcionando efecto de refuerzo lo que evita la desagregación de las piezas, mientras que se mantiene la integridad de la estructura 3D de espuma. El mecanismo se cree que es análogo al proceso fractura del hueso y la dentina, en donde las fibras de colágeno proporcionan un elemento de fortaleza (216). El alcance real de este efecto refuerzo dependerá de las propiedades mecánicas del polímero, la calidad de la infiltración y las condiciones en la interfaz polímero-cerámica (217). En esta tesis el biopolímero elegido para fabricar el compuesto con HA fue la gelatina por ser un polímero biodegradable con muchas propiedades atractivas, tales como excelente biocompatibilidad, no antigenicidad, plasticidad y adhesividad. La gelatina además, promueve la adhesión celular y la migración. Por otra parte es ampliamente utilizado como polímero en la fabricación de andamios compuestos.

Revisando la literatura podemos observar el uso de polímeros naturales y sintéticos de diferentes orígenes , como el quitosano (353) , el colágeno (354), gelatina (355), ácido hialurónico (356), la fibrina (357), almidón (358), ácido poliláctico (PLLA) (359), ácido glicólico polilactico (PLGA) (360) y policaprolactona (PCL) (361) se han propuesto para este propósito (302).

Nuestro trabajo se basa en estudios previos donde se realizaron distintos ensayos para determinar cual era la combinación ideal de los componentes de la espuma HABP como se ha comentado en el material y métodos.

Son muchos los autores que al igual que nosotros eligieron la gelatina como biopolímero ya sea de manera aislada o en combinación con otros. Mohamed KR and col publican en 2014 sus resultados *in vitro* de un compuesto formado por una nano-

hidroxiapatita con quitosano y gelatina. Ellos demuestran que la degradación de la HA se redujo en los compuestos a los que se les había agregado la matriz quitosano-gelatina lo que disminuía su fragilidad y que la deposición de partículas de HA en la superficie del material compuesto aumentó con la adición de dicha matriz polimérica (362). Cabe destacar que en su compuesto a diferencia del nuestro utilizan nanohidroxiapatita que según autores presenta una solubilidad mayor lo que afecta la a la respuesta biológica.

Un tema controvertido es que el andamio debe soportar las demandas mecánicas del sitio lesionado durante todo el proceso de regeneración, lo que implica que las propiedades y mecanismos de degradación deben trabajar en equilibrio con la formación de tejido nuevo. Esta es un área que le ha costado mucho esfuerzo a la comunidad científica, de hecho, todavía no está claro si este equilibrio implica que la tasa de formación de tejido y de degradación del material deben ser iguales, o si alguna debería ir más avanzada que la otra. Esto dependerá principalmente de las propiedades del material, de la zona por regenerar y del paciente como tal (209,363,364).

La espuma HABP está destinada a ser utilizada en condiciones de requisitos mecánicos bajos, como para relleno de cavidades o como recubrimiento de superficies, o en caso de requisitos mecánicos mayores estos materiales se han de combinar con firmes materiales de osteosíntesis que mantengan la carga del hueso hasta la curación completa.

En el caso de defectos óseos con altos requisitos mecánicos quizás sería más adecuado la utilización de otro material.

En 2004, Gil Albarova y cols realizaron un estudio in vivo del

comportamiento de dos materiales, el vidrio  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$  y la vitrocerámica  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO -MgO}$  en conejos Nueva Zelanda. Realizaron defectos en la epífisis femoral distal de 5 mm de diámetro y 4 mm de profundidad, que fueron rellenados con los biovidrios. Realizaron estudios radiológicos e histomorfométricos, que mostraron una unión íntima entre el nuevo hueso formado y los implantes. Los autores concluyen que ambos materiales son útiles para la sustitución y reparación ósea. Sus indicaciones incluyen el relleno de cavidades y el recubrimiento de superficies de implantes. La mínima degradación de los discos de vidrio-cerámica sugiere su aplicación en localizaciones de soporte de peso o transmisión de fuerzas (266).

En 2005, Gil Albarova y cols estudiaron en defectos críticos realizados en diáfisis de conejos Nueva Zelanda un biovidrio con composición 70%  $\text{CaO}$ –30%  $\text{SiO}_2$  y una vitrocerámica obtenida por calentamiento térmico de un biovidrio. Encontraron una unión íntima entre el nuevo hueso formado y ambos materiales estudiados. Los estudios mecánicos mostraron mejores resultados para el grupo de vitrocerámica. Proponen la aplicación de los cilindros de biovidrio para utilización en localizaciones donde se prefiere una rápida reabsorción, considerando la posibilidad de servir como vehículo de fármacos o células (267).

### **3.6. DEGRADABILIDAD**

La tasa de degradación del andamio se ve influenciada por la porosidad y por el tamaño de poro. Un área de superficie de poro mayor mejora la interacción de los materiales de andamio con el tejido del huésped y de este modo se puede acelerar la degradación por los macrófagos a través de la oxidación y / o hidrólisis (207).

Los andamios fabricados con materiales que se degradan lentamente y que tienen propiedades mecánicas sólidas pueden, en cambio, ser altamente porosos (207,234).

En un trabajo sobre el mismo material realizado con anterioridad (258), se estudió de manera exhaustiva el proceso de degradación del mismo así como la respuesta in vitro de osteoblastos frente al material, mostrando un excelente comportamiento in vitro y una tasa de degradación adecuada sin aparición de productos de degradación citotóxicos.

En nuestro trabajo en la mayoría de las muestras analizadas se ha observado la presencia de reacciones de cuerpo extraño bien delimitadas, en las que destaca la existencia de células gigantes multinucleadas de gran tamaño, que con frecuencia contenían en su citoplasma restos de la HABP lo que demuestra la degradación incompleta de nuestro material a 4 meses. Acompañando a éstas se observaba un proceso de fibrosis reactiva. Esta observación es concordante con muchos de los trabajos revisados en los que, a pesar, de trabajar con materiales de mayor capacidad de degradación a la finalización del estudio todavía observan restos del material testado (202). En el trabajo de Barbeck antes mencionado aún con un periodo de seguimiento mayor al nuestro ( 6 meses) y de trabajar con un material cuya degradabilidad es mayor, tampoco observa la degradación completa del material (309).

La menor degradabilidad de la hidroxiapatita en comparación con otros materiales similares como el b-TCP ha sido ampliamente demostrada; por ejemplo en 2014 Yang (349) publica un artículo en el que evalúan in vivo la capacidad de regeneración ósea y de degradabilidad de tres tipos de cerámicas fosfocálcicas con

diferente proporción de HA/b-TCP: b-TCP puro, un compuesto HA/b-TCP con un ratio de 60/40 (BCP 60/40), y un tercer compuesto HA/b-TCP con un ratio de 20/80 (BCP 20/80). El animal de experimentación elegido fue el conejo y la localización anatómica la bóveda craneal. A 10 animales se les realizó 4 defectos de 8 mm de diámetro; se implantó cada uno de los 3 materiales en 3 de los defectos de cada animal; en el cuarto defecto no se implantó ningún material. Los resultados histológicos e histomorfométricos se evaluaron a las 2 y a las 8 semanas. La formación de hueso nuevo se incrementó en general durante todo el período de curación en todos los grupos del estudio, pero la cantidad fue menor en el grupo b-TCP. Este hecho lo atribuyen a la mayor degradabilidad de las partículas de b-TCP en comparación con la HA, que en este material es una característica más dominante que la formación de hueso, especialmente en el período de cicatrización temprana en cambio la cantidad de formación de hueso nuevo a las 8 semanas post-cirugía fue mayor en el grupo BCP 60/40 demostrando la gran capacidad osteogénica de la HA.

En este estudio in vivo, la reabsorción de partículas BCP no parece ser afectada significativamente por la relación HA/b-TCP durante el período de observación. Quizás esto sea debido a que este periodo fue tan solo de 2 meses. Al contrario que lo que dice Kwon que asegura que la velocidad de disolución de los compuestos HA/b-TCP dependen en gran medida del contenido de b-TCP (365).

En el trabajo de Yang también describen como el uso de cualquiera de las combinaciones de BCP produjo una unión fuerte y directa entre el hueso y el material, especialmente en el margen del defecto demostrando la capacidad de formar hueso entre los tejidos y el material, resultando en una interfaz única y fuerte de las cerámicas fosfocálcias y según este estudio esta es mayor en presencia de hidroxiapatita (349).

### **3.7. OSTEOINDUCCIÓN**

Un aspecto que continúa siendo controvertido es la potencial capacidad osteoinductiva de las cerámicas de fosfatos de calcio, hecho que ha venido siendo descrito desde 1994 y que recientemente se ha hecho extensiva a algunas formulaciones de cementos fosfocálcicos. La posible osteoinductividad de los biomateriales cerámicos ha sido postulada al encontrar neoformación ósea al implantarlos en tejidos blandos, especialmente a nivel muscular en animales de experimentación. Los autores que defienden esta postura consideran que determinadas geometrías y composiciones específicas de las cerámicas de fosfatos de calcio, son capaces de reclutar factores osteoinductivos endógenos en los tejidos blandos implantados que se encargan de promover la neoformación ósea. No obstante, los mecanismos íntimos de este tipo de osteogénesis no han sido dilucidados (7).

Trabajos antiguos como el de Piecuch demostraban la no capacidad inductiva de las cerámicas fosfocálcicas. En su trabajo describen como tras la implante de una HA coralina a nivel subcutáneo en perros no se produjo formación ósea (336).

Dong J (366) realiza un estudio in vivo en el que usa un espuma similar a la nuestra fabricada con HA y un polímero denominado polioxietileno lauril eter (PEI) pero a la que le añaden osteoblastos derivados de médula ósea. La espuma presentaba un porcentaje de porosidad del 77%, con poros interconectados del tamaño de 500  $\mu\text{m}$ . Implantaron el biomaterial a nivel subcutáneo en ratas durante un periodo de 8 semanas. Evaluaron los resultados mediante análisis bioquímico de la actividad de la fosfatasa alcalina y el contenido de osteocalcina ósea y con análisis histológico. Llegaron a la conclusión de que el compuesto HA-PEI presentaba

capacidad osteogénica in vivo. Este estudio es poco valorable para valorar la osteoinducción de las cerámicas de fosfato cálcico debido al sembrado con osteoblastos.

Por otra parte estudios más recientes si que informan de la posible inducción de las cerámicas fosfocálcicas. Yamasaki describe en su artículo publicado en 1992 la formación de hueso heterotópico en 6 de los 10 perros a los que les implanta gránulos de HA a nivel subcutáneo en el abdomen y sólo observa esta neoformación ósea a partir de los 6 meses de seguimiento. Sugiere que la diferenciación celular y la osteogénesis puede ser influenciada por factores físicos y bioquímicos existentes en el microambiente existente en los gránulos de HA (367).

Kurashina obtiene resultados similares tras inyectar cerámicas de fosfato cálcico a nivel intramuscular en conejos durante 6 meses. Uno de los compuestos que analizaron además de conseguir a lo largo del tiempo el mantenimiento de su estructura porosa logró inducir formación de hueso. Los otros dos compuestos testados no consiguieron inducir la formación de hueso; también observaron que estos compuestos mostraron evidentes cambios en su forma macro y microscópica con el paso del tiempo. Concluyen que las cerámicas fosfocálcicas son capaces de inducir formación de hueso extraesqueléticamente y que el mantenimiento de la estructura del material o dicho de otra manera su tasa de degradación puede ser uno de los factores que afecten a la osteogénesis inducida por las cerámicas (368).

Pollick llega a unos resultados interesantes tras implantar en 2 perros adulto un total de 56 implantes (fémur, músculo esquelético y tejido subcutáneo) de una cerámica porosa compuesta por una fina capa de hidroxiapatita sobre un sustrato de carbonato de cálcico. El seguimiento fue de 4 meses. Observaron que la tasa de

degradación del material fue más rápida para los implantes colocados en defectos óseos que en el tejido blando. Una observación sorprendente fue que el crecimiento óseo se produjo en el 67% de los implantes colocados en los tejidos blandos. Este hueso era histológicamente normal en el 71 % de los implantes que contienen hueso. Escriben que no son capaces de entender los mecanismos exactos por los que ocurren ambos fenómenos (369).

Tras la valoración de estos estudios, la osteogénesis producida por la HABP quizás sea debida más que a una posible capacidad de inducción de la cerámica en sí ya que ésta en la mayoría de los estudios se produce a partir de los 6 meses, a la proliferación celular y de factores de crecimiento a partir del tejido óseo circundante y su transformación subsiguiente en células formadoras de hueso, dando lugar como defendió Loty y cols (306) a la osteogénesis por contacto.

LeGeros y col también apoyan la capacidad de osteoinducción de las cerámicas combinadas de b-TCP e HA. Yang atribuye esta capacidad no a una propiedad inherente de las cerámicas BCP y de la HA sino a la probable consecuencia de una geometría crítica que permite la concentración endógena de las BMPs hasta un nivel que permite la osteoinductividad (370–372).

### **3.8. MANEJABILIDAD - FORMA FÍSICA DEL MATERIAL**

Un aspecto todavía de difícil solución es la manejabilidad quirúrgica.

La forma física del biomaterial insertado en un defecto óseo es un aspecto que influye de forma significativa en el proceso de neoformación ósea.

Estamos de acuerdo con Moioli en que la inserción en un defecto óseo de un



material o injerto en forma de bloque deja huecos en la interfase hueso autógeno y biomaterial o injerto lo que supone una barrera física para la colonización celular (373,374). Cada vez más las líneas de investigación abiertas para la búsqueda del sustituto óseo ideal hacen hincapié, además de en las propiedades químicas del mismo, en las propiedades físicas. Es mucho más fácil y rápida la reparación de un defecto en el que se introduce un injerto en forma de partículas o espumas, como en nuestro caso, que si se introduce en forma de bloque, ya que en el primer caso se favorece la colonización del injerto por células osteoprogenitoras y la neoformación a su través de una red vascular que proporcione nutrición a las células (373,374). Por otra parte debido a que la formación de vasos sanguíneos ocurre de forma centrípeta, es decir, desde la periferia hacia el centro del defecto, los injertos en bloque también presentan menos estructura vascular en su región central al ser comparados con los injertos en partículas o espumas (375).

Estamos de acuerdo con Nishimura en que el tipo de defecto óseo define en gran parte la forma física del implante a utilizar, de tal manera que lo idóneo es que el material se adapte de forma adecuada a la forma del defecto y que haya la mínima cantidad de espacio entre el implante y el lecho receptor (375).

La manejabilidad quirúrgica es un de los aspectos a destacar de nuestra espuma. Ésta manejabilidad se ha conseguido gracias al recubrimiento orgánico con gelatina que le proporcionó flexibilidad y capacidad de humidificación. Esto permite que la espuma se expanda con los fluidos corporales como la sangre condicionando su adaptación de manera perfecta a la forma de la cavidad asegurándose una buena fijación y estabilidad primaria del material sin necesidad de cementos. En la práctica clínica diaria esta flexibilidad y adaptabilidad de un sustituto óseo es de gran ayuda debido que la mayoría de los productos comerciales no tienen la capacidad de

adaptarse de forma perfecta al defecto. La estabilidad del implante resulta además un factor favorecedor de la osteointegración del mismo (140).

Mohamed KR también describe en su artículo que la adición de quitosano-gelatina a un andamio de HA aumenta la capacidad de absorción del agua. Recalcan que esta capacidad se incrementa con una mayor concentración de calcio (362).

#### **4. ANÁLISIS DEL ESTUDIO RADIOLÓGICO**

Las imágenes realizadas con radiología simple en proyección lateral, durante todo el seguimiento postoperatorio a las epífisis de los fémures donde estaban colocados los cilindros de espuma HABP, demostraron una osteointegración progresiva, con crecimiento y remodelación ósea de dicho defecto, a diferencia de los defectos óseos controles, en los que solo se observó la reparación de la cortical a expensas del periostio circundante.

Realizamos sólo una proyección lateral en lugar de dos proyecciones (anteroposterior y lateral) por dos motivos; en primer lugar, en la proyección radiológica anteroposterior de la rodilla, la superposición rotuliana sobre el implante artefactaría la interpretación radiográfica; en segundo lugar por economía y radioprotección de la doctorando y directores que mantuvimos inmovilizado el animal bajo sedación durante la realización de la misma.

A medida que el uso clínico de los materiales cerámicos aumenta, la necesidad de una evaluación de diagnóstico fiable in vivo se convierte cada vez más necesaria.

Desafortunadamente todavía no existen métodos no invasivos precisos para la

evaluación de la formación de hueso nuevo en presencia de matrices que contienen minerales tales como b-TCP o HA, ya que éstos dificultan la determinación y cuantificación de tejido óseo nuevo en el interior de dicha matriz (376,377) debido a que muchos de los biomateriales utilizados son radiodensos, por lo que eclipsan en parte la osteogénesis producida en los defectos y su remodelación posterior (376,378).

Hoy en día es frecuente el uso de microTC en estudios experimentales. Actualmente disponemos de esta herramienta en nuestro centro; no era así en el momento de hacer este trabajo experimental. El estudio con microTC se puede realizar como estudio de seguimiento seriado, lo que requiere sedación de los animales o puede hacerse también sobre especímenes de necropsia al término del estudio una vez ya sacrificado el animal.

Como ventajas, permite medir y cuantificar parámetros, a diferencia de la valoración cualitativa de la radiología simple. Como desventajas principales el coste económico y el tiempo de adquisición del estudio.

Nolf M.C. publica en 2010 un estudio en el que realizan una hemimandibulectomía (segmento de 25mm) a 10 ovejas tras lo cual le realizan una reconstrucción utilizando un TCP poroso radiopaco y una placa. El seguimiento es de 16 semanas tras las cuales sacrifican a los animales y les realizan TC y microradiografías. Compara las imágenes obtenidas mediante TC convencional con las obtenidas mediante micro-radiografía (gold estándar). Concluyen que el TC convencional a pesar de ser el estándar en la evaluación clínica de la cicatrización ósea, no permite la diferenciación entre el material cerámico y el callo recién formado. Tampoco ofrece suficiente resolución para diferenciar los materiales en función de su microestructura (trabecular vs. porosa) y evaluar la interfaz o la

cantidad de deposición de hueso nuevo de injerto óseo dentro del material cerámico (379).

Cabe destacar un trabajo publicado en 2008 por Schaaf y col donde se estima el rendimiento de una nueva técnica de diagnóstico denominada tomografía computada volumétrica (VCT). Este método de diagnóstico presenta una resolución de 8 a 16 veces superior al TC convencional. En el momento de la publicación del artículo de Shaaf este nuevo método se limitaba al estudio de lesiones con unas dimensiones determinadas pero es un paso prometedor hacia un mejor seguimiento de los pacientes después del injerto óseo de fosfato de calcio (380).

Debido a lo anterior consideramos que por el momento la valoración con radiología convencional es, por lo menos a día de hoy, la técnica de imagen más utilizada a la hora de evaluar la formación de hueso en estudios experimentales en animales.

Existen diversas escalas para cuantificar la formación ósea y la remodelación en defectos sustituidos con injertos óseos pero todavía no existen baremos radiológicos específicos para el estudio experimental de los defectos óseos cavitarios rellenados de biomateriales (7,273,276).

En este trabajo hemos usado la escala de Lane y Sandhu que asigna una puntuación de 0 a 4 en función de la neoformación ósea porcentual producida en los defectos óseos sustituidos con injertos óseos. Esta escala no tiene considerada la posibilidad de reabsorción del injerto (273).

Zhang y col en su artículo publicado en 2014 utilizan también la escala de Lane-Sandhu la eficacia como sustituto óseo de sus dos grupos de estudio, uno al que le implantan autoinjerto óseo y otro al que le implantan una combinación de

aloinjerto con periostio. Como animal experimental utilizan al igual que nosotros conejos de la raza Nueva Zelanda. En su trabajo debido a la subjetividad interobservador de la escala, todas las imágenes radiográficas fueron valoradas por 3 examinadores independientes familiarizados con los criterios de puntuación. Por este motivo nosotros hicimos lo mismo (381).

Otros autores utilizan esta escala con otros materiales (268,382).

La información aportada por los resultados obtenidos mediante radiología para la valoración de la regeneración ósea producida por los biomateriales, es limitada debido a que plantean una serie de inconvenientes como son la calidad radiográfica muchas veces alterada por la densidad radiográfica del material y la subjetividad del observador. A pesar de esto en el caso de nuestro material consideramos que la información que aporta la radiología es válida debido por una parte a que el material implantado HABP es un material radiotransparente por lo que todo el hueso que hallemos dentro del implante será hueso neoformado. Ha de tenerse en cuenta que en el modelo experimental utilizado en este trabajo se ha respetado la cortical medial del fémur, lo que dificulta la interpretación radiológica por superposición de imágenes en las proyecciones laterales.

Por otra parte con el objetivo de disminuir la subjetividad de las mediciones en la escala de Lane y Sandhu tanto la doctoranda como cada uno de los directores de esta tesis hicieron una valoración individual y posteriormente se decidió una puntuación final de manera consensuada. Según esta escala constatamos que existe una neoformación ósea que comienza a las cuatro semanas y que progresa hacia las dieciséis semanas, también encontramos un inicio de la remodelación ósea más tardío comenzando en la mayoría de las muestras entre la 4ª y la 8ª semana. Por otro

lado, es importante constatar que no observamos fenómenos de osteolisis ni migración del material.

Por lo que, a pesar de las limitaciones del estudio radiográfico y que como he citado previamente estudios revisados desaconsejan formular conclusiones en base a él, en nuestro trabajo si existe relación entre el área trabecular total y la densidad ósea radiográfica.

Nuestros resultados han mostrado una correlación entre los hallazgos histológicos y las observaciones radiográficas

Por otra parte, el estudio de radiografía simple permite descartar la aparición de complicaciones (fracturas, inestabilidad, ...) y es de uso cotidiano en la práctica clínica.

Los trabajos revisados que utilizaron este modelo experimental demostraron que el estudio radiológico es limitado por lo que desaconsejan formular conclusiones en base a él (7,157,186,187,265,266,268,275).

Esto apoya la hipótesis que en nuestro modelo animal, la espuma HABP ofrece unas condiciones óptimas de porosidad, reactividad de la superficie, y una tasa de reabsorción adecuada para la reparación ósea.

# **CAPÍTULO 7:**

# **CONCLUSIONES**

1. La espuma HABP analizada ha demostrado una excelente biocompatibilidad.

2. La espuma HABP analizada es capaz de favorecer la formación de tejido óseo cuando se implanta en un defecto óseo crítico.

3. La espuma HABP actuó como andamio para el crecimiento óseo que siguió la morfología del implante durante el proceso de curación.

4. La capacidad de expansión de la HABP tras ser humedecida en líquidos biológicos facilita al cirujano el perfecto relleno del defecto óseo crítico, lo que mejora la estabilidad en el lecho de implantación y el contacto entre el material y el hueso, favoreciendo la osteoconducción y la osteointegración.

5. La espuma analizada tiene una buena manejabilidad quirúrgica.



# **CAPÍTULO 8:**

# **RESÚMENES**

## 1. RESUMEN

En el campo de la ingeniería de tejidos, las cerámicas de fosfato cálcico son ampliamente utilizadas como sustituto óseo debido a su semejanza estructural a la fase mineral del hueso lo que hace que presenten una buena compatibilidad y capacidad de osteointegración. Las cerámicas fosfocálcicas se pueden conformar mediante distintos métodos de síntesis.

La utilización de cerámicas para la reconstrucción ósea se basa en su semejanza estructural respecto a la fase mineral del hueso lo que hace que presenten una buena compatibilidad y capacidad de osteointegración

El principal requisito que han de cumplir estos andamios es ser capaces de favorecer la formación de tejido óseo, así como asegurar la creación de una red vascular que permita la oxigenación y nutrición del hueso recién formado. Para poder cumplir estos requisitos, los materiales diseñados deben presentar una estructura porosa con porosidad interconectada. Por otra parte ha de existir un compromiso entre la tasa de degradación del material fabricado y la velocidad de regeneración de tejido recién formado.

En nuestro trabajo, se describe una espuma tridimensional (3D) de hidroxiapatita con un alto grado de porosidad que se obtuvo mediante el método sol-gel combinado con la introducción del surfactante Pluronic F127 ( $\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$ ) como agente director de la macroprosidad mediante EISA. Con el fin de conferir flexibilidad y manejabilidad, las espumas resultantes se revistieron por inmersión en una solución de un polímero biocompatible.

Estas espumas han sido previamente propuestas como nuevos dispositivos potenciales para el tratamiento de intoxicación de metales pesados por ingestión y como purificadores de agua.

En este trabajo presentamos el potencial in vivo de la espuma HABP como regenerador de hueso en 15 conejos adultos de raza Nueva Zelanda evaluado desde el punto de vista radiológico e histológico.

Usando una broca motorizada se realizó un defecto óseo de 6 mm de diámetro y 10 mm de profundidad en la vertiente lateral de la epífisis femoral distal de ambos fémures en todos los animales. En el defecto óseo realizado en el fémur izquierdo se implanto un cilindro de la espuma HABP previamente tallado con bisturí con la forma requerida y esterilizado con óxido de etileno. En los defectos óseos realizados en el fémur derecho no se implantó material alguno con el objetivo de que sirvieran de control. Los defectos óseos diseñados correspondían a defectos óseos críticos de acuerdo con los requisitos estándar.

Durante el seguimiento se realizaron de manera mensual radiografías digitales laterales estandarizadas. Todos los animales fueron sacrificados de manera farmacológica y bajo anestesia general tras 4 meses de seguimiento. Tras la muerte de los animales se extrajo el tercio distal de ambos fémures para su estudio anatomopatológico.

Tras la valoración de las pruebas podemos afirmar que la espuma HABP a estudio permitió la curación de defectos óseos críticos localizados en la epífisis distal del fémur de los animales. Los resultados indican que existen considerables diferencias en el potencial de curación entre el grupo control y el grupo al que se le implantó los cilindros de espuma HABP, demostrando la viabilidad adecuada del

hueso receptor. La espuma HAP a estudio mostró evidencias de osteointegración, de crecimiento de hueso sobre su superficies y de remodelación posterior.

Esto sugiere que la espuma HAP se comporta como un andamio adecuado de acuerdo con los criterios de Shors para el crecimiento óseo a través de un implante bioactivo en condiciones ideales (estabilidad, viabilidad y proximidad), por medio de un proceso de reclutamiento de células mesenquimales de los tejidos circundantes sobre el material y la transformación subsiguiente en células formadoras de hueso.

## **2. SUMMARY**

Calcium phosphates are widely used as biocompatible bone fillers and regenerators in tissue engineering, as they are very similar in hardness to natural bone tissue. These types of ceramics are conformed by different synthesis and shaping methods. The main requirement of these scaffolds is to be precursors of newly formed bone as well as to ensure bone oxygenation and angiogenesis. For this purpose the designed materials must have interconnected porosity which must also include a number of macropores. It is also necessary to find a compromise between a suitable degradation rate and a robust scaffold inducing tissue regeneration.

Three-dimensional (3-D) hydroxyapatite (HA) foams with a high degree of porosity were prepared by sol-gel routes including the non-ionic surfactant Pluronic F127 ( $\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$ ) as a macropore inducer using an accelerated evaporation-induced self-assembly (EISA) method. In order to confer flexibility and handleability, the resulting foams were coated by immersion in a solution of a biocompatible polymer.

These foams have previously been proposed by our group as new potential devices for the treatment of heavy metal intoxication by ingestion and as water purifiers.

Herein, for the first time, the potential of these HABP foams as bone regenerators in vivo has been studied in 15 mature New Zealand rabbits. For this purpose radiological and histological studies have been performed to assess the effects of the scaffolds on osteointegration.

Using a motorized drill a bone defect 6 mm in diameter and 10 mm in depth was made in the lateral aspect of both distal femoral epiphyses in all animals. The bone defect in the left femur was then filled using HABP foam cylinders previously carved into the required shape with a scalpel and sterilized with ethylene oxide. The bone defects in the right femora served as controls. The designed bone defects corresponded to critical bone defects according to the standard requirements.

During follow-up standardized lateral digital radiographs were taken monthly. All the animals were killed pharmacologically under general anaesthesia after 4 months. After death the femora were extracted for histological study.

In this study the HABP foam tested allowed healing of epiphyseal limited bone defects in rabbits. The results indicate that there were considerable differences in healing potential between the control group and the group that received carved cylinders of HABP foam, showing adequate viability of the recipient bone. The HABP foam tested showed evidence of osteointegration, bone growth over its surfaces and subsequent remodelling.

This suggests that it performed as an adequate scaffold according to Shors

criteria for bone growth over a bioactive implant under ideal conditions (stability, viability and proximity), by means of a process of mesenchymal cell recruitment from the surrounding tissues and subsequent transformation into bone-forming cells.

# **CAPÍTULO 9:**

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Sanchís Olmos, V. El banco de huesos del Hospital Provincial de Madrid. *Acta Ortop Traumatol Ibérica*. 1953;1:3–22.
2. 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.
3. Kaplan FS, Hayes W, Keaveny T, Boskey A, Einhorn T, Iannotti J. Forma y Función del hueso. In: *Ciencias básicas en ortopedia American Academy of Orthopaedic Surgeons*. Simon SR; 1997. p. 135–91.
4. 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.
5. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. Academic Press Inc; 1996.
6. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int*. 1993;53 Suppl 1:S102–6; discussion S106–7.
7. Sanzana Salamanca ES. Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos en defectos cavitarios experimentales. *Universitat de Barcelona*; 2004.
8. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone*. 1992;13 Suppl 1:S3–6.
9. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop*. 1991 Feb;(263):30–48.
10. Torzilli PA and cols. The mechanical and structural properties of maturing bone. En: *Mechanical Properties of Bone*. New York: American Society of Mechanical Engineers. Cowen SC Ed. 1981;145–61.
11. Ferrández Portal L. Capítulo 11: Fisiopatología ósea. In: *Manual SECOT de cirugía ortopédica y traumatología*. Panamericana (ed). Madrid; 2003. p. 10–117.
12. Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG. Functional Histology. In: *Churchill Livingstone Ed*. New York; 1987. p. 146–60.
13. Hooper G. Bone as a tissue. In: *Orthopaedics The Principles and Practice of Musculoskeletal Surgery and Fractures*. Hughes SPF, Benson MKD, Colton C (eds.). London: Churchill Livingstone; 1987. p. 1–14.
14. Ferrandez L. Herrera A. *Fracturas osteoporóticas*. Madrid: Medical & Marketing Communications; 2006.
15. Peel N, Eastell R, Russell G. Markers of bone and collagen breakdown in early inflammatory arthritis. *Baillières Clin Rheumatol*. 1992 Jun;6(2):351–72.
16. Salter RC. *Trastornos y lesiones del sistema musculoesquelético*. Barcelona: Masson, 2000;13.
17. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*. 1998 Oct;(355 Suppl):S7–21.
18. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011;9:66.
19. Comín M, Peris JL, Prat JM, Dejoz JR, Vera PM, Hoyos JV. *Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación*. 1999; Instituto de Biomecánica de Valencia. In Valencia: Ed. Martín;
20. Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop*. 1989 Dec;(249):265–84.



21. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am.* 1991 Jul;73(6):832–47.
22. Ballester Alfaro J.J. and col. Capítulo 1: Regeneración ósea. In: *Biomateriales y sustitutos óseos en Traumatología y Cirugía Ortopédica.*
23. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S3–6.
24. Kwong FNK, Harris MB. Recent developments in the biology of fracture repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008 Nov;16(11):619–25.
25. Giannoudis PV, 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.
26. Sundfeldt M, Carlsson LV, Johansson CB, Thomsen P, Gretzer C. Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop.* 2006 Apr;77(2):177–97.
27. Cornell CN. Regeneration of bone in critical defects. *J Orthop Trauma.* 1999 Oct;13(7):523–4.
28. Jensen SS, Brogini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun;17(3):237–43.
29. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop.* 1986 Apr;205:299–308.
30. 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.
31. Proubasta Y., Gil Mur J., Planell J.A. (eds). *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales.* Ergon SA, 1997.
32. Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop.* 1986 Jun;(207):290–305.
33. Sacramento Dominguez C, Navarro Navarro R, Medina Henríquez JA, Almenara Martínez M, Hernández Lecuona A. Sustitutos de injertos óseos. XV Jornadas Canarias de Traumatología y Cirugía Ortopédica. In 2001. p. 182–4.
34. Van Meekeren J. *Heel en geneeskunstige aanmerkingen.* Commelijjn 1668; Amsterdam.
35. López Martínez JJ. Aloinjertos óseos estructurales en tumores óseos de huesos largos. Experiencia del hospital universitario Virgen de la Arrixaca. [Murcia]: Departamento de Cirugía, Pediatría, Ginecología y Obstetricia. Universidad de Murcia;
36. Von Walter P. Wiedereinheilung der bei der trapanation ausgebohrten knochenscheibe. *J Chir Augen-Heilkd.* 1821;2:571.
37. Ollier L. *Traité experimental et clinique de la régénération del' os.* Paris: Victor Masson et Fils; 1867.
38. Syme J. *Treatise on the Excision of Diseased Joints.* Editorial; 1831.
39. McEwen W. Observations concerning transplantation on bone. Illustrated by a case of inter-human osseus transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of the humerus was restored. London. *Proceedings of the Royal Society of London.* 1881; 32: 232-47.

40. Barth A. Über histologische befunde nach knochen-implantationen. Arch Klin Chir. 1883;46:409–35.
41. Curtis BF. Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia, osteomyelitic cavities and ununited fractures. Am J Med Sci. 1893;106:30–43.
42. 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.
43. Lexer E. Die verwendung der freien knochenplastik nebst versuchen uber gelenkversteifung and gelenktransplantation. Art Klin Chir. 1908;86:939–054.
44. Lexer E. Joint transplantation and arthroplasty. Surg Gynecol Obstet. 1925;40:782–809.
45. Axhausen G. Knochennekrose und Sequesterbildung. Dtsch Med Wochenschr. 1914;40:111–5.
46. Phemister DB. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. Surg Gynecol Obstet. 1914;19:303–33.
47. Bonfiglio M, Jeter WS, Smith CL. The immune concept: its relation to bone transplantation. Ann N Y Acad Sci. 1955 Jan 24;59(3):417–33.
48. Burwell RG, Gowland G, Dexter F. Studies in the transplantation of bone. VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. J Bone Joint Surg Br. 1963 Aug;45:597–608.
49. Wilson PD. Experiences with a Bone Bank. Ann Surg. 1947 Dec;126(6):932–45.
50. Stevenson S. Biology of bone grafts. Orthop Clin North Am. 1999 Oct;30(4):543–52.
51. Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. Clin Orthop. 1998 Oct;(355 Suppl):S239–46.
52. Burchardt H. The biology of bone graft repair. Clin Orthop. 1983 Apr;(174):28–42.
53. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. Clin Orthop. 1987 Dec;(225):7–16.
54. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. J Bone Joint Surg Am. 1987 Jun;69(5):786–90.
55. Elves MW, Pratt LM. The pattern of new bone formation in isografts of bone. Acta Orthop Scand. 1975 Sep;46(4):549–60.
56. Megas P, Panagiotis M. Classification of non-union. Injury. 2005 Nov;36 Suppl 4:S30–7.
57. Phieffer LS, Goulet JA. Delayed unions of the tibia. J Bone Joint Surg Am. 2006 Jan;88(1):206–16.
58. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. J Am Acad Orthop Surg. 2005 Feb;13(1):77–86.
59. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? Injury. 2007 Mar;38 Suppl 1:S75–80.
60. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. J Bone Joint Surg Am. 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98–103.

61. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(3698):893–9.
62. Bae HW, Zhao L, Kanim LEA, Wong P, Delamarter RB, Dawson EG. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine*. 2006 May 20;31(12):1299–306; discussion 1307–8.
63. Cammisa FP Jr, Lowery G, Garfin SR, Geisler FH, Klara PM, McGuire RA, et al. Two-year fusion rate equivalency between Grafton DBM gel and autograft in posterolateral spine fusion: a prospective controlled trial employing a side-by-side comparison in the same patient. *Spine*. 2004 Mar 15;29(6):660–6.
64. De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2007 Mar;89(3):649–58.
65. Novicoff WM, Manaswi A, Hogan MV, Brubaker SM, Mihalko WM, Saleh KJ. Critical analysis of the evidence for current technologies in bone-healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 Suppl 1:85–91.
66. De Biase P, Capanna R. Clinical applications of BMPs. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S43–6.
67. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev Online*. 2010;(6):CD006950.
68. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop*. 2002 Feb;(395):110–20.
69. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S1–6.
70. Bostrom MP, Camacho NP. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop*. 1998 Oct;(355 Suppl):S274–82.
71. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*. 2014 Apr;93(4):335–45.
72. Tatay Díaz A., Pérez Sánchez J.M., Ribera Zabalbeascoa J., Cordero Fernández J.A., Mella Sousa M. Sustitutos óseos. *Rev Traum Ort*. 2008;26 (1/2):2–13.
73. Dai J, Li L, Jiang C, Wang C, Chen H, Chai Y. Bone Morphogenetic Protein for the Healing of Tibial Fracture: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PloS One*. 2015;10(10):e0141670.
74. Starman JS, Bosse MJ, Cates CA, Norton HJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in the off-label treatment of nonunions and acute fractures: a retrospective review. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012 Mar;72(3):676–81.
75. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014 Jan;14(1):15–56.
76. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev*. 1994 Feb;15(1):27–39.
77. Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J*. 2004 Feb 11;23(3):552–63.

78. Chen G, Deng C, Li Y-P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272–88.
79. Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science.* 2000 Sep 1;289(5484):1498–500.
80. 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 FGF-2 and FGF-10. *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7493–500.
81. Du C, Meijer GJ, van de Valk C, Haan RE, Bezemer JM, Hesselting SC, et al. Bone growth in biomimetic apatite coated porous Polyactive 1000PEGT70PBT30 implants. *Biomaterials.* 2002 Dec;23(23):4649–56.
82. 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.
83. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000.* 2006;41:48–72.
84. Luu YK, Pessin JE, Judex S, Rubin J, Rubin CT. Mechanical Signals As a Non-Invasive Means to Influence Mesenchymal Stem Cell Fate, Promoting Bone and Suppressing the Fat Phenotype. *BoneKEy Osteovision.* 2009 Apr 1;6(4):132–49.
85. Segunda Conferencia para el Consenso de definiciones en Biomateriales. 1992.
86. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface R Soc.* 2006 Oct 22;3(10):589–601.
87. Meyer U, Meyer TH, Handschel J, Wiesmann HP. *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine.* New York: Springer; 2009.
88. Barrère GU et al. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *J Mater Sci Eng.* 2008;59:38–71.
89. Garzón AA. Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones Básicas. *Revista EIA.* 2006;5:93-100. ISSN 1794-1237.
90. Perren S.M., Gogolevski S. Clinical Requirements for Bioresorbable implants in Internal Fixation. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation.* ISFR Symposium. Singapur. The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 35-44.
91. Pizzoferrato A, Ciapetti G., Savarino L., Stea S., Donati M.E., Visentin M. Kinetics of biodegradable implant resorption. En: L Kwok-sui, H Leung-Kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixations.* ISFR Symposium. Singapur. The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 153-163.
92. Forriol F. Combinación de sustitutos óseos osteoconductores, osteoinductores y componentes celulares. Ingeniería del tejido óseo. Injertos, sustitutos óseos y materiales en la cirugía reconstructiva del aparato locomotor. Curso básico Fundación SECOT. 2005. p. 177-187.
93. Huber M, Reinisch G, Trettenhahn G, Zweymüller K, Lintner F. Presence of corrosion products and hypersensitivity-associated reactions in periprosthetic tissue after aseptic loosening of total hip replacements with metal bearing surfaces. *Acta Biomater.* 2009 Jan;5(1):172–80.
94. Dunstan E, Ladon D, Whittingham-Jones P, Carrington R, Briggs TWR. Chromosomal aberrations in the peripheral blood of patients with metal-on-metal hip bearings. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Mar;90(3):517–22.

95. Greenfield EJ. Mounting of artificial teeth. U S Patent Office. 478360. 1909.
96. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):1728–34.
97. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals: preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Feb;15(2):99–107.
98. Alvarez Kelly, Nakajima Ideo. Metallic Scaffolds for bone regeneration. *Materials*. 2009;2(3):790–832.
99. Bansiddhi A, Sargeant TD, Stupp SI, Dunand DC. Porous NiTi for bone implants: a review. *Acta Biomater*. 2008 Jul;4(4):773–82.
100. 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.
101. 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 Jan;53(1):101–14.
102. 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.
103. Haugen HJ, Monjo M, Rubert M, Verket A, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, et al. Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model. *Acta Biomater*. 2013 Feb;9(2):5390–9.
104. Tiainen H, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ. Ultra-porous titanium oxide scaffold with high compressive strength. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Oct;21(10):2783–92.
105. Li YC, Xiong JY, Hodgson PD, Wen C. Effects of structural property and surface modification of Ti6Ta4Sn scaffolds on the response of SaOS2 cells for bone tissue engineering. *J Alloy Compd*. 2010;494:323–9.
106. Gasbarra E, Iundusi R, Perrone FL, Saturnino L, Tarantino U. Densitometric evaluation of bone remodelling around Trabecular Metal Primary stem: a 24-month follow-up. *Aging Clin Exp Res*. 2015 Oct;27 Suppl 1:69–75.
107. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*. 1998 Aug;19(16):1473–8.
108. Dressmann H. Ueber knochenplombierung. *Beitr Klin Chir*. 9.
109. Lillo R, Peltier LF. The substitution of plaster of Paris rods for portions of the diaphysis of the radius in dogs. *Surg Forum*. 1956;6:556–8.
110. Albee FH. Studies in bone grow: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg*. 1920 Jan;71(1):32–9.
111. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop*. 2002 Feb;(395):81–98.
112. Hamadouche M, Sedel L. Ceramics in orthopaedics. *J Bone Joint Surg Br*. 2000 Nov;82(8):1095–9.
113. Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc* 1998; 81: 1705-28.

114. Ray RD, Ward AA Jr. A preliminary report on studies of basic calcium phosphate in bone replacement. *Surg Forum*. 1951;429–34.
115. Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, Grower MF, Driskell T. Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1971 Aug;32(2):336–46.
116. De Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials*. 1980 Jan;1(1):47–50.
117. Osborn JF, Newesely H. The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1980 Apr;1(2):108–11.
118. Winter M, Griss P, de Groot K, Tagai H, Heimke G, von Dijk HJ, et al. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1981 Jul;2(3):159–60.
119. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop*. 1981 Jun;(157):259–78.
120. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res*. 1970 Sep;4(3):433–56.
121. Roy DM, Linnehan SK. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*. 1974 Jan 25;247(5438):220–2.
122. Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*. 1987 Apr;18(2):323–34.
123. Johnson EE, Urist MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop*. 2000 Feb;(371):61–74.
124. Miller TA, Ishida K, Kobayashi M, Wollman JS, Turk AE, Holmes RE. The induction of bone by an osteogenic protein and the conduction of bone by porous hydroxyapatite: a laboratory study in the rabbit. *Plast Reconstr Surg*. 1991 Jan;87(1):87–95.
125. Okumura M, Ohgushi H, Tamai S. Bonding osteogenesis in coralline hydroxyapatite combined with bone marrow cells. *Biomaterials*. 1991 May;12(4):411–6.
126. Trécant M., Delécrin J., Royer J., Goyenvallée E., Daculsi G. Mechanical changes in macroporous calcium phosphate ceramics after implantation in bone. *Clin Mater*. 15(3):22–12.
127. Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Oka M. Transmission electron microscopy observations at the interface of bone and four types of calcium phosphate ceramics with different calcium/phosphorus molar ratios. *Biomaterials*. 1995 Sep;16(14):1101–7.
128. Yang Z, Yuan H, Tong W, Zou P, Chen W, Zhang X. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*. 1996 Nov;17(22):2131–7.
129. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23-24):2287–303.
130. Cerroni L, Filocamo R, Fabbri M, Piconi C, Caropreso S, Condò SG. Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. *Biomol Eng*. 2002 Aug;19(2-6):119–24.
131. Yu L, Li Y, Zhao K, Tang Y, Cheng Z, Chen J, et al. A novel injectable calcium phosphate cement-bioactive glass composite for bone regeneration. *PloS One*. 2013;8(4):e62570.

132. Shepherd, J.H., Best, S.M. Calcium phosphate scaffolds for bone repair. *JOM*. 63:83–92.
133. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991; 74: 1487-510.
134. Friedman RJ. Advances in biomaterials and factors affecting implant fixation. *Instr Course Lect*. 1992;41:127–36.
135. Boutin P. Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot*. 1972;58(3):229–46.
136. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(1):1–25.
137. Montufar Jiménez EB. Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico. [Barcelona]: Universidad Politécnica de Cataluña; 2010.
138. Tencer AF, Woodard PL, Swenson J, Brown KL. Mechanical and bone ingrowth properties of a polymer-coated, porous, synthetic, coralline hydroxyapatite bone-graft material. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;523:157–72.
139. Guillemin G, Patat JL, Fournie J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res*. 1987 May;21(5):557–67.
140. Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*. 1999 Oct;30(4):599–613.
141. Pekka Ylinen. Applications of coralline hidroxyapatite with bioabsorbable containment and reinforcements as bone graft substitute. [Helsinki]: University of Helsinki; 2006.
142. Elsinger EC, Leal L. Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Foot Ankle Surg Off Publ Am Coll Foot Ankle Surg*. 1996 Oct;35(5):396–9.
143. Holmes RE. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast Reconstr Surg*. 1979 May;63(5):626–33.
144. Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res*. 1973;7(3):25–42.
145. Balas F. Materiales bioactivos en el sistema CaO-P2O5-SiO2. [Madrid]: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid; 2001.
146. Burnie J, Gilchrist T, Duff SR, Drake CF, Harding NG, Malcolm AJ. Controlled release glasses (C.R.G.) for biomedical uses. *Biomaterials*. 1981 Oct;2(4):244–6.
147. Vitale-Brovarone C, Di Nunzio S, Bretcanu O, Verné E. Macroporous glass-ceramic materials with bioactive properties. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Mar;15(3):209–17.
148. Fernandez Aguado E. Obtención y caracterización de nuevos cementos óseos de fosfatos de calcio en el sistema CaHPO4-alfa-Ca3(PO4)2. [Barcelona]: E.T.S. D'Enginyeria industrial de Barcelona; 1996.
149. Wolff J. *The Law of Bone Remodelling*. Berlin: Springer;
150. McAndrew MP, Gorman PW, Lange TA. Tricalcium phosphate as a bone graft substitute in trauma: preliminary report. *J Orthop Trauma*. 1988;2(4):333–9.
151. Sheikh Z, Zhang YL, Grover L, Merle GE, Tamimi F, Barralet J. In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts. *Acta Biomater*. 2015 Oct 15;26:338–46.

152. Kühne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1994 Jun;65(3):246–52.
153. Dorozhkin S. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *J Mater Sci*. 2008;43(9):3028–57.
154. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S16–21.
155. Galois L, Mainard D, Delagoutte JP. Beta-tricalcium phosphate ceramic as a bone substitute in orthopaedic surgery. *Int Orthop*. 2002;26(2):109–15.
156. Oonishi H. Orthopaedic applications of hydroxyapatite. *Biomaterials*. 1991 Mar;12(2):171–8.
157. Torner P. Reparació del teixit ossi mitjançant osteotransducció amb ciment de fosfat càlcic. Estudi experimental. [Barcelona]: Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques. Universitat de Barcelona.; 2001.
158. Young RA. Biological apatite vs hydroxyapatite at the atomic level. *Clin Orthop*. 1975 Dec;(113):249–62.
159. Alexander H et al. Calcium-based ceramics and composites in bone reconstruction. In: Ducheyne P ed *CRC critical reviews in biocompatibility*. Boca Raton: CRC Press, Inc. 43–77, 1987.
160. LeGeros RZ, Parsons JR, Daculsi G, Driessens F, Lee D, Liu ST, et al. Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. Biodegradation-bioresorption. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;523:268–71.
161. Tracy BM, Doremus RH. Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface. *J Biomed Mater Res*. 1984 Sep;18(7):719–26.
162. Ricci J et al. Partially resorbable hydroxylapatite base cement for repair of bone defects. In: Saha S. ed *Biomedical Engineering: recent developments*. New York: Pergamon Press 469–474, 1986.
163. Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T, Takagi M, Shibuya T, et al. Bonding behavior between two bioactive ceramics in vivo. *J Biomed Mater Res*. 1987 Sep;21(9):1109–23.
164. Klein CP, Driessen AA, de Groot K, van den Hooff A. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res*. 1983 Sep;17(5):769–84.
165. Büsing CM. The degradation of calcium phosphate ceramics. *Clin Mat*. 1987;2:303–7.
166. LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater*. 1993;14(1):65–88.
167. Toth JM, An HS, Lim TH, Ran Y, Weiss NG, Lundberg WR, et al. Evaluation of porous biphasic calcium phosphate ceramics for anterior cervical interbody fusion in a caprine model. *Spine*. 1995 Oct 15;20(20):2203–10.
168. Le Huec JC, Schaefferbeke T, Clement D, Faber J, Le Rebeller A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials*. 1995 Jan;16(2):113–8.
169. Tencer AF, Mooney V, Brown KL, Silva PA. Compressive properties of polymer coated synthetic hydroxyapatite for bone grafting. *J Biomed Mater Res*. 1985 Oct;19(8):957–69.



170. Mushipe MT, Revell PA, Shelton JC. Cancellous bone repair using bovine trabecular bone matrix particulates. *Biomaterials*. 2002 Jan;23(2):365–70.
171. Higashi S, Yamamuro T, Nakamura T, Ikada Y, Hyon SH, Jamshidi K. Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers. *Biomaterials*. 1986 May;7(3):183–7.
172. Cehreli MC, Sahin S, Kesenci K, Tuzlakoglu K, Piskin E, Ozturk S, et al. Biological reactions to a poly(L-lactide)-hydroxyapatite composite: a study in canine mandible. *J Biomater Appl*. 2003 Apr;17(4):265–76.
173. Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Nakamura T, Matsusue Y, Shikinami Y, et al. Long-term study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures: a 2-4-year follow-up study in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003 Aug 15;66(2):539–47.
174. Lee DSH, Pai Y, Chang S, Kim DH. Microstructure, physical properties, and bone regeneration effect of the nano-sized  $\beta$ -tricalcium phosphate granules. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Jan 1;58:971–6.
175. Böhner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc*. 2001 Oct;10 Suppl 2:S114–21.
176. Strocchi R, Orsini G, Iezzi G, Scarano A, Rubini C, Pecora G, et al. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits. *J Oral Implantol*. 2002;28(6):273–8.
177. Mazor Z, Mamidwar S, Ricci JL, Tovar NM. Bone repair in periodontal defect using a composite of allograft and calcium sulfate (DentoGen) and a calcium sulfate barrier. *J Oral Implantol*. 2011 Apr;37(2):287–92.
178. Radentz WH, Collings CK. The implantation of plaster of paris in the alveolar process of the dog. *J Periodontol*. 1965 Oct;36(5):357–64.
179. Liu J, Mao K, Liu Z, Xiumei Wang, Cui F, Guo W, et al. Injectable biocomposites for bone healing in rabbit femoral condyle defects. *PloS One*. 2013;8(10).
180. Doty HA, Leedy MR, Courtney HS, Haggard WO, Bumgardner JD. Composite chitosan and calcium sulfate scaffold for dual delivery of vancomycin and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Mater Sci Mater Med*. 2014 Jun;25(6):1449–59.
181. Marín Ruiz M. Estudio histológico e histomorfométrico de la respuesta ósea frente a un biomaterial sintético compuesto por ácido poliláctico-poliglicólico en un modelo de experimentación animal. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2006.
182. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop*. 1999 Oct;(367 Suppl):S107–17.
183. Böstman OM, Laitinen OM, Tynninen O, Salminen ST, Pihlajamäki HK. Tissue restoration after resorption of polyglycolide and poly-laevo-lactic acid screws. *J Bone Joint Surg Br*. 2005 Nov;87(11):1575–80.
184. Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 1998;43(4):422–7.
185. Laschke MW, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D. In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2010 Jun;6(6):2020–7.

186. Garrido Lahiguera R, Gil Albarova J, Gil Albarova R, Bueno Lozano A, Salinas Sanchez AJ, Melgosa Gil M, Vallet Regi M. Estudio experimental en conejos de un nuevo vidrio bioactivo en la reconstrucción de defectos óseos. *Rev Esp Cir Osteoart.* 2002;37:125–37.
187. García-Barea A. Desarrollo de vitrocerámicas y vidrios bioactivos en el tratamiento de defectos óseos segmentarios. Universidad de Zaragoza; 2007.
188. Rokkanen PU. Absorbable materials in orthopaedic surgery. *Ann Med.* 1991 Apr;23(2):109–15.
189. Navarro Toro M. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea. [Barcelona]: Universidad Politécnica de Cataluña; 2005.
190. El-Ghannam AR. Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: design principles and structure-bioactivity relationship. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Jun 1;69(3):490–501.
191. Mittelmeier H, Grabowski MT. [Healing of bone defects after using the preparation “collapat”]. *Chir Narzadów Ruchu Ortop Pol.* 1983;48(5-6):483–8.
192. Katthagen BD, Mittelmeier H. Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite. *Arch Orthop Trauma Surg Arch Für Orthop Unf-Chir.* 1984;103(5):291–302.
193. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin Orthop.* 1988 May;(230):257–65.
194. Burwell RG. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop.* 1985 Nov;(200):125–41.
195. Patt HM, Maloney MA. Bone formation and resorption as a requirement for marrow development. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1972 May;140(1):205–7.
196. Shikinami Y, Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials.* 1999 May;20(9):859–77.
197. Ignjatovic N. Synthesis and application of hydroxyapatite/polylactide composite biomaterial. *Appl Surf Sci.* 2004;9(1):19–25.
198. Wang M, Joseph R, Bonfield W. Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials.* 1998 Dec;19(24):2357–66.
199. Mickiewicz RA, Mayes AM, Knaack D. Polymer–calcium phosphate cement composites for bone substitutes. *J Biomed Mater Res.* 2002 Sep 15;61(4):581–92.
200. Ramírez G, Escobar I, Echevarría A, Cardona J, Giraldo A, Riaño C. Características osteoconductoras de la HA sintética y la derivada de corales marinos injertados en conejos. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 1999;2:97–107.
201. Velasco Peña MA. Implantes Scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. Disponible en [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol\\_29\\_1\\_10/ibi08110.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol_29_1_10/ibi08110.htm).
202. Lax-Pérez A. Respuesta ósea al implante de espuma de hidroxiapatita (HA-02), Estudio experimental en conejos. *Rev Ortop Traumatol.* 2005;49:293–300.
203. Ochoa ER, Vacanti JP. An overview of the pathology and approaches to tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Dec;979:10–26; discussion 35–8.

204. Horna Tomás D. Estructura composición y superficie como vectores directores en el diseño de biomateriales. Aplicación al desarrollo de scaffolds poliméricos y a superficies bioactivas. Universitat Ramon Llull; 2011.
205. Arias Fernández JI. Nuevos enfoques para mejorar las propiedades mecánicas y biológicas de compuestos cálcicos para su uso como substitutos óseos. *Rev Electrónica Vet.* 2007;VII(12):1695–7504.
206. Vallet Regí M. Andamio macroporoso cerámico puro basado en apatita nanocristalina, método de preparación y aplicaciones. Universidad Complutense de Madrid; P201000957, 2013.
207. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005 Sep;26(27):5474–91.
208. Motamedian SR, Hosseinpour S, Ahsaie MG, Khojasteh A. Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. *World J Stem Cells.* 2015 Apr 26;7(3):657–68.
209. Álvarez Barreto JF. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *Evista Estud Transdiscipl.* 1(2):98–109.
210. Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop.* 2002 Feb;(395):11–22.
211. Temenoff JS. Bone Tissue Engineering Using Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds. En *Bone Engineering* (pp. 454). Toronto: University of Toronto. J. E. Davies (Ed.);
212. Gao C, Deng Y, Feng P, Mao Z, Li P, Yang B, et al. Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4714–32.
213. Sopyan I, Kaur J. Preparation and characterization of porous hydroxyapatite through polymeric sponge method. *Ceram Int.* 2009;35(8):3161–8.
214. González J, Escobar DM. Producción y caracterización de cuerpos porosos de hidroxapatita sintética. *Rev Fac Ing.* 2008;43:66.
215. Heo S-J, Kim S-E, Wei J, Kim DH, Hyun Y-T, Yun H-S, et al. In vitro and animal study of novel nano-hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite scaffolds fabricated by layer manufacturing process. *Tissue Eng Part A.* 2009 May;15(5):977–89.
216. Peterlik H, Roschger P, Klaushofer K, Fratzl P. From brittle to ductile fracture of bone. *Nat Mater.* 2006 Jan;5(1):52–5.
217. Yunos DM, Bretcanu O. Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci* 2008;43: 4433-42. *J Mater Sci.* 2008;43:4433–42.
218. Lan Levengood SK, Polak SJ, Wheeler MB, Maki AJ, Clark SG, Jamison RD, et al. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials.* 2010 May;31(13):3552–63.
219. Gomes ME, Bossano CM, Johnston CM, Reis RL, Mikos AG. In vitro localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Eng.* 2006 Jan;12(1):177–88.
220. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2002 Nov;23(22):4307–14.
221. Cooper DML, Matyas JR, Katzenberg MA, Hallgrímsson B. Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif Tissue Int.* 2004 May;74(5):437–47.

222. Özgür E, Cüneyt T. Preparation of porous  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  and  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Bioceramics. *J. Am- Ceram. Soc.* 2000; 83(7): 1581-1584.
223. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* 2001 Dec;7(6):679–89.
224. Leon y Leon CA. New perspectives in mercury porosimetry. *Adv ColloidInterface Sci* 1998;76–77:341–72.
225. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res.* 1998 Feb;39(2):190–9.
226. Story BJ, Wagner WR, Gaisser DM, Cook SD, Rust-Dawicki AM. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998 Dec;13(6):749–57.
227. Cyster LA, Grant DM, Howdle SM, Rose FRAJ, Irvine DJ, Freeman D, et al. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2005 Mar;26(7):697–702.
228. Shyam T. Effect of scaffold architecture on diffusion of oxygen in tissue engineering constructs. The University of Texas; 2007.
229. Green D, Walsh D, Mann S, Oreffo ROC. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone.* 2002 Jun;30(6):810–5.
230. Cunningham E, Dunne N, Walker G, Maggs C, Wilcox R, Buchanan F. Hydroxyapatite bone substitutes developed via replication of natural marine sponges. *J Mater Sci Mater Med.* 2010 Aug;21(8):2255–61.
231. González Ocampo J. Métodos de fabricación de cuerpos porosos de hidroxapatita, revisión del estado del arte. *Rev Ion.* 2014;27(2):55–70.
232. Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1999 Oct;20(19):1799–806.
233. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008 Nov;108(11):4742–53.
234. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Res.* 2013 Sep;1(3):216–48.
235. Itälä AI, Ylänen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT. Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res.* 2001;58(6):679–83.
236. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin Orthop.* 1992 Mar;(276):291–8.
237. González R, Melo MC, Pérez Reyes A, Rodríguez AC. Hidroxapatita porosa HAP-200 principales características físico-químicas. *Quim Nov.* 1993;16(6):509–12.
238. Xu Y, Wang D, Yang L, Tang H. Hydrothermal conversion of coral into hydroxyapatite. *Mater Charact.* 2001;47(2):83–7.

239. Chou J, Hao J, Ben-Nissan B, Milthorpe B, Otsuka M. Coral exoskeletons as a precursor material for the development of a calcium phosphate drug delivery system for bone tissue engineering. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(11):1662–5.
240. López ME, Echavarría A, Suárez R, Herrera N. Hidroxiapatita macroporosa obtenida en la Universidad de Antioquia: síntesis, caracterización y comparación con el hueso esponjoso y calcinado de bovino. *Rev Fac Ing.* 2003;30:109–24.
241. Rodríguez A, Londoño ME, Echavarría A. Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxiapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos. *Rev EIA.* 2007;7:87–95.
242. Saiz E, Gremillard L, Menendez G, Miranda P, Gryn K, Tomsia AP. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(3):546–50.
243. Teixeira S, Rodriguez MA, Pena P, De Aza AH, De Aza S, Ferraz MP. Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 29(5):1510–4.
244. Yang TY, Lee JM, Yoon SY, Park HC. Hydroxyapatite scaffolds processed using a TBA-based freeze-gel casting/polymer sponge technique. *J Mater Sci Mater Med.* 2010 May;21(5):1495–502.
245. Lee EJ, Koh YH, Yoon BH, Kim HE, Kim HW. Highly porous hydroxyapatite bioceramics with interconnected pore channels using camphene-based freeze casting. *Mater Lett.* 2007;61(12):2270–3.
246. Zhang Y, Zuo K. Effects of gelatin addition on the microstructure of freeze-cast porous hydroxyapatite ceramics. *Ceram Int.* 2009;35(6):2151–4.
247. McNamara SL, Rnjak-Kovacina J, Schmidt DF, Lo TJ, Kaplan DL. Silk as a bioadhesive sacrificial binder in the fabrication of hydroxyapatite load bearing scaffolds. *Biomaterials.* 2014 Aug;35(25):6941–53.
248. Zhao K, Tang YF, Qin YS, Luo DF. Polymer template fabrication of porous hydroxyapatite scaffolds with interconnected spherical pores. *J Eur Ceram Soc.* 2011;31(1):225–9.
249. Liu DM. Preparation and characterisation of porous hydroxyapatite bioceramic via a slip-casting route. *Ceram Int.* 1998;24(6):441–6.
250. Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):354–62.
251. Rios AC. Fabricación de andamios de hidroxiapatita por impresión tridimensional. *Rev Lat Met Mat.* 2014;34(2):262–74.
252. Sepulveda P, Binner JG, Rogero SO, Higa OZ, Bressiani JC. Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation. *J Biomed Mater Res.* 2000 Apr;50(1):27–34.
253. Zhao J, Duan K, Zhang JW, Guo LY, Weng J. Preparation of highly interconnected porous hydroxyapatite scaffolds by chitin gel-casting. *Mater Sci Eng C.* 2011;31(3):697–701.
254. Brinker CJ, Lu YF, Selinger A, Fan HY. Evaporation-induced-self assembly: nanostructures made easy. *Adv Mater.* 1999;11:579–85.
255. Sanchez-Salcedo S, Vila M, Izquierdo-Barba I, Cicuéndez M, Vallet-Regí M. Biopolymer-coated hydroxyapatite foams: a new antidote for heavy metal intoxication. *J Mater Chem.* 2010;20:6956–61.

256. Vallet Regí M. Espumas cerámico/poliméricas y su uso en la captura e inmovilización de iones tóxicos de metales pesados. Oficina española de patentes y marcas. Universidad Complutense de Madrid; 16.09.2011.
257. Cicuéndez M, Izquierdo-Barba I, Sánchez-Salcedo S, Vila M, Vallet-Regí M. Biological performance of hydroxyapatite-biopolymer foams: in vitro cell response. *Acta Biomater.* 2012 Feb;8(2):802–10.
258. Vila M, Sánchez-Salcedo S, Cicuéndez M, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Novel biopolymer-coated hydroxyapatite foams for removing heavy-metals from polluted water. *J Hazard Mater.* 2011 Aug 15;192(1):71–7.
259. Hijon N, Cabañas V, Izquierdo-Barba I. Bioactive Carbonate–Hydroxyapatite Coatings Deposited onto Ti6Al4V Substrate. *Chem Mater.* 2004;16:1451–5.
260. Yang S-H, Hsu C-K, Wang K-C, Hou S-M, Lin F-H. Tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinked gelatin incorporating bone morphogenetic protein--a viable scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Jul;74(1):468–75.
261. Ulubayram K, Aksu E, Gurhan SID, Serbetci K, Hasirci N. Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2002;13(11):1203–19.
262. Falini G, Fermani S, Foresti E, Parma B, Rubini K, Sidoti MC, et al. Films of self-assembled purely helical type I collagen molecules. *J Mater Chem.* 14:2297–302.
263. Perut F, Montufar EB, Ciapetti G, Santin M, Salvage J, Traykova T, et al. Novel soybean/gelatine-based bioactive and injectable hydroxyapatite foam: material properties and cell response. *Acta Biomater.* 2011 Apr;7(4):1780–7.
264. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2007 Oct;29(10):1001–10.
265. Garrido Lahiguera R. Estudio experimental de un nuevo vidrio bioactivo en la reconstrucción de defectos óseos. Universidad de Zaragoza; 2000.
266. 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 Aug;25(19):4639–45.
267. 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.
268. Roche Albero A. Estudio y desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea. Universidad de Zaragoza; 2011.
269. Aspenberg P, Lindqvist SB. Ethene oxide and bone induction. Controversy remains. *Acta Orthop Scand.* 1998 Apr;69(2):173–6.
270. Aspenberg P, Johnsson E, Thorngren KG. Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *J Bone Joint Surg Br.* 1990 Nov;72(6):1036–7.
271. Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, et al. Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials.* 2008 Jan;29(3):266–71.
272. Rikli DA, Regazzoni P, Perren SM. Is there a need for resorbable implants or bone substitutes? *Injury.* 2002 Aug;33 Suppl 2:B2–3.

273. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 1987 Apr;18(2):213–25.
274. Clément J. Desarrollo y caracterización de un material compuesto totalmente biodegradable para aplicaciones quirúrgicas. [Barcelona]: Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metallúrgica. Universitat Barcelona Politècnica de Catalunya.; 2001.
275. Fernández de Retana P. Osteointegración del homoinjerto óseo triturado en los defectos cavitarios. Estudio experimental en conejos. [Barcelona]: Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques. Universitat de Barcelona;
276. Weiland AJ, Phillips TW, Randolph MA. Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1984 Sep;74(3):368–79.
277. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 1985;3(4):389–404.
278. Miño-Fariña N, Muñoz-Guzón F, López-Peña M, Ginebra M-P, 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 Lond Engl* 1997. 2009 Feb;179(2):264–72.
279. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials.* 2009 Apr;30(12):2149–63.
280. Caccioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C. The critical size bone defect: morphological study of bone healing. *Ann Fac Medic Vet Parma.* 2006;26:97–100.
281. Bulcholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Othop.* 2002;395:44–52.
282. Siegel HJ, Baird RC 3rd, Hall J, Lopez-Ben R, Lander PH. The outcome of composite bone graft substitute used to treat cavitary bone defects. *Orthopedics.* 2008 Aug;31(8):754.
283. MacDonald KM, Swanstrom MM, McCarthy JJ, Nemeth BA, Guliani TA, Noonan KJ. Exaggerated inflammatory response after use of recombinant bone morphogenetic protein in recurrent unicameral bone cysts. *J Pediatr Orthop.* 2010 Mar;30(2):199–205.
284. Pollock R, Alcelik I, Bhatia C, Chuter G, Lingutla K, Budithi C, et al. Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc.* 2008 Jun;17(6):845–52.
285. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br.* 1989 Aug;71(4):677–80.
286. Seiler JG 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc.* 2000;9(2):91–7.
287. Schneider A, Taboas JM, McCauley LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2003 Sep;21(5):859–64.
288. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1014–7.
289. Vallet-Regí M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans Camb Engl* 2003. 2006 Nov 28;(44):5211–20.

290. Vallet Regi M. Biocerámicas: evolución y aplicaciones. *Quím.* 2011;107(1):28–35.
291. Nizard M. Knochengewebsneubildung durch Collagen Apatit Implantation. Habilitationsschrift, Universität Homburg; 1981.
292. Katthagen BD. Bone regeneration with bone substitutes. An animal study. Berlin: Springer Verlag. 1986;
293. Jacenko O, Olsen BR. Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl.* 1995 Feb;43:39–41.
294. 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 Oct;8(10):3777–83.
295. Kim JM, Son JS, Kang SS, Kim G, Choi SH. Bone regeneration of hydroxyapatite/alumina bilayered scaffold with 3 mm passage-like medullary canal in canine tibia model. *BioMed Res Int.* 2015;2015:235108.
296. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone.* 1999 Jun;24(6):579–89.
297. Meseguer-Olmo I, Bernabeu-Escaplez A, Vallet Regi M, Aznar-Cervantes S, Vicente-Ortega V, Alcazar-Baños M, et al. Ingeniería tisular del tejido óseo: Diseño y desarrollo de materiales híbridos biológicamente activos basados en vitrocerámicas para sustitución ósea. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2010;54(1):59–68.
298. O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Feb;90 Suppl 1:79–84.
299. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am.* 1995 May;77(5):734–50.
300. Chao EYS, Inoue N. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater.* 2003 Dec 31;6:72–84; discussion 84–5.
301. Lax Pérez A, Vicente Ortega V, Meseguer L, Alcazar Baños M, Sepúlveda P, Clavel-Nolla Sanz M. Implante óseo de la espuma de hidroxiapatita-09 Estudio experimental en conejos. 38(1):14–20.
302. Borkowski L, Pawłowska M, Radzki RP, Bieńko M, Polkowska I, Belcarz A, et al. Effect of a carbonated HAP/ $\beta$ -glucan composite bone substitute on healing of drilled bone voids in the proximal tibial metaphysis of rabbits. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Aug;53:60–7.
303. Wang D-X, He Y, Bi L, Qu Z-H, Zou J-W, Pan Z, et al. Enhancing the bioactivity of Poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold with a nano-hydroxyapatite coating for the treatment of segmental bone defect in a rabbit model. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:1855–65.
304. Bigham-Sadegh A, Karimi I, Shadkhist M, Mahdavi M-H. Hydroxyapatite and demineralized calf fetal growth plate effects on bone healing in rabbit model. *J Orthop Traumatol Off J Ital Soc Orthop Traumatol.* 2015 Jun;16(2):141–9.
305. Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Yang F, Shen H, Wang S, et al. In vivo evaluation of composites of PLGA and apatite with two different levels of crystallinity. *J Mater Sci Mater Med.* 2010 Jan;21(1):251–8.



306. Loty C, Sautier JM, Tan MT, Oboeuf M, Jallot E, Boulekbache H, et al. Bioactive glass stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. *J Bone Min Res.* 2001;16(2):231–9.
307. Le Geros RZ, Le Geros JP, Dense HA. In: *An Introduction to Bioceramics.* London: Hench LL y Wilson J, World Scientific Pub. Co.; 1993.
308. Pavón Palacio JJ. *Fractura y Fatiga por contacto de recubrimientos de vidrio sobre Ti6Al4V para aplicaciones biomédicas.* [Barcelona]: Universidad Politécnica de Cataluña;
309. Barbeck M, Christiane H, Sader R, Fabian P, Wolf-Dietrich H, Kirkpatrick CJ, et al. Injectable bone substitute based on  $\beta$ -TCP combined with a hyaluronan-containing hydrogel contributes to regeneration of a critical bone size defect. *J Oral Implantol.* 2015 Aug 24;
310. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jun;21(6):567–76.
311. Meseguer Olmo L. *Estudio morfológico de la respuesta ósea inducida por la cerámica beta fosfato tricálcio y el composite beta fosfato tricálcio y colágeno. Modelo experimental en conejo.* [Murcia]: Facultad de Medicina, Universidad de Murcia; 1993.
312. Galian Cánovas A. *Respuesta biológica del hueso al compuesto Hidroxiapatita-Colágeno. Estudio morfológico y ultraestructural.* [Murcia]: Universidad de Murcia;
313. Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W. Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 1985;3(1):65–77.
314. De Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res.* 1987 Dec;21(12):1375–81.
315. Minabe M, Sugaya A, Satou H, Tamura T, Ogawa Y, Hori T, et al. Histological study of the hydroxyapatite-collagen complex implants in periodontal osseous defects in dogs. *J Periodontol.* 1988 Oct;59(10):671–8.
316. Gatti AM, Zaffe D, Poli GP. Behaviour of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. *Biomaterials.* 1990 Sep;11(7):513–7.
317. Stubbs D, Deakin M, Chapman-Sheath P, Bruce W, Debes J, Gillies RM, et al. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials.* 2004 Sep;25(20):5037–44.
318. Philippart A, Boccaccini AR, Fleck C, Schubert DW, Roether JA. Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years. *Expert Rev Med Devices.* 2015 Jan;12(1):93–111.
319. Foroughi MR, Karbasi S, Ebrahimi-Kahrizsangi R. Mechanical evaluation of nHAp scaffold coated with poly-3-hydroxybutyrate for bone tissue engineering. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013 Feb;13(2):1555–62.
320. Denissen HW, de Groot K, Makkes PC, van den Hooff A, Klopper PJ. Tissue response to dense apatite implants in rats. *J Biomed Mater Res.* 1980 Nov;14(6):713–21.
321. Ducheyne P, Hench LL, Kagan A, Martens M, Bursens A, Mulier JC. Effect of hydroxyapatite impregnation on skeletal bonding of porous coated implants. *J Biomed Mater Res.* 1980 May;14(3):225–37.
322. Gumaer KI, Sherer AD, Slighter RG, Rothstein SS, Drobeck HP. Tissue response in dogs to dense hydroxylapatite implantation in the femur. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 1986 Aug;44(8):618–27.

323. Frank RM, Gineste M, Benqué EP, Hemmerle J, Duffort JF, Heughebaert M. Ultrastructural study of bone formation after bioapatite implantation in man. *J Biol Buccale*. 1987 Jun;15(2):125–34.
324. Alobera Gracia MA, Clemente De Arriba C, Sobrino Del Riego JA, Ferrandiz Bernal J, Alonso Rodríguez C. Estudio comparativo del porcentaje de osteointegración entre implantes convencionales con distintas superficies e implantes experimentales. *Biomecánica*. 2008;16(2):12–6.
325. Ono K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. Quantitative study on osteoconduction of apatite-wollastonite containing glass ceramic granules, hydroxyapatite granules, and alumina granules. *Biomaterials*. 1990 May;11(4):265–71.
326. Denissen H, Martinetti R, van Lingen A, van den Hooff A. Normal osteoconduction and repair in and around submerged highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. *J Periodontol*. 2000 Feb;71(2):272–8.
327. Klawitter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. *J Biomed Mater Res*. 1976 Mar;10(2):311–23.
328. Eggl PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop*. 1988 Jul;(232):127–38.
329. Galois L, Mainard D, Bordji K, Membre H, Marchal L, Foliguet B. Céramiques phosphocalciques : influence de la taille des pores sur la réhabilitation osseuse de deux céramiques phosphocalciques, l'Ha et le bTCP. *Actual En Biomateriaux*. 1996;3:361–80.
330. Sepulveda P, Bressiani AH, Bressiani JC, Meseguer L, König B. In vivo evaluation of hydroxyapatite foams. *J Biomed Mater Res*. 2002 Dec 15;62(4):587–92.
331. Vallet-Regí M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *CRChim*. 2010;13:174–85.
332. Kuboki Y, Jin Q, Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S105–15.
333. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem (Tokyo)*. 1997 Feb;121(2):317–24.
334. Götz HE, Müller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(18):4057–64.
335. Black J, Hastings G. *Handbook of Biomaterials Properties*. London: Chapman & Hall; 1998.
336. Piecuch JF. Extraskelatal implantation of a porous hydroxyapatite ceramic. *J Dent Res*. 1982 Dec;61(12):1458–60.
337. Foroughi MR, Karbasi S, Ebrahimi-Kahrizsangi R. Physical and mechanical properties of a poly-3-hydroxybutyrate-coated nanocrystalline hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *J Porous Mater*. 2012;19:667–75.
338. Li JJ, Gil ES, Hayden RS, Li C, Roohani-Esfahani S-I, Kaplan DL, et al. Multiple silk coatings on biphasic calcium phosphate scaffolds: effect on physical and mechanical properties and in vitro osteogenic response of human mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*. 2013 Jul 8;14(7):2179–88.

339. Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJA, de Bruijn JD. Scaffolds with a standardized macro-architecture fabricated from several calcium phosphate ceramics using an indirect rapid prototyping technique. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Jan;22(1):97–105.
340. Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res*. 2:161–229.
341. Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil*. 1991 Sep;18(5):439–52.
342. Bohner M, Baumgart F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3569–82.
343. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3230–7.
344. Muhamad Nor MAA, LC H, Arifin Ahmad Z, Md Akil H. Preparation and characterization of ceramic foam produced via polymeric foam replication method. *J Mater Process Technol*. 2008;207(1):235–9.
345. Von Doernberg M-C, von Rechenberg B, Bohner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, et al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(30):5186–98.
346. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Aug;1(4):245–60.
347. Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:41–75.
348. Hoshino M, Egi T, Terai H, Namikawa T, Takaoka K. Repair of long intercalated rib defects using porous beta-tricalcium phosphate cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(28):4934–40.
349. Yang C, Unursaikhan O, Lee J-S, Jung U-W, Kim C-S, Choi S-H. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 Jan;102(1):80–8.
350. Salerno PA, Netti P. Part 1: Fundamentals, properties and modification of biomedical foams. Chaptre 1: Introduction to biomedical foams. In: *Biomedical foams for tissue engineering applications*. Elsevier; 2014. p. 3–39.
351. García AJ. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials*. 2005 Dec;26(36):7525–9.
352. Zheng W, Wang Z, Song L, Zhao Q, Zhang J, Li D, et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials*. 2012 Apr;33(10):2880–91.
353. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, et al. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*. 2000 Mar;71(3):410–7.
354. Sionkowska A, Kozłowska J. Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. *Int J Biol Macromol*. 2010 Nov 1;47(4):483–7.

355. Yaylaoğlu MB, Korkusuz P, Ors U, Korkusuz F, Hasirci V. Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. *Biomaterials*. 1999 Apr;20(8):711–9.
356. Brekke JH, Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 1998;43(4):380–98.
357. Bonucci E, Marini E, Valdinucci F, Fortunato G. Osteogenic response to hydroxyapatite-fibrin implants in maxillofacial bone defects. *Eur J Oral Sci*. 1997 Dec;105(6):557–61.
358. Meskinfam M, Sadjadi M a. S, Jazdarreh H, Zare K. Biocompatibility evaluation of nano hydroxyapatite-starch biocomposites. *J Biomed Nanotechnol*. 2011 Jun;7(3):455–9.
359. Ignjatović N, Savić V, Najman S, Plavgić M, Uskoković D. A study of HAp/PLLA composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy. *Biomaterials*. 2001 Mar;22(6):571–5.
360. Kim S-S, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim B-S. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8):1399–409.
361. Iooss P, Le Ray AM, Grimandi G, Daculsi G, Merle C. A new injectable bone substitute combining poly(epsilon-caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules. *Biomaterials*. 2001 Oct;22(20):2785–94.
362. Mohamed KR, Beherei HH, El-Rashidy ZM. In vitro study of nano-hydroxyapatite/chitosan-gelatin composites for bio-applications. *J Adv Res*. 2014 Mar;5(2):201–8.
363. Temenoff JS, Lu L, Mikos AG. Bone tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds bone Engineering (pp. 454). Toronto: University of Toronto. University of Toronto, Toronto: J. E. Davies; 2000. 454-461 p.
364. Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH, et al. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng*. 1999 Feb;5(1):35–51.
365. Kwon SH, Jun YK, Hong SH, Kim HE. Synthesis and dissolution behavior of b-TCP and HA/b-TCP composite powders. *J Euro Ceram Soc*. 23:1039–45.
366. Dong J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res*. 2001 Nov;57(2):208–16.
367. Yamasaki H, Sakai H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials*. 1992;13(5):308–12.
368. Kurashina K, Kurita H, Wu Q, Ohtsuka A, Kobayashi H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. *Biomaterials*. 2002 Jan;23(2):407–12.
369. Pollick S, Shors EC, Holmes RE, Kraut RA. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 1995 Aug;53(8):915–22; discussion 922–3.
370. LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Mar;14(3):201–9.

371. Ripamonti U, Ma S, Cunningham NS, Yeates L, Reddi AH. Initiation of bone regeneration in adult baboons by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matrix Stuttg Ger*. 1992 Nov;12(5):369–80.
372. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng*. 2000 Aug;6(4):351–9.
373. Moioli EK, Clark PA, Sumner DR, Mao JJ. Autologous stem cell regeneration in craniosynostosis. *Bone*. 2008 Feb;42(2):332–40.
374. Stosich MS, Moioli EK, Wu JK, Lee CH, Rohde C, Yoursef AM, et al. Bioengineering strategies to generate vascularized soft tissue grafts with sustained shape. *Methods San Diego Calif*. 2009 Feb;47(2):116–21.
375. Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Jun;15(3):293–300.
376. 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 Feb;230(2):369–76.
377. Weissman JL, Snyderman CH, Hirsch BE. Hydroxyapatite cement to repair skull base defects: radiologic appearance. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996 Sep;17(8):1569–74.
378. Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, et al. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1996 May;14(3):351–69.
379. Nolff MC, Kokemueller H, Hauschild G, Fehr M, Bormann K-H, 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-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2010 Jan;38(1):38–46.
380. Schaaf H, Streckbein P, Obert M, Goertz B, Christophis P, Howaldt H-P, et al. High resolution imaging of craniofacial bone specimens by flat-panel volumetric computed tomography. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2008 Jun;36(4):234–8.
381. Zhang D, Huang D, Huang Y, Liu Y, Lin B, Yu C, et al. Efficacy of combined therapy of periosteum and bone allograft in a critical-sized defect model in New Zealand white rabbits. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2014;20:2394–403.
382. Miño Fariña N. Estudio comparativo de la respuesta ósea generada por dos cementos y un biovidrio basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos en defectos cavitarios experimentales. [Lugo]: Universidad de Santiago de Compostela; 2006.