

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación del uso de quitina y rhBMP-2 para la  
regeneración ósea: una aproximación desde la  
Ingeniería de Tejidos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Carlos Díaz López**

DIRECTORES

**José Vicente Sanz Casado**  
**Enrique Martínez Campos**  
**Viviana Ramos Lino**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



# **Evaluación del uso de quitina y rhBMP-2 para la regeneración ósea: una aproximación desde la Ingeniería de Tejidos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR  
Carlos Díaz López

Bajo la dirección de los Doctores:  
José Vicente Sanz Casado  
Enrique Martínez Campos  
Viviana Ramos Lino

**MADRID, 2017**





Madrid 2017

El Dr José Vicente Sanz Casado, Profesor Titular de Universidad, Director del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, el Dr Enrique Martínez Campos, Personal Investigador Post-doctoral asociado a proyecto y la Dra Viviana Ramos Lino, Responsable Técnico de la empresa Noricum S.L. y miembro del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN que,

el Licenciado en Odontología, D. Carlos Díaz López ha realizado la labor investigadora correspondiente a la Tesis Doctoral titulada **“Evaluación del uso de quitina y rhBMP-2 para la regeneración ósea: una aproximación desde la Ingeniería de Tejidos”** bajo su dirección en el Instituto de Estudios Biofuncionales y reuniendo los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente nombrado a tal efecto. Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente documento.

Madrid, 7 de abril de 2017.

Dr José Vicente Sanz Casado

Dr Enrique Martínez Campos

Dra Viviana Ramos Lino



## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a todas las personas que he conocido y que han participado de un modo u otro en esta Tesis Doctoral, empezada hace 4 años.

En primer lugar a mis Directores de Tesis, los pilares que de no ser por ellos no hubiese sido posible haber concluido felizmente este proyecto, Pepe, Kike, Vivi y José Luís López Lacomba al que considero no sólo el Director de Honor, sino una bellísima persona que me ayudó y apoyó de una forma en la que siempre le estaré agradecido.

También quiero recordar a todos las personas del Instituto de Biofuncionales de la UCM, del grupo de Biofuncionales, Ander, Ana, Rodri, Carol, Laura de histología, Laura de Noricum y Alba, fueron los primeros que conocí y siempre los tengo en la memoria, de los buenos momentos pasados, como el día a día del laboratorio, operaciones de animales o las Tesis que han ido presentando (por fin es mi turno). También recordar al resto de compañeros del instituto como Marian, Susana, Ángela, David, y al resto de personas que están ahí pero que me es imposible poder nombrarlos a todos.

No puedo olvidar a aquellos que llegaron al grupo después de mí, Alfonso, Clara, Ana 2.0, Lidia, Luisa, Luciano, Heberth, Isabel y David, muchas gracias por darme vuestra ayuda y apoyo.

Le agradezco también todo el apoyo y ayuda prestados al Dr. Pascual y al Dr. Romero del Hospital San Rafael para poder hacer posible las partes de este trabajo que he tenido que hacer a distancia desde Cádiz.

A mi familia le agradezco que me hayan animado a meterme en la aventura de hacer una tesis, a mis Padres José Luís y Encarnación y a mi hermana Laura, a Olga por darme todo su cariño y fuerza durante todo el proceso y por supuesto se lo dedico al resto de mi gran familia que saben que les quiero. Una mención especial querría dársela al Dr. Antonio López Rodríguez, al que lo conocí en su papel de abuelo. Una de sus inquietudes era la embriología a la que dedicó buena parte de su vida, con lo que espero que le hubiese gustado este trabajo.

Quiero agradecer a mis amigos de Cádiz, Martín, Guillermo, Fran, Manolo y Luis, siempre interesados en el momento que iba a terminar la Tesis, además de animarme a ello.

**SIEMPRE OS LO AGRADECERÉ**



<b>ÍNDICE</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	7
<b>RESUMEN</b>	10
<b>ABREVIATURAS</b>	13
<b>I. Introducción</b>	16
1. Ingeniería de Tejidos	16
2. Componentes de la Ingeniería de Tejidos	19
2.1. Células	19
2.2. Biomateriales	21
2.2.1. Quitina	22
<u>Obtención</u>	24
<u>Estructura física</u>	25
<u>Solubilidad</u>	26
<u>Propiedades físico-químicas y biológicas</u>	27
2.3. Agentes bioactivos	29
2.3.1. BMPs	29
3. Desarrollo embrionario del proceso mandibular	31
<u>Origen celular de las células de la cresta neural craneal</u>	32
4. Regeneración de defectos óseos	34
4.1. Materiales de regeneración	34
Injerto Autólogo	34
Aloinjerto	35
Xenoinjerto	35

Injertos sintéticos o Aloplásticos	37
4.2. Modelo de calota de conejo	37
5. Oseointegración: mecanismos y rutas de diferenciación tisular	38
6. Efecto de la BMP-2 en las células del hueso (osteoblastos)	41
6.1. Diferenciación ósea	41
6.2. Expresión de marcadores óseos	42
7. Cascada de señalización génica tras activación con BMP-2	42
7.1. Factores de transcripción	43
8. Proceso de síntesis de matriz ósea	44
8.1. Marcadores tempranos de diferenciación ósea	44
8.2. Otros marcadores de diferenciación osteoblástica	45
9. Características de la rhBMP-2	47
9.1. Producción de BMP-2	47
<b>II. Antecedentes del grupo de investigación</b>	51
<b>III. Justificación</b>	52
<b>IV. Objetivos</b>	55
<b>V. Material y Métodos</b>	57
1. Modelos animales: embrión de pollo	57
1.1. Animales de experimentación	57
2. Quitina	57
2.1. Caracterización	57
3. Obtención de la proteína rhBMP-2	59
4. Inmovilización de la proteína rhBMP-2	59

5. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio	59
5.1. Contacto directo	59
5.2. Zona del desarrollo del maxilar	61
6. Protocolo cultivo <i>ex ovo</i>	62
7. Procesamiento histológico	66
7.1. Tinciones histológicas	66
8. Estudio <i>in vivo</i> . Modelo en calota de conejo. Implantación de injertos, quitina/rhBMP-2	67
8.1. Obtención de las muestras y tratamiento histológico	69
9. Histomorfometría	70
10. Técnica de tinción inmunohistoquímica	71
<b>VI. Resultados</b>	74
1. Caracterización fisicoquímica de la quitina	74
2. Inmovilización de la rhBMP-2	77
3. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio. Contacto directo	78
4. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio. Zona del desarrollo maxilar, primera intervención	81
5. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio. Zona del desarrollo maxilar, segunda intervención	83
6. Cultivos <i>ex ovo</i>	84
7. Regeneración ósea mediante el uso de matrices y transportador activado (quitina/rhBMP-2) en el modelo de calota de conejo	87
7.1. Histomorfometría	94
7.2. Bio-Oss Collagen	94

7.2.1. Descripción histológica	95
7.2.2. Histomorfometría Bio-Oss Collagen	96
7.2.3. Comparación de resultados entre muestras	100
7.3. Mucograft	106
7.3.1. Descripción histológica	107
7.3.2. Histomorfometría Mucograft	108
7.3.3. Comparación de resultados entre muestras	111
7.4. Cerabone	117
7.4.1. Descripción histológica	118
7.4.2. Histomorfometría Cerabone	118
7.4.3. Comparación de resultados entre muestras	119
8. Comparación entre biomateriales	123
8.1. Formación de tejidos en la regeneración entre los diferentes biomateriales	124
9. Inmunohistoquímica. Detección de osteocalcina	128
<b>VII. Discusión</b>	130
1. Efecto de la quitina-rhBMP-2 en el embrión	130
2. Xenoinjertos para la regeneración ósea empleados en odontología: Bio-Oss Collagen, Cerabone y Mucograft	136
3. Resultados de la combinación de quitina/rhBMP-2 con los diferentes xenoinjertos	137
4. Quitina en biomedicina y odontología	141
5. Degradación del Xenoinjerto bovino óseo	142
6. Uso futuro en humanos	144
<b>VIII. Conclusiones</b>	147





## **ABSTRACT**

### **Evaluation of the use of chitin and rhBMP-2 for bone regeneration: an approach from Tissue Engineering**

Bone tissue engineering involves the creation of new bone tissue *in vitro* or *in vivo* using cells, bioactive elements and biomaterials, either alone or in combination, according to the principles of Tissue Engineering. Within this field, applications in dentistry have a great interest, since bone created by tissue engineering with native properties, is the ideal tissue for osseointegration of dental implants. In addition, tissue regeneration due to mandibular defects caused by dental infections, trauma, congenital malformations, surgical lesions caused by tumor resection or bone deficiencies, are a problem to be solved in the clinical practice of dentistry and maxillofacial medicine.

The elements analyzed in this Doctoral Thesis work were the main cells in the formation of the bone tissues and their product, the osteoblasts and the bone matrix. In addition, the role of the bioactive element or bone growth factor, the human recombinant bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2), was evaluated. The rhBMP-2 transporter biomaterial is chitin, a natural polymer whose origin is in the exoskeleton of mollusks.

In this Doctoral Thesis two different animal models have been used. First, the effects of chitin/rhBMP-2 on the embryonic development and morphogenesis of chicken have been analyzed. Secondly, the regeneration of bone defects in mature bone tissue in rabbit calvarial using different commercial biomaterials as matrix activated with chitin/rhBMP-2 was analyzed. The obtained samples were evaluated by histological and histomorphometric study. With this double approach (embryonic models and surgeries in adult animals) as a general objective of this Doctoral Thesis it is to verify if the treatment with chitin/ rhBMP-2 promotes the bone differentiation, and with this, an improvement in tissue regeneration.

For the accomplishment of this general objective we have set out the partial objectives: first, to establish an optimal method for the implantation of biomaterials in the chicken embryo *in ovo*. In addition, we seek to optimize the histological protocols for fixing, cutting and staining of chicken embryos. In this way, the study of the biocompatibility of chitin microparticles in embryonic models will be carried out. To conclude, the osteogenic effect of rhBMP-2 will be analyzed using chitin as a transporter in the mandibular process of the chicken embryo.

In the rabbit calvarial model, using bone tissue with the same embryological origin as the mandibular bone, we will try to regenerate defects to test the tissue response using chitin/rhBMP-2 by combining it with xenografts; Bio-oss Collagen, CeraBone and Mucograft.

The application of chitin/rhBMP-2 during the embryonic development of the mandibular process was addressed by two different strategies: to operate the animal inside the egg, *in ovo*, or to remove it from the egg and cultivated it in a culture chamber designed for this purpose, *ex ovo*. The samples obtained were processed for histological analysis, by inclusion in paraffin blocks and microtome cutting. The histological staining used for analysis was the Masson trichrome with a protocol adapted to this goal. This stain is useful to differentiate different structures including collagen fibers.

In the *in ovo* experiments, different effects were observed depending on the dosis . As a main result, it has been observed that chitin/rhBMP-2 is capable of producing osteoblastic differentiation in an embryonic stage in which there is as yet no bone matrix formation. As a side effect, other individuals have documented the formation of an edema that caused the death of the embryo, probably by the action of rhBMP-2 in vasculogenesis. The microparticles of chitin proved to be biocompatible and inert upon contact with the mesenchyme. However, as a result of the intervention or the contaminations that occurred during the post-treatment incubation period, low survival percentages were obtained. In order to overcome this problem, three surgical methods were designed to solve these drawbacks, but none offered results that stood out from the rest.

Changing the strategy of manipulating the *ex ovo* embryo, the percentages improved with respect to the *in ovo* method presenting 100% without contamination; 85.7% survival within the new culture chamber with filter; 75% survival without filter and 75% survival after application of rhBMP-2 by the shower method.

In view of these results, we conclude that rhBMP-2 has the ability to induce the formation of osteoblastic phenotype in the St 26 chicken embryo after implantation in the mandibular mesenchyme. A failure to monitor the location of the implantation or rate of release can cause adverse side effects (onset of edema).

In the regeneration of bone defects in adult rabbit calvarial, two trepanations of 8 mm diameter were performed, one in each parietal bone, without invading the dura mater. In each defect, a biomaterial, BioOss Collagen, CeraBone and Mucograft was used as a matrix.

These materials were also combined with chitin microparticles, rhBMP-2 and rhBMP-2 activated chitin to see the results and facilitate their comparison.

After two months of healing, the animals were sacrificed and processed for histological treatment, decalcifying the samples, including them in blocks of paraffin and cutting them to the microtome. The histological staining used was Mason's trichrome, adapting the protocol for this type of tissue. Once the dyed samples were obtained, a histomorphometric study was performed in order to accomplish a quantitative analysis of the regeneration of the tissues present in the defects and facilitate their statistical analysis. With these data, we realized a statistical test of the analysis of the variance of a factor (ANOVA) using the statistical program Prism 5 (Graph Pad).

The results obtained showed that the combination of a bone xenograft with chitin /rhBMP-2 offers better regeneration rates than the combined material with chitin alone or only with rhBMP-2. Regarding the choice of the appropriate matrix, Bio-oss Collagen, obtained better results than CeraBone, possibly due to the 10% of collagen containing the first one with respect to the second one. Mucograft is a collagen matrix xenograft designed for soft tissue augmentation and demonstrated that its possible application alone with chitin, rhBMP-2 or chitin/rhBMP-2 is not suitable for bone regeneration in this model.

In conclusion, rhBMP-2-activated chitin microparticles offer better regeneration rates in the rabbit calvarial model than chitin alone and better results than control materials. The results obtained by a hydroxyapatite mineral xenograft (CeraBone), showed worse results than a xenograft with an organic content of 10% (Bio-oss Collagen). rhBMP-2 adsorbed onto microparticles of chitin and bound to a commercial matrix, favours the resorption of bone xenograft but does not prevent ossification of the defect. The use of a mineral matrix of hydroxyapatite with 10% reabsorbable content (Bio-oss Collagen) with our chitin/rhBMP-2 treatment, improve the parameters of the bone regeneration.

On the other hand, the matrix of collagen Mucograft, has not been suitable for the regeneration of bone defects. With this matrix, the addition of chitin and rhBMP-2 has not been determinant to reach optimum values of bone growth.

Finally, it is considered that the results obtained in this Doctoral Thesis suggest a possible future use of chitin/rhBMP-2 in clinical applications related to bone differentiation, demonstrating a great potential in regenerative medicine and tissue engineering.

## **RESUMEN**

En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos modelos animales diferentes para evaluar los efectos de la quitina/rhBMP-2 para la regeneración de defectos óseos. En primer lugar, se han analizado los efectos de la quitina/rhBMP-2 en el desarrollo embrionario del pollo. De este modo, se busca determinar su efecto en la morfogénesis embrionaria y su seguridad. En segundo lugar, para el análisis de la regeneración de defectos óseos en tejido óseo maduro, se realizaron defectos en calota de conejos y empleando diferentes biomateriales, Bio-oss Collagen, CeraBone y Mucograft como matriz, se activaron con solo quitina; con rhBMP-2 o con quitina/rhBMP-2. Las muestras obtenidas se evaluaron mediante un estudio histológico e histomorfométrico. Con esta doble aproximación (modelos embrionarios y cirugías en animales adultos) se busca comprobar si el tratamiento con quitina/rhBMP-2 promueve la diferenciación ósea, y con ello, se obtiene una mejora en la regeneración del tejido.

El método de aplicación de la quitina/rhBMP-2 durante el desarrollo embrionario, actuando en el área del desarrollo del proceso mandibular, se afrontó con dos estrategias diferentes: operar al animal dentro del huevo, *in ovo*, o extraerlo del huevo y cultivarlo en unas cámaras de cultivo diseñadas para tal efecto, *ex ovo*. Las muestras obtenidas se procesaron para análisis histológico, mediante la inclusión en bloques de parafina y corte con micrótopo. La tinción histológica empleada para su análisis fue el Tricrómico de Masson

En los experimentos con embriones, se observaron diferentes efectos según la dosis liberada. Como resultado principal, se ha observado como la quitina/rhBMP-2 es capaz de producir la diferenciación osteoblástica en un estadio embrionario en el que todavía no hay formación de matriz ósea. Como efecto colateral, en otros individuos se ha documentado la formación de un edema que provocaba la muerte del embrión.

Por otro lado, se evaluó la regeneración de defectos óseos en calota de conejos adultos empleando las matrices descritas y quitina/rhBMP-2. Tras dos meses, se recogieron las muestras y se analizaron mediante estudios histológicos e histomorfométricos, con el fin de realizar un análisis cuantitativo y estadístico de la regeneración de los tejidos presentes en los defectos.

Como conclusión, las micropartículas de quitina activadas con rhBMP-2 en combinación con matrices óseas basadas en hidroxiapatita (Bio-Oss Collagen y Cerabone) mejoraron la

regeneración ósea en comparación con los respectivos controles. Los resultados obtenidos por un xenoinjerto mineral de hidroxiapatita (CeraBone) activados con quitina/rhBMP-2, obtuvieron peores resultados que un xenoinjerto con un contenido orgánico del 10% (Bio-oss Collagen) con el mismo tratamiento. La administración de rhBMP-2 desde micropartículas de quitina y unida a estas matrices, favorece la resorción del xenoinjerto óseo pero no impide la osificación del defecto. El empleo de una matriz mineral de hidroxiapatita con un 10 % de contenido reabsorbible (Bio-Oss Collagen) y activada con quitina/rhBMP-2, han obtenido los mejores valores en regeneración ósea entre todos los tratamientos analizados.

Por otro lado, la matriz de colágeno Mucograft, no ha resultado idónea para la regeneración de defectos óseos. Con esta matriz, la adición de quitina/rhBMP-2 no ha resultado determinante para alcanzar valores óptimos de crecimiento óseo.

Finalmente, se considera que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren un posible uso futuro del material quitina/rhBMP-2 en aplicaciones clínicas relacionadas con la diferenciación ósea, demostrando un gran potencial en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.



## Abreviaturas

TE	<i>Tissue Engeneering</i>
SC	<i>Stem Cells</i>
ESC	<i>Embrionic Stem Cell</i>
ASC	<i>Adult Stem Cell</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
$\beta$ -TCP	<i>Tricalcium phospate Beta</i>
GF	<i>Growth Factor</i>
BMPs	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BMP-2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
IGF	<i>Insulin like Growth Factor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
CNCC	<i>Crestas neuronales craneales</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
PMN	<i>Polimorfonucleares</i>
DFDBA	<i>Demineralized freeze-dried bone allografts</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sodio</i>
HA	<i>Hidroxiapatita</i>
Runx-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
Osx	<i>Osterix</i>

Dlx5 *Distal-less homeobox 5 gene*

FA Fosfatasa alcalina

Fmod Fibromodulina

OC Osteocalcina

OPN Osteopontina



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Ingeniería de Tejidos

Una de las ideas repetidas en la historia de la humanidad ha sido la capacidad de crear órganos, tejidos o seres vivos completos a voluntad, esta idea es patente a través de mitos, religión o literatura (p.e la creación de Prometeo, el origen de Eva en el Génesis o Frankenstein). Tal es el poder de esa idea, que a lo largo de la historia se han llevado a cabo diversos intentos de lograr este objetivo, y a cada pequeño avance se han sucedido incontables fracasos hasta la actualidad.

Los primeros intentos de restaurar un tejido perdido han sido los dientes, mediante diferentes métodos de “implantología antigua” que datan del periodo Greco-Romano (Crubézy *et al.*, 1998).

La recuperación de la función perdida de la masticación, siguió siendo un problema tras la era clásica y llevó de forma indirecta a mejorar en la medicina reconstructiva en una época previa a la odontología moderna y la prótesis, como queda reflejado en el tratado *Dix livres de la chirurgie* de Ambroise Pare en 1634, donde se describe los métodos de la reconstrucción de la dentición, nariz y otras partes del cuerpo (Pare, 1634).

Durante el Siglo XVIII, el método más común de restauración dental era el trasplante de dientes homólogos. John Hunter investigó este método tanto desde un punto de vista clínico (donde los dientes homólogos se mantenían durante años según este autor) y como experimental con animales, sentando las bases de una aproximación científica en la medicina de trasplantes (Hunter, 1771).

Johann Friedrich Dieffenbach se podría considerar un pionero de la ingeniería de tejidos moderna, por el uso de injertos de piel y uno de los padres de la cirugía reconstructiva y plástica (Dieffenbach, 1822).

Durante la I y II Guerra Mundial, hubo avances en la regeneración de tejidos y en los campos de la cirugía de reconstrucción y plástica. Rudolf Virchow describió los mecanismos biológicos de un injerto trasplantado, determinó que la regeneración tisular depende de la proliferación celular y además marcó las pautas para el cultivo celular *in vitro* (Virchow, 1858).

Una vez logrado con éxito el cultivo celular *in vitro*, se desarrolló como consecuencia el campo de la microcirugía, que facilitó el camino a la ingeniería de tejidos moderna y a la medicina regenerativa. Alexis Carrel con sus trabajos de microcirugía, es considerado el

padre de los trasplantes modernos de órganos, gracias a sus métodos de anastomosis vascular (Carrel, 1911).

La creación del concepto “Ingeniería de Tejidos” (TE) tiene origen en la mitad de la década de 1980, cuando el Dr. Joseph Vacanti del Hospital de Niños de Boston junto con el Dr. Robert Langer del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), empezaron a trabajar sobre la idea de diseñar biomateriales apropiados que actúen como andamiaje para la inclusión celular. Para ello, diseñaron polímeros biodegradables y biocompatibles que sirviesen a este propósito hasta que refinaron la técnica y publicaron su trabajo en 1993 en la revista científica *Science*, artículo más citado sobre la descripción de la TE (Langer y Vacanti, 1993; Vacanti 2006).

El objetivo de la TE es obtener sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función biológica dañada de un tejido u órgano. Requiere, para el desarrollo de estos sustitutos terapéuticos, el trabajo de diversas especialidades científicas, tanto básicas como aplicadas, ya que estos materiales a diseñar han de incluir al menos tres tipos de elementos: las células, los factores de crecimiento y los biomateriales (Caplan, 2000; Atala, 2004).

Las células tienen como misión la de proliferar y/o diferenciarse hacia el fenotipo específico que buscamos restaurar. Los medios para lograr ese objetivo incluyen, desde la modificación genética de las células (terapia génica), hasta el desarrollo y caracterización de mecanismos de diferenciación de células progenitoras (SC) hacia tipos celulares con cultivos primarios del propio paciente.

Por otra parte, estas células que forman parte de un material de TE cuando, al implantarlas en una localización anatómica deseada, deben desarrollarse de forma controlada en un entorno biológico complejo. Pueden ocurrir situaciones donde no hubo reparación debido a un error en la regulación de los mecanismos biológicos que iniciarían la reparación *per se* del tejido, o bien porque la lesión excede la capacidad de reparación del organismo (Maxson *et al.*, 2012).

Para encontrar estrategias apropiadas para abordar estos problemas, el estudio de la biología del desarrollo proporciona herramientas útiles para mejorar la regeneración del tejido. De este modo, observando los mecanismos del desarrollo de los diferentes órganos en el tejido embrionario, es posible identificar los genes y rutas moleculares implicadas en estos procesos. De este modo, la ingeniería genética nos permite emplear aquellos factores

de crecimiento o biológicos, clave para modular la respuesta del tejido, mediante la expresión, purificación y producción de las proteínas recombinantes que estos genes codifican.

Estos factores de crecimiento, el segundo componente de la TE, tienen un papel regulador clave en los mecanismos de la regeneración y su uso en TE requiere que puedan ser liberados en cantidades suficientes para conseguir una respuesta dentro del organismo (Salgado *et al.*, 2004).

Finalmente, el último elemento necesario para el desarrollo de la TE, son los biomateriales, que dan un soporte o andamio físico a la regeneración del tejido. Dicho soporte bi o tridimensional debe permitir dirigir el crecimiento celular. Los productos bioactivos que regulan el comportamiento celular pueden ser liberados desde el biomaterial en localizaciones concretas para que ejerzan su acción en el lugar de interés. Además, la cinética de liberación de estos factores ha de estar ajustada a los requerimientos del tejido diana. Todos estos aspectos se persiguen para el diseño de un biomaterial adecuado.

La ingeniería de tejidos ósea consiste en la creación de tejido óseo nuevo *in vitro* o *in vivo* empleando células, elementos bioactivos y biomateriales, solos o en combinación, según los principios de la TE (Crane *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2012). Dentro de este campo, son de gran interés las aplicaciones en odontología, ya que el hueso creado mediante ingeniería tisular con propiedades nativas es ideal para la oseointegración de los implantes dentales. Además, la regeneración tisular por defectos mandibulares causadas por infecciones dentales, traumatismos, malformaciones congénitas, lesiones quirúrgicas por resección de tumores o deficiencias óseas, resultan un problema a solventar en la práctica clínica de la odontología y medicina maxilofacial (Xia *et al.*, 2013). La pérdida de dientes y la consecuente remodelación ósea, interfiere con la capacidad de masticación, del habla y disminuye la confianza en las interacciones sociales. En última instancia, disminuye la calidad nutricional, física, social y psicosocial en la vida del individuo (Hollister *et al.*, 1993; Reisine *et al.*, 1995; Weintraub *et al.*, 1985).

## 2. Componentes de la Ingeniería de Tejidos

### 2.1. Células

Las células constituyen una de las piedras angulares de la medicina regenerativa. Los intentos en sus inicios de su utilización han puesto de manifiesto toda una serie de problemas técnicos que se han tenido que ir solventando y que han dado lugar a campos de investigación independientes, indispensables para la TE (Forriol y Esparza, 2008).

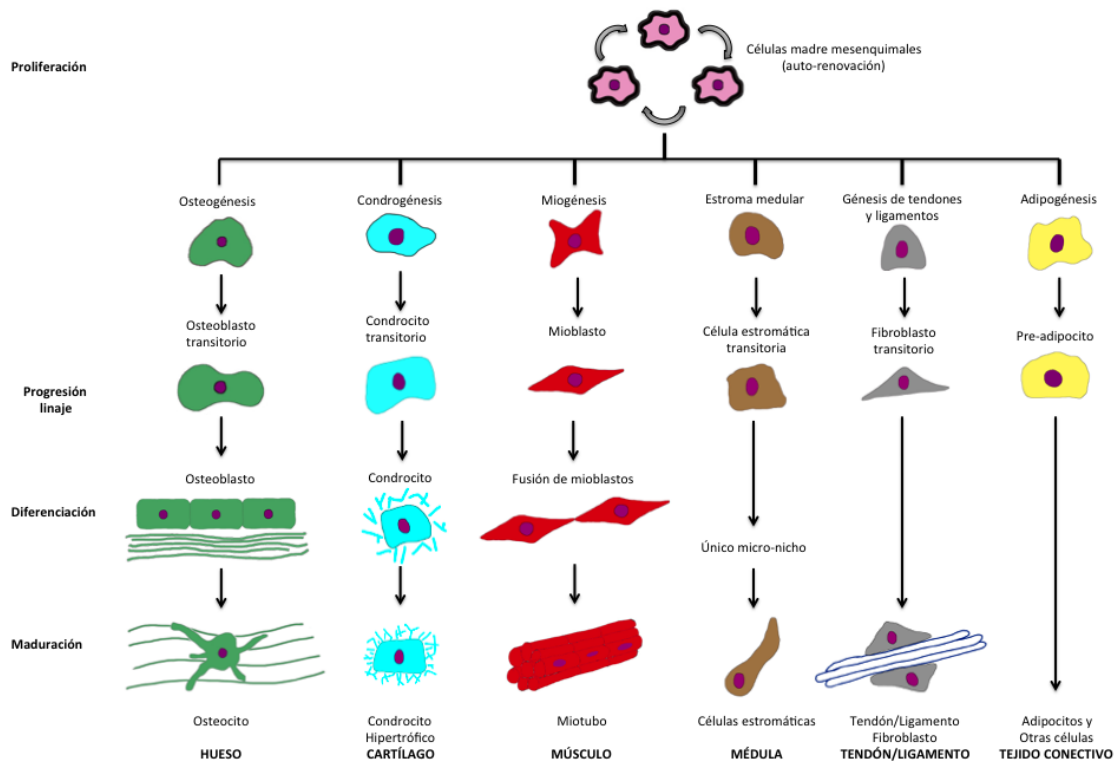
Un primer problema es la procedencia de las células que han de proliferar y/o diferenciarse sobre el biomaterial rector para la regeneración tisular. Ante esta dificultad existen dos opciones:

La primera es el uso de células del propio tejido huésped. Sin embargo, tiene sus limitaciones debido a que hay muy pocas células de tejidos que tienen capacidad de auto-regeneración. Destacamos, por ser el tejido objetivo a reparar en este trabajo, el tejido óseo (Arvidson *et al.*, 2011).

La segunda son las células procedentes de cultivos *in vitro*, maduras especializadas (como osteoblastos u osteoclastos), o de células madre indiferenciadas.

Sabemos que existen diferentes grados de células madre según su grado de inmadurez, mayor en las células madre embrionarias (ESC) o menor en las células madre adultas (ASC) (Maxson *et al.*, 2012). Las ESC tienen capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular y las ASC pueden diferenciarse a un número limitado de tipos de células. Esto ha sido tema de investigación para conocer qué elementos regulan el proceso de especialización de las células hacia un tejido y función concretos y también los mecanismos de los procesos de indiferenciación, la capacidad de retornar al estado indiferenciado para reconvertirla en el tipo celular deseado (Tuan *et al.*, 2003; Bielby *et al.*, 2007; Kallai *et al.*, 2010).

Dentro de la TE ósea, son las células madre mesenquimales (MSC), las que son los precursores entre otras líneas celulares, de los osteoblastos que a su vez madurarán en osteocitos. Las MSCs son células no hematopoyéticas con capacidad de diferenciarse en varias líneas celulares como los osteoblastos, mioblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos y células estromáticas y estos a su vez, formarán los tejidos correspondientes: huesos, músculos, tendones y ligamentos, tejido conectivo, cartílagos y la médula (Figura 1)(Chamberlain *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Proceso mesengénico. Diagrama de las diferentes líneas celulares a partir de las MSC. (Adaptado de la referencia: Firth, Yuan. 2012).

Es gracias a agentes bioactivos, como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), los factores de crecimiento transformantes-beta, la 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>3</sub>, el estrógeno y las paratohormonas, que las MSC puedan diferenciarse hacia el fenotipo osteoblástico.

El proceso de diferenciación de los osteoblastos se podría dividir al menos en dos fases. Uno, en el que a partir de las células mesenquimales indiferenciadas se forman los progenitores de osteoblastos, y otro es la maduración de los osteoblastos propiamente dichos, que darán lugar a los osteocitos (Harada y Rodan, 2003).

Por ello, al aumentar el conocimiento sobre las líneas celulares que componen un organismo, ha permitido mejorar la comprensión de los elementos bioactivos (péptidos, proteínas, etc.) cuya presencia, a los tiempos y concentraciones adecuados, controlan y dirigen el destino final de la célula activando los mecanismos de regulación génica, que producen la diferenciación celular (Duplomb *et al.*, 2007). Estos factores son clave en la señalización que lleve a la expresión de unos u otros genes y por lo tanto son fundamentales en los procesos de regeneración tisular.

## 2.2. Biomateriales

Un biomaterial es un elemento que no produce respuesta inmune, ni tiene efecto farmacológico, puede ser de origen natural o sintético, diseñado para ser implantado o incorporado dentro del organismo para tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo (Bose *et al.*, 2012).

Los biomateriales de primera generación o “inertes” se empleaban para reemplazar el tejido perdido tratando de evitar efectos nocivos en el hospedador como por ejemplo los implantes de titanio (Morais *et al.*, 2010).

La segunda generación se concibió con la estrategia de diseñar materiales que presenta *per se* cierta actividad biológica. Con mejores resultados, éstos materiales bioactivos interaccionan en el organismo permitiendo su reemplazo por tejido del propio hospedador como por ejemplo las cerámicas de fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) o los biovidrios y evitando así una segunda intervención de retirada del biomaterial (Nair y Laurencin, 2007).

Actualmente, estamos ante los biomateriales de tercera generación, que tienen capacidad de estimular de forma específica la respuesta celular a nivel molecular mediante elementos bioactivos. Son totalmente biocompatibles, permitiendo la proliferación celular en ellos y el desarrollo del nuevo tejido, es más, pueden activar genes que estimulan la regeneración. Como ejemplo, podríamos citar cerámicas de  $\beta$ -TCP activadas con rhBMP-2 para a la regeneración ósea (Abarrategi *et al.*, 2008a).

Se han desarrollado diversos materiales en la búsqueda del elemento ideal, empleando metales, cerámicas y polímeros. Éstos se han obtenido de forma natural o sintética y se han buscado que posean propiedades biodegradables o no (Malafaya *et al.*, 2007; Schliephake, 2010). Los polímeros biodegradables se están imponiendo, en determinadas circunstancias, a expensas de los biomateriales tradicionales permanentes. Puesto que, al degradarse los primeros en el medio biológico y eliminarse sus productos de degradación mediante la actividad celular, se evita la necesidad de una segunda cirugía para retirarlos al completarse la regeneración (Nair y Laurencin, 2007).

### 2.2.1. Quitina

La quitina es un polímero natural muy abundante en la naturaleza. Forma parte del exoesqueleto de los artrópodos (insectos, crustáceos y arácnidos) y también del tejido estructural de algunas especies de moluscos, hongos y microalgas.

La quitina fue aislada, identificada y nombrada gracias a investigaciones realizadas por Braconnot, Odier, Children y otros a principios del siglo XIX (Braconnot, 1811; Odier, 1823; Children, 1824). El nombre quitina proviene de la palabra en griego (χίτων, kithon) que se traduce como túnica, cubierta o envoltura, y se nombró así al ser identificada como el componente principal de los caparzones de los insectos. En la actualidad, casi dos siglos después del hallazgo de Braconnot, se acepta que la quitina proveniente de animales y hongos es predominantemente poli [ $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosas]; aunque puede haber diferencias en la fracción molar y distribución de algunos residuos de D-glucosamina presentes según el origen. Además, la quitina proveniente de fuentes animales puede contener pequeñas cantidades ligadas de residuos de aminoácidos de las proteínas.

Químicamente, la molécula de quitina es similar a la celulosa. Ambas cumplen funciones estructurales, para las plantas la celulosa y para los animales, la quitina. La diferencia de la quitina en su composición (Figura 2 y Figura 3) está en el grupo hidroxilo del C2 que es reemplazado por un grupo acetamida.

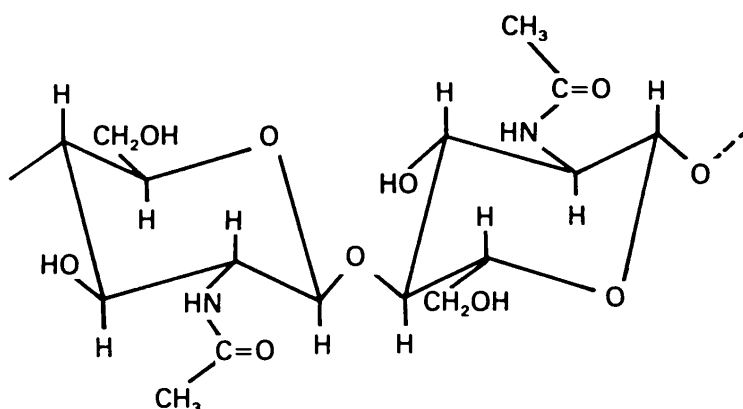
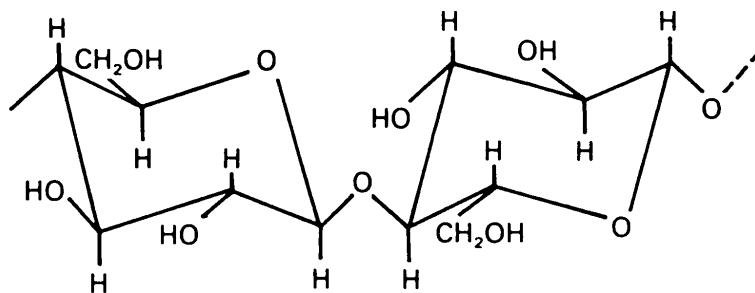


Figura 2. Fórmula química de la quitina.



**Figura 3.** Fórmula química de la celulosa

Los nombres “quitina” y “quitosano” son ampliamente usados en la literatura, pero ninguno de ambos representa una estructura química única. Es generalmente reconocido que la quitina no existe en la naturaleza como una sustancia discreta, sino que se presenta en una matriz acompañada de otras sustancias. En los exoesqueletos de insectos y crustáceos está complejada con proteínas; en la cutícula de insectos puede estar fuertemente unida con polihidroxifenoles (esclerotizada), mientras que en los hongos se encuentra complejada con otros polisacáridos, inclusive con celulosa (Ruiz-Herrera, 1978). Hasta el momento “quitina pura” se ha identificado solamente en las espinas de las diatomeas *Thalassiosira fluviatilis* y *Cyclotella cryptica* (Falk *et al.*, 1966). La quitina como una entidad sólo se obtiene en el laboratorio, luego de rigurosos procesos de purificación para eliminar los otros componentes.

Teniendo en cuenta lo anterior, la quitina no puede concebirse estrictamente como una entidad química “natural”, sino que debe considerarse como un producto de la separación de varios constituyentes con los que se presenta unida (Richards, 1951).

En la actualidad, la palabra quitina se emplea para designar a la aislada de su matriz y no se refiere a un material único de composición química precisa. Predomina la proporción de residuos de 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina) sobre la 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina), siendo por ende insoluble en medio ácido. Esta denominación tampoco establece si los residuos estaban presentes en la quitina nativa, o si fueron originados por la hidrólisis de grupos acetamida durante los procesos de obtención y purificación.

De manera similar, el quitosano, ya sea el que existe en forma natural o el obtenido por desacetilación alcalina de la quitina, contiene una mayor proporción de residuos de D-glucosamina con respecto a los N-acetil-D-glucosamina, por lo que es soluble en soluciones diluídas de ácido.

El sistema de nomenclatura más reconocido es utilizar el término quitina o quitosano seguido de la fracción desacetilada, por ejemplo un quitosano comercial típico tiene un 85% de grado de desacetilación

Las propiedades fisicoquímicas, biodegradabilidad y rol biológico de ambos polímeros dependen generalmente de la proporción relativa de los monómeros mencionados.

### **Obtención**

A pesar de la gran abundancia de quitina en la naturaleza, la misma es realmente accesible a partir del material de desecho de la industria pesquera. El empleo de caparazones de almejas y ostras está limitado por la gran cantidad de material inorgánico que debe ser removido (mayor de un 90 % peso seco).

Se considera que la quitina de origen fúngico tiene numerosas ventajas sobre las obtenidas a partir de crustáceos. Comprende un material de desecho que es constante en su composición, está disponible durante todo el año y no requiere de una etapa de desmineralización. Se encuentra presente en una enorme cantidad de hongos, sin embargo está generalmente asociada con otros polisacáridos, que deben ser normalmente eliminados.

En cuanto a la quitina proveniente de algas, dos diatomeas marinas, *Cyclotella cryptica* y *Thalassiosira fluviatilis*, constituyen fuentes de quitina pura que no se presenta asociada con proteínas, pero son de crecimiento lento y producen cultivos de baja densidad.

Generalmente toda la quitina producida comercialmente deriva de exoesqueletos de los crustáceos obtenidos como desecho del procesamiento industrial de alimentos del mar. Las cantidades disponibles a partir de este origen representa una extensa fuente de quitina y son suficientes para satisfacer la presente demanda de la misma y de quitosano.

La quitina de diferentes crustáceos se encuentra asociada con proteínas, material inorgánico, principalmente carbonato de calcio y pigmentos. Existen en la literatura diversos procedimientos para eliminar estos constituyentes, pero no se ha desarrollado un proceso estandarizado y muchos de ellos se han publicado como patentes.

La desmineralización se realiza frecuentemente por tratamiento con ácido clorhídrico y la desproteínización con hidróxido de sodio. Pueden utilizarse otros métodos y el orden en

que se realizan estas dos etapas puede variar, aunque en la mayoría de los casos se lleva a cabo la desproteínización y luego la desmineralización.

La elección de las condiciones del proceso puede estar gobernada, hasta cierto punto, por el propósito para el cual se requiere la quitina. Por ejemplo, una desacetilación parcial durante la desproteínización no es una desventaja si la quitina se convierte posteriormente en quitosano, por otro lado puede tolerarse una hidrólisis de la cadena del polímero durante el proceso de desmineralización si la quitina se empleará posteriormente en forma de partículas o como quitina microcristalina.

Para la desproteínización se propone en la bibliografía el uso de un amplio rango de agentes que incluyen diferentes hidróxidos, carbonatos y sulfitos. La mayoría de los procedimientos utilizan hidróxido de sodio de concentración aproximadamente 1M, variando ampliamente la temperatura y duración del tratamiento.

La etapa de desmineralización se puede realizar con una variedad de ácidos, como por ejemplo: ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido acético y ácido fórmico. La mayoría de los investigadores emplean el primero variando las condiciones.

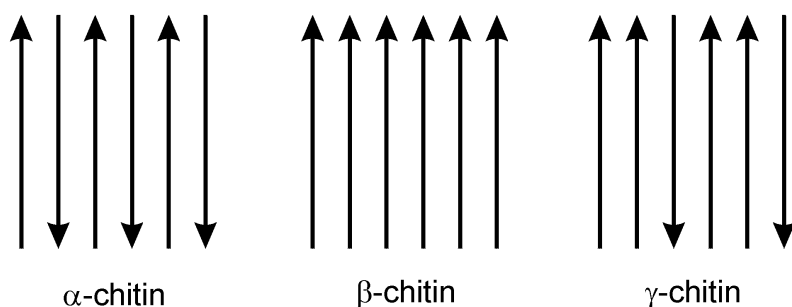
A pesar de lo propuesto sobre la posibilidad de realizar una desmineralización con ácido a temperaturas entre 0 y 100°C, en todos los casos no se emplean temperaturas mayores a la ambiente con el objeto de minimizar la hidrólisis de la cadena del polímero.

Los pigmentos se pueden separar por contacto con etanol o acetona luego de la desmineralización. El tratamiento con solución de ácido acético 50% produce simultáneamente desmineralización y extracción de los carotenoides. En la literatura también se puede encontrar otras alternativas para la decoloración mediante el empleo de permanganato de potasio, hipoclorito de sodio, dióxido de azufre, sulfito ácido de sodio y agua oxigenada.

### **Estructura física**

La quitina presenta una estructura cristalina que se pone en evidencia en estudios de difracción de rayos X. Se encontraron tres formas polifórmicas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , las cuales difieren en la orientación de las cadenas dentro de las regiones cristalinas. En la  $\alpha$  quitina las cadenas están orientadas en estructuras antiparalelas; en la  $\beta$  quitina en forma paralela y en la  $\gamma$  quitina cada dos cadenas que están hacia arriba la consecutiva se orienta hacia

abajo (Figura 4). La más abundante es la  $\alpha$  quitina, la misma parece ser la más estable, además la  $\beta$  y  $\gamma$  quitina pueden convertirse en la forma  $\alpha$  por tratamientos adecuados.



**Figura 4.** Estructuras cristalinas de la quitina.

### **Solubilidad**

La quitina es un polímero relativamente difícil de trabajar y a pesar de su estructura semejante a la celulosa, es insoluble en los solventes típicos de la misma. Tanto la  $\alpha$  como la  $\beta$  quitina pueden disolverse por tratamiento en caliente con soluciones concentradas de sales neutras de un alto grado de hidratación ( $\text{LiCNS} > \text{Ca}(\text{CNS})_2 > \text{CaI}_2 > \text{CaBr}_2 > \text{CaCl}_2$ ). El agregado de etanol produce la formación de una masa translúcida gelatinosa.

La quitina es soluble en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico concentrados, pero la disolución está acompañada de hidrólisis.

El uso de mezclas de dimetilacetamida-cloruro de litio y N-metil-2-pirrolidona-cloruro de litio fue propuesto por Austin (Austin *et al.*, 1989), con una concentración de cloruro de litio de 50 g/L en todos los casos y concluyeron que estos solventes son los mejores, no produciendo degradación.

El sistema dimetilacetamida-cloruro de litio ha sido usado por gran número de investigadores para la preparación de fibras (Brine *et al.*, 1975; Nakajima *et al.*, 1984) y filmes (Uragami *et al.*, 1981; Aiba *et al.*, 1985), en las determinaciones de peso molecular (Terbojevich *et al.*, 1988) y síntesis de derivados de la quitina en condiciones homogéneas.

La estrategia que se usa para poder disolverlo más fácilmente es modificar sus características químicas. Esto puede hacerse ya sea modificando su peso molecular, reduciendo el tamaño de la molécula hasta que se favorezca la disolución o mediante la forma más común que es eliminando la mayoría de los grupos acetilos (desacetilación) para obtener quitosano, que se disuelve en soluciones acuosas ácidas.

## **Propiedades físico-químicas y biológicas**

Las características químicas y físicas distintivas de la quitina, como la presencia de los grupos amida, el tamaño y relativa rigidez de las moléculas son la base de sus propiedades funcionales. Entre las principales propiedades de la quitina tenemos que no es soluble en agua ni en la gran mayoría de los solventes comunes (de nuevo, parecido a la celulosa), es biodegradable, biocompatible, absorbente y puede reaccionar en ciertas condiciones para formar compuestos derivados. Mención especial merece la capacidad de la quitina de formar distintos tipos de materiales por si misma o en combinación con otros compuestos, tal como funciona en la naturaleza. Sin embargo, disponemos de muy pocas estructuras de quitina formadas naturalmente que podamos usar directamente como lo hacemos con la madera o las fibras de algodón por ejemplo y la dificultad que presenta disolver la quitina limita su uso en muchas aplicaciones.

Las fibras de quitina son útiles como suturas absorbibles y materiales para el cuidado de las heridas. Estas suturas de quitina tienen la ventaja de resistir el ataque de bilis, orina y el líquido pancreático. Los vendajes de quitina y fibras de quitosano aceleran la cicatrización de las heridas (Khor, 2002; Muzzarelli *et al.*, 2007).

En el campo de la TE, la quitina se ha utilizado en forma de films, polvo o gel así como excipiente y transportador de medicamentos en aplicaciones que implican la mucoadhesividad (Gortari *et al.*, 2013).

Además de sus aplicaciones en el campo médico, las fibras de quitina y quitosano tienen aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales, en especial para la eliminación de iones de metales pesados gracias a las propiedades quelantes de estos polímeros.

En el campo de la odontología, se ha creado un composite con capacidad de auto-endurecerse, compuesto por hidroxiapatita-quitina-quitosano, para la regeneración de defectos óseos por la enfermedad periodontal (Swetha *et al.*, 2010).

La quitina puede actuar como soporte sólido para la inmovilización de enzimas y como un vehículo no absorbible para ingredientes alimenticios altamente concentrados (Dutta *et al.*, 2004).

Es de importancia muy significativa la liberación de compuestos inmovilizados en una matriz, de manera predecible, en un entorno específico y durante un período de tiempo determinado según los objetivos deseados. Es decir, crear un ambiente con una respuesta óptima, mínimo efecto secundario y eficacia prolongada. En el caso de la quitina, su

capacidad de adsorber compuestos, proporciona una matriz con características para liberar dichos compuestos a través de hinchamiento, degradación biológica, intercambio con el medio biológico.

Además de estas propiedades como son su insolubilidad, obtención en estructura de partículas, capacidad de retener compuestos, este biopolímero es biocompatible, no es tóxico, no tiene efecto alergénico y es biodegradable en el organismo (Kumar, 2000).

La degradación *in vivo* de la quitina se debe principalmente a la acción no específica de la enzima lisozima aunque también se encuentra sometida en menor proporción a la actividad de otras enzimas inespecíficas como lipasas y proteasas. Los subproductos de degradación, sacáridos y glucosaminas, son gradualmente absorbidos por el cuerpo humano, siendo productos biocompatibles, no tóxicos, no inmunogénicos y no carcinogénicos (Muzzarelli, 1997).

La lisozima es una endo-carbohidrasa, también denominada muramidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -(1→4) glicosídicos de peptidoglicanos de la pared celular de ciertas bacterias, de la quitina y de quitosanos parcialmente desacetilados (Nordtveit *et al.*, 1994). En el cuerpo humano se encuentra en todos los fluidos corporales, como saliva, lagrime, orina, jugos gástricos e incluso en el interior de células fagocíticas, activadas por daño tisular, como son macrófagos y neutrófilos. La concentración correspondiente de la enzima en el suero humano depende de la edad y alcanza valores desde 0,950  $\mu\text{g/mL}$  hasta 2,5  $\mu\text{g/mL}$  (Hankiewicz y Swierczek, 1974; Brouwer *et al.*, 1984).

Numerosos estudios indican que la acción de dicha enzima depende notablemente del grado de desacetilación estableciéndose una relación inversa entre ambos parámetros. Según este mecanismo la enzima lisozima no sería activa frente al polímero totalmente desacetilados y ni acetilados (Tomihata y Ikada, 1997).

Los productos procedentes de la degradación, tanto quitoligómeros como los residuos de GlcNAc y GlcN, favorecen la curación de heridas. No sólo promueven la activación de macrófagos, la formación de depósitos de colágeno y la vascularización del nuevo tejido, sino que también van a formar parte de la matriz extracelular formando parte de compuestos como dermatan sulfato, condroitin sulfato y ácido hialurónico (Muzzarelli, 1997). La glucosamina por si sola presenta actividad antiinflamatoria, es sintetizada por el cuerpo humano desde la glucosa e incorporada en forma de glucosaminoglucanos y glicoproteínas (Muzzarelli, 2009; Muzarrelli *et al.*, 2012).

### **2.3. Agentes bioactivos**

Los agentes bioactivos o Factores de Crecimiento (GF) tienen un papel en la regulación de las acciones celulares como la migración por gradientes de concentración, la proliferación celular o la morfogénesis. En los mecanismos de la remodelación ósea también actúan determinados GF y la TE ósea persigue la incorporación de dichas moléculas a los diversos biomateriales.

Estas biomoléculas son liberadas en el organismo por las células y su recepción por otra célula, provoca las modificaciones internas específicas. Esto se conoce como “comunicación celular”. La forma de envío de los GF puede ser mediante tres mecanismos: autocrina donde las células del mismo fenotipo secretan los factores en ellas mismas; de forma paracrina, actuando sobre células vecinas de fenotipos diferentes pero del mismo tejido y por último, de forma endocrina que es la comunicación de células de diferente fenotipo pertenecientes a otro tejido (Lieberman *et al.*, 2002).

En el tejido óseo, la matriz ósea sintetizada por los osteoblastos, es un reservorio de GF entre las que destacan las BMPs y los factores de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ).

Otros factores implicados en la osteogénesis son los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento insulínico (IGF) (Bose *et al.*, 2012; King y Krebsbach, 2012).

De entre todos los factores que intervienen en este proceso de regeneración ósea, las BMPs son, sin duda, las proteínas que más relevancia han mostrado puesto que inducen la diferenciación de las MSC hacia línea de osteoblastos de la forma más efectiva (Sykaras y Opperman, 2003).

#### **2.3.1. BMPs**

Las BMPs son factores proteicos de la superfamilia de factores de crecimiento TGF- $\beta$  (Urist, 1965). Tienen un papel clave en diversos tejidos durante la fase embrionaria de desarrollo como en la adulta. Se consideran factores clave en la regulación de procesos como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celular, jugando un papel importante en el desarrollo embrionario y de varios órganos y tejidos.

Son las proteínas encargadas de formar el tejido óseo, neural y cardiaco durante la embriogénesis e incluso actúan en la vida adulta en los procesos de reparación de fracturas (Sykaras y Opperman, 2003).

Actualmente se han identificado al menos 20 BMPs, que se encuentran divididas en diferentes subfamilias atendiendo a las similitudes en la secuencia de aminoácidos, destacando la BMP-2, BMP-4, BMP- 6, BMP-7 y BMP-9, como las proteínas que han demostrado presentar mayor actividad osteoinductora y capacidad de formación de hueso ectópico (Kempen *et al.*, 2008; Bragdon *et al.*, 2011).

Mediante la recombinación genética se ha sintetizado la proteína de origen humano de la BMP-2 o rhBMP-2 (*Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2*) y es la que actualmente se utiliza en el campo de la medicina (Khan *et al.*, 2004).

La estructura de la proteína, descrita por Scheufler y cols, consta de dos láminas  $\beta$  antiparalelas separadas, una  $\alpha$  hélice y un nudo de cistina donde hay 7 residuos de cisteínas (Scheufler *et al.*, 1999). Estas cisteínas forman 3 puentes de disulfuro intracatenarios (presentes en el extremo carboxi terminal) y la unión de los dos monómeros (de 114 aminoácidos) se establecen entre las cisteínas 78 de cada unidad. La proteína presenta dos cavidades en la estructura cristalina, los centros hidrofóbicos (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura secundaria de la BMP-2: las  $\alpha$ -hélice tienen formas espirales y las hebras- $\beta$  como flechas; los puentes disulfuro están representados en color verde. Las subunidades se muestran en azul y naranja. (Scheufler, Sebald y Hülsmeier 1999)

Las BMPs liberadas por la degradación de los osteoclastos al tejido óseo maduro, inducen a la diferenciación de MSC a osteoblastos. Las fuentes de MSCs son la médula ósea, el periostio y las células perivasculares (Cunningham *et al.*, 1992).

Las MSCs presentan tres tipos de receptores tipo I que sirven para recibir a los ligandos de las BMPs, el tipo IA y IB (para la BMPR-IA o ALK-3 y BMPR-IB o ALK-6, respectivamente) y el receptor tipo IA de activina ( para ActR-IA o ALK-2) (Koenig *et al.*, 1994).

Otra de las actividades de las BMPs es inducir la expresión y secreción del factor de crecimiento vascular endotelial alfa (VEGF- $\alpha$ ), la importancia de este factor es poder añadir el aporte de oxígeno mediante la formación de nuevas redes vasculares, indispensable para la regeneración del tejido óseo (Deckers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Fiedler *et al.*, 2002).

La BMP-2 posee la capacidad de estimular la osteogénesis y de inducir la formación de hueso ectópico, es por ello que se haya estudiado y aplicado su uso en la TE (Cao y Cheng, 2005). En 2004, la FDA de Estados Unidos aprobó el empleo de la rhBMP-2 y la rhBMP-7 para el tratamiento de patologías como grandes defectos óseos o defectos en la columna vertebral (Lissenberg-Thunnissen *et al.*, 2011; Lo *et al.*, 2012).

Las BMPs tienen acción local por lo tanto, deben permanecer en el defecto óseo el tiempo suficiente para inducir la diferenciación celular y permitir la regeneración del tejido. Por ello necesitan de un transportador que las libere de forma controlada en el lugar clave, evitando sobredosis y posibles efectos secundarios (Epstein *et al.*, 2011).

### **3. Desarrollo embrionario del proceso mandibular**

Hemos mencionado el papel que desempeña las proteínas morfogenéticas óseas en los organismos adultos, pero no hemos de olvidar que estas proteínas juegan un importante papel en el desarrollo embrionario como factores que regulan la correcta morfogénesis del organismo. De este modo, es necesario conocer las fases del desarrollo óseo, ya que es el tejido que nos interesa regenerar para que posea las mismas propiedades que el original.

Comprender las rutas embrionarias que permiten a los organismos desarrollar una estructura esquelética ósea nos permite identificar las proteínas diana que hemos de modular para mejorar la regeneración ósea.

### **Origen celular de las células de la cresta neural craneal**

La mandíbula o maxilar inferior se forma durante el desarrollo embrionario a partir del primer arco branquial, tratándose de una estructura bilateral simétrica que se sitúa por debajo del estomodeo y compuesta por tejido mesenquimal.

El mesénquima del proceso mandibular, procede de las células de las crestas neuronales craneales (CNCC), se trata de un tipo de célula indiferenciada pluripotencial migratoria. De las CNCC emerge la mayoría del esqueleto craneofacial, así como cartílago y tejido conjuntivo (Guan *et al.*, 2005).

Su origen y destino se debe a las relaciones entre la placa neural y el ectodermo superficial durante las etapas tempranas del desarrollo donde, gracias a la señal de las BMPs, se puede llevar a término. Esto ha sido demostrado mediante experimentación, con ratones transgénicos tipo Knockout (creado con un bloqueo génico específico y así poder observar la función de dicho gen) para la BMP-2. La mayoría de los embriones no superan la fase de gastrulación pero el pequeño grupo que consigue pasar a la etapa somática, mostraron una ausencia de migración de las CNCC (Walker & Trainor, 2006).

Quiénes determinan el destino de las CNCC hacia las áreas correspondientes del encéfalo (el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo), son los 7 rombómeros (R). Tienen origen en el rombocéfalo, de los cuales los rombómeros 2, 4 y 6, dirigen a las CNCC hacia el 1º, 2º y 3º arco faríngeo. En el caso de la mandíbula, las células CNCC se unen con los precursores mesodérmicos del tejido muscular y con el ectodermo, al menos hasta que los músculos con el conjuntivo, se desplacen a otras áreas de la cabeza. Cuando han alcanzado su destino, las CNCC se dividen y se especializan hacia los diferentes tipos celulares que dan origen a las diferentes estructuras cráneo-faciales. Todo este proceso es controlado por una compleja red de genes que implica de forma importante al grupo de las BMPs (Spears & Svoboda, 2005).

Gracias a los modelos embriológicos de animales (aves y mamíferos) y a las técnicas de la biología molecular, se ha podido conocer el papel de los rombómeros, las rutas de las

CNCC y facilitar el conocimiento del desarrollo embriológico, para poder extrapolarlo a los humanos (Teillet *et al.*, 1999).

El cartílago mandibular (Meckel) se osifica por mecanismo intramembranoso, pero posee unos cartílagos secundarios de distinto origen embriológico, lo que permite, una vez finalizada la primera osificación, existan los centros de osificación endocondral que regulan el crecimiento y el desarrollo óseo (Copray *et al.*, 1986).

En la osificación intramembranosa, las BMPs también intervienen de forma directa, en concreto la BMP-2, la BMP-4 y la BMP-7 activando en las CNCC el factor de transcripción Cbfa-1, que induce a las células mesenquimáticas a transformarse en osteoblastos (Ornitz & Marie, 2002; Nie *et al.*, 2006).

El papel de las BMPs analizado en los ratones knockout y mutantes de Cbfa-1, ha demostrado que sólo desarrollan un esqueleto cartilaginoso, al no producirse la osificación intramembranosa. En el caso contrario, la sobreexpresión de BMPs cambia el patrón esquelético, alterado el tamaño y morfología de la cara, mientras que la deficiencia de BMPs en ratones, provoca defectos del esqueleto craneofacial. Además, inactivando algunos mediadores de la BMP en el ratón, se origina una mandíbula hipotrófica. Es debido a que el cartílago anterior está ausente, provocando la ausencia de la sínfisis mandibular. El resultado son dos huesos mandibulares separados (Opperman *et al.*, 2005).

En el caso del hueso alveolar, las BMPs han demostrado ser claves en su desarrollo. Si los ratones carecen del factor de transcripción Msx-1, el cual produce la inexistencia del hueso alveolar, pueden ser recuperados por la administración vía ectópica de BMP-4. Así se determinó que la BMP-4 interviene en la activación del gen Msx-1 y éste en la formación del hueso alveolar (Ekanayade & Hall, 1997).

Mención importante de otros genes que intervienen en la regulación del destino de las CNCC son las familias Msx, Dlx, Otx, Barx, Gsc, Pax, Hand, Pitx y Prx. Son factores de transcripción que inducen a la expresión de otros genes reguladores, tejiendo una red de señales que controla el destino celular y la formación del proceso mandibular (Mina *et al.*, 2001).

La morfogénesis del proceso mandibular es un desarrollo dinámico que puede ser alterado por efectos externos, concretamente las BMPs afectan en varias fases de la embriogénesis y la osteogénesis.

## **4. Regeneración de defectos óseos**

El tejido óseo tiene la capacidad de auto-reparación, por medio de los mismos mecanismos empleados durante la embriogénesis. Ante una lesión ósea, la fisiología del hueso tiene recursos suficientes para reconstruir los pequeños defectos, sin embargo, ante grandes lesiones la restitución del tejido necesita de la ayuda de los sustitutos óseos que se han desarrollado en la medicina regenerativa.

Los sustitutos óseos son los tejidos o materiales que pueden utilizarse para eliminar los defectos del tejido óseo y así regenerarlo.

Existen dos tipos fundamentales de sustitutos, los injertos óseos, que corresponden a fragmentos de hueso natural que pueden tener diversos orígenes y los biomateriales, diseñados y procesados en la búsqueda de la imitación del tejido óseo maduro.

### **4.1. Materiales de regeneración**

#### **Injerto Autólogo**

El autoinjerto o injerto autólogo de hueso en bloque, es el más usado, reconocido como el estándar de oro y requiere de una zona donante del mismo paciente que se ha de adaptar según las características de la zona receptora. Posee las propiedades que requiere un biomaterial para regenerar un defecto óseo, osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. No se puede transmitir enfermedades al receptor del injerto, pues es el mismo paciente ni tampoco va a sufrir respuesta inmune (Blokhuys *et al.*, 2011).

En el campo maxilofacial y odontológico, los injertos obtenidos intraoralmente provienen de la tuberosidad, la rama mandibular, y el mentón. Si la cantidad necesaria es mayor de la que se pueden recolectar intraoralmente, se tiene que obtener el injerto autólogo de manera extraoral como por ejemplo el peroné, la calota o la cresta iliaca, como es evidente, recurrir a zonas extraorales, aumenta la morbilidad (Misch ed2008). Independientemente del sitio donante, para emplear estos injertos en la regeneración de defectos óseos se necesitan realizar dos intervenciones al mismo paciente en la misma sesión (obtener el injerto y colocarlo en el defecto) aumentando el impacto de la cirugía y del riesgo de complicaciones postoperatorias, como por ejemplo, infección, sangrado, dolor, edema y daño a los nervios y los vasos sanguíneos (Nkenke *et al.*, 2004).

## **Aloinjertos**

En los aloinjertos el tejido se transfiere entre dos individuos de la misma especie, hueso de cadáver humano congelado desmineralizado (DFDBA). Las ventajas que presentan son tener propiedades osteoinductoras y osteoconductoras; no existe el problema de la cantidad disponible y reducen la morbilidad, al evitar una intervención para obtener tejido donante. Las desventajas se presentan ante la posibilidad de transmisión de infecciones y una respuesta antigénica. (Miron *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2015).

## **Xenoinjertos**

Los injertos óseos xenogénicos derivan de animales, preferiblemente de origen bovino, aunque existen variedades de origen porcino y equino. Son desproteinizados mediante técnicas de esterilización mediante calor para excluir el riesgo de reacciones alérgicas y transmisión de enfermedades (Murugan *et al.*, 2003).

Los materiales de hueso bovino tienen una larga tradición de uso en Odontología regenerativa, están muy bien documentados y su aplicación clínica posee una aceptación de amplio alcance. La eliminación de todas las proteínas los transforma en cerámicas derivadas de hidroxiapatita de origen biológico. Se caracterizan por su estructura natural del hueso tridimensional, con poros de interconexión, que se asemeja fuertemente a la estructura ósea humana. Su integración ósea guiada en lugar de una rápida resorción conduce a la estabilidad de volumen del injerto, con la formación de hueso nuevo en la superficie del hueso bovino altamente estructurado.

Bio-Oss, (Geistlich, Wolhusen, Suiza) es un xenoinjerto compuesto por el componente inorgánico del hueso bovino, gracias a un proceso de esterilización progresivo (ascendiente de 300 °C), se eliminan todos los componentes orgánicos. Posteriormente el tejido óseo es tratado químicamente con hidróxido de sodio (NaOH), dando como resultado gránulos de hidroxiapatita (HA) porosa con un tamaño de partícula de 0.25–2 mm. Este material ha sido usado en los campos de la odontología y cirugía maxilofacial, para el injerto óseo, la regeneración de las áreas de defectos, y para la regeneración periodontal (Esposito *et al.*, 2008) .

Debido a la velocidad de absorción muy baja y su estructura trabecular, permite el acceso a las células sanguíneas y óseas, pueden colonizar el espacio generado y permitir la síntesis de matriz ósea. Esto significa que el material tiene las características de un

andamio con una excelente biocompatibilidad (Amerio *et al.*, 2010). Los estudios clínicos realizados durante la última década han informado de la utilidad de Bio-Oss como un material biocompatible para la regeneración de la pérdida ósea intra-oral (Scarano *et al.*, 2006). Sin embargo, de acuerdo con los estudios experimentales, la proliferación de osteoblastos y su diferenciación son conocidos por ser más baja para Bio-Oss que para hueso autógeno (Turhani *et al.*, 2005).

Cerabone, (Botiss Dental GmbH, Berlin, Alemania), somete al xenoinjerto bovino a un proceso de sinterización a alta temperatura (1250 °C), logrando obtener una HA con un 50% de porosidad y un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm (Tadic *et al.*, 2004).

Mucograft, (Geistlich, Wolhusen, Suiza) es una matriz de reabsorción de origen porcino compuesto por colágeno de tipo I y de tipo III, que se utiliza para el aumento de tejidos blandos en ambos procedimientos de regeneración tisular y ósea guiada. Está compuesto por una estructura de bicapa de colágeno porcino (Sanz *et al.*, 2009; Ghanaati *et al.*, 2011). La capa compacta, protege contra la infiltración de bacterias durante las condiciones de curación abierta, también contiene propiedades elásticas adecuadas para permitir la sutura. La segunda capa consiste en una estructura gruesa, porosa y esponjosa de colágeno, que se coloca al lado de los tejidos del huésped para facilitar la organización del coágulo de sangre y promover la neo-angiogénesis y la integración de los tejidos (Ghanaati *et al.*, 2011; Ramachandra *et al.*, 2014).

INFUSE Bone Graft, (Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN) es un injerto óseo comercial que contiene rhBMP-2 a una concentración de 1.5 mg/cc que se libera desde una esponja de colágeno absorbible. En marzo de 2007, este injerto fue aprobado por la FDA como alternativa a los injertos óseos autógenos para las elevaciones de seno y para los aumentos de cresta en defectos postextracción (Wallace *et al.*, 2014).

Esta fue la tercera indicación aprobada de la FDA para INFUSE Bone Graft, sumándose a los procedimientos de fusión espinal entre cuerpos vertebrales y para las fracturas abiertas de tibia con una fijación de clavos intramedular (Boyne *et al.*, 2005; Fiorellini *et al.*, 2005).

Bio-Oss Collagen, (Geistlich, Wolhusen, Suiza) se compone de gránulos de Bio-Oss con la adición de un 10 % de colágeno porcino tipo I. El colágeno, de acuerdo con el fabricante, actúa como un cohesivo para los gránulos lo que al hidratarlo, facilita su manejo clínico (Araújo *et al.*, 2010).

### **Injertos sintéticos o aloplásticos**

Los materiales aloplásticos poseen capacidad de osteoconducción. Dentro de este grupo encontramos cerámicas de sulfato de calcio, las cerámicas fosfato cálcicas (Hidrogel hidroxiapatita y fosfato tricálcico), biovidrios de hidroxiapatita (CDC 2002 USA).

Las cerámicas de sulfato de calcio y de fosfato de calcio son alternativas atractivas a los autoinjertos debido a su biocompatibilidad, diseño de porosidad y diferentes velocidades de disolución. También poseen propiedades físicas similares al tejido óseo, con capacidad para inducir la liberación de factores de crecimiento. Otra de sus ventajas es el suministro potencialmente ilimitado de este biomaterial, a un coste modesto (Aichelmann-Reidy *et al.*, 2004).

El sulfato de calcio, es osteoconductor, pero en contacto con el hueso y/o el periostio parece tener propiedades osteogénicas (Frame *et al.*, 1975). Cuando hay presencia suficiente de matriz orgánica y de osteoblastos, estos iones se pueden utilizar de manera efectiva en la formación de hueso. El sulfato de calcio también parece facilitar la migración de los fibroblastos gingivales y fijación de las células, así poseer un potencial angiogénico y anti-inflamatorio (Payne *et al.*, 1996; Strocchi *et al.*, 2002). Una posible razón para las propiedades anti-inflamatorias de este material es su disolución rápida y difusión a distancia, antes de que pueda ocurrir la infección (Pecora *et al.*, 1997). El tiempo de degradación comprende de 4-6 semanas, lo que lo hace poco indicado para la regeneración de grandes defectos (alveolos postextracción de molares o elevaciones de seno). Para resolver estos inconvenientes se han seguido desarrollando nuevas variantes como diversos polímeros y biovidrios.

#### **4.2. Modelo de calota de conejo**

Una gran variedad de especies se utiliza en los estudios de regeneración ósea en experimentación animal. Las ratas y los conejos se utilizan con frecuencia debido a que su cuidado y mantenimiento es más fácil en comparación con otras especies grandes. Además el modelo de bóveda craneal, utilizado para evaluar la regeneración de defectos en zonas de poca carga con diversos biomateriales, se encuentra ampliamente aceptado y presenta similar origen embriológico al hueso mandibular humano, con menor suministro sanguíneo y medula ósea limitada. Existe sin embargo, una falta de homogeneidad en los

diseños de estos estudios dando gran variedad de resultados que hacen compleja la comparación (Delgado-Ruiz, 2015).

## 5. Oseointegración: mecanismos y rutas de diferenciación tisular

La oseointegración no es más que la curación de una herida ósea alrededor de un implante dental y por lo tanto posee algunos mecanismos biológicos comunes de la regeneración (Nguyen *et al.*, 2009).

Consta de las cuatro fases de la cicatrización o sanación de una herida, los mismos que en el caso del tejido blando, fase exudativa o hemostasis, fase inflamatoria, fase proliferativa y la fase de remodelación (Stadelmann *et al.*, 1998).

La **hemostasis** se inicia con el trauma quirúrgico provocado con la secuencia de fresado y la posterior colocación del implante dental, su duración varía de minutos a horas. Las proteínas, los factores de crecimiento y de diferenciación que se encontraban almacenados en la matriz ósea quedan liberados al medio (Bosshardt *et al.*, 2011). El sangrado por el desgarro de los vasos sanguíneos induce a la polimerización del fibrinógeno para la creación de la primera matriz extracelular en el defecto. La polimerización es activada por la trombina, liberada de las plaquetas, además de la cascada de la coagulación (factor Hageman) (Terheyden *et al.*, 2011).

Durante este intervalo de tiempo, en la superficie del implante, se producen interacciones con moléculas de agua e iones. Pudiendo producir un cambio en la carga eléctrica de la superficie de titanio, beneficiando la unión a proteínas del plasma como la albúmina o la fibrina e incrementando la concentración proteica sobre la superficie del implante. Es gracias a la absorción de las proteínas que las células puedan ser capaces de anclarse a la superficie de titanio del implante (Wilson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010)

En la zona de la herida vascular, la agregación plaquetaria, forma un trombo blanco para cerrar el desgarro y las plaquetas liberan mensajeros moleculares entre los cuales está la trombina, precipitando la cascada de la coagulación. Con la degranulación de las plaquetas se liberan citoquinas y así comienza la fase inflamatoria (Terheyden *et al.*, 2011).

La **fase inflamatoria** comienza aproximadamente tras los 10 minutos de la cirugía y se mantiene durante los primeros días postquirúrgicos. La degranulación de las plaquetas

provoca la liberación de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF).

Otra molécula liberada, la bradiquinina, incrementa la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos para facilitar el paso a los glóbulos blancos, proteínas séricas y fluidos. La vasoconstricción inicial de esta fase se vuelve en vasodilatación y el aspecto clínico es la característica hinchazón y calor de la piel que cubre la zona afectada (Terheyden *et al.*, 2011).

En las primeras etapas de esta fase, se activa el sistema inmune innato para acabar con los patógenos bacterianos de la flora oral invasores a través de la herida quirúrgica y tejidos necróticos óseos provocados con el fresado. Lo componen los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos neutrófilos (PMN) y los macrófagos (Ferencyk *et al.*, 2006).

Los PMNs matan a las bacterias mediante la liberación de radicales de oxígeno, colagenasa y elastasa que tiene como inconvenientes que afectan también a la salud de los tejidos vecinos. El papel de los macrófagos es eliminar las bacterias y los restos de tejido desbridado y tienen además la función de activar el mecanismo para detener la respuesta inflamatoria de los PMNs. Tras la retirada de los restos patológicos, los macrófagos secretan factores de crecimiento angiogénicos y fibrogénicos. La alta concentración de fibronectina, permite la unión de los fibroblastos y que éstos puedan incorporarse a la zona herida, dando así pie a la fase proliferativa (Ferencyk *et al.*, 2006).

En la **fase proliferativa** se va a formar el tejido de granulación, compuesto por una nueva matriz extracelular y una nueva red vascular (angiogénesis). La duración de esta fase varía entre días y semanas. Los fibroblastos estimulados por los macrófagos, se desplazan hacia el coágulo de sangre (matriz extracelular provisional) y secretan una matriz de metaloproteinasas (MMPs) que formará la nueva matriz extracelular (Friedl *et al.*, 2000).

La angiogénesis se estimula por la hipoxia, que atrae a los macrófagos para que liberen los factores de crecimiento vascular (VEGF). Este factor estimulará a los pericitos vasculares (MSC) para diferenciarse a células endoteliales que formarán los nuevos vasos comunicantes que se conectarán a la red existente del organismo y así restablecer el aporte de oxígeno, indispensable para la regeneración ósea (Hitchon *et al.*, 2002).

Existe evidencia de que estos mismos pericitos también pueden ser diferenciados a osteoblastos mediante el estímulo de las BMPs (Corselli *et al.*, 2010). Gracias a la capa

proteica que se ha formado sobre la superficie del implante, los osteoblastos pueden ser capaces de adherirse al metal (Wierzbicka-Patynowski *et al.*, 2003).

Las BMPs que aparecen por primera vez en la herida ósea, proceden de la matriz ósea donde se almacenan, de forma inactiva unidas a los glicosaminoglicanos heparin sulfato. Esto permite el almacenamiento de grandes cantidades para su uso, independientemente de la síntesis de nuevas proteínas. Al dañar el tejido óseo y por la degradación de los restos de hueso desbridados, los factores de crecimiento son liberados mediante enzimas de las células somáticas (Taipale *et al.*, 1997).

Los osteoclastos son otra de formas de liberación de las BMPs, tanto por la degradación de la matriz ósea como la capacidad de sintetizarlas. Las BMPs se encuentran en la herida ósea alrededor de los 3 días tras la intervención (Garimella *et al.*, 2008).

A la semana de la colocación del implante dental, comienza la remodelación ósea, donde se pierde la estabilidad primaria/mecánica a causa de los osteoclastos y comienza la estabilidad secundaria/osteointegrada, gracias a la síntesis del nuevo tejido óseo sobre la superficie del titanio (Berglundh *et al.*, 2003).

El primer tejido óseo que se forma es el hueso reticular, organizado histológicamente por fibras de colágeno orientadas de forma aleatoria. Este tejido se desarrolla tanto sobre las espiras del implante como sobre la superficie existente del tejido óseo vecino (Bosshardt *et al.*, 2011).

Dentro de los mecanismos de osificación (endocondral o intramembranoso), en el caso del hueso del proceso alveolar, se produce una osificación intramembranosa. Los osteoblastos secretan una matriz de colágeno tipo III, mineralizado posteriormente por la hidroxiapatita (Terheyden *et al.*, 2011).

Con la formación del hueso reticular, concluye esta fase y comienza la última de todo este proceso, la fase de remodelación.

**La fase de remodelación ósea**, comienza con la aparición de los osteoclastos, al reabsorber el tejido óseo vecino que retiene de forma mecánica al implante dental, para crear el espacio para el para la formación del nuevo tejido óseo. La duración de esta fase es de años, el tiempo que tarda en reabsorberse el tejido óseo reticular y el hueso maduro previo, es reemplazado por el nuevo tejido óseo.

Este nuevo tejido óseo se conoce como hueso lamelar, debido a la orientación paralela de las fibras de colágeno y su aspecto macroscópico alrededor del implante dental es de

trabéculas óseas, recordando la forma de los arcos góticos. Las trabéculas distribuyen las cargas oclusales que deben soportar el implante dental una vez colocado la corona dental protésica, que es el fin para el que ha sido colocado (Degidi *et al.*, 2003).

Comprender los mecanismos biológicos de la oseointegración nos permite determinar de qué forma se integrarían los implantes dentales en un tejido óseo regenerado donde el fin que persigue la TE es la restitución de un tejido con las propiedades exactas al original y por lo tanto, tener las mismas fases de la regeneración al colocar el implante dental en este hueso neoformado.

## **6. Efecto de la BMP-2 en las células del hueso (osteoblastos)**

Los osteoblastos se generan de forma constante junto a los osteoclastos para mantener el equilibrio del tejido óseo (fenómeno de remodelación y regeneración ante lesiones) gracias a las células madre mesenquimales (MSC) de la línea osteogénica ubicadas en la médula ósea.

Las MSC son células no hematopoyéticas con capacidad de diferenciación hacia tejidos mesenquimáticos como el hueso, cartílago, músculo, ligamentos, tendones y tejido conectivo como el adiposo. Los mecanismos de diferenciación hacia una clase de célula, dependen de factores reguladores hacia un fenotipo exclusivo (Figura 1)(Chamberlain *et al.*, 2007).

### **6.1. Diferenciación ósea**

La diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos está dirigida principalmente por miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformante  $\beta$  en el que comprenden alrededor de cuarenta miembros como las TGF- $\beta$ s, Nodal, Activina y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Guo *et al.*, 2009).

Los osteoblastos producen altos niveles de actividad fosfatasa alcalina y proteínas de la matriz extracelular ósea como el colágeno tipo  $\alpha 1$ , tipo  $\alpha 2$ , la osteopontina, la osteonectina, la sialoproteína, la fibronectina y la osteocalcina, esta última necesaria para la mineralización de la matriz (Milona, *et al.*, 2003). Para iniciar y controlar la producción, existen unos factores de transcripción como por ejemplo *Osx*, *Dlx5* o *Runx2* (Chen *et al.*, 2012).

## **6.2. Expresión de marcadores óseos**

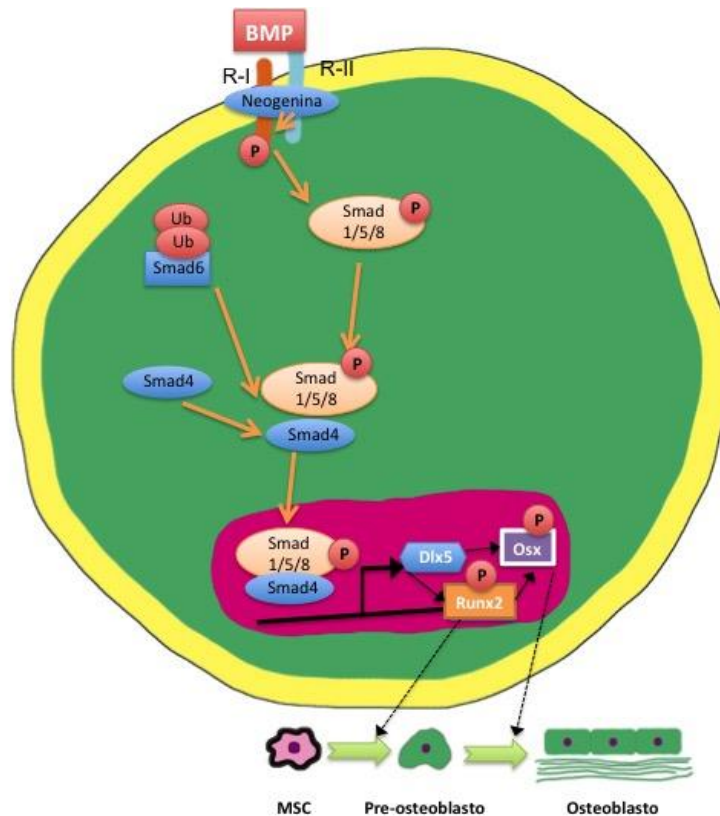
Los marcadores óseos son marcadores bioquímicos que se expresan por la actividad de los osteoblastos, que son detectados por un análisis de sangre del paciente. La actividad de los osteoclastos puede ser determinada tanto en orina como en sangre (Watts *et al.*, 1999).

Pertenecen a estos marcadores óseos de los osteoblastos, la fosfatasa alcalina y la fibromodulina, aparecen en la fase de proliferación celular, conocidos como marcadores osteogénicos tempranos, encargados de la proliferación celular y todos los mecanismos asociados. Otro marcador, la osteocalcina, se produce en las fases finales de la formación ósea, durante la mineralización de la matriz y la estructuración del tejido óseo (Dragoo *et al.*, 2003).

## **7. Cascada de señalización génica tras activación con BMP**

Las células madre mesenquimales sufren su transformación a través de las BMPs por un mecanismo conocido como transducción Smad-dependiente. En la membrana de estas células se encuentran receptores específicos de tipo I y II de serina/treonina kinasa. Los receptores tipo I se activan por fosforilación a consecuencia de la activación de los receptores tipo II (Wagner *et al.*, 2010)

Los receptores tipo I activados inician una señal intracelular a través de la fosforilación de proteínas Smad específicas, esta señal se va intercambiando entre varias de estas proteínas hasta finalmente translocarse al núcleo celular para dar una respuesta transcripcional directa (Yi *et al.*, 2010) (Figura 6).



**Figura 6.** la transducción Smad-dependiente comienza cuando la BMP se une a receptores tipo II (R-II) y tipo I (R-I) en la superficie de la membrana celular. La transmisión de la señal se lleva a cabo mediante proteínas Smad que forman un complejo con Smad4 y se traslocan al núcleo celular, para interactuar con los factores de transcripción claves para la diferenciación osteoblástica (Runx2, Dlx5 y Osx) y activar la expresión génica. La Neogenina regula la asociación de la BMP/receptor con Smad1/5/8. Smad6 se une al receptor tipo I y previene la activación de Smad1/5/8.

### 7.1. Factores de transcripción

Sabemos que las proteínas Smad participan en transducción de las señales de BMP intracelularmente, a los genes del núcleo celular. Runx-2 (*Runt-related transcription factor 2*) es el factor clave de transcripción para la formación ósea tanto endocondral como intramembranosa (Lee *et al.*, 2000).

En el caso concreto de la BMP-2, la expresión de Runx2 es esencial para la diferenciación osteoblástica (Javed *et al.*, 2009). El complejo activado de BMP-Smad, interactúa con Runx2 para inducir la expresión de genes específicos osteoblásticos en la línea celular miogénica C2C12 (Lee *et al.*, 2000). Smad1 interactúa con Runx2 en la promoción de los genes específicos y controla la expresión génica y diferenciación (Jonason *et al.*, 2009).

No obstante, las BMP-Smads pueden funcionar independientemente de Runx-2, mediante Osterix (Osx). Osx es otro factor de transcripción que permite la diferenciación de los pre-osteoblastos a osteoblastos maduros y la formación de hueso (Zhang *et al.*, 2010). La inducción de Osx por la BMP-2 es completamente anulado por el bloqueo del factor de transcripción Dlx5 (*Distal-less homeobox 5 gene*), demostrando que la expresión de Osx inducida por BMP-2 es mediada por Dlx5, en vez de Runx2. Esto hace pensar que Dlx5 interacciona directamente con Osx (Lee *et al.*, 2003).

Por otro lado, Dlx5 puede conducir a la expresión de Runx2 y a la diferenciación osteogénica en el desarrollo del mesénquima de la sutura craneal (Holleville *et al.*, 2007).

Así, tras la acción de la BMP-2 a las células precursoras de osteoblastos, se produce un entramado íntimo entre estos tres factores de transcripción para provocar la diferenciación a osteoblastos (Figura 6).

## 8. Proceso de síntesis de matriz ósea

### 8.1. Marcadores tempranos de diferenciación ósea

Los principales marcadores que sirven para detectar la diferenciación ósea temprana son la fosfatasa alcalina y la fibromodulina.

La **fosfatasa alcalina** (FA) es una proteína enzimática tetramérica que está relacionada con el inicio de la calcificación. Esta actividad enzimática es uno de los marcadores más utilizados para evaluar la diferenciación osteoblástica puesto que se empieza a expresar en las primeras fases del proceso. Bajo el tratamiento de células mioblasticas C2C12 con BMP-2 los niveles de expresión de fosfatasa alcalina aumentan hasta un momento en el que empiezan a disminuir.

Este hecho está relacionado con el comienzo de la expresión de marcadores tardíos como es el caso de osteocalcina (OC) que está íntimamente relacionado (Luu *et al.*, 2007). En el caso de las MSC, la FA está presente pero de forma discreta, sin embargo al estimularlas con agentes osteogénicos, aumenta su expresión (Shafiee *et al.*, 2011).

La **fibromodulina** (Fmod) es una glicoproteína de la matriz extracelular expresado en tejidos conectivos como ligamentos, cartílago y tendones (Kalamajski, Odberg, 2007).

Al igual que con la FA, las células C2C12 tratadas con BMP-2 únicamente expresan Emod pasadas 8 horas post-tratamiento (Li *et al.*, 2008). Esto mismo ocurre con las MSC, ya que no expresan Fmod en su forma pasiva pero ocurre lo contrario al estimularlas con factores de crecimiento dentro de las primeras 24 horas (Barry *et al.*, 2001).

## 8.2. Otros marcadores de diferenciación osteoblástica

Otros marcadores presentes durante la maduración de la matriz extracelular son la osteocalcina o la osteopontina

La **osteocalcina (OC)** es una hormona peptídica lineal, sintetizada por los osteoblastos durante la formación ósea y por tanto, formando parte de la matriz extracelular ósea. Debido a sus características posee un nombre alternativo, *bone gla protein* (proteína glandular ósea) (Price, 1989). Es posible medir la osteocalcina sintetizada por los osteoblastos pues una parte está presente en la circulación sanguínea (Hauschka, *et al.*, 1989).

En experimentos con ratones sin capacidad de formar osteocalcina han presentado una matriz extracelular ósea (ECM) normal, sin mostrar alteraciones en la mineralización. Sin embargo, la sobreexpresión de OC tampoco afecta a la mineralización de ECM (Murshed *et al.*, 2004)

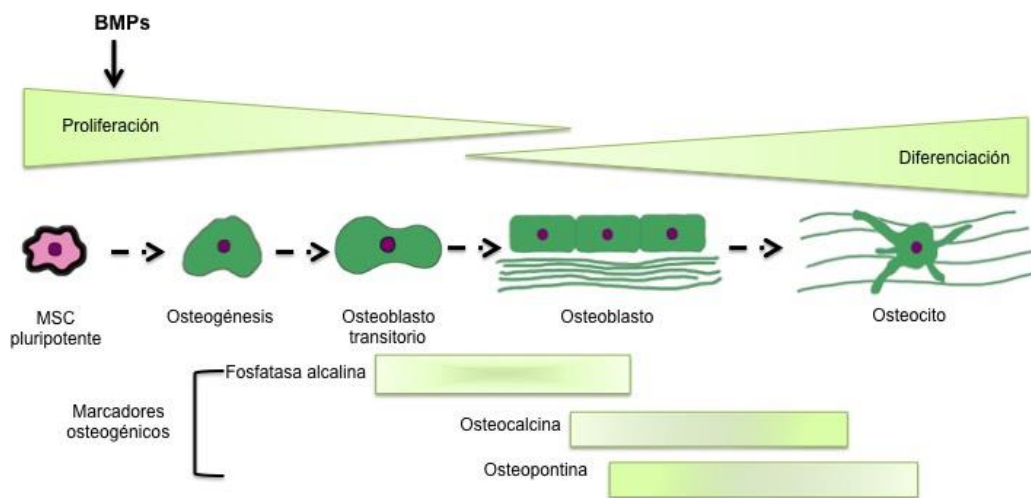
La aplicación clínica de esta hormona, es que los niveles de osteocalcina correlacionan positivamente con el cociente de formación ósea, medida por histomorfometría, tanto de forma fisiológica como en aquellas patologías donde hay un incremento de la formación del hueso o, lo que es lo mismo, un aumento en la actividad osteoblástica (Power *et al.*, 1991).

La **osteopontina (OPN)** es una proteína multifuncional con efecto estimulante sobre síntesis de matriz extracelular. Esta proteína es expresada en hueso, sin embargo también se expresa en otros tejidos como epiteliales, musculares, endotelio, entre otros (Uaesoontrachoon *et al.*, 2008).

Es capaz de unirse al calcio y tiene una elevada afinidad hacia la hidroxiapatita jugando un papel importante en la mineralización del hueso y en la resorción de la matriz ósea (Reinholt *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1993). Por esto mismo, participa en la función de los osteoclastos ya que promueve la unión de éstos a la superficie del hueso por medio de la interacción de la hidroxiapatita a la superficie de la célula. Además, en este proceso pueden interactuar proteínas como la osteocalcina, colágeno tipo I y la fibronectina (Denhardt, Guo, 1993).

La expresión de osteopontina en osteoblastos se produce durante el periodo de proliferación activa (apareciendo hasta el 25% de su máxima expresión), posteriormente decrece durante la post-proliferación y por último, alcanza sus máximos niveles de expresión durante la mineralización (a los días 16-20) (Hu *et al.*, 2009).

Los niveles de expresión de osteopontina en células C2C12 y MSC, aumentan considerablemente cuando estas células son tratadas con factores de diferenciación ósea como es el caso de las BMPs (Figura 7) (Bessa *et al.*, 2008b; Uaesoontrachoon *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Diferenciación osteogénica de las MSC inducido por BMPs. Cuando las BMPs se unen a los receptores específicos de las MSC, activan la proliferación y diferenciación de estas células y a su vez, la expresión de marcadores osteogénicos. (Adaptado de Luo *et al.*, 2004 y Peng *et al.*, 2004).

## 9. Características de la rhBMP-2

La información estructural y funcional de todos los seres vivos está codificada en su DNA. Para que esta información se exprese tiene que traducirse en proteínas, responsables de las características fenotípicas de los organismos vivos.

Con la Ingeniería de DNA recombinante se puede conseguir fragmentos de DNA portadores del gen o genes. que nos interesen, para ser insertados en vectores biológicos (plásmidos, bacteriófagos) para conseguir producir las proteínas pertenecientes a la descodificación de dicho gen o genes.

De todos los vectores que se han empleado, las bacterias y concretamente *Escherichia coli*, permiten obtener grandes cantidades de proteína recombinante de manera rápida y bajo coste, ya que el crecimiento de bacterias es un proceso rápido y requiere de medios más económicos para su cultivo. Durante mucho tiempo fue preferible realizar la expresión de proteínas recombinantes complejas en hospedadores eucarióticos, y no en hospedadores bacterianos, ya que estos últimos no eran adecuados para la producción de proteínas con puentes disulfuro o aquellas que necesiten modificaciones postraduccionales. Sin embargo, desde el punto de vista económico *Escherichia coli* es el organismo de elección, y por tanto, sigue siendo interesante el desarrollo de estos procesos para mejorar la producción de aquellas proteínas que no requieran un procesamiento postradaccional y la de aquellas proteínas recombinantes que puedan recuperar su actividad por un proceso de plegamiento *in vitro* (Choi *et al.*, 2006).

### 9.1. Producción de rhBMP-2

Existen diferentes dificultades a la hora de planificar la obtención de BMP-2 humana en altas dosis y apta para el tratamiento clínico. La rhBMP-2 ha sido descrita como una proteína con bajo rendimiento de producción hasta la fecha, lo que incrementa los costes de su aplicación (Yano *et al.*, 2009, Bessho *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha visto que el hueso adulto y otros tejidos contienen bajas cantidades de BMPs nativas. Se estima que la cantidad de BMP-2 presente en el hueso es de dos microgramos por kilogramos de hueso cortical. Además, aunque se obtenga la BMP-2 directamente del hueso, se obtiene una proteína de muy bajo rendimiento. Se ha visto que el proceso para conseguir la proteína purificada encierra una gran complejidad, y se limita su aplicación clínica por el alto riesgo

asociado a los donantes alogénicos (Wang *et al.*, 1988; Bessho *et al.*, 1999; Urist *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 2009).

La BMP-2 humana, como otras proteínas de este grupo, ha sido clonada y actualmente se puede obtener de manera recombinante (rhBMP-2) utilizando diferentes sistemas de expresión en varios hospedadores como bacterias, células de mamífero, células insecto infectadas por baculovirus, etc. Sin embargo, la dificultad de producción de BMP-2 radica en la complejidad de la proteína.

De todos los métodos, describiremos el empleo de *Escherichia coli* que, a pesar de sus ventajas, ya mencionadas, presentan varios inconvenientes en los que se trabajan para solucionarlos mediante diferentes técnicas.

En la etapa del **cultivo** de *E. Coli* se han desarrollado técnicas para mejorar el rendimiento de la producción de la proteína. Es el caso del cultivo en alta densidad celular (HCDC) (Vallejo *et al.*, 2002) que se basa en emplear un biorreactor donde se controla todos los parámetros que pueden afectar al proceso como la temperatura, el pH e incluso el aporte de nutrientes y de oxígeno. De este modo, en sucesivos trabajos (Vallejo *et al.*, 2002; Bessa *et al.*, 2007) se ha empleado dicho método para la producción de rhBMP-2 consiguiendo gran cantidad de bacterias por litro de cultivo.

Otra etapa del proceso muy estudiada, es la renaturalización de la proteína. Esto es debido a que es necesario controlar muchos parámetros que influyen en gran medida en la formación correcta de los puentes disulfuro de la BMP-2 y, por tanto en su actividad *in vitro* e *in vivo* (Ruppert *et al.*, 1996; Von Einem *et al.*, 2010). Se han examinado exhaustivamente variables como el pH, las condiciones rédox, la concentración de la proteína, la temperatura e incluso la presencia de aditivos de carácter desnaturizante (urea, cloruro de guanidinio) que eviten la agregación durante el proceso (Vallejo, Rinas 2004a; Long *et al.*, 2006).

El último proceso, y el menos estudiado, es la purificación de la proteína, el cual influye estrechamente en el reto de las etapas de la producción. Puesto que la rhBMP-2 nativa tiene un lugar de unión a heparina, la columna de cromatografía más ampliamente utilizada es la de afinidad por heparina (Vallejo, Rinas *et al.*, 2004a; Long *et al.*, 2006; Gueorguieva *et al.*, 2006). Además, se han empleado otro tipo de cromatografías como la His-Trap (IMAC), pero para ello es necesario proporcionarle (mediante un vector de

clonación) a la cadena polipeptídica de la proteína una cola de histidina capaz de unirse a dicha columna (Bessa *et al.*, 2007).

Finalmente, tras estas etapas se obtiene rhBMP-2 purificada y biológicamente activa en cantidades que permiten su uso en experimentación en modelos *in vitro* e *in vivo*. Este producto es capaz de regular todas las rutas de regulación celulares y moleculares anteriormente descritas de manera similar a la acción de la propia BMP-2 endógena.



## II. Antecedentes del grupo de investigación

El Grupo de Ingeniería de Tejidos dirigido anteriormente por el Profesor José Luis López Lacomba y actualmente por el Profesor José Sanz Casado, se encuentra en el Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid.

Los trabajos que se realizan se centran en el estudio de nuevos materiales para su aplicación en la regeneración de tejidos, en especial el tejido óseo y en la obtención de factores de diferenciación como por ejemplo la rhBMP-2.

Puesto que los factores de diferenciación son una pieza clave para la regeneración de tejido, gran parte del esfuerzo científico del grupo se ha centrado en la obtención y caracterización de estos factores, fundamentalmente rhBMP-2, rhBMP-4 y rhBMP-7, que se utilizan para activar materiales. Para ello, se ha dotado al laboratorio del instrumental necesario para la realización de ensayos de biología molecular y celular.

El estudio de nuevos materiales se inicia con el diseño y producción de estructuras 2D y 3D. En este sentido, las vías de investigación se encaminan principalmente en varios grupos de materiales diferentes. Entre ellos, destaca la quitina y su derivado, el quitosano; cerámicas de  $\beta$ -TCP e hidroxiapatita y matrices de nanotubos de carbono.

El grupo de trabajo ha inmovilizado con éxito la rhBMP-2 sobre filmes de quitosano, logrando inducir la diferenciación de células mioblásticas hacia osteoblastos. Estos filmes de quitosano se han utilizado como recubrimiento de distintos materiales, como por ejemplo cerámicas o titanio con el fin de mejorar la regeneración ósea.

Las investigaciones se realizan en diferentes localizaciones anatómicas para la aplicación de los materiales estudiados, en los modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos, ovejas y por último embriones de pollos.

Los resultados de las líneas de investigación se han materializado en contribuciones a congresos, artículos científicos, proyectos de investigación y colaboraciones con diferentes grupos y empresas.

### III. Justificación

La Ingeniería de Tejidos es un campo con aplicaciones que ya están en funcionamiento en diversos campos de la medicina. En nuestro campo, la Odontología, aún se encuentra en fases tempranas, experimentando progresos en diversas técnicas de regeneración ósea guiada. Es por ello que el presente trabajo aporta un paso más en la aplicación de las técnicas de Ingeniería de Tejidos para lograr el objetivo de obtener biomateriales que restauren, mantengan o mejoren la función biológica dañada de un tejido u órgano.

En el presente trabajo, se analizan los efectos de la adición de rhBMP-2 en el desarrollo embrionario, con objeto de evaluar su biocompatibilidad y la seguridad en posibles aplicaciones clínicas. Además, se selecciona un transportador (quitina) para la administración de la proteína y se estudia su acción en la morfogénesis del embrión, atendiendo a la diferenciación ósea. ,

Por otro lado en el caso de los organismos adultos, se evalúan en modelo de calota de conejo varios materiales comerciales destinados a regeneración ósea empleados en Odontología. Asimismo, estos materiales se activan con la proteína rhBMP-2 inmovilizada en micropartículas de quitina, buscando de este modo, una posible mejora en su capacidad para la regeneración ósea.

En primer lugar, como se ha podido revisar en la Introducción, existe una larga tradición en el estudio del efecto de la BMP-2 en la morfogénesis del embrión de pollo. Aunque hay descritos estudios previos de la acción de este factor en el proceso mandibular (Ekanayake *et al.*, 1997; Mina *et al.*, 2001; Mina *et al.*, 2002), resulta necesario valorar el papel de la BMP-2 dentro de la jerarquía actual de las redes de regulación génicas que dirigen el desarrollo mandibular. Además, también es relevante el estadio de desarrollo en el que se implanta este factor de manera experimental. En este sistema dinámico, una diferencia de horas puede llevar a conclusiones muy diferentes, por lo que se optimiza tanto el momento temporal como el método con el que serán operados estos embriones.

De manera adicional, es de gran interés analizar el vehículo utilizado para la administración de BMP-2 en nuestro modelo embrionario. El uso de micropartículas de quitina puede abrir una nueva línea de experimentación que permita en un futuro valorar una posible aplicación en cirugía oromaxilar.

Por todo lo descrito anteriormente, esta Tesis Doctoral analiza la acción de la quitina/rhBMP-2 en la diferenciación ósea de los mamelones maxilar y mandibular en los estadios de desarrollo cercanos a la formación del cartílago de Meckel (St26). De esta manera, se busca influir en el comportamiento de las células mesenquimales allí presentes, sensibles a este estímulo, con objeto de provocar una diferenciación ectópica a fenotipo óseo que demuestre la correcta administración de nuestro factor.

Una vez observados los efectos durante el desarrollo embrionario, se analiza la aplicación de la quitina como vehículo de la rhBMP-2, tanto de forma aislada como combinándolo con diferentes materiales empleados en regeneración ósea guiada en odontología y cirugía maxilofacial. El modelo animal escogido, la calota de conejo, permite realizar una cirugía segura y controlada en un tejido óseo adulto de características similares a la maxila y mandíbula humana.

Los materiales que se evalúan son los siguientes: Bio-Oss·Collagen, matriz basada en hidroxiapatita porosa con un 10% de colágeno, Cerabone, matriz sinterizada de hidroxiapatita, y Mucograft, compuesto por una matriz de colágeno tipo I y III. Este doble enfoque permite, por un lado, comparar la capacidad de estos productos comerciales para regenerar el defecto óseo en calota de conejo. Por otro lado, se posibilita analizar la mejora de la acción de cada producto tras la adición de micropartículas de quitina activadas con rhBMP-2.

En este estudio, se incluye una evaluación de la formación de tejido óseo *de novo*, de la persistencia del xenoinjerto y de otros aspectos de interés, como el análisis de la respuesta inmune o la aparición de otros efectos colaterales. Para ello, se utilizan técnicas cualitativas y cuantitativas, empleando test estadísticos para la comparación de los resultados obtenidos.

Desde esta perspectiva, en la presente Tesis Doctoral se presenta una nueva vía para el desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales capaces de aumentar tanto la calidad de la regeneración del tejido como otros aspectos de interés clínico, como la rapidez de la curación de la lesión o la ausencia de complicaciones adicionales. De este modo, se busca aplicar los principios de la Ingeniería de Tejidos para controlar los procesos de diferenciación ósea y mejorar la regeneración del organismo adulto.

## **Hipótesis**

La adición de micropartículas de quitina activadas con rhBMP-2 puede ser un tratamiento capaz de afectar al desarrollo embrionario del proceso mandibular del embrión de pollo. Además, este tratamiento, en combinación con el empleo de diferentes xenoinjertos óseos, puede mejorar la regeneración ósea tras una lesión en calota de conejo adulto.

## IV. Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la evaluación del tratamiento con micropartículas de quitina activadas con rhBMP-2 en la diferenciación ósea embrionaria y en la regeneración de defectos óseos en modelos adultos..

Para la concreción de este objetivo general nos hemos planteado los siguientes objetivos parciales:

1- Establecer un método óptimo para la implantación de biomateriales en el embrión de pollo *in ovo* y *ex ovo*. Optimizar los protocolos histológicos para fijación, corte y tinción de embriones de pollo.

2- Iniciar el estudio de la biocompatibilidad de micropartículas de quitina y quitina/rhBMP-2 en modelos embrionarios. Comenzar el análisis del efecto osteogénico de la BMP-2 en el proceso mandibular del embrión de pollo.

3- Comparar la acción de diferentes xenoinjertos comerciales empleados en odontología en la regeneración de lesiones en calota de conejo. Observar los efectos del tratamiento con quitina/rhBMP-2 en conjunto con los diferentes xenoinjertos en la regeneración de estas lesiones.



## V. MATERIALES Y METODOS

### 1. Modelos animales: embrión de pollo

#### 1.1. Animales de experimentación

Se obtuvieron huevos marrones fértiles (*Isa Brown*) de la granja Santa Isabel (Córdoba), que fueron incubados a una temperatura de 38 °C y humedad constante, hasta que alcanzasen el estadio embrionario objetivo según la clasificación de Hamburger y Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1951) que se resume en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Estadios de desarrollo del embrión de pollo con su correspondiente tiempo de incubación (Hamburger and Hamilton, 1951).

Estadio de desarrollo	Tiempo de incubación
St 26	108h-120h
St 27	120h
St 28	132h
St 29	144h
St 30	156h
St 31	168h
St 32	180h
St 33	187h
St 34	192h

### 2. Quitina

La quitina fue adquirida a la empresa Sigma (C92213-1KG, SIGMA. Iceland) y es procedente de los caparazones de gambas.

#### 2.1. Caracterización

Descripción visual: Se determinó de forma visual la coloración y la morfología inicial sobre un fondo blanco.

Determinación del tamaño de partículas: La quitina se molió empleando un molino (Fritsch Pulverisette 14) con separador ciclón y dotado de un tamiz de malla de 0,08 milímetros.

Determinación del contenido en humedad: Se determinó el porcentaje de agua presente en las muestras mediante gravimetría, secando una muestra (0,3 g) en estufa de vacío (Selecta, VACIOTEM) a 105 °C y 0,8 bares de presión hasta peso constante. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Humedad \%} = (P3 \times 100) / P1$$

Siendo:

P1: peso inicial de la muestra.

P2: peso de la muestra seca.

P3: peso del agua contenida inicialmente en la muestra (P1-P2).

Determinación del contenido en cenizas: La cantidad total de materia inorgánica presente en las muestras se determinó por gravimetría, llegando hasta la obtención de cenizas blancas o ligeramente grises tras la calcinación de 0,5 g de muestra a 800 °C en una mufla (NEY, Vulcan A-130). Las determinaciones se realizaron por triplicado y el porcentaje de cenizas se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Cenizas \%} = (P2 \times 100) / P1$$

Siendo:

P1: peso de la muestra seca (teniendo en cuenta el contenido de agua).

P2: peso de cenizas obtenidas

Determinación del contenido de metales pesados: El ensayo se realizó empleando un espectrómetro de emisión excitación ICP (ICP-OES, CAI Centro de espectrometría atómica de la UCM). En el análisis se determinó el contenido en plomo y mercurio por triplicado de las cenizas de quitina resuspendidas en HCl 5% (v/v) y filtradas por 0,22 µm.

Análisis elemental: Se determinó el contenido en peso de nitrógeno y carbono por macroanálisis elemental (LECO CNS-2000I, CAI de Microanálisis Elemental, Facultad de

Farmacia, UCM). Se llevaron 0,3 g de muestra a combustión a una temperatura de 1200 °C, usando aire como blanco.

Difracción de rayos X: Se empleó un difractómetro automático PHILIPS X'PERT MPD (CAI de DRX, Facultad de Farmacia, UCM). El equipo posee un goniómetro PW3050 ( $\theta$ - $2\theta$ ) y la potencia del generador se fijó a 45kV y 40mA. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente con radiación  $\text{CuK}\alpha^1$  (de longitud de onda  $1,54056\text{\AA}$ ) con monocromador de grafito y en geometría confocalizada (Bragg-Berntano). Se fijó el tamaño y la duración de paso ( $2\theta$ ) de las medidas en  $0,040^\circ$  y en 1 segundo. El rango angular estudiado fue de  $5^\circ$ - $40^\circ$  ( $2\theta$ ).

Espectroscopia IR: Se obtuvieron los espectros infrarrojos de las quitinas empleando un equipo Perkin Elmer Spectrum One. Los scans se realizaron desde 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$  de longitud de onda con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **3. Obtención de la proteína rhBMP-2**

La proteína rhBMP-2 se obtuvo mediante técnicas de ingeniería molecular a partir de *Escherichia coli*. La proteína fue adquirida a la empresa Noricum SL (San Sebastián de los Reyes, España).

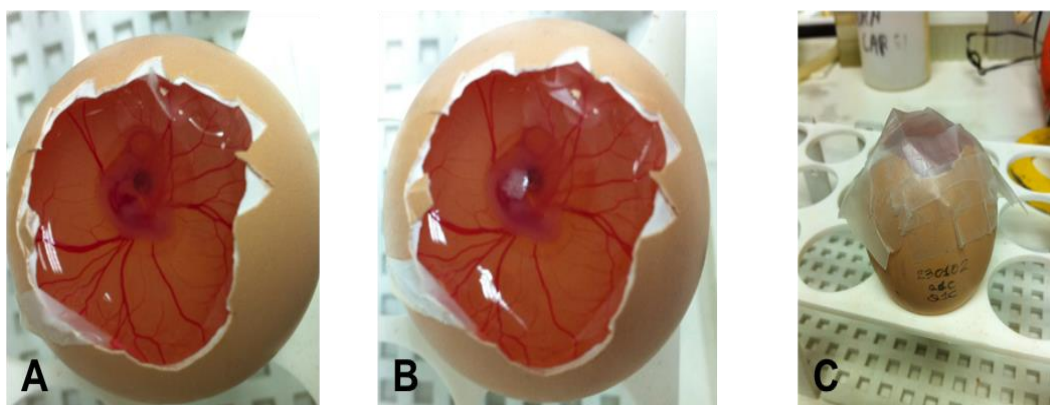
### **4. Inmovilización de la proteína rhBMP-2**

La inmovilización de la proteína rhBMP-2 sobre las partículas de quitina se realizó mediante contacto del material (200 mg) con la proteína ( $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) a  $4^\circ\text{C}$  durante 12 horas en agitación. La cantidad de proteína adsorbida se analizó por espectrofotometría (Specord 205 Analytikjena) a 280 nm. Se recogió el sobrenadante por centrifugación a 1500 r.p.m durante 5 minutos, luego se hizo un lavado con PBS (1500 r.p.m, 5 min). La proteína retenida en las partículas se determinó en colaboración con la Dra Yamila Mansilla de Universidad Nacional Mar de Plata, Argentina.

## **5. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio**

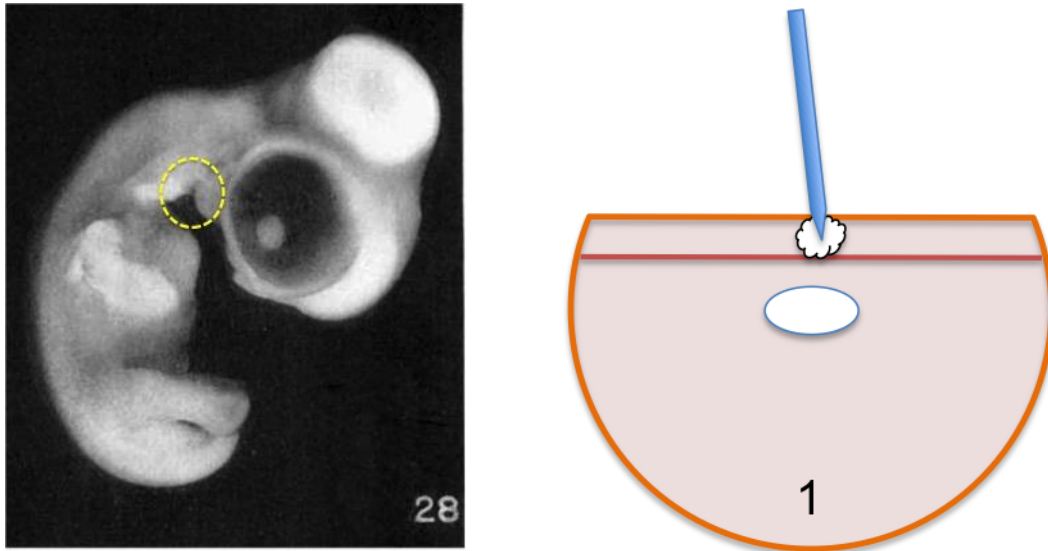
### **5.1. Contacto directo**

La intervención para acceder a los embriones se realizó siguiendo el siguiente protocolo: con una aguja estéril, se perforó la cáscara y con unas pinzas de disección se amplió el acceso al embrión (técnica de ventana *in ovo*). Posteriormente, se depositó el material con pinzas en la zona maxilar; quitina en el grupo control y quitina/rhBMP-2 en el grupo experimental. Para proteger al embrión y evitar contaminación toda la operación se realizó bajo llama de mechero Bunsen y se sellaron los huevos con parafilm (BEMIS) y cinta adhesiva (Figura 8 y Figura 9). Los huevos intervenidos fueron colocados de nuevo en la incubadora a una temperatura de 38 °C y humedad constante, durante un período de tiempo de incubación de 1 a 7 días post-tratamiento, para la evaluación del efecto. Los embriones desarrollados (entre St 26 a St 34) se recuperaron mediante la disección del saco vitelino con tijeras y para separar al embrión de la yema, se utilizaron espátulas.



**Figura 8.** Apertura del huevo con el embrión en st 26 A), colocación del material B) y C) sellado con parafilm y celo.

La evaluación del estadio de desarrollo según las horas de incubación del embrión, se determinó calculando las horas que llevaban los embriones fecundados desde su recepción en el laboratorio hasta la apertura de los huevos próxima al inicio de la osificación del esqueleto (St 26). Se confirmó el estadio de desarrollo al ver *in situ* el aspecto del embrión y comparándolo con la clasificación de Hamburger y Hamilton (Tabla 1). Una vez aplicada la quitina con la rhBMP-2, volvían a incubarse los huevos hasta un máximo de siete días, alcanzando estadios de desarrollo cercanos al St 34.



**Figura 9.** A la izquierda, imagen de un embrión en estadio 28 de incubación con la zona de interés remarcada. A la derecha, esquema de la primera intervención. El material se colocó reposando sobre la membrana amniótica, localizado sobre el primer arco branquial. No hay contacto directo del material en el embrión, representado por la elipse de color blanco.

## 5.2. Zona del desarrollo del maxilar

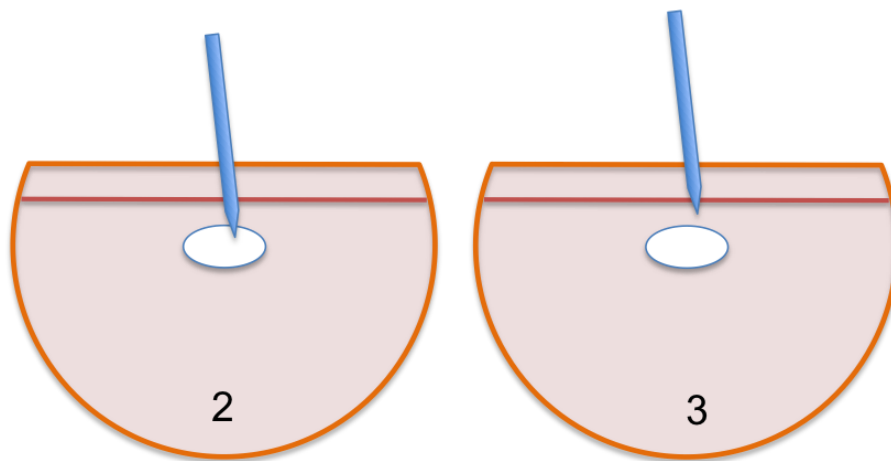
### Primera intervención

Como en el anterior experimento sólo se colocó el material sobre el embrión, para esta segunda aproximación se insertó directamente el material en la zona de desarrollo del maxilar, en el primer arco branquial. La intervención se realizó con instrumentos de tungsteno, realizando una incisión en la membrana amniótica, y posteriormente creando un bolsillo en el mesénquima del primer arco branquial para introducir el material.

Para este segundo experimento, se crearon cuatro grupos: control de apertura del huevo, control con cirugía sin colocación del material, control de quitina insertándose en un bolsillo en el mesénquima del embrión y el grupo experimental, al que se le implantó quitina/rhBMP-2 mediante la creación de un bolsillo en el mesénquima.

### Segunda intervención

De forma paralela a este experimento, se realiza otro modificando la técnica, donde se realiza una tercera intervención con una sola incisión, exclusivamente en el saco amniótico. Se realizaron tres controles de quitina y otros tres de quitina/rhBMP-2 (Figura 10).



**Figura 10.** Esquemas de los procedimientos quirúrgicos 1º y 2º intervención en la zona del desarrollo maxilar. En 2, se realiza un bolsillo quirúrgico en el mesénquima para introducir el material y así esté localizado y en íntimo contacto en la zona del primer arco branquial. En 3, solamente realizamos la incisión de la membrana amniótica para probar una colocación sobre el embrión evitando la membrana barrera, al contrario que con el primer método.

## 6. Protocolo cultivo *ex ovo*

Todo el equipo y fundentes han sido esterilizado con ETOH 70% o adquiridos esterilizados.

### **Parte 1: Incubación de los huevos**

Los huevos fertilizados se incubaron por 72 horas para alcanzar el estadio de desarrollo deseado, en posición horizontal, en una incubadora con bandeja móvil, (Octagon 40) rotando los huevos 12 veces al día de forma continua. La humedad se mantiene entre un 60-62% y la temperatura de la incubación a 37,5-38°C.

Antes de empezar la incubación, la suciedad, plumas y excrementos fueron cuidadosamente retirados de la cáscara mecánicamente con un paño humedecido en etanol 70%.

### **Parte 2: cultivo *Ex ovo***

1. Después de 72 horas, los huevos se retiraron de la incubadora, garantizando una mayor supervivencia. En estadios más tempranos a las 72 horas de incubación, el saco vitelario de

la yema aún no está cubierto por la membrana corioalantoidea (CAM), por lo que es una capa más fina y tiende a adherirse a la cáscara, dejando:

- Pequeñas hemorragias en el área de adherencia
- La ruptura de la membrana yema-saco.

El método presentado no es aplicable a embriones mayores de 72 horas. Debido a su novedad, en este texto se procede a su explicación de manera pormenorizada:

1. El huevo debe estar en posición horizontal para que el embrión se desplace a la posición superior, como una “burbuja”. La zona superior del huevo se marca con lápiz para no confundirnos al sujetar el huevo y proceder a su apertura.

2. Todo el proceso de abrir el huevo para ser colocado en la cámara de incubación se realiza en medio estéril, dentro de una campana de flujo laminar. Para evitar que el contenido se derrame en caso de fallo en la operación y contamine la campana, utilizar una bandeja amplia para recoger los residuos y evitar la fuga.

3. El huevo se agarra con las dos manos horizontalmente con la marca a lápiz en la parte superior y se “casca” el huevo con una “guillotina” de borde fino no cortante. El huevo debe estar orientado perpendicularmente a la guillotina.

Para una mayor sensibilidad en la manipulación de los huevos, no utilizamos guantes, pero las manos deben ser desinfectadas con 70% ETOH.

Para tener una certeza de que se ha abierto correctamente, se debe observar una fuga de clara del huevo en la apertura, realizada en el momento previo a la separación de las dos mitades de la cáscara. Esto es un signo seguro de que el saco vitelar ha sido perforado.

4. El huevo se mantiene cerca del fondo de la cámara de la incubación para evitar fugas de clara. Durante el procedimiento inicial de apertura, es importante que estén conectados la clara y el fondo de la cámara, dando como resultado un efecto de vaciado por presión negativa, que arrastra la clara con el embrión en la parte superior. El vaciado puede ser regulado por presión con los dedos (corazón y pulgar) que permite la entrada de aire al huevo.

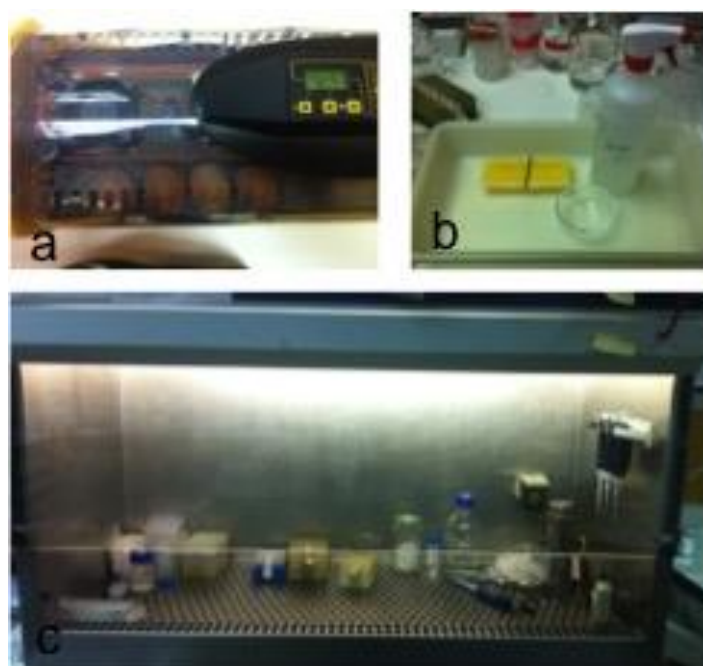
5. Aplicando presión gentilmente a la línea de fractura que se ha creado en el ecuador del huevo, con los dedos corazón y pulgar, es posible controlar el vaciado y transferir el contenido del huevo sin daños. El embrión y sus vasos deberán estar en la parte alta de una yema intacta. Si los embriones son mayores de 72 horas, el saco vitelar de la yema se

pega a la cáscara y se rompe a veces. Lo mismo ocurre cuando la humedad del incubador es más baja que el 60% o los huevos no han sido rotados durante la incubación.

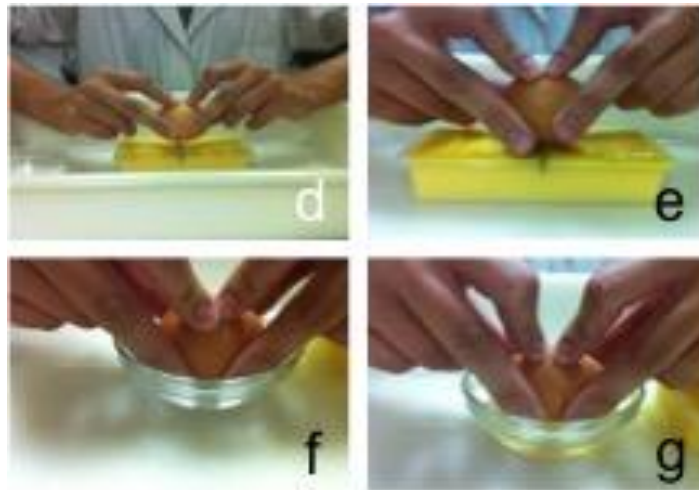
6. Tras el trasvase del embrión del huevo a la cámara de cultivo, comprobamos si existe latido cardíaco para asegurarnos de que el animal siga vivo y en caso afirmativo, realizamos el procedimiento experimental de interés. Tras su realización, cubrimos la cámara de cultivo con la tapa con filtro de células al terminar.

7. Los cultivos ex ovo se colocan en la incubadora y se mantienen a 37.5°C -38°C y 60% de humedad. Suplementos de CO<sub>2</sub> o O<sub>2</sub> no son necesarios si la incubadora no está cerrada herméticamente. La tapa con filtro de cultivos celulares protege al embrión de la contaminación ambiental.

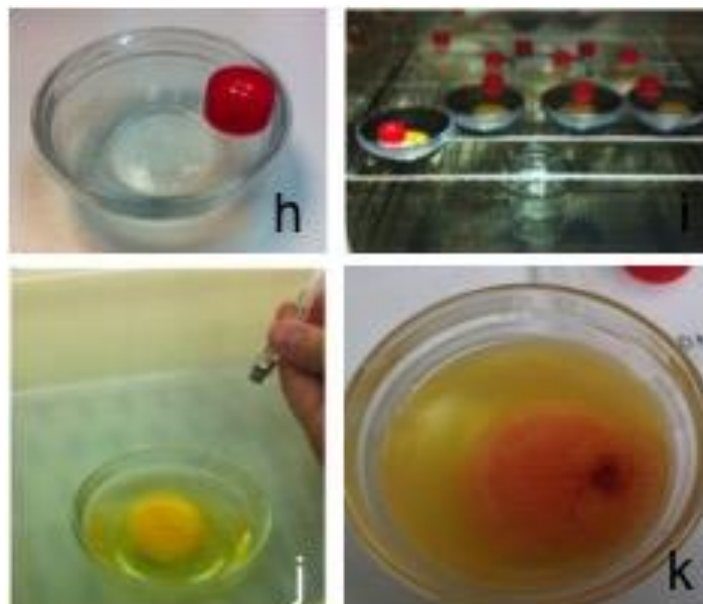
En la Figuras 11, 12 y 13 se resumen en etapas todo el procedimiento anteriormente descrito.



**Figura 11.** a) Incubadora móvil automática (Octagon 40), a una humedad del 60-62% y temperatura de 37,5-38 °C constantes. b) Material necesario para la apertura de los huevos, consta de una bandeja para evitar los posibles derrames del contenido, una guillotina metálica fabricada de forma artesanal, etanol al 70% para desinfectar y una cámara de vidrio esterilizada que será la que contenga el contenido del huevo y al embrión c) El proceso de la apertura de los huevos se realiza en un ambiente estéril, dentro de una cámara de flujo laminar y tras la desinfección de los huevos con etanol al 70% y lavado de las manos con el mismo desinfectante, se procede a la apertura.



**Figura 12.** La técnica de la apertura consiste en las siguientes fases d) hay que sujetar el huevo en posición horizontal con ambas manos, quedando éste orientado perpendicularmente a la hoja sin filo de la guillotina. e) Realizamos un golpe seco y para saber si se ha realizado con éxito, hay que observar si existe una fuga de la clara antes de separar las 2 mitades de la cáscara. f) Colocamos el huevo apoyándolo en el fondo de la cámara de vidrio, evitando más fugas del contenido. g) Al separar las dos mitades, creamos una presión negativa que facilita la salida de la yema con el embrión posicionado en la orientación prevista



**Figura 13.** h) Cámara de incubación *ex ovo*. Está compuesta por un cuenco de vidrio estéril y una tapa de petri adaptada con un filtro de cultivos celulares. i) Se sellan con parafilm y se introducen en la incubadora a 37,5- 38 °C constante y 60% de humedad j) Los cultivos *ex ovo* permiten un fácil acceso a la manipulación experimental del embrión así como su observación k) Tras 72 horas de incubación *ex ovo* vemos que los embriones han sobrevivido y desarrollado a estadios mayores.

## 7. Procesamiento histológico

Tras la incubación post-intervención, los embriones se almacenaron en paraformaldehído (PFA) al 4% y enfriados a -4 °C. Tras haber sido fijados durante 3 días, se deshidrataron (mediante la secuencia de etanoles; 80%, 96% y absoluto) los embriones y se incluyeron en bloques de parafina. Los bloques se seccionaron a 5 micras, con un micrótopo (Leica RM 2155) y se colocaron en portas Starfrost (Knittel Glass). Los cortes se tiñeron mediante la tinción básica de Tricrómico de Masson. El montaje de los cortes en los portas se realizó con el kit de montaje de cubreobjetos, EUKITT (EMS), según las instrucciones del fabricante.

### 7.1. Tinciones histológicas

La tinción Tricrómica de Masson, permite visualizar las fibras de colágeno tipo I, las cuales forman fibras gruesas o haces, para ofrecer resistencia; también se tiñen, aunque con menos intensidad, las fibras reticulares. Intervienen tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno.

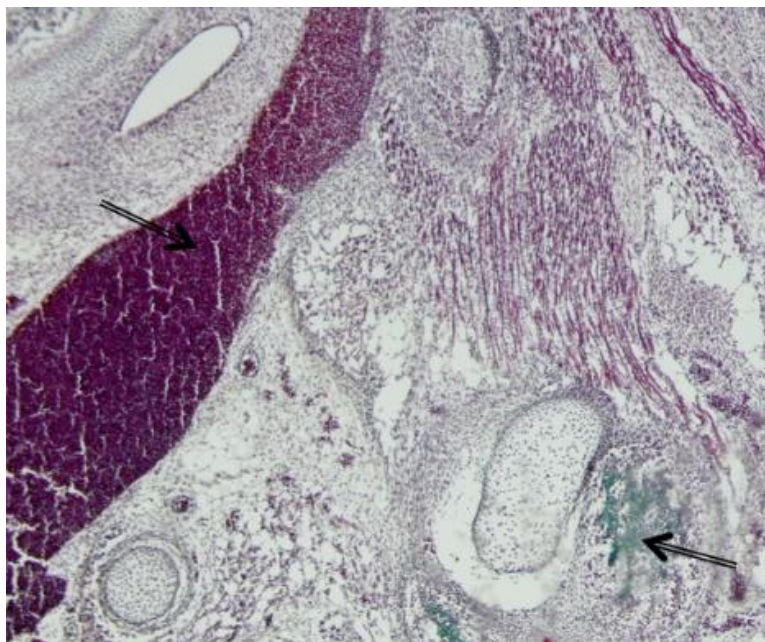
Primero, se tiñen las secciones con un tinte ácido, la Fucsina + Ponceau. Todos los elementos tisulares afines al ácido como el citoplasma y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. A continuación, los cortes histológicos se bañan en ácido fosfomolibdico. Debido a la menor permeabilidad del citoplasma en comparación al colágeno, los ácidos fosfomolibdicos ayudan a la difusión de Fucsina + Ponceau en el colágeno exclusivamente. El ácido fosfomolibdico contiene grupos ácidos que posiblemente permitan la tinción de las fibras de colágeno con la tinción histológica Verde luz.

Para la tinción con Tricrómico de Masson se utilizó el siguiente protocolo:

1. Desparafinado: 5 min de estufa y 5 min de xilol/isoparafina (3 min y 2 min).
2. Hidratación: ETOH Abs, 96%; 80%; H<sub>2</sub>O: 2 min
3. Hematoxilina de Weigert: 4:30 min
4. Lavado H<sub>2</sub>O: 2' o 20 veces
5. Nuevo lavado: 10 min
6. Fucsina + Ponceau BS: 4 min
7. Ácido fosfomolibdico : 2 baños; 1º-1 min y 2º-4 min
8. Verde luz: 4:30 min

9. H<sub>2</sub>O: 2' o 20 veces
10. Baño de Ácido acético: 4min
11. Deshidratación: ETOH 80%; 96%; Abs: 2 min
12. Xilol 5 min
13. Montaje (Eukitt).

En la Figura 14, se puede observar una muestra histológica teñida mediante tricrómico de Masson. Nos permite distinguir por las diferentes coloraciones, el tejido conectivo, la formación de nuevo tejido óseo.



**Figura 14.** Tinción histológica de Tricrómico de Masson en el embrión de pollo control de St 36. Las fibras de colágeno y el tejido conjuntivo adquieren un tono verde. La queratina, glóbulos rojos y el tejido muscular, un tono rojo. Los núcleos celulares se tiñen de lila o marrón.

## **8. Estudio *in vivo*. Modelo en calota de conejo. Implantación de injertos, quitina/rhBMP-2**

Seis conejos machos de la raza New Zeland, edad joven (3 meses), peso medio de 3.5 Kg, fueron sometidos a procedimiento quirúrgico en cráneo, confeccionando defectos circulares no críticos en hueso parietal (2 por animal). Los sujetos experimentales se aleatorizaron y dividieron en grupos, dependiendo del material de relleno del defecto

-Defecto con material comercial (Bio-oss Collagen, Mucograft y CeraBone).

-Defecto con material comercial + 50µg rhBMP-2.

-Defecto con material comercial + micropartículas de quitina (200 mg, 0.08 mm).

-Defecto con material comercial + micropartículas de quitina (200 mg, 0.08 mm) y 50µg rhBMP-2.

Estos resultados se compararon con controles apropiados (sólo quitina, control vacío) para el mismo procedimiento quirúrgico y el mismo tiempo post-cirugía.

El protocolo experimental empleado en esta tesis doctoral fue aprobado por el comité ético de experimentación animal del Hospital Clínico San Carlos (CEEA). Siguiendo el protocolo de cría de animales de experimentación, los conejos tuvieron un periodo de adaptación tras el traslado al animalario del centro de experimentación del H.C. San Carlos.

Los animales se alojaron en jaulas aprobadas para conejos, a temperatura controlada de 18 a 20 °C, con medios de alimentación y agua accesibles, con una base de heno para tener un adecuado ambiente y posibilidad de tener contacto visual con otros conejos de jaulas contiguas.

La anestesia en los animales fue inducida con ketamina (40 mg/Kg), midazolam (2 mg/Kg), y citrato de fentanil (0.8 µg/Kg). Mediante una máscara de aire, para el Mantenimiento anestésico, se aplicó una mezcla de isoflurano/óxido nitroso (1%:1.5%) y oxígeno (2/3:1/3). Se afeitó el pelo del área quirúrgica de los cráneos y se desinfectó con clorhexidina 2%.

Se realizó una incisión vertical de unos 20mm, a la altura de la sutura sagital y se despegó el plano dérmico y periostio. Una vez expuesta la calota, se crearon dos defectos circulares, uno en cada hueso parietal, a cada lado de la sutura media, con fresa de trefina de 8 mm de diámetro interno, bajo irrigación copiosa con solución salina al 0.9%. La osteotomía se realiza con precaución de mantener intacta la duramadre y con ayuda de un despegador se remueve completamente la tapa ósea. Cada animal recibió un injerto control y otro injerto experimental y la selección de los animales se realizó de manera aleatoria. Debido al interés de las observaciones surgidas en el transcurso de la cirugía experimental, este procedimiento se detalla más a fondo en el apartado de Resultados de esta Tesis Doctoral.

El diámetro del defecto fue el adecuado para recibir el injerto donde se colocó, la incisión se suturó por planos, lo que permitió que el periostio ayudara a contener el injerto. Tanto

el periostio como la dérmis se suturaron con sutura reabsorbible 4/0 (Vicryl 4.0 Ethicon Inc/ Johnson&Johnson). Los animales recibieron una inyección intramuscular de benzyl penicilina (40,000 IU) y 5 mg/Kg de tramadol después del procedimiento. Se realizó un seguimiento de las heridas y se descartó cualquier proceso infeccioso e inflamatorio intracraneal.

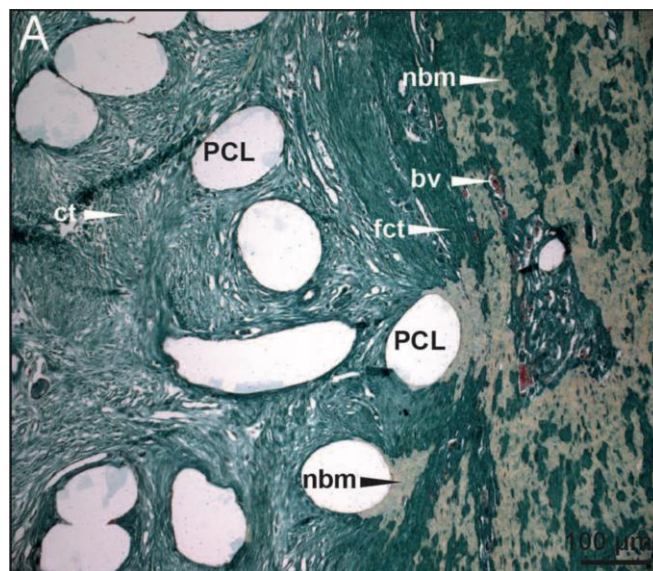
### **8.1 Obtención de las muestras y tratamiento histológico**

Tras dos meses desde la cirugía, se realizó el sacrificio mediante una sobredosis inyectada de midazolán y anestésico. Para la obtención de las muestras, se seccionó la calota en un fragmento con forma de pentágono en el que contenía las dos regeneraciones y se fijaron en formalina al 10% durante 72 h. Posteriormente se eliminó la formalina al introducir las muestras en agua durante 24 h. Se descalcificó el hueso con DECAL (HistoLAB) durante 4 días. Una vez descalcificado, dividimos el fragmento en dos mitades, cada una conteniendo un defecto regenerado. A continuación, las muestras se deshidrataron en una secuencia ascendente de etanoles (70%, 80%, 90% y absoluto) y un tratamiento con xilol para su posterior inclusión en bloques de parafina. Los bloques se cortaron con un micrótopo de rotación motorizado Leica RM2155 (Leica Biosystems) de manera que la imagen histológica abarcara en un corte transversal el diámetro del defecto regenerado. El espaciado entre cortes fue de 8µm y colocados en un portaobjetos Starfrost (Knittel Glass). Los cortes elegidos para su tinción fueron aquellos que se situaban en la zona que abarcaba el centro del defecto. La tinción histológica empleada para el análisis histológico fue Tricrómico de Masson. Se siguió en estas muestras el siguiente protocolo de tinción de Tricrómico de Masson.

1. Desparafinado: Estufa: 25min; Xilol 1: 25min
2. Hidratación: 5 min en EtOH abs; EtOH 96%; EtOH 80%; EtOH 70% y H<sub>2</sub>O
3. Hematoxilina de Weigert: 3 min
4. Lavado H<sub>2</sub>O: 10min.
5. Fucsina + Panceau: 4 min
6. H<sub>2</sub>O: 5min
7. Ácido fosfomolibdico : 2 baños de 10 min cada uno

8. Verde luz: 3.30 min
9. Lavado H<sub>2</sub>O: 5min.
10. Ácido acético 1%: 4min.
11. Deshidratar: 5 min en EtOH 70%; EtOH 80%; EtOH 96% y EtOH abs
12. Xilol 2: 5min.
13. Montaje (Eukitt).

En la siguiente figura se muestra a modo de ejemplo un corte histológico donde se observan los tejidos que aparecen en una regeneración ósea empleando xenoinjertos (Figura 15).

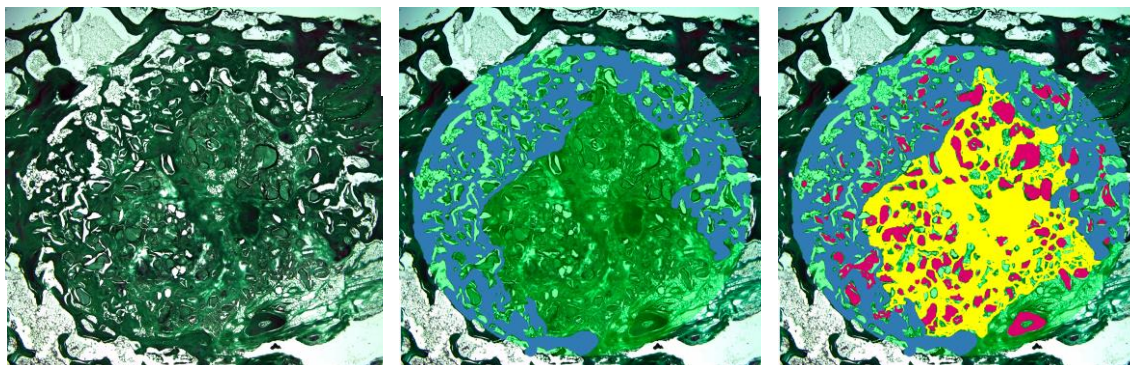


**Figura 15.** Tinción con tricrómico de Masson de la regeneración de un defecto óseo mediante xenoinjerto. En la imagen se señala la presencia de vasos sanguíneos (bv); matriz ósea regenerada (nmb); tejido conectivo firme (fct); tejido conectivo (ct) y los restos del xenoinjerto (PCL). (Rentsch *et al.*, 2014).

## 9. Histomorfometría

La histomorfometría ósea es el estudio cuantitativo de la organización microscópica y estructural del hueso por medio del análisis asistido por ordenador de los cortes histológicos (Vidal *et al.*, 2012).

El método empleado para realizar las mediciones, consistió en el análisis de las estructuras en el corte histológico para determinar su área en píxeles con el programa de tratamiento de imágenes digitales Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, USA) empleando una tableta gráfica Intuos Pro (Wacom, China). Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  la desviación estándar. Los análisis estadísticos empleando el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) se llevaron a cabo empleando el programa estadístico Prism 5 (Graph Pad) (Figura 16).



**Figura 16.** Secuencia de histomorfometría en una muestra de regeneración ósea en calota de conejo.

## 10. Técnica de tinción inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica de los cortes mediante Anti-osteocalcina (OCG3 Abcam AB13420), se realizó en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital San Rafael, Cádiz.

La inmunohistoquímica es una técnica de tinción que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a un revelador colorimétrico, para demostrar la presencia de una determinada molécula. Es una técnica que tiene variantes cuantitativas y cualitativas. Hemos empleado esta técnica para observar la expresión de la osteocalcina.

Los cortes se procesaron mediante un procesador automático (BenchMark ULTRA) con tratamiento estándar (rehidratación, bloqueo, incubación de los anticuerpos, lavado). Las imágenes se fotografiaron con un microscopio óptico y analizadas usando el software CellD.

El protocolo de la tinción fue el siguiente:

1. Horneado de los portaobjetos a 75°C e incubar 4 minutos
2. Desparafinado, calentando el portaobjetos a 72 °C desde temperatura del medio
3. Acondicionador celular, Ultra conditioner #1. Calentar porta a 95°C e incubar 8 minutos. Acondicionador celular 1. 20minutos de Ultra CC1 y 36 minutos de Ultra CC1.
4. Incubación Anticuerpo Osteocalcina, aplicar una gota de Prekit 1. Aplicar cubreobjetos e incubar 52 minutos.
5. Revelado y contratinción, aplicar una gota de hematoxilina. Aplicar el cubreobjetos e incubar 4 minutos.
6. Postcontratinción, aplicar una gota de *Bluing Reagent*. Aplicar cubreobjetos e incubar 4 minutos.
7. Montaje de los portaobjetos



## **VI. RESULTADOS**

En la realización de la presente Tesis Doctoral se procedió a la adquisición una quitina de origen crustáceo (gambas) como soporte para la proteína rhBMP-2. El material se caracterizó teniendo en cuenta los parámetros más relevantes para ser empleado como material en Ingeniería de Tejidos.

### **1. Caracterización fisicoquímica de la quitina**

La quitina adquirida en forma de escamas se sometió a una molienda para lograr un tamaño máximo de partícula de 0,08 milímetros. La quitina presentó una coloración blanco amarillento. Uno de los parámetros a determinar es el contenido en humedad y cenizas, necesarios para poder comparar de forma adecuada los ensayos realizados. El primero de ellos afecta de forma muy importante al peso real de polímero que se emplea, mientras que el segundo nos da una idea de la eficacia del proceso de desmineralización empleado en su obtención. Por lo general las casas comerciales no dan unos límites concretos para estos parámetros, sino sólo un valor máximo de los mismos, siendo común por ejemplo, para el contenido en humedad, estipular que debe ser inferior al 10-15% y en función de la aplicación final este valor puede llegar a ser mucho menor, alrededor de un 8%.

El porcentaje de cenizas describe la cantidad total de material inorgánico presente en la muestra, proveniente en su mayoría de sales como carbonatos y silicatos. La composición de estas sales depende de la procedencia de la quitina y el tratamiento industrial aplicado para su obtención. Los resultados correspondientes a la determinación de cenizas totales muestran un valor menor del 1%, límite establecido para este parámetro en las especificaciones de calidad de las muestras comerciales.

Dentro del contenido en cenizas están los metales pesados presentes en la muestra de quitina. Este parámetro sí puede afectar de forma significativa al uso de los mismos en aplicaciones biomédicas, siendo especialmente importante para las mismas el contenido en Hg y Pb.

Se reconoce que la quitina no es una entidad química simple, aún luego de los tratamientos de desproteización y desmineralización. Las muestras varían en sus propiedades químicas y físicas dependiendo del origen del material y del proceso de

obtención. Por este motivo, es necesario caracterizar el material que se utiliza como soporte y en la Tabla 2 se presentan las especificaciones bibliográficas y las obtenidas.

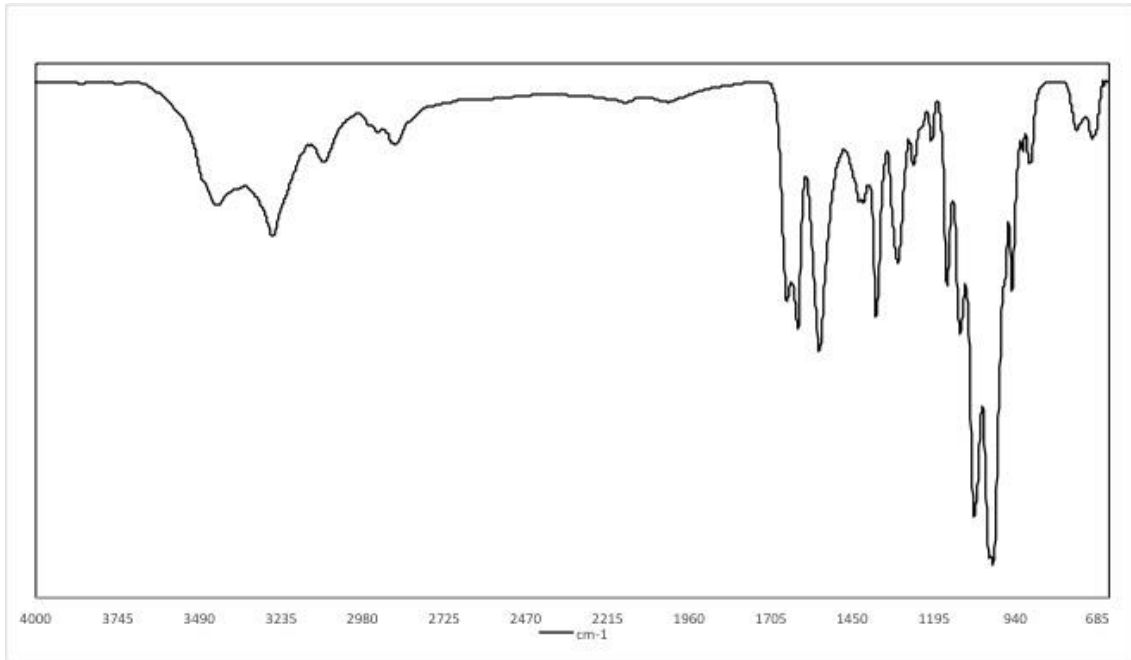
**Tabla 2.** Control de calidad de quitina.

Especificaciones	Valores obtenidos	
Apariencia	polvo gris-rosa-natural	polvo color natural
Tamaño de partícula	< 25 %	< 25 %
Contenido de humedad	2 - 10 %	5,0 %
Cenizas	< 1,0 %	0,21 %
Grado de desacetilación	10 %	-
Contenido de nitrógeno	6 - 7 %	6,52 %
Picos de difracción de rayos X	8°58' - 10°26'	9°3'
	19°58' - 20°00'	19°02'

La quitina presenta un valor adecuado de metales pesados, inferiores a 0,2 ppm de Hg e inferiores a 0,1 ppm de Pb.

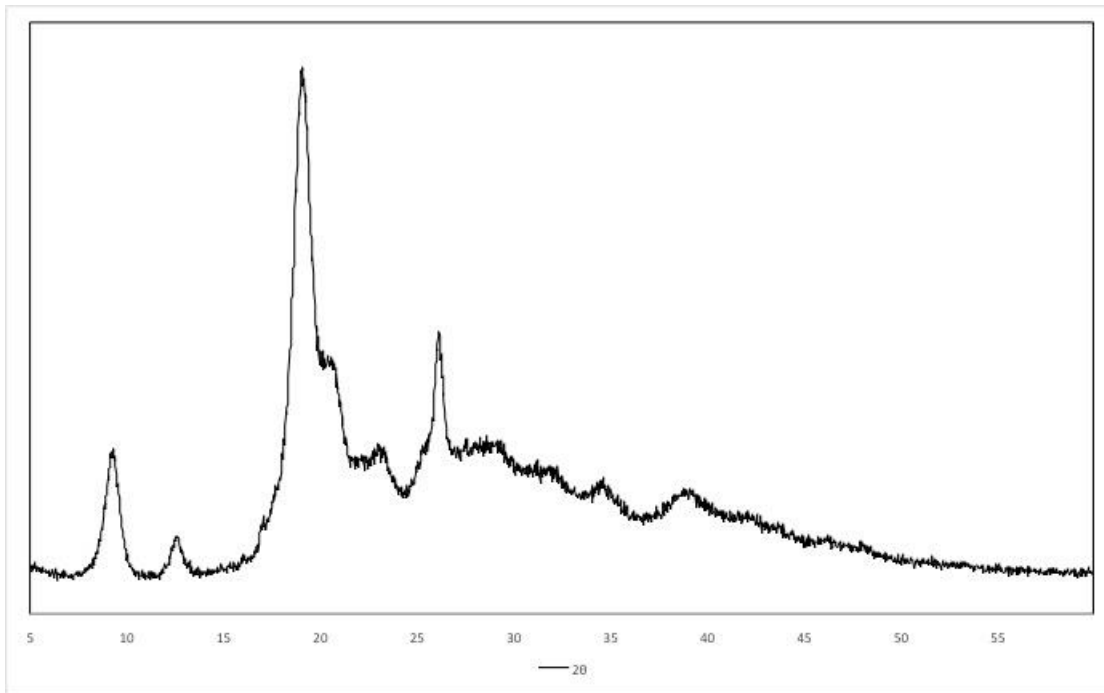
Los porcentajes de carbono y nitrógeno obtenidos por análisis elemental son compatibles con la fórmula molecular de la quitina y que coinciden con los valores descritos en bibliografía (Dutta *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Galed-Ceresuela, 2006). *Análisis elemental*: C, 44,44; O, 42,42 ; H, 6,62; N, 6,52

*Espectroscopía IR*: en el espectro de la Figura 17 se presenta una banda intensa de deformación a 3250 – 3400 cm<sup>-1</sup> correspondiente a -OH asociado (de alcohol); bandas de tensión a 2850 y 2930 cm<sup>-1</sup> (de metilo y/o metileno) y a 1380 cm<sup>-1</sup> de metilo (del grupo acetilo); bandas muy significativas y típicas de amida: - banda I de tensión a 1630 cm<sup>-1</sup> (correspondiente al carbonilo de la amida) - banda II de tensión a 1550 cm<sup>-1</sup> (correspondiente a N-H) y bandas de deformación de -OH a 1050 cm<sup>-1</sup> (de alcohol primario) y a 1100 cm<sup>-1</sup> (alcohol secundario).



**Figura 17** Espectro IR de quitina.

*Difracción de rayos X:* en el espectro de difracción de rayos X (Figura 18) se observan los picos cristalinos característicos de la quitina a  $2\theta = 9,3$  y  $19,2$ . Por la intensidad de los picos se puede asegurar que se trata de una estructura cristalina, libre de proteínas, pigmentos y no presenta contenido de calcio, por estar ausente su pico característico a  $2\theta = 29,4$ .



**Figura 18.** Espectro de difracción de rayos X de quitina.

## 2. Inmovilización de la rhBMP-2

Existen diferentes procedimientos para retener la proteína sobre el soporte quitina, en este trabajo se optó por una unión química mediante adsorción sobre las micropartículas. La proteína se une por fuerzas de van der Waals y por puentes de hidrógeno. En este tipo de inmovilización influyen el pH del medio, la fuerza iónica y la morfología de la superficie. Tiene la ventaja de la preparación sencilla, bajo costo, y que no cambia la especificidad de la biomolécula. Como desventajas podemos decir que tienen unión débil al soporte (afectadas por concentraciones elevadas de sustrato, cambios de pH y de fuerza iónica) y que son poco estables mecánicamente.

La inmovilización altera el comportamiento de las proteínas, generalmente se incrementa la estabilidad conformacional de las mismas, se aumenta la protección frente a proteasas y se evita la agregación intermolecular. Se produce una alteración del microentorno de la proteína debido a su interacción con el soporte. Pueden perder total o parcialmente la actividad por interacciones con el soporte, por impedimento del paso del sustrato al sitio activo, por interacción con grupos cargados del soporte o por cambios conformacionales que den formas inactivas.

En nuestro caso, se obtuvieron porcentajes de retención de la proteína sobre el soporte (micropartículas de quitina, 0,08mm; 200 mg) de  $80,1\pm 13,7$ . Estos resultados se

obtuvieron en colaboración con la Dra. Yamila Mansilla de la Universidad Nacional de Mar del Plata (Argentina) y no se presentan en esta Tesis Doctoral.

### **3. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio. Contacto directo**

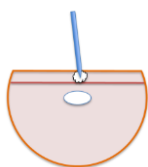
En esta primera experiencia y para ganar habilidad en el manejo de este modelo, se realizó una operación sin sacar al embrión del huevo (*in ovo*), colocando la quitina sobre la membrana amniótica sin atravesarla pero limitando la zona al primer arco branquial (Figura 19). Los resultados del desarrollo y supervivencia quedan registrados en la Tabla 3.



**Figura 19.** Estadio 28 del embrión de pollo y área de la intervención (Imagen de Hamburger and Hamilton, 1951).

**Tabla 3.** Resultados tras utilizar el primer método operatorio para la implantación de quitina/rhBMP-2. Se adjunta una figura para visualizar de forma esquemática el método de operación.

Sujeto	Condición	Estadio Operación	Tiempo incubación	Estadio Esperado	Estadio Recogida	Supervivencia operación	Estado Embrión en la recogida
1	Control quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Sin latido)
2	Control quitina	26	24h	28	28	Si	Vivo
3	Control quitina	26	144h	36	31	Si	Muerto (Sin latido)
4	Control quitina	26	144h	36	26	No	Muerto (Sin latido)
1	BMP-2 y quitina	26	24h	28	27*	Si	Muerto (Sin latido)
2	BMP-2 y quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Edema)
3	BMP-2 y quitina	26	144h	36	34	Si	Muerto (Edema)
4	BMP-2 y quitina	26	144h	36	26	No	Muerto (Sin latido)



Se operaron 8 huevos y tras 24 horas de incubación se extrajeron cuatro de ellos para observar los resultados a corto plazo y la influencia de la manipulación del operador. De estos cuatro embriones, dos murieron a causa de la manipulación, sin desplazamiento de material ni aparente desarrollo. Otro embrión, al que se le colocó quitina/rhBMP-2, presentaba un aspecto de haber sufrido una hemorragia interna, posiblemente debida a una acción excesiva de rhBMP-2, pues las BMPs tienen capacidad de activar también al factor de crecimiento vascular y endotelial  $\alpha$  (VEGF  $\alpha$ ) (Deckers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Fiedler *et al.*, 2002). Esta acción colateral puede provocar un fallo en el desarrollo del sistema vascular.

De los embriones supervivientes, solo uno perteneciente al control de quitina salió adelante, alcanzando un St 30 de desarrollo y observando un desplazamiento de las micropartículas a la parte posterior del cuello.

Los otros cuatro embriones restantes de la operación, continuaron incubándose hasta cumplir siete días. Al término de la incubación, ninguno sobrevivió. Dos de ellos no mostraron desarrollo, prueba de que habían muerto el día de la operación a causa de la

manipulación. Sin embargo los otros dos, uno experimental y otro control, consiguieron desarrollarse hasta estadios próximos a los correspondientes por el tiempo de incubación. Por lo tanto, sobrevivieron a la intervención y su muerte debió de ser próxima a la reapertura de los huevos.

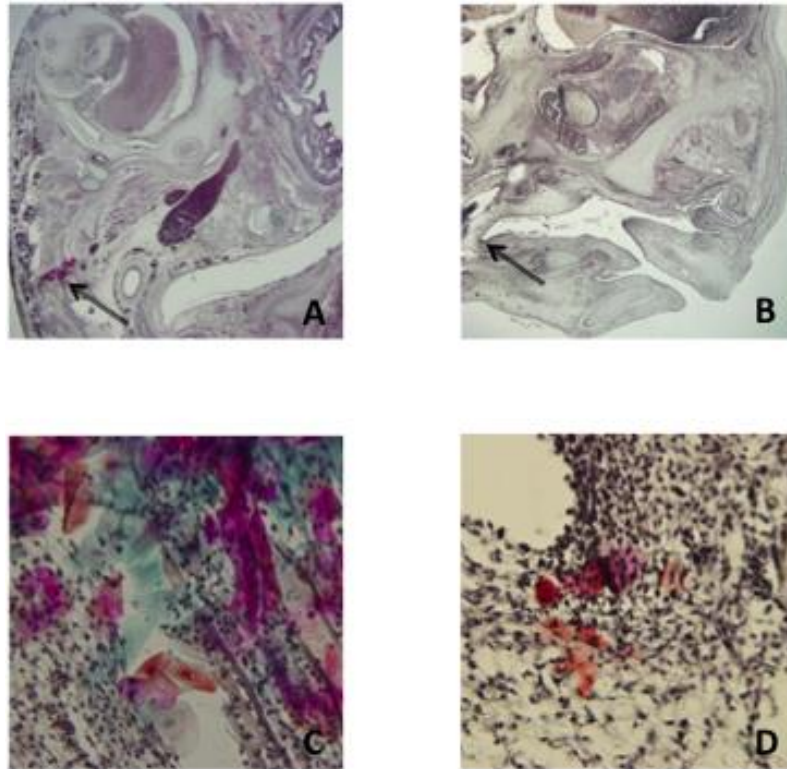
El embrión control (quitina) alcanzó el estadio 31, se encontró también muerto, y las posibles causas se deban a una contaminación por la perforación del film sellador.

El embrión experimental (quitina/rhBMP-2) alcanzó el estadio 34 y mostraba haber sufrido una hemorragia interna masiva que le provocaría la muerte. En el área del cuello presentaba el biomaterial adherido demostrando que estuvo actuando en nuestra zona objetivo. Los posibles motivos de este hallazgo pueden deberse a una sobreexpresión de VEGF  $\alpha$  inducida por la rhBMP-2.

Los motivos que ambos embriones no coincidan con exactitud al término de la recogida de muestras pueden deberse por dos motivos, la diferencia de horas entre sus muertes o la diferencia de velocidad de evolución, estas posibilidades se consideran normales y ya fueron descritas en la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951).

Tras la incubación los embriones se fijaron en PFA al 4% para incluirlos en bloques de parafina y realizar los cortes histológicos. Los cortes se tiñeron con la tinción histológica básica de Tricrómico de Masson.

Los resultados histológicos de esta primera experiencia fueron los siguientes: en el caso del embrión experimental, al que se aplicó quitina con rhBMP-2, se observó cómo el depósito de esa quitina transportadora de proteína, provocó una tinción positiva para colágeno (en verde) (Figura 20). Este resultado demuestra que la rhBMP-2, ha inducido a las células mesenquimales a diferenciarse a fenotipo osteoblástico y a sintetizar matriz osteoide. En el embrión control de quitina, se observa que las micropartículas son totalmente biocompatibles, no provocando respuesta alguna al huésped. En ambas situaciones no se produjeron alteraciones morfológicas ni teratogénicas.



**Figura 20.** Cortes histológicos del embrión experimental x2 en la zona de cabeza y cuello a) corte con magnificación x2 del embrión control b) Las flechas en A y B señalan la localización del material implantado. Los cortes C y D son las magnificaciones x50 del biomaterial al detalle. c) La quitina activada presenta una tinción positiva en verde que indica la expresión de la formación de tejido óseo ectópico. d) La quitina por sí sola no produce ningún tipo de reacción. En ninguno de los dos embriones se detectaron efectos teratogénicos y/o malformaciones.

#### **4. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio. Zona del desarrollo maxilar, primera intervención**

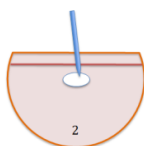
Tras los resultados anteriores, se modificaron los protocolos de operación para conseguir que el biomaterial actuase en el mesénquima del primer arco branquial para ver sus efectos, ya que en el método anterior no se tenía precisión a la hora de posicionar correctamente las micropartículas de quitina.

En este nuevo procedimiento tras la apertura del huevo, ayudándonos con visión magnificada mediante lupa se procedía a operar al embrión. Primero se practicaba una incisión al saco amniótico con instrumentos de tungsteno y posteriormente se practicaba un bolsillo quirúrgico en el primer arco branquial para introducir en él el biomaterial con capilares de vidrio.

Se crearon cuatro grupos en este experimento: control de apertura in ovo, control de la operación vacío, control con quitina y grupo experimental con quitina con rhBMP-2. Se recuperaron los embriones tras 24 horas (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados del segundo método quirúrgico in ovo. 11 embriones operados en total, que tras 24 horas después de la cirugía, sobrevivieron dos, uno del grupo control de operación y el segundo, perteneciente al grupo control de la quitina.

Sujeto	Condición	Estadio Operación	Tiempo incubación	Estadio Esperado	Estadio Recogida	Supervivencia operación	Estado Embrión en la recogida
1	Control apertura in ovo	26	24h	28	28*	Si	Vivo
2	Control apertura in ovo	26	24h	28	26	No	Muerto (Sin latido)
3	Control apertura in ovo	26	24h	28	28	Si	Vivo
4	Control apertura in ovo	26	24h	28	26	No	Muerto (Contaminación)
1	Control operación	26	24h	28	26	No	Muerto (Sin latido)
2	Control operación	26	24h	28	29	Si	Vivo
3	Control operación	26	24h	28	26	No	Muerto (Sin latido)
1	Control quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Sin latido)
2	Control quitina	26	24h	28	28*	Si	Vivo
1	BMP-2 y quitina	26	24h	28	26*	Si	Muerto (Sin latido)
2	BMP-2 y quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Sin latido)



Observamos que este método no mejora la supervivencia (Tabla 6). Aunque hubo un porcentaje similar de embriones desarrollados tras la operación, tan sólo se consiguió que dos embriones se encontraran vivos (presencia de latido cardíaco) tras 24 horas después de la cirugía.

Otra conclusión a la que se alcanzó es la dificultad del método por la facilidad de rasgar los vasos sanguíneos que rodean al embrión, reduciendo su supervivencia.

## 5. Tratamiento de los embriones con los materiales de estudio. Zona del desarrollo maxilar, segunda intervención

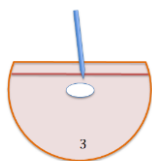
El método anterior fue cruento y por ese motivo modificamos el anterior protocolo aplicando una única incisión a la membrana amniótica para poder depositar la quitina activada o no, posándose sobre el mesénquima del embrión, buscando reducir al mínimo las hemorragias.

Se crearon un grupo control quitina y otro experimental de quitina/rhBMP-2, con tres embriones cada uno. Tras la intervención, se dejaron incubar cuatro días.

El resultado (Tabla 5), fue que no se encontraron supervivientes en la recogida de muestras. Sólo dos de ellos, un control y otro experimental, llegaron a desarrollarse tras la cirugía, mientras que el resto no mostraron signos de evolución del desarrollo. Los motivos de la muerte del embrión experimental fueron los de hemorragia interna (muerte por edema). La supervivencia a la operación siendo un método más conservador no alcanzó resultados mejores a los anteriores procedimientos.

**Tabla 5.** Resultados del tercer método quirúrgico *in ovo*.

Sujeto	Condición	Estadio Operación	Tiempo incubación	Estadio Esperado	Estadio Recogida	Supervivencia operación	Estado Embrión en la recogida
1	Control quitina	28	96h	35	28*	Si	Muerto (Contaminación)
2	Control quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Contaminación)
3	Control quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Sin latido)
1	BMP-2 y quitina	28	96h	35	31	Si	Muerto (Edema)
2	BMP-2 y quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Contaminación)
3	BMP-2 y quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Sin latido)



Observando los porcentajes de supervivencia a la operación, se ha observado que los intentos de mejorar la administración de la proteína para conseguir un contacto íntimo con el mesénquima no son ideales (Tabla 6).

**Tabla 6.** Supervivencia a los tres métodos operatorios, presentando el dato en porcentaje y mostrando el número de embriones totales.

% Supervivencia a la operación		
Operación 1	75%	6/8
Operación 2	71,4%	5/7
Operación 3	33,3%	2/6

También observamos que la dosificación de la acción de la rhBMP-2 en un sistema inmaduro tiene un equilibrio muy delicado y un desajuste en el momento o posición de la colocación puede provocar la muerte por hemorragias internas o edema, debido a que la rhBMP-2 además de inducir la formación de hueso ectópico también provoca la expresión del factor de crecimiento endotelial alfa (Tabla 7). (Deckers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Fiedler *et al.*, 2002).

**Tabla 7.** Porcentaje de muertes por hemorragia interna dentro de los grupos tratados con BMP-2 y quitina.

% Muertes por edema asociadas a BMP-2		
Operación 1	50%	2/4
Operación 2	0%	0/2
Operación 3	33,3%	1/3

Con estos resultados, decidimos modificar radicalmente el sistema de operación. Gracias a la capacidad de poder incubar a los embriones de pollo fuera de la cáscara y mejorar la manipulación y observación, desarrollamos el método de cultivo fuera del huevo o *ex ovo*.

## 6. Cultivos *ex ovo*.

Este experimento se realizó empleando un nuevo diseño para las cámaras de cultivo utilizadas para cultivar a los embriones. En este diseño, se incluye una cámara de cristal con un filtro de gases acoplado apto para cultivos celulares (ver Material y Métodos para más detalle). Se operaron 25 huevos y a 72 horas de incubación.

Para reducir la manipulación se añadió únicamente la rhBMP-2 (1 µg/µl) disuelta en ácido acético por el método de la ducha, con diferentes volúmenes (10-20 µl), con objeto de encontrar una cantidad óptima para ejercer su acción en un organismo en desarrollo.

Los resultados totales respecto a supervivencia fueron mejores a los operados por el método *in ovo*, reflejado en las tablas 8, 9 y 10.

Primero se operaron nueve controles *ex ovo* para evaluar la tasa de supervivencia y la contaminación presente en las nuevas cámaras de cultivo. Dos de estos controles fueron en cámaras sin filtro, emulando la experiencia de los experimentos *in ovo*. En este grupo, solo dos murieron, siendo uno sin filtro y el otro con él. Ninguno de los sujetos presenta signos de contaminación.

El segundo grupo control, se le añadió una ducha de ácido acético de 20µl, para testar la respuesta a la manipulación de los embriones. Ocho sujetos en total y dos de ellos en cámara sin filtro, de los cuales ninguno murió o se contaminó.

El tercer grupo fue un ensayo con la aplicación de la rhBMP-2 por el método de la ducha. Se dividieron en dos grupos de cuatro embriones con dos dosis diferentes: 10µl y 20µl de rhBMP-2. Sólo se produjo una muerte en cada grupo a dosis diferentes.

**Tabla 8.** Resultados de la prueba del nuevo diseño de la cámara de cultivo, parte I.

Sujeto	Condición	Estadío de operation	Estadío hipotético	Estadío en la recogida	Estado de el embrión en la recogida
1	Control ex ovo	16	26	25	vivo
2	Control ex ovo	16	26	26	vivo
3	Control ex ovo	16	26	25	vivo
4	Control ex ovo	18	28	26	vivo
5	Control ex ovo	18	28	26	vivo
6	Control ác acético 20 µl	16	26	23	vivo, torcido
7	Control ác acético 20 µl	18	28	28	vivo
8	Control ác acético 20 µl	16	26	20	vivo, torcido

**Tabla 9.** Resultados de la prueba del nuevo diseño de la cámara de cultivo, parte II.

Sujeto	Condición	Estadío de operation	Estadío hipotético	Estadío en la recogida	Estado de el embrión en la recogida
9	BMP-2 10 $\mu$ l	16	26	25	vivo
10	BMP-2 10 $\mu$ l	16	26	25	viv
11	BMP-2 10 $\mu$ l	18	28	27	muerto
12	BMP-2 10 $\mu$ l	16	26	25	vivo
13	BMP-2 20 $\mu$ l	16	26	20	muerto
14	BMP-2 20 $\mu$ l	16	26	23	vivo, torcido
15	BMP-2 20 $\mu$ l	16	26	26	vivo
16	BMP-2 20 $\mu$ l	16	26	26	vivo

**Tabla 10.** Resultados de la prueba del nuevo diseño de la cámara de cultivo, parte III.

Sujeto	Condición	Estadío de operation	Estadío hipotético	Estadío en la recogida	Estado de el embrión en la recogida
17	Control ex ovo	18	28	28	vivo
18	Control ex ovo	17-18	27-28	27	muerto
19	Control ex ovo sin filtro	18	28	28	vivo
20	Control ex ovo sin filtro	18	28	26	muerto
21	Control ác acético 20 $\mu$ l	17	27	25	vivo, torcido
22	Control ác acético 20 $\mu$ l	16	26	26	vivo
23	Control ác acético 20 $\mu$ sin filtro	19	29	29	vivo, torcido
24	Control ác acético 20 $\mu$ l sin filtro	16-17	26-27	26	vivo
25	Control ác acético 20 $\mu$ l	16-17	26-27	26	vivo

De esta manera, las tasas de supervivencia finales con el método de cultivo *ex ovo* fueron las siguientes:

-100% sin contaminación

-85,7% de supervivencia de las cámaras con filtro

-75% de supervivencia sin filtro

-75% de supervivencia tras la aplicación de la rhBMP-2

Así, se observó que el uso de este método de cultivo *ex ovo* diseñado en esta Tesis Doctoral, consigue dos objetivos: en primer lugar, anular la contaminación del cultivo; y en segundo, mejorar la supervivencia del embrión al tratamiento. Por otro lado, las tasas de muerte asociada a la aplicación de rhBMP-2 indicaron que ha disminuido la acción dañina de la proteína administrada al cultivo. No se observó un fallo grave en el desarrollo del sistema cardiovascular, a diferencia de las otras aproximaciones experimentales anteriormente descritas. Además, dada la falta de especificidad en la administración (método de la ducha), tampoco se observaron signos de diferenciación ósea provocados por la rhBMP-2.

Finalmente, se considera que los resultados relativos a los efectos de la quitina/rhBMP-2 demuestran como el vehículo es capaz de administrar la proteína y afectar al desarrollo *in ovo* de la estructura ósea embrionaria (Figura 20). La proteína exógena aceleró la diferenciación celular y motivó la aparición de tejido óseo en el mesénquima embrionario. Sin embargo, el equilibrio global presente en el embrión puede verse alterado ante este estímulo externo, provocando por su acción inespecífica muertes por edema (Tabla 7). Esta pérdida de sujetos experimentales se suma a la ya existente debida al método quirúrgico o a la contaminación del cultivo. Por ello, se consideró que era necesario el desarrollo de un método que garantice la supervivencia en este modelo experimental. Este método de cultivo *ex ovo* aquí desarrollado permitió un acceso fácil al embrión, facilitó la administración de la proteína y aumentó la supervivencia de los organismos en ausencia de contaminaciones.

Debido al éxito en la diferenciación ósea observada tras la administración de quitina/rhBMP-2 en tejido embrionario, decidimos trasladar la experimentación a tejidos óseos plenamente conformados en organismos adultos, en este caso conejos, a los que se les produjo defectos óseos en la calota.

## **7. Regeneración ósea mediante el uso de matrices y transportador activado (quitina/rhBMP-2) en el modelo de calota de conejo**

En trabajos previos realizados por el Grupo de Investigación de Ingeniería de Tejidos relacionado con este modelo animal, se llegó a la conclusión que el tamaño de partícula óptimo para este tipo de cirugía es el empleado en este trabajo, 0,08 mm. La cantidad total de proteína empleada es de 50 µg por muestra.

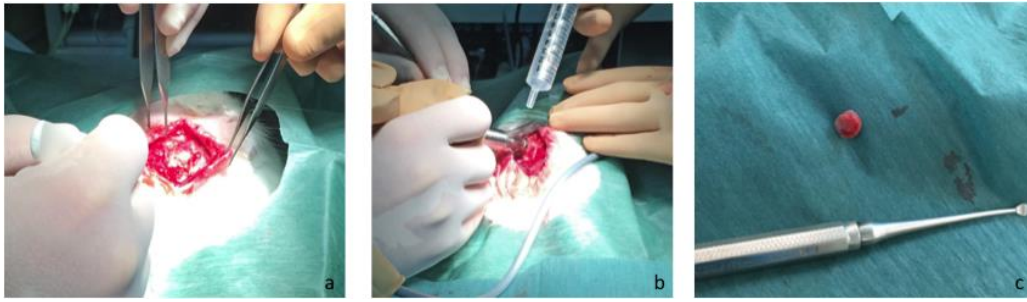
En la Tabla 11 se presenta un resumen del diseño de las operaciones.

**Tabla 11.** Resumen de operaciones, cirugía, tratamiento e histología.

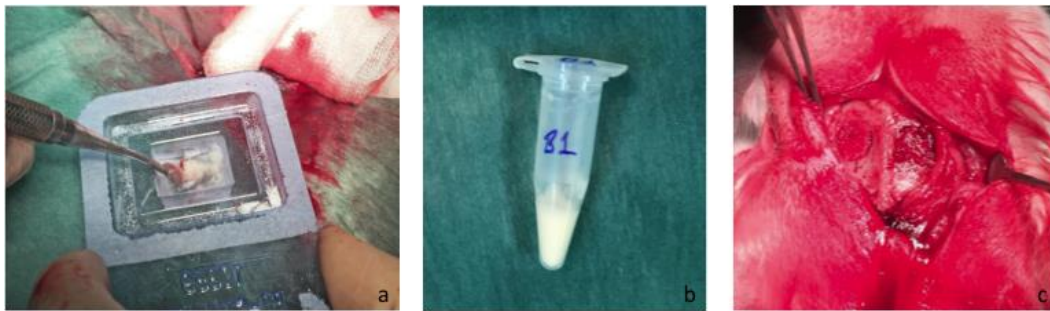
Conejos n: 6	Operación	Contenido		Tinción
L1	Trepanación de 8mm de diámetro a ambos lados del hueso parietal	Izq Bio-oss collagen + BMP2	Drch Bio-oss collagen/ quitina +rhBMP-2	Tricrómico de Masson
L2	Trepanación de 8mm de diámetro a ambos lados del hueso parietal	Izq Bio-oss collagen	Drch Bio-oss collagen/ quitina	Tricrómico de Masson
L3	Trepanación de 8mm de diámetro a ambos lados del hueso parietal	Izq Mucograft +BMP2	Drch Mucograft/ quitina +rhBMP-2	Tricrómico de Masson
L4	Trepanación de 8mm de diámetro a ambos lados del hueso parietal	Izq Mucograft	Drch Mucograft/ quitina	Tricrómico de Masson
L5	Trepanación de 8mm de diámetro a ambos lados del hueso parietal	Izq Cerabone/ quitina	Drch Cerabone/ quitina +rhBMP-2	Tricrómico de Masson
L6	Trepanación de 8mm de diámetro a ambos lados del hueso parietal	Izq Control vacío	Drch Control vacío	Tricrómico de Masson

La intervención quirúrgica fue la misma para todos los sujetos, trepanación de 8 mm de diámetro a ambos lados del hueso parietal. Se realizó una incisión vertical de unos 20mm, a la altura de la sutura sagital en dos planos, reflejando dermis y periostio. Una vez expuesta la calota, se crean defectos circulares en ambos parietales a cada lado de la sutura media, a baja velocidad con fresa trefina de 8 mm de diámetro interno, bajo irrigación copiosa con solución salina al 0.9%. La osteotomía se realiza con precaución de mantener intacta la duramadre y con ayuda de un elevador se remueve completamente la tapa de calota. Cada animal recibió dos tratamientos diferentes, un control y un experimental.

Tras la colocación del biomaterial y su comprobación que rellenaba completamente el defecto, se procedió a suturar la incisión por planos, para que el periostio ayudara a contener el injerto. El plano periostico y dérmico se cerró con sutura reabsorbible 4/0 (Vicryl 4.0 Ethicon Inc/ Johnson&Johnson). Los animales se medicaron con inyección intramuscular de benzyl penicilina (40,000 IU) y 5 mg/Kg de tramadol después del procedimiento. Se realizó un seguimiento de las heridas y se descartó cualquier proceso infeccioso e inflamatorio intracraneal adverso. En la secuencia de las Figuras 21, 22, 23, 24 y 25, se resume todo el procedimiento quirúrgico y manejo de cada uno de los materiales empleados.



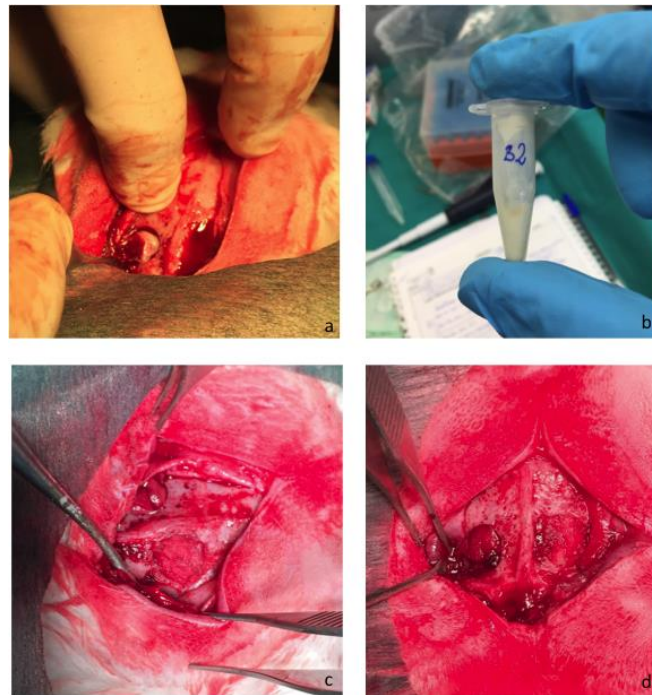
**Figura 21.** Procedimiento quirúrgico de la osteotomía. a) Incisión. b) Osteotomía con trefina y pieza de mano. c) Sección ósea retirada de la calota.



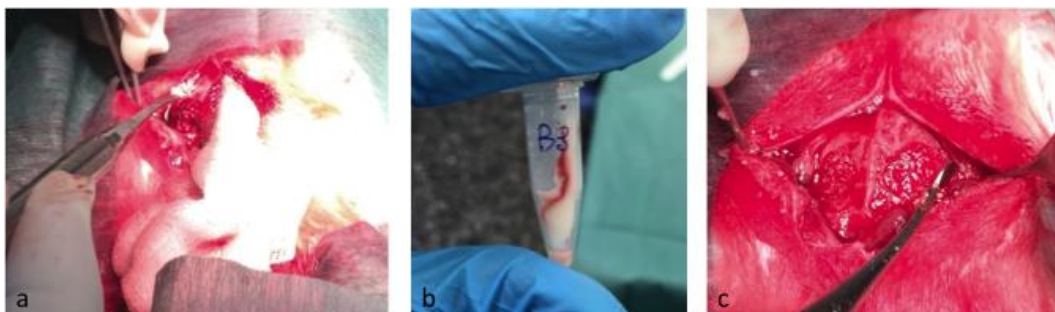
**Figura 22.** En la primera intervención, dentro del Grupo de Bio-oss Collagen, a) Hidratamos el material con rhBMP-2 en disolución (50µg totales). b) Las micropartículas de quitina activadas con rhBMP2, se añaden al biomaterial para que queden mezclados y formar un complejo. c) Conejo operado con una buena adaptación en el defecto.



**Figura 23.** Grupo Bio-oss Collagen. a) Este biomaterial se puede adaptar su forma para que coincida con la del defecto creado. b) Al hidratarse con la sangre del sujeto, adquiere una consistencia maleable y permite una adaptación excelente. c) La mezcla con quitina por sí sola permite manejar clínicamente de forma excelente y sellar completamente el defecto sin dejar espacios muertos.



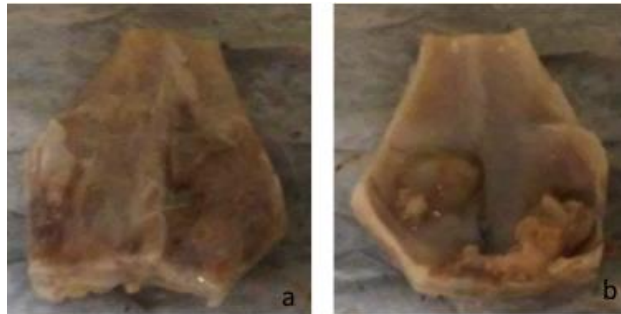
**Figura 24.** Operación del conejo del grupo Mucograft. a) Se observa la dificultad de introducir el material y que se quede estable dentro del defecto. b) Pellet con rhBMP-2 el cual se añade a la otra matriz de colágeno en el lado derecho experimental. c) Aspecto de ambos defectos rellenos, el lado derecho, gracias a las micropartículas de quitina activadas, ha sido mucho más sencillo de manipular y contener dentro del defecto. d) Defecto relleno con Mucograft en el lado control, el cual también resultó de difícil manipulación para mantenerlo dentro del defecto. En el lado experimental con las partículas de quitina se mejora la retención de la matriz en el defecto.



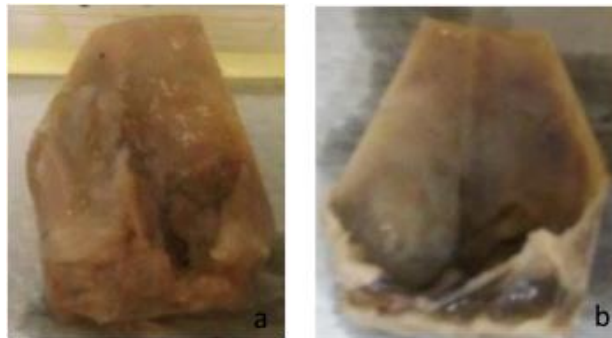
**Figura 25.** Grupo Cerabone. a) el xenoinjerto bovino mezclado con quitina hace que las partículas sean un poco más incómodas de transportar hasta el defecto. b) Para una buena homogenización, mezclamos el xenoinjerto dentro del pellet con la quitina/rhBMP-2. c) El relleno de los defectos se realizó de forma satisfactoria.

Tras dos meses de cicatrización, se sacrificaron a los animales y se obtuvieron las muestras. El aspecto de los tejidos en general no presentaba infección ni alteraciones que fuesen apreciables macroscópicamente.

En la Figura 26 y 27, se muestran los resultados para Mucograft activado con quitina/rhBMP-2. Aún mostrando el relleno del defecto, al tacto el tejido formado no presenta una dureza compatible con el tejido óseo.

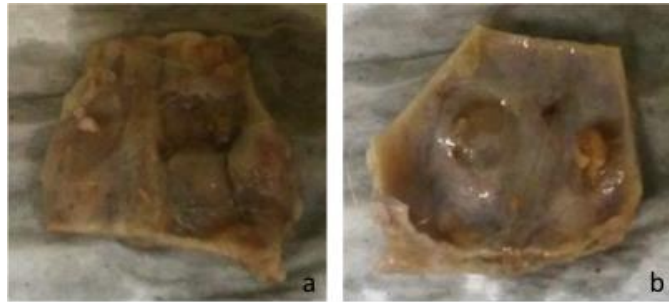


**Figura 26.** Muestra obtenida tras el sacrificio del conejo al que se le aplicó Mucograft/rhBMP2 en el lado izq y Drch Mucograft/rhBMP2/quitina .a) Cara externa de la calota. b) Cara interna.

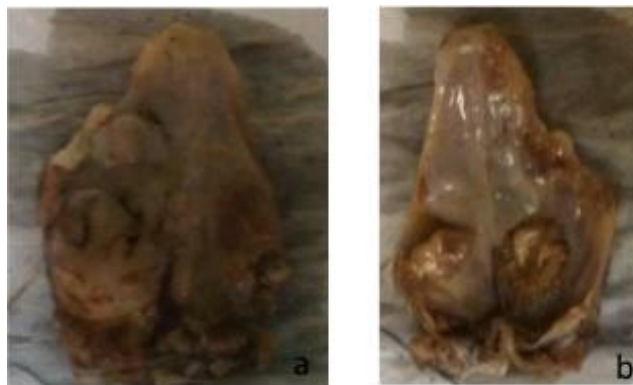


**Figura 27.** Calota donde se aplicó Mucograft en el lado izq y Drch Mucograft/quitina. a) Cara externa de la calota. b) Cara interna.

En el caso de Bio-Oss Collagen, (Figuras 28 y 29) las muestras presentaban un aspecto de relleno mucho más sólido y al tacto la dureza nos hacía suponer una adecuada regeneración.

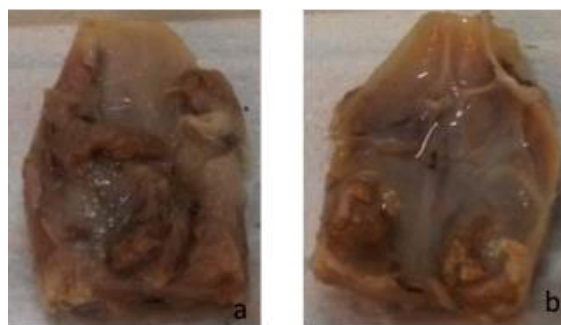


**Figura 28.** Resultado tras el sacrificio del conejo al que se le aplicó Bio-oss collagen/rhBMP2 en el lado izq y Drch Bio-oss collagen /rhBMP2/quitina .a) Cara externa de la calota. b) Cara interna.



**Figura 29.** Resultado tras el sacrificio del conejo al que se le aplicó Bio-oss collagen en el lado izq y Drch Bio-oss collagen /quitina .a) Cara externa de la calota. b) Cara interna.

La Figura 30 corresponde al conejo regenerado con con Cerabone, con un aspecto similar a las muestras donde se empleó Bio-Oss.

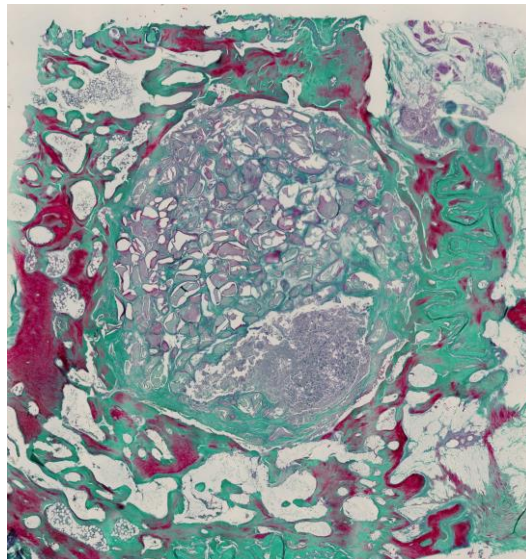


**Figura 30.** Resultado tras el sacrificio del conejo al que se le aplicó Cerabone/quitina en el lado izq y Drch Cerabone/rhBMP2/quitina .a) Cara externa de la calota. b) Cara interna.

Las muestras fueron descalcificadas, incluidas en bloques de parafina para poder ser procesadas mediante cortes histológicos y teñidas con tinción de Tricrómico de Masson.

La tinción Tricrómica de Masson, tiene la característica de teñir las fibras de colágeno tipo I. Por ello lo empleamos como tinción histológica ideal al teñir el componente orgánico del tejido óseo, cuyo aspecto es de haces o fibras gruesas para ofrecer resistencia mecánica. Las fibras reticulares se tiñen con menor intensidad y nos ayuda a diferenciar el tejido conectivo. Otras estructuras se tiñen en otros tonos como la queratina, los glóbulos rojos y el tejido muscular, en color rojo y los núcleos celulares en color lila o marrón.

La diferenciación entre el tejido óseo lamelar secundario y el tejido óseo reticular primario se basa en la disposición de las fibras de colágeno tipo I. Si se encuentran entrelazadas sin orden, se trata de un tejido óseo primario que estará pendiente de la remodelación a un tejido óseo secundario con disposición en haces o láminas (Figura 31).



**Figura 31.** Muestra de calota de conejo. El tejido más organizado se encuentra normalmente en la periferia del defecto y el desorganizado, en el interior.

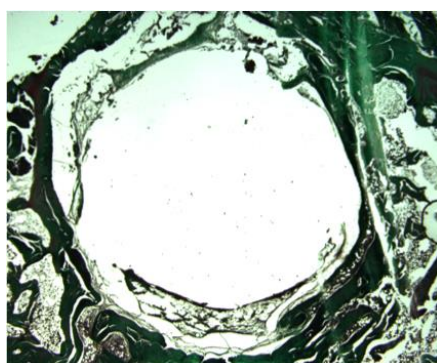
## 7.1. Histomorfometría

De este modo, las muestras experimentales sometidas a cortes histológicos se fotografiaron y evaluaron mediante técnicas histomorfométricas. Con el análisis histomorfométrico, se obtuvo la media y desviación estándar en los porcentajes de formación de los diferentes tejidos hallados dentro de los defectos regenerados, a continuación, describiremos los resultados obtenidos con cada material empleado.

### Control vacío

Uno de los animales sirvió de control del defecto sin colocación de material de regeneración, también conocido como control vacío. Gracias a este control podemos comparar el resultado de producir el mismo defecto óseo en la calota y las consecuencias de no colocar ningún tipo de biomaterial, registrando la capacidad del organismo para resolver la agresión con los mecanismos de la osificación.

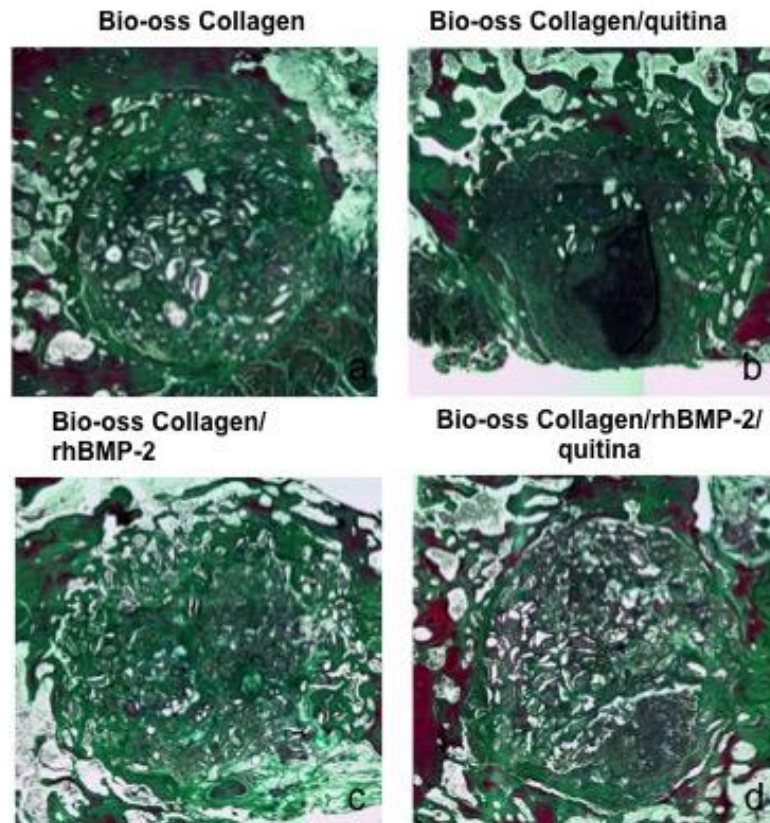
Tras ocho semanas, la imagen del corte histológico en un defecto de ocho milímetros de diámetro, presenta el defecto prácticamente sin contenido de tejido óseo en su interior, exceptuando por la periferia de la herida levemente (Figura 32).



**Figura 32.** Histología del defecto quirúrgico sin colocación de biomateriales.

## 7.2. Bio-oss Collagen

Dos de los seis conejos sometidos a la intervención por trepanación de los parietales, fueron tratados con el biomaterial comercial Bio-oss Collagen (Geistlich, Suiza) con tres modificaciones (sólo quitina, sólo rhBMP-2, o quitina activada con rhBMP-2), dando como resultado cuatro muestras con diferentes condiciones (Figura 33).



**Figura 33.** a) El Bio-Oss Collagen empleado como matriz para la regeneración ósea de calota. b) Bio-oss Collagen con quitina. c) Bio-oss Collagen con rhBMP-2. d) Bio-oss Collagen en combinación con quitina/rhBMP-2.

### 7.2.1. Descripción histológica

#### Bio-oss Collagen

En el caso de la histología de Bio-oss Collagen (Figura 33a) para servir de control del biomaterial, observamos un aspecto de estructura ósea bien organizada y de un relleno del defecto casi completo. El relleno está compuesto por tejido óseo lamelar, reticular y restos de xenoinjerto bovino procedente del Bio-oss Collagen. El xenoinjerto se diferencia por tener un aspecto de fragmentos óseos dispersos con osteocitos vacíos y por encontrarse dentro de áreas sin tejido, producidas por el procesamiento de las muestras para el corte histológico. El tejido que envuelve a los fragmentos de xenoinjerto, es el tejido óseo con diferentes grados de madurez, mayor en la periferia del defecto creado y con menor grado de madurez al aproximarnos al centro del defecto.

#### Bio-oss Collagen/quitina

La imagen histológica del Bio-oss Collagen añadiéndole micropartículas de quitina (Figura 33b) para comprobar el comportamiento de ambos materiales juntos en la regeneración, muestra un relleno compacto, pero aparece un tejido fibroso en el centro que no es compatible con el tejido óseo. Mucha menor cantidad de tejido óseo formado y de restos de xenoinjerto aparece en la imagen.

#### **Bio-oss Collagen/rhBMP-2**

La rhBMP-2 embebida directamente en el biomaterial para que actuase de transportador de la proteína (Figura 33c), ha motivado un crecimiento óseo desde el centro del defecto. La presencia de restos de xenoinjerto es menor respecto a otras muestras. El relleno del defecto es casi completo.

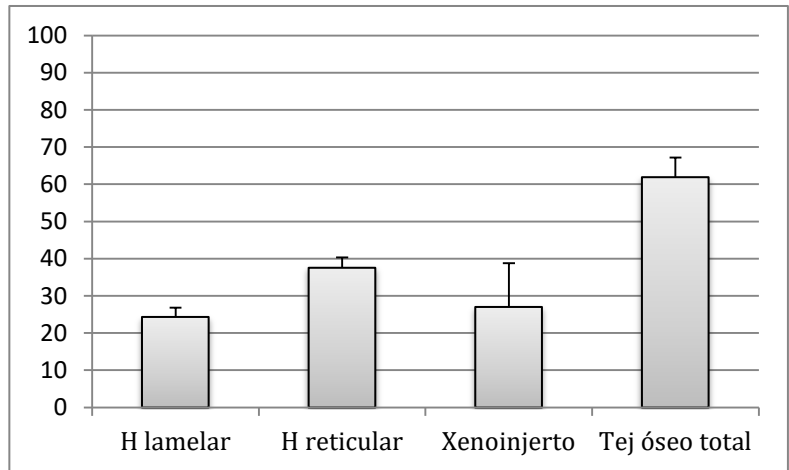
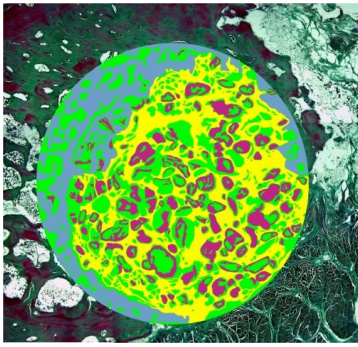
#### **Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2**

Al combinar el Bio-oss Collagen con micro partículas de quitina activada con rhBMP-2 (Figura 33d), obtenemos un buen relleno del defecto , donde los bordes del defecto se difuminan con los de la regeneración. El aspecto del tejido óseo presente tiene un grado de madurez homogéneo tanto en el centro del defecto como en los límites del mismo. La presencia de restos de xenoinjertos óseos es equiparable a las histologías de Bio-oss Collagen y observamos restos de micropartículas de quitina en un área del defecto que se diferencian del xenoinjerto bovino. El aspecto es de un relleno casi completo del defecto óseo.

### **7.2.2. Histomorfometria Bio-oss Collagen**

Los resultados de las mediciones con la técnica de histomorfometría para cada una de las muestras, nos permiten conocer un porcentaje de relleno del defecto de media con su desviación estándar. A continuación describimos las muestras según este procedimiento.

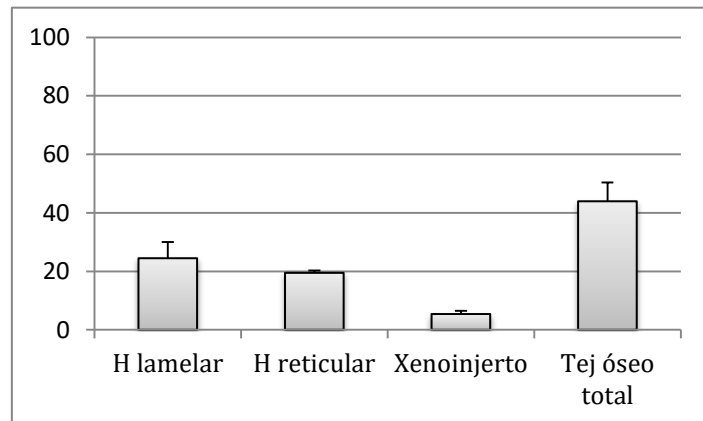
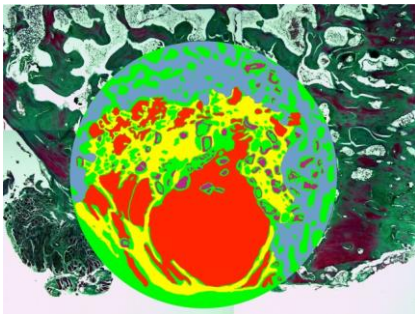
#### **Bio-oss collagen**



**Figura 34.** Fotografía de una medición histomorfométrica de un defecto regenerado con Bio-oss Collagen.

En la imagen y su correspondiente gráfica (Figura 34), se aprecia un mayor porcentaje en la formación del hueso reticular respecto al lamelar, indicando que tras 8 semanas existe mayor cantidad de hueso inmaduro en el área central del defecto respecto a la periferia, donde se asienta el tejido madurado.

### Bio-oss collagen/quitina



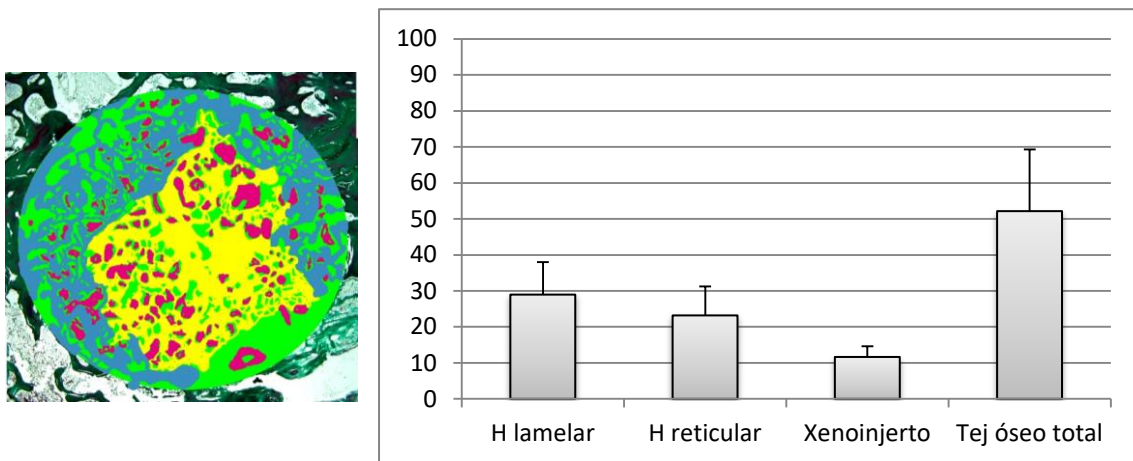
**Figura 35.** Histomorfometría de la regeneración con Bio-oss coll/quitina.

En el caso de añadirle al Bio-oss Collagen con micropartículas de quitina (Figura 35), no hay aparentemente una diferencia entre sus medias en la formación de hueso lamelar y reticular, se repite la imagen de un tejido óseo maduro en la periferia en contacto con los

bordes del defecto y el inmaduro depositado en el interior. La presencia de restos de xenoinjerto bovino es mayor respecto a los otros dos tejidos y a la suma de ambos como tejido óseo total.

Lo que hemos diferenciado es un depósito en la zona central de la regeneración de micropartículas de quitina respecto al xenoinjerto bovino, la media de la presencia de la quitina es del 42,49%.

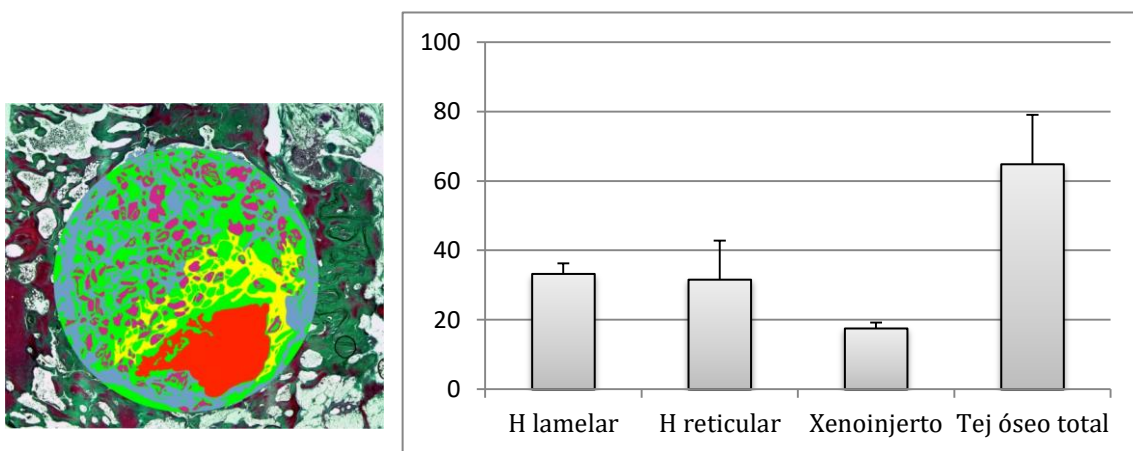
### Bio-oss collagen/rhBMP2



**Figura 36.** Histomorfometría de la regeneración con Bio-oss coll/rhBMP2.

Los resultados obtenidos de usar como matriz portadora de la proteína rhBMP-2 , al Bio-oss Collagen (Figura 36) ha sido una gran presencia de tejido lamelar óseo y reticular con una media superior respecto a los restos de xenoinjerto de las muestras.

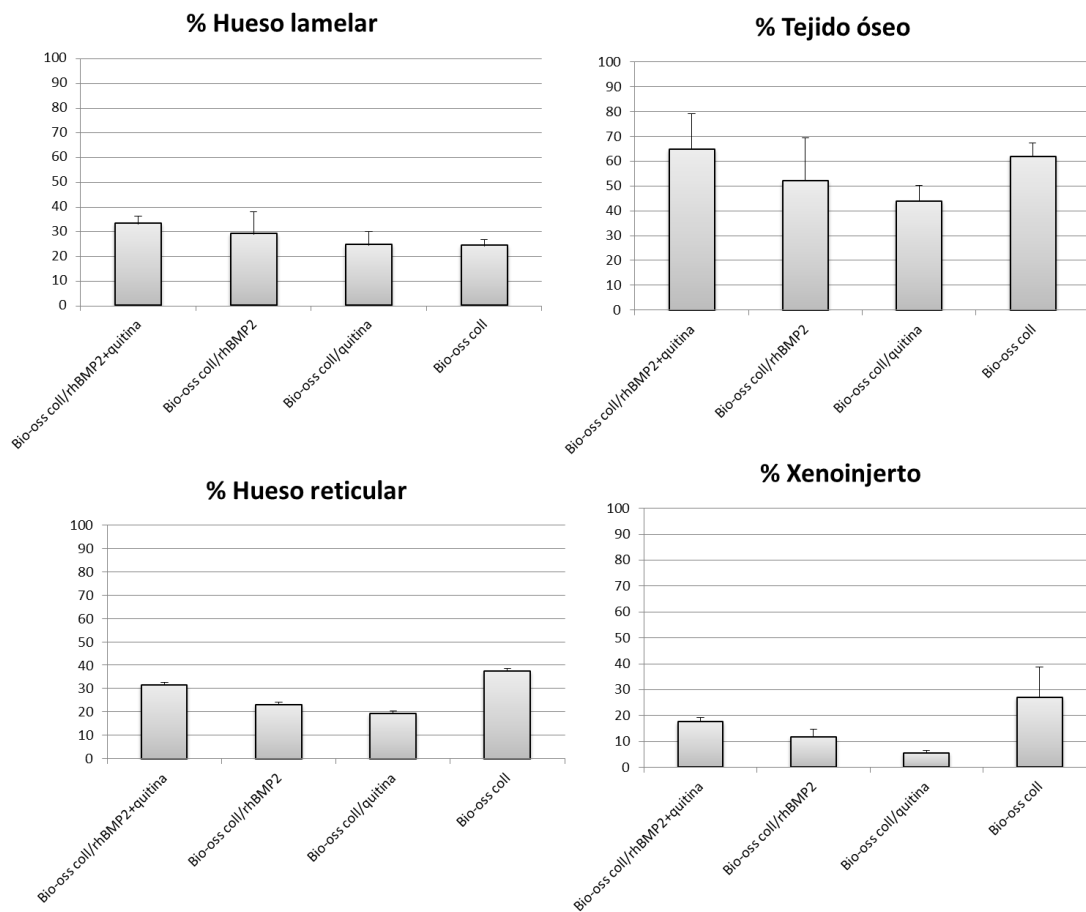
### Bio-oss collagen/quitina+rhBMP2



**Figura 37.** Histomorfometría de la regeneración con Bio-oss coll/quitina+rhBMP2.

Las histologías de las regeneraciones de Bio-oss Collagen combinando con micropartículas de quitina activada con rhBMP-2 (Figura 37) ofrecieron unos buenos resultados de relleno del defecto. Las medias fueron similares respecto a la formación de tejido lamelar y reticular pero sí hubo una mayor cantidad de xenoinjerto dentro de la regeneración. El tejido óseo total formado que rellenó el defecto fue superior al 60%, presentando una gran desviación entre las muestras.

Para facilitar la comparación posterior entre las cuatros muestras que emplearon Bio-oss Collagen, se representan las variables analizadas en la siguiente figura (Figura 38).



**Figura 38.** Tablas con los porcentajes de relleno del defecto de los diferentes tejidos para cada una de las muestras.

### 7.2.3. Comparación de resultados entre muestras

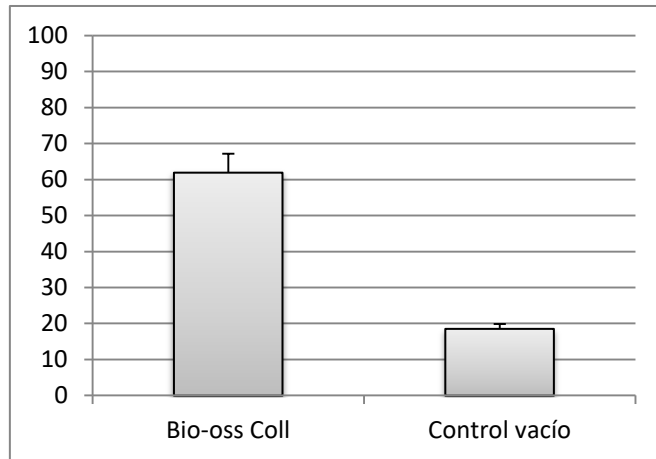
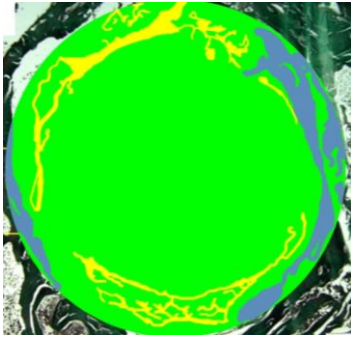
Para poder determinar qué material consiguió mejor resultado en la regeneración los compararemos mediante test de ANOVA para un factor, utilizandola media con su desviación típica.

Así haremos las comparaciones que consideramos más representativas como la diferencia entre el biomaterial comercial sólo respecto al control quirúrgico vacío, donde el organismo tratará de resolver la cobertura del defecto por sus propios mecanismos intrínsecos.

Otro grupo es la comparación del biomaterial contra el mismo con añadido de micropartículas de quitina; el tercero será las diferencias entre el biomaterial solo y su homólogo activado con rhBMP-2; un cuarto grupo consiste en el biomaterial vs biomaterial con quitina activada con rhBMP-2; la comparación entre el control con los experimentales en la presencia de xenoinjerto y por último comparar el biomaterial con rhBMP-2 vs biomaterial con rhBMP-2 y quitina.

#### **Bio-oss Collagen vs Control vacío**

La cantidad de tejido óseo formado dentro del control vacío es inferior al 20% del defecto (Figura 39). Es un resultado significativo respecto al Bio-oss Collagen que superó el 60% ( $F > 7,7$ ) (Figura 40). La falta de un biomaterial que estabilice al coágulo sanguíneo y permita a las osteoblastos tener unos cimientos para sintetizar tejido óseo, ofrece estos resultados para un defecto óseo de 8 mm de diámetro, el cual supera la capacidad del organismo de reparar dicho defecto. Lo que sí se aprecia es una leve formación de tejido óseo en la periferia del defecto, donde los osteoblastos tienen un sustrato para poder iniciar la regeneración pero limitada en el espacio.



**Figura 39.** Porcentaje de tejido óseo. Comparativa entre material control, respecto al control de defecto vacío.

Análisis de varianza de un factor

**RESUMEN**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Bio-oss coll	3	185,8	61,93333333	7,35043333
Control vacío	3	55,65	18,55	0,5421

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2823,17042	1	2823,17042	715,402849	1,1615E-05	7,70864742
Dentro de los grupos	15,7850667	4	3,94626667			
Total	2838,95548	5				

**Figura 40.** Análisis de la varianza (ANOVA) de la comparación de porcentaje de tejido óseo formado en la regeneración empleando Bio-Oss Collagen vs Control vacío.

**Bio-oss Collagen vs Bio-oss Collagen con quitina**

Existen diferencias estadísticamente significativas entre la formación de tejido óseo entre ambos grupos (Figura 41) con una  $F > 7,7$ . La mayor formación de hueso reticular de media supuso la mayor diferencia entre las muestras (Figura 42). No hemos observado efecto patológico en la inclusión de la quitina pero en vista de los resultados, parece no favorecer una mayor cantidad de hueso reticular a 8 semanas de cicatrización.

Análisis de varianza de un factor

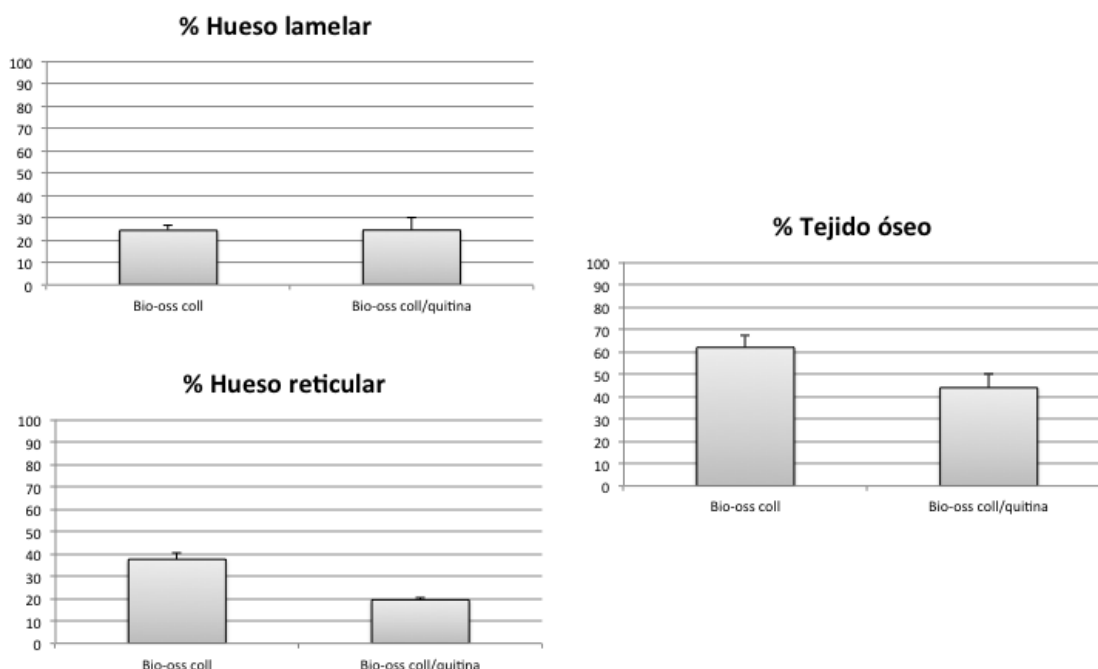
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Bio-oss coll	3	185,8	61,9333333	7,35043333
Bio-oss coll/quitina	3	131,79	43,93	39,4261

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	486,180017	1	486,180017	20,7873471	0,01034422	7,70864742
Dentro de los grupos	93,5530667	4	23,3882667			
Total	579,733083	5				

**Figura 41.** Análisis de la varianza (ANOVA) de la comparación de porcentaje de tejido óseo formado en la regeneración empleando Bio-Oss Collagen vs Bio-Oss Collagen con quitina.



**Figura 42.** Gráficas que muestran las diferencias del porcentaje de relleno de los diferentes tejidos en el defecto, comparando Bio-oss Collagen vs Bio-oss Collagen con quitina.

**Bio-oss Collagen vs Bio-oss Collagen/rhBMP-2**

No hubo diferencias significativas en la formación de tejido óseo total en el caso del Bio-oss Collagen/rhBMP-2, respecto al Bio-oss Collagen con una  $F < 7,7$  (Figura 43). Sin embargo sí hubo diferencias significativas en la formación de tejido óseo inmaduro, como si el efecto de aplicación de la rhBMP-2 de forma exógena acelerase la formación de este tejido respecto al material control (Figura 44).

Análisis de varianza de un factor

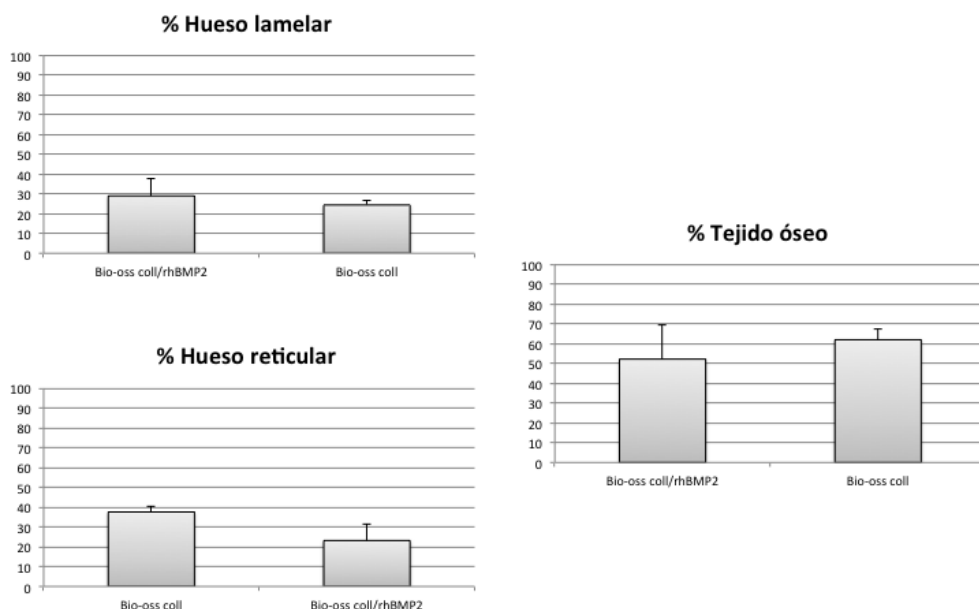
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Bio-oss coll/rhBMP2	3	156,41	52,1366667	284,291733
Bio-oss coll	3	185,8	61,9333333	7,35043333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	143,962017	1	143,962017	0,98725104	0,37665525	7,70864742
Dentro de los grupos	583,284333	4	145,821083			
Total	727,24635	5				

**Figura 43.** Analisis de la varianza (ANOVA) de la comparación de porcentaje de tejido óseo formado en la regeneración empleando Bio-Oss Collagen vs Bio-Oss Collagen con rhBMP-2.



**Figura 44.** Bio-oss Collagen vs Bio-oss Collagen con rhBMP-2.

**Bio-oss Collagen vs Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2**

La diferencia en la formación de hueso lamelar maduro, entre Bio-oss collagen y Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2, fue significativa ( $F > 7,7$ )(Figura 45). Sin embargo, no se encontraron diferencias tanto en la formación de hueso reticular como en el tejido óseo total, aunque en éste último, la media de tejido óseo total fue superior para Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2 (Figura 46).

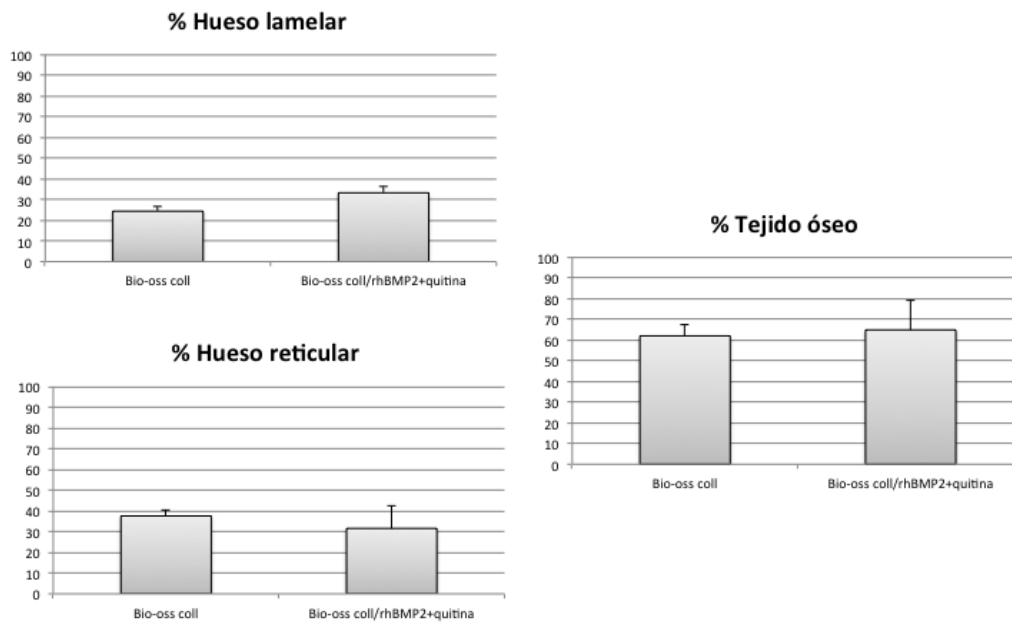
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Bio-oss coll	3	185,8	61,93333333	7,35043333
Bio-oss coll/rhBMP2+quitina	3	194,44	64,81333333	123,629233

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	12,4416	1	12,4416	0,18997758	0,68542609	7,70864742
Dentro de los grupos	261,959333	4	65,4898333			
Total	274,400933	5				

**Figura 45.** Analisis de la varianza (ANOVA) de la comparación de porcentaje de tejido óseo formado en la regeneración empleando Bio-Oss Collagen vs Bio-Oss Collagen con quitina y rhBMP-2.



**Figura 46.** Bio-oss Collagen vs Bio-oss Collagen con quitina y rhBMP-2.

**Bio-oss Collagen/rhBMP-2 vs Bio-oss Collagen/quitina +rhBMP-2**

La presencia de la quitina no produjo diferencias estadísticamente significativas ( $F < 7,7$ ) (Figura 47) en la regeneración de tejido óseo al estar activados ambos materiales con la proteína morfogenética. Sin embargo la media de formación de nuevo tejido óseo fue mayor con Bio-oss Collagen/quitina +rhBMP-2 (Figura 48).

Análisis de varianza de un factor

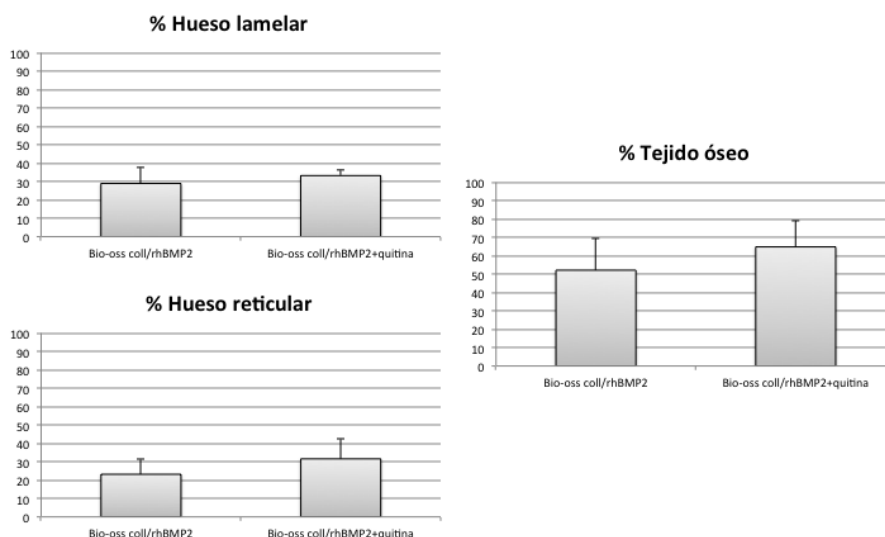
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Bio-oss coll/ rhBMP2	3	156,41	52,1366667	284,291733
Bio-oss coll/ rhBMP2+quitina	3	194,44	64,8133333	123,629233

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	241,046817	1	241,046817	1,18183097	0,33810668	7,70864742
Dentro de los grupos	815,841933	4	203,960483			
Total	1056,88875	5				

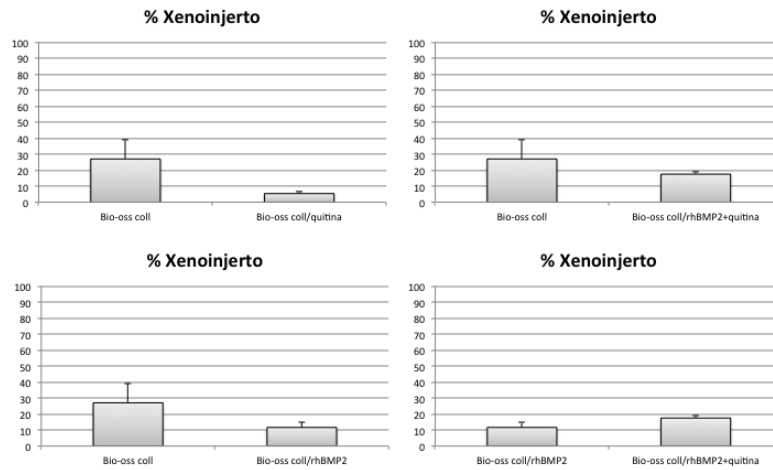
**Figura 47.** ANOVA del tejido óseo formado en la regeneración empleando Bio-Oss Collagen/rhBMP-2 vs Bio-Oss Collagen con quitina y rhBMP-2.



**Figura 48.** Bio-oss Collagen/rhBMP-2 vs Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2.

**% Xenoinjerto en Bio-oss Collagen vs Bio-oss Collagen/experimental**

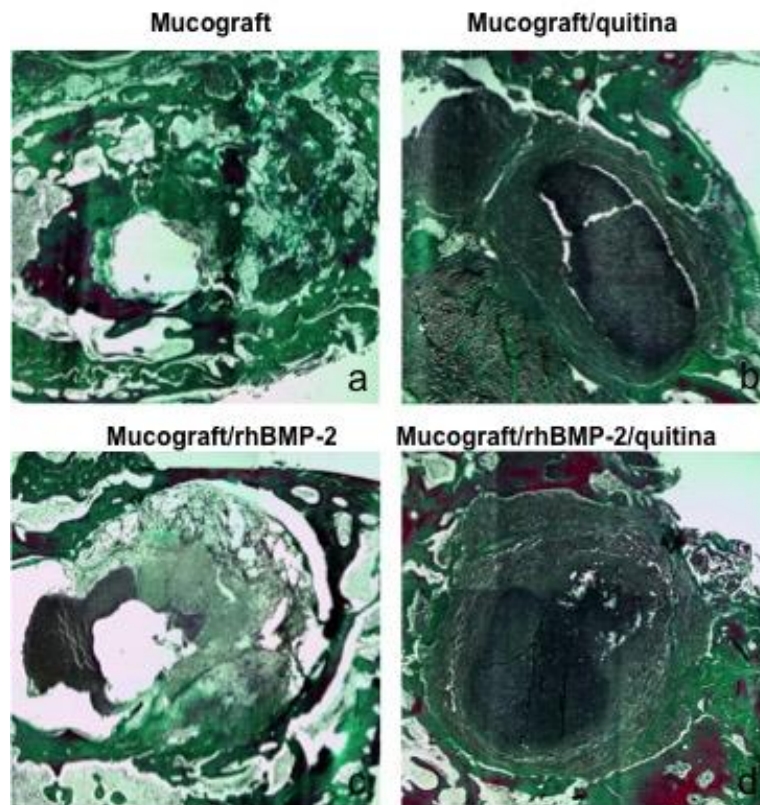
Una observación al analizar las muestras es que existen diferencias en la cantidad de xenoinjerto remanente en la regeneración (Figura 49). Al compararlas respecto al biomaterial control es estadísticamente significativa la menor presencia de material en los grupos experimentales. En el caso de comparar experimentales Bio-oss Collagen/rhBMP-2 vs Bio-oss Collagen/rhBMP-2+quitina, la cantidad de xenoinjerto fue menor en el caso de Bio-oss Collagen/rhBMP-2 de forma significativa ( $F > 7,7$ ).



**Figura 49.** Media y desviación estándar de la cantidad de xenoinjerto presente en las cuatro muestras de Bio-oss collagen

### 7.3. Mucograft

Se trataron dos conejos con la matriz tridimensional de colágeno comercial, Mucograft (Geistlich, Suiza) con las mismas modificaciones que el Bio-oss Collagen. El manejo clínico durante la operación fue más complicado y a la vista de las muestras obtenidas en el sacrificio a los dos meses, macroscópicamente el aspecto del tejido formado no parecía tener las características físicas del tejido óseo. También fueron tratadas las muestras con el mismo procedimiento de descalcificación, inclusión en parafina, corte con el microtomo y teñidas mediante Tricrómico de Masson (Figura 50).



**Figura 50.** a) Mucograft empleado como matriz de colágeno para regeneración de defecto óseos en la calota. b) Mucograft con quitina. c) Mucograft con rhBMP-2. d) Mucograft con quitina+rhBMP-2

### 7.3.1. Descripción histológica

#### **Mucograft**

El procesamiento histológico de las muestras en las que se empleó el Mucograft (Figura 50a), resultó complejo y se obtuvieron muy pocos cortes representativos. De los que fueron aptos para el análisis, podemos observar amplias áreas vacías de tejido, grandes cantidades de xenoinjerto de colágeno procedente de la matriz y muy poco tejido óseo dentro del defecto quirúrgico.

#### **Mucograft/quitina**

La combinación de micropartículas de quitina con Mucograft (Figura 50b), provoca que el defecto no tenga áreas vacías relleno el espacio con una red densa de xenoinjerto de colágeno en el centro del defecto y tejido óseo reticular principalmente en la periferia.

#### **Mucograft/rhBMP-2**

La proteína absorbida en la matriz de colágeno (Figura 50c), dio como resultado grandes ausencias de tejido dentro del defecto, ocupado en gran parte por xenoinjerto de colágeno y hubo una regeneración de tejido óseo tanto lamelar como reticular casi inexistente.

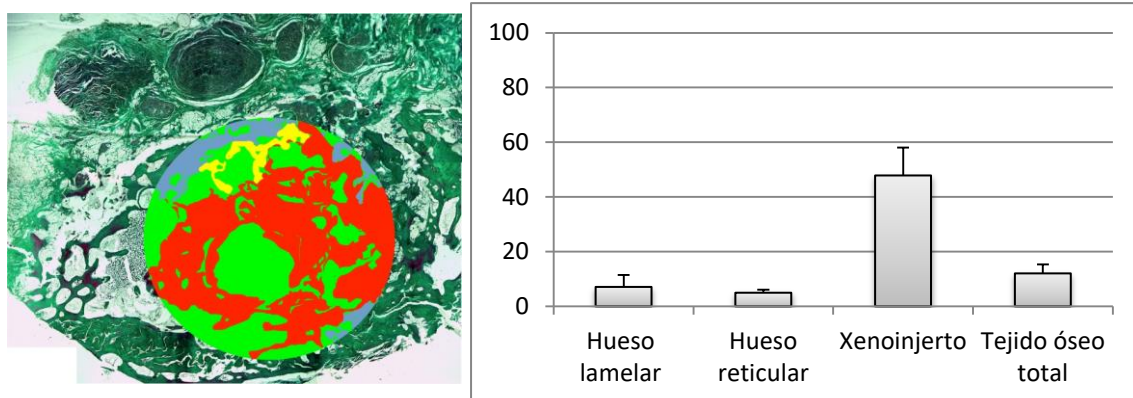
### **Mucograft/quitina+rhBMP-2**

El empleo de Mucograft con quitina activada con rhBMP-2 (Figura 50d), no presentó un relleno de tejido duro dentro del defecto, los cortes histológicos mostraron un tejido denso de colágeno en el centro del defecto y un tejido óseo reticular en la periferia.

### **7.3.2. Histomorfometría Mucograft**

Al aplicar las mediciones por histomorfometría de este grupo de muestras los resultados obtenidos fueron los siguientes.

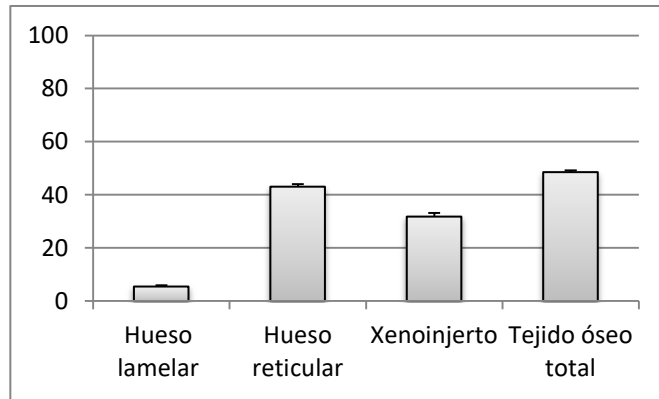
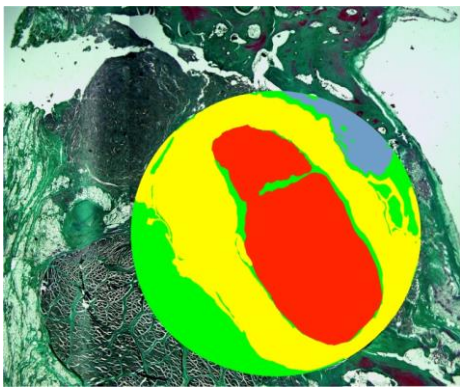
#### **Histomorfometria de Mucograft**



**Figura 51.** Fotografía de una medición histomorfométrica de un defecto regenerado con Mucograft.

En la imagen medida y su correspondiente gráfica (Figura 51), se aprecia una diferencia significativa en la cantidad de xenoinjerto presente en el defecto respecto al resto de tejidos, en un 50% de media. También se aprecia que el tejido óseo apenas rellena más del 10% del defecto, tras 8 semanas no se aprecia mejora de la regeneración del defecto.

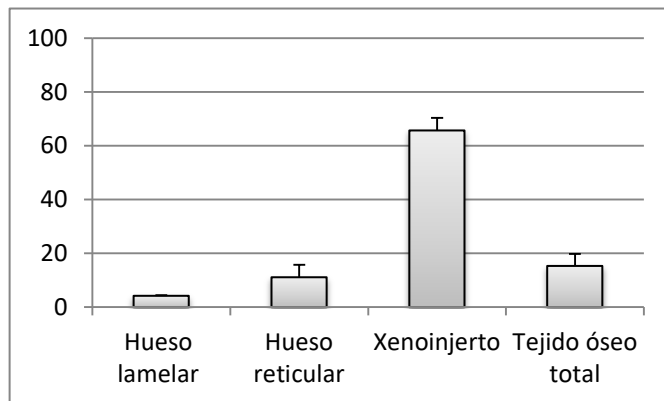
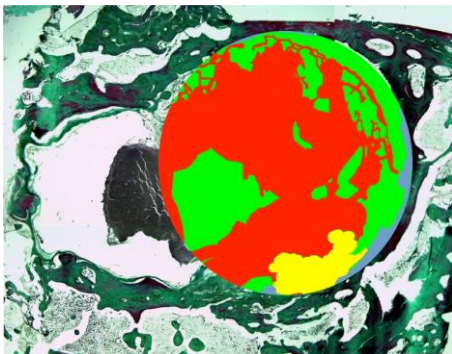
### **Mucograft/quitina**



**Figura 52.** Histomorfométrica de un defecto regenerado con Mucograft con quitina

En el caso de la combinación de Mucograft con micropartículas de quitina (Figura 52), hubo un mayor relleno del defecto con casi un 50% de tejido óseo y menor restos de xenoinjerto de colágeno, superior al 30%.

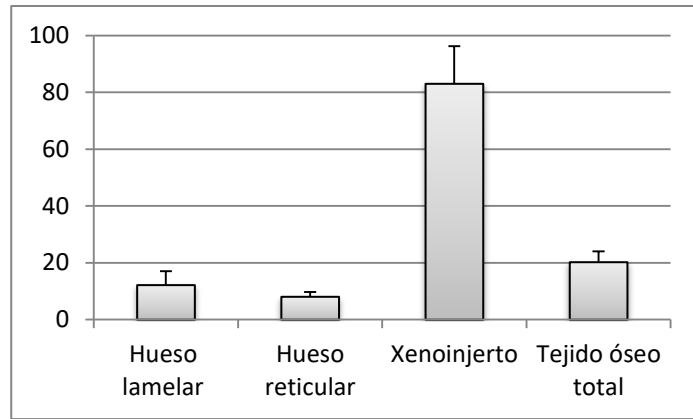
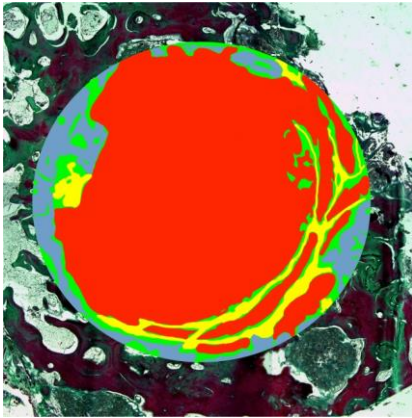
#### Mucograft/rhBMP-2



**Figura 53.** Histomorfométrica de un defecto regenerado con Mucograft con rhBMP-2.

La liberación de la rhBMP-2 del colágeno proveniente de la matriz del Mucograft, (Figura 53) no ayudó a la formación de tejido óseo, apenas rellenando un 15%. Casi un 65% del defecto se encontraba ocupado por xenoinjerto de colágeno.

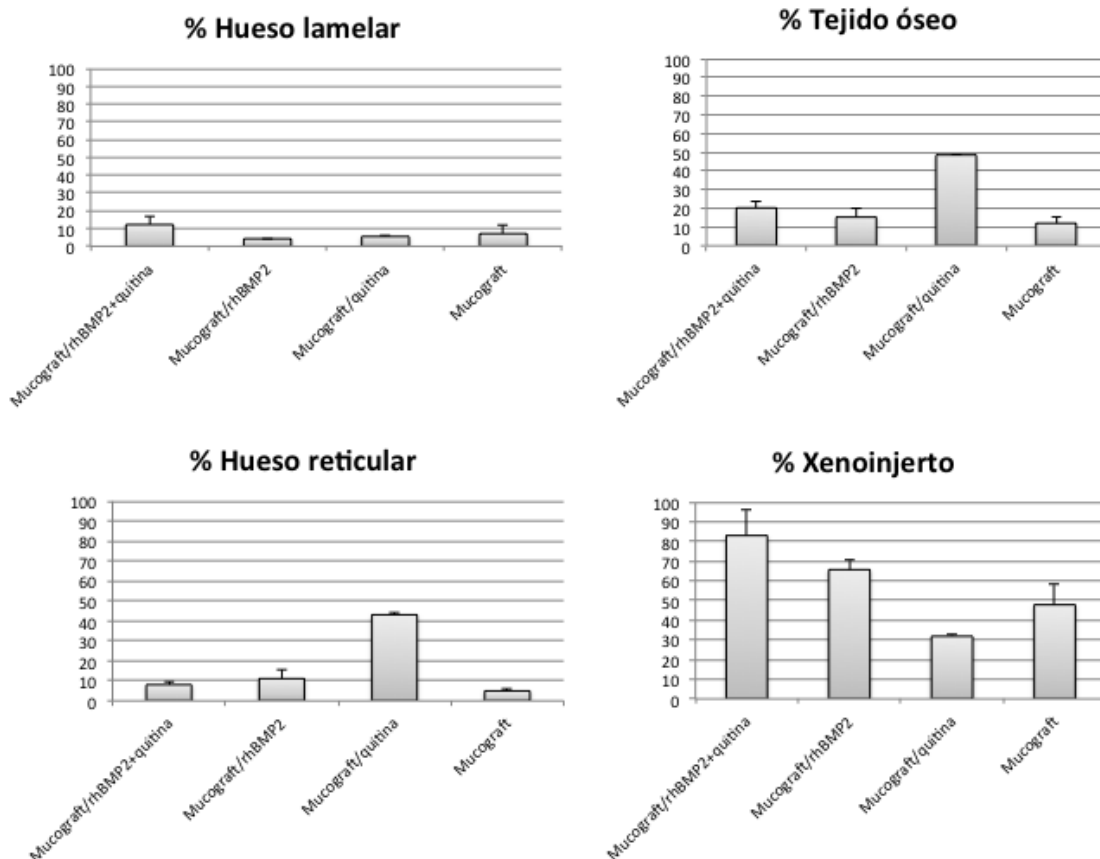
#### Mucograft/quitina+rhBMP-2



**Figura 54.** Histomorfométrica de un defecto regenerado con Mucograft con quitina activada con rhBMP-2.

En el caso de añadirle al Mucograft micropartículas de quitina activada con rhBMP-2 (Figura 54), dio como resultado una ocupación del defecto de más del 80%, sin embargo se trataba principalmente por material del xenoinjerto de colágeno.

Para facilitar la comparación posterior entre los cuatro grupos (Figura 55), se representan las variables analizadas de forma global en la siguiente figura:

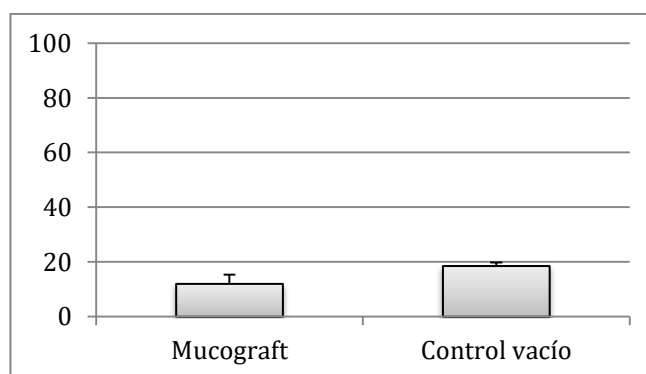


**Figura 55.** Comparando las cuatro muestras con sus medias y desviaciones, se aprecia poca formación ósea y mucha cantidad de xenoinjerto presente en esta serie de regeneraciones.

### 7.3.3. Comparación de resultados entre muestras

#### Mucograft vs Control vacío

La cantidad de tejido óseo formado dentro del control vacío es inferior al 20% del defecto (Figura 56). En esta situación, la cantidad de tejido óseo conseguido con Mucograft fue inferior a la del control vacío de manera estadísticamente significativa ( $F > 10,12$ ) (Figura 57).



**Figura 56.** Media y desviación estándar para la formación de tejido óseo entre Mucograft y el control vacío.

Análisis de varianza de un factor

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Mucograft	2	24,04	12,02	10,8578
Control vacío	3	55,65	18,55	0,5421

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	51,16908	1	51,16908	12,8543996	0,03714647	10,1279645
Dentro de los grupos	11,942	3	3,98066667			
Total	63,11108	4				

**Figura 57.** Análisis de la varianza (ANOVA) de la comparación de porcentaje de tejido óseo formado en la regeneración empleando Mucograft vs Control vacío.

## Mucograft vs Mucograft con quitina

Las micropartículas de quitina, mostraron un mejor resultado para la formación de tejido óseo reticular en combinación con el Mucograft de manera significativa ( $F > 10,12$ ) (Figura 58), con una media de relleno del defecto mayor del 40%, respecto al Mucograft control (Figura 59).

Análisis de varianza de un factor

### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Mucograft	2	24,04	12,02	10,8578
Mucograft/quitina	3	145,7	48,5666667	0,32363333

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1602,79061	1	1602,79061	417,935157	0,00025591	10,1279645
Dentro de los grupos	11,5050667	3	3,83502222			
Total	1614,29568	4				

Figura 58. ANOVA Mucograft vs Mucograft/quitina para la variable tejido óseo.

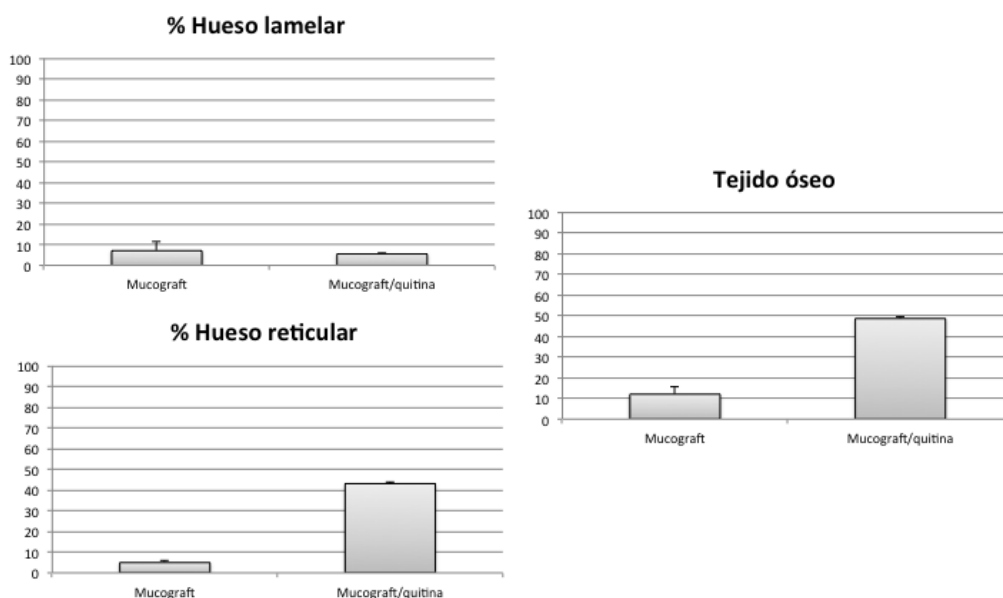


Figura 59. Media y desviación estándar de Mucograft vs Mucograft/quitina.

## Mucograft vs Mucograft/rhBMP-2

Al aplicar rhBMP-2 a la matriz de colágeno, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la formación de los diferentes tejidos óseos entre ambos materiales ( $F < 10,12$ ) (Figura 60). Sin embargo, sí se detectó una tendencia a encontrar una mayor cantidad de tejido óseo de media para Mucograft con rhBMP-2 (Figura 61). Posiblemente, los resultados son tan similares porque el colágeno por sí sólo no tiene capacidad de liberación lenta de la rhBMP-2.

Análisis de varianza de un factor

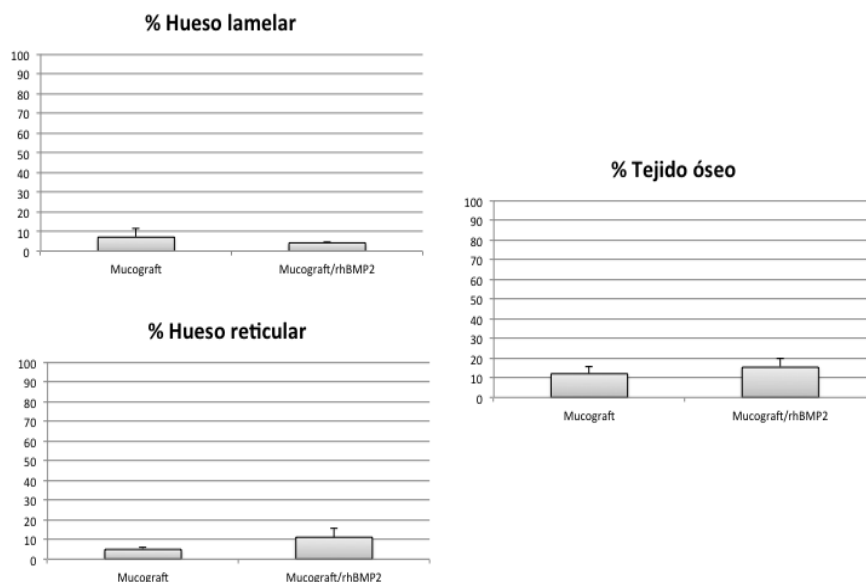
**RESUMEN**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Mucograft	2	24,04	12,02	10,8578
Mucograft/ rhBMP2	3	45,95	15,3166667	19,6226333

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	13,0416133	1	13,0416133	0,78088713	0,44194742	10,1279645
Dentro de los grupos	50,1030667	3	16,7010222			
<b>Total</b>	<b>63,14468</b>	<b>4</b>				

**Figura 60.** ANOVA Mucograft vs Mucograft/rhBMP-2 para la variable tejido óseo.



**Figura 61.** Media y desviación estándar de Mucograft vs Mucograft/rhBMP-2.

**Mucograft vs Mucograft/ quitina+rhBMP-2**

La comparación de Mucograft con quitina portadora de rhBMP-2 respecto a Mucograft, demostró que las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $F < 10,12$ )(Figura

62). Sin embargo formó mayor cantidad de tejido óseo de media Mucograft/quitina+rhBMP-2 (Figura 63).

Análisis de varianza de un factor

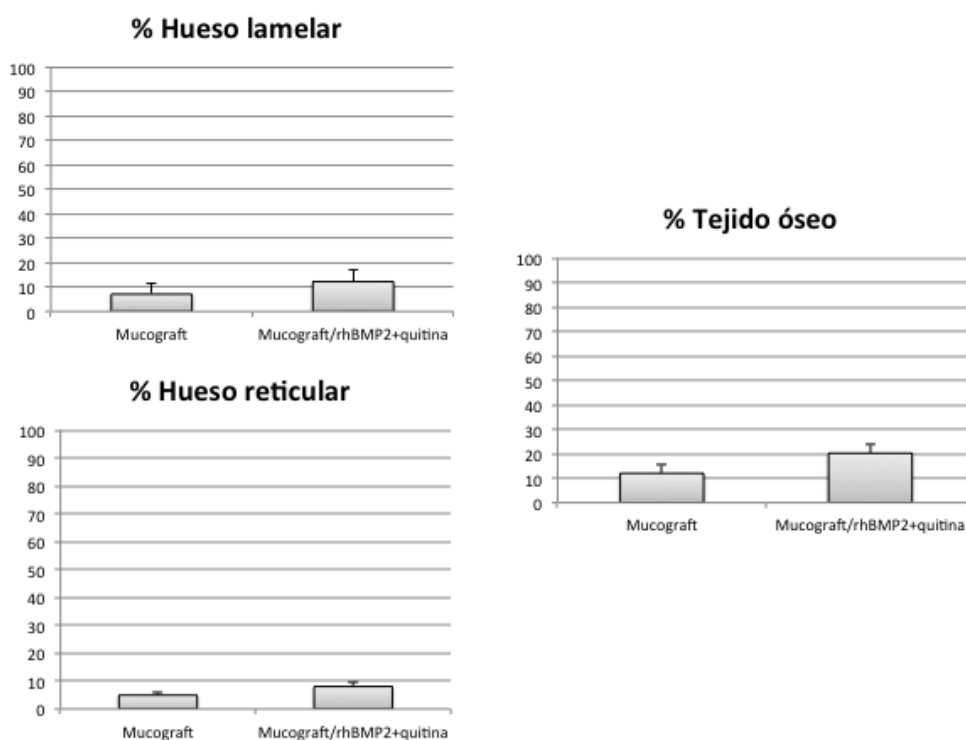
**RESUMEN**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Mucograft	2	24,04	12,02	10,8578
Mucograft/ rhBMP2+quitina	3	60,7	20,2333333	14,2536333

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F
Entre grupos	80,9506133	1	80,9506133	6,16922212	0,08897096	10,1279645
Dentro de los grupos	39,3650667	3	13,1216889			
Total	120,31568	4				

**Figura 62.** ANOVA Mucograft vs Mucograft/quitina+rhBMP-2 para determinar las diferencias estadísticas en la variable de formación de tejido óseo.



**Figura 63.** Media y desviación estándar de Mucograft vs Mucograft/quitina+rhBMP-2.

**Mucograft/quitina vs Mucograft/quitina+rhBMP-2**

La presencia de las micropartículas de quitina con la capacidad de adsorción de la rhBMP-2, permite su acción osteoinductiva en función del tiempo, es por ello que hubo diferencias

estadísticamente significativas en la formación de hueso lamelar. Curiosamente la formación de tejido óseo total, aunque fue mayor en la regeneración de Mucograft/quitina+rhBMP-2, la diferencia no fue significativa ( $F < 7,7$ ) (Figura 64, 65).

Análisis de varianza de un factor

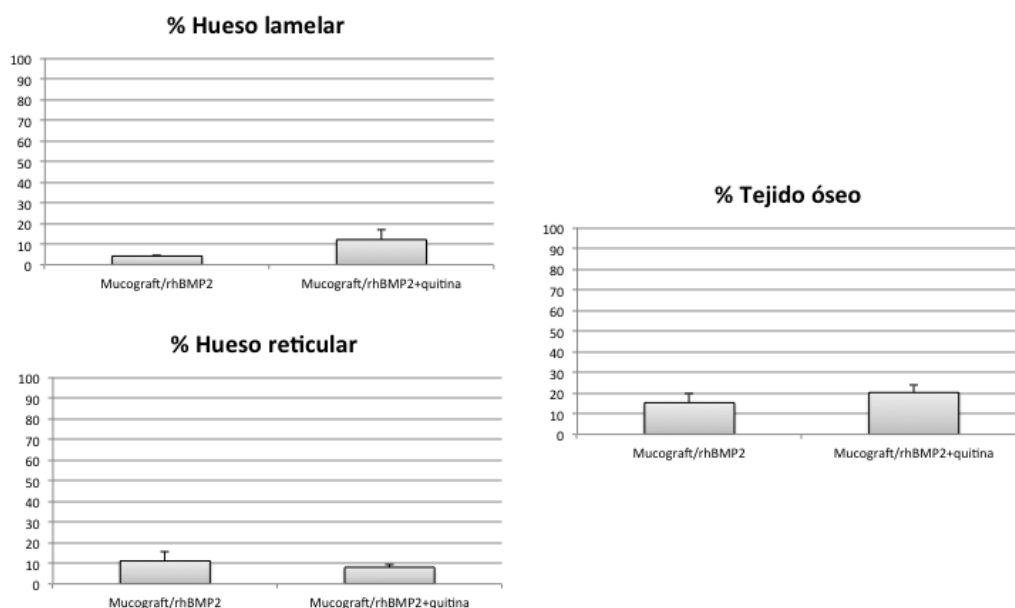
**RESUMEN**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Mucograft/ rhBMP2	3	45,95	15,3166667	19,6226333
Mucograft/ rhBMP2+quitina	3	60,7	20,2333333	14,2536333

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	36,2604167	1	36,2604167	2,14075636	0,21726351	7,70864742
Dentro de los grupos	67,7525333	4	16,9381333			
Total	104,01295	5				

**Figura 64.** ANOVA Mucograft/rhBMP-2 vs Mucograft/quitina+rhBMP-2 para determinar las diferencias estadísticas en la variable de formación de tejido óseo

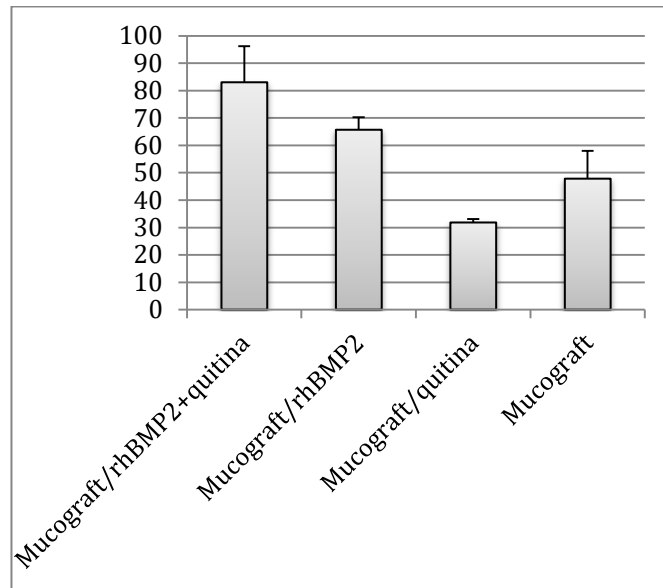


**Figura 65.** Media y desviación estándar de Mucograft/rhBMP-2 vs Mucograft/quitina+rhBMP-2.

**% Xenoinjerto de colágeno en Mucograft vs Mucograft/experimental**

La imagen más llamativa de la regeneración observada con el biomaterial Mucograft es la gran cantidad de xenoinjerto presente (Figura 66). A diferencia del xenoinjerto bovino, la

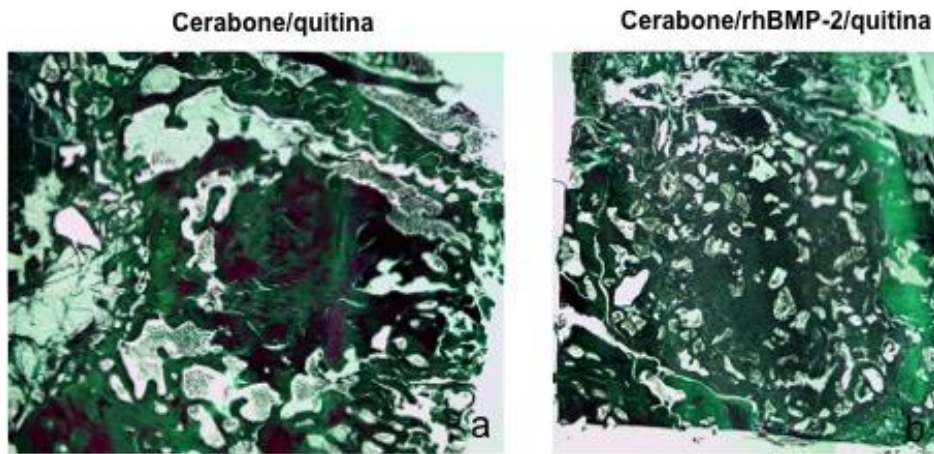
matriz tridimensional que se emplea tiene un origen porcino. Observamos mayor cantidad de xenoinjerto en aquellos modelos donde se empleó la rhBMP-2. Al compararlas respecto al biomaterial control es estadísticamente significativo ( $F > 10,12$ ). La mayor presencia de xenoinjerto está en el caso de Mucograft con quitina y rhBMP-2, así como con Mucograft con rhBMP-2. El material que presentaba menor cantidad de xenoinjerto, de forma significativa, fue el Mucograft con quitina ( $F > 10,12$ ).



**Figura 66.** Porcentaje de xenoinjerto. Media y desviación estándar del xenoinjerto remanente en las regeneraciones.

#### 7.4. Cerabone

El último de los biomateriales comerciales testados es el Cerabone (Botiss, Alemania), un xenoinjerto bovino desproteinizado. El más empleado y estudiado es el de Bio-Oss estándar (Geistlich, Suiza) pero este producto al tener un mismo origen y pero diferente método de desproteinización, optamos por utilizarlo en este estudio y así ver sus resultados como control de los xenoinjertos estándar. A diferencia de los otros dos experimentos anteriores, la regeneración se hizo en un solo conejo y por ello disponemos de dos condiciones experimentales: Cerabone con quitina y Cerabone con quitina y rhBMP-2 (Figura 67).



**Figura 67.** a) Cerabone mezclado con quitina. b) Cerabone mezclado con quitina/rhBMP-2.

### 7.4.1. Descripción histológica

#### Cerabone/quitina

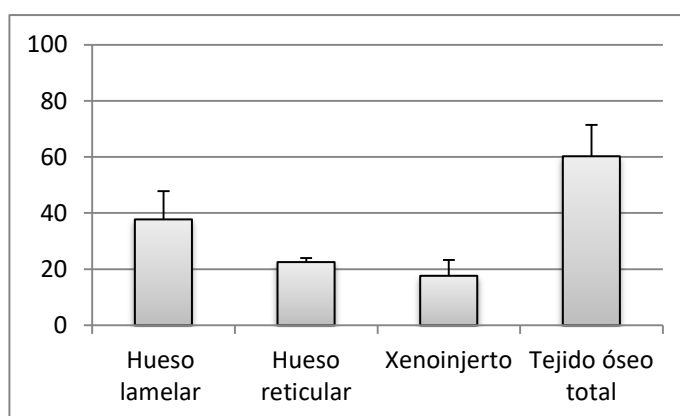
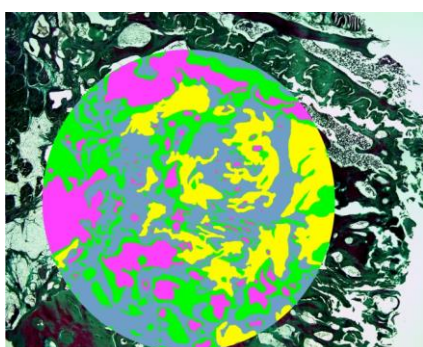
El cerabone con quitina (Figura 67a) resultó en una imagen histológica de un tejido óseo bien organizado pero con áreas vacías, similar a una regeneración habitual cuando se emplean estos materiales en la práctica clínica. El tejido óseo lamelar se dispone en la periferia del defecto y el tejido óseo reticular se encuentra hacia el interior del mismo. Hay presencia de restos de xenoinjertos óseos que no se han reabsorbido.

#### Cerabone/ quitina+ rhBMP-2

La quitina/rhBMP-2 añadida al Cerabone (Figura 67b), muestra un mejor relleno del defecto, más compacto y sin tantas zonas vacías, gracias a una mayor cantidad de tejido óseo reticular. Al observar la periferia del defecto óseo, los límites entre el borde del defecto y el injerto, se difuminan por el hueso lamelar. También se ha detectado una menor cantidad de restos de xenoinjerto.

### 7.4.2. Histomorfometría Cerabone

#### Histomorfometría Cerabone/quitina

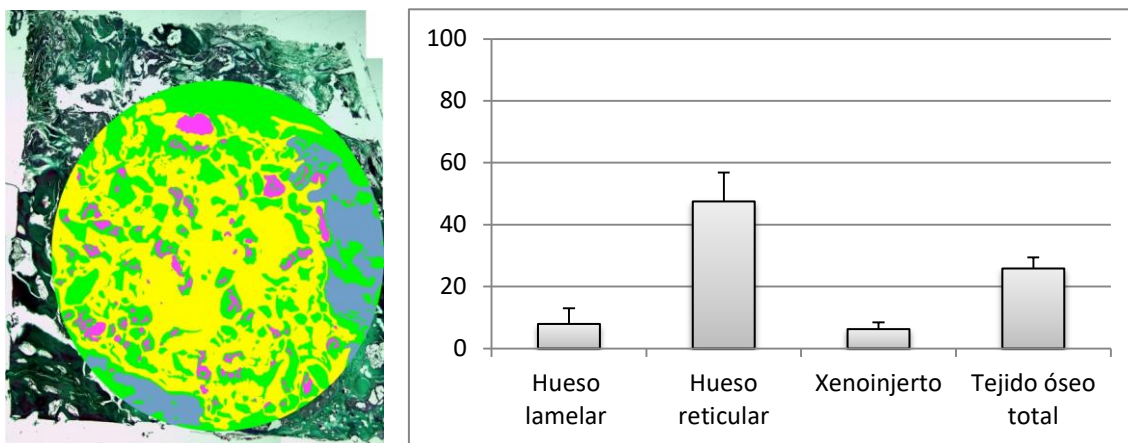


**Figura 68.** Histomorfometría de un defecto regenerado con Cerabone con quitina

En el análisis histológico (Figura 68) podemos observar una mayor formación de tejido óseo lamelar respecto al reticular y un 60% de relleno del defecto con tejido óseo

regenerado. Casi el 20% del defecto está compuesto por restos de xenoinjerto óseo bovino.

### Histomorfometría Cerabone/quitina+rhBMP-2



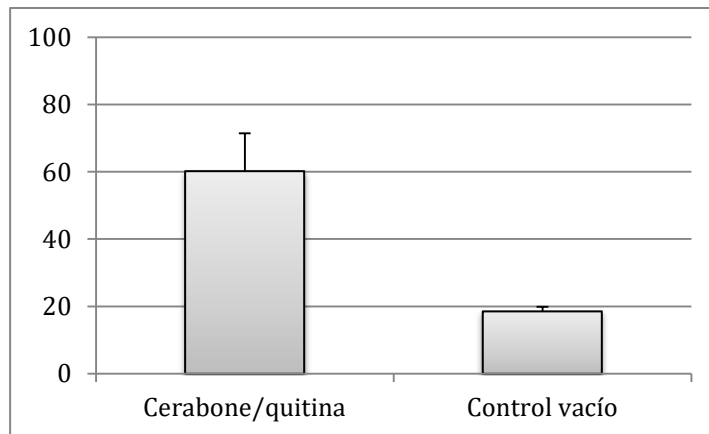
**Figura 69.** Histomorfometría de un defecto regenerado con Cerabone/ quitina+rhBMP-2.

Respecto a la anterior histología, se aprecia una gran cantidad de hueso inmaduro repartido por casi todo el defecto de forma homogénea (Figura 69). Tanto el hueso lamelar y la presencia de xenoinjerto no sobrepasaron el 10% del relleno del defecto. En cambio, la formación de hueso reticular ocupó un 45% del defecto.

### 7.4.3. Comparación de resultados entre muestras

#### Cerabone/quitina vs Control vacío

Al no disponer de un control de Cerabone solo, comparamos las diferencias con el Control vacío con Cerabone con quitina (Figura 70), se puede apreciar que un material de regeneración como Cerabone con quitina en un defecto óseo tras ocho semanas, frente al control vacío, produjo un relleno del defecto con tejido óseo total de un 60% frente a casi el 20%. Los resultados fueron estadísticamente significativos ( $F > 7,7$ )(Figura 71).



**Figura 70.** Porcentaje de tejido óseo. Cerabone vs control vacío. Observamos que el porcentaje de relleno de tejido óseo fue muy superior respecto al control vacío.

Análisis de varianza de un factor

**RESUMEN**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Cerabone/ quitina	3	180,66	60,22	125,4981
Control vacío	3	55,65	18,55	0,5421

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2604,58335	1	2604,58335	41,3294068	0,00301048	7,70864742
Dentro de los grupos	252,0804	4	63,0201			
Total	2856,66375	5				

**Figura 71.** Análisis de la varianza (ANOVA) de la comparación de porcentaje de tejido óseo formado en la regeneración empleando Cerabone/quitina vs Control vacío.

## Cerabone/quitina vs Cerabone/quitina +rhBMP-2

La presencia de quitina sin activar y activada con rhBMP-2 mezclada con el Cerabone, dio resultados variados. Se formó más cantidad de hueso lamelar, de manera estadísticamente significativa con Cerabone con quitina( $F>7,7$ ) (Figura 72).

Análisis de varianza de un factor

### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Cerabone/ rhBMP2+quitina	3	23,85	7,95	25,8241
Cerabone/quitina	3	113,15	37,7166667	101,268033

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1329,08167	1	1329,08167	20,9152468	0,01023504	7,70864742
Dentro de los grupos	254,184267	4	63,5460667			
Total	1583,26593	5				

**Figura 72.** ANOVA Cerabone/quitina vs Cerabone/quitina+rhBMP-2 en la formación de hueso lamelar.

En el caso del hueso reticular el resultado fue el contrario, Cerabone con rhBMP-2 tuvo más cantidad de este tejido de forma significativa ( $F>7,7$ ), posiblemente por la influencia de la acción de la rhBMP-2 (Figura 73).

Análisis de varianza de un factor

### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Cerabone/ rhBMP2+quitina	3	142,54	47,5133333	86,9658333
Cerabone/quitina	3	67,51	22,5033333	2,18363333

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	938,25015	1	938,25015	21,0489235	0,01012278	7,70864742
Dentro de los grupos	178,298933	4	44,5747333			
Total	1116,54908	5				

**Figura 73.** ANOVA Cerabone/quitina vs Cerabone/quitina+rhBMP-2 en la formación de hueso reticular.

Tras la suma de ambos tejidos óseos formados, el tejido óseo total regenerado en el defecto (Figura 74) fue mayor en Cerabone quitina de manera estadísticamente significativa ( $F > 7,7$ ).

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Cerabone/ rhBMP2+quitina	3	77,57	25,8566667	12,6854333		
Cerabone/quitina	3	180,66	60,22	125,4981		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1771,25802	1	1771,25802	25,636311	0,0071643	7,70864742
Dentro de los grupos	276,367067	4	69,0917667			
Total	2047,62508	5				

**Figura 74.** ANOVA Cerabone/quitina vs Cerabone/quitina+rhBMP-2 en la formación de tejido óseo total regenerado.

La última variable estudiada, la presencia de xenoinjerto (Figura 75) remanente también fue significativamente menor ( $F > 7,7$ ) en el caso de Cerabone con quitina como transportador de rhBMP-2, demostrando una posible influencia en la menor presencia de xenoinjerto con la rhBMP-2.

Análisis de varianza de un factor

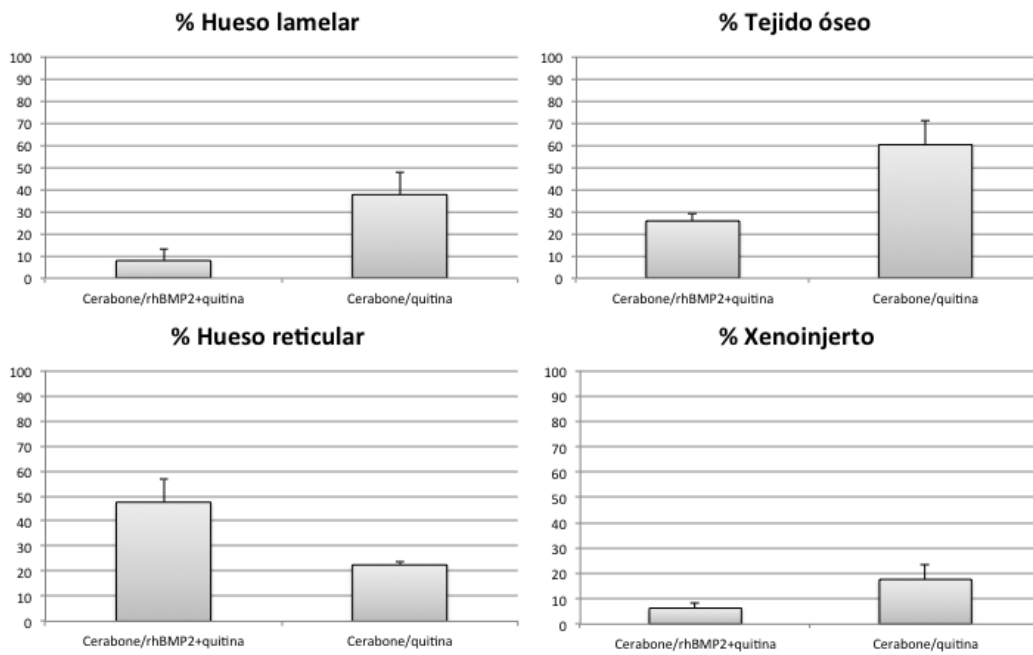
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Cerabone/ rhBMP2+quitina	3	18,85	6,28333333	4,99773333		
Cerabone/quitina	3	52,84	17,6133333	31,6681333		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	192,55335	1	192,55335	10,5031392	0,03164834	7,70864742
Dentro de los grupos	73,3317333	4	18,3329333			
Total	265,885083	5				

**Figura 75.** ANOVA Cerabone/quitina vs Cerabone/quitina+rhBMP-2 en la presencia de xenoinjerto.

En la siguiente figura de tablas se muestra la comparación entre ambos materiales (Figura 76).



**Figura 76.** Media y desviación estándar de las cuatro variables entre Cerabone/quitina y Cerabone/quitina+rhBMP-2.

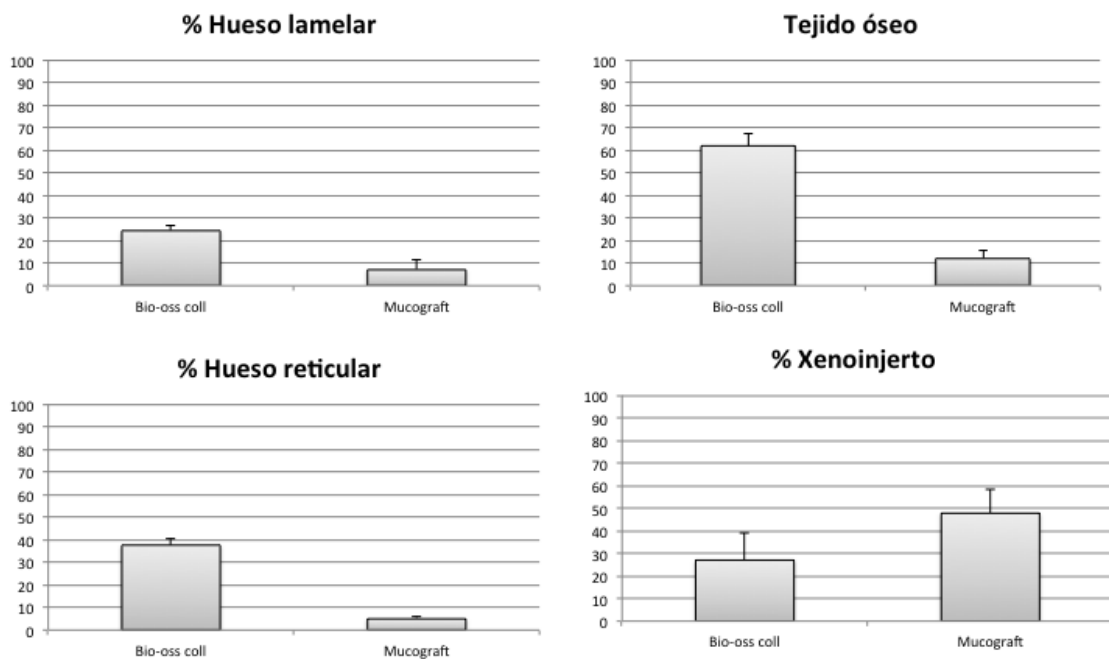
## 8. Comparación entre biomateriales

Se determinaron las diferencias entre las muestras que emplearon el mismo biomaterial, Bio-oss Collagen, Mucograft y Cerabone. Con los resultados obtenidos, se midieron las diferencias entre estos materiales con las mismas variables para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas.

## 8.1. Formación de tejidos en la regeneración entre los diferentes biomateriales

### Bio-oss Collagen vs Mucograft

La comparación de ambos biomateriales control para la regeneración del defecto óseo en calota (Figura 77), dio como resultado una formación de tejido óseo total, lamelar maduro y reticular inmaduro, significativamente mayor en el caso de Bio-oss Collagen respecto al Mucograft ( $F > 10,12$ ). La presencia de restos de xenoinjerto fue de media mayor para Mucograft, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativo.

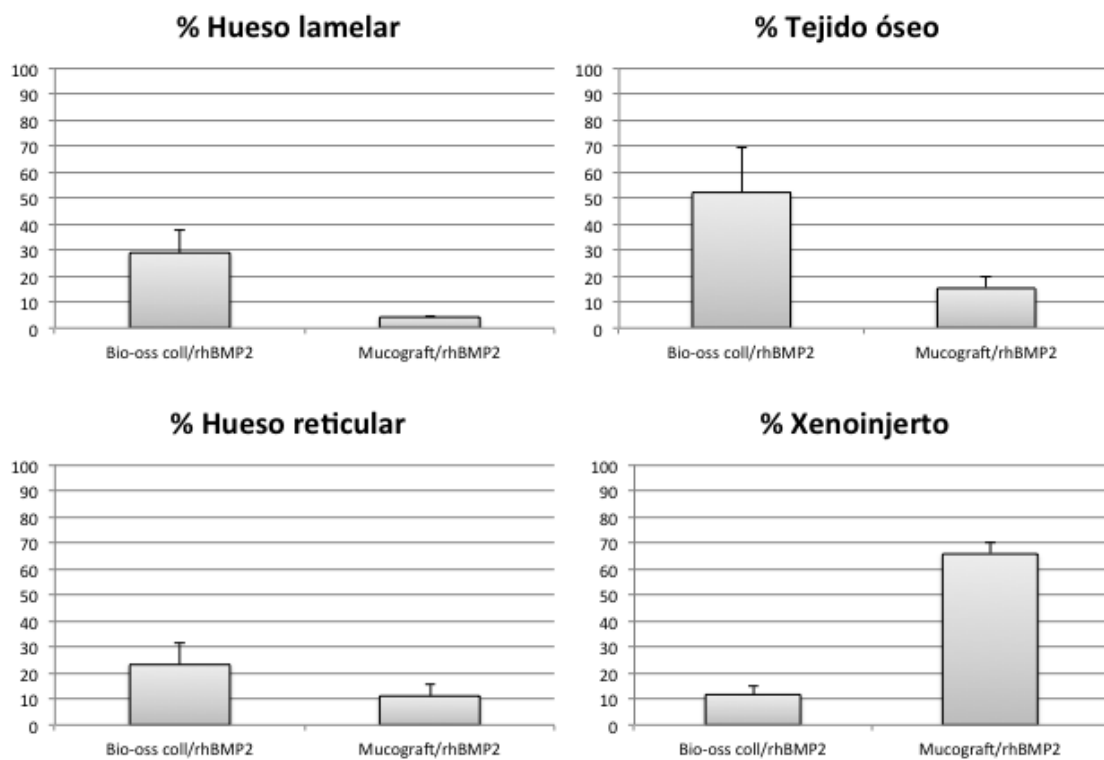


**Figura 77.** Media y desviación estándar de las cuatro variables entre Bio-oss Collagen y Mucograft.

### Bio-oss Collagen/rhBMP-2 vs Mucograft/rhBMP-2

En el caso de formación de hueso lamelar entre Bio-oss Collagen con rhBMP-2 y Mucograft con rhBMP-2 (Figura 78), hubo diferencias estadísticamente significativas ( $F > 7,7$ ), con mayor regeneración de hueso lamelar para Bio-oss collagen con rhBMP-2. Respecto al hueso reticular, no hubo diferencias significativas.

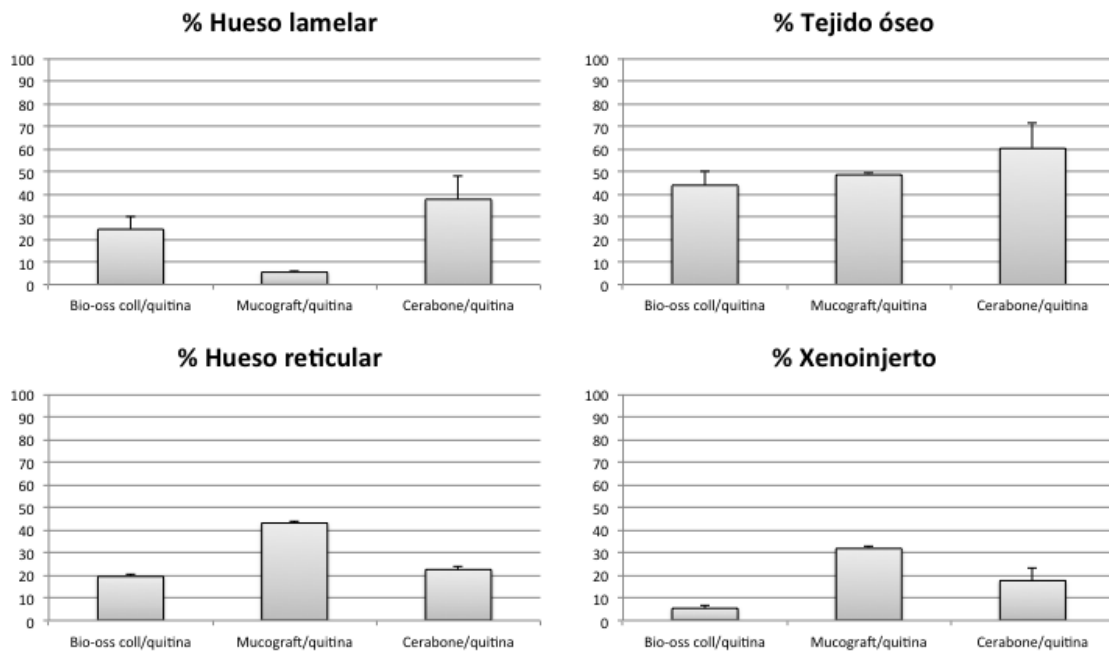
El tejido óseo global regenerado, fue estadísticamente significativamente mayor para el Bio-oss Collagen. La cantidad de xenoinjerto residual en ambas regeneraciones mostró una mayor cantidad de xenoinjerto de colágeno porcino para Mucograft con rhBMP-2 (65%), respecto al Bio-oss Collagen (10%), siendo estos resultados estadísticamente significativos.



**Figura 78.** Media y desviación estándar de las cuatro variables entre Bio-oss Collagen/rhBMP-2 y Mucograft/rhBMP-2.

### Bio-oss Collagen/quitina vs Mucograft/quitina vs Cerabone/quitina

En esta situación tenemos la misma condición experimental para los tres biomateriales (Figura 79). En la regeneración, la cantidad de tejido óseo lamelar fue significativo para el Cerabone con quitina, mientras que el hueso reticular fue mayor en el Mucograft con quitina respecto a los otros dos y también hubo diferencias significativas entre Bio-oss Collagen con quitina y Cerabone con quitina ( $F > 7,7$ ). Las diferencias entre porcentaje de relleno de tejido óseo no fue significativo entre los tres biomateriales. Por último, la cantidad de xenoinjerto presente en la regeneración, en el caso de Bio-oss Collagen con quitina fue el que menor cantidad de xenoinjerto presentaba, mientras que Mucograft con quitina el que más material conservó.



**Figura 79.** Media y desviación estándar de las cuatro variables entre Bio-oss Collagen/quitina, Cerabone/quitina y Mucograft/quitina.

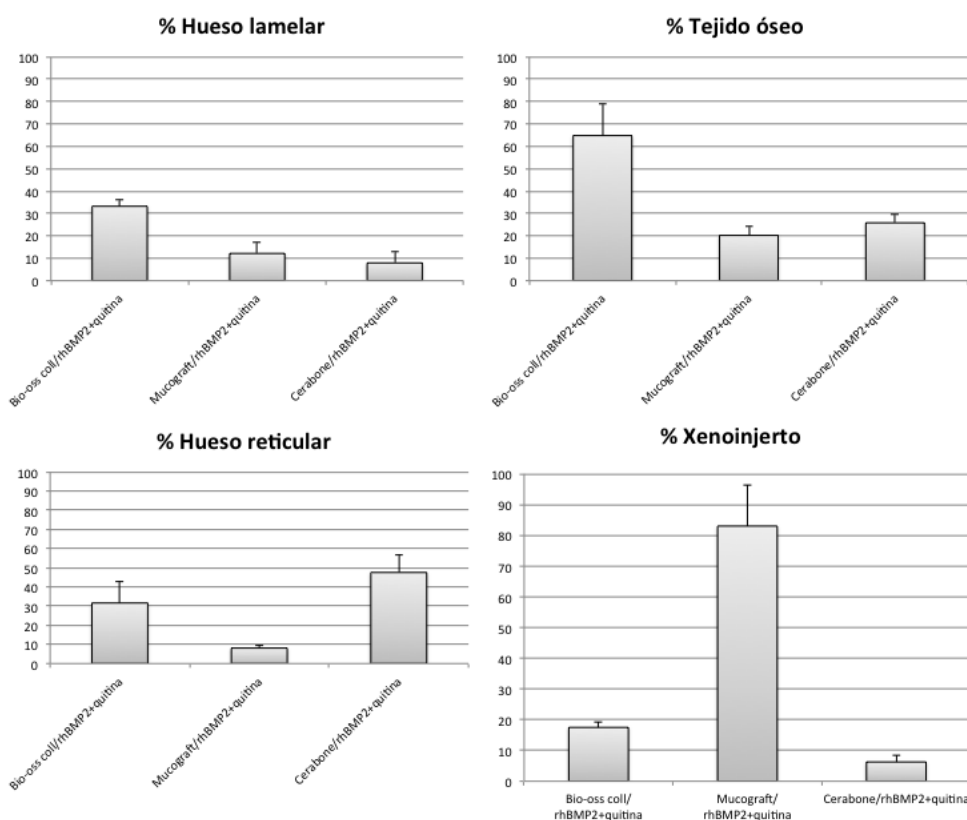
**Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2 vs Mucograft/quitina+rhBMP-2 vs Cerabone/quitina+rhBMP-2**

Los resultados en la última comparación de los tres biomateriales combinados con micropartículas de quitina activada con rhBMP-2 fueron los siguientes (Figura 80): se formó mayor cantidad de manera significativa de tejido óseo lamelar en Bio-oss Collagen con rhBMP-2 y quitina en comparación a los otros dos materiales ( $F>7,7$ ).

El hueso reticular se formó en menor cantidad de manera significativa en Mucograft con rhBMP-2 y quitina respecto a los otros dos ( $F>7,7$ ) y entre los dos Xenoinjertos óseos bovinos activados, no hubo diferencias significativas.

En el caso de la suma de ambos tejidos óseos, el Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2 fue el que mayor porcentaje de regeneración del defecto óseo consiguió, (más del 60%), de manera estadísticamente significativa frente a los otros biomateriales ( $F>7,7$ ).

Respecto a la cantidad de xenoinjerto remanente en las regeneraciones, se observó más del 80% ocupado de xenoinjerto con Mucograft con quitina/ rhBMP-2, y el que menos cantidad, inferior al 10%, para el Cerabone con quitina/ rhBMP-2.

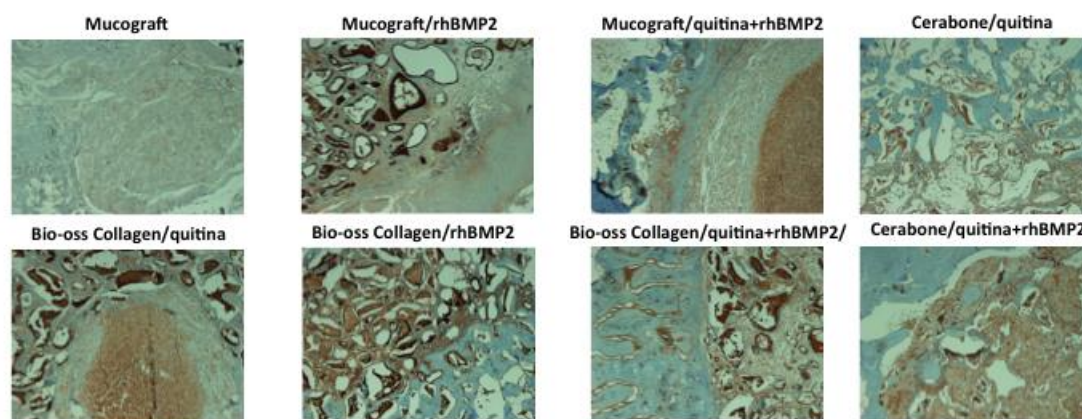


**Figura 80.** Media y desviación estándar de las cuatro variables entre Bio-oss Collagen/quitina+rhBMP-2, Mucograft/quitina+rhBMP-2 y Cerabone/quitina+rhBMP-2.

## 9. Inmunohistoquímica. Detección de osteocalcina

Para determinar si la proteína rhBMP-2 ejerce su acción osteoinductiva cuando se encuentra unida al soporte quitina, realizamos una tinción inmunohistoquímica para osteocalcina de las muestras obtenidas de las cirugías en calota de conejos. En la interpretación, prima la intensidad de la tinción que demuestra la expresión de la osteocalcina, en este caso de color marrón. Desgraciadamente no todas las muestras soportaron el procesamiento, pero sí logramos cortes de los tres biomateriales comerciales que nos pueden ayudar a comprender cómo actúa la rhBMP-2 y se expresa la osteocalcina. La Osteocalcina es secretada solamente por los osteoblastos y juega un papel crucial en la regulación metabólica del cuerpo y en los mecanismos pre-osteoblásticos o formación ósea. La expresión de esta proteína en el tejido óseo se observa como tinción marrón utilizando esta técnica.

Hemos observado una mayor densidad de expresión de osteocalcina en la cercanía a los fragmentos de xenoinjerto (actividad máxima). Existe una alta concentración del epotopo, diferenciándose bien las áreas del tejido conjuntivo y del óseo. Se puede identificar como control positivo la tinción moderada del hueso autóctono con aspecto de estructura bien organizada (Figura 81).



**Figura 81.** Tinción Inmunohistológica de Anti-Osteocalcina.

Se puede observar que la expresión de la proteína aumenta en general con el uso de la rhBMP-2 en el tratamiento, sea añadida directamente al material o mediante las micropartículas de quitina. Respecto a los diferentes materiales, es destacable el aumento en la expresión mediante las las micropartículas activadas con rhBMP-2 en los casos con Mucograft. Con Bio-oss Collagen, la osteocalcina se expresa en un tejido óseo más complejo, aumentando su expresión con el uso del material activado. Por último, se observa un efecto similar pero con menor intensidad en el grupo de Cerabone.



## VII. Discusión

### 1. Efecto de la quitina-rhBMP-2 en el embrión

La ingeniería de tejidos es un campo de investigación que persigue la restauración completa de tejidos u órganos que se han perdido, empleando biomateriales, factores de crecimiento y células (Atala, 2004). La rhBMP-2 es uno de los factores de crecimiento más estudiados y empleados en la ingeniería de tejidos por su capacidad de inducir la formación de hueso ectópico e inducir la diferenciación celular hacia un fenotipo osteoblástico (Cao y Cheng, 2005). En la actualidad se comercializan productos que contiene BMP, como por ejemplo, INFUSE Bone graft, esponjas de colágeno portadoras de rhBMP-2, aprobadas por la FDA para las regeneraciones óseas en fusión espinal entre cuerpos vertebrales, fracturas abiertas de tibia, elevaciones de seno y regeneración de defectos post-extracción (Wallace *et al.*, 2014). Sin embargo, en la documentación del fabricante, en el apartado de efectos adversos, se reconoce que no existen suficientes estudios de los efectos en mujeres embarazadas. Se describe en las instrucciones de uso de INFUSE, que la rhBMP-2 había demostrado producir anticuerpos con capacidad de atravesar la barrera placentaria en un estudio experimental en conejos. No tiene tampoco establecido la seguridad en madres en periodo de lactancia, por lo que en las recomendaciones del fabricante se advierte a las pacientes que vayan a someterse a este tratamiento, el evitar quedarse embarazadas hasta pasado un año post-tratamiento (INFUSE Bone Graft, instrucciones de uso, 2012).

Para poder analizar los posibles efectos de esta proteína durante el desarrollo embriológico, empleamos el modelo del embrión de pollo como sujeto ideal para comenzar nuestro estudio. Las ventajas que ofrece como modelo orgánico para estudio de la biología del desarrollo es que el embrión se desarrolla fuera de la hembra y es fácilmente accesible para la manipulación experimental. Varias técnicas han permitido a los científicos al examinar el embrión dentro del huevo (*in ovo*), sin embargo el acceso al embrión puede ser limitado en los últimos estadios de desarrollo.

El embrión aviar ha sido muy relevante en el desarrollo craneofacial humano debido a los tejidos que componen las prominencias faciales (el ectodermo superficial, la cresta neural, el mesodermo y el endodermo) que están altamente conservados entre aves y otras especies de mamíferos (ratones y humanos) (Brugmann *et al.*, 2006).

Este grado de conservación morfológica y celular ha permitido al embrión de esta ave situarse a la vanguardia de modelos animales para enfermedades craneofaciales humanas, como por ejemplo las ciliopatías craneofaciales (Schock *et al.*, 2016).

Al analizar la acción de la rhBMP-2 injertada mediante el material quitina/rhBMP-2, en la diferenciación ósea embrionaria del pollo en un estadio 26, en el área de desarrollo mandibular, puede inducir un cambio celular a un fenotipo óseo, observando una tinción activa para colágeno de manera próxima a las micropartículas de quitina.

Además, hemos detectado que la inserción de micropartículas de quitina sin rhBMP-2 no ha provocado alteración en el desarrollo embrionario, encontrándose esta observación acorde con las evidencias bibliográficas que describen la biocompatibilidad de este material (Kumar *et al.*, 2000). Por ello, toda alteración del proceso de desarrollo se debe al proceso de manipulación, quirúrgico o al papel de la rhBMP-2 como regulador del crecimiento y diferenciación celular.

Se han desarrollado diferentes protocolos quirúrgicos, con los que se busca optimizar la inducción de efectos osteogénicos durante la fase del desarrollo mandibular. Igualmente, se ha buscado perfeccionar la técnica de operación para mejorar la supervivencia de los animales. Para ello, hemos realizado tres tipos de aproximaciones experimentales diferentes, *in ovo* para optimizar un protocolo de operación para la implantación de quitina con rhBMP-2 capaz de conseguir una supervivencia de los embriones cercana al 100%.

En el primer experimento, accediendo al embrión a través de una ventana en la cáscara del huevo (Windowing technique), se depositó quitina y quitina/rhBMP-2, en contacto o próximo al primer arco branquial, sin atravesar la membrana amniótica. Las dificultades que nos encontramos con este método fue la falta de un control preciso de la colocación del material.

Fue el método menos cruento, ya que no se realiza ninguna incisión en la membrana amniótica ni en el embrión. No obstante el resultado de la supervivencia fue reducido tras la operación. Creemos que los motivos principales fueron dos: la inexperiencia en la operación de embriones y la propia acción por alta concentración de la rhBMP-2, la mitad de las defunciones fue posiblemente por hemorragia interna. Esta conclusión se debe a

que el aspecto de los embriones muertos, donde se administró la proteína, mostraban macroscópicamente los signos de haber sufrido un shock hemorrágico.

La concentración podría ser un factor importante para las muertes por hemorragia interna. La rhBMP-2 participa en la expresión y secreción de factores de crecimiento vasculares endoteliales alfa (VEGF- $\alpha$ ). Esta regulación de la angiogénesis es paralela a la diferenciación ósea, ya que para producirse la osteogénesis es indispensable el aporte de oxígeno, de ahí que nuevos vasos sanguíneos sean necesarios en el futuro tejido óseo (Deckers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Fiedler *et al.*, 2002). En este primer ensayo, posiblemente se haya afectado un proceso del desarrollo vascular, interrumpiendo o alterando la morfogénesis más allá de nuestro objetivo. Al no controlar en algunas ocasiones la posición exacta del material, creemos que la proteína pudo alterar otras áreas vecinas como el corazón, situado justo debajo del primer arco branquial. También otro posible motivo de las hemorragias se deba a la técnica de operación, ya que se puede lesionar la red vascular que rodea al embrión y que es más abundante al acercarnos al primer arco branquial, debido a la proximidad del desarrollo cardíaco. (Ekanayake *et al.*, 1997).

En el segundo experimento, cambiamos de técnica para lograr un mayor control de la localización y la dosis. Para ello, aparte de la técnica de la ventana de acceso, realizamos dos incisiones para introducir una cantidad concreta de material en una región específica del proceso mandibular y evitar daños tisulares colaterales.

Realizamos la incisión de acceso al saco amniótico para a continuación realizar otra incisión en el mesénquima del primer arco, creando un "bolsillo" o "sobre", donde introducir la quitina activada con la proteína o quitina. La dificultad añadida es que el embrión se encuentra en suspensión en la clara y puede hundirse. Otro problema es que a ese estadio de desarrollo, el embrión se mueve al contacto con los instrumentos. El movimiento no se debe por la percepción del dolor, pues aún no está desarrollado el sistema nervioso a ese nivel, pero ante el estímulo de contacto el embrión se mueve y dificulta la intervención.

Se suma otro problema y es la gran vascularización de la zona, pues aparte de la proximidad del tubo cardíaco en desarrollo, también se cruzan vasos principales. Además cualquier mínima hemorragia causada por una mala incisión o por error, provocará la muerte. De producirse un sangrado, la clara se enturbia y se hace más difícil la visión y

prácticamente haciendo imprevisible la supervivencia del embrión (Ekanayake *et al.*, 1997).

Con las micropartículas de quitina surgió otra dificultad añadida, pues al colocarla atravesando la membrana amniótica, las partículas solían dispersarse por la clara, al no tener capacidad de mantenerse cohesionadas en un medio líquido y la posición se hacía difícil de mantener.

Por todos los problemas de esta operación creímos conveniente reducir el tiempo de incubación post-quirúrgico a 24 horas para valorar su supervivencia. Los resultados que obtuvimos fueron similares a los de la primera operación, sin lograr mejorar la supervivencia.

Desarrollamos una tercera intervención *in ovo*, eliminando la incisión en el embrión para evitar en todo lo posible las hemorragias. De esta manera, se comprobó si atravesando el saco amniótico y colocando las micropartículas próximas a la zona del proceso mandibular se obtienen resultados similares a los del primer experimento.

Por ser más conservadora la cirugía, se prolongó el período de incubación a 4 días. Los resultados tampoco fueron satisfactorios, sólo sobrevivió un sujeto del grupo experimental con muestras haberse desarrollado en comparación al resto, debido a su muerte prematura. Llegamos a la conclusión que este sistema tampoco mejoró la supervivencia.

Decidimos cambiar el método de operación de los embriones para lograr mejores resultados y para ello se realizó una puesta a punto de las técnicas de cultivo del embrión fuera del huevo, *ex ovo*. La mayor ventaja de estos cultivos es que permiten un mejor acceso a los tejidos, evitando obstáculos que puedan crear la propia cáscara del huevo o la posición del propio embrión, sobre todo en los últimos estadios de desarrollo.

Para ello, hemos tenido en cuenta la posibilidad de realizar la extracción temprana del embrión y su cultivo en placa en un medio semisólido (Método EC; Chapman *et al.*, 2001), un método clásico y con una gran tradición en el estudio del desarrollo temprano del embrión de pollo.

Sin embargo, teniendo en cuenta los estadios avanzados en los que se plantea este estudio, el método shell-less (sin cáscara) parece más apropiado. Este método, similar al descrito anteriormente, permite la observación continua de los embriones de pollo vivos desde el día 3 al día 18 de la incubación. De la misma manera, podríamos observar la diferenciación de los sistemas de órganos y estructuras extraembrionarias así como el comportamiento antes de la eclosión. La supervivencia de los cultivos *ex-ovo* registradas en publicaciones, varían del 30-50% (Auerbach *et al.*, 1975; Dohle *et al.*, 2009).

Realizamos un diseño de cámara de incubación con filtro para células que permitió evitar la contaminación y aumentar el porcentaje de la supervivencia. Gracias a los protocolos de manipulación de la operación y a esta cámara, se consiguieron unos resultados de supervivencia del 85,7%, permitiendo que la experimentación con este modelo animal sea más predecible, sencilla, fácil de documentar y reduciendo el número de huevos necesarios para realizar los experimentos.

Otros autores ya han realizado experimentos similares para determinar el papel de las BMPs durante el desarrollo del proceso mandibular, depositando la proteína *in vivo* en diferentes estadios y regiones del desarrollo del embrión de pollo. En estos trabajos, se ha observado que existe un resultado decisivo dependiendo de la zona elegida y en el momento de la colocación de la BMP de manera experimental (Ekanayake *et al.*, 1997; Barlow y Francis-West, 1997; Wang *et al.*, 1999; Mina *et al.*, 2002).

Por ejemplo, la colocación de BMP-2, BMP-4 o BMP-7 en la región lateral de la mandíbula en un estadio 23 de desarrollo, no afectó al crecimiento del mesénquima pero sí alteró la morfología y los patrones de la articulación mandibular (Wang *et al.*, 1999). En contraste con sus efectos en el estadio 23, la implantación *in vivo* de esferas de heparina portadoras de BMPs a concentraciones similares en estadios más tempranos (20-22) y en la misma región lateral, provocó la pérdida del cartílago de Meckel. Además, se observó una reducción global del crecimiento del proceso mandibular articular en el sitio donde se implantó la proteína (Barlow y Francis-West, 1997; Ekanayake *et al.*, 1997; Mina *et al.*, 2002). Por otra parte, la implantación de estas esferas en una posición más medial (donde se expresa el gen homeobox *Msx*), produjo la formación de una derivación adicional del cuerpo de cartílago de Meckel (Barlow y Francis-West, 1997; Mina *et al.*, 2002). De este modo, se ha descrito que tanto la edad embrionaria como el tejido diana determinan la acción de la proteína morfogenética ósea aplicada. Además, el modelo animal escogido puede también presentar sus particularidades, ya que se ha observado que aunque los

procesos de desarrollo son similares, existen ciertas diferencias propias de cada especie. Como ejemplo, en el embrión de ratón de 10 días, correspondiente a un estadio 18 de Theiler y equivalente a un estadio 36 de desarrollo del embrión de pollo (Schneider *et al.*, 1979), la aplicación de BMP-2 durante 6 días en la región lateral mandibular, provocó la formación de cartílago ectópico. Por el contrario, en la región medial no hubo efecto (Semba *et al.*, 2000).

En nuestro modelo, la elección del estadio embrionario 26 se debe a que es el momento donde se produce el inicio de la osificación mandibular y esquelética. En esta etapa del desarrollo no hemos detectado un cambio notable en el crecimiento del arco mandibular.

Tras todos los resultados obtenidos sobre los efectos de la quitina portadora de rhBMP-2 en el embrión de pollo, podemos concluir que la dosis, la posición y el momento donde se deposita este elemento activo, puede provocar efectos colaterales indeseables. Sin embargo, también se puede inducir a la diferenciación de células destinadas hacia un determinado fenotipo celular, como por ejemplo las células mioblásticas, ser redirigidas hacia la línea celular de los osteoblastos.

Si queremos responder a la pregunta de si la rhBMP-2 podría poner en riesgo el desarrollo de un embrión humano, deberíamos continuar esta línea de investigación con mamíferos como ratones o conejos y medir la capacidad de la barrera placentaria de evitar que productos o antígenos pongan en riesgo a los embriones y evitar en última instancia poner en riesgo el desarrollo de un embrión humano.

La respuesta a la quitina/rhBMP-2 en un organismo en desarrollo es diferente a la de un organismo adulto. En estos se produce la regeneración de los defectos óseos, el objetivo de la ingeniería de tejido ósea. En el campo de la odontología la restauración de este tejido tiene una importancia crucial y es por ello que nuestra siguiente línea de investigación, tiene como objetivo la regeneración de defectos óseos empleando quitina/rhBMP-2 combinados con xenoinjertos comerciales utilizados en la práctica clínica. Se persigue la mejora de las propiedades de estos materiales y los índices de regeneración de defectos óseos en modelo de calota de conejos adultos, ya que presenta este hueso, el mismo origen embriológico que el hueso mandibular (Delgado-Ruiz, 2015).

## **2. Xenoinjertos para la regeneración ósea empleados en odontología: Bio-Oss Collagen, Cerabone y Mucograft**

El injerto de hueso autólogo es actualmente el material ideal para ser empleado en la regeneración de defectos óseos por sus propiedades intrínsecas (osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis), ya mencionadas en la introducción. Sin embargo, los problemas asociados a la morbilidad y la cantidad limitada de tejido que puede obtenerse, son los grandes inconvenientes que presentan estos injertos (Blokhuys *et al.*, 2011).

Debido a estas limitaciones, se han investigado y desarrollado múltiples alternativas, siendo las más comunes los aloinjertos y los xenoinjertos.

Los xenoinjertos presentan menor oseointegración, osteoconducción y capacidad osteogénica cuando se comparan con los autoinjertos, pero resuelven el problema de la morbilidad y cantidad de injerto disponible para la regeneración (Albrektsson *et al.*, 2001).

Por todo lo expuesto anteriormente, los xenoinjertos son cada vez más empleados en odontología e ingeniería de tejidos, sin embargo, están en continuo estudio para conseguir mejorar sus propiedades. Por ello se decidió emplear este tipo de injertos para lograr mejorar la regeneración ósea sin sacrificar la integridad de los pacientes, al reducir la morbilidad de las intervenciones con injertos que posean capacidades similares o incluso mejores que los injertos autólogos.

Los xenoinjertos que hemos empleado en este trabajo tienen diferentes composiciones, hecho que nos permite poder comparar sus características.

El primero, Bio-Oss Collagen, posee las mismas partículas que Bio-Oss con un 10 % de colágeno porcino tipo I que ayuda en el manejo clínico al ser hidratado por suero salino o sangre del paciente (Araújo *et al.*, 2010). El segundo, Cerabone, es un xenoinjerto bovino como Bio-Oss Collagen pero se diferencia por su procesamiento para eliminar los componentes orgánicos (sinterización) y no tener ese 10% de colágeno (Tadic *et al.*, 2004). El tercer material empleado, Mucograft se diferencia de los anteriores xenoinjertos por ser una matriz tridimensional de colágeno porcino tipo I y tipo III que ha demostrado su eficacia para los aumentos de tejidos blandos (Sanz *et al.*, 2009). Otros autores han publicado estudios histológicos de otras posibles aplicaciones de Mucograft al usarlo como membrana combinada con Bio-Oss Collagen para la preservación alveolar (Cioban *et al.*, 2013). El colágeno es actualmente el *carrier* comercial aceptado por la FDA como portador de factores biológicos como la BMP-2 (Fiorellini *et al.*, 2005). Por todos estos trabajos previos, consideramos que Mucograft podría tener nuevas aplicaciones en la regeneración

ósea en combinación con quitina activada con rhBMP-2.

El uso de la rhBMP-2 en ingeniería tisular ósea presenta una larga trayectoria de estudios por su capacidad como osteoinductor para las células madre mesenquimales y los pre-osteoblastos, así como promover la migración de células osteoblásticas (Bragdon *et al.*, 2011). Es por ello que optamos por elegirla como agente bioactivo, aunque no es la única que participa en la osteogénesis y de cara a futuras intervenciones, existen otras alternativas o tratamientos, como por ejemplo, combinando varios de estos factores como otras BMPs con capacidad osteogénica como la BMP-4 y la BMP7 (Geuze *et al.*, 2012) o el factor de crecimiento vascular (*VEGF*) que posee un efecto sinérgico demostrado con las BMPs, que podrían mejorar la capacidad osteoregeneradora reduciendo la cantidad de BMPs necesaria (Li *et al.*, 2016). Una vez conocidos los biomateriales que vamos a emplear en el estudio, los combinaremos con quitina/rhBMP-2 para observar su capacidad de regeneración de defectos óseos de un diámetro de 8 mm en la calota de conejos adultos.

### **3. Resultados de la combinación de quitina/rhBMP-2 con los diferentes xenoinjertos**

Estudios previos en animales confirmaron que diversos materiales de injerto óseo tales como la matriz ósea desmineralizada, la matriz ósea cristalina desorganizada bovina y los “andamios/scaffold” de polímeros, son excelentes transportadores de proteínas osteoinductivas (Sigurdsson *et al.*, 1996). Hänseler, observó, que la superficie de Bio-Oss presenta 1000 veces más rugosidad que la hidroxiapatita/fosfato tricálcico, que unido a su afinidad a la BMP-2, lo convierte en un biomaterial muy apropiado para su uso en medicina regenerativa. Los experimentos utilizando injertos de hueso que contienen rhBMP-2 han reportado resultados significativamente mejores de regeneración ósea. Sin embargo, la simple adición de rhBMP-2 a un injerto óseo da como resultado una rápida liberación de rhBMP-2, la cual no resulta apropiada para regular los procesos biológicos de manera adecuada (Hänseler *et al.*, 2015).

Para superar este problema, se han estudiado varias aproximaciones diferentes para conseguir la liberación controlada de rhBMP-2. El colágeno natural polimerizado, que se ha utilizado durante mucho tiempo como soporte de rhBMP-2, es el único material aprobado por la FDA para este fin. Sin embargo, el colágeno libera rhBMP-2 muy rápidamente debido a su baja afinidad, pues a los 14 días posteriores a la implantación, sólo alrededor del 5% de la rhBMP-2 permanece en el sitio de la implantación (Uludag *et al.*, 1999). Esta liberación masiva inicial de rhBMP-2 difiere completamente de lo que

realmente sucede en el cuerpo, ya que en condiciones naturales en los lugares de fractura ósea, los niveles de rhBMP-2 se incrementan gradualmente hasta alcanzar su pico de concentración alrededor de los 21 días después de la lesión (Cho *et al.*, 2002). Así pues, la regeneración podría mejorarse si la liberación de la rhBMP-2 fuese similar a los mecanismos que se producen en los procesos de reparación naturales. En el caso de grandes defectos óseos, requerirán un tiempo de curación prolongado, y por lo tanto es necesario la liberación controlada y lenta de rhBMP-2 y así lograr mejorar la regeneración ósea (Haidar *et al.*, 2009a & 2009b).

En el estudio experimental de Huh, similar al planteado en este trabajo, se regeneraron defectos óseos en calota de conejo con Bio-Oss y heparina activada con rhBMP-2 (Huh *et al.*, 2015). Gracias a la liberación de la rhBMP-2 almacenada en la heparina, el período de vida media de la rhBMP-2 aumentó aproximadamente 20 veces más (Zhao *et al.*, 2006). Los sistemas que minimizan la liberación rápida de rhBMP-2 no sólo promueven la formación de hueso en los sitios de tratamiento, sino también restringen fenómenos patológicos no deseados (Bhakta *et al.*, 2012). La combinación de rhBMP-2 con heparina ha demostrado tener un efecto anti-inflamatorio y promueve las funciones características de los osteoblastos (Kim *et al.*, 2011; Kodama *et al.*, 2008). De este modo, el transportador puede tener otras funciones además de la liberación del agente bioactivo, hecho que pensamos puede justificar la utilización de la quitina tal y como desarrollaremos más adelante.

En este estudio (Huh *et al.*, 2015), los hallazgos histológicos y análisis de micro CT revelaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de Bio-Oss y el grupo de Bio-Oss/rhBMP-2 ( $p < 0,05$ ). Los resultados fueron mejores en cuanto a la regeneración ósea con relación al grupo de control vacío a las cuatro y ocho semanas después de la cirugía. En el análisis histométrico, a las ocho semanas el porcentaje de nuevo tejido óseo formado, para el control vacío fue de  $7,49 \pm 1,92$ ; para Bio-Oss  $17,76 \pm 1,66$  y para Bio-Oss/rhBMP-2  $29,20 \pm 4,68$ . En contraposición con nuestros resultados, con el mismo modelo animal e intervención, nuestros porcentajes de nuevo tejido óseo fueron: control vacío  $9,53 \pm 1,13$ ; Bio-Oss Collagen  $61,93 \pm 5,25$ ; Bio-Oss Collagen/rhBMP-2  $52,13 \pm 17,13$ ; Bio-Oss Collagen/quitina  $43,93 \pm 6,4$  y Bio-Oss Collagen/quitina+rhBMP-2  $64,81 \pm 14,19$ . En nuestro estudio, hemos utilizado además Cerabone un xenoinjerto bovino sin colágeno añadido. En este caso, los resultados de la formación de tejido óseo fueron Cerabone/quitina  $60,22 \pm 11,2$  y Cerabone/quitina+rhBMP-2  $25,85 \pm 3,56$ .

En el artículo de Huh, a las cuatro y ocho semanas, el grupo de Bio-Oss/rhBMP-2 mostró significativamente mayor regeneración ósea que el grupo de Bio-Oss. Histológicamente, se observaron hallazgos de osificación directa a la cuarta semana en el grupo de Bio-Oss/rhBMP-2 y no se observó consolidación en la octava semana. Este resultado coincide con un estudio previo sobre xenoinjertos óseos (Bio-Oss) impregnados con 1 ml de 0.5 mg/ml rhBMP-2 en pacientes humanos para una regeneración ósea en anchura del reborde alveolar en mandíbula (Jung *et al.*, 2003).

Una de las principales diferencias entre el método empleado en el estudio de Huh respecto a este trabajo, fue la concentración de rhBMP-2 utilizada. El Bio-Oss fue cargado con 0.1 mL de solución de rhBMP-2 para obtener una concentración de 10 µg. La concentración empleada en este trabajo fue de 50µg, tras haber ajustado la dosis efectiva, suficiente para determinar una diferenciación a fenotipo osteoblástico sin perjudicar a la osificación de la calota del conejo, ni poner en riesgo al animal.

La bibliografía examinada no muestra un consenso sobre la concentración óptima de rhBMP-2 en la nueva formación de hueso (Kato *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2008). Se ha descrito que diferentes concentraciones de rhBMP-2 no afectan diferencialmente la formación de hueso (Tatakis *et al.*, 2002), mientras que en otros estudios, la formación de hueso aumentó con el aumento de la concentración de la rhBMP-2 (Kato *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2008). Además, las funciones del factor de crecimiento dependen de la especie, el objeto del estudio, el método de aplicación y el tipo de defecto utilizado (Liu *et al.*, 2007).

En vista de los diferentes enfoques experimentales utilizados en nuestro trabajo respecto al estudio de Huh, en esta Tesis Doctoral se obtuvieron mejores resultados al aumentar la concentración, siendo el mismo procedimiento quirúrgico, el mismo tamaño del defecto (8 mm), tiempo, agente bioactivo, modelo animal y biomateriales ( Bio-Oss Collagen y Bio-oss Collagen con rhBMP-2). El resultado obtenido por Huh para Bio-Oss con rhBMP-2, nos hace preguntarnos si podría el elemento reabsorbible del Bio-Oss Collagen tener un papel clave en los resultados obtenidos.

La matriz de colágeno porcino Mucograft, tiene una indicación de uso para situaciones clínicas que requieran de aumento de tejidos blandos en la cavidad oral (Sanz *et al.*, 2009). Sin embargo, otros autores han publicado trabajos, donde la preservación alveolar resultaba eficaz con la combinación de esta matriz junto a un injerto óseo particulado

(Cioban *et al.*, 2013). Otras publicaciones han avalado el uso de la esponja de colágeno con rhBMP-2 (INFUSE) para el uso clínico en odontología con un resultado para la preservación alveolar con un porcentaje de hueso vital del 49,6% y una desviación estándar del 10,8% (Wallace *et al.*, 2014).

Con estas publicaciones nos preguntábamos si podríamos modificar una matriz de colágeno como Mucograft y darle la capacidad de INFUSE con la combinación de las micropartículas de quitina activadas con rhBMP-2. La única publicación que hemos encontrado en la literatura que haya realizado algo parecido es la de Ramalingam, que evaluó histológicamente la eficacia de Mucograft respecto a membranas de colágeno convencionales para la regeneración ósea guiada en defectos de calota en el modelo animal de rata (Ramalingam *et al.*, 2016).

Al ser más pequeño el modelo animal, el tamaño del defecto también debía ser menor, en este caso 4,6 mm de diámetro. En este trabajo se definieron tres grupos: control Mucograft; Mucograft con un aloinjerto humano particulado Puros (Zimmer Biomet Dental, USA) y Membrana de colágeno con aloinjerto. Colocaron las membranas en la base del defecto, para aislar la lámina dura y depositaron el aloinjerto Puros, que contiene BMP-2, BMP-4 y BMP7 (Shi *et al.*, 2011). Por último, se cubrieron los defectos rellenos con otra capa de membrana de colágeno o de Mucograft, según corresponda y se esperó ocho semanas para sacrificar a los animales.

En el estudio solo se hicieron análisis cualitativos histológicos con una tinción de hematoxilina-eosina. El empleo de Mucograft en la regeneración, mostró la formación de un puente de tejido conectivo que se extendía por todo el defecto. Pequeñas cantidades de tejido óseo neoformado aparecían encapsuladas en el tejido conectivo, cercano a la periferia del defecto. Se distinguían restos de colágeno del xenoinjerto en el interior del defecto. Al combinarlo con el aloinjerto, la cantidad de tejido óseo neoformado fue mucho mayor, pero con interposición de tejido conectivo fibroso y algunas áreas mostraron tejido óseo encapsulado. También en esta muestra se encontraron restos de xenoinjerto tanto provenientes del colágeno de la matriz, como del aloinjerto particulado.

En comparación con nuestros resultados, el análisis histológico reveló un relleno del defecto en gran medida por los restos del xenoinjerto de colágeno y muy poco tejido óseo formado. Al realizar la histomorfometría, pudimos determinar los porcentajes de relleno en el defecto de 8 mm y en el caso del tejido óseo fueron los siguientes: Mucograft se logró un porcentaje de  $12,02 \pm 3,29$ ; Mucograft con quitina,  $48,56 \pm 0,56$ ; Mucograft con rhBMP-2  $15,31 \pm 4,42$  y Mucograft con quitina+rhBMP-2  $20,23 \pm 3,77$ . Posiblemente los

resultados obtenidos se deban a que la capa compacta de Mucograft, que posee una superficie de baja porosidad, podría afectar negativamente a la osificación, dificultando el paso de las células óseas (Ghanaati *et al.*, 2011). En vista de nuestros resultados podemos afirmar que la matriz tridimensional de colágeno Mucograft, no es la adecuada tanto por sí sola como con la adición de quitina activada con rhBMP-2 para la regeneración ósea.

Otro motivo por el que se hayan obtenido estos resultados en nuestro experimento, se deban al soporte empleado, la quitina. Mientras que en la literatura se han utilizado heparina o colágeno (Huh *et al.*, 2015; Ramalingam *et al.*, 2016), los resultados obtenidos con este biomaterial han sido superiores y es debido a sus propiedades inherentes.

#### **4. Quitina en biomedicina y odontología**

El empleo de micropartículas de quitina como transportador de rhBMP-2 ha aumentado la regeneración ósea y ha presentado buena biocompatibilidad en los tejidos analizados. Tras las cirugías, no se ha observado la aparición de tejido de granulación u otras consecuencias de respuesta inmune. En este caso, difiere del efecto descrito del quitosano, más estudiado en el campo de la ingeniería de tejidos. Este biomaterial puede presentar una respuesta inmune más aguda tras su implantación. Por ejemplo, se ha detectado la formación de tejido de granulación en las lesiones dermo-epidérmicas (Shi *et al.*, 2006). Además, se ha descrito un efecto estimulante del quitosano en las células inflamatorias, que inhibe el crecimiento bacteriano pero que puede conducir a la respuesta inflamatoria sobreexpresada *in vivo* (Zhang *et al.*, 1999). En cambio, existen varios estudios que muestran que la quitina tiene una respuesta inflamatoria más leve (Baek *et al.*, 2016), algo que concuerda con nuestras observaciones.

El uso de la quitina ofrece varias ventajas. En primer lugar, su biocompatibilidad y biodegradabilidad, debida a su degradación por enzimas a N-acetilglucosamina, que permite que sea utilizada en los procesos biológicos de reparación de tejidos. La quitina actúa como un andamiaje temporal, en espera de la resorción del injerto y su sustitución por hueso natural. En segundo lugar, las características físicas proporcionan propiedades mecánicas adecuadas, lo que proporciona una alta capacidad de soporte de carga, así como conferir características de estabilidad del implante (Ito, 1991).

La capacidad que tiene la quitina (y su derivado el quitosano) para obtenerse en fibras, filmes, esponjas, esferas... ayuda para poder adaptarla a las necesidades clínicas (Kardas *et al.*, 2012). Además, también se contempla actualmente la aplicación de la nanotecnología

para obtener mejores resultados, utilizando nanofibras de quitina y quitosano como transportadores de drogas, células y factores de crecimiento (Elieh-Ali-Komi *et al.*, 2016). Concretamente, las nanofibras de quitina han mostrado su capacidad para la liberación controlada de drogas, debido a su gran área de superficie específica y al corto periodo de difusión de fármacos, dando como resultado una mayor velocidad global de liberación en comparación con otros materiales (Azuma *et al.*, 2014).

La terapia celular, que persigue la regeneración de un tejido u órgano introduciendo las células adecuadas, también se pueden beneficiar de este polímero natural. La configuración de nanofibras de quitina en microesferas, tiene un potencial para servir de transportador tridimensional de células, factores biológicos o andamiaje, por lo que los resultados aplicables a la ingeniería de tejidos son muy prometedores (Duan *et al.*, 2015). Por todas estas características, las micropartículas de quitina son un transportador ideal para la rhBMP-2 y ha permitido mejorar los porcentajes de regeneración de los defectos óseos. Además, se observó una menor presencia dentro de las muestras de la cantidad de xenoinjerto óseo bovino remanente tras este tratamiento.

## **5. Degradación del Xenoinjerto bovino óseo**

Se ha demostrado que las partículas de xenoinjerto colocadas en un defecto óseo, son rodeadas lentamente por el tejido óseo del hospedador. Sin embargo, una vez incorporado, se ha descrito que el componente mineral del hueso bovino aparentemente no participa activamente en una mayor remodelación del tejido (Berglundh y Lindhe 1997; Iezzy *et al.*, 2008; Traini *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha sugerido que las partículas del injerto se mantienen en el hueso como cuerpos extraños inertes, rodeadas por una mezcla de tejido y hueso laminar, y contrarrestando la reducción ósea post-extracción dental (Araújo *et al.*, 2008; Araújo y Lindhe 2009). Sin embargo, no todos los estudios examinados en la bibliografía otorgan un papel pasivo al xenoinjerto implantado. Como ejemplo, algunos estudios clínicos y en animales han informado que después de varios meses de cicatrización, las partículas de Bio-Oss empleadas mostraron osteoclastos en su superficie (Hürzeler *et al.*, 1997; Zitzmann *et al.*, 2001; Hämmerle *et al.*, 1998).

El injerto xenogénico (Bio-Oss Collagen) utilizado en el experimento de Araújo, se compone de gránulos de Bio-Oss de hueso esponjoso, de dimensión variable que se incluye en una red de colágeno porcino purificada (tipo I). La cantidad de componente mineral se mantuvo sin cambios (aproximadamente 20% del volumen del alveolo) en la

muestra que se tomó, durante todo el período de 4 semanas, mientras que la porción de colágeno se eliminó rápidamente. Grandes cantidades de colágeno porcino podían ser identificadas en la primera semana de la cicatrización. Posterior a esa primera semana, no hay restos de colágeno en las histologías (Araújo *et al.*, 2010).

Los resultados anteriores demuestran que las partículas inorgánicas de xenoinjerto bovino (tanto Bio-Oss como Cerabone), colocados en un defecto óseo, durante la curación puede quedar cubiertas por osteopontina (OPN), proteína producida por las diferentes células mesenquimales o hematopoyéticas. Por lo tanto, se establece un mecanismo, aún sin determinar, que permite a los osteoclastos se unan al xenoinjerto y permitir la reabsorción. En el estudio de Araújo, sin embargo, la cantidad de resorción del material de Bio-Oss que era muy limitada, no hubo una reducción significativa del volumen ocupado por Bio-Oss en el intervalo entre 1 y 4 semanas.

Araújo observó que en lugares donde se alojan las partículas más grandes de Bio-Oss, había una frontera clara entre el biomaterial y el hueso huésped, mientras que en los sitios que albergaba partículas pequeñas (20-50  $\mu\text{m}$ ) no se apreciaban límites entre el tejido óseo y el xenoinjerto. Durante el proceso posterior de remodelación del tejido, las partículas más pequeñas aparentemente no sólo sirvieron como un andamio para la formación de hueso nuevo, sino también parecían haberse convertido en una parte integral del tejido óseo nuevo (Araújo *et al.*, 2010).

Los motivos por los que en nuestros resultados se haya detectado una disminución del porcentaje del xenoinjerto al aplicar rhBMP-2 podrían explicarse por el papel de la proteína y su concentración. A una dosis alta, puede activar también a los osteoclastos y permitir la resorción del xenoinjerto (Seeherman *et al.*, 2010). Esta función bifásica (activación de osteoblastos y osteoclastos), da como resultado el aumento de la formación ósea mientras también activa la resorción del tejido. Este proceso se conoce como el mecanismo de remodelación ósea (Kamiya *et al.*, 2008), ajustado en un fino equilibrio.

Las esponjas de colágeno requieren de altas dosis de rhBMP-2 para lograr una formación ósea estable debido a su rápida liberación. (Swiontkowski *et al.*, 2006) Esto podría explicar la deformación del defecto óseo en nuestras muestras donde se utilizó Mucograft con rhBMP-2.

Kim y colaboradores, diseñaron un estudio para observar la relación dosis-efecto *in vivo* de la rhBMP-2 a concentraciones entre 5 y 20  $\mu\text{g}$  en esponjas de colágeno, injertadas en un

defecto de hueso de calota de 8 mm. Al administrar 20 µg de rhBMP-2, tras una semana se genera una respuesta de resorción temprana por la alta dosis. Sin embargo, también investigaron la formación ósea temprana, examinando los marcadores de expresión de los osteoblastos mediante RT-PCR (cbfa1, osterix, ALP y VEGF). La expresión de osterix, ALP y VEGF fue mayor en el grupo de 20 µg que en el de 5 µg ( $p < 0,01$ ). Para cbfa1 no hubo diferencias significativas entre las dos dosis (Kim *et al.*, 2014).

Los autores tienen la hipótesis que la rhBMP-2 tiene su papel en la resorción ósea en la ruta de señalización c-Fos/NFATc1, debido a que esta ruta es clave en la regulación de la osteoclastogénesis, y se observó activada en estos experimentos (Takayanagi *et al.*, 2007). De cara a futuras investigaciones, sería necesario comprobar esta hipótesis mediante el empleo de técnicas de biología molecular (como RT-PCR) empleando nuestras condiciones: una dosis de 50 µg, pero liberada de forma controlada por micropartículas de quitina. En base a los trabajos publicados y a los resultados obtenidos, nos hace pensar que nuestras condiciones consiguen una expresión temprana de la osteoclastogénesis que facilitaría la degradación de las partículas del xenoinjerto óseo y posterior a esta fase, la rhBMP-2 beneficiaría la activación de la osteogénesis.

Al analizar estos resultados prometedores, se podría pensar que el uso de este biomaterial en humanos es posible, pero el proceso para aprobar su uso como tratamiento requiere de mayor cantidad de estudios experimentales.

## **6. Uso futuro en humanos**

Los ensayos preclínicos en animales son un punto de partida necesario en las etapas para la aprobación de un ensayo clínico en humanos. En nuestro caso, las partículas de quitina/rhBMP-2 producen una mejora del uso de un producto sanitario y este deberá superar las etapas necesarias de aprobación de un ensayo clínico de productos sanitarios. En la solicitud de ensayo clínico se deberán incluir los resultados de los estudios básicos y preclínicos y el diseño del futuro estudio clínico. Además de la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), los ensayos serán supervisados por Comités éticos de investigación clínica para proteger los derechos y seguridad de los participantes.

El descubrimiento de moléculas y nuevos elementos, en este caso factores de crecimiento (como la rhBMP-2), deben demostrar su proceso de síntesis, caracterización y pruebas de su eficacia.

Son necesarios también estudios de liberación de la proteína desde el material para determinar los efectos a distintas dosis y su distribución en el organismo. El producto deberá ser fabricado bajo normas de calidad.

Por tanto, en base a nuestros resultados para proponer a nivel clínico la regeneración ósea con quitina/rhBMP-2 y xenoinjerto necesitaremos realizar la experimentación para demostrar la eficacia del producto en otros modelos animales como por ejemplo cerdos y ovejas.

La ingeniería de tejidos ósea está obteniendo mejores resultados con las diferentes técnicas que se están desarrollando actualmente y también mejorando el conocimiento de aquellas que ya han sido aprobadas pero que se desconocen sus efectos adversos.

En nuestros experimentos, utilizando una matriz mineral de hidroxiapatita con una pequeña cantidad de contenido reabsorbible, a modo de soporte estructural donde contenga a un elemento portador de rhBMP-2, en este caso las micropartículas de quitina, mejoran el porcentaje de la regeneración del defecto óseo. Es gracias a este resultado que defendemos su uso futuro en el campo de la regeneración ósea.



## VIII. Conclusiones

1. Tras evaluar diversas aproximaciones quirúrgicas, se desarrolló un método de cultivo de embriones de pollo *ex ovo* capaz de aumentar la supervivencia de los embriones en ausencia de contaminación. Además, se optimizó la técnica histológica apropiada para el estudio embrionario.
2. La proteína rhBMP-2 tiene capacidad de inducir la formación de fenotipo osteoblastico en el embrión de pollo de St26 tras la implantación en el mesénquima mandibular. Por si sola, la quitina ha demostrado una excelente biocompatibilidad. Sin embargo, la quitina activada puede ocasionar efectos colaterales perjudiciales si no se controla la localización de la implantación o la dosis, (aparición de edema).
3. Las micropartículas de quitina activadas con rhBMP-2 en combinación con los diferentes xenoinjertos, ofrecen en general mejores tasas de regeneración en el modelo de calota de conejo que la quitina por sí sola y mejor resultado que los materiales control.
4. La matriz de colágeno Mucograft, ya sea por sí sola o con quitina/rhBMP-2, no ha resultado idónea para la regeneración de defectos óseos. Se obtuvo una mejora significativa en la formación de tejido óseo empleando un xenoinjerto mineral de hidroxiapatita (Cerabone) activado con quitina/rhBMP-2 respecto a su control. El material Bio-Oss Collagen, con un contenido orgánico del 10% obtuvo los mejores valores de regeneración ósea, siendo superiores con el uso de quitina/rhBMP-2. Además, el tratamiento con quitina/rhBMP-2 unido a un xenoinjerto favorece la resorción del mismo y no impide la osificación del defecto.



## IX. Bibliografía

Abarrategi A, Moreno Vicente C, Ramos V, Aranaz I, Casado JV, Lopez-Lacomba JL. Improvement of Porous beta TCP Scaffolds with rhBMP 2 Chitosan Carrier Film for Bone Tissue Application. *Tissue Engineering Part A*. 2008a;14(8):1305-1319.

Aiba S, Izume M, Minoura N. Studies on chitin. 2. Preparation and properties of chitin membranes Carbohydr. *Polym*. 1985; (5), 4, 285-295.

Aichelmann-Reidy ME, Heath CD, Reynolds MA. Clinical evaluation of calcium sulfate in combination with demineralized freeze-dried bone allograft for the treatment of human intraosseous defects. *J Periodontol*. 2004;75:340-7.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001;10:S96-S101.

Amerio P, Vianale G, Reale M, Muraro R, Tulli A, Piattelli A. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. *Clin Oral Implant Res*. 2010; 21, 650-655.

Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *The Interational Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 2008; 28: 123-135.

Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen. A 6 month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*. 2009; 20: 433-440.

Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res*. 2010; 21, 55-64.

Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA. Bone regeneration and stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011;15(4):718-746.

Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Research*. 2004; 7:15-31.

Auerbach R, Kubai L, Knighton D & Folkman J. A simple procedure for long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol*. 1974; 41, 391-394.

- Austin PR, Castle JE, Albisetti CJ, *Chitin and Chitosan*. Ed. Elsevier, London. 1989; 749.
- Azuma K, Ifuku S, Osaki T, Okamoto Y, Minami S. Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers. *J Biomed Nanotechnol*. 2014; Oct;10(10):2891-920.
- Baek YJ, Kim JH, Song JM, Yoon SY, Kim HS, Shin SH. Chitin-fibroin-hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration: micro-computed tomography evaluation in a rat model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2016; Mar 22;38(1):14.
- Barlow AJ, Francis-West PH. Ectopic application of recombinant BMP-2 and BMP-4 can change patterning of developing chick facial primordia. *Development*. 1997; 124:391-398.
- Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Experimental cell research*. 2001; vol. 268, no. 2, pp. 189-200.
- Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss . An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*. 1997; 8: 117–124.
- Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP & Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research*. 2003; 14: 251–262.
- Berton G, Lowell CA. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal*. 1999; 11:621.
- Bessa PC, Casal M, Reis R. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2008b; Vol 2, no. 1, pp. 1-13.
- Bessa PC, Pedro AJ, Klösch B, Nobre A, van Griensven M, Reis RL, Casal M. Osteoinduction in human fat-derived stem cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*. 2007; vol. 30, no 1, pp. 15.
- Bessho K, Konishi Y, Kaihara S, Fujimura K, Okubo Y, Iizuka T. Bone induction by *Escherichia coli* -derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000, vol. 38, no. 6, pp. 645-649.

Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Tani Y, Iizuka T. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1999; vol. 37, no. 1, pp. 2-5.

Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury International Journal of the Care of the Injured*. 2007; 1 (38): 26-32.

Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury*. 2011; 42, S26–S29.

Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*. 2012; 10 (30): 548-54.

Bosshardt DD, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Lang NP. The role of bone debris in early healing adjacent to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in man. *Clinical Oral Implants Research*. 2011; 22: 357–364.

Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, Triplett RG. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63:1693–1707.


Braconnot H. Sur la nature des champignons. *Ann Chi Phys*. 1811; 79, 265-304.

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: A critical review. *Cellular signaling*. 2011; 23: 609-620.

Brine CJ, Austin PR. Renatured Chitin Fibrils, Films, and Filaments. *Amer. Chem. Soc. Marine Chemistry in the Coastal Environment*. 1975; Chapter 31, pp 505–518.

Brouwer J, Leeuwen-Herbets T, Otting-Ruit M. Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clinical Chimia Acta*. 1984; 142: 21-30.

Brugmann SA, Tapadia MD, Helms JA. The molecular origins of species-specific facial pattern. *Curr Top Dev Biol*. 2006; 73, 1–42.

- Cao X, Chen D. The BMP signaling and *in vivo* bone formation. *Gene*. 2005; 357: 1-8.
- Caplan AI. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Engineering*. 2000; 6: 1-8.
- Carrel A, Burrows MT. Cultivation of tissues in vitro and its technique. *J Exp Med*. 1911; 13:387-398.
- Centres for disease control and prevention (CDC) Update: Allograft-associated bacterial infections: United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:207-10.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*. 2007; vol. 25, no. 11, pp. 2739-2749.
-  Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn*. 2001; 220:284-289.
- Chen G, Deng C, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int J Biol Sci*. 2012; 8(2):272-288.
- Chen J, Singh K, Mukherjee BB & Sodek J. Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix*. 1993; vol. 13, no. 2, pp. 113-123.
- Children JG. Lamarck's genera of shells. *Zool J*. 1824; 1, 101.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002; 17, 513-520.
- Choi JH, Keum KC & Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*. 2006; vol. 61, no. 3, pp. 876-885.

Cioban C, Zaganescu R, Roman A. Early healing after ridge preservation with a new collagen matrix in dog extraction sockets: Preliminary observations. *J Morphol Embryol*. 2013; 54:125–130.

Copray JC, Jansen HW, Duterloo HS. Growth and growth pressure of mandibular condylar and some primary cartilages of the rat *in vitro*. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 1986; 90, 19–28.

Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2010; 30: 1104–1109.

Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. Bone tissue engineering. *Nat. Med*. 1995; 1, 1322–1324.

Crubézy E, Murail P, Girard L, Bernadou JP. False teeth of the roman world. *Nature*. 1998; 391(6662):29.

Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor B1 mRNS expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:11740–4.

Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*. 2002; 143(4):1545–53.

Degidi M, Scarano A, Petrone G, Piattelli A. Histologic analysis of clinically retrieved immediately loaded titanium implants: a report of 11 cases. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2003; 5: 89–93.

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *The FASEB Journal*. 1993; vol. 7, no. 15, pp. 1475-1482.

Dieffenbach JF. Nonnulla de regeneratione et transplantatione. Richter. 1822, Würzburg.

Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP. Chick *ex ovo* Culture and *ex ovo* CAM Assay: How it Really Works. *J Vis Exp*. 2009; Nov 30, (33).

Duan B, Zheng X, Xia Z. Highly biocompatible nanofibrous microspheres self-assembled from chitin in NaOH/urea aqueous solution as cell carriers, *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2015; 54 (17): 5152-5156.

Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells*, 2007; 25 (3): 544-552.

Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2004; Jan; Vol. 63, pp 20-31.

Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH & Benhaim P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *Journal of orthopaedic research*. 2003; vol. 21, no. 4, pp. 622-629.

Ekanayake S, Hall BK. The in vivo and in vitro effects of bone morphogenetic protein-2 on the development of the chick mandible. *Int J Dev Biol*. 1997; Feb;41(1):67-81.

Elieh-Ali-Komi D, Hamblin MR. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int J Adv Res (Indore)*. 2016; Mar;4(3):411-427.

Epstein NE. Pros, cons and cost of infuse in spinal surgery. *Surgical Neurology International*. 2011; 2: 10.

Esposito, M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: Bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; 16, CD003607.

Falk M, Smith DG, McLachlan J, McInnes AG. Studies on chitan ( $\beta$ -(14)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan) fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt. II. Proton magnetic resonance, infrared, and X-ray studies. *Can J Chem*. 1966; 44: 2269-2281.

Ferencyk M, Rovensky J, Mat'ha V, Herold M. *Kompendium der Immunologie*. 2006; Wien: Springer.

Forriol F, Esparza R. Tissue engineering: Application of pluripotent stem cells in traumatology and orthopedic surgery. *Trauma Fundación MAPFRE*. 2008; 19 (2): 88-101.

Frame JW. Porous calcium sulphate dihydrate as a biodegradable implant in bone. *J Dent*. 1975; 3:177-87.

Friedl P, Bröcker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000; 57: 41-64.

Fiedler J, Röderer G, Günther KP. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*. 2002; 87:305-12.

Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, Toljanic J, Jones A, Nevins M. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol*. 2005; 76(4):605-613.

Firth AL, Yuan JX. Identification of functional progenitor cells in the pulmonary vasculature, *Pulmonary circulation*. 2012; vol. 2, no. 1, pp. 84-100.

Galed-Ceresuela. Biopolímeros Quitina/Quitosano: Optimización de los procesos de Obtención y Caracterización Funcional Estudios sobre Quitina y Quitosana. Tesis para optar al Grado de Doctor. 2006.

Garimella R, Tague SE, Zhang J, Belibi F, Nahar N, Sun BH, Insogna K, Wang J, Anderson HC. Expression and synthesis of bone morphogenetic proteins by osteoclasts: a possible path to anabolic bone remodeling. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2008; 56: 569-577.

Geuze RE, Theyse LF, Kempen DH, Hazewinkel HA, Kraak HY, Oner FC, Dhert WJ, Alblas JA. differential effect of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor release timing on osteogenesis at ectopic and orthotopic sites in a large animal model. *Tissue Eng*. 2012 Part A; Oct;18(19-20):2052-62.

Ghanaati S, Schlee M, Webber JM, Willershausen I, Barbeck M, Balic E, et al.. Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix *in vivo* and its translation to the clinic. *Biomed Mater.* 2011; 6:015010.

Gortari MC, Hours RA. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electron J Biotechnol.* 2013; 16, 14–14.

Guan G, Shi S, Kramer PR. Role of adult stem cells in craniofacial growth and repair. *Semin Orthod.* 2005;11:227-33.

Gueorguieva L, Vallejo LF, Rinas U, Seidel-Morgenstern A. Discontinuous and continuous separation of the monomeric and dimeric forms of human bone morphogenetic protein-2 from renaturation batches. *Journal of Chromatography A.* 2006; vol. 1135, no. 2, pp. 142-150.

Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* 2009; 19:71-88.

Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett.* 2009; 31, 1817–1824.

Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett.* 2009; 31, 1825–1835.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn.* 1992; Dec;195(4):231-72.

Hämmerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clinical Oral Implants Research.* 1998; 9: 151–162.

Hankiewicz J, Swierczek E. Lysozyme in human body fluids. *Clinica Chimia Acta.* 1974; 57: 205- 9.

Hänseler P, Ehrbar M, Kruse A, Fischer E, Schibli R, Ghayor C, Weber FE .Delivery of BMP-2 by two clinically available apatite materials: In vitro and in vivo comparison. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103, 628–638.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; vol. 423, no. 6937, pp. 349-355.

Hauschka PV. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev*. 1989; 69, 990–1047

Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*. 2002; 46: 2587–2597.

Holleville N, Mateos S, Bontoux M, Bollerot K, Monsoro-Burq AH. Dlx5 drives Runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Dev Biol*. 2007; 304:860-74.

Hollister MC, Weintraub JA. The association of oral status with systemic health, quality of life, and economic productivity. *J Dent Educ*. 1993; 57(12):901–12.

Hu ZM, Peel SAF, Ho SKC, Sandor GKB, Clokie CML. Induction of Bone Matrix Protein Expression by Native Bone Matrix Proteins in C2C12 Culture. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2009; vol. 22, no. 2, pp. 164-169.

Huh JB, Yang JJ, Choi KH, Bae JH, Lee JY, Kim SE, Shin SW. Effect of rhBMP-2 Immobilized Anorganic Bovine Bone Matrix on Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2015; Jul 14; 16(7):16034-52.

Hunter J. The natural history of the human teeth. *Johnson*. 1771, London.

Hürzeler MB, Quiñones CR, Kirsch A, Gloker C, Schüpbach P, Strub JR, Caffesse RG. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clinical Oral Implants Research*. 1997; 8: 476–486.

Iezzy G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piatelli A. Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years insertion in a sinus augmented with anorganic bone. *Journal of Periodontology*. 2008; 79: 192–198.

INFUSE Bone Graft package insert. Available at: [www.infusebonegraft.com/spine\\_package\\_insert.pdf](http://www.infusebonegraft.com/spine_package_insert.pdf). Accessed September 21, 2012.

Ito M. In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone-filling paste. *Biomaterials*. 1991; Jan;12(1):41-5.

Javed A, Afzal F, Bae JS, Gutierrez S, Zaidi K, Pratap J. Specific residues of RUNX2 are obligatory for formation of BMP2-induced RUNX2-SMAD complex to promote osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189:133-7.

Jiang X. On novel options for oromaxillofacial functional restoration. *Int J Prosthodont*. 2012; 25, 132–134.

Jonason JH, Xiao G, Zhang M, Xing L, Chen D. Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage. *J Dent Res*. 2009; 88:693-703.

Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CH, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clin Oral Implant Res*. 2003; 14, 556–568.

Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hammerle CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clin Oral Implant Res*. 2008; 19, 188–195.

Kalamajski S, Oldberg Å. Fibromodulin Binds Collagen Type I via Glu-353 and Lys-355 in Leucine-rich Repeat 11. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; vol. 282, no. 37, pp. 26740-26745.

Kallai I, Lenthe GH, Ruffoni D, Zilbermana Y, Müller R, Pelled G, Gazit D. Quantitative, structural and image-based mechanical analysis of nonunion fracture repaired by genetically engineered mesenchymal stem cells. *Biomechanics*. 2010; 43 (12): 2315-2320.

Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, Mochida Y, Yamauchi M, Kronenberg HM. BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development*. 2008; 135:3801e11.

Kardas I, Struszczyk MH, Kucharska M, van den Broek LAM, van Dam JEG, Ciechańska D. Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications. In *The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE). Research Initiatives and Results*; Narvard. P., Ed.; Springer-Verlag: Wien, Austria, 2012; pp. 329–374.

Kato M, Toyoda H, Namikawa T, Hoshino M, Terai H, Miyamoto S, Takaoka K. Optimized use of a biodegradable polymer as a carrier material for the local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Biomaterials*. 2006; 27, 2035–2041.

Kempen DR, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Classic KL, Dhert WA, Yaszemski MJ. Retention of *in vitro* and *in vivo* BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2008; 29: 3245-3252.

Khan SN, Lane JM. The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2004; 4 (5): 741-8.

Khor E. Chitin: A biomaterial in waiting. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2002; 6, 313–317.

Kim RY, Oh JH, Lee BS, Seo YK, Hwang SJ, Kim IS. The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and *in vivo* bone resorption. *Biomaterials*. 2014; Feb;35(6):1869-81.

Kim SE, Song SH, Yun YP, Choi BJ, Kwon IK, Bae MS, Moon HJ, Kwon YD. The effect of immobilization of heparin and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. *Biomaterials*. 2011; 32, 366–373.

King WJ, Krebsbach PH. Growth factor delivery: How surface interactions modulate release *in vitro* and *in vivo*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 1239-1256.

Kodama T, Goto T, Miyazaki T, Takahashi T. Bone formation on apatite-coated titanium incorporated with bone morphogenetic protein and heparin. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 2008; 23, 1013–1019.

Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquetl F, Ventura F, Grant RA, Chen G, Wrana J, Massague J, Rosenbaum JS. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 1994; 14, 5961–5974.

Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers.* 2000; 46(1):1-27.

Kumar MM, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Dom AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews.* 2004; 10: 6017-6084.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 14, 260 (5110): 920-6.

Lee K, Kim H, Li Q, Chi X, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim E, Choi J, Ryoo H, Bae S. Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Molecular and cellular biology.* 2000; 20:8783-92.

Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309:689-94.

Lee MH, Oh N, Lee SW, Leesungbok R, Kim SE, Yun YP, Kang JH. Factors influencing osteoblast maturation on microgrooved titanium substrata. *Biomaterials.* 2010; 31: 3804–3815.

Li B, Wang H, Qiu G, Su X, Wu Z. Synergistic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Bone Morphogenetic Proteins Induced Bone Formation In Vivo: Influencing Factors and Future Research Directions. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:2869572.

Li G, Cui Y, McIlmurray L. rhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res.* 2005; 23:680–5.

Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, Lian JB, Stein GS. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; vol. 105, no. 37, pp. 13906-13911.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Journal of bone and joint surgery*. 2002; 84-A (6): 1032-1044.

Lissenberg-Thunnissen SN, Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International Orthopaedics*. 2011; 35:1271-1280.

Liu HW, Chen CH, Tsai CL, Lin IH, Hsiue GH. Heterobifunctional poly(ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis. *Tissue Eng*. 2007; 13, 1113-1124.

Lo KH, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein based surgical repair. *Advanced Drug delivery review*. 2012; 64 (12): 1277-1291.

Long S, Truong L, Bennett K, Phillips A, Wong-Staal F, Ma H. Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2006; vol. 46, no. 2, pp. 374-378.

Luo Q, Kang Q, Si W, Jiang W, Park JK, Peng Y, Li X, Luu HH, Luo J, Montag AG, Haydon RC, He T. Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Is Regulated by Wnt and Bone Morphogenetic Proteins Signaling in Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; Dec 31;279(53):55958-68.

Luu HH, Song W, Luo X, Manning D, Luo J, Deng Z, Sharff KA, Montag AG, Haydon RC, He T. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 2007; vol. 25, no. 5, pp. 665-677.

Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59(45):207-233.

Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkva A. Concise Review: Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem cells Translational Medicine*. 2012; 1: 142-149.

Milona M, Gough J, Edgar A. Expression of alternatively spliced isoforms of human Sp7 in osteoblast-like cells. *BMC Genomics*. 2003; vol. 4, no. 1, pp. 43.

Mina M. Regulation of mandibular growth and morphogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12(4):276-300.

Mina M, Wang YH, Ivanisevic AM, William B. Upholt and Rodgers. Region- and Stage-Specific Effects of FGFs and BMPs in Chick Mandibular Morphogenesis. *Development Dynamics*, 2002; 223:333–352.

Miron RJ, Bosshardt DD, Laugisch O, Dard M, Gemperli AC, Buser D, Gruber R, Sculean A. In vitro evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with enamel matrix derivative. *J Periodontol*. 2013; 84:1646–1654.

Misch C, Misch-Dietsh F, Singer M, Lyman M. Extraoral Autogenous Donor Bone Grafts for Endosteal Implants: Ilium and Tibia. In: Misch C, editor. *Contemporary Implant Dentistry*. Mosby Elsevier. 3rd. ed2008.

Misch C. Mandibular Donor Block Bone Grafts: symphysis and ramus. In: Misch C, editor. *Contemporary Implant Dentistry*. Mosby Elsevier. 3rd. edition ed2008. p. 975-1012.

Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response. *The AAPS Journal*. 2010; 12(2):188-196.

Murshed M. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol*. 2004; 165, 625–630.

Murugan R, Rao KP, Kumar TSS. Heat-deproteinated xenogeneic bone from slaughterhouse waste: Physico-chemical properties. *Bull Mater Sci*. 2003; 26:523–528.

Muzzarelli RA. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Molecular Life Science*. 1997; 53 (2): 131 - 140.

Muzzarelli RAA, Morganti G, Palombo P, Biagini G, Mattioli Belmonte M, Giantomassi F, Orlandi F, Muzzarelli C. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. *Carbohydr Polym*. 2007; 70, 274–284.

Muzzarelli RA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*. 2009; 76: 167-82.


Muzzarelli RA, Greco, F, Busilacchi A, Sollazzo V, Gigante A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymer*. 2012; 89: 723-739.

Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007; 32:762–798.

Nakajima M, Atsumi K, Kifune K. *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*. Ed. Academic Press, New York. 1984; 407.

Nguyen DT, Orgill DP, Murphy GF. *Biomaterials For Treating Skin Loss*. Chapter 4: The Pathophysiologic Basis for Wound Healing and Cutaneous Regeneration, 25–27. Boca Raton/ Cambridge, 2009; CRC Press (US) & Woodhead Publishing (UK/Europe).

Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signaling in craniofacial development. *Int J Dev Biol*. 2006; 50:511- 21.

Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic  augmentation procedures: A prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33, 157–163.

Nordtveit RJ, Vårum KM, Smidsrød O. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydrate Polymers*. 1994; 23 (4): 253- 260.

Odier A. Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes. *Mém Soc Hist Nat*. 1823; 1,29-42.

Opperman LA, Gakunga PT, Carlson DS. Genetic factors influencing morphogenesis and growth of sutures and synchondroses in the craniofacial complex. *Sem Orthod*. 2005; 11:199-208.

Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and genetic disease. *Genes Dev*. 2002; 16: 1446-65.

Pare A. *The works of that famous Chirurgion Ambrose Parey*. Cotes and Young. 1634, London.

Payne JM, Cobb CM, Rapley JW, Killoy WJ, Spencer P. Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol*. 1996; 67:236–44.

Pecora G, Baek SH, Rethnam S, Kim S. Barrier membrane techniques in endodontic microsurgery. *Dent Clin North Am*. 1997; 41:585–602.

Peng Y, Kang Q, Luo Q, Jiang W, Si W, Liu BA, Luu HH, Park JK, Li X, Luo J, Montag AG, Haydon RC, He TC. Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004; vol. 279, no. 31, pp. 32941-32949.

Power MJ, Fottrell PF. Osteocalcin: diagnostic methods and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1991; 28(4):287-335.

Price PA. Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res*. 1989; 21, 51–57.

Ramachandra SS, Rana R, Reetika S, Jithendra KD. Options to avoid the second surgical site: a review of literature. *Cell Tissue Bank*. 2014; 15:297-305.

Ramalingam S, Basudan A, Babay N, Al-Rasheed A, Nooh N, Nagshbandi J, Aldahmash A, Atteya M, Al-Hezaimi K. Efficacy of Mucograft vs Conventional Resorbable Collagen Membranes in Guided Bone Regeneration Around Standardized Calvarial Defects in Rats: A Histologic and Biomechanical Assessment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016; 36 Suppl:s99-s107.

Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990; vol. 87, no. 12, pp. 4473-4475.

Reisine S, Locker D. *Social, psychological, and economic impacts of oral conditions and treatments*. In: Cohen LK, Gift HC, editors. Disease prevention and oral health promotion:

socio-dental sciences in action. Copenhagen (Denmark): Munksgaard and la Federation Dentaire Internationale; 1995. p. 33-71.

Rentsch C, Schneiders W, Manthey S, Rentsch B, Rammelt S. Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomatter*. 2014; 4: e27993.

Richards AG. *The Integument of Arthropods: the chemical Components and their Properties, the Anatomy and Development, and the Permeability*. Ed. University of Minnesota Press, 1951, Minneapolis.

Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human Bone Morphogenetic Protein 2 Contains a Heparin-Binding Site which Modifies Its Biological Activity. *European Journal of Biochemistry*. 1996; vol. 237, no. 1, pp. 295-302.

Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*. 2004; 4: 743-765.

Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft® prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009; 36:868- 876.

Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: A comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent*. 2006; 15, 197-207.

Schneider BF, Norton S. Equivalent ages in rat, mouse and chick embryos. *Teratology*. 1979; Jun;19(3):273-8.

Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*. 1999; vol. 287, pp. 103-115.

Schliephake H. Application of bone growth factors the potential of different carrier system. *Oral Maxillofacial Surgery*. 2010; 14:17-22.

Schock EN, Chang CF, Youngworth IA, Davey MG, Delany ME, Brugmann SA. Utilizing the chicken as an animal model for human craniofacial ciliopathies. *Dev Biol.* 2016; Jul 15;415(2):326-37.

Seeherman HJ, Li XJ, Bouxsein ML, Wozney JM. rhBMP-2 induces transient bone resorption followed by bone formation in a nonhuman primate core-defect model. *J Bone Jt Surg Am.* 2010; 92:411e26.

Semba I, Nonaka K, Takahashi I, Takahashi K, Dashner R, Shum L. Positionally-dependent chondrogenesis induced by BMP4 is co-regulated by sox9 and msx2. *Dev Dyn.* 2000; 217:401-414.

Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology letters.* 2011; vol. 33, pp. 1257.

Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *J Surg Res.* 2006; 133(2):185–92.

Shi Y, Dittman B, Atkinson B. Bone Morphogenic Protein (BMP) Content in Cancellous Bone: A Suitable Substrate For Allograft Stem Cells. *Allosource Scientific Data Series.* 2011; 4, 3.

Sigurdsson TJ, Nygaard L, Tatakis DN, Fu E, Turek TJ, Jin L, Wozney JM, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: Evaluation of rhBMP-2 carriers. *Int J Periodontics Restor Dent.* 1996; 16, 524–537.

Spears R, Svoboda KH. Growth factors and signaling proteins in craniofacial development. *Sem Orthod.* 2005; 11:184-98.

Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American Journal of Surgery.* 1998; 176: 26S–38S.

Strocchi R, Orsini G, Iezzi G, Scarano A, Rubini C, Pecora G. Bone regeneration with calcium sulfate: Evidence for increased angiogenesis in rabbits. *J Oral Implantol.* 2002; 28:273–8.

Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2010; 47, 1-4.

Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Jt Surg Am*. 2006; 88:1258e65.

Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science*. 2003; 2 (45): 57-73.

Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*. 2004; Mar;25(6):987-94.

Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB Journal*. 1997; 11: 51- 59.

Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1116:227e37.

Tatakis DN, Koh A, Jin L, Wozney JM, Rohrer MD, Wikesjo UM. Peri-implant bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a canine model: A dose-response study. *J Periodontal Res*. 2002; 37, 93-100.

Terbojevich M, Carraro C, Cosani A. Solution studies of the chitin-lithium chloride-N, N-dimethylacetamide system. *Carbohydr Res*. 1988; 180:73-86.

Teillet MA, Ziller C, Le Douarin NM. Quail-chick chimeras. *Meth Mol Biol*. 1999; 97:305-318.

Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration-communication of cells. *Clin Oral Impl Res*. 2011; 00, 1-9.

Traini, T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piatelli A. Histological microanalytical study of anorganic bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *Journal of Periodontology*. 2008; 79: 1232-1240.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*. 2003; vol. 5, no. 1, pp. 32-45.

Turhani D, Weissenböck M, Watzinger E, Yerit K, Cvikl B, Ewers R, Thurnher D. In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34, 543-550.

Uaesoontrachoon K, Yoo H, Tudor EM, Pike RN, Mackie EJ, Pagel CN. Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: Association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008; vol. 40, no. 10, pp. 2303-2314.

Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res*. 1999; 46, 193-202.

Uragami T, Ohsumi Y, Sugihara M. Studies on synthesis and permeability of special polymer membranes. *Polymer Bulletin*. 1981; 22, 1155.

Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150, 893-899.

Urist MR, Chang J, Lietze A, HuoY, Brownell A, DeLange R. Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide Fragments. *Methods in enzymology*. 1987; vol. 146, pp. 294-312.

Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006; Jul-Sep;10(3):569-76.

Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, Gross G, Weich HA, Rinas U. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2002; vol. 94, no. 2, pp. 185-194.

Vallejo LF, Rinas U. Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnology and bioengineering*. 2004a; vol. 85, no. 6, pp. 601-609.

Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascão R, Abdulghani S, Caetano-Lopes J, Ferreira A, Fonseca JE, Canhao H. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port*. 2012; Oct-Dec;37(4):294-300.

Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Hirschwald. 1858; Berlin.

Von Einem S, Schwarz E, Rudolph R. A novel "TWO-STEP" renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2. *Protein expression and purification*. 2010; vol. 73, no. 1, pp. 65-69.

Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Borgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal*. 2010; 3:mr1.

Walker MB, Trainor PA. Craniofacial malformations: intrinsic vs extrinsic neural crest cell defects in Treacher Collins and 22q11 deletion syndromes. *Clin. Genet*. 2006; 69:471-9.

Wallace SC, Pikos MA, Prasad H. De novo bone regeneration in human extraction sites using recombinant human bone morphogenetic protein-2/ACS: a clinical, histomorphometric, densitometric, and 3-dimensional cone-beam computerized tomographic scan evaluation. *Implant Dent*. 2014; Apr;23(2):132-7.

Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988; vol. 85, no. 24, pp. 9484-9488.

Wang YH, Rutherford B, Upholt WB, Mina M. Effects of BMP-7 on mouse tooth mesenchyme and chick mandibular mesenchyme. *Dev Dyn*. 1999; 216:320-335.

Watts WS. Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Clin Chem*. 1999; 45: 1359-68.

Wei L, Miron RJ, Shi B, Zhang Y. Osteoinductive and Osteopromotive variability among different demineralized bone allografts. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015; Jun 17(3):533-42.

Weintraub JA, Burt BA. Oral health status in the United States: tooth loss and edentulism. *J Dent Educ*. 1985; 49:368-78.

Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of Cell Science*. 2003; 116(Pt 16): 3269-3276.

Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Engineering*. 2005; 11: 1-18.

Xia L, Zeng D, Sun X, Xu Y, Xu L, Ye D, Zhang X, Jiang X, Zhang Z. Engineering of bone using rhBMP-2-loaded mesoporous silica bioglass and bone marrow stromal cells for oromaxillofacial bone regeneration. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013; 173, 155–165.

Yano K, Hoshino M, Ohta Y, Manaka T, Naka Y, Imai Y, Sebald W, Takaoka K. Osteoinductive capacity and heat stability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced by *Escherichia coli* and dimerized by biochemical processing. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2009; vol. 27, no 3, pp. 355-363.

Yi JJ, Barnes AP, Hand R, Polleux F, Ehlers MD. TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell*. 2010; 142:144-57.

Zhang C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *J Orthop Surg Res*. 2010; 5:37.

Zhang R, Ma PX. Poly(A-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res*. 1999; 44(4):446–55.

Zhao J, Zhang Z, Wang S, Sun X, Zhang X, Chen J, Kaplan DL, Jiang X. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone*. 2009; 45, 517–527.

Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Yanai T, Fukuda T, Chung UI, Koike T, Takaoka K, Kamijo R. Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem*. 2006; 281, 23246–23253.

Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP, Schüpbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Clinical Oral Implants Research*. 2001; 21: 288–295.