

Tesis Doctoral

Estudio y desarrollo experimental de nuevos
materiales biodegradables para la reparación ósea

Autor

Adrián Roche Albero

Director/es

Jorge Gil Albarova
Antonio Herrera Rodríguez

Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia
2011

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO Y DESARROLLO EXPERIMENTAL DE NUEVOS
MATERIALES BIODEGRADABLES PARA LA REPARACIÓN ÓSEA.**

Memoria presentada por:

ADRIÁN ROCHE ALBERO

Directores:

DR. JORGE GIL ALBAROVA

PROF. ANTONIO HERRERA RODRÍGUEZ

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Gil Albarova por gran implicación y estrecha supervisión. Ha sido imprescindible para la realización de este trabajo.

Al Prof. Antonio Herrera, por su constante estímulo, oportunas correcciones y numerosas facilidades.

Al Departamento de Ciencia de los Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Cataluña por diseñar los materiales implantados y realizar el estudio mecánico.

Al Servicio de Cirugía experimental del Instituto Ortopédico Rizzoli de Bolonia por colaborar en el estudio histológico y morfométrico.

Al Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza, por ayudarnos con la manipulación, intervención y estabulación de los animales de experimentación.

A mis padres y mis hermanos, a ellos les debo todo lo que soy.

A Patricia, por su ayuda y constante apoyo.

INDICE

Introducción	
Elección del tema	1
Generalidades	
Conceptos básicos	5
Tipos de biomateriales para la reparación y regeneración ósea	6
Evolución histórica y estado actual de la regeneración tisular	
Evolución histórica de los sustitutos óseos	7
Antecedentes históricos del empleo de materiales cerámicos	11
Nuevos materiales capaces de sustituir al hueso.	
Características	14
Sustitutos óseos coralinos	16
Sustitutos óseos a partir de sulfato y fosfato de calcio	
Conceptos básicos	18
Biocerámicas	19
Cerámicas de fosfato de calcio	20
Biovidrios	21
Vidrios bioactivos	22
Vidrios de fosfato	22
Estructura	23
Propiedades	23
Polímeros reabsorbibles	
Generalidades	26
Estructura de los polímeros sintéticos	30
Ácido poliláctico	31
Isomerismo óptico	31
Propiedades	32
Biocompatibilidad	33
Ácido poliláctico-poliglicólico	34
Aplicaciones biomédicas	35
Factores que se emplean para el crecimiento óseo	
Conceptos básicos	45
Las BMP	46
Aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento en la regeneración ósea	50
Osteoinducción por tratamiento genético	52
Ingeniería de tejidos	54
Objetivo	56
Material y método fase subcutánea	57
Número de animales y distribución	57
Animales y analgesia. Técnica quirúrgica	57
Material implantado	58
Estudios analíticos	59
Eutanasia. Medición del pH local. Preparación del estudio histológico	60
Estudio mecánico	60
Análisis por microscopía electrónica	
Resultados de la fase subcutánea	69
Postoperatorio	69
Medición del pH local	69
Resultados de las analíticas practicadas	69
Estudio anatomopatológico	71

Estudio mecánico	73
Análisis de microscopía electrónica	80
Discusión de la fase subcutánea	84
Hallazgos de la implantación subcutánea	84
Diferenciación a osteoblastos	84
Mineralización de la matriz y osteogénesis por contacto	85
Estudio mecánico	86
Análisis por microscopía electrónica	87
Planteamiento de la fase ósea. Objetivo	88
Material y método	89
Material de experimentación	89
Anestesia, analgesia y técnica quirúrgica	89
Segmento óseo	90
Material implantado	91
Estudios complementarios	92
Eutanasia. Estudio necrópsico	92
Resultados de la fase ósea	94
Postoperatorio	94
Resultado de las analíticas practicadas	94
Estudio radiográfico	94
Estudio necrópsico	96
Estudio histológico y resultados morfométricos	96
Discusión de la fase ósea	99
Análisis del modelo experimental	99
Análisis de los estudios analíticos	101
Análisis macroscópico del estudio necrópsico	101
Análisis del estudio radiológico	102
Análisis del estudio histológico	106
Propiedades biológicas	108
Biocompatibilidad	108
Osteoconducción	108
Osteogénesis	109
Degradación	110
Osteoestimulación. Control genético de los biomateriales	110
Efecto de la porosidad y tamaño de los poros	112
Control de la vascularización de los tejidos por productos iónicos	115
Biomateriales como vehículo de sustancias	116
Propiedades antibacterianas	119
Análisis comparativo con estudios recientes	121
Límites de la tesis	126
Futuro	127
Conclusiones	129
Bibliografía	130

INTRODUCCION

ELECCIÓN DEL TEMA

En Cirugía Ortopédica y Traumatología los injertos óseos se emplean con mucha frecuencia especialmente en el tratamiento de fracturas que no consolidan o tardan en hacerlo, para conseguir fusión de la columna vertebral en el tratamiento de algunas deformidades raquídeas y para sustituir defectos óseos secundarios a traumatismos y tumores.

La necesidad de tratar defectos óseos de diferente etiología, magnitud y localización ha estimulado enormemente la búsqueda y desarrollo de materiales capaces de sustituir al hueso.

En clínica, los injertos de que se dispone son del tipo no vascularizado (autoinjertos y aloinjertos); también se utilizan, aunque con menor frecuencia, los injertos óseos vascularizados, que permiten el restablecimiento fisiológico de un flujo sanguíneo por anastomosis quirúrgica de un pedículo vascular nutricio al lugar del receptor, asegurando con muchas posibilidades la viabilidad de las células en el segmento óseo transplantado.

El autoinjerto, pese a ser el injerto ideal por su composición en la mayoría de las situaciones, presenta una morbilidad intrínseca en su obtención, una limitación en cuanto a la cantidad y morfología del mismo, y un coste económico no desdeñable. Los bancos de huesos permiten resolver gran parte de las necesidades actuales, pero se acompañan de una problemática específica de tipo económico, de infraestructura y médico-legal entre otras.

GENERALIDADES

CONCEPTOS BÁSICOS

Un biomaterial es una sustancia biocompatible, natural o sintética, o combinación de sustancias que puestas en contacto con los tejidos vivos o los fluidos biológicos, no afectan de forma adversa a los constituyentes biológicos del conjunto del organismo. Otra definición de biomaterial considera que es aquel material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo. La biocompatibilidad se define como la tolerancia biológica 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 (1-3). Además de las propiedades y exigencias propias de cada material según su destino y aplicaciones particulares, éstos deben cumplir un número de requisitos que son comunes a todos los biomateriales. El principal requisito es la biocompatibilidad, esto es, el material no debe producir ninguna reacción de inflamación en los tejidos. De acuerdo con una definición que ha sido aprobada por consenso (4, 5): “Biocompatibilidad es la capacidad de un material de llevar a cabo su función, junto con una respuesta biológica apropiada, ante una situación específica”.

Se define como biodegradación la ruptura gradual de un material mediado en o por un sistema biológico, siendo o no éste último la causa del proceso de degradación (2,3). Los fragmentos resultantes pueden ser desplazados de su lugar de implantación, pero no necesariamente fuera del organismo, en particular si pueden ser depositados en algún otro tejido receptor (6).

Se reserva el término biorreabsorbible para aquellos sistemas poliméricos capaces de degradarse en componentes de menor peso molecular incluidos normalmente en vías metabólicas, o eliminados al menos a través de las vías naturales del organismo. El concepto de bioabsorbible hace referencia a la eliminación del lugar de implantación, sin degradación previa de macromoléculas, como el caso de la lenta disolución de implantes hidrosolubles en los fluidos corporales (3,6).

TIPOS DE BIOMATERIALES PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN ÓSEA

Entre las sustancias más importantes utilizadas como biomateriales para la regeneración ósea se encuentran algunos metales y aleaciones, cerámicas, vidrios biológicos, polímeros naturales y sintéticos, los cuales se aplican entre otras, en las especialidades médicas mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1: Biomateriales para regeneración ósea

Materiales	Aplicaciones
Polímeros	Liberación de fármacos, ingeniería de tejidos
Metales	Placas de osteosíntesis, clavos y tornillos, implantes dentales
Cerámicas y Biovidrios	Relleno de cavidades y defectos óseos, prótesis de cadera

Los materiales utilizados en implantes quirúrgicos pueden reaccionar bioquímicamente con el medio según las siguientes categorías (4, 7):

- 1.- Materiales casi inertes, con una mínima reactividad química.
- 2.- Materiales bioactivos.
- 3.- Materiales reabsorbibles.

La primera categoría corresponde a materiales casi inertes y no completamente inertes. Ningún material es completamente inerte dentro del cuerpo, todos generan una respuesta del tejido vivo, aunque en algunos casos ésta sea muy leve. Estos materiales son considerados muy poco reactivos debido a que son muy poco solubles cuando están dentro del cuerpo humano. Esencialmente la reacción fisiológica que toma lugar en los alrededores de la prótesis formada por este tipo de materiales es la formación de tejido fibroso.

Los materiales de la segunda categoría son los llamados bioactivos. Este tipo de materiales recibe una respuesta biológica específica en la interfase, teniendo como resultado la formación de hueso entre el tejido y el material (8). Bajo este concepto se han incluido un gran número de materiales con un amplio rango de velocidades de enlace con el tejido óseo y grosores de las capas de enlace interfaciales, entre ellos se encuentran algunas cerámicas, vitro-cerámicas y biovidrios principalmente. Todos estos materiales forman enlaces o uniones interfaciales con el tejido adyacente, sin embargo, el tiempo en el cual se crea el enlace, la fuerza del enlace, los mecanismos de enlace y el grosor de la capa formada, difieren de un material a otro.

Los materiales de la tercera categoría son llamados reabsorbibles o bioabsorbibles ya

que representan al grupo de biomateriales que tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados dando lugar a productos que no son tóxicos y pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste. Generalmente, este grupo está representado por los polímeros biodegradables, aunque existen ciertos materiales cerámicos que son también reabsorbibles.

EVOLUCION HISTORICA Y ESTADO ACTUAL DE LA REGENERACIÓN TISULAR.

EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LOS SUSTITUTOS ÓSEOS

El tratamiento de los defectos óseos ha sido objeto de controversia durante siglos. El hueso es el único tejido del organismo que es capaz de regenerarse al ser dañado por medio de la creación de un tejido igual al original. De esta manera, cuando el hueso presenta soluciones de continuidad, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, en las pérdidas mayores de masa tisular se hace necesario recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación (9 10).

La posibilidad de sustituir un tejido u órgano dañado o insuficiente siempre ha sido objeto de gran preocupación. El primer caso de injerto conocido pertenece a la tradición cristiana, que atribuye a los Santos Cosme y Damián el milagro de reemplazar la pierna tumoral de un sacristán por la de un moro fallecido, hecho que habría acontecido en el siglo III y que fue una fuente de inspiración para varios pintores del renacimiento.

Más adelante, pero siempre en el plano de lo anecdótico, en 1668, Van Meekeren (9) describe el relato de un misionero, del que podría ser el primer procedimiento de sustitución ósea. Este corresponde al implante de un xenoinjerto óseo obtenido de la calota de un perro para reparar el defecto traumático craneal de un soldado ruso.

Deben transcurrir muchos años antes que comiencen los verdaderos avances en el tratamiento de las soluciones de continuidad óseas.

En 1820, Von Walter emplea por primera vez en clínica un autoinjerto óseo, al reponer los fragmentos de hueso triturados en una trepanación quirúrgica craneana para resolver el defecto óseo creado, obteniendo su reparación (9, 11).

En 1867, Ollier publica el “Tratado experimental y clínico de la regeneración del hueso” en que demuestra que los autoinjertos óseos son viables. El primer resultado parcialmente satisfactorio lo obtiene con un conejo de ocho meses en 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 (9, 12).

En 1878, McEwen utiliza el primer aloinjerto óseo en clínica implantando cuñas óseas de tibias procedentes de pacientes con raquitismo, para tratar un gran defecto diafisario humeral secundario a una resección ósea por infección en un niño. Debido a que los resultados que obtiene son satisfactorios, postula las siguientes conclusiones:

- 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.

Todas estas condiciones, con excepción de la primera, son coincidentes con el conocimiento actual relativo a la incorporación de los injertos óseos (9, 13).

En 1893, Barth en Alemania y Curtis en USA, trabajando independientemente, publican sus trabajos sobre injertos óseos. Barth es el primero en observar el proceso de necrosis de los injertos óseos en sus estudios histológicos, determinando el concepto de "schleichenden ersatz". Este concepto 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 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 (9, 14, 15).

En 1907, Huntington publica un método que permite solucionar defectos segmentarios tibiales transfiriendo localmente un segmento de peroné con su vascularización conservada, de esta manera soslaya 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 (9, 16).

En 1908, Buchmann presenta las primeras autoartroplastías biológicas en dos casos de anquilosis de codo. Para ello reseca la articulación cúbito humeral y la reemplaza por la primera articulación metatarsofalángica logrando una recuperación parcial de la movilidad del codo comprometido (9, 17).

En 1914, Phemister describe en un trabajo sobre injertos óseos realizados en perros, el proceso de "creeping substitution" del hueso necrótico, confirmando el fenómeno que antes Barth había denominado "schleichenden ersatz", y que se puede traducir "sustitución por arrastre". Considera que una parte de las células del injerto óseo siguen vivas, lo que le otorga propiedades osteogénicas. Además, postula que la incorporación de los injertos es favorecida con la fragmentación de las piezas, pues así sobrevive un mayor número de células, dado que el aumento de superficie favorece su nutrición (9).

En 1915, Albee publica un libro sobre cirugía de los injertos óseos, recogiendo los conocimientos de la época y confirmando la utilidad de los autoinjertos. En 1925, Lexer presenta la primera serie clínica de aloinjertos con un seguimiento de 20 años, encontrando resultados satisfactorios en el 50 % de los 23 casos en que realiza un trasplante osteoarticular. Para ello utiliza como injerto hueso fresco procedente de pacientes amputados o de cadáveres (9, 18, 19).

El 1942, Inclán reporta su experiencia con la implantación de huesos preservados, siendo reconocido como el fundador del primer banco de huesos. Presenta una serie de 52 casos, de los cuales en 43 pacientes utiliza autoinjertos conservados, en 8 casos aloinjertos y en 1 paciente emplea huesos de un feto de nueve meses, obteniendo resultados comparables con los del autoinjerto fresco. Para la conservación almacena el tejido óseo en bolsas estériles con sangre citratada o solución de Ringer a una temperatura de 2 a 5 °C, durante un periodo que oscila entre 1 y 63 días (9, 20).

En 1946, Wilson funda el banco de huesos del Hospital for Special Surgery de Nueva York. Las piezas proceden de intervenciones quirúrgicas donde es necesario resecaer hueso, que son almacenadas a - 27 °C en bolsas estériles. Es el primero que plantea la necesidad de organizar un banco de huesos con una metodología adecuada, selección rigurosa de los donantes y controles microbiológicos seriados (9, 21).

En 1953, Sanchiz Olmos publica la experiencia del primer banco de huesos creado en España, que había sido fundado dos años antes en el Hospital Provincial de Madrid. Paralelamente, ese mismo año, Narváez reporta los resultados preliminares del primer banco de huesos de Chile. (9, 22, 23).

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 (9, 24)

En 1963, Burweil demuestra que el hueso almacenado durante una semana a - 20 °C tiene menor inmunogenicidad. De esta forma, la congelación se transforma en el método más utilizado para la conservación de los injertos óseos (9, 25).

En 1965 y 1970, Ottolenghi y Volkov publican, respectivamente, sus experiencias en el reemplazo óseo y articular con alotransplantes óseos masivos (9, 26, 27).

Las conocidas limitaciones de los injertos como sustitutivos óseos, permiten que la microcirugía vascular y la osteogénesis por distracción puedan entregar otro interesante aporte para la solución de defectos óseos específicos.

En 1975, Taylor efectúa el primer injerto de peroné libre vascularizado con anastomosis microvascular, para reconstruir un defecto traumático tibial contralateral. En 1977, Serafin realiza la transferencia de una costilla vascularizada para la resolución de un defecto mandibular. El injerto óseo vascularizado permite la reparación de amplios defectos secundarios a lesiones tumorales o traumáticas, pero tiene como desventaja la necesidad de sacrificar un hueso sano del esqueleto (9, 28).

En 1989, Ilizarov publica su experiencia con el transporte óseo, técnica que venía desarrollando desde el año 1940 para resolver grandes defectos diafisarios por medio de la osteogénesis por distracción. Este procedimiento aprovecha la capacidad que tiene el hueso de generar nuevo tejido óseo al ser corticotomizado y sometido a distracción continua, lo que representa una ventaja respecto al autoinjerto óseo vascularizado (9, 29, 30).

Posteriormente se introdujo el concepto de injerto óseo libre vascularizado con anastomosis microvasculares, abriendo nuevos horizontes en el tratamiento de grandes defectos óseos.

Los avances en la comprensión de la biología del hueso y de la fractura, unidos al descubrimiento de las proteínas morfogenéticas (BMP) por Marshall Urist (31), permitieron a la aparición de nuevas estrategias para la regeneración tisular. Además, el reciente aislamiento de progenitores osteogénicos, llamados células madre mesenquimales pluripotenciales, ha ofrecido nuevas herramientas en la regeneración tisular.

Actualmente el injerto autólogo se considera en patrón oro para el tratamiento de defectos óseos, ya que proporciona los mejores resultados. El injerto alogénico presenta una alternativa y los sustitutos óseos sintéticos están empezando a ser una opción a tener

en cuenta.

Recientemente los factores de crecimiento como el factor β transformador del crecimiento y las proteínas óseas morfogenéticas como la BMP-2 y la BMP-7 están disponibles en la clínica y numerosos estudios han demostrado una mejoría del proceso de consolidación de la fractura (32, 33).

Varios estudios clínicos y experimentales han demostrado que las células madre pluripotenciales en una matriz biológica o artificial seguida de la implantación en el defecto facilitan la osteogénesis y la curación (32). Además se ha visto que modificar genéticamente las células madre pluripotenciales mediante transferencia genética de BMP-2 con adenovirus favorece la curación de la fractura (34, 35). Con esta técnica las células madre pluripotenciales derivadas de emplazamientos como el tejido adiposo que se sabe son pobres en potencial osteogénico comparadas con la médula ósea o el periostio, sobreexpresan la proteína BMP-2 y pueden facilitar la curación de grandes defectos óseos en un modelo animal.

Como consecuencia de los grandes esfuerzos en investigación, se han desarrollado nuevas estrategias con modalidades de tratamiento que ofrecen mejores resultados. El progreso hecho en todos los aspectos de la medicina, incluidos la medicina molecular, la biología molecular, la ingeniería de tejidos y la ingeniería genética han aumentado las armas del cirujano para el tratamiento de las difíciles condiciones asociadas a los grandes defectos óseos y tisulares.

La ingeniería de tejidos de las articulaciones es un reto en el diseño de nuevos sustitutos. El desarrollo de nuevos tratamientos para inducir la restauración de la estructura y función de las articulaciones ha provocado la aparición de nuevas tecnologías. Además de buscar los requisitos tradicionales en el diseño de sustitutos, los nuevos enfoques deben buscar dirigir la compleja interacción de factores biológicos y mecánicos que influyen en la regeneración tisular de las articulaciones (36).

Los materiales óseos sintéticos ofrecen una alternativa eficiente para los autoinjertos, aloinjertos y matriz ósea desmineralizada. Los productos a base de fosfato tricálcico son esterilizables, osteoconductivos, y tienen una alta efectividad en unión de defectos de columna, extremidades, y pelvis (37, 38). No hay riesgo de transmisión de enfermedades asociado con estos productos sintéticos. Los injertos óseos sintéticos no tienen en general propiedades osteoinductivas y por lo tanto requieren un ambiente del huésped bien vascularizado para tener el aporte celular y de factores de crecimiento adecuado, de acuerdo a la “triada de osteoconducción” propuesta por Shors (39) que comprende conceptos de proximidad, viabilidad y estabilidad, para sustitutos óseos coralinos. En los defectos pequeños, el fosfato tricálcico se puede utilizar solo. En los grandes defectos se recomienda utilizar una combinación de aloinjerto e injerto óseo sintético.

Aunque los injertos estructurales sintéticos compuestos (soportes de metal con factores de crecimiento osteoinductivos) fueron introducidos como alternativa a aloinjertos, no son válidos para reemplazar corticales femorales u otros grandes aloinjertos. Las fracturas periprotésicas del fémur requieren todavía de aloinjertos estructurales. En el presente, no hay alternativa para este tipo de injertos; por lo tanto, los aloinjertos estructurales son necesarios.

En la cirugía protésica, principalmente en revisiones de artroplastias totales de articulaciones, se pueden utilizar múltiples sustitutos. La selección del material se basa en diferentes factores. Uno de ellos es la preferencia del cirujano y la comodidad de su utilización. Otro es el coste y la disponibilidad del producto. Y otro debería ser el análisis de la necesidad biológica del lecho receptor con arreglo a su trofismo, estabilidad mecánica

y potencial soporte de cargas mecánicas.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL EMPLEO DE MATERIALES CERÁMICOS

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

El primer material cerámico que se emplea como sustitutivo óseo en clínica corresponde al sulfato de calcio hemihidratado, conocido comúnmente como yeso de París. En 1892, Dreesman de la Clínica Trendelenburg de Bonn usa este material mezclado con una solución de fenol al 5.0 % para rellenar cavidades de huesos largos en 8 pacientes. Seis defectos eran de origen tuberculoso, 1 secundario a una osteomielitis y 1 correspondiente a un encondroma. Las cavidades se rellenaron con hueso neoforado en 5 de los casos (9, 40).

En 1920, Albee realiza la primera aplicación clínica satisfactoria de las cerámicas de fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en humanos, que fueron descritos como reactivos químicos de triple fosfato cálcico (9, 41).

En 1951, Ray y Ward publican, treinta años después que Albee, un informe preliminar del empleo clínico de cerámicas de fosfatos de calcio como sustitutivos óseos, trabajo que es seguido en 1971, por Bhaskar y cols, de la aplicación de fosfato tricálcico como implante en clínica dental con resultado exitoso (9, 42, 43).

En 1959, Peltier publica su experiencia con la utilización clínica del yeso de París en el tratamiento de diferentes defectos óseos. En 1980, Coetzee emplea este material cerámico como sustitutivo óseo en clínica para el tratamiento de defectos craneanos, reportando buenos resultados (9, 44, 45)

En 1971, Hench y cols descubren que ciertas composiciones de vidrios de base silicio tienen la capacidad de ligarse con el tejido óseo y promover la neoformación ósea. Denominan a estos materiales como vidrios bioactivos y desde esa fecha se han realizado numerosos estudios con vistas a su utilización clínica como sustitutivos óseos (46)

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 como aumentador de injertos óseos (9, 47)

En 1981, Burnie y Gilchrist presentan sus estudios relativos a una serie de vidrios con contenidos variables de pentóxido de fósforo (P_2O_5) y distintas proporciones de CaO y Na_2O . De esta manera, obtienen materiales con un amplio rango de propiedades bioactivas y diferentes velocidades de disolución, que abren la posibilidad de desarrollar vidrios basados en fosfatos de calcio para futuras aplicaciones biomédicas (9, 48).

En 1982, LeGeros postula el concepto de los cementos basados en fosfatos de calcio, el que fue concretado por Brown y Chow en 1983, al publicar el primer estudio sobre un cemento óseo que fragua a temperatura fisiológica, que luego patentaron en 1986 (9, 49, 50).

En 1993, Driessens y cols. del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universidad Politécnica de Cataluña, desarrollan un nuevo cemento óseo apatítico basado en la hidrólisis del fosfato tricálcico y postulan el concepto de osteotransducción que caracteriza a estos materiales. En 1994, Ginebra del mismo Departamento, continúa con el desarrollo y optimización del cemento de fosfato tricálcico, denominado cemento H, proponiéndolo para su aplicación en cirugía ósea, ortopédica y dental y para mejorar la osteointegración de las endoprótesis articulares (9, 51, 52).

En 1998, Clement y cols. elaboran y caracterizan un vidrio del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O en el Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universidad Politécnica de Cataluña, estudiando su biocompatibilidad y velocidad de disolución. Posteriormente, Navarro y cols., del mismo Departamento, determinan *in vitro* las propiedades físico-químicas y biológicas de diferentes vidrios de base fosfato, dos de los cuales, corresponden a los vidrios G0 y G5 (9, 53, 54, 55)

En 2002, Garrido Lahiguera y cols (56, 57) evaluaron *in vivo* un vidrio bioactivo en la reparación de defectos óseos en animales esqueléticamente maduros e inmaduros. Para ello intervinieron 32 conejos machos Nueva Zelanda divididos aleatoriamente en dos grupos de 16: esqueléticamente maduros e inmaduros respectivamente. En todos ellos, labraron un defecto óseo en la cara lateral del cóndilo femoral. En la mitad de cada grupo se rellenó el defecto óseo con un implante de biovidrio. El resto sirvió como control. En los animales inmaduros, el defecto óseo resultó equivalente a una lesión fisaria tipo VI de Rang. El seguimiento fue de 4 meses. Realizaron un estudio radiográfico mensual, así como un estudio necrópsico, histológico e histomorfométrico de los especímenes. No observaron desviaciones axiales de las extremidades intervenidas en los animales inmaduros. El vidrio presentó una excelente osteointegración tanto en animales maduros como inmaduros, con evidencia de osteoconducción sobre su superficie, de forma simultánea a su degradación y reabsorción, sin deformidades o roturas. La formación ósea inducida por el vidrio fue mayor en los animales inmaduros respecto a los maduros. Los animales control presentaron una reparación del defecto óseo de menor calidad, con variaciones entre individuos. Concluyen que el comportamiento *in vivo* del vidrio testado permite considerarlo como un material adecuado para la sustitución o reparación ósea, en el relleno de cavidades, la cobertura de superficies de implantes, y la vehiculización de sustancias. En cirugía del cartílago de crecimiento podría utilizarse como material de interposición tras la resección de puentes óseos misarios

En 2004, Gil Albarova y cols (58) evaluaron en conejos Nueva Zelanda el vidrio SiO_2 - P_2O_5 -CaO y la vitrocerámica SiO_2 - P_2O_5 -CaO-MgO. 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 consideran que ambos materiales son útiles para la sustitución y reparación ósea. Sus indicaciones incluyen relleno de cavidades y 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. Como indicación específica, ambos materiales se pueden utilizar como materiales de interposición tras resección de puentes óseos en cirugía de la placa de crecimiento.

En 2004, Sanzana y cols realizaron un estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos en defectos cavitarios experimentales. Realizan estudios radiológico e histológico que muestran una

correcta osteointegración y sustitución de los implantes por hueso neoformado en todos los animales. Concluyen que los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio son materiales osteoconductivos, biocompatibles y biodegradables que se comportan como sustitutos óseos en los defectos cavitarios en el animal de experimentación (9).

En 2005, Navarro Toro y cols (4) desarrollaron y caracterizaron un material compuesto por PLA y biovidrio de fosfato para la fijación y regeneración ósea en aplicaciones ortopédicas y dentales. Concluyen que el material compuesto desarrollado tiene potencial como andamio para Ingeniería de Tejidos.

En 2005, Gil Albarova y cols (59) estudiaron en defectos críticos realizados en diáfisis de conejos Nueva Zelanda un biovidrio con composición 70% CaO–30% SiO₂ 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 la el grupo de vitrocerámica. Proponen la utilización 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.

En 2007, García Barea y cols. realizaron un estudio de vitrocerámicas y vidrios bioactivos en el tratamiento de defectos óseos segmentarios. Los dos materiales logran restablecer la continuidad del defecto óseo crítico segmentario creado en el fémur del conejo, demostrando sus propiedades de biocompatibilidad, bioactividad y osteoconducción, manteniendo un soporte estructural adecuado y proporcionando unas propiedades bioactivas satisfactorias mientras se producen los fenómenos de biodegradación del implante y osteogénesis sobre su superficie (60).

Durante la última década se han producido avances significativos en los sustitutos óseos en cirugía ortopédica y traumatología. No hay un consenso para determinar el tipo específico de sustituto óseo que se debe utilizar en cada indicación particular.

Bostrom y Seigerman han estudiado los sustitutos óseos utilizados en el Hospital for Special Surgery durante los últimos dos años y medio. Encuentran que el 50% de los materiales sintéticos fueron empleados en cirugía de columna, el 20% en artroplastias y traumatología y 12% en cirugía de mano y pie (61)

El riesgo de transmitir enfermedades, tanto virales como bacterianas, es la mayor limitación para utilizar aloinjerto de cadáver. Además, su falta de propiedades osteoinductivas limita su uso clínico. Ciertas de sus propiedades estructurales no se han conseguido reproducir por ningún material sintético, y por lo tanto se sigue utilizando en la clínica habitual (62).

Cuando se seleccionan una alternativa para un aloinjerto, es necesario utilizar un producto que disminuya el riesgo de infección y por lo tanto proporcione un campo osteoconductivo para ser incorporado por el hueso del huésped. La extracción de la fase mineral del hueso mediante un riguroso proceso de esterilización disminuye ciertamente el riesgo de infección vírica y bacteriana (63). Sin embargo, la matriz ósea desmineralizada no es un producto estéril, por lo tanto el riesgo de infección no está erradicado. Pese a todo, la matriz ósea desmineralizada es muy utilizada en cirugía de pie y mano. Una posible explicación puede ser la disponibilidad de formulaciones en gel e inyectables de estos productos. Estas formulaciones permiten a los cirujanos implantar estos materiales en campos operatorios de reducido tamaño (63).

NUEVOS MATERIALES CAPACES DE SUSTITUIR AL HUESO.

CARACTERÍSTICAS.

En los últimos años, la idea de contar con materiales capaces de sustituir al hueso se ha desarrollado progresivamente. Entre otras razones, se argumenta que la obtención de un autoinjerto no está exenta de morbilidad, existe una limitación en cuanto a la cantidad a obtener y a la morfología anatómica del mismo, pese a ser el injerto ideal por su comportamiento en la mayoría de las necesidades (39,64-66). Por otra parte se ha calculado que el coste económico de la obtención de un autoinjerto de cresta ilíaca y el tratamiento de su morbilidad puede exceder de los 5000 euros por caso (39).

El sustituto óseo ideal debería ser osteogénico, biocompatible, bioabsorbible, capaz de proporcionar soporte estructural y de vehiculizar otras sustancias, fácilmente utilizable en clínica y con una adecuada proporción coste-beneficio (39, 56, 60, 64, 66). En la práctica sería deseable que en determinadas aplicaciones una o varias de dichas características predominasen sobre otras en función de la necesidad del caso a tratar.

Los sustitutos óseos pueden emplearse en el relleno de pequeñas cavidades, o mezclados con el autoinjerto óseo con la finalidad de incrementar el volumen del mismo, permitiendo su aplicación en situaciones en las que se requiere un gran volumen de injerto, tales como el tratamiento quirúrgico de la escoliosis, la cirugía de revisión de prótesis articulares o la cirugía ortopédica oncológica (66-70).

En las dos últimas décadas los materiales bioabsorbibles han sido utilizados y experimentados en diferentes aspectos de la cirugía ortopédica como alternativas para la fijación de fracturas, artrodesis, osteotomías y daños en los ligamentos y meniscos (4) (71). Este tipo de materiales fueron desarrollados para eliminar la necesidad de una segunda intervención quirúrgica debida a la retirada del implante ya que los mismos tienen la finalidad de proveer la rigidez suficiente para que el hueso comience a sanar, mantener sus propiedades mecánicas mientras que el hueso forma el callo óseo y luego iniciar su degradación o período de reabsorción.

Una de las aplicaciones de los sustitutos óseos se sirve de células madre u osteoblastos del paciente, que son cultivadas en un soporte *in vitro* en condiciones óptimas para la formación ósea. El compuesto puede entonces implantarse en el defecto óseo donde el tejido se debería regenerar al tiempo que el soporte se reabsorbe (72, 73).

Un sustituto óseo óptimo debería cumplir varios criterios. Debería ser biocompatible (no tóxico) y actuar como plantilla tridimensional para el crecimiento óseo tanto *in vivo* como *in vitro*. Para conseguirlo debería estar formado por una serie de macroporos interconectados con unos poros de interconexión de al menos 100 micras para permitir la migración celular, el crecimiento tisular en su interior y finalmente la vascularización (72, 74, 75). El sustituto debería promover la adhesión y activación celular, e idealmente estimular la osteogénesis a nivel genético (72, 76) por lo que el sustituto óseo se debería poder cultivar *in vitro*, preparándose para la implantación. El sustituto debe tener unas propiedades mecánicas acordes con el hueso del huésped. Además debería unirse al hueso del huésped sin la formación de cicatriz ósea, creando un punto de contacto estable, y reabsorberse al mismo tiempo que el hueso se regenera, con productos de degradación no tóxicos y fácilmente excretados por el cuerpo, por lo que el hueso volvería a su estado y función originales (72). La técnica de procesamiento para sustitutos óseos debería permitir

la elaboración de diversas formas tridimensionales para su adaptación estable a la morfología del defecto óseo, que permitan su esterilización y su producción comercial de acuerdo a los requisitos internacionales para el uso clínico (72).

El hueso es una estructura compuesta de células, agua, matriz orgánica y sales inorgánicas. El componente inorgánico del hueso representa aproximadamente el 70% de su peso seco, es biocompatible, no es inmunogénico y está constituido por sales de calcio, fundamentalmente fosfato de calcio, junto con pequeñas cantidades de sodio y magnesio (39, 56, 60, 77). De estas sales, la hidroxiapatita, un fosfato de calcio pobremente cristalizado, es el mayor constituyente del componente inorgánico, mientras que otras sales de calcio, como el carbonato de calcio, están presentes en una menor proporción. Las sales de calcio, y en particular la hidroxiapatita y el carbonato de calcio, son bioactivas y osteoconductoras (39, 78). El mayor constituyente de la fase orgánica es el colágeno tipo I, con elementos celulares que integran el resto de la matriz orgánica (39).

El reto del investigador se ha planteado a la hora de dar una adecuada forma tridimensional a las sales de calcio para que el crecimiento óseo se desarrolle en una determinada localización y dirección. Sobre la base del conocimiento de la incorporación de los injertos óseos se ha propuesto la porosidad del material como cualidad necesaria para el crecimiento del tejido blando y posterior regeneración ósea tras la implantación. Sin embargo, la porosidad por sí sola no es suficiente para el crecimiento óseo, y resulta indispensable que esté asociada a interconexión de los poros (39, 56, 60). Por otra parte se acepta que el tamaño de los poros para el crecimiento óseo en los implantes porosos, debe oscilar entre 100 y 500 micras (3, 67, 78-81). Además, el diámetro de la interconexión entre poros condiciona el tipo de tejido que crece en el implante, y se considera que debe ser mayor de 100 micras para que se regenere hueso mineralizado, entre 40 y 100 micras para el crecimiento de formas osteoides y entre 10 y 40 micras para el tejido fibrovascular (39, 67, 56, 60).

Un componente clave en la ingeniería de tejidos para la regeneración ósea es el andamio que sirve como patrón para las interacciones celulares y la formación de matriz ósea extracelular para proporcionar soporte estructural para el nuevo tejido formado. Los andamios para la regeneración ósea deberían guardar ciertos criterios para llevar a cabo su función, incluyendo propiedades mecánicas similares a las del tejido óseo a reparar, biocompatibilidad y biodegradación en rango adecuado al remodelamiento. Los andamios sirven primariamente como material osteoconductor, ya que se deposita nuevo tejido óseo a partir de tejido óseo adyacente. Además, los andamios pueden servir como vehículos para citoquinas como proteínas óseas morfogenéticas (BMPs), factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) y factores transformadores del crecimiento (TGFs) que transforman células precursoras reclutadas del huésped a la matriz para producir células, y por tanto pueden proporcionar osteoinducción. Finalmente, la osteogénesis se logra mediante siembra celular sobre los andamios antes de la implantación con células, como osteoblastos y células mesenquimales que tienen el potencial de comenzar un linaje osteoblástico. También pueden utilizarse células transducidas genéticamente. La combinación de andamios como vehículos celulares o de citoquinas mediante ingeniería tisular *ex vivo* puede lograr mejores resultados en la regeneración ósea que la simple implantación de andamiajes sintéticos en el defecto a tratar.

Los andamios para osteogénesis deberían imitar la morfología, estructura y función ósea para optimizar su integración en el tejido que le rodea. El hueso es una estructura compuesta por cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) depositados en una matriz orgánica, de la que aproximadamente el 95% es colágeno tipo I (82, 83). La morfología se

compone de hueso trabecular que crea un ambiente interconectado mediante poros con 50-90% de porosidad y tamaño de los poros del orden de 1 mm de diámetro. El hueso cortical tiene una estructura sólida con una serie de huecos, como por ejemplo los canales de Havers, con un área de sección de 2500-12000 μm^2 que resulta en una porosidad de 3-12%. El grado de mineralización varía en los diferentes tejidos: por ejemplo, en el hueso trabecular del calcáneo es $1,135 \pm 0,147 \text{ g/cm}^3$, mientras que en el hueso trabecular de la cresta iliaca es de $1,098 \pm 0,077 \text{ g/cm}^3$. (82, 84).

Las propiedades mecánicas del hueso dependen de la edad (82, 85). Se acepta que después de la madurez, la fuerza de tensión y el módulo de elasticidad del hueso femoral cortical disminuyen el 2% por década. La complejidad de la arquitectura y la variabilidad de las propiedades del tejido óseo (porosidad tamaño de los poros, propiedades mecánicas, mineralización o densidad mineral, tipos de células y citoquinas) así como las diferencias en la edad, estado nutricional, actividad y enfermedades de los individuos establece un cambio en la fabricación de los andamios y la ingeniería de tejidos que tiene como objetivo atender las necesidades específicas según localización e individuo (82).

La porosidad se define como el porcentaje de espacio vacío en un sólido y es una propiedad morfológica independiente del material. Los poros son necesarios para la formación del tejido óseo porque permiten la migración y proliferación de osteoblastos y células mesenquimales, así como la vascularización. Además, la superficie de los poros mejora el bloqueo mecánico entre el biomaterial implantado y el hueso natural de alrededor, proporcionando mayor estabilidad en la interfase. El tamaño mínimo del poro que se requiere para regenerar hueso mineralizado se considera que es aproximadamente 100 μm tras los estudios de Hulbert y cols, quienes implantaron bolas de aluminato cálcico con 46% de porosidad en fémures de perros (86). Los poros más grandes, 100 a 200 μm permitieron crecimiento de tejido óseo en su interior. Poros más pequeños, de 10 a 44 y 45 a 75 μm eran penetrados solo por tejido fibroso. Estos resultados se correlacionan con sistemas normales de canales haversianos que tienen un diámetro aproximado de 100-200 μm . Sin embargo, utilizando técnicas de perforación con láser y placas de titanio, se estudiaron cuatro tamaños de poros diferentes (50, 75, 100 y 125 μm) en defectos femorales de conejos en condiciones de no carga. El crecimiento en el interior de los poros fue similar en todos los poros, independientemente del tamaño, lo que sugiere que 100 μm no es el tamaño crítico del poro en condiciones de no carga (82, 87)

SUSTITUTOS ÓSEOS CORALINOS

Algunos corales marinos presentan esqueletos con porosidad e interconexión entre los poros. Además, están compuestos fundamentalmente de carbonato de calcio en la forma cristalina de aragonita, que es relativamente inestable y que sometida a calor, tiende a convertirse en una forma termodinámicamente más estable como la calcita (39, 78). Este hecho dio paso a la utilización de estos esqueletos de coral como modelos de sustitutos de injertos óseos. Los materiales implantables utilizados no son el propio coral, pero derivan del componente mineral del mismo, por lo que son llamados coralinos (3, 39, 56, 60).

Existen dos procesos para manufacturar estos implantes coralinos. El primero de ellos consiste en utilizar el coral en su forma de carbonato de calcio y el segundo consiste en utilizar el coral tras convertir el carbonato de calcio a hidroxiapatita mediante una reacción de estado sólido que mantiene la porosidad y su interconexión (8, 19). Entre los corales duros existe un número limitado de ellos que cumplan los requerimientos de porosidad y diámetro de interconexión adecuados. En concreto, los géneros *Goniópóra* y *Porita*

cumplen dichos requerimientos (3, 39, 78, 56, 60). El procesamiento del coral conlleva su esterilización y la eliminación del material orgánico mediante métodos patentados industrialmente. Su manufacturación parece conllevar la eliminación de material orgánico mediante lavados con determinados detergentes, y la esterilización se realiza mediante radiación. No se recomienda su esterilización al vapor, ya que el calor transforma la aragonita en calcita (39).

Se han desarrollado productos coralinos híbridos, compuestos de carbonato de calcio y fosfato de calcio, testados en diferentes animales y comercializados como una cerámica coralina porosa reabsorbible. El grosor de la capa de hidroxiapatita puede ajustarse, por lo que se presentan una serie de implantes con diferentes proporciones de reabsorción (39, 80, 81, 88).

Las propiedades mecánicas de los implantes coralinos son más similares a las del hueso esponjoso que a las del hueso cortical, debido a su porosidad e interconexión entre poros. A menor porosidad del material coralino mayor resistencia mecánica del mismo, por lo que puede seleccionarse el material coralino más adecuado para determinadas aplicaciones clínicas. La fragilidad de la cerámica permite adecuar su forma con instrumentos convencionales de forma intraoperatoria, tallando la morfología más conveniente del implante al lecho receptor (39).

Las propiedades *in vivo* de los implantes coralinos permiten que tras su implantación, sean invadidos por tejido fibrovascular (39). La fase inicial es la formación de un coágulo que se resuelve dando lugar a un tejido proliferativo fibrovascular, que avanza a una media de 2 a 3 mm por semana. La presencia de macrófagos puede desempeñar un papel importante en estas primeras fases, aunque la presencia de células inflamatorias es rara o tan sólo ocasional. Una infección concomitante desencadenaría una típica respuesta inflamatoria, aunque no existen evidencias de que estos materiales faciliten la infección, sino que se comportan como biocompatibles y resistentes al proceso infeccioso (39, 56, 60).

Los implantes coralinos se comportan como osteoconductivos si cumplen los siguientes criterios que Shors (39) llama la “triada de osteoconducción” 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. Por otra parte, la superficie de contacto entre el implante y el hueso está en relación directa con el efecto osteoconductor, por lo que la viabilidad del tejido óseo circundante es un requisito necesario. Por último, la estabilidad del implante respecto al hueso circundante es otra condición necesaria para la osteoconducción, considerándose como beneficiosos los micromovimientos, y como perjudiciales los macromovimientos del implante (3, 39, 56, 60).

La formación ósea se inicia sobre la superficie de un implante coralino si es bioactivo. Si los fibroblastos proliferan en superficie, el implante es osteoconductor y posteriormente aparecerán los osteoblastos. Sin embargo, es rara la presencia de condroblastos en el interior de la porosidad, por lo que parece darse un proceso de osificación intramembranosa en vez de un proceso de osificación endocondral, aunque este hecho todavía no está del todo aclarado (39). La formación ósea sobre aloinjertos mineralizados estables generalmente será de tipo intramembranosa, mientras que será de tipo endocondral si el injerto no es estable en el lecho (89, 90).

Los implantes coralinos son anisótropos, es decir, que mantienen una microarquitectura direccional, que se traduce en sus propiedades mecánicas, diferentes de unos tipos de coral

a otros, por lo que puede escogerse el material coralino más adecuado a la indicación clínica para la que se emplea (39).

La reabsorción de los sustitutos óseos no es siempre una ventaja. Mientras que es conveniente para valorar la fusión ósea en determinadas indicaciones, ya que se facilita el estudio mediante radiología simple, densitometría y tomografía computerizada, puede no serlo en implantaciones cráneo-faciales donde la reabsorción puede acompañarse de cambios estéticos indeseables. Biomecánicamente, la reabsorción de este tipo de implantes tiene ventajas en la reconstrucción de defectos óseos diafisarios, ya que se persigue una regeneración cortical completa. Aunque la biodegradación del implante puede ser deseable, es recomendable que se inicie una vez que el implante haya cumplido su función como matriz estructural osteoconductiva para la formación ósea (39, 56, 60).

El proceso de degradación de las sales de calcio puede darse por disolución o por reabsorción. La disolución vendrá condicionada por la solubilidad de la matriz del implante, proporción entre el volumen y área del implante, pH local, flujo de fluidos y temperatura. Como regla general, el porcentaje de disolución está inversamente relacionado con la proporción de fosfato cálcico, pureza y tamaño de los cristales, y directamente relacionado con la superficie y porosidad del implante (39). La reabsorción es un proceso biológico mediado por osteoclastos que consiguen disolver el fosfato de calcio mediante la secreción de una solución extracelular con alto contenido ácido. Los osteoclastos segregan la enzima anhidrasa carbónica, capaz de reabsorber el hueso y los implantes coralinos. En este proceso, fuertemente influenciado por las variables biológicas y biomecánicas, existe una variabilidad entre las especies animales, e incluso dentro de la misma especie animal (39).

SUSTITUTOS ÓSEOS A PARTIR DE SULFATO DE CALCIO Y FOSFATO DE CALCIO.

CONCEPTOS BÁSICOS

Se han utilizado diferentes materiales en el campo de la implantología ortopédica para la reparación del tejido óseo (56, 57, 60). Los metales han sido ampliamente utilizados debido a sus propiedades mecánicas. Sin embargo, los implantes metálicos presentan una resistencia mucho mayor a la del hueso, lo cual conlleva un conflicto de tensiones. Otra desventaja de los materiales metálicos para aplicaciones de osteosíntesis es su gran facilidad para corroerse, lo cual también afecta el comportamiento biológico. Por lo tanto se hace necesaria la utilización de materiales que posean tanto propiedades mecánicas como una composición química más cercanas a las del hueso (4).

El interés por la forma sintética de la hidroxiapatita descendió tras comprobar su pobre biorreabsorción y escasas características de manejo en cuanto a su moldeabilidad. Esto dio a paso a la búsqueda de una hidroxiapatita en forma de cemento (3, 39, 77). De esta manera surgió un material desarrollado en el Centro de Investigación Paffenburger de la Asociación Americana de la Salud Dental, que se aplica en forma de una pasta densa (39, 67, 78). Se trata de un fosfato tretacálcico y un fosfato dicálcico anhidro que cuando se mezcla con agua, dan lugar a hidroxiapatita a un pH fisiológico de forma isotérmica tras 15 minutos *in vivo*. La hidroxiapatita se forma tras la colocación del cemento por precipitación durante las primeras cuatro a seis horas. Los estudios en animales indican que el implante permanece estable durante más de un año, y hasta el 77% es reemplazado por hueso vivo (39).

Otra forma maleable de hidroxiapatita está compuesta por fosfato tetracálcico y dihidrato dicálcico, que mezclados con agua dan lugar a un cemento tras una reacción isotérmica que se produce entre 10 y 15 minutos (39, 67, 90). El fosfato tricálcico también ha sido utilizado como relleno de cavidades óseas. Tiene similitudes con la hidroxiapatita en cuanto a que es biocompatible y reabsorbible (39, 91). Se ha utilizado en combinación con la hidroxiapatita, colágeno I, médula ósea e injerto córtico-esponjoso autólogo. Este material presenta teóricas ventajas para el tratamiento de las fracturas de los huesos largos, y ha resultado eficaz en modelos experimentales de fusión vertebral aunque con resultados dispares (39, 92).

Se han realizado intentos de reforzar cerámicas coralinas mediante la elaboración de compuestos con polímeros reabsorbibles como el ácido poliláctico. Sin embargo, se ha comprobado que el polímero reabsorbible ocluye la interconexión entre poros, con lo que la proliferación vascular es muy inferior, consiguiéndose una menor formación ósea. Sin embargo, las cerámicas coralinas disminuyen la acidez local durante la degradación de los polímeros reabsorbibles, amortiguando los efectos locales de la misma. La mezcla de hueso desmineralizado con las cerámicas coralinas consigue incrementar la capacidad de formación ósea, a diferencia de lo que ocurre con el aloinjerto liofilizado (39, 80, 88, 93, 94).

El sulfato de calcio es especialmente soluble *in vivo*, por lo que es útil como fuente de calcio para la formación mineral. Se ha demostrado que el sulfato de calcio es efectivo para rellenar defectos óseos (95). En clínica se usa para relleno de defectos óseos y como transporte de antibióticos.

El fosfato tricálcico β (β -TCP) poroso es un material del grupo de las cerámicas, sintético y biodegradable, que se ha usado en diversas aplicaciones como reconstrucciones maxilofaciales, aumento alveolar y tumores benignos (96, 97). En un modelo de implantación en cóndilo femoral de oveja se ha observado que el 55% del β -TCP se degrada a las 24 semanas de implantación (96, 98). El β -TCP es un material con una buena osteoconductividad debido a su alta porosidad y conectividad. Sin embargo es un material muy frágil. Un sustituto hecho únicamente de β -TCP no es capaz de soportar fuerzas mecánicas de una determinada magnitud (96, 99). Queda por determinar si un sustituto puro de β -TCP sería útil para reparar defectos óseos en localizaciones de carga en modelos animales. Yuan et al (96) han implantado β -TCP con células del estroma de médula ósea (BMSC) autólogas cultivadas, cultivadas e inducidas osteogenéticamente *in vitro* en defectos mandibulares de modelos animales caninos. Han observado una reparación satisfactoria a las 32 semanas de la implantación sugiriendo el potencial uso de β -TCP y BMSC en clínica para reparación de defectos óseos mandibulares.

Biocerámicas

La utilización de cerámicas para la reconstrucción ósea se basa en su semejanza estructural respecto a la fase mineral del hueso. A pesar de la alta fragilidad de los materiales cerámicos, algunos de ellos poseen propiedades físicas iguales o mejores que algunas aleaciones metálicas como por ejemplo resistencia al calor, corrosión, desgaste y una gran dureza entre otras.

En ortopedia, las cerámicas han sido utilizadas en diferentes aplicaciones como las prótesis articulares en forma de piezas de cerámica densas. Es el caso de la alúmina y la zirconia, las cuales son inertes y muy resistentes al desgaste, más incluso que los metales. Otras aplicaciones de las cerámicas incluyen los cementos óseos para el relleno de pequeños defectos, los materiales reabsorbibles para la estimulación de la regeneración ósea y los

recubrimientos de implantes metálicos.

En las últimas décadas, la atención se ha enfocado hacia aquellos materiales cerámicos que tienen un gran parecido con la fracción mineral del hueso, como es el caso de las apatitas, y más específicamente la hidroxiapatita debido a su potencial bioactivo (4).

La formación ósea requiere una estructura física a la que los osteoblastos puedan adherirse, por lo que se ha desarrollado la idea de diseñar implantes porosos compuestos de materiales biocompatibles (65, 39, 77, 80, 81, 90). Así se ha trabajado con cerámicas como el óxido de aluminio y con metales inertes como el cromo-cobalto y aleaciones de titanio, que aunque presentan una estructura tridimensional favorable para la incorporación ósea, no han logrado un crecimiento satisfactorio del tejido sobre la superficie. Sólo algunas cerámicas han demostrado ser bioactivas y con capacidad osteoconductiva, sobre las que el hueso crece y se une químicamente a su superficie tridimensional (39, 67, 78, 80). Las cerámicas pueden ser clasificadas en cuatro tipos fundamentales (3, 56, 60):

- Las tipo 1 son cerámicas densas no porosas, casi inertes, y su fijación al hueso deriva del crecimiento del mismo sobre las irregularidades de superficie, resultando una fijación morfológica. Un ejemplo es la alúmina.
- Las tipo 2 son implantes porosos e inertes cuya fijación al hueso deriva de la colonización de éste, permitiendo una fijación mecánica. Entre ellas tendríamos la alúmina porosa y los metales recubiertos de hidroxiapatita.
- Las tipo 3 son cerámicas, vidrios y vitrocerámicas de superficies reactivas, densas y no porosas cuya unión al hueso se lleva a cabo mediante enlaces químicos, formando una fijación bioactiva. Entre ellos están los vidrios y cerámicas bioactivas.
- Las tipo 4 son cerámicas reabsorbibles, densas y porosas o no porosas, diseñadas para ser sustituidas lentamente por hueso. Entre ellas están el sulfato tricálcico y las sales de fosfato cálcico.

A. Cerámicas de Fosfato de Calcio

Las cerámicas basadas en fosfatos de calcio tienen mucho interés en el campo de los sustitutos óseos. El comportamiento *in vivo* de los implantes constituidos por fosfatos de calcio depende de varios factores: la relación Ca/P, la estructura cristalográfica y la porosidad. El buen comportamiento histológico de los fosfatos de calcio se esperaba debido a que la hidroxiapatita es el principal mineral constituyente de los huesos. Por esta razón este compuesto fue usado en el pasado para hacer implantes cerámicos en el hueso. Se produce una reacción bioquímica positiva en la interfase cerámica-hueso debido a la similitud de esta cerámica con la fracción mineral del hueso (56, 60).

Las cerámicas basadas en fosfatos de calcio han sido utilizadas en medicina desde hace más de tres décadas. Dependiendo de la aplicación, se utilizarán cerámicas bioactivas o bioabsorbibles, para lo cual se usarán diferentes fases de estas cerámicas de fosfato de calcio.

Las fases estables de estas biocerámicas dependen de la temperatura y de la presencia de agua, tanto durante el procesamiento como en el medio donde luego se utilizarán.

Existe una relación entre la proporción Ca/P, pH y solubilidad. Cuanto menor sea la relación Ca/P, el nivel de pH disminuirá y la solubilidad aumentará.

A la temperatura del cuerpo humano, sólo dos fosfatos de calcio son estables en contacto

con los fluidos corporales, a $\text{pH} < 4,2$ la fase estable es fosfato dicálcico dihidratado o brushita ($\text{Ca}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), mientras que a un $\text{pH} > 4,2$ la fase estable es hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Sin embargo, por razones cinéticas pueden precipitar más fácilmente otras fases como Fosfato octacálcico (OCP), con pH 5-7. Algunas fases se encuentran deshidratadas y se hidrolizan en presencia de los fluidos corporales a 37°C , transformándose así en hidroxiapatita (4, 8).

El comportamiento mecánico de las cerámicas de fosfato de calcio determina sus aplicaciones como implantes. La resistencia a tensión, a compresión y la fatiga dependen del volumen total de porosidad del material.

En general, las biocerámicas son utilizadas en clínica como gránulos o implantes pequeños que no tengan que soportar cargas.

B. Biovidrios

En el grupo de los materiales cerámicos tenemos las vitrocerámicas y los biovidrios.

Los biovidrios son cadenas silicofosfatadas que pueden enlazarse iónicamente con diferentes compuestos. A su vez, pueden intercambiar iones o grupos moleculares con el medio fisiológico donde se implantan, siendo así posible su osteointegración mediante unión química al hueso. Sus formas reabsorbibles se han empleado como vehículos de liberación de sustancias. Su capacidad de dar lugar a la formación de una capa de apatita hidroxicarbonatada activa idéntica a la fase mineral del hueso, los hace muy útiles en cuanto a su aplicación en la superficie de implantes óseos para facilitar su osteointegración (56, 60, 67, 100-105). Sus propiedades están directamente relacionadas con su composición, permitiendo así la creación de una gama de materiales con diferentes propiedades mecánicas y de disolución con intervalos que oscilan entre pocos días y varios meses (100-105).

Los biovidrios se dividen además en vidrios de base SiO_2 y vidrios de base P_2O_5 . Los biovidrios de silicio fueron desarrollados en los años 70 por Hench principalmente (106), y han demostrado ser altamente bioactivos, sin embargo su tasa de reabsorción resulta ser muy baja para algunas aplicaciones. Por otro lado, el desarrollo de los vidrios de fosfato para aplicaciones biomédicas, se remonta a principio de los años 80, cuando fueron introducidos por Burnie y Gilchrist (48). La composición de estos vidrios puede adaptarse a la de la fase mineral del hueso, y además presentan un amplio rango de velocidades de degradación, que puede ser modificado dependiendo de la composición química. Por lo tanto, es posible obtener vidrios con diferentes velocidades de disolución, según la aplicación requerida (4, 48).

Existen dos familias de compuestos de silicio con capacidad de unión directamente al hueso, los vidrios bioactivos y los iones de vidrio. Los vidrios bioactivos son duros, sólidos (no porosos), materiales que fueron descritos por primera vez en la década de 1970. Están formados por óxido de sodio, óxido de calcio, pentóxido de fósforo y dióxido de sílice. Las formas de dióxido de sílice (también llamado silicato) son el principal componente. Con variaciones de la proporción de óxido de sodio, óxido de calcio y dióxido de silicio, se pueden producir formas solubles *in vivo* (siendo la solubilidad proporcional al contenido en óxido de sodio) (107, 108).

Los compuestos de vidrios bioactivos son materiales de reciente interés, ya que tienen unas características elásticas superiores al resto de la familia de vidrios bioactivos. La

combinación más favorable es la de vidrio bioactivo con polímero de polisulfona. Este material se asemeja al hueso cortical y tiene una buena combinación de bioactividad, fuerza, resistencia a la fractura y módulo de elasticidad. La bioactividad es una medida de la velocidad de osteointegración. Los compuestos de vidrio bioactivo se están utilizando para cirugía de columna vertebral (109)

Tabla 2: Propiedades biomecánicas (108)

	Hueso esponjoso	Hueso cortical	HA	Biovidrio	Vidrio cerámico A/W	Biovidrio PS modificado
Bioactividad (A)	13	13	3	13	6	13
Resistencia a la fractura K _{Ic} (B)	0,1	6,0	1,0	0,6	2,0	1,2
Módulo de elasticidad GPa (C)	1	15	85	35	118	5
Fuerza de tensión MPa (D)	3	151	80	42	215	103
Índice de cualidad = (AxBxD)/C	4	500	3	9	20	303

HA: Hidroxiapatita; A/W Apatita-Wollastonita; PS: Polisulfona; K_{Ic}: resistencia a la fractura en deformación plana; GPa: Gigapascal (10^9 Pa); MPa: Megapascal (10^6 Pa); Pa: Pascal (unidad de presión)

Vidrios Bioactivos

Algunos vidrios con composiciones basadas en combinaciones de SiO₂-CaO-NaO-P₂O₅ han demostrado la formación de uniones con el hueso. La característica principal de estos materiales es que desarrollan en su superficie una capa biológicamente activa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) que proporciona la interfase de unión con el tejido. Estos materiales reaccionan en contacto con el medio formando un gel hidratado en la superficie rico en iones Ca y P. La cristalización de esta capa implica la formación de apatita y por lo tanto a la unión con el hueso. Por lo tanto, esta capa formada en la superficie del implante es similar tanto químicamente como estructuralmente a la fase mineral del hueso, y es por esto que se da la unión interfacial hueso-implante (8, 4).

Vidrios de Fosfato

Los vidrios de fosfato fueron desarrollados en el campo de la óptica, a principios del siglo XX por Brow y colaboradores (110), debido a su bajo índice de dispersión y alto índice de refracción en comparación con los vidrios de base silico.

Sin embargo, la baja estabilidad química de estos vidrios, inicialmente creados para el área de la óptica, llevó a una limitación en sus aplicaciones y a un retraso temporal en el desarrollo de los mismos.

En las últimas décadas, los vidrios de fosfato de calcio, se han estudiado ampliamente por su composición química, muy semejante a la de la fase mineral ósea y por su solubilidad,

que varía según la composición del vidrio (48). La elevada solubilidad de algunas composiciones, que fue la causa inicial del fracaso de este tipo de vidrios, es de gran interés en el campo biomédico, ya que otorga al material la propiedad de ser biodegradable, por lo que sirve de soporte en las primeras etapas del proceso de reparación ósea y disminuye sus propiedades mecánicas gradualmente mientras el tejido óseo se regenera. Debido a la solubilidad, este tipo de vidrios puede ser considerado como un material reabsorbible o biodegradable (4)

Estructura de los vidrios de Fosfato

Se define vidrio como material amorfo cuya estructura vítrea se produce uniendo los tetraedros de algún grupo iónico determinado para formar una estructura reticular no cristalina, es decir, no existe periodicidad alguna a largo alcance dentro de la red.

El óxido de Si (SiO_2) es el óxido formador de red más conocido. El P_2O_5 es también uno de los 4 óxidos formadores de vidrio clásicos propuestos por Zacharisen, que son: SiO_2 , GeO_2 , B_2O_3 y P_2O_5 . Tanto los vidrios de Si como los vidrios de fosfato están formados básicamente por configuraciones tetraédricas de fósforo (PO_4), que se unen por enlaces covalentes formando largas cadenas que implican a la formación de la red vítrea (4)

Propiedades

Las principales características de los biovidrios bioactivos son: excelente osteoconductibilidad y bioactividad, capacidad de liberar células, y una biodegradabilidad controlable. Estas propiedades convierten a los biovidrios en un sustituto óseo prometedor en la ingeniería de tejidos (56, 57, 60, 111-114). Se han usado múltiples técnicas para la fabricación de materiales porosos. La técnica de replicación es una de las más novedosas. Se ha usado para producir estructuras de cerámica porosa muy similares al hueso esponjoso. Recientemente Chen et al (111) han producido biovidrio 45S5 mediante esta técnica.

Existe una relación entre la diferente composición de los vidrios bioactivos y su capacidad de enlace al hueso, propuesta por Hench, delimitando unas propiedades determinadas de sus componentes que condicionan su bioactividad, reabsorción y su comportamiento más o menos inerte (8).

Figura 1: Esquema propuesto por Hench (8)

Los vidrios bioactivos tienen propiedades osteoinductoras y osteointegradoras. Existe una fuerte capacidad de unión mecánica entre vidrios bioactivos y hueso como resultado de

una capa rica en sílice que se forma en la superficie del vidrio bioactivo cuando se expone a soluciones acuosas fisiológicas. Dentro de este gel los iones de Ca^{2+} y PO_4^{2-} se combinan para formar cristales de hidroxiapatita similar al hueso, generando por lo tanto una unión química fuerte (107). Cuando se utilizan como un implante preformado tienen mayor fuerza mecánica comparado con los preparados de fosfato cálcico como la cerámica. Los bloques de vidrio bioactivo resisten las perforaciones y el moldeado, sin embargo, se pueden fracturar en el proceso. Como consecuencia, son difíciles de fijar al esqueleto. Se han utilizado con éxito como complemento de injerto óseo y solos en cirugía maxilofacial (115, 116). Su utilización en forma granular en zonas de descarga como relleno no proporciona ningún beneficio respecto otros materiales preformados, con la excepción de que se pueden reabsorber más fácilmente que las partículas de HA permitiendo por lo tanto una restauración más rápida del defecto óseo. Otra aplicación exitosa es como recubrimiento de implantes metálicos para aumentar su osteointegración (108, 117).

Una variación de los vidrios bioactivos son las cerámicas bioactivas. Las cerámicas bioactivas generalmente tienen mayor fuerza y mejores propiedades mecánicas que los vidrios bioactivos pero ambos tienen poca resistencia a la fractura en relación al hueso cortical. Las cerámicas bioactivas se han utilizado con éxito para prótesis vertebrales en el tratamiento de tumores, fracturas por aplastamiento e implantes en la cavidad orbitaria.

Para mejorar la resistencia a la fractura de los vidrios bioactivos y las cerámicas bioactivas se han probado dos métodos. Incorporar fibras de acero inoxidable dentro del biovidrio aumentando la resistencia a la flexión (de 42 MPa a 340 MPa), y la incorporación de partículas de cerámica (zirconio) en el vidrio cerámico de apatita-wollastonita (A/W) que aumenta la resistencia a la flexión (de 680 MPa a 703 MPa) y dureza (de 2,0 a 4,0). Pese al incremento de fuerza y dureza estos materiales tienen módulos de estabilidad muy superiores al hueso cortical (108).

Los biovidrios se pueden fabricar en forma de microesferas, fibras e implantes porosos. (118) Los biovidrios tienen una porosidad con interconexión de 10-500 μm y han demostrado ser buen soporte para cultivo de osteoblastos humanos primarios (82, 119). En otros estudios, implantes de biovidrio con poros entre 100 y 600 μm indujeron formación de hueso ectópico en perros (82, 120). Por otro lado biomateriales de fosfato cálcico con diferente porcentaje de porosidad (51%, 47% y 43%, generados disminuyendo el contenido en sílice) y una amplia distribución de los tamaños de los poros (100-300 μm) ayudaron a regenerar hueso en defectos femorales en conejos (121). Los andamios cuya composición era rica en sílice mostraron mayor reabsorción que los que tenían menor contenido en sílice. Esta fuerte capacidad osteogénica se atribuyó a su composición química (alto contenido en fosfatos) y no a diferencias en la porosidad. Las propiedades de los andamios vidrios y cerámicas amorfos se resumen en la tabla 2.

Tabla 3: Porosidad y tamaño de poros de vidrios utilizados en regeneración ósea (82)

<i>Material</i>	<i>Técnica de fabricación</i>	<i>Tamaño del poro (μm)</i>	<i>Porosidad (%)</i>
Vidrios	Aglomerado por calor	100-200	5
Biovidrio	Espuma	10-500	40
	Aglomerado por calor	100-600	
Vidrios cerámicos	Aglomerado por calor	100-200	
	Transformación	10-300	41, 47, 43

	de fase		
--	---------	--	--

POLÍMEROS REABSORBIBLES

GENERALIDADES

Los polímeros tienen muchas aplicaciones en el campo de la implantología médica gracias a que presentan propiedades físicas, químicas y mecánicas más cercanas a las de los tejidos vivos, que en su mayor parte están formados por polímeros naturales, como las proteínas y los polisacáridos. Además, son de fácil procesado y obtención.

Actualmente existen numerosos polímeros utilizados como implantes. Algunos de ellos son estables, y son utilizados para aplicaciones permanentes, como el polimetilmetacrilato (PMMA), o el polietileno (PE).

En la Figura 2 se describen los polímeros biodegradables de uso más generalizado.

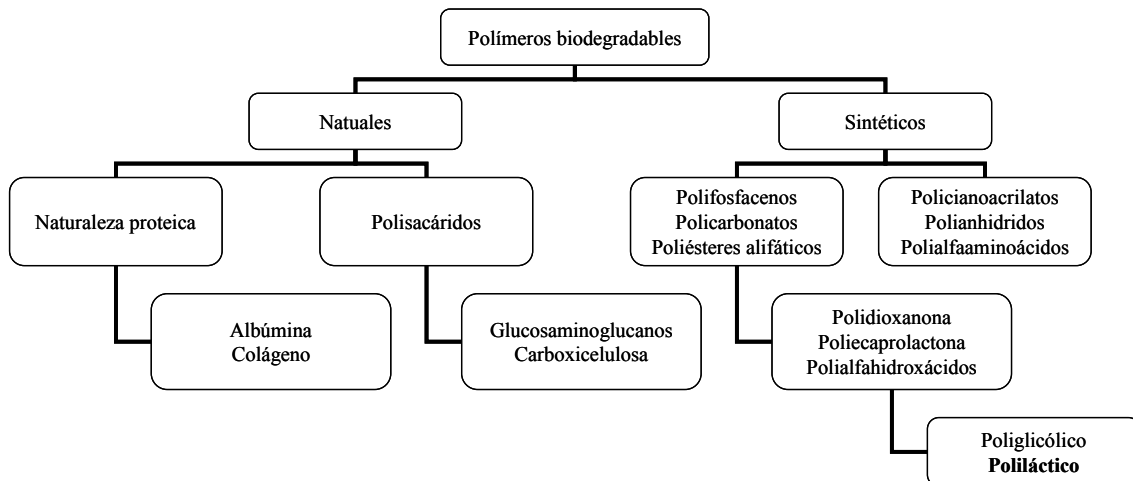


Figura 2: Polímeros biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas (82).

Los polímeros sintéticos se crearon hace aproximadamente 65 años. Desde entonces se han desarrollado un gran número de polímeros gracias a su gran variedad de composiciones y propiedades que cubren un amplio rango de aplicaciones tanto bioestables como biodegradables (4, 122).

Según el tipo de polímero y su constitución, estos materiales biodegradables pueden ser concebidos para proveer el soporte mecánico suficiente durante las primeras etapas de la reparación del hueso, mantener este soporte durante un período determinado y luego degradarse poco a poco.

El uso de implantes fabricados con polímeros se ha popularizado en los últimos años. Las razones de su empleo en Cirugía Ortopédica y Traumatología vienen determinadas por (2, 6, 56, 60):

- Evitar su extracción después de conseguir su objetivo.

- Permiten una transferencia gradual y progresiva de tensiones al hueso
- Son eliminados completamente del organismo, promoviendo el restablecimiento de los tejidos originales.
- Reducen el riesgo de migración posterior y las complicaciones a largo plazo relacionadas con la presencia de materiales extraños.

Los polímeros reabsorbibles utilizados en la fabricación de estos implantes han de tener las siguientes características (1, 123-126):

- Proporcionar resistencia y rigidez inicial, que se pierde a medida que avanza el proceso de reparación.
- Deben ser totalmente reabsorbibles, y los subproductos derivados de su degradación, preferentemente por hidrólisis, no deben ser tóxicos, teratógenos, mutágenos o carcinogénicos.
- Los monómeros deben ser hidrosolubles y su eliminación debe llevarse a cabo por vía renal y pulmonar.
- Deben permitir su esterilización sin pérdida de las propiedades anteriores.

Los polímeros reabsorbibles con los que se cuenta actualmente en el mercado son: ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polidioxanona, poligliconato y co-polímeros de los dos primeros. La investigación bioquímica ha desarrollado el diseño de poliésteres y polímeros de elevado peso molecular a partir de monómeros cíclicos, que permiten la fabricación de un implante según la resistencia y rigidez deseadas (2, 3, 6, 56, 60, 123, 127, 128).

Los polihidroxiácidos se han usado en durante los últimos treinta años para fabricar suturas reabsorbibles. El ácido glicólico es una sustancia que se produce en el metabolismo humano normal. Viene de la misma familia de los ácidos, como el ácido láctico (129).

El uso más extendido del ácido poliglicólico es la fabricación de hilo multifilamento reabsorbible, pero hay una gran variedad de productos que se pueden hacer con este material como tornillos, agujas, barras y mallas. Estos productos tienen un extenso número de aplicaciones desde la fijación interna de fracturas de muñeca y codo hasta la fijación de osteotomías. Estos productos tienen la ventaja de que se obtiene una buena fijación de la fractura y posteriormente son gradualmente reabsorbidos (129).

Los hilos multifilamento de ácido poliglicólico y ácido poliláctico se han sintetizado como liberadores de BMPs. Estos hilos tienen una tasa muy consistente y predecible de bioabsorción, lo que produce una liberación controlada de BMPs. En 1995, Robinson y cols describieron el uso de bloques de ácido poliglicólico poroso, con una estructura semejante a celdillas óseas, para reparar defectos óseos de cráneo (129). Los polihidroxiácidos no han demostrado proporcionar el soporte estructural necesario en zonas de carga como en acetábulo, fémur proximal y tibia proximal (129).

El poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) se ha usado como sustituto en la ingeniería de tejidos debido a sus propiedades físicas favorables. Sin embargo, la superficie química del PGLA no fomenta la adhesión y proliferación celular debido a su naturaleza hidrofóbica (130, 131). Lee y cols (131) han creado compuestos de PLGA y matriz de submucosa de vejiga porcina (BSM) y han estudiado su comportamiento *in vitro* añadiendo células madre embrionarias humanas y osteoblastos de origen bovino.

La esterilización de los implantes reabsorbibles se realiza mediante radiación, con riesgo de pérdida de sus propiedades biomecánicas en esterilizaciones repetidas, o mediante esterilización con óxido de etileno, que puede acompañarse de reacciones

químicas entre el gas residual presente en el material esterilizado y las propiedades tisulares (3, 125, 127). Se ha demostrado en diferentes estudios experimentales, la pérdida total de la capacidad de osteoinducción de determinados implantes tras la esterilización con óxido de etileno (56, 60, 132-134).

El medio del cuerpo humano es hostil y todos los polímeros inician su deterioro tan pronto como son implantados. La causa más probable de ese deterioro es el ataque iónico (especialmente OH-) y el oxígeno disuelto, junto con la degradación enzimática en el caso de materiales poliméricos naturales como el colágeno reconstituido (3, 135). El proceso de reabsorción *in vivo* de este tipo de implantes sigue tres fases, cuya duración está en relación directa con la composición del polímero empleado, su morfología y pureza, lugar de implantación y solitud mecánica (1, 56, 60, 123, 135, 136):

- Fase I: pérdida progresiva de la resistencia del implante por reducción de su peso molecular. En esta fase tiene lugar una respuesta a cuerpo extraño por parte del organismo receptor, con fragmentación del implante y pérdida de su resistencia mecánica.
- Fase II: pérdida progresiva de masa del implante por su hidrólisis metabólica. Se mantiene la respuesta a cuerpo extraño, con pérdida progresiva de la morfología inicial del implante.
- Fase III: eliminación del implante y sustitución del mismo por tejido óseo y/o conjuntivo.

La reabsorción de los implantes se ha relacionado con efectos clínicos adversos derivados de la reacción a cuerpo extraño como enrojecimiento cutáneo en el lugar de implantación, dolor, hinchazón local y drenaje de fragmentos del implante a través de orificios cutáneos (123, 137-140). Estos fenómenos están relacionados con el acúmulo local de productos de degradación del implante y con la capacidad de los tejidos circundantes de eliminar dichos residuos (136, 140).

Se ha comprobado en la clínica humana que la población tisular más numerosa en los exudados que drenan espontáneamente son linfocitos, con una menor proporción de monocitos, y ausencia de neutrófilos dada la esterilidad del drenaje de etiología no infecciosa (68). Para Santavirta y cols (141), la escasez de elementos fagocíticos mononucleares hace sospechar una reacción inmunológica mediada por linfocitos contra el implante.

Otros autores, en el campo experimental, consideran que se trata de una respuesta inflamatoria no específica con invasión de macrófagos, células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño, neutrófilos y leucocitos polimorfonucleares (140, 142, 143). Dicha respuesta inflamatoria tiene su traducción radiográfica en los fenómenos de osteólisis periférica a los implantes, observados tanto en el campo experimental (4, 140, 143) como en la clínica humana (137, 144, 145).

La gran mayoría de los andamios desarrollados para aplicaciones en el campo de la Ingeniería de Tejidos está constituida por estructuras elaboradas a partir de materiales poliméricos.

Los polímeros sintéticos bioabsorbibles con capacidad de degradarse gracias a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo y eliminarse completamente por vías metabólicas, son los materiales más atractivos para la elaboración de andamios en Ingeniería de Tejidos. Los andamios elaborados a partir de este tipo de polímeros ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales dejando de lado

los problemas de infección y formación de tejido fibroso, asociados a los implantes permanentes.

A pesar de que actualmente existen diferentes polímeros biodegradables para el desarrollo de estos andamios (Tabla 4), el PLA, el PGA y sus copolímeros, continúan siendo los más populares y de mayor uso.

Tabla 4: Polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en Ingeniería de Tejidos (4, 146)

Polímero	Aplicaciones
PLA-PGA	Hueso, Cartílago
Polianhídridos	Hueso, Liberación controlada de fármacos
Poliortoéster	Liberación controlada de fármacos
Policaprolactona	Dispositivos biodegradables de fijación
Policarbonato	Hueso, dispositivos de fijación, liberación controlada de fármacos
Polifumarato	Hueso

Las estructuras poliméricas porosas pueden ser obtenidas a través de numerosos métodos. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio. Algunas de las técnicas utilizadas hoy en día para la fabricación de andamios porosos son (4):

- Gel Casting
- Disolución y colada con liberación de partículas
- Laminación de membranas
- Separación de fases
- Saturación con gas
- Espumado con alta presión y liberación de partículas
- Liofilización
- Unión de fibras
- Impresión tridimensional

Existen tres razones principalmente por las que la adición de una fase inorgánica en una matriz polimérica resulta interesante en un substrato para Ingeniería de Tejidos. En primer lugar, la incorporación de esta segunda fase modifica el comportamiento mecánico del material, así como la integridad estructural del andamio. En segundo lugar, la bioactividad del polímero aumenta debido a la incorporación de una fase bioactiva. En tercer lugar, la introducción de la fase inorgánica podría modificar de forma positiva el patrón de degradación del polímero. En la Tabla 5 se encuentran tabulados algunos de los compuestos para Ingeniería de Tejidos elaborados hasta este momento. Se puede observar que la mayoría de estos compuestos contienen TCP, HA o vidrio de silicio bioactivo como fase de refuerzo o bioactiva; sin embargo, en ninguno se utilizan vidrios de fosfato de calcio.

Tabla 5: Materiales compuestos desarrollados hasta el momento (4)

Matriz polimérica	Fase de refuerzo
PCL	HA
PLLA	HA
PLA	Bioglass
Quitosano	TCP, vidrio de fosfato de calcio

PGA	Apatita carbonatada
PLLA	TCP
PDLA	Bioglass
PLLA	Nano HA
Colágeno/PLLA	Nano HA
PLA/PGA	Nitrato de calcio tetrahidratado+amoniohidrógeno fosfato

Los estudios realizados en la primera mitad del siglo XX sobre los polímeros sintetizados a partir del ácido glicólico y otros hidroxiaácidos, fueron abandonados temporalmente debido a que los polímeros resultantes eran muy inestables para aplicaciones industriales que requerían materiales estables a largo plazo. Sin embargo, paradójicamente, esta inestabilidad ha demostrado durante las tres últimas décadas ser de gran utilidad en aplicaciones médicas.

ESTRUCTURA DE LOS POLÍMEROS SINTÉTICOS

La versatilidad de la síntesis química de los polímeros sintéticos permite la fabricación de andamios con diferentes características (forma, porosidad y tamaño del poro, rango de degradación, propiedades mecánicas) para conseguir aplicaciones específicas. Hu y cols (147) estudiaron el efecto de los parámetros de fabricación en las propiedades de los polímeros sintéticos. Bajando la temperatura de la solución consiguieron menor tamaño de poros, pero no afectó a la porosidad. Aumentando la solución de polímero, disminuyeron el tamaño de los poros y la porosidad. Dos tipos de estos andamios, el poli(D,L-láctico) (118 μm de tamaño de poros de media y 92% de porosidad) y poli(láctico-co-glicólico) (78 μm de tamaño de poros de media y 90% de porosidad), fueron estudiados in vitro y funcionaron adecuadamente como soporte para proliferación y diferenciación de precursores celulares.

Microtransportadores huecos con poli(láctico-co-glicólico) fueron sintetizados en andamios porosos con una media de poros de 187 μm y 31% de porosidad (148) ha sido además utilizado en cultivo de osteoprogenitores humanos en andamios con 200 μm de tamaño de poros (149) y para fabricar implantes dentales con un 65% de porosidad y una media de poros de 100 μm . El electrospinning es una técnica prometedora para fabricar andamios altamente porosos, y se han conseguido estructuras de poli(láctico-co-glicólico) de 92% de porosidad; con un tamaño de 2-465 μm (150).

Otro polímero que se ha aplicado en la regeneración ósea es el poli(propileno fumarato) utilizado como andamio con 70% de porosidad y 300-500 de tamaño de poros para liberación de TGF- β 1 e implantación en defectos de cráneos en conejos (151). Este polímero se ha utilizado en defectos de tibias en ratas con y sin autoinjerto, y la adición de autoinjerto dio lugar a mayor formación de hueso, aunque el porcentaje de autoinjerto (75 y 25%) no afectó al crecimiento óseo dentro del implante. (82)

Taboas y cols (152) crearon variedades de andamio puro y compuesto controlando la porosidad, tamaño del poro, geometría, unión de los poros, conectividad de los poros y orientación de los poros. Lograron preparar andamios de poli(láctico) con canales de 600 μm (poros globales) y conexiones de 50-100 μm (poros locales), compuestos de poli(láctico) y poli(glicólico) con 800 μm de poros globales o poli(láctico) e hidroxiapatita con 600 y 500 μm de poros globales, respectivamente, y andamios de poli(láctico) con

arquitectura compleja que mimetizan el hueso humano trabecular.

A continuación profundizaremos un poco más en el polímero obtenido a partir del ácido láctico ya que éste será el polímero utilizado en este estudio.

ACIDO POLILÁCTICO (PLA)

Los polímeros obtenidos a partir del ácido poliglicólico (PGA) y del ácido poliláctico (PLA) son los primeros polímeros biodegradables desarrollados y los más frecuentemente utilizados en cirugía, comenzando con las suturas biodegradables que fueron aprobadas en 1960. Desde entonces se han desarrollado numerosos dispositivos basados en PGA y PLA, además de otros materiales, como la polidioxanona, politrimetilen-carbonato, los polianhídridos y los poliortoésteres.

El ácido poliláctico es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares (4).

Se obtiene mediante polimerización por apertura de anillo del dímero cíclico del ácido láctico. El monómero tiene un carbono asimétrico por lo que es factible preparar polímeros con diferentes tacticidades.

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. 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 (153).

Isomerismo Óptico

Existen dos formas estereoisómeras de ácido poliláctico que dan lugar a cuatro polímeros morfológicamente diferentes: dos polímeros estereorregulares, D-PLA y L-PLA, la forma racémica D,L-PLA y una cuarta forma morfológica, meso-PLA, que se usa muy poco en la práctica.

El isomerismo óptico del ácido láctico tiene una importante influencia sobre el metabolismo del monómero y las propiedades del polímero resultante. Este tipo de isomerismo se produce porque uno de los átomos de carbono, el centro asimétrico, tiene cuatro grupos diferentes unidos a él y por lo tanto no son superponibles en su imagen especular.

El ácido láctico D y el L son física y químicamente idénticos, salvo que uno rota a la derecha, D, dextrorrotación y el otro a la izquierda, L, levorotación (4).

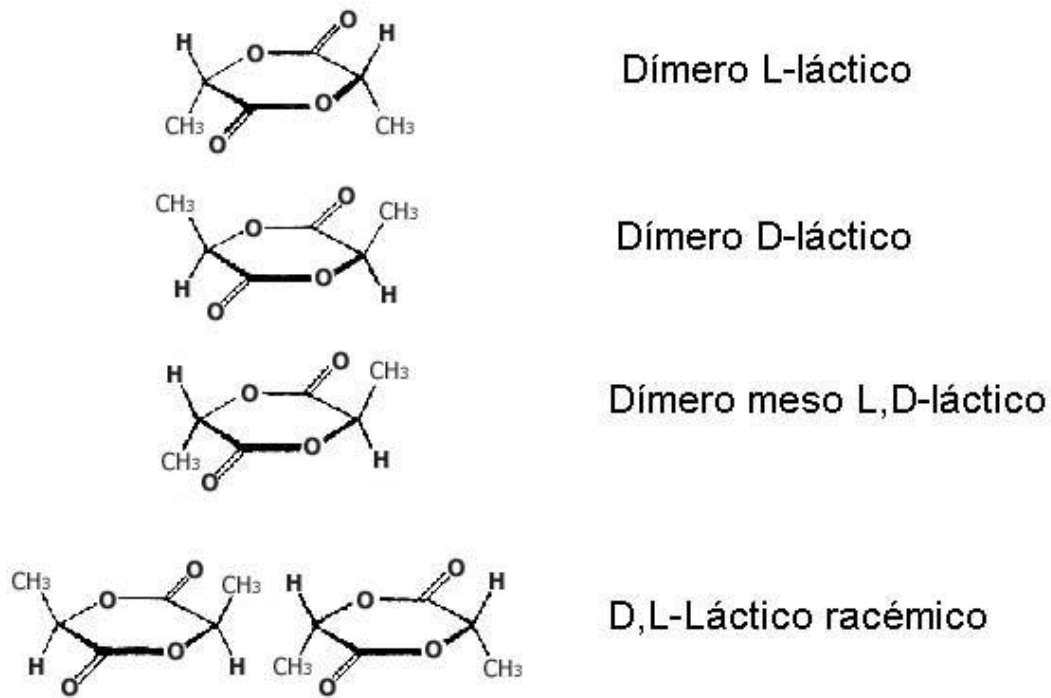


Figura 3: Esteroisómeros del ácido láctico (4).

El homopolímero derivado del monómero natural L-láctico (L-PLA) presenta un elevado grado de cristalinidad (37%) debido a su estereorregularidad.

El material tiene alta tensión y baja elongación lo que se traduce en un elevado módulo de Young. El polímero es muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y las fijaciones ortopédicas.

Sus características térmicas están definidas por un elevado punto de fusión (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea de 60-65°C (100).

El D-L-poliláctico es un polímero amorfo ya que está constituido por las dos formas isoméricas (D-L) del ácido láctico. En este caso el polímero tiene baja resistencia a la tensión, alta elongación y una elevada velocidad de degradación que hace que sea un material muy atractivo para los sistemas de liberación de fármacos. Se preparan también copolímeros de L-PLA y D,L-PLA para disminuir la cristalinidad del polímero y acelerar el proceso de degradación. (153)

Propiedades

Los polímeros pueden ser semicristalinos o amorfos.

En los polímeros semicristalinos las cadenas se distribuyen formando regiones ordenadas más densas llamadas dominios cristalinos, que actúan como enlaces cruzados que confieren al polímero una resistencia a la tracción mayor y un módulo elástico más elevado, ya que le provee una mayor rigidez que el polímero amorfo.

Los polímeros derivados de los monómeros D y L del ácido poliláctico son semicristalinos, mientras que el D,L-PLA es amorfo. Las diferencias de cristalinidad de D,L-PLA y L-PLA tienen importantes implicaciones tanto en las propiedades mecánicas y en el tiempo de degradación del polímero.

Tanto las zonas amorfas del D y el L-PLA como el D,L-PLA presentan una Tg (temperatura de transición vítrea) determinada. Por debajo de la Tg el polímero se comporta más como un sólido vítreo y por encima tiene un comportamiento de tipo gomoso. La Tg es un parámetro que influye en el comportamiento final del material, un polímero con una Tg cercana a la temperatura corporal es más dúctil al ser implantado que a la temperatura ambiente. Por otro lado, tenemos la influencia del peso molecular, puede variar considerablemente con algunos métodos de procesado y esterilización. Todas estas propiedades pueden afectar tanto las propiedades mecánicas del material como el tiempo de degradación del implante. Aunque las propiedades de estos materiales son altamente dependientes del peso molecular, la tabla 6 muestra algunas de sus propiedades en general.

Material	Tm(°C)	Tg(°C)	E(GPa)	Tiempo degradación (meses)
L-PLA	173-178	60-65	2,7	>24
DL-PLA	Amorfo	55-60	1,9	12-16
Hueso			10-20	
Acero			210	

Tabla 6: Algunas propiedades del ácido poliláctico en comparación con el acero y el hueso cortical (4). Tm (°C): temperatura de transición vítrea en grados centígrados; Tg(°C): temperatura media de fusión en grados centígrados; E(GPa): módulo elástico en Gigapascales.

Biocompatibilidad

El ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo.

El PLA se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación conlleva a la liberación de sus respectivos monómeros de ácido láctico. Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica.

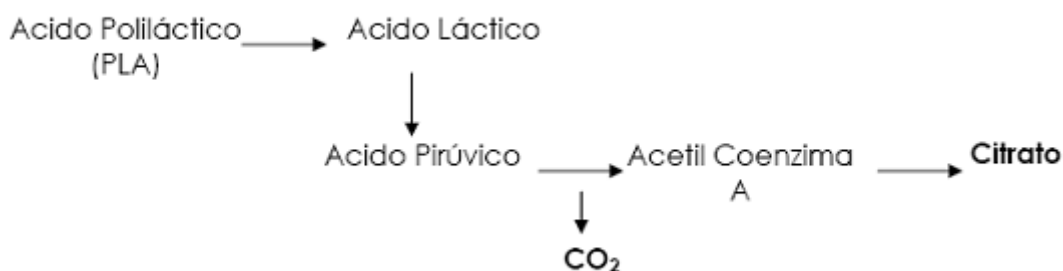


Figura 4: Esquema simplificado de la degradación del PLA por el metabolismo (4, 154)

La ruta metabólica del ácido láctico comienza con la transformación de lactato a piruvato por la acción de la enzima lactato dehidrogenasa. El piruvato sufre una descarboxilación oxidativa para producir Acetilcoenzima A (Figura 4). Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido cítrico (o del ácido tricarbóxico), el cual se lleva a cabo a nivel mitocondrial obteniéndose como resultado ATP por fosforilación oxidativa más agua y dióxido de carbono, los cuales son eliminados en la respiración y excretados por los riñones

ACIDO POLILÁCTICO-POLIGLICÓLICO

Los polímeros de ácido poliláctico y poliglicólico se han constituido en diferentes proporciones que muestran distintos tiempos de reabsorción que pueden oscilar entre 2 y 6 meses como se muestra en el artículo de Hutmacher (155) cuyos resultados resumimos a continuación:

- D,L-Láctico y poliglicólico (50:50), de 2 a 3 meses
- Poliglicólico, de 3 a 4 meses
- D,L-láctico y poliglicólico (85:15), de 2 a 4 meses
- Poli (D,L-láctico), de 4 a 6 meses
- Poli (L-láctico), de 18 a 36 meses

Se ha estudiado la respuesta ósea a este biomaterial con diferentes proporciones de los ácidos láctico y glicólico después de su implantación en tejido de rata (156). En este estudio se emplearon los polímeros de síntesis (Phusis®, Le Versoud, Francia) constituidos por los ácidos láctico y glicólico en distintas proporciones:

- Láctico en un 85% y glicólico en un 15% (PLA85 GA15)
- Láctico en un 80% y glicólico en un 20% (PLA80 GA20)
- Láctico en un 75% y glicólico en un 25% (PLA75 GA25)

Los cambios observados en el hueso receptor de los polímeros durante el tiempo que duró el experimento se pueden dividir en una serie de fases bastante bien individualizadas:

1. Degradación e involución ósea.
2. Fase de reparación.
3. Fase de invasión.
4. Fase de sustitución.
5. Formación de hueso maduro.

1. Degradación e involución ósea:

Comprende las dos primeras semanas para cualquiera de los compuestos estudiados, debiéndose al efecto lesivo del acto quirúrgico. Se observa una desestructuración del tejido óseo que rodea al biomaterial, con trabéculas rotas, en degeneración con núcleos más densos y picnóticos. Los haces de fibras colágenas aparecen desestructuradas. Posteriormente comienzan a formarse trabéculas jóvenes que progresivamente se van cargando de un material osteógeno.

2. Fase de reparación:

Se forma un tejido osteoide inmaduro en las áreas más próximas al hueso constituido por abundante sustancia intercelular de aspecto fibrilar y escasas células.

3. Fase de invasión:

Hacia la semana 18 se observan soluciones de continuidad en el cerco óseo que rodea al polímero por las que penetran vasos. Entre las semanas 22 a 28 se observa una paulatina conversión del tejido fibroso en osteoide que comienza progresivamente a calcificarse.

4. Fase de sustitución:

La sustitución del polímero por hueso se realiza a partir de los vasos que han invadido el espesor del mismo en los polímeros (PLA 85 PG15). En los compuestos con mayor contenido en glicólico la sustitución se realiza de manera centrípeta: según va desapareciendo el biomaterial por degradación o fagocitosis, el tejido fibroso que lo delimita va ocupando los espacios.

5. Formación de hueso maduro:

Aparecen trabéculas más numerosas cuyos huecos son invadidos por médula que no se diferencian en nada de las trabéculas restantes.

APLICACIONES BIOMEDICAS

Debido a sus propiedades biológicas y mecánicas los polímeros de ácido poliláctico o los copolímeros PLA y PG tienen desde hace varios años aplicaciones terapéuticas muy diversas que dan testimonio de su biocompatibilidad y de sus propiedades reabsorbibles, así como de su ausencia de toxicidad. A continuación vamos a detallar algunas de las aplicaciones de estos polímeros en el campo de la medicina.

Como **material de sutura absorbible**

Ésta fue la primera aplicación de los polímeros destacando su importancia en cirugía oftalmológica, toracoabdominal y anastomosis neurológicas. Son bien tolerados y se degradan progresivamente después de la cicatrización.

En **Cirugía Ortognática**:

Durante años, la fijación ósea se ha realizado exclusivamente mediante miniplacas y tornillos metálicos de titanio que, debido a su permanencia a lo largo del tiempo, pueden dar lugar a problemas como:

- Infecciones tardías o atrofiás óseas subyacentes
- Artefactos en resonancia magnéticas o en tratamientos radioterápicos
- Corrosión, palpación y movilización.
- Alergias y sensibilidad al frío.
- Interferencias con el desarrollo óseo y migración intracraneal en niños.
- Potencial tóxico o cardiogénico.

Con la aparición de los modernos sistemas de osteosíntesis, primero metálicos y luego reabsorbibles, y las modernas técnicas de diagnóstico por imagen con reconstrucciones tridimensionales (TAC, RMN) se han simplificado de forma notable la planificación de los abordajes y las diferentes osteotomías a realizar. La estabilización y osteosíntesis de los fragmentos osteotomizados mejora y acorta el periodo de reosificación, disminuyendo en parte los problemas enumerados anteriormente.

Los modernos sistemas de osteosíntesis reabsorbible han superado en gran medida, pero no de forma absoluta, los problemas de restricción del crecimiento craneal (5-8%) y la migración que sufrían las mini o microplacas de titanio utilizadas durante la pasada década, sobre todo en pacientes con craneosinostosis sindrómicas y de forma más acentuada en la

región temporal (157). Por el contrario, estos nuevos materiales presentan un elevado coste junto con la posibilidad de provocar reacciones inflamatorias y edemas locales de dilatada evolución.

Las placas y tornillos absorbibles empleados en cirugía craneofacial están compuestos generalmente de polímeros de los ácidos láctico y glicólico. Existen en el mercado diversos sistemas con diferentes tiempos de reabsorción in vivo, mezclas generalmente de unos y otros polímeros, generalmente de ácido L o D-Láctico. Hay más de 30 años de experiencia con el uso del ácido láctico en cirugía ortopédica, con indicaciones limitadas pero buenos resultados.

En general, la mayor o menor rapidez en la pérdida de propiedades biomecánicas de estos materiales y, en último término la reabsorción de los mismos dependen de distintos factores (153):

- Peso molecular del polímero
- Estructura:
 - Amorfa o cristalina: el amorfo presenta mayor velocidad de degradación.
 - Macro o microestructura:

Microestructura: los derivados L tienen un tiempo de degradación más largo que los derivados DL.

Macroestructura: El proceso de reforzamiento de algunos sistemas como el Biosorb® (Bionx) aumenta el periodo de degradación.

- Disponibilidad de agua.
- Tamaño y geometría del material.
- Otros: pH del medio temperatura, etc.

En realidad, la pérdida de resistencia mecánica de un implante absorbible determinado, o su tiempo de reabsorción completa, dista de ser fácilmente estandarizable. Parece indicado utilizar sistemas de corto periodo de reabsorción para procedimientos quirúrgicos en bebés de pocos meses de edad (menos de un año).

Romance y cols estudiaron dos sistemas de osteosíntesis absorbibles, Lactosorb® en 63 pacientes y Biosorb® en 4 pacientes, durante 1997-1999. Los resultados en términos de estabilidad conseguida y bajo índice de complicaciones fueron altamente satisfactorios (158).

Sailer y cols (159) mostraron su experiencia en 21 pacientes pediátricos en los que se emplearon como material de osteosíntesis polímeros reforzados de PDLLA y PLA/PGA tanto extra como intracranealmente. Según los investigadores no hubo ningún caso que mostrase intolerancia al material, ni infecciones ni desplazamientos del mismo. Destacan la estabilidad del material, comparable a la que ofrecen las clásicas miniplacas de titanio. El tiempo de reabsorción estimado para PDLLA estaba entre uno y dos años mientras que para PLA/PGA era menor de un año.

Lades y Kriener (160) han publicado un artículo en el que exponen su experiencia al tratar a doce pacientes con fracturas mandibulares, cuatro de ellos con el sistema de fijación absorbible MacroSorb® (Macropore) y ocho con PolyMax® (Synthes). Ambos sistemas están compuestos por 70.30 L/DL ácido poliláctico de estructura amorfa. Un caso se complicó con una osteomielitis que ocasionó pérdida de parte del cuerpo de la mandíbula y en otro caso no se unió la fractura. El resto de los pacientes no presentaron ningún caso clínico o radiológico de dislocación, pseudoartrosis o rotura de las miniplacas.

De las 22 miniplacas colocadas se expusieron dos de ellas pero no causaron ningún signo de infección local en los tejidos blandos. Salvo en los dos casos nombrados anteriormente se apreciaba consolidación ósea entre los fragmentos a los tres meses de la intervención. Para estos autores, estas miniplacas absorbibles son fáciles de manejar y adaptar por su diámetro de 2 mm y son buenos sistemas para proporcionar estabilidad en la osteosíntesis mandibular.

Estos mismos autores (161) publicaron unos meses más tarde un estudio de 18 pacientes, 6 de ellos intervenidos con el sistema de fijación absorbible MacroSorb® (Macropore) y 12 con PolyMax® (Synthes). 10 pacientes no presentaron problemas y la fijación resultó estable. Dos pacientes presentaron reacción a cuerpo extraño a los 3 y 4 meses de la intervención, a 4 pacientes se les fracturaron las miniplacas y en otros 2 hubo colapso mandibular.

Chamorro Pons y cols (162) publicaron un artículo en el que trataron 5 casos de cirugía ortognática fijando el maxilar superior mediante miniplacas y tornillos absorbibles con el sistema Polimax ® (Stratec Medical-Synthes). Este material está compuesto por poli-L/DL-láctico en proporción 70:30 como ya se expuso anteriormente, lo que asegura un proceso de degradación a las 8 semanas del 32%, a los 6 meses del 70% y a los 2 años del 100%. Este sistema presenta un diseño más ergonómico (bajo perfil, cabezas de los tornillos encastradas) y un instrumental de reducidas dimensiones que ha demostrado en su test de marcado tanto en Estados Unidos como en nuestro país su avanzada tecnología y calidad. La fijación del maxilar superior fue adecuada en 4 de los 5 casos, por lo que tuvieron que reintervenir al paciente colocando dos miniplacas de titanio como refuerzo. A pesar de haber obtenido unos buenos resultados al año, no recomiendan el empleo de este material en grandes avances o rotaciones importantes, recomendando en estas situaciones asociar un método de fijación adicional fácil de retirar como los alambres circuncingomáticos.

Existen pocas publicaciones que reporten las expectativas en cuanto a la fijación de cirugía ortognática bimaxilar con series de pacientes y un control de la evolución razonables que permitan hacer un juicio de la efectividad en la estabilidad ósea y determinar si se presenta alguna reacción tisular. El estudio más representativo que hemos encontrado sería el de Ashmmakhi y cols. (163) quienes utilizaron miniplacas y tornillos del sistema Biosorb® (copolímero de ácido poliláctico y poliglicólico 80:20 reforzado) en 161 niños y 4 adultos con un periodo de observación de 3 años y medio. Durante la cirugía el manejo de este sistema no presentó complicaciones aunque los autores refieren que la técnica fue más dificultosa que la empleada con las placas tradicionales de titanio y proporcionó fijación estable en todos los casos salvo en 2. Ocurrieron complicaciones postoperatorias en 12 pacientes, es decir, en el 7,3% de los casos pero que no interfirieron en el resultado final de la corrección quirúrgica.

Otro estudio mucho menos representativo que el anterior en cuanto a fijación ósea en osteotomías bimaxilares sería el publicado por Edwards y cols. (164) quienes trataron a 20 pacientes usando miniplacas y tornillos de ácido poliláctico-poliglicólico sin encontrar problemas ni de infección o dehiscencia, ni de inestabilidad ni de maloclusión durante los 12 o 25 meses que duró el seguimiento postoperatorio. A pesar de tan buenos resultados estos autores destacan el hecho de que la media de avance maxilar fue de 5,5mm y la de avance mandibular de 5mm con lo que la efectividad de este tratamiento con material absorbible no se puede extrapolar a movimientos más extensos.

Debido a que un dispositivo de fijación absorbible tiene menor fuerza que su

contraparte metálica de similar tamaño y volumen, es pertinente considerar a este tipo de material como de fijación interna semirrígida que permite algo de flexión del material en mínimo grado y microdesplazamientos de los segmentos óseos. Estos hallazgos clínicos y características del material parecen permitir el ajuste ortodóncico temprano y detallar la oclusión dental. La fijación interna semirrígida permite incrementar las fuerzas de carga que serán transmitidas al hueso, permitiendo igualmente un mejor acomodo de la articulación temporomandibular (153).

En cirugía orbitaria:

Se emplea en forma de materiales termoplásticos que son moldeables con temperatura, la cual se logra con solución de cloruro polivinílico de cloruro de calcio que se comercializa en una bolsa térmica.

Se ha publicado un trabajo (153) que evaluaba el comportamiento de un copolímero de degradación intermedia, amorfo, formado por ácido poliglicólico (PGA) en un 18% y ácido poli-L-láctico en un 82% llamado Lactosorb®. Los autores lo emplearon en 12 pacientes, 2 casos pediátricos y 10 adultos jóvenes con fracturas orbito-malares y tipo Blow Out. Este material en forma de placas y tornillos proporcionó una fijación y estabilización satisfactoria. Las ventajas e inconvenientes encontrados por estos autores a los copolímeros absorbibles son:

Ventajas:

1. No producen migración intraósea, con la consecuente reoperación para su extracción, como en el caso del titanio.
2. No transmiten sensación térmica como los metales.
3. Los copolímeros se reabsorben en un plazo que varía entre 10-15 meses.
4. Al no ser metales, no interfieren con estudios como la Tomografía Axial Computerizada (TAC), las Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o la Radioterapia.
5. No sufren deslizamientos una vez fijados.

Como inconvenientes cabe destacar que no resuelven el enoftalmus preoperatorio porque no reponen volumen.

Existe algún estudio en el que incluso 5 años después de la colocación del ácido poliláctico (PLA) para reconstrucción del suelo de la órbita éste no había completado su reabsorción (165).

Fernández Sanromán y cols. (165) publicaron un artículo en el que presentaban los resultados obtenidos en el tratamiento de 8 pacientes con defectos menores de 3 cm del suelo de la órbita secundarios a fracturas del complejo órbita-zigomático tratados con láminas de Vicryl® (polyglactin 910). Ninguno de los pacientes presentó complicaciones postoperatorias como infección local, migración o extrusión del implante. Se apreció una adecuada reducción de la fractura ósea en todos los casos salvo en uno, en el que la TC constató una inadecuada restitución del volumen orbitario existiendo un aumento del mismo con enoftalmus secundario. Estos autores sugieren que las láminas de Vicryl® pueden ser una buena opción en la reconstrucción de defectos pequeños o moderados del suelo de la órbita. En los casos de grandes defectos, fracturas conminutas o pérdida de volumen infraorbitario son necesarios otros materiales con mayor rigidez y que aporten volumen para la reconstrucción del suelo de la órbita, quizás el uso de autoinjertos junto con los nuevos biomateriales pueden ser las mejores opciones.

En Farmacología:

Los polímeros de ácido láctico y glicólico que constituyen las microesferas permiten modificar ciertos parámetros cinéticos y la bio-distribución de las moléculas transportadas lo que se traduce en una administración selectiva y controlada del fármaco, particularmente en el tratamiento del cáncer, afecciones de la piel, mucosa y enfermedades infecciosas (166).

Estas formulaciones de liberación prolongada pueden ser administradas por vía oral, parenteral, o en contacto de los tejidos. Un fármaco en el seno de una matriz de polímero absorbible asegura la protección del principio activo y su liberación progresiva y controlada, a medida que se hidroliza el polímero.

En Dermatología:

El ácido glicólico es un alfa-hidroxiácido frecuentemente prescrito por dermatólogos y cirujanos plásticos. Se le denomina también como ácido hidroxiacético y como ácido 2-hidroxietanoico. Se puede obtener de forma natural de la caña de azúcar.

Debido a su acción exfoliante actúa sobre la piel como humectante, queratoplástico o queratolítico dependiendo de las propiedades utilizadas, el tiempo de exposición y el vehículo empleado.

Algunos estudios han tratado de evaluar cualitativa y cuantitativamente a nivel histológico los efectos del ácido glicólico sobre la piel de la cara. Para ello emplearon cuatro tratamientos: ácido glicólico 35% y 50% con 3 y 6 aplicaciones cada uno. Estos resultados permitieron comprobar que el ácido glicólico mejoraba las arrugas finas de la piel facial humana, recomendándose el tratamiento de ácido glicólico al 35% con 6 aplicaciones como el más adecuado (167).

El ácido glicólico disminuye el pH de la zona tratada, lo que promueve la movilización de agua desde la dermis a la capa córnea. Esta capacidad de hidratación favorece la remoción del estrato córneo (167).

Durante muchos años la principal función de los ácidos era ajustar el pH del producto para su aplicación en piel aunque también se han empleado para el tratamiento de diversas alteraciones relacionadas con anomalías de la queratinización como: ictiocitosis, hiperqueratosis y acné y para el tratamiento de lesiones hiperpigmentadas de la piel como: melasma, léntigo solar, efélides y discromías (167).

El tratamiento con ácido glicólico promueve la reducción de los signos del envejecimiento cutáneo. Estos beneficios se atribuyen a un incremento en la proliferación celular y a la activación funcional de los fibroblastos en la síntesis de colágeno (167)

La investigación bioquímica ha desarrollado el diseño de poliésteres y polímeros de elevado peso molecular a partir de monómeros cíclicos, lo que permite la fabricación del material según la resistencia y rigidez deseadas (168).

La esterilización de estos materiales absorbibles se realiza mediante radiación, con riesgo de pérdida de sus propiedades biomecánicas en esterilizaciones repetidas, o mediante óxido de etileno demostrándose en diferentes estudios experimentales la pérdida

de la capacidad de osteoinducción de determinados materiales tras la esterilización con óxido de etileno (132, 133).

En Odontología:

La Periodoncia fue una de las ramas pioneras de la Odontología en la búsqueda de recuperar aquellos tejidos perdidos por procesos patológicos. Tiene como objetivo reparar en forma predecible el aparato de inserción de los dientes que muestran pérdida de tejido conectivo de soporte y hueso alveolar por causa de periodontitis.

Desde principios de la década de los años ochenta se han investigado diversos biomateriales que han ampliado el espectro de posibilidades a la hora de tratar una lesión periodontal. El estudio de estos materiales aplicados a la cicatrización de las heridas ha derivado en la modalidad denominada regeneración tisular guiada (RTG). Esta técnica no se conforma con mejorar las condiciones biológicas y restablecer la salud mediante la re inserción de fibras sobre la superficie radicular tratada, sino que avanza hacia la recuperación de los tejidos perdidos.

La RTG se basa en la colocación de membranas por debajo de los colgajos mucoperiósticos para proteger el coágulo, favorecer la generación de un espacio y excluir las células que provienen del epitelio gingival y el tejido conectivo.

Hasta hace unos años, las membranas utilizadas eran de materiales no reabsorbibles, como Gore-Tex, que aunque han demostrado su eficacia, conllevan una serie de inconvenientes como son la necesidad de una reintervención para su eliminación, la colonización bacteriana y sobreinfección y la dificultad de manejo en algunos casos.

Estos problemas dieron lugar a una línea de investigación para obtener materiales reabsorbibles en el campo de la RTG. Dentro de estos materiales se han utilizado los polímeros sintéticos y los derivados colágenos animales. Se han empleado membranas de colágeno, de ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de estos dos. La capacidad de estos materiales para favorecer la regeneración tisular periodontal ha sido demostrada en múltiples estudios que se describen a continuación

Robert y cols (169) evaluaron en un estudio realizado en ratas la biocompatibilidad y reabsorción de una membrana de ácido poliláctico de elevado peso molecular con oligómeros de PLA 50 demostrándose una tolerancia tisular excelente con mínima reacción inflamatoria.

Estos mismos autores estudiaron tres tipos distintos de membranas de ácido DL-láctico que contenían 0%, 10% y 30% respectivamente de oligómeros (monómeros de bajo peso molecular) para el tratamiento de 65 defectos periodontales creados en 6 perros. Se sacrificaron los animales de dos en dos a los 2,4 y 6 meses de la intervención. Al comparar los resultados obtenidos con cualquiera de estas membranas con el control se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los tres tipos de membranas fueron bien toleradas y la reabsorción de las mismas comenzó en la zona coronal para irse extendiendo progresivamente en dirección apical con un tiempo de reabsorción relacionado con el contenido de oligómeros ya que las membranas que contenían un 30% de oligómeros se reabsorbían en un 64% en dos meses, cifra de reabsorción obtenida por las del 10% a los cuatro meses y a los seis meses en el caso de las membranas del 0%.

Mattson y cols (170) trataron 23 defectos de dos y tres paredes en 19 pacientes

comparando las membranas de colágeno bovino con las de un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico (PGA/PLA). Cuando se evaluaron los resultados a los 6 meses de la intervención, se encontró que ambas membranas producían resultados clínicos similares sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales aunque la muestra no es lo suficientemente amplia como para alcanzar la significación. Los resultados de este estudio indican que ambas membranas pueden recomendarse para el tratamiento de los defectos intraóseos localizados en la región interdental.

Da Silva Pereira y cols (171) han comparado histológica e histomorfométricamente la respuesta al tratamiento de dehiscencias creadas en las raíces distales de los terceros y cuartos premolares en seis perros mongrel. Uno de los defectos se trató con una membrana de ácido poliláctico (Atrisorb®), otro con una membrana no absorbible de politetrafluoretileno expandido (ePTFE), en otro de los defectos simplemente se hizo el desbridamiento quirúrgico y el cuarto defecto se dejó sin tratamiento. A los 3 meses se sacrificaron los animales y se obtuvieron mejores resultados en los parámetros de regeneración tisular guiada evaluados en los defectos tratados con cualquiera de las dos membranas en comparación con los otros dos grupos. La mayor formación ósea la presentan las membranas PLA en comparación con las de ePTFE o los grupos que se trataron con desbridamiento únicamente o el grupo control.

En concordancia con este estudio Caffesse y cols (172) obtuvieron resultados similares al comparar una membrana reabsorbible de ácido poliláctico-poliglicólico con la de PTFE-e en defectos periodontales en perros.

Trejo y cols (173) compararon la eficacia que presentan las membranas de PLA solas comparadas con estas mismas membranas unidas a un injerto de hueso liofilizado desmineralizado. Obtuvieron resultados igualmente satisfactorios con ambos procedimientos de regeneración tisular guiada en un estudio realizado en 30 pacientes sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos procedimientos al evaluar la regeneración ósea a los 6 y 12 meses de la intervención.

Durante muchos años, la única aplicación del polímero de ácido poliláctico-poliglicólico en el campo odontológico ha sido en forma de membranas para la regeneración tisular guiada en cirugía periodontal. La industria ha desarrollado una nueva aplicación de este polímero sintético reabsorbible a base de ácido L-D-poliláctico y ácido poliglicólico con nombre comercial de Fisiograft® (Ghimsas S.P.A) para su aplicación en cirugía bucal y rellenado de defectos óseos.

Serrino y cols. (174) realizaron un estudio para evaluar el empleo de este material para prevenir o reducir la reabsorción de la cresta alveolar tras la extracción dentaria mediante la aplicación del mismo en comparación con la cicatrización normal por la formación de coágulo y evaluar histológicamente la cantidad y calidad del hueso formados en los alvéolos a los 6 meses de haber colocado el biomaterial. Participaron 36 pacientes a los que se les rellenaron 26 alveolos con el biomaterial mientras que 13 alvéolos quedaron sin relleno. La pérdida de altura alveolar fue menor en los alvéolos que se rellenaron con el biomaterial. Las biopsias recogidas en los lugares de prueba revelaron que el hueso estaba mineralizado, maduro y bien estructurado y no se pudieron identificar partículas del material de relleno en ninguna de las 10 biopsias. Concluyen que se puede prevenir la reabsorción de hueso alveolar con este biomaterial y que la calidad del hueso formado es óptima para la inserción de implantes dentales.

En Cirugía Ortopédica y Traumatología (175):

El PLA es uno de los polímeros aprobados por la FDA desde 1995 (4). La principal ventaja del PLA y los polímeros biodegradables sobre los implantes metálicos en ortopedia es que los primeros transfieren las cargas a el área dañada a través del tiempo, permitiendo así la reparación de los tejidos y eliminando la necesidad de una segunda operación para retirar el implante. El PLA es actualmente utilizado en aplicaciones que no requieran altas prestaciones mecánicas como anclajes para la unión de ligamentos y reparación de meniscos, suturas, tornillos y clavos para la fijación de fracturas y cirugía maxilofacial, liberación de fármacos y stents para cirugía cardiovascular.

Se han empleado distintas gamas de tornillos, anclajes y placas destinados a la osteosíntesis o a la reparación de ligamentos.

Las razones de su uso vienen determinadas por (64, 67, 123):

- Evitar su extracción después de conseguir su objetivo
- Permitir una transferencia gradual y progresiva de tensiones al hueso.
- Ser eliminados completamente del organismo promoviendo el restablecimiento de los tejidos originales.
- Reducir el riesgo de migración posterior y las complicaciones a largo relacionadas con la presencia de materiales extraños.

El empleo de las fijaciones absorbibles en traumatología ha ocasionado distintos problemas. Muchos aparatos hechos con ácido poliglicólico mostraban una rápida disminución de fuerza con lo que la aparición de nuevas fracturas era bastante común (176, 177).

Por otro lado, remanentes de ácido poliláctico puro se han encontrado incluso ocho años después de su implantación (177). Esto nos hace cuestionarnos si realmente el ácido poliláctico es suficientemente bioestable como para ser usado como material absorbible (178). Por otra parte, la degradación de los materiales absorbibles puede ocasionar una respuesta inflamatoria no infecciosa denominada absceso estéril que puede requerir drenaje en más del 26% de los pacientes, principalmente con la utilización del ácido poliglicólico o sus copolímeros (179).

Se han desarrollado distintas teorías para tratar de explicar esta reacción inflamatoria. La mayoría de los investigadores coinciden en que ésta reacción se debe a la imposibilidad que presentan los tejidos adyacentes para aclarar los productos de desecho metabólico del PGA. Esta teoría se basa en el hecho de que el ácido glicólico se ha encontrado dentro del tejido inflamatorio y además, estas reacciones son mucho menos comunes cuando estos materiales son derivados principalmente del ácido poliláctico, cuya degradación es mucho más lenta. Por ello, se han creado copolímeros de 70% PLA y 30% PGA que presentan una tasa de degradación tal que permiten fijar la fractura hasta que consolida sin el riesgo de formación de un absceso estéril como veíamos que ocurría con los homopolímeros de PGA puro (180).

En este sentido, Bozic y Júpiter han publicado un trabajo (153) en el que comparan un copolímero de 70% PLA y 30% PGA con el uso de placas de titanio en hueso sintético con propiedades mecánicas y anatómicas similares a las humanas que además permiten simular la degradación hidrolítica de los biomateriales al introducirlos en soluciones salinas tamponadas a pH 7,4. Según los autores, algunas ventajas atribuibles a estos materiales

para la fijación de fracturas en la mano en comparación con las tradicionales miniplacas de titanio serían: menor fuerza de fijación rígida, menor interferencia en las técnicas de imagen modernas y la eliminación de la necesidad de intervenciones posteriores para retirar el material.

Una de las aplicaciones más recientes del PLA es en el campo de la Ingeniería de Tejidos, la cual se basa en generar tejidos a partir de células del mismo paciente cuyo crecimiento es guiado in situ mediante andamios reabsorbibles. 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 (181)

El criterio de selección del tipo de PLA depende de la aplicación. Para aplicaciones que requieran mayores prestaciones mecánicas o una degradación del material a largo plazo, la forma semicristalina del PLA (L-PLA) será la indicada. En aplicaciones donde las prestaciones mecánicas no sean lo más importante, pero si una reabsorción a tiempos menores, la forma amorfa del polímero (DL-PLA) será la indicada. Además se pueden utilizar los copolímeros de L/DL-PLA para graduar las propiedades mecánicas y la velocidad de degradación.

Se ha empleado en forma de membrana (Atrisorb®, Epi Guide®) para la regeneración ósea guiada (169, 182, 183) con resultados clínicos equivalentes entre ellas y las membranas de politetrafluoretileno expandido (PTFE).

Prokop y cols. (167) evaluaron las posibles relaciones inflamatorias producidas por el polímero (70/30) L-DL ácido láctico (Polypin®) en la fijación del fémur izquierdo de 18 ovejas y se compararon los resultados con los obtenidos añadiendo a este polímero un 10% de fosfato tricálcico (90/10) en otro grupo con el mismo número de animales. Se evaluaron los resultados a los 3, 18 y 33 meses sacrificando 12 animales en cada ocasión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y no se observaron signos de infección. Sólo se observaron cambios en la membrana sinovial en dos animales del grupo sacrificado a los 18 meses con el polímero más el fosfato tricálcico en el que se evidenciaron células gigantes. A los 33 meses de la intervención ambos materiales se habían degradado en su totalidad.

El PLA no ha sido comercializado como placas de osteosíntesis para el soporte de huesos largos debido a los altos requerimientos mecánicos que esto supondría. Sin embargo, en la actualidad se realizan estudios dirigidos al desarrollo de polímeros con mayor resistencia y rigidez que puedan ser usados como placas de osteosíntesis, para esto se están estudiando materiales compuestos con matriz polimérica reforzados con fibras o partículas generalmente cerámicas o vítreas y en algunos casos, reforzados con fibras del mismo polímero (4).

En cirugía experimental del cartílago de crecimiento se ha estudiado la aplicación de tornillos de ácido poliglicólico reforzado como posible método de epifisiodesis de trocánter mayor en conejos de raza Nueva Zelanda esqueléticamente inmaduros (185, 186). Los resultados demostraron que los tornillos de ácido poliglicólico reforzado carecen de capacidad de compresión para lograr una epifisiodesis del trocánter mayor, comportándose como un mero material de interposición a través del orificio practicado en la fisis trocantérica del conejo.

También en el campo experimental, Gil Albarova y cols (187, 188), comprobaron cómo un modelo quirúrgico experimental en conejos de Nueva Zelanda era capaz de lograr el

crecimiento asimétrico de la fisis femoral distal, merced a la compresión asimétrica del mismo mediante un montaje triangular compuesto de tres tornillos metálicos unidos por un filamento reabsorbible de PDS II®. Dicho material reabsorbible mostró una eficacia comparable al montaje enteramente metálico en los primeros meses del seguimiento. Posteriormente, la progresiva desaparición de su fuerza tensil proporcional a su degradación, condicionaba la disminución de su efecto frenador del crecimiento misario.

FACTORES QUE SE EMPLEAN PARA EL CRECIMIENTO ÓSEO.

CONCEPTOS BÁSICOS

En los últimos años se han identificado una serie de sustancias promotoras del crecimiento que se localizan en las zonas donde el sistema esquelético haya sufrido una lesión, y que parecen tener un importante papel en la reparación ósea. Entre ellas se recogen el factor β transformador del crecimiento, las proteínas óseas morfogenéticas, los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento tipo insulina y los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (56, 60, 64, 90, 189-198). También son producidas por líneas celulares clónicas en sarcomas osteogénicos (189, 199).

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas por las células que actúan sobre una o varias células diana, con una acción concreta, para inducir la división celular o promover la síntesis de matriz extracelular. Esta acción puede ser autocrina, paracrina o endocrina. Por lo tanto no es de extrañar que los factores de crecimiento tengan efectos en múltiples tipos de células y promuevan una variedad de funciones celulares en tejidos muy distintos (200, 201). Los factores de crecimiento están presentes en la matriz ósea hasta que la remodelación o un traumatismo ocasionan su solubilización y liberación, por lo que el hueso dispone de los factores de crecimiento en el momento y en la cantidad adecuados y su aporte externo es necesario únicamente en condiciones patológicas, retardos de consolidación o pseudoartrosis, en las alteraciones de la vascularización o en técnicas en que se requiere la formación de hueso extra, como pueden ser los aloinjertos óseos o las elongaciones.

Cuando el factor de crecimiento se une a un receptor de la célula diana, induce una señal intracelular que alcanza el núcleo y produce una respuesta biológica. La mayor parte de los factores de crecimiento se unen a receptores específicos y la respuesta será proporcional a la concentración del factor de crecimiento y el número de receptores en cada célula.

Se han descrito numerosos factores de crecimiento relacionados con el aparato locomotor, y se dividen en

- Factores de crecimiento transformadores (TGF)
- Factores de crecimiento insulinoides (IGF)
- Factores de crecimiento fibroblásticos (FGF)
- Factores de crecimiento plaquetarios (PDGF)
- Factores de crecimiento epidérmicos (EGF)
- Otros péptidos activos

Los llamados factores osteogénicos están envueltos en procesos de formación ósea y remodelación, como quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células formadoras y encargadas de la reabsorción ósea, los vasos, los nervios y los elementos medulares. Los factores de crecimiento como IGF-1 y TGF β 1 tienen un efecto estimulador de la formación de hueso pero son incapaces de formar hueso ectópico, como ocurre con las BMP (200, 202)

Las citoquinas son moléculas solubles con una función esencial en las interacciones intercelulares; son un grupo de proteínas de bajo peso molecular secretadas por numerosas células que se unen a receptores específicos. Inician una cascada de señales intracelulares que altera el patrón de expresión génica de la célula diana para producir una respuesta biológica determinada. Según la célula que las produce, se denominan linfocinas

(linfocito), monocinas (monocito) o interleucinas (IL) (células hematopoyéticas). La producción de citoquinas suele ser breve y está limitada a lo que dura el estímulo y se caracteriza por ser pleotrópico, es decir, tienen múltiples efectos al actuar sobre diferentes células, y varias de ellas pueden producir el mismo efecto. Se pueden dividir en citoquinas catabólicas (IL-1, TNF α , IL-7, IL-8), que actúan sobre las células incrementando los productos de degradación de la matriz; citoquinas anticatabólicas o inhibitoras (IL-4, IL-10, IL-3), que impiden la actividad de las citoquinas catabólicas, y por último, citoquinas anabólicas (IGF-1, TGF β 1, β 2 y β 3, BMP-2, 4, 6, 7, 9 y 13), que actúan como factores de crecimiento y diferenciación para incrementar la actividad sintética. Además, algunas pueden ser clasificadas como moduladoras (IL-6, LIF, IL-11), por su capacidad para regular las actividades de las otras citoquinas. Sin embargo, su acción fundamental es dirigir el mecanismo de la inflamación, y así se dividen en proinflamatorias (IL-1, TNF α , IL-8, IL-12, IL-16 y los interferones (IFN) 10, 11 y 12) y antiinflamatorias (IL-10) (200)

Actualmente existen tres estrategias para la implantación de factores de crecimiento. La primera es la descrita por Urist (31), consistente en la extracción y purificación de una mezcla de proteínas que incluyen la proteína ósea morfogenética del hueso cortical de procedencia animal o humana. La segunda es la utilización de proteína ósea morfogenética recombinante tipo 2 mediante clonación y secuenciación genética (203). La tercera, y más reciente, es la transmisión del ácido desoxirribonucleico que codifica un factor de crecimiento en lugar de la implantación de la propia proteína codificada (203, 204).

Las BMP

Dentro de la familia del TGF están las BMP, inhibinas, activinas, sustancia mülleriana, complejo genético de *Drosophila* y otros factores de diferenciación y crecimiento y polipéptidos reguladores. Las BMP son parte de un complejo sistema de señales que consiste en numerosas moléculas, diferentes tipos de receptores y antagonistas solubles. Las BMP también inducen los osteoclastos y, por lo tanto, la reabsorción y muchas veces esta respuesta precede a la respuesta formadora de hueso. Por eso se ha señalado que el tratamiento con BMP se puede completar con un bifosfonato para proteger el hueso de la reabsorción, aunque el efecto anabólico y sinérgico de estas dos terapias debe ser estudiado (200, 205, 206)

Las BMP fueron identificadas inicialmente por su capacidad para inducir la formación heterotópica de hueso en roedores (207). Pero no todas las BMP tienen un comportamiento osteoinductor. Se consideran osteoinductores a las BMP-2, 4, 6 y 7. Las BMP son proteínas pleotrópicas con múltiple y diferentes acciones biológicas, ya que regulan al hematopoyesis, estimulan la síntesis de matriz extracelular e influyen en el mantenimiento celular, y también en su muerte o apoptosis, en el crecimiento y diferenciación de condroblastos *in vitro* y funciones en al morfogénesis de diferentes tejidos y órganos, como son el renal y el nervioso (tabla 7) (200, 208)

Tabla 7: Efecto de las BMP (200)

BMP	Función
BMP-2	Osteoinducción, diferenciación osteoblastos, apoptosis
BMP-3 (Osteogenina)	BMP más abundante en el hueso, inhibe osteogénesis
BMP-4	Osteoinductiva, desarrollo pulmones y ojos
BMP-5	Condrogénesis
BMP-6	Diferenciación osteoblastos, condrogénesis
BMP-7	Osteoinducción, desarrollo riñones y ojos

BMP-8 (OP-2)	Osteoinductiva
BMP-9	Sistema nervioso, reticuloendotelial, hepatogénesis
BMP-10	Desarrollo cardíaco
BMP-11 (GDF-8 miostatina)	Patrón mesodermal y tejido nervioso
BMP-12 (GDF-7)	Induce formación tendons
BMP-13 (GDF-6)	Induce formación de tejido tendinoso y ligamentoso
BMP-14 (GDF-5)	Condrogénesis, reparación tendón y formación hueso
BMP-15	Modifica actividad de la folitropina

Las BMP son los únicos morfógenos, pues estimulan la multiplicación de las células conectivas y son capaces de transformarlas en células osteoprogenitoras (209). Las células, en presencia de BMP-7 se diferencian directamente a osteoblastos evitando el paso intermedio por tejido cartilaginoso y saltando el proceso de osificación endocranal (210). Los otros factores inducen la multiplicación celular pero no pueden multiplicar una célula. Las BMP inducen una cascada de fenómenos que lleva a la osificación endocranal o desmal. También son proteínas morfogenéticas de cartílago, ya que éste es el primer paso de la formación ósea (208). Los extractos de cartílago articular bovino contienen proteínas morfogenéticas derivadas del cartílago (CDMP) y también factores de crecimiento y diferenciación (GDF) miembros de la familia de las BMP. Esto explica los buenos resultados del cartílago tratado con BMP-7 (200).

FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

Están presentes en la reparación normal de una fractura, y tienen actividad promotora de mitogénesis, de angiogénesis y de diferenciación celular tanto *in vitro* como *in vivo* (56, 60, 190, 192, 194, 195, 203,204). Están ligados a la proliferación y actividad sintética de osteoblastos y condrocitos, aunque su efecto sobre la síntesis de colágeno todavía no está aclarado. Tampoco se ha demostrado experimentalmente que su aplicación exógena a un foco de fractura mejore o acelere su consolidación, ya que en dependencia de la dosis administrada pueden inducir o inhibir la reparación ósea (64, 195, 196, 211).

FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADOS DE PLAQUETAS

Su principal actividad es mitogénica (56, 60, 193, 194, 196). La aplicación experimental en conejos mediante inyección ha demostrado un efecto estimulador en la reparación de osteotomías incrementando el volumen y la densidad del callo óseo en relación a los controles, aunque sin acompañarse de un incremento de las propiedades mecánicas (64, 190, 211). Por otra parte, se ha observado experimentalmente en ratones que su inyección provoca un aumento concomitante en la reabsorción ósea, lo que puede condicionar su utilidad como agente terapéutico (193, 194).

FACTORES DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (SOMATOMEDINAS) Y HORMONA DE CRECIMIENTO

Sus principales actividades son la mitogénica, anabólica y mediadora de algunas acciones de la hormona de crecimiento (56, 60, 194, 196, 197). La tipo I desempeña un papel fundamentalmente en la osificación de tipo endocranal característica del cartílago de crecimiento, por lo que se le supone alguna actividad en la osificación endocranal de la reparación de las fracturas (64, 196, 197). La tipo II es el factor de crecimiento más abundante en el hueso, y presenta acciones similares a la tipo I, aunque es menos potente en el estímulo celular. Circula a concentraciones muy superiores que la tipo I (190, 194, 196, 197). La hormona de crecimiento y el factor I de crecimiento tipo insulina

desempeñan un importante papel en el crecimiento y desarrollo óseo, pero su importancia en la reparación ósea es menos clara (64, 190, 196, 197). El factor I de crecimiento tipo insulina parece estar regulado por hormonas sistémicas como la parathormona (193, 194). Por otra parte se han observado diferentes respuestas en cuanto a la respuesta formadora de hueso tras la administración de hormona de crecimiento, a diferentes dosis y en diferentes modelos experimentales de reparación ósea (190, 192, 193, 212-217).

FACTOR β TRANSFORMADOR DEL CRECIMIENTO

Es quizá el factor de crecimiento más extensamente estudiado en el campo de la biología ósea. Su mayor función en el sistema musculoesquelético es la de estimular las células mesenquimatosas a dividirse (193, 217). Su administración exógena es capaz de estimular significativamente la reparación ósea, mejorando sus propiedades mecánicas, y puede potenciar la capacidad osteoinductiva de las proteínas óseas morfogenéticas, actuando mediante un mecanismo sinérgico (64, 190, 193, 218-221).

Este factor comprende una gran familia de moléculas, incluyendo las proteínas óseas morfogenéticas, y presenta una diversidad de acciones en dependencia del contexto que le rodea (31, 56, 60, 64, 189-192, 196, 197, 216-218, 222).

Una sustancia se denomina proteína ósea morfogenética cuando es capaz de inducir formación ectópica de hueso en un sistema de ensayo estandarizado *in vivo* en roedores (217). Las proteínas óseas morfogenéticas son capaces de inducir la transformación de células mesenquimales indiferenciadas en osteoblastos y condroblastos durante la embriogénesis, el crecimiento, la edad adulta y en los procesos de reparación ósea (31, 64, 70, 193, 197, 203, 216, 217, 223). La cadena de acontecimientos que inducen ha sido establecida por Reddi (224): quimiotaxis de células progenitoras, proliferación de células mesenquimales, diferenciación de condrocitos, calcificación de la matriz cartilaginosa, angiogénesis e invasión vascular, diferenciación ósea y mineralización, remodelación ósea y diferenciación medular. Sin embargo, el término proteína ósea morfogenética es impreciso puesto que muchas proteínas así denominadas pueden encontrarse en tejidos extraesqueléticos, y desempeñar funciones reguladoras del desarrollo de otros sistemas tisulares (193, 194).

La aparición de formas recombinantes de proteínas óseas morfogenéticas, en particular los tipos 1, 2 y 7, ha dado lugar a su aplicación experimental mediante diferentes materiales vehiculizadores de las mismas, mediante inyección directa de diferentes modelos animales de reparación ósea y mediante recubrimiento de superficies en la osteointegración de implantes (31, 64, 70, 189, 190, 192, 197, 216, 218, 222, 223, 225-231). Más recientemente se ha utilizado con éxito en clínica humana en la reconstrucción de defectos óseos femorales y en retardos de consolidación, mediante su vehiculización en aloinjerto liofilizado, consiguiéndose la consolidación y posterior remodelación del injerto aportado (90, 191).

En 1965 Urist (31) afirmó que la matriz ósea desmineralizada (DBM) induce la formación de hueso heterotópico. Posteriormente aisló una proteína de la matriz ósea que calificó de proteína ósea morfogenética (BMP). La matriz ósea desmineralizada fue digerida por colagenasa bacteriana y el producto se disolvió en una mezcla de sal y etilen glicol. La BMP así aislada indujo formación de hueso en una rata. Demostró que la implantación de matriz ósea desmineralizada en el músculo de una rata produce la formación local de hueso en tejidos blandos (232).

Se ha demostrado que los componentes activos de la matriz ósea desmineralizada son series de glicoproteínas, que pertenecen a un grupo comúnmente llamada superfamilia del factor transformador del crecimiento (TGF- β). Los miembros de esta familia son los responsables de los acontecimientos morfogenéticos incluidos en el desarrollo de tejidos y órganos. Estas proteínas se encuentran en otras especies en unas formas moleculares muy similares y no son específicas de cada especie. En este grupo de compuestos son de especial interés las BMP, de las que la BMP-2 a BMP-6 y BMP-7 a BMP-9 tienen propiedades osteoinductoras (232). Éstas últimas son llamadas en ocasiones proteínas osteogénicas (OP) 1 a 3. Clasificar un compuesto como BMP implica que es capaz de inducir formación de hueso mediante osificación endocondral. Las BMPs originariamente estudiadas eran extraídas del hueso cortical, pero los procesos de extracción eran complejos y solo se podían obtener pequeñas cantidades. La utilización de la tecnología del ADN recombinante ha permitido la producción de mucha mayor cantidad de algunas BMPs para el uso en ensayos clínicos y en investigación (232).

La inducción producida por las BMPs sucede en una secuencia específica. Las proteínas inducen quimiotaxis de células progenitoras, diferenciación de condrocitos, calcificación de la matriz cartilaginosa, angiogénesis e invasión celular, diferenciación del hueso, mineralización y remodelación. Es probable que diferentes BMPs regulen diferentes partes de este ciclo y, experimentalmente, una combinación de BMP-2 con BMP-7 o BMP-6 ha demostrado incrementar la formación de hueso entre cinco y diez veces (232). Se ha descubierto un receptor conjunto para la BMP-2 y BMP-4, lo que sugiere que algunas BMPs podrían actuar en combinación *in vivo*, pero se desconoce qué moléculas son necesarias para el proceso de osteoinducción.

La curación del hueso es un proceso muy complejo que solo conocemos parcialmente. Sabemos que podemos intervenir alterando el ambiente biológico o mecánico de la fractura. Sin embargo quedan muchas cuestiones sin respuesta como qué debemos alterar, cómo y cuando debemos hacerlo (233).

La eficacia de la proteína ósea morfogenética recombinante humana 2 (rhBMP) como adyuvante a los cuidados clásicos para las lesiones de los huesos largos ha sido objeto de un reciente estudio clínico: The BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) (234). En este estudio prospectivo, aleatorio, multicéntrico y controlado que ha incluido 450 pacientes con fractura abierta de tibia diafisaria aguda se ha observado una reducción significativa del riesgo de segundas intervenciones en el grupo tratado con rhBMP-2 comparado con el grupo de pacientes tratados únicamente con las medidas clásicas (235).

La actividad de las BMP se basa en su capacidad de movilizar las células madre progenitoras del paciente para el proceso de curación; y esta capacidad se ha demostrado tanto en humanos (235) como en ratas (325, 236). El proceso de migración se cree que está regulado, en parte, por factores de crecimiento que se encuentran en la matriz, los cuales se liberan por la resorción del hueso; en un estudio publicado recientemente, los modelos de investigación reprodujeron este efecto mediante medios de cultivo de progenitores mesenquimales y células COS-7 transferidas con rhBMP-7 (235, 237). Sin embargo, este proceso no se produce si la vitalidad o el número de células multipotenciales del paciente no son suficientes o si el paciente es anciano y con pobre estado general de salud (235, 238). Estas últimas dos condiciones incluyen a pacientes con grandes defectos óseos, que han recibido radio o quimioterapia, ancianos, inmunocomprometidos, malnutridos y otros.

Además otras limitaciones para el uso de BMPs son (235):

- Se necesitan grandes dosis no fisiológicas debido a la rápida degradación de sus proteínas desprotegidas. La concentración es un factor crucial y depende de cada

- especie. Desafortunadamente en los humanos se necesita mucha mayor concentración que en roedores y perros.
- Existen dificultades con la incorporación de estas proteínas en vehículos limpios debido a su química inestable.
 - Duran poco tiempo en la lesión.
 - Serias limitaciones en la terapia genética a parte de la transducción celular directa o el reparto de ADN mediante matrices activadas genéticamente.

Binderman y cols (239) implantaron células pluripotenciales con un soporte de matriz ósea desmineralizada en tejido celular subcutáneo en ratas obteniendo tejido óseo en 3 semanas. Por el contrario, observaron que los cultivos de células frescas de la médula ósea forma tejido óseo de tipo membranoso. Deducen que la matriz ósea normal incluye factores de crecimiento y de diferenciación que regulan la diferenciación de las células progenitoras. Las citoquinas y los factores de crecimiento son muy importantes para dirigir a las células progenitoras a formar tejido óseo específico. Además encontraron que las células óseas progenitoras tienen receptores para la hormona paratiroidea (PTH) y vieron que incluyendo PTH en el soporte del implante se incrementa la cantidad de tejido óseo formado. Concluyen que los implantes en la ingeniería de tejidos deberían incorporar soportes biológicos ya que por un lado aportan factores de crecimiento y diferenciación y por otro lado atraen células progenitoras.

Aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento en la regeneración ósea.

Las aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento cubren un amplio campo de posibilidades que, actualmente, se limitan al tratamiento de retrasos de consolidación y pseudoartrosis y las artrodesis vertebrales.

Numerosos trabajos experimentales han demostrado la utilidad de los factores de crecimiento en la reparación ósea. Seeherman y cols (240) realizaron una resección de peroné bilateral, de 6 a 8 cm, en primates. En un lado inyectaron rhBMP-2 a las tres horas de la intervención, utilizando como transportador fosfato cálcico en pasta, y demostraron una aceleración del 40% del proceso de consolidación respecto al lado control. También Edwards y cols (241) demostraron que la inyección de rhBMP en fosfato cálcico mejora la reparación de osteotomías tibiales en perros. Summer y cols (242) analizaron el efecto de la BMP-2 en la osteólisis alrededor de los implantes, observaron que todos los cilindros tratados con diferentes dosis de BMP-2 presentaron mayor formación ósea y mayor actividad ósea que los controles. Los tratados con 200 mg tuvieron 3 veces más actividad que el grupo control (200).

Hoshino y cols (243) han observado que al implantar cilindros de hidroxiapatita en defectos óseos realizados en costillas de perros conservando el periostio han producido con éxito regeneración ósea; por el contrario cuando los defectos óseos incluían el periostio, la β -TCP por sí sola no ha logrado la formación de hueso. Para solucionar esta cuestión han combinado un agente osteoinductor a los implantes de β -TCP porosos, la proteína ósea morfogenética recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2). Con este combinado han constatado una regeneración ósea con éxito en los defectos óseos sin periostio.

Roldan y cols (244) compararon el efecto de la BMP-7 y el plasma rico en plaquetas (PRP) en los defectos de mandíbula de rata colocando hueso bovino no orgánico y costilla autóloga. No se vio mejor efecto colocando costilla autóloga. Sin embargo, al colocar el PRP y la BMP-7 sobre un sustituto óseo, no se vieron diferencias entre el grupo control y

el PRP, pero se obtuvo formación de hueso combinando rhBMP-7 con el sustituto óseo. También consiguieron una osificación heterotópica con la BMP-7, cosa que no ocurrió al inyectar PRP (200).

La eficacia de las BMPs se ha demostrado en numerosos estudios *in vivo* llevados a cabo en cráneo de rata (210, 245, 246), fémur de rata (210, 230, 247), radio y cúbito de conejo (210, 248), vértebra de oveja (210, 249), zonas ectópicas (210, 250, 251), fémur de perro (210, 252), y mandíbula de mono (210. 253). Bordem y cols (210) han demostrado que la matriz sintética es una promesa como material para sustituto óseo. Cuando se combina con los factores apropiados se potencia la regeneración ósea. Se trabaja para cuantificar la extensión y el tipo de formación ósea y revascularización cuando se combina con médula y factores osteoinductores (210).

Los factores de crecimiento osteoinductivos se utilizan con más frecuencia en cirugía de columna (254).

Pese a sus potenciales limitaciones como coste, posibles efectos adversos y carencia de propiedades osteoconductoras, estos factores de crecimiento son altamente osteogénicos (255). Además, se recomienda su uso cuando el hueso huésped está biológicamente comprometido para ayudar a la incorporación del sustituto óseo adicional.

Es importante considerar el coste cuando se selecciona un injerto óseo. La mayoría de los aloinjertos son menos caros que la matriz ósea desmineralizada o los sustitutos sintéticos. Los factores de crecimiento osteoinductivos son mucho más caros que cualquier del resto de los productos, aunque su utilización en pacientes con entorno biológicamente comprometido puede ser crítico y su coste en estas situaciones puede estar justificado.

Seguridad, eficacia, y coste son los factores cruciales para seleccionar el sustituto óseo más adecuado en todas las áreas de la cirugía ortopédica. Con respecto a la seguridad del paciente, es preferible la utilización de hueso sintético, no de cadáver, aunque los productos adecuados pueden no estar disponibles en nuestro entorno. Las alternativas sintéticas tienen en la actualidad un coste razonable y pueden ser funcionalmente superiores a otras opciones. La utilización de productos sintéticos, cuando es posible, es ciertamente ventajosa, aunque las matrices óseas desmineralizadas y los aloinjertos siguen siendo productos razonablemente seguros y eficaces (61).

	Osteo- conducción	Osteo- inducción	Células osteoprogenitoras	Respuesta inmune	Resistencia inmediata
Aloinjerto congelado	+	+/-	+/-	++	++
Aloinjerto triturado	+	+/-	-	+	+
Cerámicas	+	-	-	-	+/-
Matriz ósea desmineralizada	+	++	-	-	-
Proteína ósea morfogenética	+	+++	+/-	-	-
Médula ósea	-	+/-	+	-	-
Injerto compuesto	++	+/-	+	-	+/-

Tabla 8: Diferencias entre los diferentes tipos de injertos y sustitutos óseos (256).

OSTEOINDUCCIÓN POR TRATAMIENTO GENÉTICO

Este procedimiento consiste en la transferencia de información genética a determinadas células diana, que inician la síntesis de la proteína codificada por los genes transferidos. La duración de la síntesis proteica depende de las técnicas utilizadas para transferir el material genético a la célula, de forma que es posible conseguir una expresión más o menos prolongada del gen transferido, en dependencia de las necesidades del caso a tratar (25, 56, 60, 195, 257, 258)

El tratamiento genético es una atractiva posibilidad para estimular o mejorar la función y reparación ósea puesto que los genes pueden ser implantados dentro de su vehículo en una localización anatómica precisa. Por otra parte, la duración de su efecto puede modularse mediante la selección del material que les sirve de vehículo para alcanzar el lecho receptor, aunque sin poder precisarse con exactitud (90, 195, 230).

Existen diferentes opciones terapéuticas. En primer lugar, el tratamiento genético puede ser sistémico o regional. El tratamiento sistémico se indicaría fundamentalmente en situaciones en las que todas las células del receptor presentan el gen defectuoso, mientras que el tratamiento regional tendría su indicación preferente en la reparación de un defecto óseo segmentario o de una fractura. Además, el gen puede ser introducido directamente en un lugar anatómico *in vivo*, o bien puede hacerse una manipulación genética *ex vivo* de células extraídas del propio individuo que son reimplantadas posteriormente. Los métodos *ex vivo* ofrecen la ventaja respecto a los *in vivo* de evitar la transferencia de partículas virales o de complejos de ácido desoxirribonucleico, son más seguros y eficaces, y por otra parte permiten la reimplantación selectiva de las células productoras de la proteína de interés a altos niveles. Sin embargo, son procedimientos laboriosos, prolongados en el tiempo y más invasivos (195, 230, 257, 258).

Finalmente el vehículo del gen transferido puede ser viral, no viral, o celular y las células diana pueden ser específicas o no. Los virus son vehículos eficaces puesto que su ciclo vital incluye la transmisión y expresión de sus genes. Debido a esto, cuando se utilizan virus se eliminan porciones de su genoma para crear espacio donde insertar los genes terapéuticos y para evitar la expresión simultánea innecesaria de los genes virales (56, 60, 195, 257, 258). Sin embargo, la recombinación de virus defectuosos con secuencias genéticas virales presentes en las células del huésped puede acompañarse de replicación viral con la facultad de propagarse dentro del organismo receptor. Por razones obvias de seguridad, esto ha llevado a buscar otros vehículos no virales (257, 258).

Los vehículos virales más comúnmente empleados son los retrovirus y los adenovirus, estando en estudio otros como el virus herpes simple y los virus adeno-asociados. Los vehículos no virales son los liposomas, los complejos de ácido desoxirribonucleico, y el oro coloidal (56, 60, 257, 258). Por otra parte, la inserción de material genético mediante virus se produce en localizaciones aleatorias, por lo que existen posibilidades de darse fenómenos de mutagénesis si la inserción del material genético se localiza en lugares sensibles al respecto del genoma del huésped. En el peor de los casos, esto podría conllevar la activación de algún oncogén, o la delección funcional de un gen supresor de tumores, dando lugar a la aparición de un tumor maligno (257, 258).

La implantación *in vivo* de células mesenquimales purificadas ha demostrado ser

efectiva experimentalmente en la reparación de defectos óseos en perros y ratas (64, 81, 195, 230, 259, 260). Teóricamente, la manipulación genética *ex vivo* de dichas células debería potenciar la expresión de su capacidad osteoinductiva o angiogénica, mejorando la formación ósea en el lecho.

La finalidad de los procedimientos de transferencia génica puede ser muy diversa. Los principales son (232):

- Introducir genes endógenos o exógenos que aporten o potencien nuevas funciones con un efecto beneficioso para el organismo o célula diana (genes suicidas).
- Restaurar o complementar una función biológica defectuosa por carencia o modificación de un determinado gen o conjunto de genes (antioncogenes).
- Silenciar o inhibir determinados genes que, por mutaciones puntuales o por disregulación de su control, dan lugar a proteínas con efectos nocivos para el organismo (oncogenes).
- Modificar la actividad de factores de transcripción mediante el bloqueo o la competición por sus dominios de unión a ácidos nucleicos.
- Introducir genes o moléculas que permitan el seguimiento (o monitorización) de las células modificadas en el interior del organismo.
- Expresar proteínas antigénicas para inmunizar con procedimientos de vacunación genética (moléculas de coestímulo y antígenos tumorales).

El tratamiento genético puede usarse en clínica con dos objetivos. El primero puede ser el tratamiento de un desorden causado por una mutación genética simple, y el segundo para estimular o mejorar la producción de una determinada proteína en determinadas enfermedades adquiridas (195, 257, 258). Sin embargo, los resultados del tratamiento genético regional presentan todavía cuestiones sin resolver, ya que no se conoce la duración de la producción de la proteína codificada y la cantidad producida de la misma, así como el vehículo ideal a elegir (203, 230, 258). En cualquier caso, son técnicas que ofrecen amplias expectativas de futuro en cuanto a sus aplicaciones clínicas.

Las principales patologías del sistema musculoesquelético susceptibles de tratamiento con terapia génica son (232):

1. Reparación de fracturas óseas.
2. Reparación de lesiones del cartílago articular.
3. Fusión ósea en columna vertebral.
4. Reparación de lesiones tendinosas o ligamentarias.
5. Tumores musculoesqueléticos.

Hay un enorme potencial para la formación de nuevo tejido mediante la terapia génica de transducción de células de diferente origen. Células que se originan en el hueso subcondral, mediante la terapia génica, pueden formar tejido de mayor calidad que el formado mediante la técnica clásica de microfractura. Por otro lado, el cartílago hialino formado mediante terapia de inducción génica en combinación con la implantación celular (posiblemente con soportes biodegradables) puede ser la respuesta para las actuales limitaciones del tratamiento de las lesiones del cartílago y puede proporcionar una solución definitiva para los pacientes. En la actualidad se están desarrollando numerosos estudios experimentales en animales para investigar sobre la terapia de inducción genética en la regeneración de defectos condrales y osteocondrales (129).

Las células madre mesenquimales son células del estroma no hematopoyéticas que tienen capacidad de diferenciarse en múltiples líneas celulares, siendo capaces de dar lugar a diferentes tejidos, incluyendo hueso, cartílago, tejido adiposo, tendón y músculo (261).

En el laboratorio, las células madre mesenquimales pueden ser aisladas, cultivadas y manejadas fácilmente. Se pueden dividir rápidamente y formar colonias. La diferenciación de las células mesenquimales se puede guiar hacia múltiples fenotipos por medio de factores de crecimiento u otras sustancias como dexametasona, indometacina, hidrocortisona, y factor β transformador del crecimiento (261, 262).

Las células madre mesenquimales parecen ser reservorios de células de reparación en el cuerpo humano, sin características específicas de un tejido. Diferentes señales pueden movilizarlas y diferenciarlas en líneas de tejido conectivo. Estas señales incluyen daño en los tejidos como traumatismos, fracturas, inflamación, necrosis y tumores (261, 263). La quimiotaxis (261, 264) y el microambiente local (261, 265) pueden también jugar un papel importante en el destino de las células madre mesenquimales.

Ulrich-Vinther y cols (266) han estudiado la función de la proteína osteoprotegerin (OPG) en la curación de las fracturas mediante terapia génica mediante la administración intramuscular de OPG con un vector adenovirus. Se ha demostrado que la terapia génica con OPG usando a un adenovirus como vector revierte la osteopenia en ratones ovariectomizados (267).

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos es un área multidisciplinar de investigación destinada a la regeneración de tejidos y la restauración de la función de los órganos mediante la implantación de células o tejidos que se han desarrollado fuera del cuerpo o por la estimulación de células a crecer en una matriz implantada (268, 269). El principio más importante en que se basa la ingeniería de tejidos implica la combinación de células vivas con un soporte natural o sintético, o andamiaje, para producir un tejido vivo tridimensional que es funcional, estructural y mecánicamente igual, si no mejor, que el tejido al que reemplaza (268, 269). Los pasos de la ingeniería de tejidos y órganos son la toma de células del donante, su siembra en un medio de soporte, la estimulación de la proliferación celular, el mantenimiento o estimulación de la especialización o diferenciación celular, y finalmente, el trasplante del tejido vivo u órgano en un paciente. El objetivo es combinar estos elementos para crear complejos tridimensionales estables y de tamaño útil en clínica humana (268).

Para conseguir una reparación efectiva, duradera y estable de un defecto o enfermedad de un tejido se deben satisfacer una serie de criterios (268):

- Suficiente número de células y tejido para rellenar el defecto.
- La diferenciación de las células hacia un fenotipo correcto y su mantenimiento.
- Asegurar que las células o los tejidos adoptan una organización tridimensional apropiada y producen matriz extracelular. Esto puede requerir un soporte estructural reabsorbible.
- La producción de células o tejidos estructural y mecánicamente adecuadas para las necesidades del tejido nativo.
- Lograr una correcta integración con el tejido local con vascularización si es necesario.
- Evitar el rechazo inmunológico.

La capacidad de satisfacer estos criterios depende en gran medida de la calidad de los materiales y un adecuado suministro de células. Hay diversas fuentes de células que se pueden utilizar para la reparación y regeneración tisular: células maduras del paciente,

células madre adultas como las células madre de la médula ósea, y células embrionarias o células germinales (268).

La ingeniería de tejidos ósea podría combinar las ventajas del trasplante autólogo de hueso con una reducción de intervenciones secundarias. Se pueden utilizar tres estrategias, sola o en combinación con otra, para el reemplazo y regeneración ósea: terapia basada en la matriz, terapia basada en factores, y terapia basada en células. Durante la última década, numerosos investigadores han observado una respuesta sinérgica cuando los factores bioactivos, andamios y células se han utilizado juntos para propósitos de ingeniería de tejidos (270).

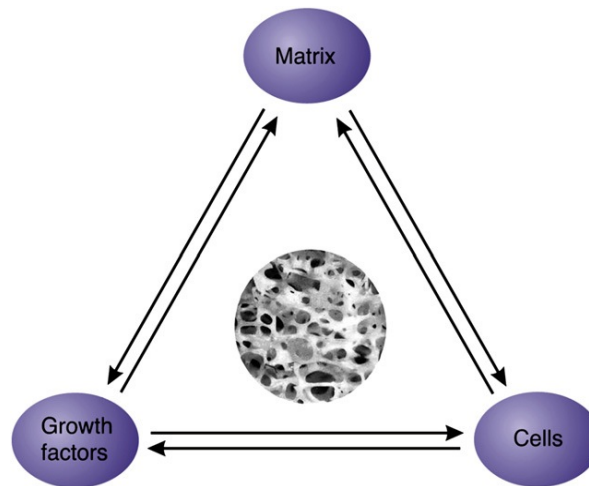


Figura 5: La interacción sinérgica entre matriz, factores de crecimiento y células permite mejorar los resultados en las aplicaciones de ingeniería de tejidos (270)

OBJETIVO

Se pretende realizar un estudio experimental en conejos adultos de Nueva Zelanda, implantando dos materiales biodegradables a nivel del tejido subcutáneo para valorar su tolerancia tisular, la potencial toxicidad derivada de los mismos o de sus productos de degradación, y los efectos de la implantación *in vivo* sobre sus propiedades mecánicas.

En función de los resultados obtenidos de la fase de implantación subcutánea, se pretende realizar una segunda fase experimental de implantación ósea cuyo diseño y planificación están condicionados por el comportamiento *in vivo* de los materiales testados.

MATERIAL Y MÉTODO FASE SUBCUTÁNEA

- Número de animales y distribución.

En la fase de implantación subcutánea, se utilizaron 18 conejos machos de nueve meses de edad y raza Nueva Zelanda. Su peso medio fue de 3.550 g. (± 150 g.). Se dividieron aleatoriamente en dos grupos de nueve en dependencia del tipo de material a implantar: material compuesto (Grupo CS) o biovidrio (Grupo BS). A su vez, estos grupos se subdividieron en subgrupos de tres animales con un seguimiento postoperatorio de dos semanas, dos meses y cuatro meses respectivamente.

Los animales de experimentación, procedentes de una granja homologada de cría, fueron estabulados en jaulas individuales en las dependencias del Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza una semana antes de la intervención, para ser identificados, medidos y pesados y proceder a su aclimatación preoperatoria. La estabulación se realizó en condiciones normales de temperatura ambiental ($20^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$), y humedad relativa ($55\% \pm 5\%$), con periodos alternantes de luz-oscuridad de 12 horas, siendo alimentados con pienso homologado Nanta®, ingesta de agua *ad libitum* y sin restricciones 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 la zona paravertebral donde estaba prevista la intervención quirúrgica.

- Anestesia y analgesia. Técnica quirúrgica.

La inducción anestésica se realizó mediante inyección intramuscular de Ketamina (75 mg/kg), continuándose con una anestesia general inhalatoria (Oxígeno a 0.8 l/min. e Isoflurano a 1.5 l/min). La analgesia se mantuvo mediante inyección subcutánea de Buprenorfina (0.001–0.05 mg/kg). La intervención quirúrgica se llevó a cabo en condiciones quirúrgicas de asepsia y antisepsia, utilizando una profilaxis con Cefazolina intramuscular (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 evitó la toxicidad del óxido de etileno en los tejidos si se implantase directamente (132-134).

Durante la intervención, se implantaron a nivel paravertebral lumbar dos láminas de los materiales testados. Para ello se practicaron dos incisiones a nivel dorsal paravertebral en los animales de experimentación, introduciendo los implantes bajo el tejido celular subcutáneo (Figura 6a y 6b). Las incisiones se suturaron con seda trenzada de calibre 000.

Figura 6a
Figura 6b
 Detalle de la implantación subcutánea paravertebral de las láminas.
 Izquierda: Lámina de material compuesto. Derecha: Lámina de biovidrio

Tras finalizar la intervención, los animales fueron trasladados a las dependencias anexas al quirófano experimental, desde donde fueron conducidos a sus respectivas jaulas de estabulación tras la recuperación anestésica.

- Materiales implantados.

Las dimensiones aproximadas de las láminas fueron de 3 x 6 x 45 mm para la lámina larga y de 3 x 6 x 6 mm para la pequeña (Figura 7).

Figura 7
 Aspecto de las láminas de material compuesto (izquierda) y de biovidrio (derecha)

Los materiales implantados fueron elaborados en el Departamento de Ciencia de los Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Cataluña. Su composición y características se recogen en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9: Composición y propiedades del biovidrio BV 11.

Composición (% molar)	
P ₂ O ₃	44,5
CaO	44,5
Na ₂ O	11
Densidad p (g/cm ³)	2,59
Temperatura de transición vítrea T ^o g (°C)	442
Velocidad de disolución (g/cm ² /h)	3,10 x 10 ⁻⁰⁶ ± 2,25 x10 ⁻⁰⁸

Dureza Vickers HV (Kg/mm ²)	357,28 ± 8,24
Módulo de Young (flexión) (GPa)	48,3 ± 5,08
Resistencia a la flexión (MPa)	33,35 ± 5,91

Tabla 10: Características del material compuesto.

Matriz	Ácido poliláctico (95L/5DL)-PLA (copolímero 95% de cadenas L-PLA y 5% de DL-PLA)
Refuerzo	Partículas de vidrio BV-44, 5p-4 (44,5% P ₂ O ₅ , 44,5% CaO y 11% Na ₂ O) con tamaño entre 90-150 µm
Densidad (g/cm ³)	1,53 ± 0,02
Porcentaje de refuerzo: en peso (%)	35,84 ± 1,63
en volumen (%)	21,16 ± 0,96
Peso molecular matriz (dl/g)	3,08 ± 0,37
Mv	138,223 ± 22,594
Temperatura de transición vítrea de la matriz T [°] g (°C)	62,53 ± 0,23
Temperatura de fusión de la matriz T [°] m (°C)	159,86 ± 0,24
Grado de cristalinidad (%)	38,85 ± 0,09

El biovidrio se elaboró mediante fusión lenta, en un crisol de platino, de los distintos reactivos (NH₄H₂PO₄, Na₂CO₃, CaCO₃) manteniendo el material fundido a una temperatura de 1200°C durante 8 horas. Posteriormente, se coló en una placa metálica y se efectuó un recocido de la placa del vidrio obtenida durante media hora a su temperatura de transición vítrea con el fin de eliminar las tensiones residuales inducidas por el enfriamiento rápido. Finalmente se deja enfriar lentamente el material hasta temperatura ambiente.

Para realizar los ensayos mecánicos del biovidrio, se cortaron barras de dimensiones 3 x 6 x 45 mm mediante una cortadora de disco de diamante Isomet®, utilizando etanol como lubricante. Posteriormente, las muestras se pulieron con papel abrasivo de tamaño de grano decreciente (180-240-400-600-1200 Mesh) y finalmente con suspensiones de alúmina de 1 y 0,05 µm de tamaño de partícula respectivamente. De la misma forma que para el corte de las muestras, se utilizó siempre etanol como agente lubricante para todo el proceso de pulido. Finalmente las probetas se envasaron en vacío y conservaron en desecador antes de su utilización.

La elaboración del material compuesto consistió de 2 etapas. En primer lugar, se procedió a la obtención de una mezcla homogénea de las dos fases mediante una extrusora de doble husillo. De esta forma, se obtiene el material compuesto en forma de granza. La segunda etapa consistió en el moldeo de la granza obtenida en placas de dimensiones 200x 200x 3 mm mediante una prensa en caliente.

Las probetas implantadas en los distintos animales para realizar su posterior análisis mecánico se cortaron a partir de dichas placas en barras de dimensiones de aproximadamente 3 x 6 x 45 mm mediante un disco de diamante. Antes de su implantación, se envasaron al vacío y conservaron en un desecador.

- Estudios analíticos.

Como estudio complementario se realizaron determinaciones analíticas de fosfatasa alcalina y creatinina en sangre periférica cada dos semanas. Para dicha extracción se canalizó la vena marginal de uno de los pabellones auriculares de los animales previamente sedados con Ketamina intramuscular (25 mg/kg).

- Eutanasia. Medición del pH local. Preparación del estudio histológico.

Llegado el momento de la muerte de los animales, se les administraron 5 ml de Tiobarbital por vía intravenosa, previa sedación Ketamina intramuscular (25 mg/kg). Tras el sacrificio de los animales se extrajeron las láminas de los materiales implantados, mediante incisión de la piel sobre las mismas, conservando al máximo el tejido conjuntivo que las envolvía (Figura 8). En dicho momento, se valoró el pH local del lugar de implantación de los materiales mediante tiras colorimétricas. La mayor de las láminas se envasó al vacío, conservándose a -4° C hasta la realización de su estudio mecánico por flexión. El tejido que rodeaba las láminas se incluyó en formol y se estudió microscópicamente usando la tinción de hematoxilina-eosina.

Figura 8. Extracción de las láminas implantadas

- Estudio mecánico.

Después de retirar los distintos implantes de los animales, se evaluaron sus propiedades mecánicas mediante ensayos de flexión. Las láminas grandes envasadas al vacío y conservadas a -4° C, fueron enviadas al Departamento de Ciencia de los Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Cataluña, para la realización del estudio mecánico. Los ensayos se realizaron en una máquina servohidráulica MTS Bionix® 858Test System, utilizando una célula de carga de 2.500 N, aplicándose a una velocidad de deformación de 0,5 mm/min.

Las propiedades mecánicas de los vidrios estudiados han sido determinadas principalmente mediante ensayos de indentación, evaluando así propiedades como la dureza, módulo de Young, tenacidad a la fractura. Además, se han llevado a cabo ensayos de flexión por tres y cuatro puntos, por una parte para corroborar los valores de tenacidad obtenidos mediante indentación, y por otra para evaluar la evolución de la resistencia a flexión y módulo de Young con el tiempo de disolución.

Técnicas utilizadas:

a) Ensayos de indentación de Vickers

Los ensayos de indentación de Vickers se basan en la aplicación de una carga

a. determinada sobre una superficie mediante una punta piramidal de diamante, lo cual provoca deformidades irreversibles, dejando una marca residual en la muestra. La presión de contacto del penetrador durante el ciclo de aplicación de la carga es constante, determinando, por definición, la dureza del material. Por otra parte, las grietas que aparecen en la zona cercana a la superficie del material permiten obtener información cuantitativa sobre la resistencia a la fractura del material ensayado (271).

La preparación necesaria de las muestras para realizar los ensayos de indentación Vickers es mínima, necesitando simplemente disponer de una superficie plana y pulida. Para ello, se embute en frío una muestra del material a analizar en resina poliéster. Posteriormente, se pule la superficie de la probeta que se quiere ensayar.

Los ensayos de indentación Vickers se realizaron mediante un *microdurómetro Akashi MVK-HO* siendo las cargas aplicadas generalmente de 300 g. Sin embargo, para el análisis de los diferentes modelos de evaluación de la tenacidad a fractura, se realizaron 5 series de indentaciones, con cargas de 500, 300, 100, 50 y 25 g. respectivamente. El tiempo de aplicación de la carga fue, en todos los casos, de 30 segundos. Se tomaron 20 medidas para cada muestra con el fin de poder eliminar los valores mínimos y máximos y calcular la media y la desviación estándar de los datos. En cada ensayo se midió la longitud de la diagonal (d) de la huella dejada por el penetrador en la superficie de la muestra y de las grietas (c) que se forman en la punta de la huella mediante un microscopio óptico con un objetivo de 40 aumentos, acoplado al indentador (271).

b) Ensayos de indentación Knoop

Los ensayos de indentación Knoop son muy parecidos a los ensayos de indentación Vickers. La única diferencia entre las dos técnicas se sitúa en la geometría de la pirámide de diamante, presentando una relación $b/a = 1/7,1$ entre sus dos diagonales. En la figura 9 se representa un esquema de la geometría propia de una impresión Knoop. Se realizaron ensayos de indentación Knoop para evaluar el módulo de Young, a escala microscópica, de los vidrios.

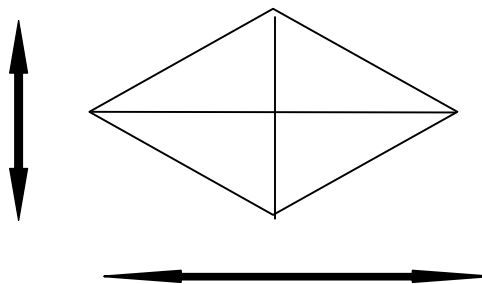


Figura 9: Geometría de una indentación Knoop.

La necesidad de preparación de las muestras para los ensayos Knoop es equivalente a la de los ensayos de indentación Vickers. Los ensayos de indentación Knoop se realizaron mediante un microdurómetro *Akashi MVK-HO*, aplicando una carga de 100 g durante 30 segundos. Al igual que en el caso de los ensayos de indentación Vickers, se tomaron 20 medidas para cada muestra, para poder eliminar los valores mínimos y máximos y calcular la media y la desviación estándar de los datos. Para cada ensayo, se midió la longitud a y b de las diagonales mayor y menor, respectivamente, de la huella en la superficie del material (271).

c) Ensayos de flexión

El biovidrio se ensayó mediante flexión por cuatro puntos y el material compuesto mediante flexión por tres puntos siguiendo las normativas MIL-STD-1942 y ASTM D790-95^a respectivamente.

Ensayos de flexión por 4 puntos

Estos ensayos se realizaron para determinar la variación de las propiedades mecánicas de los vidrios en función del tiempo de degradación. De esta manera, se evaluaron las propiedades mecánicas de las muestras después de 0, 1, 2, 4, 6 y 8 semanas de disolución en medio fisiológico SBF a una temperatura de 37° C. Las muestras se conservaron en recipientes de polietileno, con 100 ml de SBF cada uno, siendo necesario renovar el medio fisiológico cada 6 días para evitar su saturación. Para cada tiempo, las muestras se retiraron del medio, ensayándose inmediatamente.

Los ensayos de flexión se llevaron a cabo siguiendo el método descrito en la normativa publicada por el ministerio de defensa de los Estados Unidos [Norma83], utilizando en ambos casos probetas paralelepípedas de anchura $b = 4$ mm, espesor $w = 3$ mm y longitud $l = 45$ mm. Se realizaron series de ensayos de 5 muestras cada una, para los distintos tiempos de disolución (271).

Los ensayos de flexión consisten en flexionar una probeta apoyada sobre dos soportes inferiores, separados por una distancia L determinada. En los ensayos por 4 puntos, la fuerza de flexión se aplica a través de 2 soportes superiores. En la figura 10 se representa un esquema del dispositivo.

Figura 10: Esquema de la prueba de ensayo de flexión por cuatro puntos

La configuración utilizada para los ensayos de los implantes de biovidrio fue la siguiente.

Distancia entre soportes inferiores: $L = 40$ mm.

Distancia entre soportes superiores: $L/2 = 20$ mm.

Los ensayos se realizaron en una máquina de ensayos servohidráulica MTS Bionix® 858 Test System, utilizando una célula de carga de 2500 N, aplicándose una a velocidad de deformación de 0,5 mm/min.

Se determinaron el módulo elástico y la resistencia a flexión mediante las siguientes expresiones.

Resistencia a flexión:

(MPa)

a) Probeta SENB

b) Probeta para la evaluación de la morfología de grietas

Módulo de elasticidad:

Donde P_{\max} = Carga a rotura (N)

L = Distancia entre soportes externos (mm)

b = Anchura de la probeta (mm)

d = Espesor de la probeta (mm)

K = Constante dependiente de la configuración del ensayo. Para una configuración 40/20, $K = 0,17$.

r = Pendiente de la curva fuerza/deformación (N/mm)

Una vez obtenidos los valores de la resistencia a la flexión y módulo de Young, se analizaron los resultados estadísticamente con el fin de determinar los valores medios y las desviaciones estándar. Asimismo, se realizó un análisis de la varianza ANOVA con un test de comparación múltiple de Fisher para evaluar si las diferencias entre cada serie eran significativas (271).

Ensayos de flexión por 3 puntos:

Estos ensayos se utilizaron, por una parte, para medir la tenacidad a la fractura y poder así comparar con los resultados obtenidos mediante ensayos de indentación. Por otra parte, se emplearon para permitir la observación de la morfología de las grietas formadas durante los ensayos de indentación realizados.

De la misma forma que en el caso de los ensayos de flexión 4 puntos, los ensayos de flexión se llevaron a cabo siguiendo el método descrito en la normativa publicada por el ministerio de defensa de los Estados Unidos [Norma83], utilizando en ambos casos probetas paralelepípedas de anchura $b = 4$ mm, espesor $w = 3$ mm y longitud $l = 45$ mm. En el caso de los ensayos destinados a la evaluación de la tenacidad a fractura se realizó una entalla transversal en 8 probetas, mediante una cortadora de diamante de forma que $a/w = 0,5$, siendo a la longitud de la entalla. Se obtuvieron así probetas tipo SENB, como se muestra en la figura 11. En el caso de la observación de la morfología de las grietas producidas por indentación, se realizó una sola indentación Vickers en el centro de una superficie de 10 probetas con cargas de 500, 300, 100, 50 y 25 g respectivamente, tal y como se ilustra en la figura 11, teniendo 2 probetas por cada carga aplicada (271).

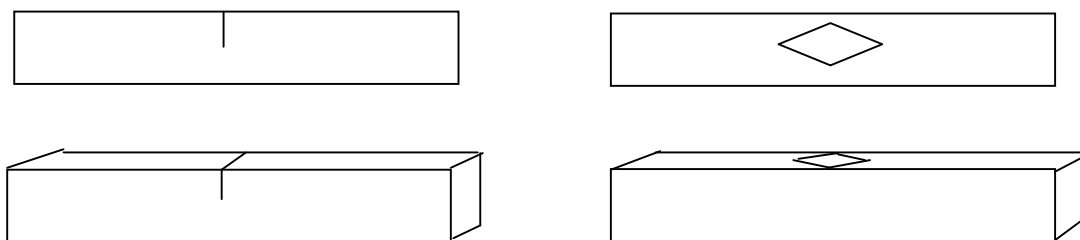


Figura 11: Geometría de las distintas probetas ensayadas por flexión 3 puntos

La diferencia con el ensayo anterior reside en el hecho que la fuerza de flexión sobre el material se ejerce a través de un solo punto de apoyo, tal y como se representa en la figura 12.

Figura 12: Esquema de la prueba de ensayo de flexión por tres puntos

Los implantes del material compuesto se ensayaron con una configuración de ensayo con una distancia entre los dos soportes inferiores de 25 mm, utilizando una máquina de ensayo universal *Instron D4507*, equipada de una célula de carga de 1KN, y aplicando una velocidad de ensayo de 5 mm/min (271).

El módulo de elasticidad y la resistencia a flexión se evaluaron mediante las siguientes expresiones.

Módulo de elasticidad: (MPa)

Resistencia a flexión: (MPa)

donde L = distancia entre los 2 apoyos inferiores (mm)

m = pendiente de la parte lineal de la curva fuerza/deformación (N/mm)

b = anchura de la probeta (mm)

d = espesor de la probeta (mm)

P_{\max} = Resistencia máxima a la flexión (N)

Métodos de evaluación de las propiedades mecánicas

a) Método de evaluación de la dureza Vickers

Una vez realizados los ensayos se calculó la dureza Vickers (HV) en cada caso a partir de la medición de la diagonal d en el microscopio de la huella en el material, según la relación:

$$(Kgf/mm^2)$$

Donde P =Carga aplicada (Kgf)

D= Longitud de la diagonal de la huella Vickers (mm)

b) Método de evaluación del módulo de Young mediante indentación Knoop

Un ensayo de indentación se puede dividir en dos fases: una de aplicación de la carga y su posterior descarga. Durante la primera fase, las deformidades producidas en el material son de naturaleza elástico-plástica, llegándose a la formación de la huella característica a partir de la cual se determina la dureza del material. Por otra parte, al dejar de aplicar la carga, el material recupera la deformación elástica. La posibilidad de medir dicha recuperación elástica durante un ensayo de indentación permite calcular, a escala microscópica, el módulo de Young de una material cerámico. En este sentido, el parámetro más importante es la relación entre la dureza y el módulo de Young H/E , pudiendo ser evaluada fácilmente mediante la observación de las contracciones relativas de las diagonales de una impresión Knoop. En efecto, si bien la diagonal mayor es poco sensible al efecto de recuperación elástica, no es éste el caso de la diagonal menor. El análisis define la siguiente ecuación (271).

$$b'/a' = b/a - \alpha H/E$$

donde:

b/a : 1/7 (Relación entre las diagonales del indentador Knoop)

b'/a' : Relación entre las diagonales medidas en la huella Knoop en la superficie del material

α : Constante calibrada experimentalmente a un valor de 0,52 (271)

El módulo de Young determinado mediante la medición de la recuperación elástica, según el método anteriormente descrito, no se puede asimilar directamente al módulo de Young a tracción o a flexión del material. En general, los valores obtenidos son superiores a los resultados de ensayos convencionales. Sin embargo, esta técnica es interesante a la hora de comparar diferentes materiales.

c) Módulo de evaluación de la tenacidad a fractura mediante ensayos de indentación Vickers

Como se ha explicado anteriormente, los ensayos de indentación Vickers permiten, en el caso de materiales frágiles, determinar su dureza, así como su tenacidad a fractura (K). En este sentido, la determinación de K pasa, en primer lugar, por la observación y la caracterización del sistema de grietas formado. De forma general, éstas se pueden clasificar en dos tipos: tipo mediano o tipo Palmqvist (271).

La morfología de las grietas producidas depende fuertemente de las condiciones de ensayo. Por otra parte, al formarse durante el ciclo de descarga, la relación E/H del material ejerce también una gran influencia sobre dicha morfología, además de resultar, muy a menudo, difícil una caracterización precisa. Gran cantidad de estudios se han dedicado al análisis de las grietas producidas por indentación y se han desarrollado numerosos modelos para calcular la tenacidad a fractura (K) del material mediante ensayos de indentación Vickers. El hecho de que la mayoría de estos modelos se hayan establecido considerando una morfología de grietas formadas perfectamente predeterminada puede provocar, como se ha demostrado, una notable discrepancia entre los resultados de K obtenidos por indentación y aquellos hallados mediante ensayos convencionales. Por lo tanto, conviene analizar en este caso distintos modelos y condiciones de indentación, con el fin de determinar cuáles son los más adecuados para evaluar la tenacidad a fractura de los vidrios de fosfato estudiados mediante ensayos Vickers. Con esta finalidad, se

analizaron siete modelos usados comúnmente en estudios de vidrios (271). Tal y como se muestra en la tabla 11, los modelos 1, 2, 3 y 4 consideran que las grietas son de tipo mediano, el modelo 5 de tipo Palmqvist y los modelos 6 y 7 corresponden a formulaciones ajustadas a cualquier tipo de grieta. En cada uno de los modelos, P (N) corresponde a la carga de indentación aplicada, c (mm) la longitud de grieta, a (mm) la semi-diagonal de la huella de indentación Vickers, HV (Gpa) la duraza Vickers, y E (GPa) el módulo de Young del material (271).

N	Modelo para la evaluación de K	Morfología grietas
1	$0,0154 * (E/HV)^{1/2} * (P/c^{3/2})$	Mediano
2	$0,0095 * (E/h)^{2/3} * (P/c^{3/2})$	Mediano
3	$0,028 * (HV a^{1/2}) * (E/HV)^{1/2} * (c/a)^{-1,5}$	Mediano
4	$0,0303 * (HV a^{1/2}) * (E/HV)^{2/5} * \log(8,4 a/c)$	Mediano
5	$0,015 * (E/HV)^{2/3} * (P/c^{3/2}) * (c/a-1)^{-1/2}$	Palmqvist
6	$0,0495 * (HV a^{1/2}) * (E/HV)^{2/5} * (c/a)^{((c/18a)*1,5)}$	Independiente
7	$0,0782 * (HV a^{1/2}) * (E/HV)^{2/5} * (c/a)^{-1,56}$	Independiente

Tabla 11. Modelos seleccionados para la evaluación de K mediante indentación Vickers.

Con el fin de escoger el mejor modelo de entre los estudiados, se realizaron indentaciones Vickers en cinco muestras de un mismo vidrio, concretamente el BV-44,5P-4, con cargas de 500, 300, 100 50 y 25 g, siguiendo el método descrito en el presente apartado. Para cada carga aplicada, se calculó el valor de K para todas las ecuaciones descritas en la tabla 11, comparándose posteriormente dichos resultados con los valores de K obtenidos mediante ensayos convencionales de flexión con probetas tipo SENB.

Una vez evaluadas las condiciones de ensayo y el modelo más adecuado para la caracterización mecánica de los vidrios estudiados a partir de BV-44,5P-4, se determinó la tenacidad a fractura del resto de los vidrios utilizando únicamente dichas condiciones y modelo.

En la figura 13 se muestra una gráfica fuerza/deformación característica de un ensayo de flexión de los vidrios estudiados. Los parámetros de relevancia de esta gráfica son la carga a rotura (P_{max}) y la pendiente de la curva (r). A partir de estos parámetros, se pueden calcular las propiedades mecánicas del material tal y como se describe a continuación.

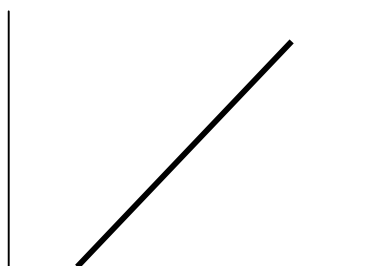


Figura 13: Curva típica fuerza/deformación obtenida durante un ensayo de flexión de los vidrios estudiados.

Resistencia a flexión

Según el método descrito en la normativa [Norma 83], se calcula la resistencia a flexión por tres y cuatro puntos mediante las expresiones siguientes. Cabe notar que la ecuación de flexión por 4 puntos es válida únicamente para una configuración con una distancia entre

$$E = \frac{K_r L^3}{b w^3} \text{ MPa}$$

los apoyos internos igual a la mitad de la distancia entre apoyos externos (271).

Ensayos de flexión por tres puntos:

$$\text{(MPa)}$$

Ensayos de flexión por cuatro puntos:

$$\text{(MPa)}$$

Donde:

P_{max} : Carga a rotura (N)

L : Distancia entre soportes externos (mm)

b : Anchura de la probeta (mm)

d : Espesor de la probeta

Módulo de Young

El módulo de Young del vidrio BV-44,5P se determinó mediante ensayos de flexión por cuatro puntos. Considerándose que el material ensayado tiene un comportamiento puramente elástico, se evaluó el módulo de elasticidad aplicando la siguiente expresión, referenciada en la norma estándar ASTM D790-95a correspondiente a ensayos de flexión en materiales plásticos y compuestos rígidos.

Donde:

K : Para una configuración de los soportes externos e internos de 40/20, la constante tiene como valor 0,17

L : Distancia entre los soportes externos (mm)

b : Anchura de la probeta (mm)

w : Espesor de la probeta (mm)

r : pendiente de la curva fuerza/deformación (N/mm)

Tenacidad a fractura

Para el análisis de los diferentes modelos de determinación de la tenacidad a fractura mediante indentación, se evaluó también la tenacidad a fractura del vidrio BV-44,5P-4 mediante ensayos de flexión por tres puntos con probetas tipo SENB. Este tipo de ensayo se basa en la determinación de la magnitud de la distribución de tensiones en la punta de una grieta aguda que se propaga. Dicha distribución se caracteriza por el factor de intensidad de tensiones K_I donde el subíndice I indica el modo de carga de la probeta, en este caso el modo I corresponde a sollicitaciones de tracción. El valor crítico de K_I corresponde a la fractura del material y se define como tenacidad a fractura K . En general, puede ser expresado en la forma (271)

$$K = Y \sigma (\Pi a)^{1/2} \text{ (MPa, m}^{1/2}\text{)}$$

Donde:

a : Longitud de la entalla (m)

σ : Resistencia a la flexión (Mpa)

Y: Factor polinómico adimensional que depende de la forma de la grieta y definido de la forma siguiente:

$$Y = 1,99 - 2,47 (a/w) + 12,97 (a/w)^2 - 23,17 (a/w)^3 + 24,8 (a/w)^4$$

Cabe destacar que dicha expresión sólo es válida cuando existen condiciones de deformación plana en la punta de la grieta, es decir, cuando el espesor de la probeta es lo suficientemente gruesa comparado con la grieta. En el caso contrario, el valor de K dependerá del espesor de la probeta, y disminuirá al aumentar éste. Experimentalmente, se ha comprobado que cuando el espesor de la probeta es mayor o igual a $2,5 (K/\sigma)^2$, donde σ representa el límite elástico para una deformación de un 0,2% del material, generalmente prevalecen las condiciones de deformación plana. En general los materiales frágiles, particularmente los vidrios, para los cuales no es posible que ocurra apreciable deformación plástica enfrente de la grieta presentan valores pequeños de K (271).

-Análisis por microscopía electrónica

La evolución del comportamiento mecánico del material compuesto con el tiempo de implantación se puede explicar mediante el análisis por microscopía electrónica de la superficie de fractura del material. Las observaciones se realizaron mediante un equipo Jeol JSM-6400. Para ello, las muestras fueron previamente limpiada en un baño de etanol por ultrasonidos y recubiertas de una fina capa de oro para permitir la conductividad.

Los cambios físico-químicos en la superficie del material se evaluaron mediante análisis por microscopía electrónica de barrido.

RESULTADOS DE LA FASE DE IMPLANTACION SUBCUTANEA

Postoperatorio.

Todos los animales 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 (Figura 14).

Figura 14. Aspecto de la zona de implantación a los 2 meses del postoperatorio

Medición del pH local en el lugar de implantación de las láminas en el momento del sacrificio:

La Tabla 12 muestra los resultados de la medición del pH local en el lugar de implantación de las láminas, en el momento del sacrificio de los animales. El pH medio se mantuvo en torno a nueve en todos los animales, sin modificaciones importantes.

Tabla 12: Valores del pH local en el momento del sacrificio

Animal	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
pH	9	9	9	9	10	9	9	9	9
Animal	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8	BS9
pH	9	9	9	9	9	9	9	9	9

Resultados de las analíticas practicadas.

Las tablas 13 y 14 recogen los resultados de los valores de creatinina y fosfatasa alcalina durante el tiempo del estudio. Los valores de creatinina en sangre no presentaron oscilaciones significativas a lo largo del estudio. Los valores de fosfatasa alcalina presentaron oscilaciones variables entre animales y entre grupos, sin seguir ningún patrón característico.

Tabla 13: Valores de creatinina en sangre periférica (mg/dl) en la fase subcutánea

Animal	Semanas								
	Preop	2	4	6	8	10	12	14	16
CS1	0,82	1,02							
CS2	0,79	1,19							
CS3	0,76	1,13							
CS4	0,99	1,5	1,1	1,3	1				
CS5	0,88	1,9	0,9	0,8	1				
CS6	0,85	1,27	0,7	0,9	0,9				
CS7	0,85	1,13	0,7	0,9	1,2	0,98	0,9	0,8	1,1
CS8	0,76	1,25	0,9	1,1	1	1,26	0,9	0,9	1,2
CS9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	1	0,9	0,92	0,98
BS1	0,79	0,8							
BS2	0,95	0,9							
BS3	1,2	1,1							
BS4	0,8	1	0,9	1,3	0,8				
BS5	0,92	1	0,9	1,2	0,85				
BS6	1	1,1	0,98	1,2	1				
BS7	1,19	1	0,9	1	1,1	1,1	1	0,9	0,9
BS8	1,1	0,8	0,9	0,9	0,98	1,1	0,9	1	0,9
BS9	1,36	1,1	1	1,1	118	1,1	1,2	1,1	1,1

CS: material compuesto subcutáneo; BS: biovidrio subcutáneo

Tabla 14: Valores de fosfatasa en sangre periférica (ui/l) en la fase subcutánea

Animal	Semanas								
	Preop	2	4	6	8	10	12	14	16
CS1	253	286							
CS2	105	117							
CS3	84	67							
CS4	191	329	176	150	218				
CS5	200	89	67	63	113				
CS6	86	105	40	33	85				
CS7	103	104	44	47	99	101	33	35	49
CS8	272	215	81	72	125	141	54	50	53
CS9	258	110	90	89	96	59	82	89	96
BS1	286	207							
BS2	147	57							
BS3	269	99							
BS4	83	68	120	40	89				
BS5	74	30	144	152	399				
BS6	101	182	178	78	58				
BS7	301	215	229	391	260	148	217	233	291
BS8	147	79	63	128	150	48	44	41	52
BS9	197	97	82	172	156	58	45	48	61

C: material compuesto subcutáneo; B: biovidrio subcutáneo

Estudio anatomopatológico

El estudio anatomopatológico mostró con ambos materiales la existencia de un tejido conjuntiva laxo en los primeros estadios del seguimiento que evolucionó hacia un tejido más denso y organizado a los cuatro meses del postoperatorio (Figura 15).

Figura 15. Corte transversal de la envoltura fibrosa de las láminas implantadas
Hematoxilina-Eosina x 10 (Animal CS4)

Tan solo en el grupo de animales en los que se implantó el material compuesto se observó de forma aislada la presencia de escasas células gigantes multinucleadas, con material de inclusión en su interior, en el espesor de la pared del citado tejido fibroso periférico al implante (Figura 16).

Figura 16. Célula gigante multinucleada con abundante material de inclusión, rodeada
de tejido fibroso con múltiples fibroblastos desorganizados
Hematoxilina-Eosina x 120 (Animal CS3)

En un solo animal del grupo en los que se implantó material compuesto se observó la

existencia de tejido osteoide en el espesor del tejido fibroso en contacto con el implante de material compuesto (Figura 17).

Luz normal

Luz polarizada

Figura 17. Imagen de tejido osteoide en el espesor del tejido fibroso que envolvía a la lámina implantada. Hematoxilina-Eosina x 100 (Animal CS5). La luz polarizada (derecha) permite observar un incipiente tejido tabecular.

El examen macroscópico de las láminas demostró la existencia de un depósito de sales cálcicas en la superficie de las láminas de material compuesto, en forma de gránulos (Figura 18). Estas observaciones no se dieron en el grupo de animales en los que se implantó biovidrio. En el análisis por microscopía electrónica descrito en el siguiente apartado se describen estos depósitos de cristales alargados, crecimiento típico de la Brushita.

Figura 18. Aspecto macroscópico del depósito de sales cálcicas en forma de gránulos en la superficie del material compuesto tras su extracción.

Estudio mecánico.

Implantes Biovidrio.

Las distintas series de implantes ensayados fueron las siguientes:

2 semanas: BS1, BS2 y BS3.

8 semanas: BS4, BS5, BS6

16 semanas: BS7, BS8, BS9.

En la figura 19 se muestran las curvas fuerza/desplazamiento relativas a los ensayos de flexión por 4 puntos de las distintas probetas. Cabe señalar que no se pudieron ensayar las probetas BS1, BS3 y BS7, debido al hecho que las muestras llegaron fragmentadas al Departamento de Ciencia de los Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Cataluña y no cabían entre los 2 soportes inferiores.

Figura 19. Curvas fuerza/desplazamiento de los distintos implantes de biovidrio.

Los valores de módulo de elasticidad y de resistencia de cada ensayo se muestran en la tabla 15.

Muestra	d (mm)	b (mm)	Pmax (N)	Pendiente (N/mm)	Resistencia (MPa)	Módulo (GPa)
BS2	3,25	4,3	48,834	501,492	32,256	36,964
BS5	3,5	4,25	75,422	925,775	43,460	55,277
BS4	3,15	4,15	88,682	622,837	64,608	52,242
BS6	3,3	3,75	43,099	657,107	31,661	53,051
BS8	3,35	4,15	62,696	759,029	40,385	52,930
BS9	3,55	3,75	56,497	694,622	35,864	45,047

Tabla 15. Valores de resistencia a flexión y módulo de elasticidad para las distintas muestras ensayadas.

La evolución de cada propiedad con el tiempo de implantación se muestra en la tabla 16

y en las figura 20 y 21. En dichas figuras, se comparan los valores con los obtenidos en estudios anteriores de disolución del BV-11 *in-vitro* en SBF (*Simulated Body Fluid*).

Tiempo de Implantación	Resistencia a flexión (MPa)	Desviación estándar	Módulo de elasticidad (GPa)	Desviación estándar
2 semanas	32,260		36,964	
8 semanas	37,561	8,343	54,164	0,085
16 semanas	38,125	3,197	48,988	5,575

Tabla 16. Evolución de la resistencia y módulo de flexión con el tiempo de implantación.

Figura 20. Evolución de la resistencia a flexión con el tiempo de implantación.

Figura 21. Evolución del módulo de flexión con el tiempo de implantación.

Las curvas fuerza/desplazamiento muestran gráficas típicas de materiales muy frágiles, siendo el comportamiento del material completamente elástico hasta su rotura.

Los resultados muestran que las propiedades mecánicas del biovidrio, tanto la resistencia a flexión como el módulo de elasticidad, no presentan diferencias significativas en las distintas series ensayadas, aunque el pequeño número de probetas en cada serie impide realizar un tratamiento estadístico exhaustivo de los resultados. Sin embargo, los resultados indican que las propiedades mecánicas del material no varían con el tiempo de disolución.

Este hecho se debe a que la disolución del biovidrio se efectúa superficialmente, con la formación de una capa de reacción hidratada en la superficie del material desde la cual se va disolviendo el vidrio uniformemente. Por tanto, el interior del material no está afectado por la disolución, justificando porque las propiedades se mantienen con el tiempo de implantación.

Por otra parte, cabe destacar que los valores de módulo de elasticidad encontradas para el BV-11, situándose alrededor de los 50 GPa se sitúan en el mismo rango de magnitud que los valores habitualmente reportados para el hueso cortical ($E = 7-30$ GPa) y para biocerámicas y vidrios bioactivos comerciales como el Bioglass® 45S5 ($E = 35$ GPa), por lo que el BV-11 aparece, desde un punto de vista mecánico, como un buen candidato para su aplicación en la reparación del tejido óseo.

Material Compuesto.

Las distintas series de implantes de material compuesto BV11/PLA fueron las siguientes.

Referencia (sin implantar): r1, r2, r3, r4.

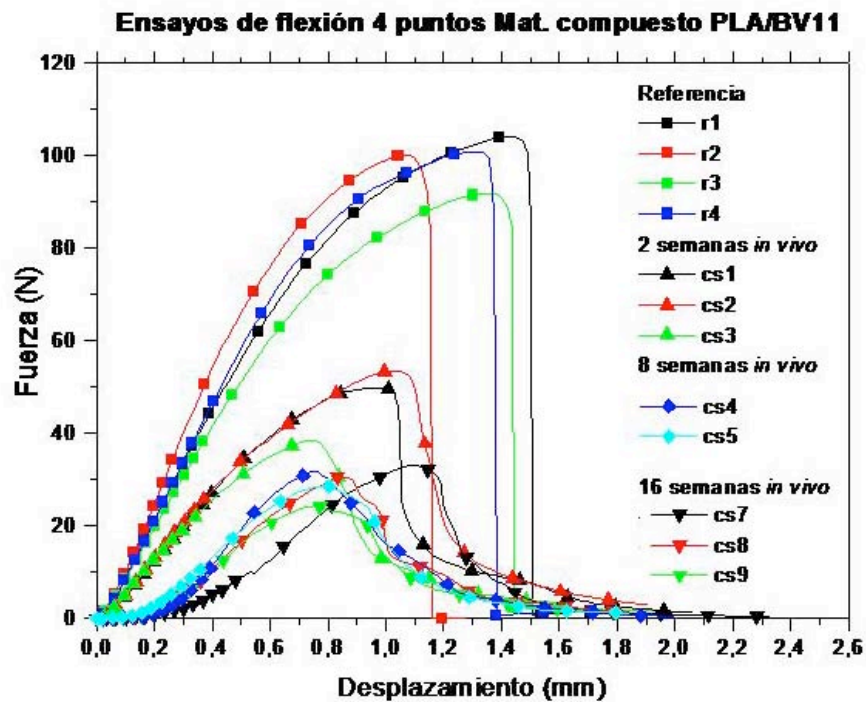
2 semanas: CS1, CS2, CS3.

8 semanas: CS4, CS5.

16 semanas: CS7, CS8, CS9.

En la figura 22 se muestran las distintas curvas fuerza/desplazamiento relativas a los ensayos de las distintas probetas para cada serie.

Figura 22. Curvas fuerza/desplazamiento para las distintas probetas de material compuesto.



Los valores calculados a partir de dichas curvas para cada probeta ensayada se encuentran en las tablas 17, 18, 19 y 20.

Serie Referencia

Probeta	Anchura (b) (mm)	Espesor (d) (mm)	Fmax (N)	Pendiente (N/mm)	Res. Max (MPa)	E (GPa)
r1	6,200	2,100	104,200	116,153	142,912	7,902
r2	6,200	2,100	100,300	145,258	137,563	9,882
r3	6,750	2,100	92,000	106,438	115,898	6,651
r4	6,650	2,250	101,000	124,348	112,503	6,413
Promedio:					127,219	7,712
Desviación:					15,253	1,587

Tabla 17. Cálculo de la resistencia a flexión y del módulo de Young para la serie referencia.

2 semanas

Probeta	Anchura (b) (mm)	Espesor (d) (mm)	Fmax (N)	Pendiente (N/mm)	Res. Max (MPa)	E (GPa)
CS1	7,150	3,300	50,000	72,242	24,081	1,098
CS2	6,500	3,100	53,700	73,811	32,238	1,489
CS3	6,400	3,150	38,600	69,316	22,794	1,354
Promedio:					26,371	1,314
Desviación:					5,122	0,198

Tabla 18. Cálculo de la resistencia a flexión y del módulo de Young para la serie a 2 semanas de implantación.

8 semanas

Probeta	Anchura (b) (mm)	Espesor (d) (mm)	Fmax (N)	Pendiente (N/mm)	Res. Max (MPa)	E (Flex) (GPa)
CS4	7,200	3,200	31,900	74,986	16,225	1,242
CS5	6,950	3,500	28,700	56,505	12,641	0,741
Promedio:					14,433	0,991
Desviación:					2,534	0,354

Tabla 19. Cálculo de la resistencia a flexión y del módulo de Young para la serie a 8 semanas de implantación.

16 semanas

Probeta	Anchura (b) (mm)	Espesor (d) (mm)	Fmax (N)	Pendiente (N/mm)	Res. Max (MPa)	E (GPa)
CS7	6,900	3,400	33,500	55,565	15,750	0,800
CS8	6,800	3,250	30,700	57,411	16,029	0,961
CS9	6,900	3,150	24,400	54,461	13,364	0,986
Promedio:					15,048	0,916
Desviación:					1,464	0,101

Tabla 20. Cálculo de la resistencia a flexión y del módulo de Young para la serie a 16 semanas de implantación.

La evolución del módulo de Young y de la resistencia a flexión del material compuesto en función del tiempo de implantación se muestra en las figuras 23 y 24.

Figura 23. Evolución del módulo de Young del material compuesto con el tiempo de implantación

Figura 24. Evolución de la resistencia a flexión del material compuesto en función del tiempo de implantación.

Se puede observar en las figuras 23 y 24 como el módulo de Young y la resistencia a flexión disminuyen rápidamente con el tiempo de implantación del material compuesto. En efecto, los resultados muestran una disminución de un 83% del módulo de Young y de un 79% de su resistencia a flexión tan solo después de 2 semanas de implantación. Posteriormente, las propiedades tienden a estabilizarse, situándose los valores después de 16 semanas de implantación en el mismo rango de magnitud que después de 2 semanas de implantación.

- **Análisis de microscopía electrónica**

Se puede observar en estas micrografías que la superficie de fractura correspondiente a la probeta sin implantar (*Fracref*) muestra una superficie muy lisa, típica de una fractura frágil. Por otra parte, se puede ver claramente que el frente de fractura contorna las partículas de vidrio sin fracturarlas, indicando una falta de adhesión entre las partículas y la matriz. Este hecho limita el efecto reforzador de las partículas de vidrio.

Las superficies de fractura correspondientes a las probetas implantadas durante distintos tiempos (*Frac2semanas*, *Frac8semanas* y *Frac16 semanas*) muestran todas un aspecto similar y en todo caso muy distinto a la probeta referencia. En efecto, se puede observar en este caso una gran ductilidad, con la presencia de picos y cuevas en la superficie de fractura, indicando una fractura de las probetas por exfoliación.

Por otra parte, no se pueden distinguir claramente a primera vista las partículas de la matriz polimérica. Este hecho demuestra que las partículas de vidrio han sufrido importantes cambios durante la implantación del material. Para observar mejor dichos cambios, se muestran, en las micrografías citadas a continuación, detalles de las partículas de vidrio en la superficie de fractura de las probetas a distintos tiempos de implantación:

Referencia: *Fracref2*

2 semanas: *Frac2semanas2* y *Frac2semanas3*.

8 semanas: *Frac8semanas2* y *Frac8semanas3*.

16 semanas: *Frac16semanas2*.

Estas micrografías muestran que:

Fracref2

- *Fracref2*: Se puede apreciar con más detalle la falta de adhesión partícula/matriz,

fracturándose la probeta únicamente a través de la matriz y contorneando las partículas de vidrio. La no adhesión de las partículas, aparte de su efecto directo sobre las propiedades mecánicas, también facilita la difusión de agua hacia el interior del material, acelerando así su degradación.

Frac2semanas2

Frac2semanas3

- *Frac2semanas2* y *Frac2semanas3*: En estas micrografías se puede observar como, al cabo de tan solo 2 semanas de implantación, las partículas de vidrio han sufrido importantes cambios. Concretamente, se puede observar que las partículas presentan una estructura hueca. La textura de la cáscara de dichas partículas presenta el aspecto de un esqueleto poroso, más marcado a medida que se acerca a la cara interna de dicha cáscara. Por otra parte, la micrografía *Frac2semanas3* muestra el crecimiento abundante, en el interior de las partículas de pequeños cristales en forma de agujas.

Frac8semanas2

Frac8semanas3

Frac16semanas2

- *Frac8semanas2, Frac8semanas3, Frac16semanas2*: En estas micrografías se puede observar, de la misma forma que se ha descrito anteriormente, la estructura hueca de las partículas de vidrio, con una cascara de textura porosa, y el crecimiento abundante de cristales en forma de agujas. El detalle de la morfología de estos cristales se puede apreciar en la micrografía *Frac8semanas3*.

Caracterización de los cambios físico-químicos en la superficie del material compuesto.

Los cambios físico-químicos en la superficie del material se evaluaron mediante análisis por microscopía electrónica de barrido.

A continuación se describen las micrografías de la superficie del material después de distintos tiempos de implantación.

Dos semanas de implantación

Surf2semanas

Surf2semanas2.

Ocho semanas de implantación

Surf8semanas

Surf8semanas2.

Dieciséis semanas de implantación

Surf16semanas

Surf16semanas2

Surf16semanas3

Surf16semanas4.

En estas micrografías, se puede ver que, después de 2 semanas aparecen en algunas zonas de la superficie de las muestras unas colonias de cristales alargados en forma de agujas. Esta forma de crecimiento es típica de la Brushita. En la micrografía *Surf2semanas2*, mostrando un detalle de las colonias de cristales, se puede observar claramente la forma de agujas alargadas de estos cristales.

Con el tiempo de implantación, se puede observar una transformación de dichos cristales. Tal y como se muestra en las micrografías a 8 semanas, los cristales en forma de agujas parecen sufrir una redisolución, formándose una capa de fosfatos de calcio de aspecto más amorfo. Finalmente, en las 4 micrografías correspondientes a 16 semanas de implantación, ya no se pueden observar cristales en forma de agujas. Al contrario, se observa el crecimiento de unos fosfatos de calcio formando un esqueleto poroso interconectado (*surf16semanas1* y *surf16semanas2*). En algunas zonas, tal y como se observan en las micrografías *surf16semanas3* y *surf16semanas4*, aparecen colonias de fosfatos de calcio en forma de bolas. Esta morfología es típica de una hidroxiapatita poco cristalizada.

DISCUSIÓN FASE SUBCUTÁNEA

HALLAZGOS DE LA IMPLANTACIÓN SUBCUTÁNEA

Los biovidrios son cadenas silicofosfatadas que pueden enlazarse iónicamente con diferentes compuestos. A su vez, pueden intercambiar iones o grupos moleculares con el medio fisiológico donde se implantan, siendo así posible su osteointegración mediante unión química al hueso. Sus formas reabsorbibles se han empleado como vehículos de liberación de sustancias. Su capacidad de dar lugar a la formación de una capa de apatita hidroxycarbonatada activa idéntica a la fase mineral del hueso, los hace muy útiles en cuanto a su aplicación en la superficie de implantes óseos para facilitar su osteointegración (67, 100-103, 272)

Existe una relación entre la diferente composición de los vidrios bioactivos y su capacidad de enlace al hueso, propuesta por Hench, delimitando unas proporciones determinadas de sus componentes que condicionan su bioactividad, reabsorción y su comportamiento más o menos inerte (8).

Los hallazgos histológicos macroscópicos y microscópicos demostraron que el material compuesto testado permitió la formación en su superficie de depósito de sales cálcicas e incluso en un conejo se observó la presencia de tejido osteoide en el tejido fibroso que creció sobre el implante. Para Shors (39), la formación ósea se inicia sobre la superficie de un implante si es bioactivo, y en condiciones ideales será de tipo intramembranoso. Las imágenes obtenidas en el estudio histológico hacen pensar que el implante de material compuesto utilizado pudo funcionar como estimulador de osteogénesis mediante el reclutamiento de células de tipo mesenquimal del lecho receptor, con diferenciación posterior a células formadoras de hueso sobre su superficie. En relación a esta observación se ha subrayado, como de particular importancia, la vascularización del lecho de implantación y la riqueza del mismo en progenitores de células endoteliales y fibroblastos, en la respuesta a un implante osteoinductivo y/o osteoconductor (89, 273-275).

Nuestros resultados no mostraron alteraciones analíticas en nuestros animales que sugiriesen toxicidad renal ni posibles alteraciones del metabolismo fosfofocálcico. La ausencia de respuesta inflamatoria aguda o crónica durante el tiempo de seguimiento estudiado, así como la ausencia de efectos deletéreos sobre tejidos distantes al lugar de implantación hablan a favor de la biocompatibilidad de ambos materiales testados (1, 2).

DIFERENCIACIÓN A OSTEÓBLASTOS

Los materiales bioactivos se han definido basándose en una respuesta biológica específica provocada cuando se implantan en hueso. Este concepto se basa en el control de la superficie química del material. Las reacciones que suceden en la superficie de un vidrio bioactivo permiten la formación de una capa de gel de silicio y la consiguiente cristalización de hidroxiapatita (273).

Las células son sensibles a las influencias de las características fisicoquímicas de los materiales con los que interactúan. Este es el caso de los biovidrios que liberan iones y crean en su superficie un microambiente que podría influir positivamente en la conducta de las células. Las reacciones cinéticas de los vidrios bioactivos han sido ampliamente estudiadas tras incubación en fluidos corporales simulados. Los vidrios con mayor nivel de bioactividad reaccionan rápidamente en su superficie, sobre la que se deposita una capa de hidroxiapatita. Además el intercambio de iones crea un pH alcalino en la superficie del

biovidrio que podría fomentar la diferenciación de los osteoblastos (273).

Este fenómeno de intercambio de iones podría explicar la promoción de osteoblastos en cultivos con biovidrios. El estudio de Maroothery y cols (276) prueba la evidencia de que esta hipótesis es válida. Este estudio mostró que extractos solubles de vidrios bioactivos produjeron mineralización ósea *in vitro*. Asimismo, se demostró que el proceso de formación ósea depende de un óptimo pH alcalino en el medio extracelular que rodea los osteoblastos (277). Por otro lado, otros autores han demostrado que los productos de corrosión del biovidrio elevan el pH del medio de cultivo a valores que tienen efectos adversos para la actividad de los osteoblastos. Para prevenir cambios en el pH, estos autores sumergieron el material en una solución tampón antes del cultivo (278, 279). Esta discrepancia puede deberse a diferencias en la composición de los biovidrios y la cinética de las reacciones en su superficie.

Una explicación biológica para el efecto estimulante de un pH alcalino en la diferenciación de los osteoblastos concierne a la regulación de las comunicaciones intercelulares por medio del “gap junction”. Yamaguchi et al (280) han demostrado que hay mayor número de gap junction en un pH alcalino en la línea celular osteoblástica MC3T3-E1. Las comunicaciones gap junction parecen tener un papel clave durante la condensación celular que precede la diferenciación a osteoblastos tanto *in vivo* como *in vitro* (281). El incremento de pH local observado en el lecho de implantación de los animales de experimentación de nuestro estudio, pudo aumentar las comunicaciones gap junction, incrementando de ese modo la diferenciación osteoblástica.

Algunos autores han relatado como ciertos biovidrios liberan silicio soluble inmediatamente a la exposición del biovidrio a una solución *in vitro* o a fluidos corporales (107, 282). Se sabe, por ejemplo, que el silicio tiene un papel estructural importante en la formación de enlaces entre el colágeno y los proteoglicanos durante el crecimiento óseo (283).

Podemos realizar la hipótesis de que el efecto estimulador del material en la diferenciación de los osteoblastos está causada por una superficie química dinámica que proporciona un estímulo extracelular a las células y un ambiente extracelular compatible con la adsorción y la actividad biológica de las moléculas.

MINERALIZACIÓN DE LA MATRIZ Y OSTEOGÉNESIS POR CONTACTO

Otro importante hallazgo de este estudio confirma la capacidad del material compuesto de formar tejido óseo mineralizado. Los implantes bioactivos tienen diferentes tasas de capacidad de unión dependiendo de su composición mayoritaria. Por ejemplo, compuestos con más del 60 % de SiO₂ no se unen al hueso. El presente estudio confirma este dato y muestra la evidencia del depósito de sales minerales tipo Brushita en la superficie del material compuesto pero no el en BV-11. Este hecho es sorprendente porque la diferenciación a osteoblastos y la formación de depósitos de sales minerales tipo Brushita podría ocurrir en el BV-11. Por consiguiente, el material compuesto no solo parece favorecer la diferenciación a osteoblastos, sino que además favorecería la osteogénesis por contacto.

Por el contrario, no se encontraron depósitos de sales minerales tipo Brushita en la superficie del BV-11 tras la preparación de la pieza para el estudio microscópico.

Las imágenes de microscopía de depósitos de sales minerales tipo Brushita en la superficie del material compuesto, y el análisis de calcio, fósforo y silicio evidencian la capacidad del material compuesto de establecer vínculos con el hueso. En nuestro estudio, se confirmó que la superficie bioactiva estaba compuesta por calcio y fósforo y estaba cristalizada. Además, se fusionaron fibras de colágeno con esta capa, las cuales parecen actuar como un núcleo para los cristales. Tal y como las observaciones sugieren, en los estadios iniciales de la osteogénesis, los focos de calcificación podrían servir de puente

para las fibras de colágeno y de ese modo crear un tejido mineralizado óseo continuo y permitir la fusión con la capa de la superficie del material compuesto. Hench y Paschall (106) fueron los primeros en demostrar la capacidad de adherencia de los vidrios bioactivos por interdigitación de las fibras de colágeno con el material de la superficie. Ahora, hemos observado mediante estudio microscópico que la biomineralización puede iniciarse en una capa bioactiva que actúa como un núcleo en la superficie para cristales biológicos y por lo tanto sirve como plantilla para la organización de la matriz, concepto que Loty (273) describió como osteogénesis por contacto. Richard y cols (284) mostraron mediante estudios con microscopio electrónico que los implantes de fosfato cálcico fomentan un depósito de cristal epitelial, lo que respalda los datos de este trabajo

Meseguer-Olmo y cols presentaron un material con una composición muy semejante a al biovidrio utilizado en nuestro estudio, 55SiO_2 41CaO $4\text{P}_2\text{O}_5$, que mostró una rápida bioactividad in vitro relacionada con la formación de una capa de apatita en su superficie, a los 3 días de su inmersión en fluido corporal simulado (SBF) (285-288). Esta capa es esencial para la unión química primaria del material en el tejido óseo receptor después de implantarse. De igual modo, la capa apatítica formada junto con la liberación iónica de Si, Ca, P, Na al medio puede afectar a la respuesta celular al igual que la alcalización del medio, causada por la liberación de Na (285).

En resumen, parece haber una mejor expresión de los osteoblastos en el material compuesto comparado con el biovidrio estudiado. Además, se puede iniciar la mineralización sobre el material compuesto, que sirve como núcleo y plantilla para la organización de una matriz sobre la que potencialmente podría generarse tejido óseo.

ESTUDIO MECÁNICO

- Biovidrio:

Las propiedades mecánicas del biovidrio, tanto la resistencia a flexión como el módulo de elasticidad, no presentan diferencias significativas en las distintas series ensayadas, aunque el pequeño número de probetas en cada serie impide realizar un tratamiento estadístico exhaustivo de los resultados. Sin embargo, los resultados indican que las propiedades mecánicas del material no varían con el tiempo de disolución. Este hecho se debe a que la disolución del biovidrio se efectúa superficialmente, con la formación de una capa de reacción hidratada en la superficie del material desde la cual se va disolviendo el vidrio uniformemente. Por tanto, el interior del material no está afectado por la disolución, lo que explica que las propiedades se mantengan con el tiempo de implantación. Por otra parte, cabe destacar que los valores de módulos de elasticidad encontrados para el biovidrio testado (BV11), que se sitúan alrededor de los 50 GPa, están en el mismo rango de magnitud que los valores habitualmente observados para el hueso cortical ($E=7-30$ GPa) y para biocerámicas y vidrios bioactivos comerciales por lo que el BV-11 aparece, desde el punto de vista mecánico, como un buen candidato para su potencial aplicación en la reparación del tejido óseo (271).

Como posibilidad podrían diseñarse implantes en forma de agujas para la fijación de osteotomías no sujetas a cargas mecánicas importantes. Se han descrito resultados satisfactorios en su utilización en fracturas de radio distal como apoyo a la osteosíntesis (118, 289).

Los vidrios bioactivos poseen mayor resistencia mecánica que los productos a base de

fosfato cálcico, como resultado de la fuerte unión entre hueso e implante (290). Por ejemplo Cortoss®, un biovidrio utilizado en Holanda principalmente, tiene una resistencia a la compresión de 91-179 MPa, con una resistencia a la fractura de 8,4 MPa, significativamente mayor que los cementos óseos de polimetilmetacrilato (291, 292). El fabricante de este material refiere que tiene un módulo de Young de 6400 MPa, pero no se ha demostrado en otros estudios (118).

- Material compuesto:

Sin embargo, el módulo de Young y la resistencia a flexión disminuyen rápidamente con el tiempo de implantación del material compuesto. En efecto, los resultados muestran una disminución de ambos parámetros tan solo después de dos semanas de implantación. Posteriormente, las propiedades tienden a estabilizarse, situándose los valores después de 16 semanas de implantación en el mismo rango de magnitud que después de dos semanas de implantación. La evolución del comportamiento mecánico del material compuesto con el tiempo de implantación se puede explicar por una falta de adhesión entre las partículas y la matriz. Este hecho limita el efecto reforzador de las partículas de vidrio y explica la rápida pérdida de las propiedades mecánicas del material. Estos resultados sugieren la utilización de este material compuesto en el relleno de defectos óseos y cavidades, así como en la vehiculización de sustancias (271).

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La evolución del comportamiento mecánico del material compuesto con el tiempo de implantación se puede explicar mediante el análisis por microscopía electrónica de la superficie de fractura del material.

La reacción rápida de las partículas de vidrio, con la formación de estructuras huecas y el crecimiento de cristales en forma de agujas en el interior del material explica la rápida pérdida de las propiedades mecánicas del material.

Los cristales en forma de agujas que aparecen en las partículas de vidrio y se desarrollan en todo el material sugieren ser cristales de Brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), un fosfato cálcico estable en pH ácidos.

PLANTEAMIENTO DE LA FASE OSEA

Tras el análisis de los resultados hasta aquí expuestos, y con la finalidad de testar *in vivo* el material compuesto, proponemos la continuación del trabajo experimental de acuerdo a lo que sugieren nuestros resultados. Para ello diseñamos esta segunda parte del trabajo mediante la creación de un defecto óseo de proporciones limitadas para ver el comportamiento del material compuesto como posible sustituto óseo.

OBJETIVO

El objetivo de esta fase es el estudio *in vivo* del material compuesto aplicable a la sustitución, reparación o relleno de defectos óseos limitados.

MATERIAL Y MÉTODO FASE ÓSEA

1. Material de experimentación

Se ha elegido como animal de experimentación el conejo Nueva Zelanda adulto 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. Se utilizaron diez conejos machos esqueléticamente maduros de nueve meses de edad. El tamaño de las extremidades permitió la realización de la intervención quirúrgica que se describe a continuación.

Los animales de experimentación, procedentes de una granja homologada de cría, fueron estabulados en jaulas individuales en las dependencias del Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza una semana antes de la intervención, para ser identificados, medidos y pesados y proceder a su aclimatación preoperatoria. La estabulación se realizó en condiciones normales de temperatura ambiental ($20^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$), y humedad relativa ($55\% \pm 5\%$), con periodos alternantes de luz-oscuridad de 12 horas, siendo alimentados con pienso homologado Nanta®, ingesta de agua *ad libitum* y sin restricciones 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 25: Detalle de la vía de abordaje.

2. Anestesia, analgesia y técnica quirúrgica.

La inducción anestésica se realizó mediante inyección intramuscular de Ketamina (75 mg/kg), continuándose con una anestesia general inhalatoria (Oxígeno a 0.8 l/min. e Isoflurano a 1.5 l/min). La analgesia se mantuvo mediante inyección subcutánea de Buprenorfina (0.001–0.05 mg/kg). La intervención quirúrgica se llevó a cabo en condiciones quirúrgicas de asepsia y antisepsia, utilizando una profilaxis con Cefazolina intramuscular (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 (132-134).

Las incisiones se suturaron con seda trenzada de calibre 000.

3. Segmento óseo

Se escogió el fémur del conejo por su semejanza anatómica con el fémur humano y su fácil accesibilidad. Se practicó un defecto óseo en la cara lateral de ambas epífisis femorales distales con broca motorizada de 5 mm de diámetro. La profundidad del defecto óseo fue de 10 mm. En el fémur izquierdo, el defecto óseo se rellenó con el material compuesto biodegradable objeto del estudio en forma de gránulos (Figura 30). El fémur derecho sirvió como control.



Figura 26: Broca motorizada de 5 mm en cara lateral de epífisis del fémur.

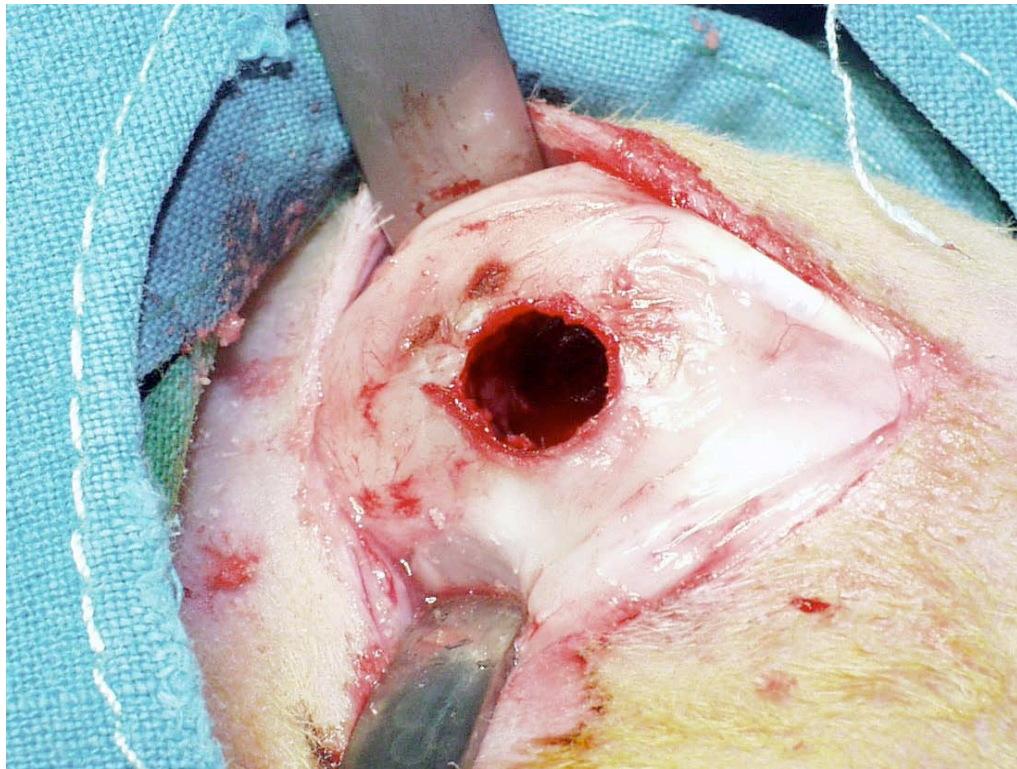


Figura 27: Detalle intraoperatorio del defecto óseo en la cara lateral de la epífisis del fémur.

Los animales se mantuvieron estabulados durante cuatro meses.

4. Material implantado

El fémur derecho se utilizó como control, sin relleno de ningún material. El material implantado fue elaborado en el Departamento de Ciencia de los Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Cataluña. Su composición y características, que contiene una matriz de ácido poliláctico y partículas de refuerzo de vidrio bioactivo, se recogen en la Tabla 10. El material en forma de gránulos irregulares con diámetros comprendidos entre los 2 y 5 mm, permitía el relleno de la cavidad ósea a tratar.

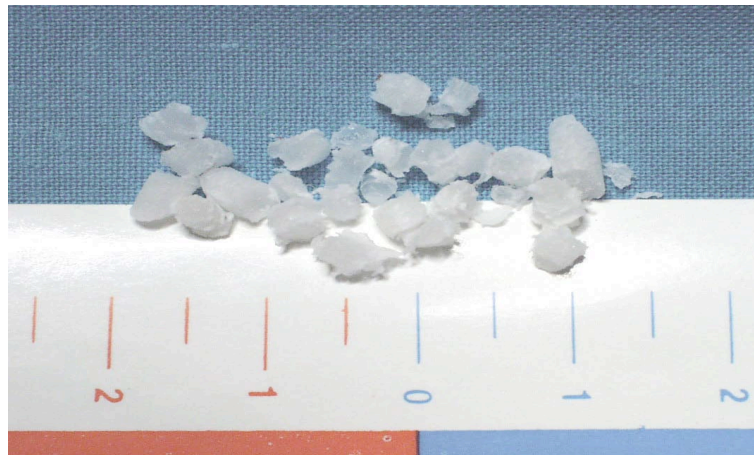


Figura 28: Visión macroscópica del implante.

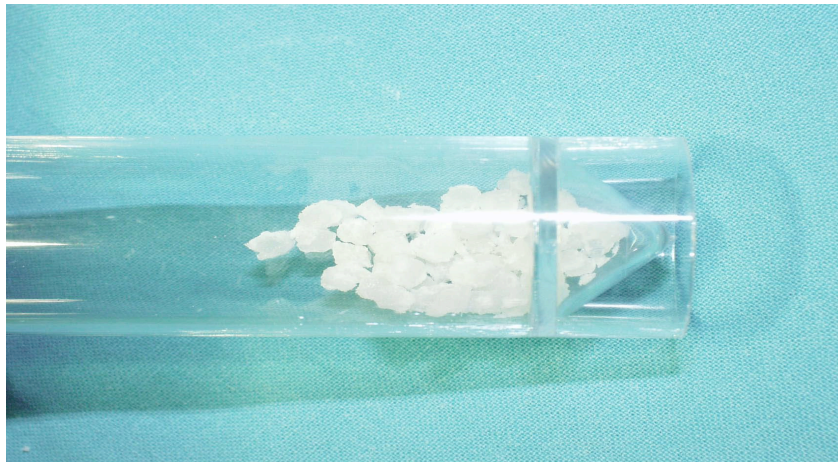


Figura 29: Detalle macroscópico del biovidrio objeto de estudio antes de su implantación.



Figura 30: Aspecto intraoperatorio del defecto óseo femoral izquierdo tras ser rellenado con los gránulos del material compuesto.

5. Estudios complementarios.

Al igual que en la fase subcutánea, como estudios complementarios se realizaron determinaciones analíticas de fosfatasa alcalina y creatinina en sangre periférica cada dos semanas. Para dicha extracción se canalizó la vena marginal de uno de los pabellones auriculares de los animales previamente sedados con Ketamina intramuscular (25 mg/kg).

Así mismo se realizaron radiografías en proyección lateral de ambos fémures. En cada una de las radiografías se procedió a la valoración del comportamiento del hueso receptor, así como del implante. Se realizó una valoración comparativa entre el fémur con implante en el defecto y el contralateral.

6. Eutanasia. Estudio necrópsico.

Llegado el momento de la muerte de los animales, se les administraron 5 ml de Tiobarbital por vía intravenosa, previa sedación con Ketamina intramuscular (25 mg/kg). Tras el sacrificio de los animales se extrajeron los fémures en bloque, liberándolos de partes blandas, para examinarlos macroscópicamente. Las piezas fueron fotografiadas realizando un estudio macroscópico comparativo entre los dos grupos.

Posteriormente se conservaron en formol hasta su procesamiento histológico y estudio morfométrico. Este estudio se realizó en el Servicio de Cirugía experimental del Instituto Ortopédico Rizzoli de Bolonia. En este Instituto fueron deshidratados en series graduales de alcohol del 50% al 100%, y se incluyen en metilmetacrilato (Merck Schuchardt OHG, Alemania). Se obtuvieron secciones longitudinales de 40 ± 10 micras mediante un sistema de corte en grano (Exact GMBH Apparatebau, Norderstedt, Alemania) y se tiñeron con Azul de Toluidina - Ácido fucsina - verde rápido.

La evaluación histomorfométrica se realizó con Software Kontron KS 300®, utilizando un PC y un microscopio Zeiss Axioscop con una cámara de JVC en dos secciones para cada muestra.

La osteointegración se evaluó en la cara interna hueso/material, a lo largo de todo el perímetro del material implantado. El índice de afinidad se calculó como el cociente entre: longitud del contacto óseo/longitud del perímetro del material compuesto x 100.

Durante el estudio se observó estrictamente la normativa europea y española sobre la experimentación animal (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).

RESULTADOS FASE ÓSEA.

Postoperatorio.

Todos los animales cumplieron el tiempo de seguimiento previsto. No se observaron efectos locales de irritación tisular, supuración o drenaje desde el lugar de implantación, ni se produjeron fracturas durante todo el seguimiento postoperatorio de los animales.

Resultado de las analíticas practicadas.

Las Tablas 21 y 22 recogen los resultados de los valores de creatinina y fosfatasa alcalina respectivamente, durante el tiempo del estudio. Estos parámetros no mostraron variaciones significativas durante el tiempo de estudio.

Tabla 21: Valores de la creatinina en sangre periférica (ui/l) en la fase ósea.

Animal	Preop.	2 Sem	4 Sem	6 Sem	8 Sem	10 Sem	12 Sem	14 Sem	16 Sem
O1	1,2	1,2	1	1,3	1,2	1,3	1,2	1,3	1,8
O2	1	0,9	1,1	1,1	1	1,1	1,1	1,1	1,1
O3	0,9	0,8	0,8	0,7	1	1	0,9	0,9	1
O4	0,9	1,1	1,2	1,1	1	1	1,2	1,1	1,1
O5	1	1,1	1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	1,2
O6	0,8	1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,3
O7	1,2	1	1,3	0,9	0,7	1,3	1,2	1,2	1,4
O8	1	1	1	1,1	1	1,1	1,1	1	1
O9	1	1	1,1	1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2
O10	0,8	0,9	0,5	0,9	0,9	1	1	1,1	1,1

Preop: valor en el preoperatorio; Sem: semanas de seguimiento.

Tabla 22: Valores de fosfatasa alcalina en sangre periférica (ui/l) en la fase ósea.

Animal	Preop	2 Sem	4 Sem	6 Sem	8 Sem	10 Sem	12 Sem	14 Sem	16 Sem
O1	26	38	31	38	38	38	29	34	31
O2	31	29	30	38	29	28	26	25	22
O3	57	51	58	54	43	57	51	60	45
O4	30	35	52	55	34	47	33	46	47
O5	28	26	26	30	30	31	42	39	48
O6	26	24	33	27	25	26	25	23	19
O7	72	63	107	053	028	259	165	121	122
O8	50	47	71	62	57	52	58	40	46
O9	69	47	71	82	78	78	62	64	81
O10	51	44	44	51	38	44	30	39	37

Preop: valor en el preoperatorio; Sem: semanas de seguimiento.

Estudio radiográfico

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 (Figura 31).

En cambio, el estudio radiográfico seriado demostró una osificación progresiva del defecto óseo relleno con los gránulos del material compuesto en los fémures izquierdos.

En el postoperatorio inmediato resultaba posible distinguir someramente la morfología de los gránulos sobre el material compuesto, mientras que 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 (Figura 32).



Figura 31: Serie radiográfica. Animal O1. Fémur derecho (control). A) Postoperatorio inmediato. B) Dos meses del postoperatorio. C) Cuatro meses del postoperatorio.

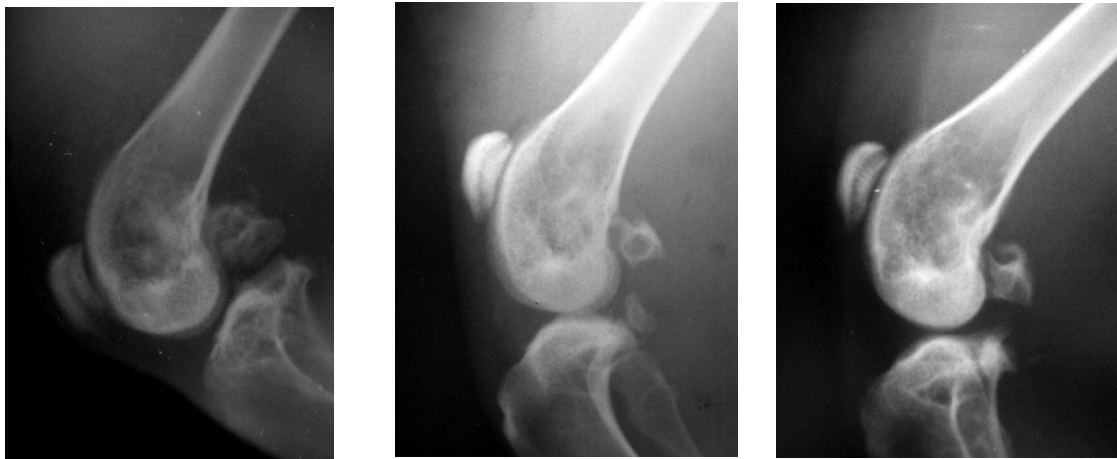


Figura 32: Serie radiográfica. Animal O1. Fémur izquierdo (material compuesto). A) Postoperatorio inmediato. B) Dos meses del postoperatorio. C) Cuatro meses del postoperatorio.

Estudio necrópsico

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. Ocasionalmente, se observó el relieve de alguno de los gránulos del material compuesto implantado en el defecto óseo de los fémures izquierdos (Figura 33). No se observaron signos de infección, ni inflamación regional ni adenopatías en los tejidos circundantes.

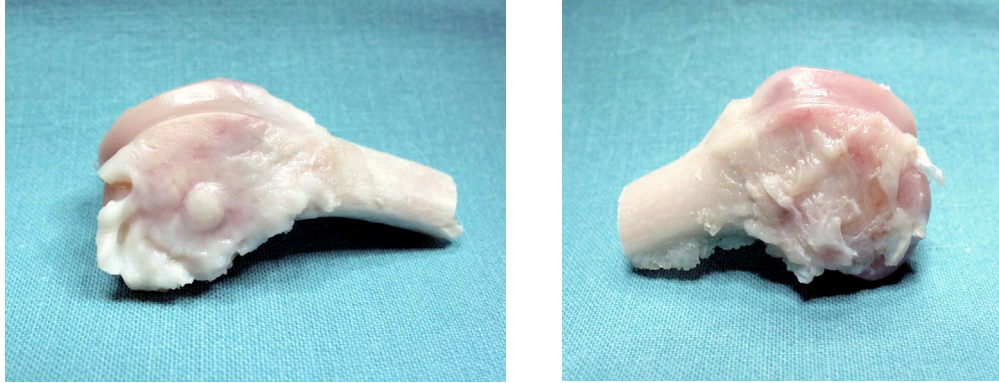


Figura 33: Estudio necrópsico. Animal O1. A) Fémur izquierdo (material compuesto). Obsérvese la aparición de una porción del material compuesto implantado a través de la superficie ósea en el fémur izquierdo. B) Fémur derecho (control)

Estudio histológico y resultados morfométricos

FÉMUR DERECHO. CONTROL

El estudio histológico mostró una mínima reparación espontánea del interior del defecto óseo creado en todos los fémures derechos (controles), pudiendo observarse la reparación del orificio en la cortical, pero sin acompañarse del relleno de la cavidad ósea por hueso esponjoso (Figura 34).

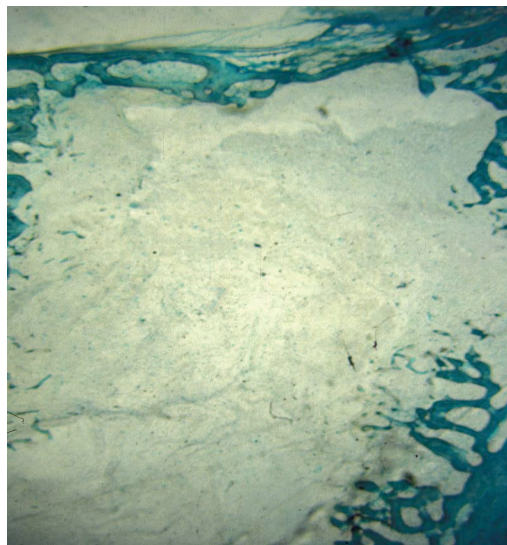


Figura 34: Estudio histológico del fémur derecho (control) del animal O1 a los cuatro meses del postoperatorio (azul de toluidina). Obsérvese la ausencia de relleno óseo de la cavidad.

La tabla siguiente recoge los valores del diámetro transversal (\varnothing) del defecto residual, medidos en cada caso en la mínima distancia entre extremos:

Tabla 23. Diámetro del defecto (mm)

Animal	Fémur derecho (\varnothing en mm)
1	5,3
2	5,8
3	5,8
4	5,5
5	5,6
6	6,0
7	5,8
8	6,1
9	6,3
10	5,8

FEMUR IZQUIERDO. MATERIAL COMPUESTO

Los defectos óseos tratados con gránulos del material compuesto mostraron un abundante crecimiento óseo sobre la superficie del material, en íntimo contacto con el mismo, y tendente a rellenar los intersticios entre los gránulos, con una excelente osteointegración. Ocasionalmente, los gránulos sobresalieron de los límites del defecto óseo a través de la cortical reparada, en el espesor del periostio (Figura 35).

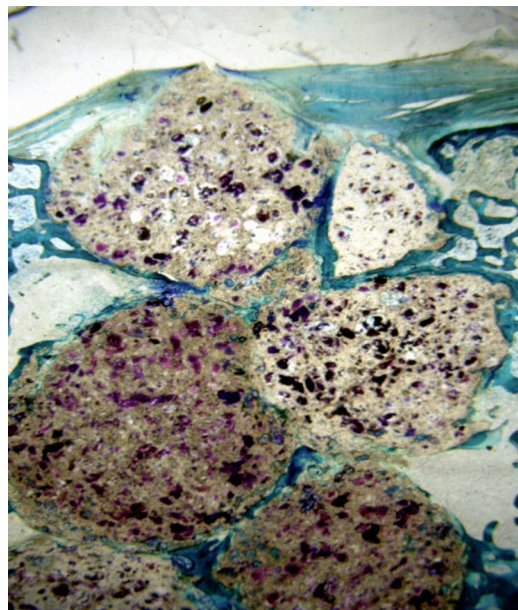


Figura 35: Estudio histológico del fémur izquierdo (material compuesto) del animal O1 a los cuatro meses del postoperatorio (azul de toluidina). Obsérvese el crecimiento óseo sobre la superficie del material rellenando sus intersticios.

El biomaterial fue reconocible en todos los casos, con mínimos cambios sugerentes de degradación o reabsorción tras cuatro meses de seguimiento.

Se midió el área de biovidrio en el defecto óseo, recogiendo los datos de la tabla 2.

Tabla 24. Área del biovidrio (mm²)

Animal	
1	59,6
2	45,5
3	39,8
4	38,2
5	56,1
6	39,2
7	43,9
8	46,7
9	50,7
10	31,4

Se observó hueso neoformado entre los gránulos de biovidrio. La osteointegración se evaluó en la intercara hueso/material, a lo largo del todo el perímetro del biovidrio. El índice de afinidad se calculó como el cociente entre: longitud del contacto óseo/longitud del perímetro del biovidrio x 100, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 25. Índice de afinidad (%)

Animal	
1	30,2
2	42,5
3	69,6
4	51,4
5	68,3
6	52,5
7	46,8
8	61,1
9	60,0
10	30,9

Finalmente, el diámetro del defecto residual se midió en cada caso como la mínima distancia entre los extremos, también en el fémur izquierdo incluso si el biovidrio ocupaba todo el área del defecto, con los siguientes resultados:

Tabla 26. Diámetro del defecto (mm)

Animal	(∅ en mm)
1	3,9
2	4,9
3	5,7
4	5,2
5	5,7
6	4,7
7	5,7
8	3,2
9	3,6
10	4,6

DISCUSIÓN FASE ÓSEA

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

Como hemos señalado, los biomateriales corresponden a todos aquellos materiales, elementos, sustancias o compuestos, elaborados con componentes naturales o artificiales, que pueden implantarse en un organismo vivo para reemplazar o reparar un tejido natural lesionado o irreversiblemente dañado, entre otros el tejido óseo.

Análisis del modelo experimental.

Se escogió como animal de experimentación el conejo macho de raza Nueva Zelanda adulto por ser un animal utilizado habitualmente en diferentes modelos experimentales sobre biomateriales reabsorbibles, así como la gran facilidad de obtención de una muestra homogénea. Trabajar con este animal supone un coste aceptable y requiere una infraestructura disponible en la mayoría de los quirófanos de cirugía experimental.

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 (56-58, 60).

El modelo experimental empleado en este trabajo es similar al modelo descrito por Katthagen el año 1986, demostrando que un defecto cavitario de 6 mm de diámetro realizado en la metáfisis femoral distal del conejo adulto de raza Nueva Zelanda no se repara espontáneamente, por lo que la regeneración ósea que se puede observar debe ser necesariamente atribuida al sustitutivo óseo implantado (9, 293). Otras razones para realizar el estudio sobre la metáfisis distal del fémur son su fácil accesibilidad y su semejanza anatómica al fémur humano. El diámetro de nuestro defecto óseo era de al menos 5 mm (diámetro de la broca) y en su evolución no demostró capacidad de regeneración completa espontánea, en los fémures derechos (control) que mostraron una reparación del orificio cortical pero no del defecto óseo epífisometafisario. Similares observaciones se han constatado por el equipo investigador en anteriores trabajos experimentales (56-58, 60).

La creación del defecto cavitario metafisario distal modifica las condiciones biomecánicas del cóndilo femoral medial del conejo, ya que destruye más del 50 % del tejido óseo de este segmento aumentando el riesgo de fractura. En su serie Katthagen describe esta complicación en el 1.2 % de los casos. Para evitar esta complicación se debe efectuar un correcto centrado del orificio, lo que se puede facilitar marcando el sitio correspondiente con un punzón, antes de realizar el orificio con la broca, realizando así el defecto cavitario buscado (9, 293). En este trabajo no hemos tenido ninguna fractura

condílea, ni en otros trabajos anteriores realizados por el equipo investigador (56-58, 60).

Como periodos de estabulación de los animales antes de la eutanasia se programaron 16 semanas, teniendo presente los estudios realizados por Katthagen 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 lado, 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 (9, 293).

Considerando lo expuesto, se utilizaron diez animales de experimentación, a los que se les realizó un defecto cavitario en ambas metáfisis femorales distales, permaneciendo estabulados durante 16 semanas hasta la eutanasia realizándose mediciones seriadas de los parámetros estudiados. Todo esto ha permitido valorar la evolución de los biomateriales 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 de la cefazolina cubre gérmenes Gram positivos, como el Estafilococo dorado y el Estreptococo, responsables habituales de infecciones quirúrgicas.

La extrapolación de los resultados obtenidos en animales de experimentación a la especie humana siempre resulta discutible, ya que se ha demostrado que el proceso de regeneración ósea es más rápido en el conejo. Sin embargo, consideramos que los resultados logrados tienen validez y permiten conseguir conclusiones fiables dado que el modelo experimental empleado ha demostrado su utilidad en trabajos previos (56-58, 60) y se ha empleado como control el fémur contralateral del animal de experimentación. De esta forma, las diferencias determinadas entre los grupos estarán relacionadas con las propiedades biológicas de los implantes utilizados, ya que las demás variables del experimento son constantes y controladas (293).

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 (229). Al comenzar a estudiarse las proteínas óseas morfogenéticas (BMPs) en la inducción ósea, se vio que en estudios con modelos experimentales pequeños (ratas o roedores) se requerían dosis mucho menores para puentear defectos óseos, comparados con mamíferos grandes (perros, ovejas, monos). Esta mayor habilidad de puentear defectos óseos en conejos y roedores respecto a animales mayores se cree que es debida a un incremento en el número de respuesta celular tanto en el hueso como en las partes blandas cercanas al mismo y a un mayor rango de regeneración ósea. Este hecho explica el fallo de algunos vehículos de liberación de proteínas osteoinductoras en roedores y conejos debido a que su permanencia prolongada puede interferir con la rápida formación ósea en este modelo de animales. Este hallazgo por el contrario, supondría una ventaja en modelos animales grandes, donde la regeneración ósea no es tan rápida (60, 294). En nuestro estudio se ha usado como control el fémur contralateral para evitar este tipo de controversias.

Los numerosos grupos de investigación en el campo de los biomateriales han diseñado y aplicado para su evaluación preclínica diversos modelos de defectos óseos segmentarios en diferentes especies animales. Coincidimos con Meseguer Olmo y cols (285) en que para

poder comparar los diferentes estudios y tomarlos como base para desarrollos posteriores, y especialmente con vistas a su traslación a la clínica, es esencial que tanto el modelo animal como el dispositivo de fijación, la técnica quirúrgica, el método de cuantificación, etc. sean aspectos estandarizados. Si revisamos la literatura médica podemos darnos cuenta de que la mayoría de los modelos preclínicos utilizados para el estudio de defectos óseos críticos no están suficientemente descritos y estandarizados debido a que cuando se selecciona un modelo animal (rata, conejo, oveja, perro, minicerdo, etc.) no se tienen en consideración diversos factores relacionados con analogías fisiológicas y fisiopatológicas del humano (edad, sexo, microestructura ósea, tasa de metabolismo, etc.). Aunque todos ellos aportan un número de ventajas e inconvenientes, creemos que la elección del modelo debe ajustarse para dar respuesta a una cuestión concreta, sin infravalorar otros factores, como coste, mantenimiento, manejabilidad, tamaño esquelético, viabilidad, aceptación social, tolerancia a la cautividad, estabulación, etc. 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 (285, 295) así como por la experiencia acumulada por el equipo investigador con este modelo experimental (56-58, 60).

ANÁLISIS DE LOS ESTUDIOS ANALÍTICOS.

Tras cuatro meses de implantación intraósea en conejos, y al igual que lo observado anteriormente tras su implantación subcutánea en el mismo animal de experimentación (260, 272), el material testado no provocó alteraciones del metabolismo fosfocálcico ni se acompañó de signos indirectos de nefrotoxicidad. Sin embargo tras dicho periodo, no se observaron signos de degradación o reabsorción del material implantado, por lo que sería necesario conocer el tiempo necesario para su completa reabsorción.

Navarro y cols evaluaron la toxicidad de dos biovidrios, el G0 y el G5, mediante un estudio experimental en conejos. Ambos biomateriales fueron bien tolerados por el tejido huésped y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el hueso formado y la toxicidad de ambos biovidrios (54).

Xie y cols. implantaron un compuesto de biovidrio, colágeno, ácido hialurónico y fosfatidilserina en un defecto óseo realizado en radio de conejo. Observaron ausencia de toxicidad tanto local como sistémica de dicho compuesto (296).

En algunos estudios *in vitro* (285, 297) se ha determinado la osteocalcina ya que es un marcador bioquímico de uso frecuente en la determinación de la funcionalidad de los osteoblastos, al igual que la producción de fosfatasa alcalina y colágeno tipo I. Sin embargo, la producción de osteocalcina es una característica exclusiva de los osteoblastos, y se considera el procedimiento más sensible y específico en estudios *in vitro*. En nuestro estudio no utilizamos la medición de la osteocalcina por tratarse de un estudio *in vivo*.

ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL ESTUDIO NECRÓPSICO.

En el estudio macroscópico de los fémures encontramos que el material compuesto en forma de gránulos implantado en los defectos óseos practicados aparecía recubierto en prácticamente toda su superficie de una capa semejante a una cortical recubierta de periostio, sin solución de continuidad. Este recubrimiento tenía un aspecto homogéneo. Los defectos cavitarios experimentales rellenos con biomaterial presentaban tejido óseo distinguible en el área de implantación. En ninguna de estas muestras observamos tejido de

carácter conjuntivo fibroso reemplazando al material compuesto implantado. Las piezas permanecieron estables durante la manipulación.

No había signos de respuesta inflamatoria, ni tejido conjuntivo fibroso de interposición entre los gránulos del biomaterial y el hueso.

En todos los fémures del grupo control, sin biomaterial, se observó una pequeña reparación espontánea a nivel cortical poco consistente que hacía intuir la falta de relleno de la cavidad ósea por hueso esponjoso.

No se observaron signos de infección ni en las heridas quirúrgicas ni en los fémures, tanto en los rellenados con el biomaterial como en los no rellenados. Este hecho confirma la efectividad de las medidas de asepsia tomadas durante la intervención y de la profilaxis antibiótica con cefazolina intramuscular.

Hench describió en 1994 la bioactividad de un material como la capacidad de formación de una capa de hidroxapatita sobre su superficie, de estructura análoga a la fase inorgánica del hueso, al entrar en contacto con los fluidos corporales. Podemos confirmar por tanto, la bioactividad del material compuesto implantado. Este hecho había sido observado previamente en la fase subcutánea de este trabajo (8).

ANÁLISIS DEL ESTUDIO RADIOLÓGICO.

Las imágenes radiográficas demostraron evidencias de reparación en el interior de los defectos óseos en los que se utilizó el material compuesto objeto de estudio, a diferencia de los defectos óseos controles, en los que solo se observó la reparación de la cortical a expensas del periostio circundante.

La evaluación radiológica de la regeneración ósea generada por biomateriales tiene como inconveniente principal la subjetividad del observador y la limitada información final que proporciona. Por otro lado, 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.

Existen numerosos trabajos que han utilizado este modelo experimental y han demostrado que el estudio radiológico es limitado y, aunque existe correlación entre la neoformación ósea radiológica y el área trabecular total, hecho que confirmamos en este estudio, se desaconseja formular conclusiones en base a él (9 , 56-58, 60, 298-301).

Por otra parte, para cuantificar el defecto, el dato determinante es el volumen del mismo, no solo el diámetro del defecto. En nuestro estudio hemos utilizado una broca de 5 mm, a diferencia de otros estudios que la utilizaron de 6mm, y la profundidad ha sido de 10 mm. En los estudios anteriormente referidos no encontramos la profundidad, y por tanto el volumen exacto del defecto, lo que supone una limitación a la hora de comparar ambos defectos.

Existen diversas escalas para cuantificar la formación ósea y la remodelación en defectos sustituidos con injertos óseos. La escala de Lane y Sandhu asigna una puntuación de 0 a 4 en función de la neoformación ósea porcentual (302). Yasco y cols. (303) han propuesto una escala de gradación radiológica que se basa en la determinación del puenteo de las corticales de los extremos del defecto, la intensidad del hueso neoformado y la visualización de las líneas del defecto óseo, permitiendo establecer comparaciones

interobservadores.

El crecimiento óseo en los defectos tratados con material compuesto era homogéneo, sin apreciarse radiolucencia entre el defecto y el hueso, lo que expresa la íntima relación establecida entre los límites del defecto y el implante. No hubo signos de deformidad ni fragmentación del implante cumpliendo de este modo dos de los requerimientos de Bauer y Muschler (89) respecto a la remodelación de un material sintético capaz de sustituir al hueso, que debe ser capaz de soportar cargas mecánicas del lugar donde se implanta sin deformarse ni romperse. Sin embargo, tampoco se pudieron observar signos radiológicos de reabsorción del implante que aunque íntimamente unido a la capa ósea que se formó sobre él, aparecía definido con una densidad radiológica diferente del hueso adyacente. En estudios anteriores de Gil Albarova y cols. (56-58, 60) los discos de vidrio que rellenaban un defecto metafisario limitado aparecían más engrosados, fragmentados y desfigurados que los discos de vitrocerámica, atribuyendo esta diferencia a la mayor bioactividad, correlacionada con mayor rapidez de formación de la capa de hidroxiapatita y mayor rango de biodegradación. Esta diferencia con nuestros hallazgos puede explicarse por la diferente composición del biomaterial, la diferente forma y tamaño del compuesto, y la definición de la imagen radiológica.

Las principales utilidades del estudio radiológico son descartar complicaciones intercurrentes como fracturas asociadas, detectar migración del implante, apreciar la reabsorción del implante o detectar calcificaciones extraóseas. En nuestro estudio no observamos ninguna de estas complicaciones.

Las técnicas de imagen han tomado un papel cada vez más importante en la caracterización rigurosa de un las propiedades y funciones de un biomaterial. Las sofisticadas tecnologías de imagen en dos dimensiones se han desarrollado para complementar la evaluación histológica e investigar los complejos sucesos biológicos que suceden en la interfase entre el tejido y los biomateriales. Sin embargo, existe una clara necesidad de tecnologías 3D en alta resolución que revelen la distribución espacial de la formación de los tejidos en los poros de los biomateriales in vitro e in vivo. Además, para la regeneración de tejidos vascularizados como el óseo o el muscular, la capacidad de cuantificar el crecimiento vascular en 3D sería tremendamente útil, particularmente para estudios que exploran la potencial mejora de regeneración mediante estrategias de angiogénesis terapéutica.

La resolución que se requiere para analizar la síntesis de un tejido y el crecimiento vascular en los poros del interior del biomaterial está en el rango de 1-30 μm . La modalidad de imagen más comúnmente utilizada para este propósito, particularmente en los estudios de ingeniería de tejidos, es la microtomografía computerizada (micro-TAC o micro-CT). El micro-TAC proporciona rápidas reconstrucciones de imágenes 3D de alta resolución y un análisis volumétrico de rayos X atenuando materiales o tejidos.

Guldberg y cols. (304) han realizado un estudio para visualizar y cuantificar la infiltración de estructuras vasculares en el biomaterial utilizando el análisis de micro-TC 3D combinado con la perfusión de contraste. Estos autores han utilizado por primera vez en la literatura la imagen de micro-CT in vivo para evaluar el crecimiento vascular en el interior del biomaterial salvando dificultades asociadas con el nivel de contraste, resolución, segmentación, o tiempo límite circulatorio. Señalan como inconveniente del uso de repetidos escáneres de alta definición in vivo el potencial efecto de la radiación ionizante en la actividad celular durante el proceso de reparación (305). En nuestro trabajo no hemos utilizado micro-TC ni la perfusión de contraste por no tener acceso a la

tecnología necesaria en nuestro medio.

Renghini y cols (306) desarrollaron y caracterizaron un andamio de biovidrio para ingeniería de tejidos óseos. Realizaron estudios mediante micro-CT, con capacidad de resolución espacial de $1 \mu\text{m}^3$. Los autores proponen el micro-CT como un excelente método no destructivo para analizar la estructura interior, la porosidad total, el tamaño de los poros, su distribución y la morfología de los andamios para la ingeniería de tejidos. Este método de caracterización estructural es superior al resto de técnicas de análisis de porosidad convencionales. Además, la micro-CT es la única técnica no invasiva capaz de analizar el crecimiento dentro del andamio y monitorizar los cambios en la morfología de los poros a lo largo del tiempo, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Saldaña y cols (307) realizaron un estudio para examinar la evolución radiográfica del un implante de células mesenquimales derivadas de la grasa y diferenciadas a osteoblastos. Para ello realizaron un defecto en el cóndilo medial femoral bilateral de ovejas. El defecto óseo cavitario se creó de 13 mm de diámetro y 11 mm de profundidad, siguiendo el modelo experimental de Walsh (308) A diferencia de otros trabajos, Saldaña y Walhs especifican la profundidad del defecto creado, aunque al tratarse de un animal diferente, la oveja, no es comparable al utilizado en nuestro trabajo, el conejo, con un fémur de menor tamaño.

Realizaron controles radiográficos tras la intervención y a las 4 y 12 semanas. Para su valoración aplicaron la escala de Lane y Sandhu (302), que se muestra en la figura 36 y la tabla 27.

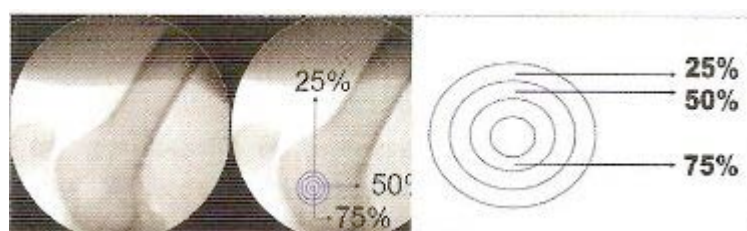


Figura 36: Esquema de los círculos concéntricos estimados para el cálculo del porcentaje de formación ósea

Formación ósea:	Puntuación
- No evidencia de formación	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 todo el defecto	4
Remodelación	
- No evidencia de remodelación	0
- Indicios en de remodelación en canal intramedular	2
- Remodelación completa hasta la cortical	4

Tabla 27: Escala de Lane y Sandhu (302)

Encontraron resultados discordantes entre la regeneración ósea real y la señalada por los resultados radiográficos. Concluyen que la radiografía simple no parece un método fiable

de evaluación en el seguimiento del injerto a las 4 ni a las 12 semanas.

Hedberg y cols (309) compararon radiografías con tomografías microcomputerizadas e histología en el seguimiento de defectos de 15 mm en el radio de conejo, tras la implantación de un material construido mediante ingeniería de tejidos. Encontraron que la radiografía es un método no invasivo útil para obtener imágenes evolutivas de calcificación de tejidos a lo largo del experimento. Con este método, sin embargo, la calidad de la imagen es baja, lo que hace difícil obtener información precisa sobre la localización y cantidad de hueso formado. Utilizaron la microtomografía computerizada para crear reconstrucciones tridimensionales del hueso, con resolución de 25 μ m. Estas reconstrucciones permitieron obtener mejor información espacial que la radiografía, pero no daban información del material implantado ni del tejido circundante no mineralizado. Para visualizar todos los materiales en el defecto creado a nivel celular, utilizaron la histología. Sin embargo, el análisis histológico es una técnica destructiva que no permite ningún estudio posterior de las muestras. Cada una de las tres técnicas estudiadas en este trabajo tiene sus ventajas y limitaciones, y cada una da una información particular de la regeneración ósea. Señalan que lo ideal es utilizar las tres técnicas para el estudio de regeneración ósea tras implantación *in vivo*.

La visión global de nuestros resultados radiológicos permite señalar que se produce regeneración con todos los implantes estudiados a diferencia del grupo control donde no se encontró neoformación ósea a excepción de la cortical. Sin embargo, se trata de una valoración general que no permite formular mayores conclusiones.

Consideramos el estudio radiológico como un método no invasivo, rápido, fácil de utilizar y accesible, que permite realizar un seguimiento seriado del implante *in vivo* y detectar posibles complicaciones, como fracturas y migración del implante.

ANÁLISIS DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las imágenes radiográficas demostraron evidencias de reparación en el interior de los defectos óseos en los que se utilizó el material compuesto objeto de estudio, a diferencia de los defectos óseos control, en los que solo se observó la reparación de la cortical a expensas del periostio circundante. Dichos hallazgos radiográficos se corroboraron con las imágenes histológicas. Los defectos tratados con los gránulos del material compuesto mostraron crecimiento de tejido osteoide en los intersticios entre los gránulos, con una excelente osteointegración. El diámetro del defecto residual mostró cifras sensiblemente menores al grupo control. Para Shors (8), el tejido óseo crece sobre la superficie de un implante si éste es bioactivo, y en condiciones ideales sería de tipo intramembranoso. Las imágenes obtenidas en el estudio histológico sugieren que el material compuesto utilizado pudo funcionar como estimulador de osteogénesis mediante el reclutamiento de células de tipo mesenquimal del lecho receptor con posterior diferenciación hacia células formadoras de hueso sobre su superficie. En relación a esta observación, la vascularización del lecho de implantación y la riqueza del mismo en progenitores de células endoteliales y fibroblastos son determinantes en la respuesta a un implante osteoinductivo y/o osteoconductor (89, 274, 274).

Este hecho contrasta con la escasa respuesta osteoformadora observada en el estudio histológico del grupo control en los que no se rellenó la cavidad con el material compuesto, que mostró una mínima reparación espontánea del interior del defecto óseo creado. Se encontró reparación del orificio en la cortical, pero sin acompañarse del relleno de la cavidad ósea por hueso esponjoso. En el estudio radiográfico, el diámetro transversal del defecto residual es muy semejante al defecto creado con la broca, mostrando la ausencia de reparación espontánea.

El material compuesto implantado presentó un índice de afinidad medio del 54,33% tras cuatro meses de implantación, demostrando una adecuada osteointegración tras dicho periodo. Cabe pensar en una osteointegración mayor tras un tiempo más prolongado de implantación.

En las imágenes obtenidas de los diferentes andamios, se observa que las paredes poliméricas son muy delgadas y que las partículas de vidrio se encuentran en algunos casos envueltas en una película del polímero y en otras ocasiones, tan sólo se encuentran un poco ancladas dentro de la red porosa. El hecho de que las paredes poliméricas sean tan delgadas, sugiere que no existen las condiciones para que se lleve a cabo el proceso de degradación autocatalítico, ya que al ser las paredes tan finas, los productos de degradación se liberan al exterior y no permanecen en el interior del material acidificándolo y acelerando su degradación interna. El efecto autocatalítico en los poli(alfa-hidroxi ésteres), fue demostrado por primera vez usando especímenes sólidos de 2 mm de espesor (310), y más recientemente se ha visto este fenómeno en películas de 100 µm de espesor (311).

En el estudio de Navarro Toro (4), no se observaron depósitos de precipitados de fosfato de calcio en la superficie del biomaterial, que se deben a un efecto tampón de los productos de degradación liberados por el biovidrio sobre los productos de degradación del PLA. Según Navarro Toro (4) puede deberse a tres razones:

- Gracias al diseño, las partículas quedan bastante expuestas a la superficie y las paredes poliméricas son muy delgadas, por lo que las cadenas poliméricas serían expulsadas hacia la circulación al igual que los productos de degradación del vidrio y por lo tanto, el efecto tampón no tendría lugar.

- En segundo lugar, es posible que la relación peso/volumen (1g/1000ml) haya sido muy baja y por lo tanto, el medio no se llegara a saturar dando paso a los precipitados de fosfato de calcio. Uno de los factores que afectan la formación de precipitados es la relación superficie/volumen o peso/volumen entre el biomaterial y el medio. Cuanto mayor sea la relación, mayor será la probabilidad de que el medio se sature y precipite.
- En tercer lugar, además de la relación superficie/volumen, existen otros factores que afectan la formación de precipitados de fosfato de calcio en la superficie de los biomateriales. Se ha visto que en el caso de los materiales compuestos, el porcentaje de fase inorgánica es un factor importante en la formación de estos precipitados (312). Es decir, que para obtener un material compuesto bioactivo, la fase bioactiva debe exceder una cierta fracción en volumen. Por debajo de este volumen crítico, a pesar de que la fase bioactiva esté presente, el compuesto no será bioactivo.

El análisis histológico 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 (ECM (new extracelular matriz)) en los poros interconectados de los andamios. La combinación de la excepcional resolución en plano y el detalle celular proporcionado por la histología es inigualable, y el análisis histomorfogenético se puede utilizar para estimar el número de células y el crecimiento óseo. El análisis histológico puede, por ejemplo, identificar fácilmente el reclutamiento de macrófagos y otras células asociadas con la respuesta inflamatoria a biomateriales implantados. Las secciones histológicas se pueden además teñir con los apropiados tintes policromáticos para identificar múltiples tipos de tejidos o examinarlos con microscopio polarizado para evaluar la organización de la matriz extracelular (ECM).

Aunque los métodos histológicos ofrecen capacidades únicas, 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. Además, el procesamiento histológico requiere tiempo y 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.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL MATERIAL TESTADO

Van der Stock y cols (118) realizaron una revisión sistemática de la literatura para estudiar las aplicaciones de diferentes sustitutos óseos en clínica en Holanda. Existe acuerdo en la osteoconductividad de los materiales, pero los datos en cuanto a tiempo de reabsorción entre los diferentes trabajos revisados son discordantes. El biomaterial más utilizado en traumatología y cirugía ortopédica ha sido el fosfato cálcico. El sulfato cálcico se utilizó en menor medida, principalmente para restaurar defectos óseos tras cirugía de resección tumoral, y destacan su limitado soporte estructural. Para estos autores, los biovidrios siguen siendo una alternativa con gran potencial, pero indican que los estudios realizados hasta el momento son limitados y señalan la importancia de profundizar en el desarrollo de este tipo de biomaterial.

Los biovidrios han demostrado tener propiedades osteoconductoras y osteoinductoras (290). La unión fuerte entre el hueso y el injerto sucede como resultado de la formación de una capa rica en silicio tras el contacto con los fluidos corporales. Como resultado se formará una capa de hidroxiapatita, que dirige la formación de nuevo hueso y absorción de proteínas. Las proteínas extracelulares atraen macrófagos, células mesenquimales pluripotenciales y células osteoprogenitoras. Este proceso da lugar a la proliferación de las células osteoprogenitoras dentro de la matriz, dando lugar a osteoblastos (106, 313). En Holanda el único biovidrio empleado como sustituto óseo es Cortoss®, que ha demostrado propiedades osteoconductoras pero no se reabsorbe, no induce citotoxicidad, presenta biocompatibilidad y poco riesgo de necrosis térmica (118, 289), resultados que coinciden con nuestro estudio.

- Biocompatibilidad:

La ausencia de respuesta inflamatoria aguda o crónica alrededor de los implantes y la incorporación del material compuesto implantado tras cuatro meses de seguimiento, hablan a favor de su biocompatibilidad (1).

El estudio histológico concuerda con lo afirmado en los hallazgos macroscópicos y radiológicos. El material compuesto se comportó como biocompatible, cumpliendo una de las primeras premisas que debe cumplir un sustituto óseo (3).

Estos hallazgos concuerdan con los resultados de biocompatibilidad sobre vidrios bioactivos publicados en otros estudios, evaluando la citotoxicidad sobre células osteoblásticas *in vitro* (314-316) que evaluaron el comportamiento de un cilindro de Bioglass R implantado en el cóndilo femoral de conejos maduros. Meseguer Olmo y cols (317) demostraron la biocompatibilidad de un biovidrio implantado en fémures de 20 conejos Nueva Zelanda así como su utilidad como vehículos liberadores de gentamicina sin encontrarse signos de citotoxicidad local o en órganos distantes.

- Osteoconducción:

El material compuesto de nuestro estudio se comportó como osteoconductor. Aparecía recubierto de una capa de tejido óseo de nueva formación en íntimo contacto con la superficie de los implantes. Esta capa de hueso neoformado fue predominantemente de tipo membranoso, dado que no se evidenció la presencia de células condrales. Esto demuestra que el diseño de nuestro estudio cumplía las condiciones ideales de proximidad, viabilidad y estabilidad para el crecimiento óseo, según los criterios de Shors (39), siguiendo un crecimiento osteonal directo a través de la unión implante hueso. La forma de gránulos del implante fue muy favorable aumentando la superficie de contacto entre el hueso y el implante, permitiendo el crecimiento óseo por osteoconducción. Similares observaciones han sido recogidas en otros estudios *in vivo* del equipo investigador (56-60).

El proceso de osteoconducción sobre un material sigue un patrón espacial determinado por la estructura y comportamiento mecánico del mismo, así como por el aporte vascular de los tejidos circundantes. Los dos factores que determinan la magnitud y velocidad de unión de un injerto al huésped son la estabilidad mecánica del lecho y el contacto entre ambos (56, 60, 89, 275).

Hollister y cols. (318) estudiaron la microestructura de los andamios polímeros y el hueso que debería reemplazar el andamio. Asumieron que el hueso rellenaría exactamente los poros del andamio y examinaron las propiedades de elementos representativos de volumen (RVE representative volume elements) en el primer momento, cuando no había hueso; y en el punto final, cuando el andamio se había degradado completamente, dejando solamente hueso en el lecho de los espacios de los poros. Aunque la optimización era sofisticada, no hay evidencia experimental para defender la morfología particular del crecimiento óseo dentro del andamio. Quizá el análisis más detallado de andamio de material compuesto hasta la fecha es el de Adachi y cols (319) que simularon el crecimiento óseo y la degradación de la matriz para dos modelos diferentes de andamios. El polímero y el hueso evolucionaron a la degradación del andamio por hidrólisis y el crecimiento óseo en su interior de acuerdo a su hipótesis. La aplicación de carga en las dos superficies opuestas dio lugar a tejido óseo alineado en la dirección de aplicación de la carga. Sin embargo, esta morfología ósea no se ha observado in vivo.

Las implicaciones de que la geometría ósea tiene poca influencia en las propiedades elásticas efectivas calculadas en estos compuestos con HA son dobles (320). Por un lado, las propiedades elásticas del compuesto se pueden estimar midiendo la fracción de volumen de hueso y usando la relación lineal entre la propiedad efectiva y fracción de volumen de hueso para esa geometría del andamio. Un método no invasivo, como el micro-CT, se puede utilizar para calcular eficientemente volúmenes de hueso en andamios (321). Por otro lado, se puede utilizar un modelo simple como herramienta para determinar el posible rango de arquitectura del andamio basándose en las propiedades iniciales del compuesto antes de realizar un estudio in vivo, reduciendo así el coste de la evaluación del andamio en términos de financiación, recursos y animales (318).

- Osteogénesis:

Siendo estrictos con la definición de osteogénesis, desarrollo y formación de tejido óseo a partir de células osteoformadoras como los osteoblastos (322), el material compuesto de nuestro estudio no es osteogénico, dado que no transportaba ningún tipo celular. Sin embargo, cuanto más se profundiza en el estudio de los biomateriales capaces de sustituir al hueso, más fino es el límite entre osteoinducción y osteogénesis. De hecho, estudios experimentales de evaluación de un soporte estructural cerámico o polimérico transportando vectores víricos para la síntesis de BMPs se consideran osteogénicos (324).

Existen razones para creer que ciertas geometrías y arquitectura de los injertos son no solo osteoconductoras, sino además osteoinductoras. El sustituto óseo no solo proporciona el andamio por donde debe crecer el hueso, además la geometría influye en la interacción con el medio, como en la proliferación vascular y la resistencia a la invasión por tejido fibroso. Estos factores establecen la relativa respuesta del medio o el tejido al sustituto óseo. La importancia de la geometría de los sustitutos fue estudiada por Kuboki y cols (325) quienes implantaron un sustituto de hidroxiapatita y BMP en ratas a nivel subcutáneo. Encontraron que los mismos materiales, acompañados de la misma cantidad de BMP, inducían patrones diferentes de regeneración tisular (exclusivamente condrogénesis, exclusivamente osteogénesis o una progresión de condrogénesis a

osteogénesis) dependiendo de la forma del injerto (326).

- Degradación:

El biomaterial implantado fue reconocible en todos los casos, con mínimos cambios sugerentes de degradación o reabsorción tras cuatro meses de seguimiento.

La reabsorción del andamio es un parámetro que puede influir en la formación ósea. Si el andamio se reabsorbe rápidamente, hay más espacio para la formación ósea. Sin embargo, si el andamio se reabsorbe demasiado rápido, se puede producir una reacción inflamatoria y disminuir la estabilidad biomecánica. No hay un consenso sobre la tasa óptima de resorción para la regeneración ósea, aunque esta tasa puede estar condicionada por los requerimientos mecánicos ó clínicos del defecto óseo a tratar (327).

Es previsible una mayor degradación del biovidrio que del PLA debida a dos razones principalmente. En primer lugar, las partículas de vidrio se degradan superficialmente y al estar presente en forma de gránulos, aumenta el área de contacto con el fluido y por lo tanto es posible que aumente su velocidad de degradación. En segundo lugar, se puede perder en parte la fase inorgánica debido al desprendimiento de las partículas de vidrio de la matriz polimérica. A pesar de que las partículas parecen estar bastante adheridas al polímero, puede haber partículas suspendidas dentro del andamio polimérico, por lo que es probable que este tipo de partículas se desprenda de la estructura porosa. También es posible que algunas de las partículas que inicialmente parecían bien adheridas al PLA, hayan sido desunidas por acción del medio (4).

Van der Stock y cols (118) realizaron una revisión sistemática de la literatura para estudiar las aplicaciones de diferentes sustitutos óseos utilizados en clínica en Holanda. El único biovidrio empleado en este país es Cortoss®. Los autores no encontraron indicios de reabsorción, lo que coincide con nuestros hallazgos.

También en la línea de nuestros resultados, encontramos a Lindfors y cols (328) que utilizaron un material compuesto con biovidrio para tratamiento de grandes defectos óseos. Observaron que la disolución del vidrio fue muy lenta, superior a los 12 meses, y permitió el remodelado óseo. Los autores encuentran este fenómeno beneficioso en ciertas ocasiones, como en el tratamiento de osteomielitis, ya que las propiedades antibacterianas y proangiogénicas del biomaterial permanecen durante mucho tiempo (329).

- Osteoestimulación. Control genético de los biomateriales:

Hench (330) estudió la hipótesis de que los productos iónicos disueltos liberados de vidrios bioactivos estimulan los genes de las células hacia el camino de la regeneración y autoreparación.

Un extenso número de trabajos confirman hoy en día esta hipótesis para la regeneración de hueso. La evidencia se basa en la respuesta osteogénica a los vidrios bioactivos. El descubrimiento original de los vidrios bioactivos y el énfasis en investigación durante muchos años se centra en el mecanismo de unión entre la superficie del hueso al vidrio bioactivo (331). El primer paso para cambiar el concepto de la unión bioactiva a la regeneración ósea se dio con el trabajo de Wilson y cols, ya que demostró por primera vez que hueso nuevo había colonizado la superficie de unas partículas de biovidrio 45S5 situadas mediante intervención en mandíbulas de monos, imitando la

resorción ósea de la enfermedad periodontal (332). Se formó nuevo hueso alrededor de las partículas y creó una estructura regenerada de hueso que unió las partículas de vidrio bioactivo. El nuevo fenómeno fue etiquetado como osteoproducción. También se le denomina osteoestimulación. El concepto de osteoestimulación fue cuantificado por Oonishi y cols pocos años después (316).

El segundo descubrimiento clave en el desarrollo de una base genética para la regeneración ósea fue en descubrimiento de Xynos y cols que demostró que no solo el vidrio, sino los productos iónicos disueltos liberados por del biovidrio 45S5, influenciaron y controlaron el ciclo celular de las células precursoras osteogénicas y finalmente controlaron la diferenciación celular (119, 333). Las células que no eran capaces de alcanzar una completa diferenciación fenotípica con características de osteocitos maduros eran eliminadas de los cultivos in vitro mediante muerte programada, apoptosis. El cambio en la población celular hacia osteoblastos maduros sucedió rápidamente, en horas, y condujo a nódulos de hueso orgánico mineralizado en cultivo, sin adición de factores óseos de crecimiento (BMP).

Otro descubrimiento clave de este trabajo fue que la efectividad de los productos de la disolución iónica liberados en pequeñas cantidades del Biovidrio 45S5 eran iones Si y Ca solubles biológicamente activos. Los iones produjeron osteoestimulación cuando presentaban un particular porcentaje de iones y una particular concentración en el rango de 15-30 ppm (partículas por millón) el Si y 60-90 ppm el Ca.

Estos descubrimientos proporcionan una comprensión del éxito clínico del uso de las partículas de biovidrio 45S5.

Oonish y cols utilizaron un modelo de defecto crítico en cóndilo femoral de conejo para cuantificar la secuencia histológica de osteoestimulación por las partículas de biovidrio 45S5 (316). El estudio muestra que hay más rápida formación ósea en presencia de partículas osteoestimulantes y regeneración de una mayor calidad mineral de hueso en el defecto, comparado con partículas de hidroxiapatita sintética. La tasa de regeneración ósea en el modelo de Oonishi está relacionada con la tasa de liberación de iones solubles de Si y Ca de las partículas testadas.

El tercer paso clave en el desarrollo de la base genética para la regeneración tisular fue el descubrimiento de que concentraciones críticas de productos iónicos en disolución (iones de Si y Ca solubles) activan o estimulan siete familias de genes en células osteogénicas (324, 335, 336) Los genes codifican la transcripción de numerosas proteínas que controlan el ciclo celular, proliferación y en última instancia la diferenciación de células hacia fenotipo de osteoblastos maduros.

Los mecanismos de biología molecular involucrados en el comportamiento los vidrios bioactivos son suficientemente conocidos como para que los resultados puedan utilizarse en el diseño de una nueva generación de materiales bioactivos para reparación de tejidos e ingeniería de tejidos. La respuesta bioactiva parece estar bajo control genético. Los vidrios bioactivos que son osteoproducidos mejoran la osteogénesis a través de un control directo sobre los genes que regulan la inducción del ciclo celular y progresión hacia un fenotipo de osteoblasto maduro. Este proceso se denomina osteoestimulación. Las células que no son capaces de formar nuevo hueso son eliminadas de la población celular, una característica que se pierde cuando los osteoblastos son expuestos a materiales bioactivos bio-inertes o de Clase B. La consecuencia biológica del control genético del ciclo celular de las células progenitoras del osteoblasto es la rápida proliferación y diferenciación de los

osteoblastos. El resultado es una rápida regeneración del hueso. La consecuencia clínica es el rápido relleno de defectos óseos con hueso regenerado que es estructural y mecánicamente equivalente al normal, a hueso sano. La utilización de partículas de vidrio bioactivo para liberar menores concentraciones de productos iónicos de disolución de un polímero esponjoso ofrece la posibilidad de diseñar una nueva generación de apósitos para el tratamiento de heridas (330).

Igual o quizá más importante a largo plazo es la posibilidad de que los productos bioactivos de disolución puedan ser utilizados para activar genes como tratamiento preventivo para mantener la salud de nuestros huesos durante el envejecimiento (330).

Se están sentando las bases para el control genético de la regeneración ósea (330). Dos acontecimientos hacen posible diseñar una nueva generación de biomateriales que controlen la expresión genética *in vitro* e *in vivo*. El primero es el mayor conocimiento del papel de la liberación controlada de productos iónicos en disolución de vidrios bioactivos para controlar la biología molecular de células osteoprogenitoras. El segundo es la utilización de los procesos de sol-gel de vidrios bioactivos para obtener un control adicional de las tasas de liberación de iones y por lo tanto de estímulos biológicamente activos (330).

Los hallazgos de los experimentos realizados por Hench y cols. (330) demuestran que el rango completo de fuentes de células de linaje osteoblástico (células madre, células fetales y células adultas primarias) son estimuladas a un nivel genético por dosis críticas de productos iónicos de disolución de Si y Ca.

Las dosis críticas y cinética de liberación de la estimulación iónica se puede obtener controlando el rango de talla de la partícula, composición, método del proceso o nanoestructura de los materiales Ca y Si contenidos.

EFFECTO DE LA POROSIDAD Y EL TAMAÑO DE LOS POROS

La porosidad y el tamaño de los poros de los biomateriales juegan un papel crítico en la formación ósea tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, una menor porosidad estimula la osteogénesis mediante la supresión de la proliferación celular y forzando la agregación celular. Por el contrario, *in vivo*, mayor porosidad y tamaño de los poros resulta en mayor crecimiento óseo en el interior. Sin embargo, esta morfología disminuye las propiedades mecánicas, de ese modo se determina un límite funcional para el tamaño de los poros y la porosidad. De esta manera, se requiere un balance entre la reparación, el rango de remodelación y el rango de degradación del andamio. Según estudios recientes, el mínimo tamaño de los poros requeridos es aproximadamente de 100 μm debido al tamaño de las células, requerimientos de migración y formación de capilares. Debido a la vascularización, el tamaño de los poros ha mostrado su efecto sobre la progresión de la osteogénesis. Los poros pequeños favorecen condiciones de hipoxia e inducen formación osteocondral antes que osteogénesis, mientras que grandes poros, que están bien vascularizados, permiten la osteogénesis directa, sin ser precedida de formación de cartílago (82).

EFFECTO DE LA POROSIDAD IN VIVO

La regeneración ósea en un andamio *in vivo* incluye reclutamiento y penetración de células del tejido circundante, así como vascularización. La mayor porosidad se espera aumente la osteogénesis y numerosos estudios han avalado esta hipótesis. Roy y cols (337)

crearon un andamio con una porosidad de 80 a 88% de poli(L-lactico-co-D,L-láctico) que contenía un 20% de fosfato tricálcico (tamaño de poros 125-150 μm). En las áreas de mayor porosidad observaron mayor crecimiento y formación ósea tras la implantación en cráneo de conejos. Además, los andamios formados por cuatro ejes axiales y cuatro radiales alcanzaron mayor osteogénesis.

Para conseguir mayor porosidad en los andamios, Lewandrowski y cols (338) combinaron poli(propileno fumarato) con sales de calcio, y los implantaron en tibias de ratas. Los compuestos con mayor porcentaje de sales de calcio, y por tanto mayor porosidad, mostraron mayor crecimiento en el interior del material. Chu y cols (339) estudiaron andamios de hidroxiapatita con fuerza de compresión de 30 MPa y módulo de compresión de 1.4 GPa en mandíbulas con dos geometrías diferentes ortogonal y radial (tamaño de poros de 444 y 366 μm , y porosidad de 44% y 38% respectivamente). Aunque no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento dentro del andamio, la forma del nuevo hueso formado se afectó por la arquitectura de los canales; la arquitectura ortogonal dio lugar a una matriz interconexionada de hidroxiapatita y nuevo hueso formado, mientras que la arquitectura radial dio lugar a una pieza sólida de hueso en el centro del implante. Kurty y cols (340) compararon andamios de hidroxiapatita con diferente porosidad. No encontró diferencias significativas.

Hay un limitado número de artículos en la literatura que muestran que la porosidad no influye en la cantidad de tejido óseo formado en el andamio. Kujala y cols (341) encontraron que implantes de níquel-titanio con 66% de porosidad tenían mayor contacto hueso-implante, aunque no estadísticamente significativos, que implantes con 47% de porosidad en defectos en fémures de ratas. Por otra parte, Fisher y cols (342) implantaron polipropileno fumarato en defectos craneales de conejos sin encontrar diferencias según la porosidad.

La ausencia de trabajos que demuestren efectos beneficiosos de la baja porosidad in vivo, apoya la preferencia de implantes con alta porosidad para la regeneración ósea.

EFEECTO DEL TAMAÑO DE LOS POROS IN VIVO

Además de los trabajos iniciales de Hulbert y cols (86) que demostró que el tamaño mínimo de los poros era 100 μm , muchos investigadores han trabajado con el tamaño de los poros para la óptima reparación ósea. Kuboki y cols (325) trabajaron con bloques de hidroxiapatita de diferente tamaño de poros (100-212, 212-300, 300-400, 400-500, 500-600 μm) mediante implantación subcutánea en ratas. Los bloques con tamaño de 300-400 μm obtuvieron mayor actividad de fosfatasa alcalina, contenido de osteocalcina y nueva formación ósea. Para estos autores, este tamaño es el crítico donde se empiezan a observar capilares. Gotz y cols (343) compararon implantes con superficie de titanio de poros de 100, 200 y 300 μm implantados en defectos de fémur distal en conejos. Aunque los implantes con poros de 300 μm tenían mayor porcentaje de hueso lamelar, su osteointegración fue menor que los implantes con poros de 200 μm basado en el menor porcentaje de contacto.

Un ejemplo de un estudio comparativo para el tamaño de los poros donde no se encontraron diferencias en la osteogénesis es el trabajo de Ayers y cols (344) No encontraron diferencias entre los implantes de nitinol en defectos en cráneos de conejos con tamaño de poros de 353, 218 y 179 μm con porosidad de 43, 54 y 51% respectivamente. Cuando Fisher y cols (342) implantaron andamios de poli(propileno fumarato) con diferente porosidad (57-75%) y tamaño de poros (300-500 y 600-800) en

defectos óseos creados en cráneos de conejos, no encontraron diferencias significativas en formación ósea ni respuesta inflamatoria. Finalmente, Kujala y cols (341) no encontraron diferencias en el contacto hueso-implante con implantes de nitinol con poros de 505 μm comparados con 209 μm de media, tras la implantación en defectos en fémures de ratas.

Un aspecto muy interesante en el efecto del tamaño de los poros en la regeneración ósea es el impacto en la progresión hacia osteogénesis. Kuboki y cols (345) implantaron hidroxiapatita con túneles 90-120 μm y otros mayores, de 350 μm , utilizados para liberación de BMP-2 y fueron implantados en tejido subcutáneo en ratas. En los túneles pequeños, la condrogénesis sucedió antes que la osteogénesis; por el contrario, en los túneles con mayor diámetro, el hueso se formó directamente. El aumento de la vascularización observado en los túneles mayores produjo mayor tensión de oxígeno y aporte de nutrientes, condiciones que favorecen la osteogénesis directa. Jin y cols (346) encontraron resultados semejantes. Implantaron andamios con similar tamaño de poros (100-200 μm) en tejido subcutáneo de ratas, en forma de bloques y partículas. Se produjo formación ósea directa. Sin embargo, en la hidroxiapatita con forma de panal de abejas, encontraron osificación osteocondral. La geometría del andamio permitió un desarrollo de vascularización en los bloques y las partículas favoreciendo la osificación directa; por el contrario, las condiciones de déficit de oxígeno en la HA con forma de panal indujo un inicio de condrogénesis. La formación ósea directa también se afectó por la geometría: los poros largos y curvados de los bloques dificultaron la penetración de células mesenquimales y capilares, resultando en formación ósea solo en la superficie exterior del material, al contrario que la HA en forma de partículas, donde se encontró hueso en la profundidad del material.

Se estudian nuevos métodos de fabricación que puedan utilizarse para generar andamios con morfología y propiedades mecánicas más selectivas diseñadas para encontrar las necesidades específicas para el tejido a reparar (82).

VALORACIÓN Y ASPECTOS FUTUROS

La porosidad y el tamaño de los poros tienen importantes influencias en las propiedades morfológicas de un biomaterial para la reparación ósea. No se pueden dar valores exactos de porosidad y tamaño de poros como guía general para los sustitutos, debido al amplio rango de variables en el hueso in vivo y la diversidad de biomateriales, células y citoquinas implicados en el proceso. Sin embargo se pueden dar algunas conclusiones basadas en la literatura y nuestro estudio. La alta porosidad y grandes poros potencian el crecimiento óseo en el interior y la osteointegración de un implante tras la cirugía. Aunque hay algunos trabajos publicados que muestran no haber diferencias los resultados para andamios con diferente porosidad, no hay trabajos que demuestren un beneficio para los implantes con poca porosidad. La tasa de degradación del andamio también se debe tener en cuenta cuando se calcula la porosidad. Los andamios fabricados con biomateriales con alta tasa de degradación no deberían tener alta porosidad (>90%), ya que la rápida degradación del material comprometerá la integridad mecánica y estructural antes de la sustitución por nuevo hueso formado. Por el contrario, andamios fabricados con biomateriales con baja tasa de degradación y robustas propiedades mecánicas pueden ser altamente porosos, porque su mayor área de superficie que interactúa con el tejido huésped puede acelerar la degradación debido a macrófagos por medio de la oxidación o hidrólisis. In vitro, la menor porosidad aumenta la osteogénesis debido a la agregación celular y supresión de la proliferación.

El tamaño mínimo de poro recomendado para un andamio es 100 μm basándonos en los

trabajos de Hulbert y cols (86), pero estudios posteriores han demostrado mayor osteogénesis con poros mayores de 300 μ m (325, 343). En general, mayores poros favorecen osteogénesis directa, ya que permiten la vascularización y alta oxigenación, mientras que menores poros dan lugar a osificación osteocondral, aunque el tipo de crecimiento en el interior del andamio depende del biomaterial y la geometría de los poros. Sin embargo, hay un límite superior en la porosidad y tamaño de los poros marcado por las propiedades mecánicas. Un incremento en la porosidad resulta en una reducción de las propiedades mecánicas, que puede ser crítica para la regeneración en huesos de carga. La medida en que el tamaño de los poros se puede agrandar manteniendo las propiedades mecánicas depende de muchos factores, como la naturaleza del biomaterial y las condiciones del procesado, así como las dimensiones de los poros del tejido óseo específico que se desea reparar.

Las diferencias de los tejidos óseos en morfología (tamaño de poros y porosidad) y propiedades mecánicas, así como gradientes de citoquinas señalan que se pueden plantear cambios en la fabricación de biomateriales dependiendo del sitio específico de implantación.

Bergmann y cols (347) realizaron un estudio con un material compuesto de β -TCP y biovidrio 45S5. Prepararon el compuesto mediante técnicas 3D de acuerdo a requerimientos establecidos. Crearon un modelo virtual del implante en 3D mediante el programa desarrollado y llevaron a cabo la fabricación del biomaterial. El análisis posterior mostró que lograron crear un material compuesto con la estructura deseada. Este hallazgo ofrece la oportunidad de alterar la composición del biovidrio y variar la composición y estructura del implante de acuerdo a los requerimientos.

El control de las características del diseño y el conocimiento más profundo de la biología celular y las citoquinas implicadas, darán nuevas oportunidades para diseños de biomateriales para la reparación ósea.

- Control de la vascularización de los tejidos por productos iónicos de disolución:

En nuestro estudio hemos objetivado crecimiento óseo, por lo que se deduce que ha habido proliferación de yemas vasculares junto con este crecimiento. Las tinciones y valoraciones morfométricas de imagen empleadas se han dirigido a estudiar la formación de hueso y la degradación y osteointegración del material testado, objetivo de nuestro estudio, no a estudiar concretamente la proliferación vascular.

Existe cierta controversia respecto al potencial angiogénico de los biovidrios. Mientras algunos estudios no han encontrado respuesta angiogénica (348), otros han mostrado el potencial angiogénico (349-352). La utilización clínica de partículas de vidrio bioactivo para aplicaciones dentales, maxilofaciales y ortopédicas ha sido un éxito en parte porque se regenera in situ hueso completamente vascularizado. Los estudios de selección genética realizados muestran que el VEGF (vascular endotelial growth factor) es uno de los factores más importantes en la estimulación. Hallazgos recientes de Leu y Leach (352), muestran que productos iónicos de disolución liberados del biovidrio 45S5 son promotores efectivos de la angiogénesis. Sus experimentos confirman que hay una estimulación de la producción de VEGF por parte de las células de endoteliales microvasculares humanas. La estimulación de la angiogénesis depende de la concentración de iones presentes en los cultivos, los cuales fueron controlados utilizando diferentes cantidades de biovidrio 45S5 en esponjas de colágeno. Encontraron que cuando había muy poca cantidad de iones, no había efecto; y con demasiados iones, tampoco había efecto. Leu y Leach también

mostraron que mayores concentraciones de productos iónicos de disolución favorecían la osteogénesis (330).

Hay implicaciones importantes de estos hallazgos: Hoy en día, la mayoría de las modalidades de tratamiento para heridas crónicas son paliativos. Existe una gran necesidad de apósitos bioactivos para heridas que puedan combatir el estímulo negativo que impide la curación de heridas crónicas. La combinación de las características antiinflamatorias de las partículas de Biovidrio 45S5 con su potencial proangiogénico, ofrece una gran promesa para diseñar apósitos que estimulen la queratogénesis y la angiogénesis que se requieren para obtener una rápida regeneración de la piel.

- Biomateriales como vehículo de sustancias:

El hecho de que nuestros biomateriales no vehiculizasen ninguna sustancia habla a favor de una posible capacidad intrínseca osteoinductora del material compuesto, mediante el reclutamiento y proliferación de células óseas sobre una capa de hidroxiapatita íntimamente unida al biomaterial, dando lugar como defendió Loty y cols (273), a la osteogénesis por contacto. Esta posibilidad ya ha sido propuesta en anteriores trabajos del equipo investigador con defectos óseos críticos (59, 60) El biomaterial implantado actuó como andamio para el crecimiento óseo que siguió la morfología del implante durante el proceso de curación.

Para utilizar los factores de crecimiento como tratamiento se deben colocar en materiales adecuados. Sin embargo, la inyección de la proteína percutánea podría tener muchas ventajas por su fácil administración en el tratamiento de las pseudoartrosis o en las elongaciones óseas, fracturas cerradas e incluso en la fusión vertebral. En estudios preclínicos, Einhorn y cols (353) vieron buenos resultados con la inyección percutánea de BMP-2 en fracturas de fémur en ratas. Mizumoto y cols (354), también en ratas, demostraron que una inyección única de rhBMP-7 administrada en la osteotomía mejora el índice de regeneración.

Sin embargo, un transportador ayuda a mantener la concentración de rhBMP en el lugar de reparación durante largo tiempo, con lo que mejora su capacidad inductiva y debe tener capacidad para liberar los factores de crecimiento en tiempo y dosis adecuados. Además. Cualquier biomaterial debe ser un sustrato que estimule el reclutamiento y la adhesión celular y potencie la quimiotaxis permitiendo la migración celular y angiogénesis y, también, debe ser biodegradable sin producir reacciones inmunitarias, inflamatorias o tóxicas que inhiban el proceso de reparación (200).

Se han descrito cuatro tipos de transportadores para los factores de crecimiento: materiales inorgánicos; polímeros sintéticos; polímeros naturales y composites o compuestos de los materiales citados. Entre los materiales más utilizados están el colágeno tipo I, los geles de ácido hialurónico y diferentes sucedáneos óseos, como el hueso desmineralizado, la hidroxiapatita y el coral, además de los ácidos poliláctico y poliglicólico. Actualmente se trabaja en la obtención de materiales artificiales, sintéticos o biológicos desnaturalizados que puedan sustituir al hueso. El colágeno bovino es el más utilizado actualmente. Sin embargo, las BMP se unen fuertemente al colágeno derivado de hueso (209). La rhBMP se libera en una esponja de colágeno reabsorbible y la rhBMP-7, en colágeno bovino tipo I (200).

Xie y cols (296) implantaron un compuesto de biovidrio, colágeno, ácido hialurónico y fosfatidilserina en un defecto óseo realizado en radio de conejo. Diseñaron un compuesto

con una superficie muy rugosa, que indica una relativamente alta área de superficie, comparado con una típica superficie lisa. El compuesto tenía una porosidad de más del 80% y una talla media de los poros del 150 μm . Estos autores sugieren que dicha porosidad y talla de los poros es deseable para el crecimiento óseo en su interior. En su estudio, el defecto rellenado mediante únicamente material compuesto mostró regeneración de tejido óseo solo parcialmente. El material compuesto que contenía BMP tuvo regeneración ósea más temprana con la mayoría del material compuesto reabsorbido mientras que en el control no se encontró regeneración ósea. En el examen histológico con tinción de Hematoxilina Eosina se observó formación de tejido óseo trabecular en el defecto rellenado con material compuesto poroso únicamente. En el compuesto con BMP se encontró mayor cantidad de nuevo tejido óseo. Además, la presencia de pequeños gránulos de material compuesto residuales indica que la reabsorción se completaría aproximadamente a las 8 semanas. Las imágenes de microtomografía computerizada demostraron la presencia de nuevo tejido óseo en el defecto con material compuesto solo y en el material compuesto con BMP. Sin embargo, el material compuesto con BMP generó más tejido óseo que el composite aislado.

Las cerámicas son materiales prometedores para la ingeniería de tejidos porque ofrecen soporte tridimensional y sirven como andamios para la proliferación y diferenciación celular y, según los últimos estudios, para la formación ósea. Se dispone de una gran variedad de biomateriales biodegradables y osteoconductivos, y son utilizados en clínica. La mayor parte de estos biomateriales son fosfato tricálcico beta (b-TCP) o fosfato cálcico derivados de los corales. Una desventaja de estos biomateriales es su baja área de superficie específica (SSA (specific surface area)) de menos de 1 m^2/g . Actualmente se están desarrollando un nuevo grupo de cerámicas con alta SSA que ha probado ser igualmente efectiva en la diferenciación osteogénica in vivo y formación ósea ectópica in vivo (355). La hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA Calcium-deficient hydroxyapatite) es un nuevo miembro de este grupo de cerámicas con alta SSA, con un SSA de 20-80 m^2/g , que se aproxima a los valores de 80 m^2/g encontrados en el hueso natural.

Para mejorar su potencial osteogénico, los andamios se pueden combinar con células mesenquimales pluripotenciales (MSC (mesenchymal stem cells)) y/o con factores de crecimiento. Las MSC son células pluripotenciales que se pueden diferenciar a osteoblastos, condrocitos, adipocitos, tenocitos, mioblastos o células estromales. Las MSC se pueden aislar de aspirado de médula ósea y expandir rápidamente in vitro. Numerosos estudios preclínicos han mostrado que las MSC expandidas in vitro pueden regenerar defectos óseos de tamaño crítico cuando se combinan con sustitutos óseos (356). Los factores de crecimiento influyen en la quimiotaxis, diferenciación, proliferación y actividad de las células óseas, de ese modo actúan en la regulación del remodelado óseo fisiológico y en la curación de la fractura. Numerosos factores de crecimiento, como las proteínas óseas morfogénicas (BMPs), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor transformador del crecimiento beta (TGF-beta), y factores de crecimiento derivados de la insulina (IGF), tienen un efecto estimulante en la curación de los defectos óseos. El plasma rico en plaquetas (PRP) contiene gran número de estos factores (PDGF, TGF-beta1, TGF-beta2, IGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), y factor de crecimiento celular epitelial (ECGF)) en su composición natural. Por ello se puede utilizar de modo autógeno, no suponiendo un riesgo de enfermedades transmisibles. Además, el PRP se puede obtener el día de la cirugía mediante dos pasos de centrifugación a partir de una extracción de sangre completa autogénica. Investigaciones básicas parecen aprobar la habilidad del PRP para el soporte óseo y la curación de tejidos blandos (357).

El PRP produce mejor formación ósea que el andamio de CDHA sin PRP, según se ha determinado mediante el estudio histológico y la micro-tomografía computerizada (micro-CT) tras 16 semanas, aunque en el test biomecánico no se han encontrado diferencias. Similares resultados se han encontrado en muestras con MSC; sin embargo, la combinación de MSC y PRP no mejoró más la curación ósea. La adición de MSC al PRP se podría omitir en el futuro para trabajos con el modelo de conejo descrito. Además, la resorción de CDHA se mejoró con la adición de PRP, MSC y MSC/PRP, pero no se encontraron diferencias entre los grupos. En conclusión, PRP mejora la curación (o reparación) ósea en un modelo diafisario de conejo en CDHA. Este estudio apoya la utilización de PRP alogénico para la curación ósea (327).

Existen estudios experimentales de defectos críticos segmentarios tratados con una matriz transportadora de BMPs donde se ha observado un alto índice de osificación fuera de los límites del defecto (358). En nuestro estudio, no se evidenciaron signos de osificación heterotópica ni excesiva formación ósea fuera de los límites del implante.

La evolución de algunos estudios clínicos ha demostrado que la utilización de las BMP reduce el sangrado entre 43 y 336 ml y disminuye el tiempo quirúrgico entre 9 y 15 minutos en artrodesis lumbar (359).

Conocemos algunas complicaciones o factores secundarios de las BMP, ya que aumentan el número de células inflamatorias en ovejas, aumentan las concentraciones séricas de anticuerpos contra las BMP, el edema generalizado, el crecimiento óseo y las osificaciones heterotópicas. Sin embargo se desconocen las complicaciones o efectos adversos en ensayos clínicos (200, 261).

Una limitación para los BMP es el coste. Los materiales de relleno óseo no pueden ser reemplazados por BMP en las grandes cirugías, como la escoliosis o los grandes defectos, por su elevado coste y porque no se recomienda más de dos dosis por tratamiento de BMP. (200).

Otro aspecto por dilucidar es la dosis necesaria efectiva de las BMP, que se ha establecido a partir de pocos trabajos experimentales y de la práctica clínica. El hueso contiene unos 0,002 mg de BMP-7 por kilo de hueso pulverizado. En el lecho de fractura, la BMP se libera en mayor concentración, aunque se desconoce en qué cantidad. En estudios experimentales con animales de tamaño medio, para obtener una reparación ósea se necesita más concentración de BMP que en animales pequeños. También depende del tipo de lesión. En los estudios de fusión vertebral, la unión entre los cuerpos vertebrales se consigue más fácilmente que las uniones intertransversas, donde la frecuencia de pseudoartrosis es mucho mayor (361). Sin embargo, un problema es que en clínica se necesitan dosis mucho mayores, lo que encarece el proceso y puede disparar efectos secundarios desconocidos (362, 363). Por ello, una alternativa propuesta es estimular la sobreexpresión de BMP-7 endógena (200, 364).

La combinación de BMP-7 y biomateriales, especialmente injertos, tiene especial interés. La BMP estimula la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mesenquimales pluripotenciales y la angiogénesis a través de los factores de crecimiento derivados osteoblásticos vasculares endoteliales y mejora la capacidad osteoinductiva de los injertos óseos autólogos, lo que facilita la proliferación y la diferenciación de las células osteoprogenitoras para que maduren a osteoblastos. La combinación de BMP-7 y autoinjerto de esponjosa potencia la capacidad osteogénica del injerto (365, 366) y ha conseguido en grandes series de pseudoartrosis resultados positivos entre el 88,8 y el 92%

de los casos 6-8 meses después de la intervención (200).

Quedan otros aspectos por discutir, pues las estatinas estimulan el promotor del gen de la BMP-2 en ratas y mejoran la formación ósea en ratas y la reparación de fracturas en ratones, aunque hasta ahora no hay datos relevantes para su aplicación clínica (200, 367).

Se han realizado numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* y ensayos clínicos que demuestran claramente la fuerte capacidad osteoinductora de las BMP. Sin embargo, las terapias estándares para los defectos óseos críticos son la osteogénesis por distracción y el autoinjerto. Podría haber indicación para la utilización de BMP en el tratamiento de defectos óseos críticos en combinación o como alternativa a terapias establecidas, como la osteogénesis por distracción. Se necesitan nuevos estudios experimentales y clínicos para definir claramente las indicaciones y las estrategias terapéuticas (368)

Las BMP son unas sustancias prometedoras para el futuro, pero todavía no conocemos completamente su esquema de funcionamiento y precisa vasos, células y una matriz o ambiente donde actuar, además de unas condiciones mecánicas apropiadas, lo que Giannoudis y cols han llamado el concepto diamante (200, 369).

- Propiedades antibacterianas:

En nuestro estudio no hemos encontrado ningún caso de infección superficial ni profunda. En la periferia del biovidrio implantado se produce un intercambio de iones que determina un rápido aumento del pH alrededor del vidrio, la alcalinidad depende de la composición del biovidrio. El alto pH y el efecto osmótico causado por la disolución del vidrio explican las propiedades antibacterianas encontradas. En estudios donde se ha neutralizado esta solución alcalina, ha desaparecido el efecto antibacteriano (370).

Lindfords y cols. (371) realizaron un estudio multicéntrico sobre 11 pacientes con osteomielitis crónicas en la extremidad inferior y la columna tratadas con un biovidrio. Durante la intervención realizaron desbridamiento de la lesión y relleno con el biovidrio objeto de estudio. 9 de los pacientes curaron sin complicaciones, 1 paciente consiguió un buen relleno de la cavidad pero tuvo una infección superficial debido a problemas vasculares y otro paciente tuvo una infección profunda debido a un hematoma. Presentan buenos resultados en el tratamiento de este tipo de patología.

Se han utilizado implantes biodegradables impregnados en antibiótico para tratar osteomielitis crónicas. Efstathopoulos y cols describen buenos resultados con sulfato cálcico impregnados con tobramicina y vancomicina, sin embargo tuvieron un incremento de bacterias resistentes al antibiótico (372).

Zongping y cols (373) compararon la efectividad de tres compuestos: vidrio, vidrio con vancomicina, sulfato cálcico con vancomicina en el tratamiento de osteomielitis en tibias de conejos. El tratamiento con sulfato cálcico fue inferior al vidrio con antibiótico. Radiográficamente el vidrio con vancomicina se reabsorbió casi en su totalidad y fue reemplazado por tejido óseo, por otro lado el sulfato cálcico con vancomicina fue completamente reabsorbido pero modestamente reemplazado por tejido óseo. Histológicamente, encontraron tejido óseo rodeando los restos de vidrio sin ningún tipo de respuesta a cuerpo extraño, al contrario del sulfato de calcio, que presentaba indicios de respuesta inflamatoria a cuerpo extraño. El biovidrio con vancomicina demostró tener una biocompatibilidad excelente y ser muy efectivo en la erradicación de la osteomielitis,

estimulando simultáneamente la regeneración ósea.

Lindfors y cols (328) realizaron un estudio prospectivo randomizado utilizando un biovidrio e injerto óseo autólogo en cirugía de tumores óseos benignos. El volumen de las grandes cavidades rellenas con el biovidrio comenzó a disminuir a los 12 meses, lo que indica que la disolución del vidrio fue muy lenta y permitió el remodelado óseo. Este fenómeno puede ser beneficioso en el tratamiento de osteomielitis ya que las propiedades antibacterianas y proangiogénicas permanecen durante mucho tiempo (329).

ANÁLISIS COMPARATIVO CON ESTUDIOS RECIENTES

La incorporación del biovidrio dentro de la matriz polimérica tiene como finalidad mejorar tanto desde el punto de vista de la biocompatibilidad, como desde el punto de vista mecánico y de la velocidad de degradación, las propiedades del andamio de PLA, para acercarnos a los criterios del andamio ideal.

La incorporación de las partículas de vidrio de fosfato de calcio en las esponjas de PLA mejora tanto las propiedades mecánicas del material como la respuesta biológica del mismo. En otros estudios en los que se usaron materiales similares (374) los valores obtenidos para el módulo a compresión aumentaron. Las partículas de vidrio han cumplido el papel de refuerzo mecánico esperado condicionando el aumento significativo de las propiedades mecánicas a compresión. Cuando las partículas de vidrio son introducidas en la estructura polimérica tridimensional, éstas evitan que las paredes de los poros se doblen y colapsen tan fácilmente como en el caso del polímero solo.

Meseguer-Olmo y cols (285) describieron el desarrollo y caracterización de un material vitrocerámico y la respuesta inicial de células madre mesenquimales adultas (MSC-A) aisladas de la médula ósea. Obtuvieron el material por calentamiento de un vidrio $55\text{SiO}_2\text{-}41\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$ por el método sol-gel. Las células se aislaron por aspirados directos de cresta iliaca de pacientes adultos jóvenes. Se estudió el grado de adherencia, proliferación y diferenciación a osteoblastos de las MSC-A sembradas sobre el material. La diferenciación celular se evaluó mediante la producción de osteocalcina y la pérdida del marcador mesenquimal CD90. El material sembrado se implantó en un defecto crítico realizado en fémur de conejo para valorar su capacidad osteorregeneradora, y se observó mediante TAC.

Las MSC-A se adhirieron, expandieron, proliferaron y produjeron matriz extracelular mineralizada sobre el material, al mismo tiempo que mostraron fenotipo osteoblástico, e incrementaron la producción de osteocalcina y la pérdida de expresión de CD90. El material se reabsorbió parcialmente al final del estudio efecto que no encontramos en nuestro estudio, ya que nuestro material compuesto no se reabsorbió)

Al igual que nuestro estudio, Meseguer-Olmo y cols (285) no observaron respuesta adversa de tipo inflamatorio, formación de cápsula fibrosa que delimite al material implantado del tejido óseo adyacente, ni otros tipos de alteraciones patológicas asociadas. Por otro lado hallaron adenopatías regionales que microscópicamente correspondían a adenitis crónica reactiva caracterizada por hiperplasia folicular cortical. En el estudio necrópsico de nuestros animales no se observó la presencia de adenopatías.

Meseguer-Olmo y cols (285) concluyen que el material compuesto por biovidrio y células mesenquimales adultas es citocompatible, osteoconductor, bioactivo y con capacidad de promover la neoformación ósea.

Nuestros resultados coinciden con Nandi y cols (375), que estudiaron la curación de defectos óseos unicorticales creados en radios de cabras adultas comparando la implantación de bloques de biovidrio poroso con la curación sin relleno. Encontraron una importante neoformación ósea que se originaba del huésped hacia el implante, mientras que en el grupo control no se apreciaron signos de neoformación ósea. Demuestran que el biovidrio utilizado promovió la formación ósea en toda la extensión del defecto relleno independientemente del tamaño de los bloques de biovidrio, coincidiendo con nuestras conclusiones. Realizaron angiografías que revelaron diferentes grados de vascularización en los dos grupos. En el grupo del biovidrio estaba bien organizada y se estableció una red vascular a través del biovidrio. Los diminutos vasos del periostio y endostio originaron una invasión del implante. Por el contrario, en el grupo control, la angiografía reveló una

angiogénesis menos uniforme. Concluyen que el periostio y los vasos de los tejidos blandos de los alrededores juegan un papel importante en la curación de los defectos óseos. Nuestro estudio se podría haber completado con la angiografía pero no disponíamos de los medios necesarios.

Vogel y cols (376) realizaron un estudio con tres biovidrios: 45s5 (45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5% CaO, 6% P₂O₅), 52s (52% SiO₂, 21% Na₂O, 21% CaO, 6% P₂O₅) y 55s (55% SiO₂, 19.5% Na₂O, 19.5% CaO, 6% P₂O₅). Los implantaron en la epífisis distal de fémures de conejos, 3 con cada biovidrio y dejaron 3 sin relleno, como grupo control.

Realizaron un abordaje parapatelar bilateral. La perforación se realizó con una broca de 4 mm de diámetro y 8 mm de longitud, en sentido anteroposterior, a diferencia de nuestro estudio donde realizamos la perforación con broca de 5mm y unos 10 mm de profundidad en sentido lateral.

Realizaron estudios microscópicos e histológicos. Encontraron que el crecimiento óseo se produjo de una manera centrípeta, lo que concuerda con nuestros hallazgos. La formación ósea se dificultó en el centro del lecho de implantación donde el crecimiento óseo mostró un pico al mes y disminuyó en la siguiente medición a los 2 meses y medio, excepto en el 55s. Esto sucedió con un número creciente de células gigantes multinucleadas. Comparando los tres materiales entre sí no encuentran diferencias al final del experimento, aunque sí en los estudios intermedios.

Coincidimos con Vogel en que la responsable de la unión ósea es la formación de una capa de hidroxiapatita en la superficie del vidrio bioactivo, hallazgo que se ha documentado *in vitro* bajo condiciones de pH fisiológicas (376-379).

En relación al tamaño de las partículas, se han dado conclusiones muy dispares. Schepers y cols (380) utilizaron biovidrio 45s5 para rellenar defectos óseos en mandíbulas de perros de cuatro tallas diferentes. Comparando partículas de 300-350 µm con 100-710 µm tras tres meses de implantación encontraron gran cantidad de tejido fibroso en las últimas, mientras que las partículas de 300-350 mostraron una buena unión al hueso (376).

Por otro lado Wheeler y cols (381) compararon la implantación del biovidrio 45s5 de diámetro de las partículas de 90-710 µm con 300-360 µm. Encontraron mejores resultados con las de 90-710 µm. MacNeill y cols (382) y Hall y cols (383) también han estudiado las diferencias entre estas dos últimos biovidrios en tibia de conejo y mandíbula de perro, respectivamente, sin encontrar diferencias entre ambos.

La relación entre la superficie de las partículas del material y el volumen del lecho de implantación, entre ciertos límites, puede dar lugar a un medio que impide la regeneración ósea. Greenspan y cols (384) desarrollaron un método para valorar el área de superficie utilizando N₂ adsorción/desorción isoterma. En nuestro experimento, el implante mostró buena unión ósea en la periferia del lecho, lo que muestra indirectamente el efecto de la solubilidad del implante en la unión ósea. Coincidimos con Vogel en que esta localización es irrigada por la sangre y el recambio de fluido intersticial es mejor que en el centro. En el centro del lecho, había menor unión ósea, y se puede explicar porque el recambio de fluido en el núcleo del defecto en este caso puede ser insuficiente para mantener un medio favorable para la osteogénesis. (376).

Oonish y cols (376, 385) obtuvieron plena restauración en defectos rellenados con partículas de biovidrio 45s5 de 300-360 µm de diámetro en 2 semanas. El defecto (de 6 mm de diámetro) se realizó en el eje de los cóndilos del fémur de conejos, como en nuestro estudio, pero no indican la profundidad de la perforación, dato que determina el volumen del defecto

Kotela y cols (386) realizaron estudios mecánicos con un compuesto formado por cerámica y una matriz de policaprolactona. Encontraron que la presencia de pequeñas cantidades de nanopartículas de wollastonita (0,5-1,0wt%) mejora significativamente el módulo de Young, la resistencia a la tensión y a la fractura del compuesto. Un contenido creciente de cerámica en los nanocompuestos (>2%) dio lugar, por el contrario, a una degradación de sus propiedades mecánicas.

Walsh y cols (287) compararon tres sustitutos óseos de β -TCP comercializados y disponibles en clínica con la misma composición química (Vitoss®, Oferion®, Chornos®) pero diferentes características macro y microscópicas, utilizando un modelo de defecto óseo en metafisis tibial de conejo Nueva Zelanda. Los tres materiales se mostraron similares en términos de propiedades mecánicas y curación de los defectos. Encontraron una disminución de las propiedades a las 12 semanas, cuando la reabsorción de los implantes estaba casi conseguida mientras que el remodelamiento de la cortical anteromedial no se había completado todavía. Todos los materiales se comportaron como osteoconductores y fueron soporte para la formación de nuevo hueso mientras que el tiempo de reabsorción fue diferente para cada implante. Vitoss® se reabsorbió más rápido que los otros materiales, probablemente debido a diferencias en la geometría de las partículas y estructura e interconectividad de los poros.

Este estudio examinó la respuesta *in vivo* del β -TCP solo, sin la adición de factores de crecimiento o autoinjerto local. El β -TCP se podría utilizar también como vehículo para moléculas bioactivas. Al igual que nosotros, estos autores optaron examinar cada material aisladamente, sin añadir células o factores, para permitir comparar directamente los tres materiales. Los tres β -TCP demostraron ser osteoconductores y lograron la curación del defecto creado.

La manipulación de tanto la macro como la microestructura de estos materiales permite la optimización de las propiedades y del comportamiento biológico para facilitar su utilización en clínica.

Xie y cols (388) realizaron un estudio del comportamiento *in vivo* de un material compuesto por biovidrio, colágeno, ácido hialurónico y fosfatidilserina para la reparación ósea. Utilizaron como modelo animal el radio de conejo y evaluaron la regeneración ósea a los 2,4 y 8 semanas. Realizaron estudios radiográficos, histológicos y micro-TC para caracterizar la formación ósea. A las ocho semanas encontraron curación completa del defecto rellenado con el material compuesto y BMP bovina, mientras que solo fue parcial en los defectos rellenados con material sin las BMP. No observaron curación en el grupo control, donde los defectos no fueron rellenados. Este estudio demostró que el nuevo biomaterial utilizado, con o sin la incorporación de las BMP, es un biomaterial prometedor en la ingeniería de tejidos para aplicación en ortopedia en localizaciones no sometidas a carga.

Los biovidrios se han utilizado con éxito en para relleno de defectos en ortopedia y maxillofacial pero sus características mecánicas limitan su utilización en zonas de carga. Intentos de reforzar estos materiales han disminuido su bioactividad. Para obtener el equilibrio óptimo entre las propiedades mecánicas y bioactividad, Beherei y cols (289) reforzaron el biovidrio 45S5 con titanio (TiO_2), formando un nuevo compuesto bioactivo vidrio/titanio. Sus resultados verificaron que mayores porcentajes de titanio mejoraban las propiedades mecánicas del compuesto. Encontraron presencia de una capa de apatita tras la inmersión del compuesto *in vitro*. Concluyen que el nuevo biocompuesto de biovidrio/titanio, especialmente con alta proporción de titanio, tiene unas propiedades de bioactividad y resistencia a la flexión comparable con el hueso cortical. Consideran que es un material prometedor como sustituto óseo en zonas de carga.

Se ha aceptado que el mecanismo de formación de HA es la disolución de iones de calcio de la superficie de los materiales bioactivos, lo que incrementa la supersaturación del fluido que lo rodea, con respecto a los componentes de HA. La disolución simultánea de silicatos da lugar a la formación de grupos de silanol en la superficie del material, los cuales son esenciales para la nucleación y formación de HA. Sin embargo, los implantes de biovidrio presentan malas propiedades mecánicas, lo que limita su utilización en zonas de carga. Por esta razón, se busca emparejar a los biovidrios con otros materiales, aprovechando sus excelentes propiedades de superficie, sin perder la buena bioactividad de los biovidrios.

En contacto con los fluidos corporales o los tejidos, los vidrios bioactivos desarrollan capas reactivas en sus superficies resultando en una unión química entre el implante y el tejido huésped (390). Ravarian y cols (391) desarrollaron un biovidrio tipo $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ obtenido mediante el método de sol-gel. Examinaron la bioactividad del compuesto *in vitro*, estudiando la capacidad de formar una capa de hidroxiapatita en la superficie como resultado del contacto con fluido corporal simulado (SBF Simulated body fluid). Detectaron que el biovidrio cristalizaba parcialmente. Además, encontraron hidroxiapatita silicatada, que se podría haber formado debido a la difusión de grupos silicato a la fase apatítica y estos podrían haber sido sustituidos por los grupos fosfato. Tras 14 días en SBF se formó apatita.

Concluyen que el vidrio tiene un mayor efecto en la estructura de la HA. Esto se relaciona con la descomposición causada por la adición del vidrio, la cual es altamente reactiva a alta temperatura y fuerza cambios químicos mayores asociados con el grupo hidroxil. Utilizando HA con biovidrio, se puede producir hidroxiapatita silicatada, que es un material altamente bioactivo.

Meseguer-Olmo y cols (392) evaluaron el vidrio 55S41C4P-1300 como potencial sustrato para ingeniería de tejidos óseos. Para este propósito, investigaron la capacidad de las células mesenquimales pluripotenciales (MSC Stem cells), aisladas de médula ósea de conejo, para adherirse, proliferar y diferenciarse a osteoblastos con y sin el vidrio 55S41C4P-1300. Obtuvieron el vidrio mediante tratamiento de calor de un sol-gel vidrio $55\text{SiO}_2, 41\text{CaO}, 4\text{P}_2\text{O}_5$ (mol.%) a 1300°C .

Los resultados mostraron que las MSC se adhirieron, difundieron, proliferaron y produjeron matriz extracelular mineralizada en el vidrio en los dos tipos de medio de cultivo utilizados. Al mismo tiempo, mostraron fenotipo osteoblástico, y este fenómeno se acompañó de una disminución gradual de la expresión del marcador CD90. El 55S41C4P-1300 fue capaz de inducir la diferenciación de las MSC. El vidrio evaluado en este estudio demostró ser bioactivo, citocompatible y capaz de promover la diferenciación de MSC a osteoblastos. Por esa razón, los autores lo proponen como una matriz útil para la ingeniería para la regeneración ósea.

Renghini y cols (306) desarrollaron y caracterizaron un andamio de biovidrio para ingeniería de tejidos óseos. Para ello utilizaron el vidrio $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$. Consiguieron desarrollar un andamio con una porosidad abierta e interconectada, de textura similar al hueso esponjoso, y con una resistencia mecánica superior a 2 MPa. Realizaron estudios mediante micro-CT, una técnica de imagen tridimensional, capaz de conseguir resolución espacial de $1\ \mu\text{m}^3$. Los andamios fueron introducidos en fluido corporal simulado (*simulated bone fluid SBF*) para estudiar la formación de microcristales de hidroxiapatita en la superficie y el interior de los poros del andamio. Observaron además una resorción gradual de las paredes de los poros durante la inmersión en el fluido.

Los investigadores observaron que la capa de hidroxiapatita creció dentro del andamio sumergido en SBF, lo que muestra la alta bioactividad y biocompatibilidad del andamio

estudiado. Observaron además la disminución del espesor de las paredes del andamio, lo que muestra la biorreabsorción del andamio. Finalmente la porosidad determinada por el micro-CT demostró que los andamios presentaban un alto porcentaje de porosidad (50-60 vol%), tanto antes como después de la inmersión. En particular, las observaciones microestructurales revelaron que las muestras estaban caracterizadas por una estructura de poros bimodal que incluía macroporos, necesarios para el crecimiento de nuevo hueso, y microporos, importante para la adhesión y proliferación celular. Concluyen que el vidrio estudiado es útil en la ingeniería de tejidos.

Clank y cols (393) implantaron un biomaterial de β TCP con una forma y estructura de interconexión de los poros novedosos, en radios de conejos de raza Nueva Zelanda. Estudiaron métodos de liberación de sustancias y utilizaron terapia celular autóloga para potenciar la curación del defecto combinada con el biomaterial. Con sus observaciones concluyen que añadir células osteogénicas únicamente al biomaterial es insuficiente para potenciar la reparación ósea, y que es necesario añadir otros factores para iniciar este proceso en el modelo experimental elegido.

Walsh y cols (308) realizaron un estudio para comparar el sulfato cálcico (plaster of Paris) solo y en combinación con injerto óseo autólogo. Para ello realizaron defectos en la cara medial de fémures distales bilaterales de oveja con brocas, consiguiendo defectos de 13 mm de diámetro y 10 mm de profundidad. Separaron los defectos en 4 grupos: sin relleno, relleno con sulfato cálcico, sulfato cálcico y autoinjerto y autoinjerto únicamente. A las 12 semanas de la implantación realizaron radiografías, tomografía computerizada y análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico. Los defectos no rellenos aparecían vacíos, con bordes esclerosos, el resto de defectos tenían porcentajes similares de relleno del defecto. Mediante los estudios inmunohistoquímicos encontraron incremento de BMP-2, BMP-7 y TGF- β y PDGF en los defectos rellenos con sulfato cálcico solo y los rellenos con sulfato cálcico en combinación con autoinjerto. Concluyen que la reabsorción del sulfato cálcico produce un aumento de la acidez del medio que podría ser responsable del mecanismo in vivo de este tipo de materiales. Este estudio, a diferencia de la mayoría de los previamente mencionados, señala las medidas completas del defecto practicado, y por tanto el volumen, dato que nos parece indispensable para la evaluación y comparación de los diferentes ensayos realizados. La profundidad del defecto realizado es de 10 mm, lo que coincide con nuestro método, pero el animal de experimentación es diferente, una oveja, con un tamaño considerablemente mayor, y por tanto nuestro modelo de defecto es proporcionalmente mayor al utilizado en este estudio.

LÍMITES DE LA TESIS

Este estudio permite la evaluación de la respuesta celular inicial, cuando las células entran en contacto con los andamios, lo cual es de gran importancia para el estudio de la biocompatibilidad, pero, a pesar de los estudios microscópicos realizados, no permite un análisis profundo de la interacción biológica entre las células y el material. No obstante, sería interesante realizar estudios complementarios para detectar los diferentes grupos de iones liberados al medio y para profundizar en el efecto de estos productos sobre el comportamiento celular. De esta forma, se tendría mayor información de la influencia de los productos de degradación en las células.

Por otro lado, sería interesante estudiar el efecto de diferentes porcentajes de vidrio en los andamios de material compuesto, sobre las propiedades mecánicas, la degradación y la respuesta celular. Además convendría realizar estudios de degradación con diferentes relaciones superficie volumen para ver el efecto de este parámetro en la formación de precipitados.

Gracias a la versatilidad del proceso de elaboración y a la combinación de los dos materiales, los andamios de material compuesto presentan múltiples posibilidades de modificar y ajustar diferentes parámetros como el grado y tamaño de la porosidad, las propiedades mecánicas, la velocidad de degradación y el grado de bioactividad, variando los porcentajes y tamaño de las partículas de vidrio. El porcentaje de porosidad y el tamaño de los poros dentro del andamio es de gran importancia y debe ser el adecuado para que permita tanto la adhesión y colonización celular como el transporte de nutrientes dentro de la estructura 3D. Por otro lado, coincidimos con Navarro Toro (4) en que el control de las propiedades mecánicas de los andamios 3D para Ingeniería de Tejidos juega un papel de gran importancia ya que debe tenerse en cuenta el efecto de la estimulación mecánica sobre el comportamiento celular debido a los fenómenos de mecanotransducción. La incorporación de diferentes porcentajes de partículas de vidrio dentro del compuesto, así como la variación del tamaño de los poros y el porcentaje de porosidad afectan en las propiedades mecánicas de las esponjas poliméricas.

Otro dato importante es el control de la velocidad de degradación del andamio, ya que la finalidad de los mismos es funcionar como soportes temporales y desaparecer una vez que se ha regenerado el nuevo tejido. Según Navarro Toro (4) este parámetro podría controlarse principalmente variando el porcentaje de fase cristalina del polímero mediante tratamientos térmicos. En cuanto a la bioactividad del andamio, la manipulación de la cantidad y del tamaño de las partículas de vidrio incorporadas en la matriz polimérica podría inducir cambios en la formación de precipitados de fosfato de calcio en la estructura 3D que favorezcan la interacción con el tejido óseo.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron una buena interacción tejido-material, por lo que el material compuesto tiene potencial como andamio para Ingeniería de Tejidos.

Futuro

Los primeros datos clínicos sobre las aplicaciones de los vidrios bioactivos aparecieron en los años 80 (394). Desde entonces, los vidrios bioactivos se han utilizado en cirugía reconstructiva craneofacial, cirugía dental y cirugía ortopédica y traumatología. Andreassen y cols (395) evaluaron la utilización de Cortoss®, un biovidrio utilizado en Holanda para apoyo de tornillos en 37 fracturas de tobillo tipo B de Weber con buenos resultados. Por otro lado se ha visto que la utilización de Cortoss® puede mitigar el dolor cuando se utiliza en vertebroplastia (396, 397). Se han descrito además resultados satisfactorios en su utilización en fracturas de radio distal como apoyo a la osteosíntesis (118, 289).

Durante los últimos años se ha avanzado considerablemente en la comprensión del proceso de reparación ósea, lo que tiene implicaciones significativas para el manejo de la pérdida ósea. La identificación de las proteínas osteoinductivas y otros factores involucrados en la promoción de la proliferación osteoblástica, diferenciación y función ha aumentado el potencial para la manipulación de la reparación local de una manera beneficiosa. La cascada de acontecimientos biológicos que da lugar al inicio y soporte de la reparación es un proceso complejo. Este proceso incluye la estimulación de una respuesta osteoblástica y el desarrollo de un ambiente local capaz de mantener esta respuesta. La restauración de un adecuado aporte sanguíneo y la habilidad de mantener la estabilidad y la carga controlada durante el proceso de reparación son también importantes para llegar a un resultado satisfactorio. Para obtener este óptimo resultado se precisa que la manipulación de este proceso requiera la combinación de diferentes estrategias dependiendo de la situación clínica (108).

Comúnmente la mayoría de los sustitutos óseos tienen poca actividad biológica. Actúan como relleno y tienen propiedades de osteointegración y osteoconducción. Idealmente los sustitutos óseos del futuro tendrán integridad estructural, proporcionarán un marco de trabajo para la formación ósea del huésped y actuarán como sistemas liberadores de factores reguladores de la respuesta local del hueso. Para asegurar la actividad efectiva como liberador de sustancias se requiere la resorción controlada del sustituto. Esto es necesario para asegurar una oportuna y predecible liberación de factores incorporados en la sustancia y el consecuente reemplazo del sustituto por hueso del huésped.

La sustitución del tejido óseo mediante técnicas de ingeniería tisular implica el uso de matrices biocompatibles, osteoconductoras y bioactivas que favorezcan la adherencia y el crecimiento celular *in vitro*, para posteriormente trasplantarse en el defecto que se va a reparar. Ciertos materiales han demostrado su capacidad de influir en la adherencia, proliferación y diferenciación de un modo muy variable, debido a las características dinámicas o reactivas de su superficie, lo que permite la liberación de iones Ca, P, Si, Na, Mg cuando entran en contacto con los fluidos biológicos y puede influir en la respuesta celular (285, 398, 399).

En última instancia la formación ósea sucede como consecuencia de la actividad celular osteoblástica. Avances recientes en la purificación y expansión *in vitro* de precursores osteogénicos han añadido una nueva dimensión para reemplazar defectos óseos. Un gran número de centros están ahora examinando el potencial de estas células para cicatrizar grandes defectos, tanto solos como en combinación con factores biológicos activos. La utilización de estos precursores autólogos expandidos *in vitro* es capaz de proveer una cantidad significativa de material para injerto óseo. Todo ello, en combinación con una apropiada combinación de un sustituto óseo, tiene el potencial para maximizar la

reparación de defectos óseos.

Recientes progresos en el diseño y funcionalidad de polímeros biocompatibles y en la tecnología de su procesamiento han permitido producir estructuras porosas con arquitectura adaptada para la ingeniería de tejidos. El diseño de los andamios debe tener determinadas características, como apropiada porosidad y biodegradabilidad, así como requerimientos específicos del defecto, según forma y medidas. El gran reto de la ciencia de los materiales y la tecnología en el campo de la ingeniería de tejidos es controlar la precisión y reproductibilidad de los andamios fabricados, para estandarizar el proceso de fabricación hacia futuras aplicaciones a escala industrial (400).

En general, los materiales osteoconductores se utilizan para tratar defectos metafisarios en combinación con fijación interna o externa. Los materiales osteoinductores se utilizan solos o como complemento a otros injertos en áreas donde la curación puede ser defectuosa: fracturas y defectos diafisarios y retardos de consolidación. Los compuestos de materiales osteoconductores y osteoinductores han demostrado ser útiles tanto en defectos metafisarios como en diafisarios, y las proteínas y factores de crecimiento que promueven la curación ósea podrían utilizarse algún día para el tratamiento de la mayoría de las fracturas. Son necesarios mejores estudios y análisis para determinar la utilidad de los diferentes sustitutos óseos. Una verdadera comparación de los diferentes productos requiere un estudio bien diseñado y aleatorio. Organizar este estudio prospectivo y multicéntrico requiere un esfuerzo organizativo y económico considerable. Dada la ausencia de datos fiables derivados de estudios de estas características, los tribunales clínicos deberían determinar las posibilidades de elección del sustituto óseo que ayude a la formación ósea y la curación de la fractura de la manera más efectiva, eficiente, segura y con la mejor relación coste-efectividad (401).

CONCLUSIONES

Los materiales son biocompatibles, biodegradables y muestran unión ósea

La regeneración ósea se realiza de forma centripeta, es decir, de la periferia al centro del defecto

El implante de material compuesto ha funcionado como estimulador de osteogénesis mediante el reclutamiento de células de tipo mesenquimal del lecho receptor, con diferenciación posterior a células formadoras de hueso en su superficie.

El material compuesto utilizado ha demostrado promover la formación ósea en defectos óseos segmentarios en el modelo experimental utilizado y ofrece un potencial interesante para los procesos de ortopedia reconstructiva.

Desde el punto de vista mecánico, el biovidrio BV-11 es un buen candidato para su aplicación en la reparación del tejido óseo. El material compuesto presenta una rápida pérdida de las propiedades mecánicas, por lo que no permite su utilización en para elaboración de material de osteosíntesis. Se propone para su utilización en relleno de defectos óseos y cavidades, y para vehicular sustancias.

BIBLIOGRAFÍA DEFINITIVA

1. 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 Fixations. ISFR Symposium. Singapur. The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 35-44.
2. 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.
3. PROUBASTA Y, GIL MUR J, PLANELL JA (eds). Fundamentos de Biomecánica y biomateriales. Ergon SA, 1997.
4. NAVARRO TORO ME. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea. Tesis doctoral, 2005. Universidad Politécnica de Cataluña
5. WILLIAMS D. Definitions in Biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 1987
6. VERT M, GUERIN PH. Biodegradable aliphatic polyester of the poly (hydroxy acid) type for temporary therapeutic applications. En: M A Barbosa (ed), Biomaterials degradation. Fundamental aspects and related clinical phenomena. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co, 1991; 35-51
7. Ravaglioli A, Krajewski A. Bioceramics. Londres: Chapman & Hall, 1992
8. HENCH LL. Bioceramics: From concept to clinic. J Am Ceram Soc 1991; 74(7):1487-1510
9. SANZANA SALAMANCA ES. Estudio comparativo de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos en defectos cavitarios experimentales. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 2004
10. Cornell CN: Regeneration of bone in critical defects. J Orthop Trauma 1999; 13: 523-4
11. Von Walter P: Wiedereinheilung der bei der trapanation ausgebohrten knochenscheibe. J Chir Augen-Heilkunde 1821; 2: 571
12. Ollier L: Traité experimental et clinique de la régénération de l' os. Paris: Victor Masson et Fils; 1867
13. McEwen W: Observations concerning transplantation on bone. Illustrated by a case of inter-human osseous 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
14. Barth A: Über histologische befunde nach knochen-implantationen. Arch Klin Chir 1883; 46: 409-35
15. 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
16. Huntington TW: Case of bone transference: Use of a segment of fibula to supply a defect in the tibia. Ann Surg 1905; 41: 249-51
17. Buchmann PI: Treatment of elbow ankylosis by means of transplantation of the entire joint. Zentralbl Chir 1908; 19: 582-4
18. Albee FH: Bone-Graft Surgery. Philadelphia: W. B. Saunders; 1915
19. Lexer E: Joint transplantation and arthroplasty. Surg Gynecol Obstet 1925; 40: 782-809
20. Inclán A: The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. J Bone Joint Surg 1942; 24 A: 81-97
21. WILSON PD: Experiences with a bone bank. Ann Surg 1947; 40: 932-45

22. Sanchiz Olmos V: El banco de huesos del Hospital Provincial de Madrid. *Acta Ortop Traum* 1953; 1: 3-15
23. Narváez S: Banco de huesos. *Rev Chil Ortop Traum* 1953; 1: 17-21
24. Bonfiglio M, Jeter WS, Smith CL: The immune concept. Its relation to bone transplantation. *Ann NY Acad Sci* 1955; 59: 417-38
25. Burwell RG: Studies in the transplantation of bone. VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg* 1963; 45 B: 597-612
26. Ottolenghi CE: Massive osteoarticular bone grafts. *J Bone Joint Surg* 1966; 48 B: 646-59
27. Volkov M: Allotransplantation of joints. *J Bone Joint Surg* 1970; 52 B: 49-53
28. Taylor GI, Miller GD, Ham FJ: The free vascularized bone graft: A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 1975; 55: 533-44
29. Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and softtissue preservation. *Clin Orthop* 1989; 238: 249-81
30. Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 1989; 239: 263-85
31. URIST M R. Bone: Formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150: 893-899
32. GIANNOUDIS PV, POUNTOS I. Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Int J Care Injured*. 2005; 36S: S2-S3
33. GOVENDER S, CSIMMA C, GENANT HK, VALENTIN-OPRAN A, AMIT Y, ARBEL R, ARO H, ATAR D, BISHAY M. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 of treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomised study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2002; 84A (12): 2123-34
34. PARTIDGE K, YANG X, CLARKE N M, OKUBO Y, BESSHO K, SEBALD W, HOWDLE SM, SHAKESHEFF KM, OREFFO RO. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 292 (1): 144-52
35. PETERSON B, ZHANG J, IGLESIAS R, KABO M, HEDRICK M, BENHAIM P, LIEBERMAN JR. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng*. 2005; 11 (1-2): 120-9
36. LYNN AK, BROOKS RA, BONFIELD W, RUSHTON N. Repair of defects in articular joints. *J Bone Joint Surg* 2004; 86-B: 1093-9
37. BUCHOLZ RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop* 2002; 395:44-52
38. SAUER ST, MARYMONT JV, MIZEL MS. Specialty update: What's new in foot and ankle surgery. *J Bone Joint Surg* 2004;86:878-886
39. Shors EC. Coraline Bone Graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 1999; 30: 599-613
40. Dressmann H: Ueber knochenplombierung. *Beitr Klin Chir* 1892; 9: 804-6
41. Albee FH, Morrison HF: Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg* 1920; 71: 32-6
42. Ray RD, Ward AA: A preliminary report of studies of basic calcium phosphate in bone replacement. *Surg Form* 1951; 3: 429-34
43. Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, Grower MF, Driskell T: Biodegradable ceramics implants in bone. *Oral Surg* 1971; 32: 336-46
44. Peltier L: The use of plaster of Paris to fill large defects in bone. *Am J Surg* 1959;

- 97: 311-5
45. Coetzee AS: Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate. Arch Otolaryngol 1980; 106: 405-9
 46. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee J T: Bonding mechanism at the interface of the ceramic prosthetic materials. J Biomed Mater Res 1971; 2: 117-41
 47. Roy DM, Linnehan SA: Hydroxyapatite formed from coral skeleton carbonate by hydrothermic exchange. Nature 1974; 247: 220-7
 48. BURNIE J, GILCHRIST T, Duff SRI, Drake CF, Harding NGL, Malcolm AJ. Controlled release glasses (C.R.G.) for biomedical uses. Biomaterials 1981; 2: 244-6
 49. LeGeros RZ, Chohayeb A, Shulman A: Apatitic calcium phosphate: posible restorative materials. J Dent Res 1982; 61: 343
 50. Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate setting cement. J Dent Res 1983; 62: 672
 51. Driessens FCM, Boltong MG, Planell JA, Bermúdez O, Ginebra MP, Fernández E: A new apatitic calcium phosphate bone cement: preliminary results. Bioceramics 1993; 6: 469-73
 52. Ginebra MP, Fernández E, Boltong MG, Bermúdez O, Planell JA, Driessens FCM: Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. Clin Mat 1994; 17: 99-104
 53. Clément J, Ekeberg L, Martínez S, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA: Influence of the chemical composition on the mechanical properties and in vitro solubility of phosphate glasses in the system P_2O_5 -CaO- Na_2O . Bioceramics 1998; 11: 141-4
 54. Navarro M, Ginebra MP, Planell JA: Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility. J Biomed Mater Res 2003; 67 A: 1009-15
 55. Navarro M, Clément J, Ginebra MP, Martínez S, Ávila G, Planell JA: Improvement of the stability and mechanical properties of resorbable phosphate glasses by the addition of TiO_2 . Bioceramics 2002; 14: 275-8
 56. Garrido Lahiguera R. Estudio experimental de un nuevo vidrio bioactivo en la reconstrucción de defectos óseos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2000
 57. GARRIDO LAHIGUERA R, GIL ALBAROVA J, GIL ALBAROVA R, BUENO LOZANO AL, 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: 125-137
 58. GIL-ALBAROVA J GARRIDO-LAHIGUERA R, SALINAS AJ, ROMAN J, BUENO-LOZANO A, GIL-ALBAROVA R, VALLET-REGI M The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects. Biomaterials 2004;25:4639-45
 59. GIL-ALBAROVA J, SALINAS AJ, BUENO-LOZANO AL, ROMAN J, ALDINI-NICOLO N, GARCIA-BAREA A, GIAVARESI G, FINI M, GIARDINO R, VALLET-REGI M. The in vivo behaviour of a sol-gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. Biomaterials 2005;26:4374-82
 60. GARCIA BAREA A. Desarrollo de vitrocerámicas y vidrios bioactivos en el tratamiento de defectos óseos segmentarios. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Junio 2007
 61. BOSTROM MPG, SEIGERMAN DA. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: A survey Study. HSSJ 2005; 1:9-18
 62. LAVERNIA CJ, MALININ TI, TEMPLE HT, MOREYRA CE. Bone and tissue allograft used by orthopaedic surgeons. J Arthroplasty 2004; 19:430-435
 63. MARTIN GJ, BODEN SD, TITUS L, SCARBOROUGH NL. New formulations of

- demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine* 1999; 24:637-645
64. LANE J M, TOMIN E, BOSTROM MPG. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop.* 1999; 367S: 107-117
 65. CANOSA SEVILLANO R, PÉREZ BLANCO R. Diferentes alternativas de reconstrucción, biológicas y con biomateriales, de los defectos óseos. *Rev Ortop Traumatol.* 1992; 361B: 128-34
 66. CHAPMAN MW. Bone grafting. En: M W Chapman, M Madison (eds), *Operative Orthopaedics.* Philadelphia: J B Lippincott. 1993; 139-149
 67. HOLLINGER JO, BREKKEJ, GRUSKIN E, LEE D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop.* 1996; 324: 55-65
 68. MALININ T I, COUCEIRO J, MNAYMNEH W, HORNICEK F J. Cirugía de preservación de la extremidad en cirugía ortopédica oncológica. *Rev Ortop Traumatol.* 1998; 42: 324-329
 69. MÄKELÄ E A, VAINIONPÄÄ S, VIHTONEN K, MERO M, HELEVIRTA P, TÖRMÄLÄ P, ROKKANEN P. The effect of a penetrating biodegradable implant on the growth plate: An experimental study on growing rabbits with special reference to polidioxanone. *Clin Orthop.* 1989; 241: 300-308
 70. GARCÍA DE LUCAS F, DE PEDRO J A, LÓPEZ BRAVO A, SAN ROMAN J, CUADRADO MA, PÉREZ CABALLER AJ, LÓPEZ-DURÁN L. Osteorregeneración inducida por biomateriales y BMP en defectos diafisarios. *Rev Ortop Traumatol.* 1995; 39: 443-456
 71. Rokkanen P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials* 2000; 21:2607-2613., An Y, Woolf SFR. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 2000; 21:2635-2652
 72. JONES JR, EHRENFRIED LM, HENCH LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:964-973
 73. TAKEZAWA TA. Strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behaviour. *Biomaterials* 2003;24:2267-75
 74. OKII N, NISHIMURA S, KURISU K, TAKESHIMA Y, UOZUMI T. In vivo histological changes occurring in hydroxiapatite cranial reconstruction-case report. *Neur Med-Chir* 2001;41(2):100-4
 75. FREYMAN TM, YANNAS IV, GIBSON LJ, Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog Mater Sci* 2001;46:273-82
 76. HENCH LL, POLAK JM. Third generation biomaterials. *Science* 2002;295 (5557):1014-17
 77. TAY BK B, PATEL VV, BRADFORD DS. Calcium sulphate and calcium phosphate based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 615-623
 78. WHITE E, SHORS EC. Biomaterial aspects of interpore-200 porous hydroxiapatite. *Dent Clin North Am.* 1986; 30: 49-67
 79. HOPE PG, WILLIAMSON DM, COATES CJ, COLE WG. Biodegradable pin fixation of elbow fractures in children. *J Bone Joint Surg.* 1991; 73B: 965-968
 80. GOSHIMA J, GOLDBERG VM, CAPLAN AI. The osteogenic potential of culture expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop.* 1991; 262: 298-311
 81. MESEGUER OLMO LR, VICENTE ORTEGA V, ALCARAZ BAÑOS M. RODRÍGUEZ VICENTE J, GALIAN CANOVAS A, CLAVEL-SAINZ NOLLA M. Osteointegración de la cerámica porosa de Whitlockite. *Rev Ortop Traumatol.* 1995, 39: 528-533
 82. KARAGEORGIU V, KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogénesis. *Biomaterials* 2005;26:5474-91

83. Marks Jr SC, Odgren PR. Structure and development of the skeleton. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2002:3–15
84. Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier PJ. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* 2004;783–9
85. Currey JD. Tensile yield in compact bone is determined by strain, post-yield behaviour by mineral content. *J Biomech* 2004;549–56
86. 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; 4(3):433–56
87. Itala AI, YLANEN HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT. Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res* 2001;58(6):679–83
88. OGUSHI H, OKUMURA M, YOSHIKAWA T. Osteogenic capacity of hydroxyapatite coated porous calcium carbonate implants. En: W Bonfield, G W Hastings, K E Tanner (eds), *Bioceramics*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991; 213-219
89. BAUER TW, MUSCHLER GF. Bone grafts materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop*. 2000; 371: 10-27
90. BROWN P. A new calcium phosphate water setting cement. En: *Cements Research Progress*. Westerville, OH: American Ceramic Society, 1986
91. FERRARO JW. Experimental evaluation of ceramic calcium phosphate as a substitute for bone grafts. *Plast Reconstr Surg*: 1979; 63: 634-640
92. WALSH WR, HARRISON J, LOEFLER A, MARTIN T, VAN SICKLE D, BROWN MKC, SONNABEND DH. Mechanical and histological evaluation of Collagraft in a ovine lumbar fusion model. *Clin Orthop*. 2000; 375: 258-266
93. BUTTS TE, PETERSON LJ, ALLEN CM. Early soft tissue ingrowth into porous block hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg*. 1989; 47: 475-479
94. LI S, VERT M. Hydrolytic degradation of the coral/poly (DL-lactic acid) bioresorbable material. *J Biomater Sci Polym*. 1996; 7: 817-827
LI S, VERT M. Hydrolytic degradation of the coral/poly (DL-lactic acid) bioresorbable material. *J Biomater Sci Polym*. 1996; 7: 817-827
95. THOMAS W, BAUER MD. An overview of the histology of skeletal substitute materials. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131:217-224
96. YUAN J, CUI L, ZHANG WJ, LUI W, CAO Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2007; 28:1005-13
97. OGOSE A, HOTTA T, KAWASHIMA H, KONDO N, GU W, KUMURA T, et al. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumours. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;72:94-101
98. LU J, DESCAMPS M, DEJOU J, KOUBI G, HARDOUIN P, LEMAITRE J, et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res* 2002;63:408-12
99. DONG J, UEMURA T, SHIRASAKIE Y, TATEISHI Y. Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 2002;23:4493-502
100. CLÉMENT J, EKERBERG L, MARTÍNEZ S, GINEBRA MP, PLANELL JA. Influence of the chemical composition on the mechanical properties and in vitro solubility of Phosphate glasses in the system P2O5-CaO-Na2O. *Bioceramics*. 1998; 11: 141-144
101. CLÉMENT J, MANEO JM, PLANELL JA, ÁVILA G, MARTÍNEZ S. Analysis of

- structural changes of a phosphate glass during its dissolution in simulated bone fluid. *J Mat Sci*. 1999; 10: 729-732
102. CLÉMENT J, TORRES P, GIL FJ, PLANELL JA, TERRADAS R, MARTÍNEZ S. Evaluation by Vickers indentation of fracture toughness of a phosphate biodegradable glass. *J Mat Sci*. 1999; 10: 437-441
 103. CLÉMENT J, BJELKEMYR A, MARTÍNEZ S, FERNÁNDEZ E, GINEBRA MP, PLANELL JA. Analysis of the kinetics of dissolution and the evolution of the mechanical properties of a phosphate glass stored in simulated body fluid. *Bioceramics*. 1999; 12: 375-378
 104. LÓPEZ-SASTRE NÚÑEZ A, VAL BERNAL JF, GONZALO ORDEN JM, GORROCHATEGUI SÁNCHEZ I, BUELTA CARRILLO L, LÓPEZ-SASTRE A. La influencia del revestimiento de hidroxiapatita y de biovidrio en al osteointegración de implantes de titanio. *Rev Ortop Traumatol*. 1997; 41: 173-181
 105. SALINAS AJ, ROMÁN J, VALLET-REGÍ M, OLIVEIRA JM, CORREIRA RN, FERNANDES M H. In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO P2O5-CaO SiO2-CaO MgO 2SiO2 system. *Biomaterials*. 2000; 21: 251-257
 106. HENCH LL, PASCHALL HA. Direct Chemical Bond of Bioactive Glass-Ceramic Materials to Bone and Muscle. *Journal of Biomedical Materials Research* 1973;7(3):25-42
 107. HENCH LL, WILLSON J. Surface active biomaterials. *Science* 1984;226:630-6
 108. MOORE WR, GRAVES SE, BAIN GI. Synthetic Bone Graft Substitutes. *ANZ J. Surg* 2001;71:354-361
 109. SCHULTE M, SCHULTHESIS M, HARTWIG E. Vertebral body replacement with a bioglass-polyurethane composite in spine metastases: Clinical, radiological and biomechanical results. *Eur Spine J*. 2000;9:437-44
 110. BROW RK. Review: the structure of simple phosphate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 200;263:1-28
 111. CHEN QZ, THOMPSON ID, BOCCACCINI AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:2414-2425
 112. LAURENCIN CT, LU HH, KHAN Y. Processing of polymer scaffolds: polymer-ceramic composite foams. In Atala A, Lanza R P, editors. *Methods of tissue engineering*. California: Academic Press; 2002. p.705-14
 113. JONES J R, HENCH LL. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2003;7:301-7
 114. BOCCACCINI AR. Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated Bioglass particles for tissue engineering applications. *J Mater Sci: Mater Med* 2003;14:350-443
 115. KINNUNEN I, AITASALO K, POLLONEN M, VARPULA M. Reconstruction of orbital floor fractures using bioactive glass. *J Craniomaxillofac Surg*. 2000; 28:229-34
 116. PELTOLA M, SUONPAA J, AITASALO K. Experimental follow-up model for clinical frontal sinus obliteration with bioactive glass. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2000;543:167-9
 117. SCHROOTEN J, HELSEN JA. Adhesión of bioactive glass coating to Ti6Al4V oral implants. *Biomaterials* 2000;21:1461-9) (MOORE WR, GRAVES SE, BAIN GI. Synthetic Bone Graft Substitutes. *ANZ J. Surg* 2001;71:354-361
 118. VAN DER STOCK J, VAN LIESHOUT EM, EL-MASSOUDI Y, VAN KRALINGER GH, PATKA P. Bone substitutes in the Netherlands. A systematic literature review. *Acta Biomater* 2011;7(2):739-50
 119. XYNOS I D, HUKKANEN M V J, BATTEN J J, BUTTERY I D, HENCH L L POLLAK J M. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhance bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif*

- Tiss Int 2000;67(4):321-329
120. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002;23(2):449–56
 121. EL GHANNAM AR. Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: design principles and structure–bioactivity relationship. *J Biomed Mater Res A* 2004;69(3):490–501
 122. CICCONE W, MOTZ C, BENTLEY C, TASTO J. Bioabsorbable Implants in Orthopaedics: New Developments and Clinical Applications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2001;9:280-288
 123. BEHRAVESH EM, YASKO AW, ENGEL PS, MIKOS AG. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop.* 1999; 367: 118-125
 124. GIARDINO R, GIANNINI S, FINI M, GIAVARESI G, MARTINI L, ORIENTI L, GRIMALDI M, CAVARRA GL. Experimental in vivo Model to Evaluate Resorbable Implants into bone. 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; 143-151
 125. GOGOLEWSKI S. Bioresorbable Internal Fixation devices-Mechanical Properties and future trends in Production Technologies. 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, 1998; 249-258
 126. HASTINGS GW. Is there an ideal biomaterial for use as an implant for fracture 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; 19-33
 127. KWOK-SUI L, Discussion and Provocative Issues. 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; 269-272
 128. LEONG KW. Chemical and mechanical considerations of biodegradable polymers for orthopaedic applications. 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; 45-56
 129. BLOM A. Which scaffold for which application? *Current Orthopaedics.* 2007; 21: 280-287
 130. LEE S J, LIM GRACE J, LEE JW, ATALA A, YOO JJ. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-plycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3466-3472
 131. LEE SJ, KHANG G, LEE YM, LEE HB. Interaction of human chondrocytes and NIH/3T3 fibroblasts on chloric acid-treated biodegradable polymer surfaces. *J Biomater Sci Polym* 2002;13:197-212
 132. ASPENBERG P, LOHMANDER S, THORNGREN KG. Failure of bone induction by bone matrix in adult's monkeys. *J Bone Joint Surg.* 1998; 70: 625-627
 133. ASPENBERG P, LINDQVIST SB. Ethylene oxide and bone induction. Controversy remains. *Acta Orthop Scand.* 1998; 69: 173-176
 134. ASPENBERG P, JOHNSON E, THORNGREN KG. Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *J Bone Joint Surg.* 1990; 72B: 1036-1037
 135. ATHANASIOU KA, SINGHAL AR, AGRAWAL CM, BOYAND BD. In vitro degradation and release characteristics of biodegradable implants containing trypsin

- inhibitor. *Clin Orthop*. 1995; 315: 272-281
136. TÖRMÄLÄ P, POHJONEN T, ROKKANEN P. Future trends in the Development of Bioabsorbable Implants for fracture 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; 259-265
 137. CASTELEYN P P, HANDELBERG F, HAENTJENS P. Biodegradable rods versus Kirschner wire fixation of wrist fractures. A randomised trial. *J Bone Joint Surg*. 1992; 74B: 858-861.
 138. COLL BOSCH M D, DÍAZ F. Tratamiento de fracturas en la infancia con tornillos reabsorbibles. *Rev Orthop Traumatol*. 1996; 40 (Supl 1): 22-25.
 139. KUMTA S M, SPINNER R, LEUNG P C. Absorbable intramedullary implants for hand fracture. Animal experiments and clinical trial. *J Bone Joint Surg*. 1992; 74B: 563-566.
 140. NORDSTRÖM P, PIHLAJAMÄKI H, TOIVONEN T, TÖRMÄLÄ P, ROKKANEN P. Tissue response to polyglycole and polylactide pins in cancellous bone. *Arch Orthop Traum Surg*. 1998; 117: 197-204
 141. SANTAVIRTA S, KONTTINEN Y T, SAITO T, GRÖNBLAD M, PARTIO E, KEMPPINEN P, ROKKANEN P. Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg*. 1990; 72B: 597-600
 142. BOS RR, ROZEMA FR, BOERING G, NIJEHUIST AJ, PENNING S AJ, VERWEY AB, NIEUWENHUIST P, JANSEN HWB. Degradation of an tissue reaction to biodegradable poly (L-Lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats. *Biomaterials*. 1991; 12: 32-36.
 143. WEILER A, HELLING H J, KIRCH U, ZIRBES T K, REHM K. Foreign-body reaction and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation. Experimental study en sheep. *J Bone Joint Surg*. 1996; 78B: 369-376
 144. GARCÍA NOVALVOS A, CLAVEL-SAINZ M, MESEGUER J, GABARDO A, SANTOJA F. Poliésteres (PLA/PGA) biodegradables en Cirugía Ortopédica y Traumatología: Estudio de su degradación y sustitución por tejido óseo. *Rev Ortop Traumatol*. 1996; 40: 500-510.
 145. FRASER RK, COLE WG, Osteolysis after biodegradable pin fixation of fractures in children. *J Bone Joint Surg*. 1992; 74B: 929-930
 146. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(2):141-150
 147. Hu Y, Grainger DW, Winn SR, Hollinger JO. Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems. *J Biomed Mater Res* 2002;59(3):563-72
 148. Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J Biomed Mater Res* 2001;55(2):242-53
 149. Yang XB, Roach HI, Clarke NM, Howdle SM, Quirk R, Shakesheff KM. Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone* 2001;29(6):523-31
 150. Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002;60(4):613-21
 151. Vehof JW, Fisher JP, Dean D, van der Waerden JP, Spauwen PH, Mikos AG. Bone formation in transforming growth factor beta-1 coated porous poly(propylene fumarate) scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2002;60(2):241-51
 152. TABOAS JM, MADDIX RD, Krebsbach PH, HOLLISTER SJ. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D

- polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials* 2003;24(1):181-94
153. MARIN 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. Tesis doctoral. 2006
 154. AGRAWAL CM, NIEDERAUER G, MICALLEF D, ATHANASIOU KA. The use of PLA-PGA polymers in orthopaedics. In: Wise D, Trantolo D, Altobelh D, Yaszemski M, Greser J, editors. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Part A. Materials*. New Cork: Marcel Dekker, 1995:1055-89
 155. HUTMACHER D, HÜRZELER MB, SCHLIEPHAKE H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:667-78
 156. GARCÍA NOVALVOS A, CLAVEL-SAINZ M, MESEGUER J, GABARDO A, SANTOJA F. Poliésteres PLA/PGA biodegradables en Cirugía Ortopédica: Estudio de su degradación y sustitución por tejido óseo. *Rev Ortop Traumatol* 1996;40:500-10
 157. EPPLEY B. Resorbable plate fixation in pediatric craneofacial surgery. *Clin Plast Surg* 1994;21:15-19
 158. ROMANCE A, MIRERA C, SALVAN R, SANCHEZ ANICETOG, MUÑOZ MJ. Bioresorbable systems of bone fixation in Craneomaxillofacial Surgery. *Cranio Max Fac Surg* 2000;28(suppl 3):90
 159. SAILER HF, HAERS PE. Is resorbable osteosynthesis material “state of art” in paediatric craneofacial surgery?. *Cranio Max Fac Surg* 2000;28(suppl 3):90
 160. LADES CA, KRIENER S, MENZER M, KOVACS AF. Resorbable plate osteosynthesis of dislocated or pathological mandibular fractures: A prospective clinical trial of two amorphous L-DL Lactide copolymer 2 mm miniplate systems. *Plastic Recons Surg* 2003;111(2):601-10
 161. LADES CA, KRIENER S. Resorbable plate osteosynthesis of sagittal split osteotomies with major bone movement. *Plastic Recons Surg* 2003;111(6):1828-40
 162. CHAMORRO PONS MC, CEBRIAN CARRERO JL, MARTÍN PÉREZ M, MONTESEDEOCA GARCÍA N. Osteosíntesis reabsorbible en cirugía ortognática. Utilización del sistema Polimax® en la fijación del maxilar superior. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* 2003;25:152-7
 163. ASHAMMAKHI N, REINER D, ARNAUF E, MARCHAC D, NINKOVIC M, DONAWAY D, JONES B. Successful use of Biosorb osteofixation devices in 165 cranial and maxillofacial cases: A multicenter report. *J Craniofac Surg* 2004;15(4):692-701
 164. EDWARDS RC, KIELY KD, EPPLEY BL. Fixation of bimaxillary osteotomies with resorbable plates and screws: Experience in 20 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2001;59:271-6
 165. FERNÁNDEZ SANROMÁN J, GOIZUETA ADAME C, SANDOVAL GUTIERREZ JL, BUSCEMA C. Reconstrucción de fracturas del suelo de la órbita con láminas de Vicryl (polyglactin 910): Estudio prospectivo de 8 casos. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* 1999;21(6):324-30
 166. FERNÁNDEZ MENA D, GÓMEZ CARRIL M, NÚÑEZ DE LA FUENTE L, RAMOS PICOS D, MOYA MIRABAL A, GHANG VALDÉS A. Características físico-químicas de las microsferas obtenidas con diferentes polímeros y la liberación del principio activo. *Rev Cubana Farm* 2003;37(1):1-5
 167. PROKOP A, JUBEL A, HELLING HJ, EIBACH T, PETERS C. Soft tissue reactions of different biodegradable polylactide implants. *J of Biomaterials* 2004;25:259-67
 168. PROUBASTA Y, GILMUR J, PLANELL JA. *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Ed Ergon SA, 1997

169. ROBERT P, MAUDIT J, FRANK RM VERT M. Biocompatibility and resorbability of a polylactic acid membrana for periodontal guided tissue regeneration. *Biomaterials* 1993;14:353-8
170. MATTSON JS, CALLAGHER SJ, JABRO MH. The use of two bioabsorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. *J Periodont* 1999;70:510-7
171. DA SILVA PEREIRA S, WILSON SALLUM A, CASATI MZ, CAFFESSE RG, WENG D. Comparision of Bioabsorbable and Non-Resorbable membranes in the treatment of Dehiscence-Type Defects. A Histomorphometric Study in Dogs. *J Periodont* 2000;71:1306-14
172. CAFFESSE RG, NASJLETI CE, MORRISON EC, SÁNCHEZ E. Guided tissue regeneration: comparision of bioabsorbable and non bioabsorbable membranes. Histologic and histometric study in dogs. *J Periodont* 1994;65:583-91
173. TREJO PM, WELTMAN R, CAFFESSE RG. Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified Freeze-Dried bone Allograft: A randomized clinical trial. *J Periodontol* 2000;71:1852-61
174. SERRINO G, BIANCU S, IEZZI G, PIATTELLI A. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(5):651-8
175. BOSTMAN ON. Clinical biocompatibility and degradation of polylevolactide screws in the ankle. *Clin Orthop* 1995;320:101-9
176. VASENIUIS J, VAINONPAA S, VIHTONENE K. Comparision of in vivo hydrolysis, subcutaneous and intramedullary implantation to evaluate the strenght retention of absorbable osteosynthesis implants. *Biomaterials* 1990;11:501-4
177. MATSUSUE Y, HANAFUSA S, YAMAMURO T, SHIKINAMI Y, IKADA Y. Tissue reaction of bioabsorbable ultra-high strenght poly(L-lactide) rod: A long term study in rabbits. *Clin Orthop* 1995;317:246-53
178. BOSTMAN OM. Current concepts review: Absorbable implants for the fixation of fractures. *J Bone Joint Surg* 1991;73:148-53
179. VOICHE P, MERLE M, MEMBRE H, FOCKENS W. Bioabsorbable rods and pins for fixation of metacaphalangeal arthrodesis of the thumb. *J Hand Surg* 1995;20:1032-6
180. GOGOLEWSKI S, MAINIL-VARLET P. Effect of termal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides: Poly (L/D- lactide) and poly (L/DL-lactide. *Biomaterials* 1997;18:257-66
181. OCHOA E, VACANTI JP. An overview of the Pathology and Approches to Tissue Engineering. *Annals New York Academy of Sciences* 2002;979:10-26
182. POLSON AM, SOUTHARD RL. Periodontal healing alter GTR with Atrisorb barrier in beagle dogs. *J Dent Rest* 1994;73:380-3
183. ROSEN PS, REYNOLDS MA, BOWERS GM. A technique report of the in situ application of Atrisorb as a barrier for combination therapy. *Int J Periodont Res Dent* 1998;18:249-55
184. PIETRAZK WS, VERSTYNNEN ML, SARVER DR. Bioabsorbable fixation devices: Status for the craniomaxillofacial surgeon. *Journal of Craneofacial Surgery* 1997;8(2):92-96
185. GIL-ALBAROVA J, FINI M, GIL-ALBAROVA R, MELGOSA M, ALDINI-NICOLO N, GIARDINO R, SERAL F. Absorbable screws through the greater trochanter do not disturb physeal growth. *Acta Orthop Scand* 1998, 69: 273-276
186. GIL-ALBAROVA J, MELGOSA M, GIL-ALBAROVA R, FINI M, ALDINI-NICOLO N, GIARDINO R, SERAL F. Trochanteric epiphyseodesis by means of absorbable screws. En: *Surgery of the growth plate*. J. de Pablos Ed. Ergón SA, Madrid, 1998

187. Gil Albarova R. Hemiepifisiodesis femoral distal mediante biomateriales reabsorbibles. Estudio experimental en el conejo. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia 1999
188. GIL-ALBAROVA R, GIL-ALBAROVA J, GARRIDO LAHIGUERA R, MELGOSA GIL M, LOSTALE LATORRE F, MORANDEIRA GARCIA JR. Hemiepifisiodesis femoral distal mediante biomateriales reabsorbibles. Estudio experimental en el conejo. *Rev Esp Cir Osteoart.* 2000; 35: 297-306
189. COOK SD, RUEGER DC. Osteogenic protein-1. Biology and applications. *Clin Orthop.* 1996; 324: 29-38.
190. BOSTROM M P G, SALEH K J, EINHORM T A. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 647-658.
191. JOHNSON EE, URIST MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop.* 2000; 371: 61-74.
192. GOLDRING SR, GOLDRING MB. Cytoquines and skeletal physiology. *Clin Orthop.* 1996; 324: 13-23.
193. LIND M, Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand.* 1996; 67: 407-417.
194. MUNDY GR, Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop.* 1996; 323: 24-28.
195. SCADUTO AA, LIEBERMAN JR. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 625-635.
196. TRIPPEL SB, COUTS RD, EINHORM TA, MUNDY GR, ROSENFELD RG. Growth factors as therapeutic agens. *J Bone Surg.* 1996; 78A: 1272-1286.
197. TRIPPEL SB, Potential role of insulin like growth factors in fracture healing. *Clin Orthop.* 1998; 355S: 301-309.
198. WOZNEY J M, ROSEN V R. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop.* 1998; 346: 26-37.
199. TSUDA T, MASUHARA K, YOSHIWAZA H, SHIMIZU N, TAKAOKA K. Establishment of an osteoinductive murine osteosarcoma clonal cell line showing osteoblast phenotypic traits. *Bone.* 1989; 10: 195-200
200. FORRIOL F. Proteínas morfogenéticas óseas y su aplicación clínica. *Rev esp cir ortop traumatol.* 2010;54(Suppl 1):2-10
201. TUAN RS BOLAND G TULI R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5:32-45
202. SCHMIDMAIER G, WILDEMANN B, OSTAPOWICZ D, KANDZIORA F, STANGE R, HAAS NP. Long-term effects of local growth factor (IGF-1 and TGF- β 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res.* 2004;22:514-9
203. BODEN S D. Bioactive factors for bone tissue Engineering. *Clin Orthop.* 1999; 376S: 84-94
204. WANG JS, ASPENBERG P. Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta Orthop Scand.* 1993; 64: 557-561
205. JEPSSON C, ASTRAND J, TAGIL M, ASPENBERG P. A combination of bisphosphonates and BMP additives in impacted bone allografts. *Acta Orthop Scand.* 2003;74:483-9
206. HARDING AK, ASPENBERG P, KATAOKA M, BYLSKI D, TAGLI M. Manipulating the anabolic and catabolic response in bone graft remodelling: synergism by a combination of local BMP-7 and a single systemic doses of zoledronate. *J Orthop Res.* 2008;26:1245-9
207. WOZNEY JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine.* 2002;27

208. REDDI AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2001; 83-A Suppl 1:S1-6
209. RENGACHARY SS. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*. 2002;13:34-61
210. BORDEN M, ATTAWIA M, KHAN Y, EL-AMIN SF, LAURENCIN CT. Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sonetered polymeric microsphere matrix. *J Bone Joint Surg (Br)*. 2004;86-B:1200-8
211. LEE D D, TOFIGHI A, AIOLOVA M, CHAKRAVARTHY P, CATALANO A, MAJAHAD A, KNAACK D: A biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle. *Clin Orthop*. 1999; 367S: 396-405
212. BACK B, JORGENSEN PH, ANDREASSEN TT. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1990; 61: 54-58.
213. CARPENTER JE, HIPPI JA, GERHART TN, RUDMAN CG, HAYES WC, TRIPPEL S B. Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *J Bone Joint Surg*. 1992; 74A: 359-367.
214. EHRNBERG A, BROSIÖ O, LÄFTMAN P, NILSSON O, STRÖMBERG L. Enhancement of bone formation in rabbits by recombinant human growth hormone. *Acta Orthop Scand*. 1993; 64: 562-566.
215. KOSKINEN EVS, LINDHOLM RV, NIEMINEN RA, PURANEN JP, ATILA U. Human growth hormone in delayed union and non-union of fractures. *Int Orthop*. 1978; 1: 317-322.
216. NORTHMORE-BALL MD, WOOD MR, MEGGIT BF. A biomechanical study of the effects of growth hormone in experimental fracture healing. *J Bone Surg*. 1980; 62B: 391-396.
217. RILE EH, LANE JM, URIST MR, LYONS KM, LIEBERMAN JR. Bone morphogenetic protein-2. Biology and applications. *Clin Orthop*. 1996; 324: 39-46.
218. HECKMAN JD, EHLER W, BROOKS BP, AUFDEMORTE TB, LOHMAN CH, MORGAN T, BOYAN BD. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg*. 1999; 81A: 1717-1729.
219. TIELINEN L, MANNINEN M, POULAKKAINEN P, PIHLAJAMÄKI H, POHJONEN T, RAUTAVUORI J, TÖRMÄLÄ P. Polylactide pin with transforming growth factor β 1 in delayed osteotomy fixation. *Clin Orthop*. 1998; 355: 312-322.
220. LIND M, SCHUMACKER B, SOBALLE K, KELLER J, MELSEN F, BÜNGER C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*. 1993; 64: 553-556.
221. NIELSEN HM, ANDREASSEN TT, LEDET T, OXLUND H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fracture in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1994; 65: 37-41
222. CUADRADO MA, DE PEDRO JA, GARCÍA DE LUCAS FG, CEBRIÁN JL, FURIO V, ASENJO JA, VALOR R, LÓPEZ-DURÁN L. Reparación experimental de grandes defectos óseos mediante el implante de un extracto parcialmente purificado de BMP. *Rev Ortop Traumatol*. 1992; 361B: 488-494
223. TXEIRAJ OC, URIST MR. Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1998; 117: 27-34
224. REDDI AH. Bone cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4: 737-744
225. BOSTROM MPG, LANE JM, TOMIN E, BROWNE M, BERBERIAN W, TUREK T, SMITH J, WOZNEY J, SCHILDHAUER T. Use of bone

- morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop*. 1996; 327: 272-282.
226. KIRKER-HEAD CA, GERHART TN, AMSTRONG R, SCHELLING SH, CARMELL LA. Healing bone using recombinant human morphogenetic protein2 and copolymer. *Clin Orthop*. 1998; 349: 205-217.
 227. RIPAMONTI U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*. 1996; 17: 31-35.
 228. COOK SD, BAFFES GC, WOLFE MW, SAMPATH TK, RUEGER DC, WHITECLOUD TS. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing on large segmental bone defects. *J Bone Surg*. 1994; 76A: 827-838.
 229. COOK SD, WOLFE MW, SALKED SL, RUEGER DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing on segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77A: 734-750.
 230. JR, DALUISISKI A, STEVENSON S, MCALLISTER P, LEE YP, KABO JM, FINERMAN GAM, BERK A J, WITTE ON. The effect of regional therapy with bone morphogenetic protein-2 producing bone-marrow cells on the repair of segment femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg*. 1999; 81A: 905-917.
 231. TÁGIL M, JEPPSON C, ASPENBERG P. Bone graft incorporation. Effects of osteogenic protein 1 and impaction. *Clin Orthop*. 2000; 371: 240-245
 232. MAZZOLINI G, RUIZ J, PRIETO J. Posibilidades de la terapia génica en el sistema musculoesquelético. *Rev Ortop Traumatol*. 2005; 49: 202-13
 233. BRANFOOT T. Research directions for bone healing. *Int J Care Injured*. 2005; 36S; S51-S54.
 234. NORDSLETTEN L. Recent developments in the use of bone morphogenetic protein in orthopaedic trauma surgery. *Curr Med Res Opin*. 2006; S13-7: S23.
 235. CANCEDDA R, GIANNONI P, MASTROGIACOMO M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007; 28: 4240-4250
 236. HU Z, PEEL SA, HO SK, SANDOR GK, CLOKIE CM. Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation. *J Craniofac Surg*. 2005; 6: 1006-14
 237. LEE DY, PARK SJ, LEE S, NAM JH, BYUN Y. Highly poly(ethylene) glycolated islets improve long-term islet allograft survival without immunosuppressive mediations. *Tissue Eng* 2007;13(8):2133-41
 238. CHEN TL. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone*. 2004; 1: 83-95
 239. DOHAN D, DISS A. Report of the 2nd International Symposium on growth factors (SyFac 2005). *Implantodontie*. 2005; 14: 116-125
 240. SEEHERMAN HJ, LI R, KIM H, LI XJ, SMITH-ADALINE EA. Rh-BMP-2/Calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2006;88-A:144-60
 241. EDWARDS RB, SEEHERMAN HJ, BOGDANSKE JJ, DEVITT J, VANDERBY R, MARKEL MD. Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2004;86-A:1425-38
 242. SUMMER JC, TURNER TM, URBAN RM, TUREK T, SEEHERMAN H, WOZNEY JM. Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. *J Orthop Res*. 2004;22:58-65
 243. HOSHINO M, EGI T, TERAH 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;27:4934-4940
244. ROLDAN JC, JEPSEN S, MILLER J, FREITAG S, RUEGER DC, ACIL Y. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs bone morphogenetic protein-7. *Bone*. 2004;34:80-90
 245. WEBER FE, EYRICH G, GRATZ KW, MALY FE, SAILER HF. Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 31: 60-5.
 246. MIKI T, MASAKA K, IMAI Y, ENOMOTO S. Experience with freeze-dried PGLA/HA/rhBMP-2 as a bone graft substitute. *J Craniomaxillofac Surg* 2000; 28: 294-9
 247. LANE JM, YASKO AW, TOMIN EBS, COLE BJ, WALLER S, BROWNE M, TUREK T, GROSS J. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop*. 1999; 361: 216-27.
 248. TEIXERA JO, URIST MR. Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1998; 117: 27-34.
 249. KANDZIORA F, BAIL H, SCHMIDMAIER G, SCHOLLMEIER G, SCHOLZ M, KNISPEL C, HILLER T, PFLUGMACHER R, MITTLMEIER T, RASCHKE M, HAAS NP. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D, L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg*. 2002; 97(Suppl):40-8.
 250. ABE N, LEE Y, SATO M, ZHANG X, WU J, MITANI K, LIEBERMAN JR. Enhancement of bone repair with a helper-dependent adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297(3): 523-7.
 251. SAITO N, OKADA T, HORIUCHI H, MURAKAMI N, TAKAHASHI J, NAWATA M, OTA H, MIYAMOTO S, NOZAKI K, TAKAOKA K. Biodegradable poly-D, L-lactide acid-polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone. *J Bone Joint Surg [Am]*. 2001; 83-A(Suppl): 92-8.
 252. JENSEN T B, OVERGARD S, LIND M, RAHBEEK O, BÜNGER C, SOBALLE K. Osteogenic protein 1 device increases bone formation and bone graft resorption around cementless implants. *Acta Orthop Scand* 2002; 73: 31-9.
 253. SETO I, ASAHINA I, ODA M, ENOMOTO S. Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59:53-61
 254. EINHORN TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85:82-88
 255. BODEN SD, GROB D, DAMIEN C. Ne-Osteo bone growth factor for posterolateral lumbar spine fusion: results from a nonhuman primate study and a prospective human clinical pilot study. *Spine* 2004; 29:504-514
 256. BARRACK RL. Bone graft extender, substitutes, and osteogenic proteins. *The Journal of Arthroplasty* 2005; 20(4):94-7
 257. EVANS C H, ROBBINS P D, Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg*. 1995; 77A: 1103-1114.
 258. EVANS C H, ROBBINS P D, Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. *Clin Orthop*. 1999; 367S: 410-418
 259. BRUDER SP, KRAUS KH, GOLDBER VM, KADILAYA S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg*. 1998; 80A: 985-994.

260. GIL ALBAROVA J, GARRIDO LAHIGUERA R, GIL ALBAROVA R, MELGOSA GIL M. Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia génica en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Mapfre Medicina*. 2003; 14: 51-65
261. IPPOKRATIS P, PETER V, GIANNOUDIS. Biology of mesenchymal stem cells. *Int J Care Injured*. 2005; 36S: S8-S12.
262. JONES E A, KINSEY S E, ENGLISH A, JONES RA, STRASZYNSKI L, MEREDITH DM, MARKHAM AF, JACK A, EMERY P, MCGONAGLE D. Isolation and characterization of bone marrow multipotencial mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3349-60
263. PALERMO AT, LABARGE MAA, DOYONNAS R, POMERANTZ J, BLAU HM. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol* 2005;279(2):336-44.
264. METHENY-BARLOW LJ, TIAN S, HAYES AJ, LI L. Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. *Microvasc Res* 2004; 68(3):221-30.
265. OTTO W R, RAO J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 2004;37(1):97-110.
266. ULRICH-VINTHER M, SCHWARZ EM, PEDERSEN FS, SOBALLE K, ANDREASSEN TT. Gene therapy with human osteoprotegerin decreases callus remodelling with limited effects on biomechanical properties. *Bone*. 2005; 37: 751-758.
267. KOSTENUIK P J, BOLON B, MORONY S, DARIS M, GENG Z, CARTER C, SHENG J. Gene therapy with human recombinant osteoprotegerin reverses establishes osteopenia in ovariectomized mice. *Bone* 2004; 34:656-64
268. VATS A, TOLLEY N S, BUTTERY A D K, POLAK J M. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg*. 2004; 86-B: 159-64.
269. STOCK UA, VACANTI JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*. 2001; 52: 443-51
270. BRAN GM, STERN-STRAETER J, HORMANNK, RIEDEL F, GOESSLER UR. Apoptosis in bone for tissue engineering. 2008; 39:467-82
271. CLÉMENT J. Desarrollo y caracterización de un material Compuesto totalmente biodegradable para aplicaciones quirúrgicas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, 2001
272. GIL ALBAROVA J, MONTÓN MATÍNEZ I, CLEMENT J, CASTIELLA T, ESTEVA F, PLANELL JA, HERRERA A. Desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea. Implantación subcutánea en conejos. *Mapfre Medicina*, 2002; 13: 252-257
273. LOTY C, SAUTIER JM, TAN MT, OBOEUF M, JALLOT E, BOULEKBACHE H, GREENSPAN D, FOREST N. Bioactive glass stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. *Journal of bone and mineral reserch*, 2001; 16(2): 231-9.
274. STEVENSON S, EMERY SE, GOLDBERG VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop*. 1996; 324: 666-674.
275. STEVENSON S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am*. 1999; 30: 543-552
276. MAROOTHYNADEN J, ZANG X, HENCH L L, REVEL P A. Effect of bioglass and loading environment on whole bone organs cultured in vitro. In: LeGeros RZ, LeGeros JP (eds.) *Bioceramics*, vol 11. World Scientific, New York, NY, USA, 1998, pp 501-504
277. GREEN J. Cytosolic pH regulation in osteoblasts. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20:16-30.

278. EL GHANNAM A, DUCHEYNE O, SHAPIRO MI. Bioactive material template for in vitro synthesis of bone. *J Biomed Mater Res* 1995; 29:359-370.
279. EL GHANNAM A, DUCHEYNE P, SHAPIRO MI. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials* 1997; 18: 295-303.
280. YAMAGUCHI DT, HUANG JT, MA D. Regulation of gap junction intercellular communication by pH in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1891-1899.
281. HALL BK, MIYAKE T. Divide, accumulate, differentiate: Cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 1995; 39:881-893.
282. OGINO M, OHUCHI F, HENCH L L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *J Biomed Mater Res* 1980; 14: 55-64
283. HOTT M, DE POLLAK D, MARIE PJ. Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 174-179
284. Richard M, Aguado E, Cottrel M, Daculsi G. Ultrastructural and electron diffraction of the bone-ceramic interfacial zone in coral and biphasic CaP implants. *Calcif Tissue Int* 1998;62:437-442
285. MESEGUER-OLMO L, BERNABEU-ESCAPLEZ A, VALLET-REGI M, AZNAR-CERVANTES S, VICENTE-ORTEGA V, ALCARAZ-BAÑOS M, CLAVEL SAINZ M, HERRERA-RODRIGUEZ A, LOPEZ-PRATS F, MORALEDA-JIMENEZ JM, MESEGUER-ORTIZ CL. 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
286. VALLET-REGI M, ROMAN J, PADILLA S, DOADRIO JC, GIL FJ. Bioactivity and mechanical properties of SiO₂-CaO-P₂O₅ glass-ceramics. *J Mater Chem.*2005;15:1353-9
287. ROMAN J, PADILLA S, VALLET-REGI M. Sol-gel glasses as precursors of bioactive glass ceramics. *Chem Mater.*2003;15:798-806
288. PADILLA S, SANCHEZ-SALCEDO S, VALLET-REGI M. Bioactive glass as precursor of designed-architectures scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.*2007;81:224-32
289. Smit RS, van der Velde D, Hegeman JH. Augmented pin fixation with Cortoss for an unstable AO-A3 type distal radius fracture in a patient with a manifest osteoporosis. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008;128:989-93
290. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36(Suppl. 3):S20-7
291. Evans SL, Hunt CM, Ahuja S. Bone cement or bone substitute augmentation of pedicle screws improves pullout strength in posterior spinal fixation. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:1143-5
292. BOYD D, Towler MR, WREN A, Clarkin OM. Comparison of an experimental bone cement with surgical Simplex P, Spineplex and Cortoss. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:1745-52
293. Katthagen BD: *Bone regeneration with bone substitutes. An animal study.* 1986; Berlin: Springer Verlag
294. SEEHERMAN H. The influence of delivery vehicles and their properties on the repair of segmental defects and fractures with osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83A:S79-81
295. O'LOUGHLIN PF, MORR S, BOGUNOVIC L, KIM AD, PARK B, LANE JM. Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90: 79-84

296. XIE E, HU Y, CHEN X, BAI X, LI D, REN L, ZHANG Z. In vivo bone regeneration using a novel porous bioactive composite. *Applied Surface Science* 2008;255:545-547
297. MESEGUER-OLMO L, MUÑOZ-RUIZ J, BERNABEU-ESCLAPEZ A, CLAVEL-SAINZ NOLLA M, ARCOS-PEREZ D, VALLET-REGI M, LOPEZ-PRATS F, LAX-PEREZ A, MESEGUER-ORTIZ DE VILLAJOS CL. Cinética de crecimiento in vitro de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxapatita. *Rev Ortop Traumatol.* 2006;50:224-32
298. Fernández de Retana P: Osteointegración del homoinjerto óseo triturado en los defectos cavitarios. Estudio experimental en conejos. Tesis Doctoral 1993; Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques. Universitat de Barcelona
299. Del Valle M: El uso del cartilago costal criopreservado en defectos óseos experimentales. PhD Thesis 1999; Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques. Universitat de Barcelona
300. Torner P: Reparació del teixit ossi mitjançant osteotransducció amb ciment de fosfat càlcic. Estudi experimental. PhD Thesis 2001; Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques. Universitat de Barcelona
301. Castillo F: Evaluación del potencial osteogénico de los polímeros bioabsorbibles derivados del ácido láctico utilizados como sustitutivos óseos. Estudio experimental en conejos. PhD Thesis 2001; Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques. Universitat de Barcelona
302. LANE JM, SANDHU HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987; 18: 213-25
303. YASCO AW, LANE JM, FELLINGER EJ, ROSEN V, WOZNEY JM, WANG EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:659-70
304. GULDBERG R E, DUVAL C L, PEISTER A, OEST M E, LIN A, PALMER A W, LEVENSTON M E. 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. *Biomaterials* 2008;29:3757-3761
305. FORD NL, THORNTON MM, HOLDSWORTH DW. Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Med Phys* 2003;30(11):2869-903
306. RENGHINI C, KOMLEV V, FIORI F, VERNE E, BAINO F, VITALE-BROVARONE C. Micro-CT studies on 3-D bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2009;5:1328-37
307. SALDAÑA DÍAZ A, RAMOS PASCUA LR, LOPEZ LAGUA M, IGLESIAS MUÑOZ FJ, GONZALO-ORDEN M, RODRÍGUEZ ALTÓNAGA JA, GONZÁLEZ CELADOR R. Evolución radiográfica del implante de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos en la reparación de tejidos óseos. Estudio experimental en ovejas. *Trauma Fund Mapfre* 2010;21(3): 192-198
308. WALSH WR, MORBERG P, YU Y, YANG JL, HAGGARD W, SHEATH PC, SVEHLA M, BRUCE JM. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. *Cin Orthop* 2003;406:228-36
309. HEDBERG EL, KROESE-DEUTMAN HC, SHIH CK, LEMOINE JJ, LIEBSCHNER MA, MILLER MJ, YASKO AW, CROWTHER RS, CARNEY DH, MIKOS AG, JANSEN JA. Methods: a comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2005;11:1356-67
310. Li SM, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous media Part 2:

- Degradation of lactide-glycolide copolymers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1990; 1:131-139
311. Lu L, Garcia CA, Mikos AG. In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 46(2):236-244
 312. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003; 24(13):2133-51
 313. Valimaki VV, Aro HT. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scand J Surg* 2006;95:95-102
 314. MATSUDA T, DAVIES JE. The in vivo response of osteoblasts to bioactive glass. *Biomaterials* 1987;8:275-84
 315. VROUWENVELDER WCA, GROT K. Behavior of fetal rats osteoblast cultured in vitro on bioactive glass and non reactive glass. *Biomaterials* 1992;13:382-92
 316. OONISHI H, HENCH LL, WILSON J, SUGIHARA F, TSUJI E, MATSURA M, KIN S, YAMAMOTO T, MIZOKAWA S. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bikoglass, A-W glass ceramic and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2000;51(1):37-46
 317. MESEGUER OLMO L, ROS NICOLAS MJ, CLAVEL SAINZ M, MARTINEZ MARIN A, VICENTE ORTEGA V, ALCARAZ BAÑOS M, LAX PEREZ A, ARCOS LOPEZ D, RAGEL CV. Cerámica de biovidrio como vector biodegradable de liberación de gentamicina. Estudio experimental in vivo. *Mapfre Medicina* 2003; 14:249-257
 318. HOLLISTER S J, MADDUX R D, TABOAS J M. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials* 2002; 23:4095
 319. ADACHI T, OSAKO Y, TANAKA M, HOJO M, HOLLISTER SJ. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3964
 320. MCINTOSH L, CORDELL J M, WAGONER JOHNSON A J. Impact of bone geometry on effective properties of bone scaffolds, *Acta Biomater* 2009;5(2):680-92
 321. HILLDORE A, WOJTOWICZ A, JOHNSON A W. Micro-CT based quantification of non-mineralized tissue on cultured hydroxyapatite scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:1012-21
 322. RILEY EH, LANE JM, URIST MR, LYONS KM, LIEBERMAN JR. Bone morphogenetic protein-2. Biology and applications. *Clin Orthop* 1996;324:39-46
 323. SCHREIBER RE, BLEASE K, AMBROSIO A, AMBURN E, SOSNOWSKI B, SAMPATH TK. Bone induction by AdBMP-2/Collagen Implants. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1059-68
 324. MUSCHLER GF, NAKAMOTO C, GRIFFITH LG. Engineering principles of critical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86:1541-58
 325. KUBOKI Y, JIN Q, TAKITA H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83:105-115
 326. CARSON JS, BOSTROM MPG. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007; 38S1:S33-S37
 327. KASTEN P, VOGEL J, GEIGER F, NIEMEYER P, LUGINBÜHL R, SZALAY K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 2008; 29:3983-3992
 328. LINDFORS NC, HEIKKILÄ JT, KOSKI I, MATTILA K, AHO A. Bioactive glass and autogenous bone as bone graft substitutes in benign bone tumors. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2009;90:131-6
 329. LINDFORS NC, KOSKI I, HEIKKILÄ, MATTILA K, AHO A. A prospective

- randomized 14- year follow-up study of bioactive glass and autogenous bone as bone graft substitutes in benign bone tumors. *J Biomed Mater Res* 2010;94:157–164
330. HENCH LL. Genetic design of bioactive glass. *J Eur Ceram Soc* 2009; 29(7),1257-65
331. HENCH LL, HENCH J, GREENSPAN DC. Bioglass: a short history and bibliography. *J Aust Ceram Soc* 2004; 40(1),1-42
332. WILSON J, LOW S B. Bioactive ceramics for periodontal treatment: comparative studies in the patas monkey. *J Appl Biomater.* 1992, 3, 123-169
333. HENCH L L, POLAK J M, XYNOS I D, BUTTERY L D K. Bioactive materials to control cell cycle. *Mater Res Innovat.* 2000, 3, 313-323
334. XYNOS I D, EDGAR A J, BUTTERY L D, HENCH L L POLAK J M. Ionic dissolution products of bioactive glass increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expresión and protein síntesis- *Biochem Biophys Res Común* 2000, 276, 461-465
335. XYNOS I D, EDGAR A J, BUTTERY L D, HENCH L L POLAK J M. Gene expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic dissolution products of Bioglass 45S5 dissolution. *J biomed Mater Res* 2001 ;55: 151-157
336. HENCH L L , XYNOS I D, EDGAR A J, BUTTERY L D, POLAK J M, ZONG J P, LIU W Y, CHANG J. Gene activating glasses. *J Inorg Mater*, 2002, 17, 897-909
337. Roy TD, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(2):283–91
338. Lewandrowski KU, Gresser JD, Bondre S, Silva AE, Wise DL, Trantolo DJ. Developing porosity of poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone graft substitutes and the effect on osteointegration: a preliminary histology study in rats. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11(8):8 79–89
339. Chu TM, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials* 2002;23(5):1283–93
340. Kruyt MC, de Bruijn JD, Wilson CE, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ. Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats. *Tissue Eng* 2003;9(2):327–36
341. Kujala S, Ryhanen J, Danilov A, Tuukkanen J. Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weightbearing nickel–titanium bone graft substitute. *Biomaterials* 2003;24(25):4691–7
342. Fisher JP, Vehof JW, Dean D, van der Waerden JP, Holland TA, Mikos AG. Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model. *J Biomed Mater Res* 2002;59(3):547–56
343. Gotz HE, Muller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials* 2004;25(18):4057–64
344. Ayers RA, Simske SJ, Bateman TA, Petkus A, Sachdeva RL, Gyunter VE. Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks. *J Biomed Mater Res* 1999;45(1):42–7
345. Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, MamoodJ, Takita H. Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res* 2002;43(2–3):529–34
346. Jin QM, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, Kuboki Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res* 2000;51(3):491–9

347. BERGMANN C, LINDNER M, ZHANG W, KOCZUR K, KIRSTE A, TELLE R, FISCHER H. 3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses. *Journal of the European Ceramic Society* 2010;30:2563-67
348. VARGAS GE, MESONES RV, BRETCANU O, PORTO LOPEZ JM, BOCCACCINI AR, GORUSTOVICH A. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass-derived glass–ceramic scaffolds in chick embryos. *Acta Biomaterialia* 2009; 5:374–80
349. DAY RM, MAQUET V, BOCCACCINI AR, JEROME R, FORBES A. In vitro and in vivo analysis of macroporous biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds containing bioactive glass. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:778–87
350. DAY RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng* 2005;11:768–77
351. LEACH JK, KAIGLER D, WANG Z, KREBSBACH PH, MOONEY DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3249–55
352. LEU A, LEACH JK. Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharm Res* 2008;25:1222–9
353. EINHORN TA, MAJESKA RJ, MAHAIDEEN A, KAGEL EM, BOUXSEIN ML, TUREK TJ. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2003;85-A:1425-35
354. MIZUMOTO Y, LOSELEY T, DREWS M, COOPER VN, REDDI H. Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2003;85-A:124-30
355. KASTEN P, LUGINBÜHL R, VAN GRIENSVEN M, BARKHAUSEN T, KRETTEK C, BOHNER M. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralised bone matrix. *Biomaterials* 2003;24(15):2594-603
356. QUATRO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, KUTEPOV S M, MUKHACHEV V, LAVROUKOV A. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Eng J Med* 2001;344:385-6
357. WILTFANG J, KLOSS F R, KESSLER P, NKENKE E, SCHULTZE-MOSGAU S, ZIMMERMANN R, SCHLEGEL KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(2):187-93
358. VOGELIN E, JONES NF, HUANG JL, BREKKE JH, LIEBERMAN JR. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1323-31
359. US JK, GORNET MF, DICKMAN CA, ZDEBLICK TA. Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech*. 2002;25:337-49
360. PERRI B, COOPER M, LAURYSSSEN C, ANAND N. Adverse swelling associated with use of rhBMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study. *Spine J*;2007:253-9
361. BISHOP GB, EINHORN TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop*. 2007;31:721-7
362. OKAMOTO M, MURRAY J, YOSHIKAWA H, TSUMAKI N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1022-33
363. WYSOCKI R, COHEN M. Ectopic ossification of the triceps muscle after application of bone morphogenetic protein-7 to the distal humerus for recalcitrant

- nonunions: a case report. *J Hand Surg Am.* 2007;32:647-50
364. ALAM N, ST-ARNAUD R, LAUZIER D, ROSEN D, HAMDY RC. Are endogenous BMPs necessary for bone healing during distraction osteogenesis? *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:3190-8
 365. GIANNOUDIS PV, KANAKARIS NK, DIMITRIOU R, GILL I KOLIMARALA V MONTGOMERY RJ. The synergistic effect of autograft and BMP-7 in the treatment of atrophic nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:3239-48
 366. KANAKARIS NK, CALORI GM, VERDONK R, BURSSSENS P, DE BIASE P, CAPANNA R. Application of BMP-7 to tibial nonunions: a 3-year multicenter experience. *Injury.* 2008;39 Suppl 2:S83-90
 367. SKOGLUND B, FORSLUND C, ASPENBERG P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res.* 2002;17:2004-8
 368. SCHMIDMAIER G, CAPANNA R, WILDEMANN B, BEQUE T, LOWENBERG D. Bone Morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options? *Injury* 2008;40(S3):S39-S43
 369. GIANNOUDIS O, EINHORN T, MARSCH D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007;38 Suppl 4:S3-4
 370. WREN AW, BOYD D, THORNTON R, COONEY JC, TOWLER MR. Antibacterial properties of a tri-sodium citrate modified glass polyalkenoate cement. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2009;90:700-9
 371. LINDFORDS NC, HYVÖNEN P, NYSSÖNEN M, KIRJAVAINEN M, KANKARE J, GULLICHSE E, SALO J. Bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in treatment of osteomyelitis. *Bone* 2010;47:212-18
 372. EFSTATHOPOULOS N, GIAMARELLOS-BOURBOULIS E, KANELLAKOPOULOU K, LAZZARETTOS I, GIANNOUDIS P, FRANGIA K, MAGNISSALIS E, PAPADAKI M, NIKOLAOU VS. Treatment of experimental osteomyelitis by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with bone cement system releasing grepafloxacin. *Injury* 2008;39:1384-90
 373. ZONGPING X, XIN L, WEITAO J, CHANGQING Z, WENHAI H, JIANQIANG W. Treatment of osteomyelitis and repair of bone defect by degradable bioactive borate glass releasing vancomycin. *J Con Rel* 2009;139:118-26
 374. Murphy WL, Kohn DH, Mooney DJ. Growth of continuous bonelike mineral within porous poly(lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 50(1):50-58
 375. NANDI SK, KUNDU B, DATTA S, DE DK, BASU D. The repair of segmental bone defects with porous bioglass: An experimental study in goat. *Research in Veterinary Science* 2009; 86:162-173
 376. VOGEL M, VOIGT C, GROSS UM, MÜLLER-MAI CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials* 2001;22:357-62
 377. Zhong JP, Greenspan DC. Bioglass surface reactivity: from in vitro to in vivo. In: LeGerosRZ, LeGeros JP, editors. *Bioceramics*, vol. 11. Singapore: World Scientific Publishing, 1998. p. 415-8
 378. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, Nakamura T, Yamamuro T. Effects of ions in aqueous media on hydroxyapatite induction by silica gel and its relevance to bioactivity of bioactive glasses and glass-ceramics. *J Appl Biomater* 1993;4:221-9
 379. Söderling E, Herbst K, Larmas E, YLI-UURPO A. Protein adsorption to a bioactive glass with special reference to precorrosion. *J Biomed Mater Res* 1996;31:525-31
 380. Schepers EJG, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehab* 1997;24:171-81
 381. Wheeler DL, Stokes KE, Hoellrich RG, Chamberland DL, McLoughlin SW. Effect

- of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J Biomed Mater Res* 1998;41:527-33
382. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. *J Clin Periodontol* 1999;26:239-45
 383. Hall EE, Meffert RM, Hermann JS, Mellonig JT, Cochran DL. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. *J Periodontol* 1999;70:526-35
 384. Greenspan DC, Zhong JP, La Torre GP. The evaluation of surface structure of bioactive glasses in-vitro. In: Wilson, Hench, Greenspan, editors. *Bioceramics*, vol. 8. Oxford: Pergamon Press, 1995. p. 89-91
 385. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orth Rel Res* 1997;334:316-25
 386. KOTELA I, PODPORSKA J, SOLTYSIAK E, KONSZTOWICZ KJ, BLAZEWICZ M. Polymer nanocomposites for bone tissue substitutes. *Ceramics Internacional* 2009; 35:2475-80
 387. WALSH WR, VIZESI F, MICHAEL D, AULD J, LANGDOWN A, OLIVER R, YU Y, IRIE H, BRUCE W. β -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials* 2008;29(3):266-71
 388. XIE E, YUNYU H, CHEN X, BAI X, LI D, REN L, ZHANG Z. In vivo bone regeneration using a novel porous bioactive composite. *Applied Surface Science* 2008;255:545-47
 389. BEHEREI HH, MOHAMED KR, EL-BASSYOUNI GT. Fabrication and characterization of bioactive glass (45S5)/Titania biocomposites. *Ceramics International* 2009;35:1991-7
 390. YLANEN H, KARLSSON KH, ITALA A, ARO HT. Effect of immersion in SBF on porous bioactive bodies made by sintering bioactive glass microspheres, *J. Non-Cryst. Solids* 2000;275:107-115
 391. RAVARIAN R, MOZTARZADEH F, HASHJIN MS, RABIEE SM, KHOSHAKHLAGH P, TAHRIRI M. Síntesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International* 2010;36:291-7
 392. MESEGUER-OLMO L, BERNABEU-ESCLAPEZ A, ROS-MARTINEZ E, SANCHEZ-SALCEDO S, PADILLA S, MARTIN AI, VALLET-REGI M, CLAVEL-SAINZ M, LOPEZ-PRATS F, MESEGUER-ORTIZ CL. In vitro behavior of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system. *Acta Biomaterialia* 2008;4:1104-13
 393. CLARKE SA, HOSKINS NL, JORDAN GR, MARSH DR. Healing of an iliac defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. *Bone* 2007;40:939-47
 394. Reck R. Tissue reactions to glass ceramics in the middle ear. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1981;6:63-5
 395. Andreassen GS, Hoiness PR, Skraamm I, Granlund O, Engebretsen L. Use of a synthetic bone void filler to augment screws in osteopenic ankle fracture fixation. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004;124:161-5
 396. Middleton ET, Rajaraman CJ, O'Brien DP, Doherty SM, Taylor AD. The safety and efficacy of vertebroplasty using Cortoss cement in a newly established vertebroplasty service. *Br J Neurosurg* 2008;22:252-6
 397. Palussiere J, Berge J, Gangi A, Cotten A, Pasco A, Bertagnoli R. Clinical results of an open prospective study of a bis-GMA composite in percutaneous vertebral augmentation. *Eur Spine J* 2005;14:982-91

398. BOSSETTI M, HENCH LL, ZANARDI L, CANNAS M. Type I collagen production by osteoblast-like cells cultured in contact with different bioactive glasses. *J Biomed Mater Res.* 2003;64: 189–95
399. BOSSETTI M, CANNAS M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials* 2005;26: 3873–3879
400. PUPPI D, CHIellini F, PIRAS AM, CHIellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 35(2010) 403-440
401. YAO J, HO AM. Bone graft substitutes in the treatment of distal radius and upper limb injuries. *Oper Tech Orthop* 2009;19:77-87