

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA



TRABAJO DE FIN DE MASTER

**Evaluación de biomateriales 3D basados en
Hidroxiapatita/Biosílíce en el proceso de regeneración ósea**

Estudio piloto *in vitro* – *in vivo*

Presentado por

Heberth Aldana Sepúlveda

Tutores:

Dr. José Vicente Sanz Casado

Dra. Ana Civantos Fernández

Máster en Ciencias Odontológicas

2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:	José V. Sanz Casado
---------------------	---------------------

del alumno/a

Nombre y apellidos	Heberth Aldana
--------------------	----------------

encuadrado en la línea de investigación

Ingeniería de Tejidos

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Evaluación de materiales 3D basados en hidroxiapatita / biosflice en el proceso de regeneración ósea. Estudio piloto in vitro e in vivo

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid, a 1 de Septiembre de 2015

Fdo: el profesor/a

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel (no es necesaria su encuadernación)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:	Ana Civantos Fernández
---------------------	------------------------

del alumno/a

Nombre y apellidos	Heberth Aldana Sepúlveda
--------------------	--------------------------

encuadrado en la línea de investigación

Ingeniería de Tejidos

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Evaluación de biomateriales 3D basados en Hidroxiapatita/Biosílice en el proceso de regeneración ósea. Estudio piloto *in vitro* e *in vivo*.

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid, a 1 de Septiembre de 2015.

Fdo: el profesor/a

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y una copia en papel (no es necesaria su encuadernación)

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Tejido óseo.....	1
1.2 Componentes estructurales	3
1.2.1 Matriz ósea orgánica.....	3
1.2.2 Matriz ósea inorgánica o Fase mineral	4
1.2.3 Células especializadas.....	5
1.3 Remodelado óseo.....	6
1.4 Injertos óseos	8
1.4.1 Injerto Autólogo.....	8
1.4.2 Aloinjertos	8
1.4.3 Xenoinjertos.....	8
1.4.4 Injertos sintéticos o aloplásticos	9
1.5 Propiedades de los Injertos	9
1.6 Materiales Aloplásticos.....	10
1.6.1 Cerámicas de Hidroxiapatita (HA)	12
1.6.2 Vidrios Bioactivos (Biovidrios BV)	13
1.7 Andamios en regeneración ósea.....	15
1.7.1 Fabricación de andamios por Robocasting	18
1.8 Activación con moléculas bioactivas (rhBMPs).....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Preparación de las muestras	26
4.2 Diseño experimental <i>in vitro</i>	29
4.3 Diseño experimental <i>in vivo</i>	31
5. RESULTADOS	40
5.1 Evaluación de la biocompatibilidad celular <i>in vitro</i>	40
5.2 Evaluación de la adhesión y proliferación celular <i>in vitro</i>	41
5.3 Evaluación macroscópica <i>in vivo</i>	41

5.4 Micro tomografía computarizada μ CT	45
5.5 Análisis histológico por microscopia.....	46
5.6 Escala Histológica.....	53
6. DISCUSIÓN.....	55
7. CONCLUSIONES.....	62
8. BIBLIOGRAFIA	63

1. INTRODUCCION

1.1 Tejido óseo

El tejido óseo es una variedad de tejido conectivo especializado compuesto principalmente por una matriz orgánica mineralizada, que representa alrededor de un 98% del volumen, y por células específicas, que representan el 2% restante. Tiene tres funciones principales: una función mecánica como soporte corporal y sitio de inserción muscular para la locomoción; una función protectora de los órganos vitales y la médula ósea; y finalmente una función metabólica como reserva de iones (especialmente calcio y fosfato) utilizado para el mantenimiento de la homeostasis, esencial para la vida (1).

El tejido óseo adulto está formado por hueso cortical o compacto que es el principal responsable de la integridad mecánica. Constituye el 80% del volumen total del hueso, y su unidad anatómica y funcional es el sistema de Havers. Está constituido por un canal central, alrededor del cual se agrupan laminillas con lagunas conteniendo células óseas, ya sean osteocitos u osteoblastos. Estas unidades estructurales también se denominan osteonas. Cada osteona consta de 4 a 20 laminillas concéntricas dispuestas alrededor de un grupo de vasos sanguíneos, albergados en el interior de un canal central llamado Conducto de Havers. En el interior de este conducto existen además terminaciones nerviosas amielínicas. Los conductos de Havers se comunican entre sí, con el periostio y también con la cavidad medular. La matriz ósea calcificada está organizada en laminillas. En cada laminilla hay fibras de colágeno y osteocitos en lagunas dispuestas regularmente. Los osteocitos introducen por los canalículos sus prolongaciones citoplasmáticas que contactan con las de osteocitos vecinos. Las lagunas más próximas

a los Conductos de Havers tienen canalículos a otras lagunas y al Conducto de Havers, llamado canal de Volkmann, interconectando las osteonas entre sí.

El hueso trabecular o esponjoso es el responsable fundamental de las demandas metabólicas y constituye el 20% del volumen total del hueso, a diferencia del cortical, no contiene osteonas, sino que las láminillas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas, dejando espacios que están rellenos de médula ósea roja. Los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. Dentro de las trabéculas están los osteocitos, que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde la misma, los osteoblastos y los osteoclastos (2). Véase Figura 1.

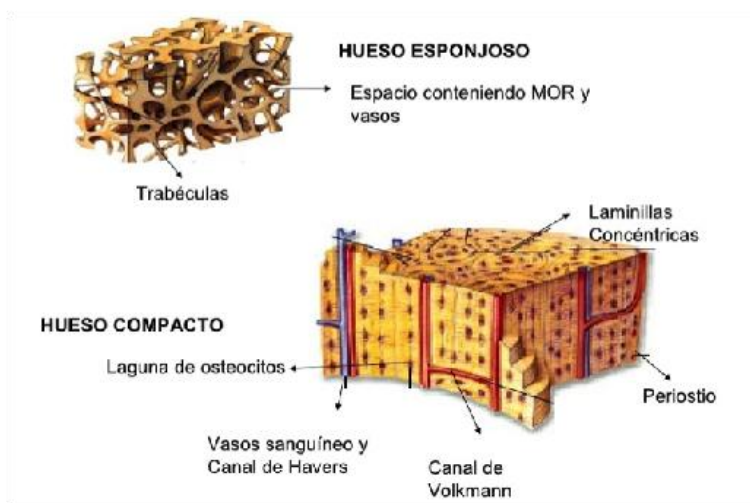


Fig.1.Unidad funcional del tejido óseo. MOR médula ósea roja (fuente: <http://image.slidesharecdn.com>)

1.2 Componentes estructurales

El tejido óseo está compuesto por una matriz ósea orgánica, una matriz ósea inorgánica o fase mineral, y células especializadas

1.2.1 Matriz ósea orgánica

La matriz intercelular ósea está formada por una matriz orgánica u osteoide que corresponde a la tercera parte del peso óseo. Entre el 85 - 90% de ella corresponde a fibras de colágeno, principalmente colágeno tipo I (95%) y colágeno tipo V (< 5%) organizadas en laminillas que se estabilizan mediante puentes de hidrógeno (3).

El resto de los componentes orgánicos son principalmente proteínas no colágenas sintetizadas principalmente por los osteoblastos, encontramos glicoproteínas como la osteonectina, fosfatasa alcalina (ALP) y la osteocalcina (OC), esta última la de mayor producción hasta el 1% de la matriz, y puede desempeñar un papel en la unión del calcio y la estabilización de la hidroxapatita en la matriz y / o la regulación de la formación de hueso. Los proteoglicanos como condroitín y queratán-sulfato, que intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Todas estas son moléculas ricas en grupos ácidos con gran tendencia a asociarse entre sí, capaces de unirse a iones calcio y que juegan un rol importante en el proceso de mineralización de la matriz ósea (4). Dentro de las proteínas no colágenas de la matriz también encontramos las de origen plasmático como la albúmina y la α 2-SH-glicoproteína sintetizada en el hígado, probablemente relacionada con la incorporación del calcio a la matriz osteoide; y los factores de crecimiento que son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otro lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la

diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina (5), capaces de intervenir en procesos de remodelación y regeneración ósea. Este proceso requiere de la diferenciación y el desarrollo de los osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras que dependen de la liberación de factores de crecimiento osteoinductores o osteopromotores, tales como proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y otros factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), véase Tabla 1 (6).

Colágeno	Tipo I, III, V, XII	
Factores de crecimiento	IGF I – II (<i>insulin growth factor</i>)	Estimula la proliferación de osteoblastos y la síntesis de la matriz ósea
	TGF β (<i>transforming growth factor-beta</i>)	Induce la apoptosis de células endoteliales y fibroblastos Induce la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos Estimula la quimiotaxis y la supervivencia de los osteoblastos.
	PDGF (<i>Platelet derived growth factor</i>)	Estimula la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos Estimula la proliferación de las células progenitoras mesenquimales
	BMPs 2,4	Estimula la migración y diferenciación de células progenitoras mesenquimales
	BMP 7	Estimula diferenciación de osteoblastos y condroblastos

Tabla 1. Proteínas y Factores de crecimiento involucrados en la síntesis de matriz y remodelado óseo.

1.2.2 Matriz ósea inorgánica o Fase mineral

La matriz inorgánica representa cerca del 65% del peso de la matriz ósea. Está constituida por sales minerales inorgánicas depositadas en el osteoide, que confieren al tejido su rigidez y dureza y actúan como una reserva de sales minerales, sensible a estímulos endocrinos. Los iones más abundantes son el fosfato y el calcio. Hay

también bicarbonato, magnesio, potasio, sodio, flúor y citrato en pequeñas cantidades. El fosfato de calcio amorfo y cristales de hidróxidos de calcio constituye cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que son aplanados y se adosan a lo largo de las fibrillas colágenas. Las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión (7).

1.2.3 Células especializadas

Constituye menos del 2% del volumen total del hueso, y son responsables del desarrollo y remodelado del esqueleto a través de su actividad metabólica. Se encuentran embebidas en lagunas dentro de la matriz ósea y coexisten varios tipos de células: los osteoblastos; los osteocitos y los osteoclastos. También se considerarse a este nivel las células osteoprogenitoras, las cuales proceden de células mesenquimales indiferenciadas que se encuentran en reposo y pueden transformarse en condrocitos, pre-osteoblastos o adipocitos según los estímulos correctos.

Osteoblasto: La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis. Son células grandes, de forma poliédrica, de origen mesenquimal, núcleo grande excéntrico, ribosomas abundante, rico en isoenzimas. Son las células primarias responsables de la formación de hueso, síntesis y deposición de las proteínas del hueso (osteóide), carecen de capacidad para migrar y reproducirse, por ende para que pueda formarse hueso en un sitio deben migrar células progenitoras mesenquimales indiferenciadas (células osteoprogenitoras) para proliferar y convertirse en osteoblastos (8). La actividad formadora de hueso siempre está acoplada con la resorción ósea iniciada y mantenida por los osteoclastos.

Osteocito: Es la célula ósea madura y está encerrado en la matriz ósea que antes secreto como osteoblasto. Sintetiza matriz ósea, al menos en un grado limitado. La muerte de los osteocitos por trauma o envejecimiento trae como consecuencia la resorción de la matriz ósea por actividad de los osteoclastos, seguida por reparación o remodelado del tejido óseo por actividad de los osteoblastos. Tiene un papel endocrino, como fuente de factores solubles y juega un papel en el metabolismo de calcio y fosfato (9).

Osteoclasto: Son células móviles, gigantes, multinucleadas, adheridas al tejido que debe ser removido, y pertenecen al sistema de los fagocitos. Suelen aparecer en los sitios de resorción ósea, estas células reabsorben el tejido por la liberación de hidrolasas lisosómicas del espacio intracelular. La resorción ósea se desarrolla en dos fases, primero se solubiliza el mineral y luego se digiere la matriz orgánica, hasta que finalmente los osteoclastos mueren por apoptosis (10).

1.3 Remodelado óseo

Una vez formado el hueso, el nuevo tejido mineralizado comienza un proceso de reestructuración que está en constante formación y resorción. Este fenómeno equilibrado permite, en condiciones normales, la renovación de un 5-10% del hueso total al año. A nivel microscópico, el remodelado óseo se produce en las unidades básicas multicelulares (*basic multicellular units* BMU), donde los osteoclastos resorben una cantidad determinada de hueso y los osteoblastos forman la matriz osteoide y la mineralizan para rellenar la cavidad previamente creada. En estas unidades hay osteoclastos, macrófagos, pre osteoblastos y osteoblastos y están regidos por una serie de factores, tanto generales como locales, permitiendo el normal funcionamiento del hueso y el mantenimiento de la masa ósea (11). Véase Figura 2.

Durante la formación de hueso, el remodelado permite la sustitución del hueso primario (*woven bone*), que tiene una baja capacidad de carga, con hueso laminar maduro (*lamellar bone*) que es más resistente a la carga.

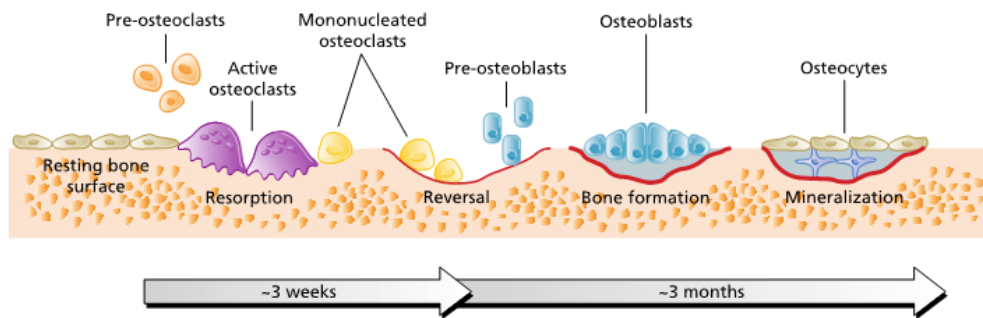


Fig. 2 Fases del remodelado óseo. Tomada de Clinical periodontology and implants dentistry Lindhe (6).

En los procesos de reparación o consolidación ósea, que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales, se precede al proceso de remodelado, una cascada de eventos que comprende una fase de inflamación y de reparación ósea. El proceso de reparación ósea es un proceso que generalmente tiene lugar de manera natural. Sin embargo, en los casos de fractura ósea grave, pérdida de hueso, o en aquellos casos en los que el hueso no se regenera adecuadamente, se hace necesaria la utilización de injertos o sustitutos óseos con la finalidad de restablecer la integridad anatómica y funcional alterada (12). La integración de los injertos óseos se puede definir como el proceso de interdigitación y englobamiento del hueso o material injertado por el nuevo tejido óseo que forma el receptor, y tiene muchas semejanzas con la reparación o consolidación de fracturas.

1.4 Injertos óseos

La reparación o reconstrucción de defectos como consecuencia de enfermedades o traumatismos, manejado por diferentes especialidades de la medicina, se ha tratado implantando tejido óseo autólogo, heterólogo (alogénico o xenogénico), o aloplástico.

1.4.1 Injerto Autólogo

El autoinjerto o injerto autólogo es el más usado y requiere de una zona donante del mismo paciente que se adapta según necesidades a la zona receptora. Cumple con todas las propiedades necesarias para la regeneración ósea, y evita la transmisión de enfermedades o rechazo inmunológico. Las zonas donantes intraorales más frecuentes son el mentón, la rama mandibular y la tuberosidad maxilar. Cuando existe limitación de área donante, se recurre a zonas extraorales como la calota, cresta iliaca y peroné, siendo procedimientos asociados a mayor morbilidad (13, 14).

1.4.2 Aloinjertos

En los aloinjertos el tejido se transfiere entre dos individuos genéticamente diferentes de la misma especie, tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras. Son una fuente ilimitada, y elimina la necesidad de un sitio donante, aunque con posibilidad de infecciones y respuesta antigénica.

1.4.3 Xenoinjertos

Cuando el material deriva de otra especie, se clasifican como xenoinjertos, están naturalmente desproteinizados y tienen propiedades osteoconductoras, con las mismas ventajas y desventajas que los aloinjertos. Actualmente se comercializan productos de origen bovino, porcino y equino. Numerosas investigaciones han referido el uso de este material en experimentación animal y humana.

1.4.4 Injertos sintéticos o aloplásticos

Por último están los materiales aloplásticos que se usan como rellenos y son de origen sintético con propiedades osteoconductoras. En este apartado encontramos las cerámicas fosfato cálcicas (CaPs), biovidrios, y polímeros.

1.5 Propiedades de los Injertos

El injerto óseo ideal debe ser en primer lugar osteogénico, es decir con capacidad de crear hueso donde antes no lo había, proceso mediado por células osteoprogenitoras. Las células son transportadas de una parte del organismo a otra, donde establecen centros de formación ósea, es el caso del hueso autólogo. También debe de ser osteoinductor, ser capaz de reclutar y transformar células mesenquimales en células osteo formadoras, proceso que es modulado por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. En la reparación de lesiones óseas destaca el uso de los aloinjertos y BMPs. Por último debe de ser osteoconductor, es decir con capacidad de guiar y soportar la neoformación de hueso nuevo, en él tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células mesenquimales, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. El andamio o matriz del material guía este crecimiento, un ejemplo es la hidroxiapatita sintética o los biovidrios. Además de las anteriores características biológicas, deben tener buenas propiedades mecánicas, ser fácil de manejar y adaptar, y tener una velocidad de resorción equiparable a la velocidad de crecimiento óseo.

Los injertos óseos autologos son el *gold standard* para regeneración de defectos óseos en la región craneofacial al reunir las anteriores características, sin embargo su uso trae consigo algunos inconvenientes, como el aumento de la morbilidad o la escasa disponibilidad de tejido donante. En el caso de los aloinjertos, con propiedades

osteoaductoras y conductoras, existe el riesgo de transmisión de enfermedades. Una variedad de substitutos óseos osteoaductivos se han desarrollado en las últimas décadas, y en esta revisión nos centraremos en los materiales aloplásticos cerámicos a base de fosfatos de calcio (hidroxiapatita) y vidrios bioactivos.

1.6 Materiales Aloplásticos

Los materiales aloplásticos, son rellenos de origen sintético, como las cerámicas de fosfatos cálcicos sintéticos (hidroxiapatita, fosfatos cálcicos) y las cerámicas de vidrio, o de origen natural como la coralina. Su composición mineral se asemeja a la del hueso, y sirve como matriz o andamio osteoaductor sobre la que se va formando las nuevas estructuras óseas, hasta que finalmente sea substituida por el hueso nuevo. Dentro de esta amplia gama de biomateriales, también encontramos materiales poliméricos naturales (alginatos, dextrosa, celulosa, colágenos, quitosanos, etc.) o sintéticos (poliestireno, poliésteres, polilactonas, etc.) usados para la regeneración ósea (15). Estos materiales deben de ser biocompatibles, biodegradables o bioabsorbibles y bioactivos. La biocompatibilidad implica al conjunto material – aplicación – huésped, entendido como la habilidad de un material para cumplir su misión de manera adecuada en una aplicación específica para un paciente concreto, en el que la respuesta, por mínima que sea, esté acorde a la función prevista. Debe tener la capacidad de degradarse cierto tiempo después de ser implantados, dando lugar a productos no tóxicos y que pueden ser eliminados o metabolizados por el organismo (16, 17), además de tener la capacidad de formar enlaces químicos directos con el tejido adyacente, permitiendo el crecimiento de dicho tejido sobre su propia superficie, determinando esta última característica su bioactividad.

Las cerámicas a base de fosfatos de calcio (CaPs), son materiales inorgánicos bioactivos capaces de reaccionar con fluidos fisiológicos formando fuertes enlaces al hueso a través de la formación de capas de hidroxiapatita con una interacción biológica efectiva y una fijación del tejido óseo con la superficie del material (18). El estudio de las cerámicas fosfato-cálcicas se ha centrado en los compuestos del sistema terciario CaO-P₂O₅-H₂O, fundamentalmente la hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) y el fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂). Las cerámicas de CaPs son materiales que pueden ser depositados directamente en un defecto óseo donde se observa una rápida deposición de hueso nuevo en su superficie, manteniendo su forma y estabilidad durante este proceso. Además en los últimos años han tenido un significativo interés en el uso simultáneo como sustituto óseo y vehículo de administración de fármacos o biomoléculas, añadiendo una nueva dimensión a su aplicación. Las cerámicas CaPs son más biocompatibles que muchas otras nano partículas cerámicas e inorgánicas (19).

El comportamiento *in vivo* de los implantes constituidos por CaPs depende de una variedad de factores, entre ellos están la relación Ca/P, la estructura cristalográfica y la porosidad. Dependiendo de la aplicación, se utilizarán cerámicas bioactivas o bioabsorbibles, para lo cual se usarán diferentes fases de estas cerámicas de fosfato de calcio. Las fases estables de estas cerámicas dependen considerablemente de la temperatura y de la presencia de agua, tanto durante el procesamiento como en el medio donde luego se implanten. Es importante entender la relación existente entre la relación Ca/P, pH y solubilidad. La biodegradación la controla la razón Ca/P y la porosidad condiciona la penetración del hueso y la resorción de los constituyentes químicos. Así tenemos que, mientras menor sea la relación Ca/P, el nivel de pH disminuirá y la solubilidad aumentará. Termodinámicamente, a la temperatura del cuerpo humano, sólo dos fosfatos de calcio son estables en contacto con el medio acuoso, a pH < 4,2 la fase

estable es $\text{Ca}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato dicálcico dihidratado o brushita), mientras que a un $\text{pH} \geq 4,2$ la fase estable es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hidroxiapatita) (20). El comportamiento mecánico de las cerámicas de CaPs influye enormemente en sus aplicaciones como implantes. Tanto la resistencia a la tensión como a la compresión y a la fatiga dependen del volumen total de porosidad del material, la cual puede venir dada en forma de microporos ($< 10 \mu\text{m}$ de diámetro) o en forma de macroporos ($> 50 \mu\text{m}$). En general, las cerámicas son utilizadas en el campo clínico bajo diversas formas como gránulos, bloques, andamios 3D, implantes pequeños que no tengan que soportar grandes cargas como por ejemplo los implantes para el oído medio, o como cementos que se implantan en estado pastoso y fraguan in vivo. También como recubrimientos sobre metales como el caso del tratamiento de superficies de los implantes dentales o dispositivos ortopédicos (21).

1.6.1 Cerámicas de Hidroxiapatita (HA)

Las cerámicas de HA son un material biocompatible y osteoconductor ampliamente usado en regeneración ósea, desde un punto de vista cristalino se asemeja a la composición mineral de los tejidos óseos (22). Este material conduce a la liberación de iones calcio y fosfato, favoreciendo la precipitación de cristales y a la formación de una capa carbonatada de fosfato de calcio con la incorporación de una matriz de colágeno. Su velocidad de resorción es extremadamente lenta y la baja resistencia mecánica generalmente restringe su uso a zonas de baja carga. Por estas razones se están desarrollando estructuras de HA alternativas, parcialmente bioabsorbibles, de mayor similitud con el tejido óseo a sustituir, tratando que el nuevo hueso se forme sobre el material implantado con la misma velocidad con que este último es reabsorbido. El componente mineral del hueso natural está constituido principalmente por HA no estequiométrica (la relación Ca/P difiere del valor estequiométrico de 1.67), la cual se

diferencia de la HA estequiométrica de los biomateriales, no solo por la composición química, sino también por la cristalinidad y la superficie específica, características que la hacen más reactiva en un medio biológico (23). Parece ser que la biodegradación de la HA se incrementa a medida que disminuye la relación Ca/P; es decir, que la HA deficiente en calcio es más biodegradable que la HA estequiométrica. Recientemente se reportó la obtención de una HA deficiente en calcio ($\text{Ca/P} < 1.67$), que además presenta una morfología nano estructurada, y ha sido dopada con iones silicato para obtener mayor similitud a la apatita biológica, y por ende, más solubilidad y resorción *in vivo*, así como una incrementada osteoconducción y bioactividad (24).

Aunque osteoconductiva, la HA no se considera osteoinductiva. Sin embargo, se ha demostrado que la osteoinductividad puede ser introducida mediante la combinación de estos materiales con factores de crecimiento como las BMPs, proteínas bioactivas, o drogas osteogénicas (25-27).

1.6.2 Vidrios Bioactivos (Biovidrios BV)

Son materiales amorfos cuya estructura vítrea se produce por la unión de los tetraedros de un grupo iónico determinado para formar una estructura reticular no cristalina, es decir, no presenta periodicidad de largo alcance dentro de la red. De forma general los BV se dividen en vidrios de base Silicio y vidrios de base Fosfato. De los cuatro óxidos formadores de vidrios clásicos propuestos por Zachariesen (SiO_2 , GeO_2 , B_2O_3 y P_2O_5), los más conocidos como óxidos formadores de red son el óxido de silicio (SiO_2) y el pentóxido de fósforo (P_2O_5). En general, se caracterizan por su hemocompatibilidad, su adaptación a la composición de la fase mineral del hueso y por su velocidad de degradación, la cual se puede modificar en función de la composición química. Por lo tanto es posible obtener vidrios con degradación a largo o corto plazo, según la aplicación requerida. Estos BV tienen una reactividad superficial controlada con los

fluidos fisiológicos, produciendo un enlace químico entre los tejidos y la superficie del biomaterial (28). Los BV de base SiO₂, están formados por configuraciones tetraédricas de silicio, los cuales, se unen por enlaces covalentes a través de los puentes de oxígenos formando largas cadenas que conllevan a la formación de la red vítrea. La característica principal de estos materiales es que desarrollan en su superficie una capa biológicamente activa de apatita hidroxí carbonatada (HCA) la cual provee la interfase de unión con el tejido. Estos materiales reaccionan en contacto con el fluido formando una especie de gel hidratado en la superficie el cual es rico en iones Ca y P. La cristalización de esta capa conlleva a la formación de apatita y por lo tanto a la unión con el hueso. Por ello, esta capa formada en la superficie del material implantado, es similar tanto químicamente como estructuralmente a la fase mineral del hueso, y es por esto que se da la unión interfacial hueso-implante. Seguidamente se llevan a cabo reacciones celulares como, colonización, proliferación y diferenciación celular. El mecanismo de reacción de este tipo de biomaterial se explica en la figura 3 (29).

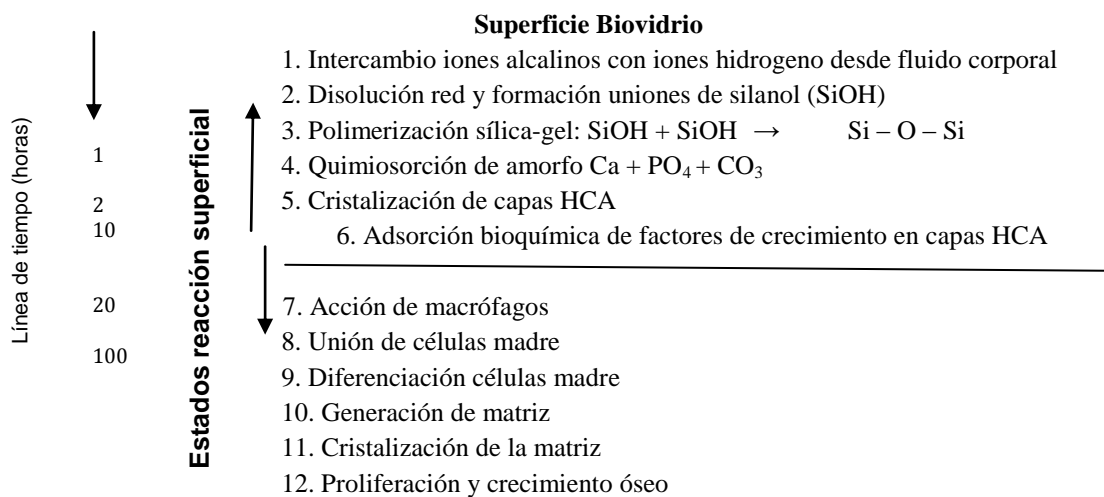


Fig. 3 Secuencia de la reacción interfacial involucrada en la formación de unión entre hueso nativo y superficie del material biovidrio (29)

La liberación controlada de productos de disolución iónicos del BV degradado, especialmente concentraciones críticas biológicamente activas de iones solubles de silicio y calcio, están fuertemente relacionadas con la formación de hueso nuevo, ya que regulan la proliferación, diferenciación y la expresión génica de osteoblastos (30). Similar es el proceso estimulado por la liberación de estos iones, siendo capaces de producir el factor de crecimiento angiogénico desde fibroblastos (VEGF) y la proliferación de células endoteliales en estudios *in vitro* (31, 32) e *in vivo* (33). No obstante, parece debatirse si la capacidad angiogénica está relacionada con el propio material, o puede estar enmascarada por la configuración del andamio ya que la geometría y la morfología (orientación de poro, tamaño de poro, y la interconectividad) afectan a la respuesta angiogénica del andamio *in vivo* (34).

Las biocerámicas vítreas son vidrios parcialmente cristalizados producidos por el calentamiento del BV por encima de su temperatura de cristalización (610-630°C). En el caso de los BV obtenidos por sinterización ($T^{\circ} > 1200^{\circ}\text{C}$), la microestructura vítrea se contrae, la porosidad se reduce y la estructura sólida gana fuerza mecánica. Sin embargo, la fragilidad y baja resistencia a la fractura siguen siendo un importante impedimento de estos materiales para uso en regeneración en zonas de alta carga.

1.7 Andamios en regeneración ósea

Un andamio se define como una estructura que permite a las células y matrices extracelulares interactuar, y proporciona el soporte mecánico para el crecimiento de células y tejidos. La situación ideal consiste en disponer de un andamio que se degrade a una velocidad similar a la formación del nuevo tejido. La tasa de degradación de estos andamios depende de la solubilidad del tipo de CaPs, y en parte esta va a depender de

su configuración. Un andamio puede tener dos tipos de configuración de poro: macroporosidad (tamaño de poro $> 50\mu\text{m}$) y microporosidad (tamaño de poro $< 10\mu\text{m}$). Existen algunas limitaciones en la presentación comercial de las cerámicas para uso clínico, por ejemplo los gránulos tienden a migrar a sitios aledaños, lo que aumenta la posibilidad de complicaciones. A su vez, las cerámicas en forma de bloques no siempre se adaptan adecuadamente al defecto tratado, y en los pocos casos en que se consigue una conveniente adaptación del implante cerámico, su lenta resorción y su fragilidad mecánica pueden afectar los resultados. Por ello se han desarrollado modificaciones en la estructura de estos materiales, que mejoren sus propiedades físicas y biológicas. Se han incorporado macroporosidades, con un tamaño de poro que supere los $100\ \mu\text{m}$, y además interconectados, proporcionando una mayor área de superficie para mejorar así, el enclavamiento mecánico entre el andamio y el tejido huésped circundante, y el aporte de micronutrientes. No obstante, se recomiendan tamaños de poro superiores a $300\ \mu\text{m}$ debido a que favorecen una mayor formación de hueso nuevo y de capilares sanguíneos. El tamaño de poro afecta a la progresión de la osteogénesis. Poros pequeños favorecen condiciones de hipoxia e inducen formación osteocondral antes que osteogénesis, mientras que los poros grandes, que permiten una adecuada vascularización, conducen a la osteogénesis directa (35). Sin embargo, el aumento de la porosidad resulta en una disminución de las propiedades mecánicas, por lo tanto se debe alcanzar un equilibrio dependiendo de la reparación, la tasa de remodelación y la tasa de degradación del andamio. La situación ideal es establecer un tamaño de poro bimodal, con propiedades similares a las del hueso trabecular, que permita suficiente permeabilidad para la nutrición y eliminación de residuos, y adecuada rigidez y resistencia para sostener las cargas transmitidas al andamio desde el hueso sano circundante. En general, los poros interconectados con un diámetro medio de $100\ \mu\text{m}$ o mayor, y porosidad abierta

superior al 50% se considera que son los requisitos mínimos para permitir el crecimiento tisular en andamios porosos (36).

El diseño del andamio tiene que considerar la rigidez y fuerza adecuada para soportar las cargas transmitidas desde el hueso sano circundante, además de ser susceptibles de fabricación en formas complejas o irregulares con el fin de que coincida con morfologías de defectos específicos de cada paciente.

Una gran variedad de métodos se han utilizado para fabricar los andamios de cerámicas, incluyendo sol-gel, unión térmica de partículas, fibras o esferas, la replicación de espumas de polímero, congelación y fabricación de forma libre sólida. Este último método, también llamado prototipado rápido, describe un grupo de técnicas que pueden utilizarse para la fabricación de andamios capa por capa a partir de un diseño asistido por ordenador (CAD), sin el uso de herramientas tradicionales tales como matrices o moldes. De esa manera, la arquitectura del andamio puede ser controlado y optimizado para lograr la respuesta mecánica deseada, acelerar el proceso de regeneración ósea, y guiar la formación de hueso con la estructura anatómica cortical-trabecular.

Varias técnicas de fabricación de forma libre sólida se han utilizado para la fabricación de andamios, incluyendo: la impresión tridimensional, modelado por deposición fundida, la impresión de tinta, estereolitografía, la sinterización selectiva por láser, y el robocasting. Con este último método se han fabricado andamios con arquitectura e interconectividad interna controlada de una variedad de biomateriales, incluyendo polímeros biodegradables como poly (lactico-co-glicólico) PLGA o policaprolactona PCL, materiales CaPs (HA, TCP) (37), cerámicas de vidrio (45S5) (38), y materiales compuestos (PLGA/HA, PLA/45S5) (39).

1.7.1 Fabricación de andamios por Robocasting

El robocasting, también conocido como conjunto de escritura directa (*direct-write assembly*) o deposición microrrobótica, es una técnica de fabricación de aditivos basados en la extrusión y, como tal, puede producir andamios con forma externa personalizada y predefinida, con arquitectura interna reproducible. En este proceso, suspensiones de polvo (tintas) altamente concentradas, capaces de retener su forma después de la extrusión se depositan por capas. Después de la deposición, las estructuras se secan y seguidamente se eliminan los aglutinantes antes de una etapa final de sinterización en la que las partículas de vidrio, cerámicas o metálicas, se unen en el andamio sólido final. Con el fin de garantizar la estabilidad de la tinta, el tamaño y la morfología del polvo utilizado es fundamental, y una etapa de molido se realiza antes de preparar la tinta (40). Una tinta adecuada para robocasting debe cumplir con ciertos criterios reológicos: debe ser capaz de fluir libremente a través de la boquilla de deposición e inmediatamente recuperar su estructura para ser capaz de mantener la forma y soportar a todas las capas depositadas posteriormente. Adaptar las propiedades reológicas de una suspensión para cumplir estos requisitos no es simple y requiere generalmente una combinación cuidadosa de agentes químicos (dispersante, plastificante, viscosificador, floculantes, etc.) y, a veces requiere la inducción de un cambio de pH o temperatura, o la adición de sales o aditivos iónicos (41).

La técnica permite la manipulación precisa de la arquitectura tridimensional y la impresión de líneas tan finas como 30 μm utilizando polvos de vidrio de tamaño micrométrico. Los andamios cerámicos sinterizados, con una estructura anisotrópica, muestran una resistencia a la compresión (136 MPa) comparable al hueso cortical y una porosidad (60%) comparable a la del hueso trabecular, lo que indica que estos andamios

podrían tener un excelente potencial para la reparación y la regeneración de defectos óseos también en zonas de carga (42).

1.8 Activación con moléculas bioactivas (rhBMPs)

Para que un andamio o sustancia sea usado como portador de un fármaco, debe tener la capacidad de incorporarlo ya sea física o químicamente, retener el fármaco hasta que alcance el sitio de destino específico, degradarse gradualmente, y administrar el fármaco de una manera controlada en el tiempo (19). Las cerámicas de CaPs y cerámicas de vidrio (SiO_2), ampliamente usados en ingeniería de tejidos debido a su excelente bioactividad y similitud con la composición mineral ósea, cumplen estos criterios y son candidatos prometedores para aplicaciones como liberación de fármacos en nanomedicina, ortopedia y odontología. Se ha demostrado que la actividad osteoinductiva puede ser introducida mediante la combinación con biomoléculas activas como factores de crecimiento, mejorando las propiedades biológicas de los andamios porosos. Sin embargo, la alta difusión por los tejidos (vida media muy corta) y liberación incontrolada de los factores de crecimiento desde los andamios se asocia con posibles efectos tóxicos. El uso de BV (SiO_2) como material de relleno en matrices degradables podría ofrecer una estrategia prometedora para regular la secreción/expresión de factores de crecimiento angiogénicos (VEGF) o osteogénicos (BMP) en niveles terapéuticos que conduce a la vascularización exitosa y la formación de hueso desde andamios en ingeniería de tejidos.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) 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 durante la embriogénesis e incluso

actúan en la vida adulta en los procesos de reparación de fracturas. Actualmente se han identificado cerca de 20 BMPs, y con excepción de la BMP-1, todas ellas son citoquinas multifuncionales y forman parte de la supe familia de las TGF- β . Destacan BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9 con mayor actividad osteoinductora y capacidad de formación de hueso ectópico (43).

La BMP-2 es una de las proteínas más activas, y más osteogénicas, siendo capaz de generar hueso en tejido ectópico. Se ha logrado obtener la forma recombinante humana de la proteína BMP-2 (rhBMP-2), ha sido clonada y actualmente se puede obtener de manera recombinante utilizando diferentes métodos de expresión como la producción y purificación de rhBMP-2 biológicamente activa mediante su expresión en *Escherichia coli* (12). La rhBMP-2 es una proteína que, aunque difiere en la estructura a nivel de aminoácidos, tiene la misma función y actividad que la BMP-2 humana.

La BMP-2, presenta una gran capacidad de estimular la regeneración ósea y de formar hueso ectópico en vertebrados adultos por lo que se considera de gran interés en el campo de la ingeniería de tejidos óseos. En el 2004, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el uso biomédico como productos sanitarios de la rhBMP-2 y la rhBMP-7 para determinadas situaciones clínicas, como grandes defectos óseos, fusión espinal anterior, lumbar y cervical. Existen diferentes productos disponibles en el mercado como InfuseTM (rhBMP-2, Medtronic, Minneapolis, USA), Inducto[®] (rhBMP-2, Wyeth Europa Ltd, London, UK), Osigraph[®] (rhBMP-7, Wyeth Europa Ltd, Londres, UK) y OP-1 Putty (rhBMP-7, StrykerBiotech, MA, USA) que emplean como transportador esponjas de colágeno (44) o Novosis[®]-Dent (rhBMP-2 and porous ceramic granule, DaewoongCo. LTD, Seoul, Korea) que emplea CaPs como andamio.

Para la incorporación de rhBMP-2 en cerámicas se han empleado métodos como la adsorción superficial, o durante el procesamiento de la muestra. La incorporación de

factores osteoinductores (rhBMP-2) en andamios porosos mediante el recubrimiento de quitosano mejora la integración y neoformación ósea de estos materiales (12).

Las BMPs actúan como agentes locales, necesitando permanecer en el defecto óseo durante un tiempo determinado para producir la diferenciación celular y la consiguiente regeneración tisular. Por ello son proteínas que requieren de una matriz portadora que permita su liberación de forma prolongada en el sitio de acción y proteja al factor de procesos de degradación. Dicho transportador será indispensable para la administración de los mismos consiguiendo disminuir la dosis a administrar y los efectos secundarios que conlleva.

Para servir de transportador, se emplea el quitosano entre otros compuestos. El quitosano se obtiene mediante desacetilación alcalina de la quitina, homopolímero presente en los exoesqueletos de crustáceos, moluscos, en la cutícula de insectos y en las paredes celulares de muchos hongos. El quitosano ha demostrado ser un polímero inocuo y seguro. La biodegradación del quitosano produce oligosacáridos que posteriormente pueden ser eliminados o reabsorbidos fácilmente por el organismo, posee un perfil de toxicidad seguro estando aprobado como excipiente de productos farmacéuticos, desde el 2002 bajo la forma de hidrocloreuro de quitosano y desde el 2011 como quitosano (Fármaco vigilancia Europea 2002/2011). En la regeneración de tejido óseo, el quitosano se ha utilizado principalmente para la formación de materiales con CaPs. Estos sistemas incorporan propiedades de los dos componentes. Por un lado, los CaPs proporcionan refuerzo a la matriz y osteoconductividad y por otro, el quitosano modula la degradación y las propiedades mecánicas. Posee una gran versatilidad debido a sus características químicas y físicas que le permite ser transformado en membranas, fibras, filmes, sistemas de andamiaje porosos, micro o nanopartículas e hidrogeles. Los filmes de quitosano poseen propiedades adecuadas

para su uso en regeneración tisular. Por un lado, el espesor del filme es modulable y directamente proporcional a la cantidad de quitosano utilizada para su formación. Por otro, los parámetros de rugosidad superficial, hidratación e hidrofiliidad corresponden a un material con capacidad para la adhesión celular. Los filmes de quitosano activados con rhBMP-2 son un potencial biomaterial para mejorar la osteointegración de implantes y prótesis quirúrgicas (45).

En el presente TFM se propone evaluar la capacidad osteoconductiva de biomateriales 3D a base de HA y biosílice en procesos de regeneración y reparación ósea en defectos de calota de conejos, además de valorar el efecto osteoinductor de su activación con BMP-2.

2. JUSTIFICACIÓN

La regeneración de los tejidos afectados por malformaciones, como consecuencia de enfermedades o accidentes ha centrado la atención de diversas disciplinas de la medicina en las últimas décadas. Dentro de los biomateriales usados como substitutos óseos encontramos los materiales aloplásticos o sintéticos, que debido a su nula inmunogenicidad, fuente ilimitada, y propiedades osteoconductoras, tienen una amplia aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos. Las cerámicas de fosfato cálcico (hidroxiapatita) y cerámicas de vidrio (basadas en silicio) se han investigado previamente en diferentes presentaciones como cementos, polvos, microesferas, bloques o estructuras 3D. Ambos materiales han demostrado resultados positivos en regeneración ósea tanto en experimentación *in vitro* como en *in vivo*, siendo probados de forma independiente, y en ocasiones activados con biomoléculas como factores de crecimiento. Desde finales de los 70, se introducen materiales cerámicos a base de vidrio, demostrando propiedades biológicas y físico-químicas igualables a la HA, con la ventaja de una mayor tasa de resorción y degradación debido al fácil control químico de su composición, y aumentando la bioactividad superficial.

Estas cerámicas, permiten desarrollar un modelo de estructura adaptado a las necesidades del defecto con propiedades físico químicas óptimas, y con un tamaño y orientación de poro adecuado que sirva de andamios en procesos de regeneración. La fácil manipulación de la estructura de estos materiales mediante procesos de robocasting le convierten en un material prometedor en el diseño a medida de andamios 3D para la regeneración ósea.

Experimentaciones *in vitro* (24, 46, 47) e *in vivo* (48-50) demuestran que la combinación de ambos compuestos (HA y BV) genera soportes bioactivos capaces de

desarrollar una capa superficial de fosfato de calcio que permitiría unirse directamente al hueso. Esta combinación parece mejorar las propiedades mecánicas y biológicas de estos materiales. Sin embargo, debido a heterogeneidad de diseños y resultados, resulta difícil comparar estos estudios sobre su comportamiento biológico.

Nos planteamos en este estudio piloto, comparar la citocompatibilidad y comportamiento biológico, de andamios con diseño 3D a base de hidroxiapatita sintética (HA) e hidroxiapatita sintética mezclada con biosilice (HAsiO_2). Además, evaluaremos el proceso de regeneración ósea de estos materiales cuando intervienen moléculas bioactivas como rhBMP-2, aplicada en filmes de quitosano sobre su estructura.

3. OBJETIVOS

- Analizar el grado de regeneración ósea *in vivo* de cerámicas de HA y cerámicas híbridas HASiO₂ fabricadas como andamios 3D en defectos de calota de conejo.
- Evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de cerámicas de HA y cerámicas híbridas HASiO₂ mediante ensayos de toxicidad en cultivo celular.
- Determinar la diferencia en el proceso de regeneración ósea de andamios 3D de HA y HASiO₂ frente a HA y HASiO₂ activadas con filmes rhBMP2/Quitosano.

Hipótesis Nula H₀:

No existe diferencia en el proceso de regeneración ósea de defectos no críticos en calotas de conejos entre estructuras cerámicas 3D de HA y estructuras híbridas de HASiO₂.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente TFM se define como un estudio piloto, preclínico, descriptivo experimental que consta de una primera parte *in vitro* en la que se evalúa la citocompatibilidad de las muestras mediante estudio de citotoxicidad de cultivos celulares, y una segunda parte *in vivo* en modelo animal sobre calotas de conejo de raza New Zeland.

4.1 Preparación de las muestras

Los andamios cerámicos se fabricaron mediante la utilización de moldeo robotizado o robocasting. El diseño de las muestras se realizó en colaboración con el Grupo Especializado de Materiales del Departamento de Ingeniería Mecánica, Energética y de los Materiales de la Universidad de Extremadura. Se diseñó la estructura por ordenador por capas, empezando en la capa inferior y consiguiendo una estructura 3D mediante el programa de diseño RoboCAD®3.0. Se elaboró una suspensión coloidal cerámica, también llamada tinta, mediante la preparación de una suspensión estable en agua con polvos cerámicos de HA al 45% y biosílíce inferior al 4%. La estabilidad de las tintas se logró mediante la adición de sustancias que aumentan la viscosidad así como también de dispersantes y floculantes (Darvan y PEI respectivamente). Se fabricó el andamio 3D mediante moldeo robotizado utilizando un equipo de deposición o extrusión robótica (3D Inks, Stillwater, OK, EE UU). La tinta cerámica se introdujo en la jeringa inyectora. La deposición de las barras se hizo en un baño de aceite de parafina para evitar el secado no uniforme durante el montaje de las estructuras 3D. Las piezas se construyen capa a capa siguiendo el diseño realizado por ordenador. El sistema robótico mueve la jeringa de inyección en las tres direcciones del espacio mientras presiona la tinta a través de la punta de acero para crear la estructura tridimensional. Los

andamiajes fueron secados en un horno convencional a 400 °C durante 1 hora, para evaporar los compuestos orgánicos y transcurrido ese tiempo se elevó la temperatura hasta 1300 °C para completar la sinterización de las muestras. Véase en la figura 4 el proceso de fabricación de las muestras.

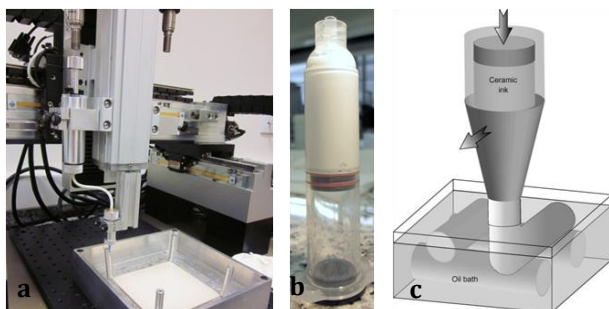


Fig. 4. Fabricación de los andamios. **a.** Equipo de extrusión robótica 3D Inks, Stillwater. **b.** Tinta HASiO₂ dentro del embolo. **c.** Representación de la extrusión o deposición de la tinta en forma de varillas sobre baño de aceite a través de punta de inyección.

El diseño final de muestra es circular con un diámetro de 7mm y altura de 1,5 mm. Su configuración interna con poros orientados a través de barras o cilindros de 410 μm de diámetro es constante y coincide con el de la punta, con separación entre ellas de 320 micras. Se diseñaron muestras con bordes cerrados y abiertos según el experimento a realizar. Véase en Fig.5

Caracterización:

Se emplean muestras de cerámicas de HA y biosílíce. Se esterilizan un total de 20 muestras, de las cuales se van a utilizar finalmente 14, introducidas en eppendorf. La esterilización de las muestras se realizó por calor seco, utilizando una mufla (VulcanTM A-130, NEY) a 120°C durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron secar en desecador y posteriormente se almacenaron en un recipiente estéril en campana de flujo laminar vertical.

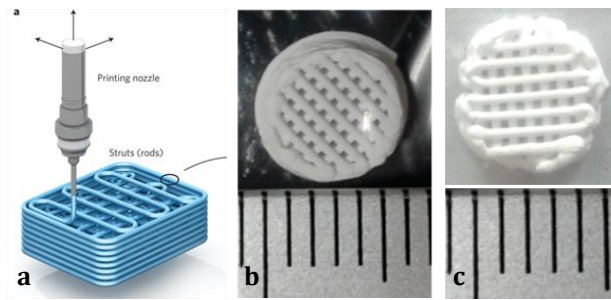


Fig. 5. Diseño de andamios. **a.** Punta de inyección. **b.** diseño para experimentación *in vitro* con bordes; **c** diseño para experimentación *in vivo* sin bordes (escala en mm).

En la siguiente figura se presentan las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de las muestras en experimentaciones previas realizadas por el equipo colaborador de la universidad de Extremadura. Las exponemos en el apartado de materiales y métodos pues no son resultado de nuestro trabajo. Puede observarse la configuración orientada de microporos y macroporos del andamio que permitirán el crecimiento de tejido en su interior (Fig.6).

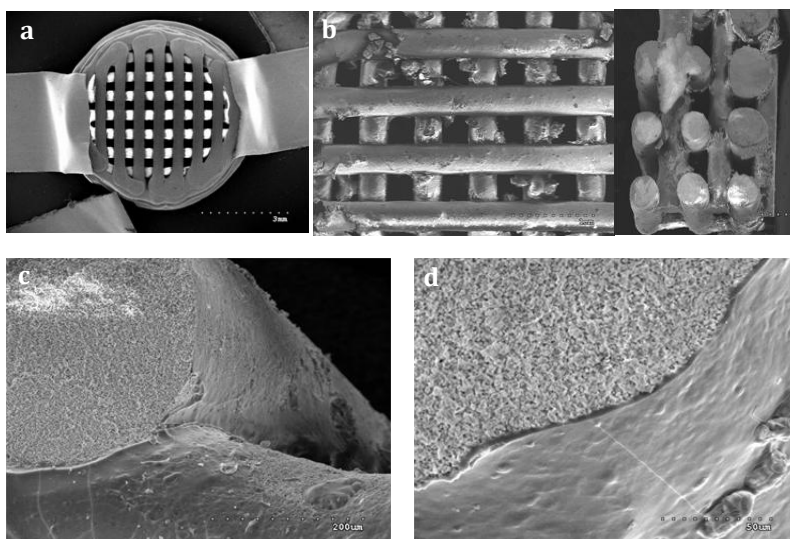


Fig. 6. Imágenes por ME de los andamios. **a.** Andamio circular. **b.** Vista coronal y sagital, nótese las barras o cilindros con macroporos orientados. **c.** Poros internos de cada barra. **d.** Superficie externa, porosa y con micro partículas de sílicio. Cortesía GEM-UE.

4.2 Diseño experimental *in vitro*

Siembra de células y cultivo

Para investigar la citocompatibilidad de las muestras preparadas para soportar el crecimiento celular y poder aproximarnos en su comportamiento para la regeneración de tejido óseo *in vivo*, las muestras estériles fueron sembradas con dos líneas celulares diferentes. En primer lugar se seleccionaron células pre-osteoblásticas de calvaria de ratón MC3T3-E1 procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron en medio α MEM completo (modified Eagle's minimum essential médium – Sigma Aldrich). Se completó con antibiótico al 1% de penicilina: solución de estreptomicina (10.000 U/ml: 10 mg/ml) y 10% de suero fetal bovino y antimicótico (α -MEM completo). Antes de los experimentos las células se amplificaron en cultivo en monocapa utilizando flasks de cultivo de 25 cm² en MEM completo. Se usaron células en pase número 10. Estas células son frecuentemente utilizadas en la literatura científica en el estudio de los procesos de diferenciación e ingeniería de tejido óseo.

Además se cultivaron y sembraron células pre-mioblásticas de musculo de ratón C2C12 transfectadas con GFP (*Green fluorescence Protein*) en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) completado con antibiótico y suero fetal bovino. Con estas células a través de su fluorescencia podemos hacer un seguimiento óptico de la adhesión y proliferación celular.

Ensayos de biocompatibilidad

Las muestras de HA y HASiO₂ se colocaron por triplicado (n = 3 de cada muestra) en placas de 24 pocillos y las células se sembraron directamente sobre la superficie del andamio a una concentración de $2,0 \times 10^4$ por muestra en un volumen final de 1 ml, y se

dejaron en incubación en estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 7 días. Transcurridas las primeras 24h de incubación, las muestras fueron transferidas a una nueva placa, con el fin de evaluar el comportamiento de las células adheridas sólo en la superficie de las muestras y no contabilizar las células en el fondo del pocillo. El medio de crecimiento se renovó cada 48 h y la tasa de proliferación se midió en los día 4 y 7 usando el ensayo Alamar-Blue® (Invitrogen). Brevemente, se añadió el reactivo Alamar-Blue® diluido 1:10 (100 µl) al cultivo de cada pocillo y se incubaron en estufa durante 90 minutos a 37°C. Como controles se emplearon células sembradas al mismo tiempo y en la placa de ensayo se utilizaron pocillos solo con medio como controles negativos. Los sobrenadantes se volvieron a sembrar a continuación en placas de cultivo de 24 pocillos y se analizaron con un lector Synergy HT (Bio.TEK Instruments, Winooski, VT USA). Este ensayo consiste en la reducción de un componente Resorufin mediante la acción de enzimas metabólicas solo presentes en las células vivas, obteniéndose un producto que presenta una coloración diferente, determinando la fluorescencia del mismo. En la multiplaca se incluyen medios como controles (Fig.7). El valor de la fluorescencia se determina por la lectura de cada muestra restando la obtenida por el medio control de las células.

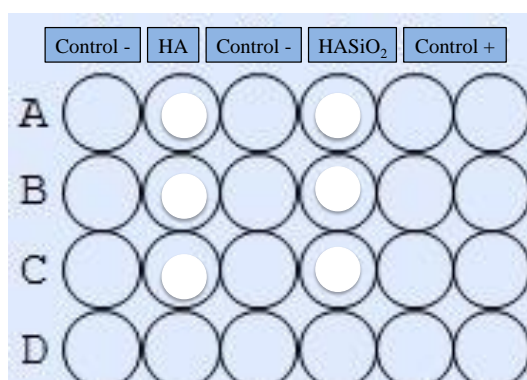


Fig.7. Multiplaca de cultivos con 24 pocillos que contiene las muestras por triplicado y los controles de solo medio de cultivo (control negativo) y los controles de células (control positivo)

Para determinar la adhesión y proliferación celular de forma cualitativa, se usaron células C2C12-GFP (ATCC, Manassas, Virginia). Se sembraron 10.000 células por muestras y se realizó un seguimiento de las mismas por microscopia óptica de luz fluorescente (Olympus IX51). De esta manera, se determinó la presencia de células en la estructura del material. Se tomaron imágenes con aumentos 2x, 10x, 40x.

4.3 Diseño experimental *in vivo*

Cuatro 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, se aleatorizaron y dividieron en tres grupos, dependiendo del material de relleno del defecto: Coágulo sanguíneo (grupo control GC), andamio hidroxiapatita 3D (HA), andamio hidroxiapatita + biosilice 3D (HAsiO₂). Adicionalmente a un quinto conejo de iguales características se implantaron dos muestras de HA y HAsiO₂, una a cada lado de la sutura media, activadas con filmes de rhBMP-2/Quitosano.

Todos los protocolos experimentales usados en el presente estudio fueron aprobados por el comité de ética de experimentación animal del Hospital Clínico San Carlos (CEEA) con el código interno 15/004-II. Los animales se sometieron a un periodo de adaptación a las condiciones ambientales del animalario del centro de experimentación del H.C. San Carlos antes de las intervenciones. Durante el tiempo de estancia el estado de salud de los animales se monitorizo diariamente, al igual que las condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado animal. Los animales se alojaron en jaulas para conejos de dimensiones adecuadas, en espacio con temperatura controlada entre 18 a 20 °C, recibieron alimentación y agua a demanda, se emplearon medios de enriquecimiento

ambiental en los que se colocó Heno, trozo de madera de haya y la jaula disponía de una madriguera por la que pueden tener comunicación visual con otros conejos de jaulas contiguas.

Activación con rhBMP-2/Quitosano

El quitosano se adquirió a la empresa Biolog (Alemania). El mismo se caracterizó en el Instituto de Estudios Biofuncionales (IEB) presentando un contenido de humedad inferior al 10%, y de cenizas inferior al 1%. Libre de metales pesados (Hg y Pb inferiores a 0.01 ppm), su peso molecular promedio evaluado por viscosimetría capilar fue de 560.100 g/mol y su grado de desacetilación determinado por RMN-H fue del 85%. La BMP-2 recombinante humana se obtuvo mediante técnicas de ingeniería genética a partir de *Escherichia coli*. La proteína fue donada por la empresa Noricum SL (San Sebastián de los Reyes, España). Los andamios fueron activados por un recubrimiento de filmes de quitosano los cuales se encuentran cargados con la proteína BMP-2. Las estructuras estériles se recubrieron con una solución de quitosano (100 µl, 1% p/v en ácido acético 1%, activadas con 10 µg de rhBMP-2). La elaboración del filme de quitosano y la incorporación de la proteína en el mismo forman parte de la patente protegida por la empresa Noricum S.L.

Procedimiento quirúrgico

La anestesia fue inducida con ketamina (40 mg/Kg), midazolam (2 mg/Kg), y citrato de fentanil (0.8 µg/Kg). El Mantenimiento anestésico se realizó aplicando una mezcla de isoflurano/óxido nitroso (1%:1.5%) y oxígeno (2/3:1/3) usando máscara de aire. Se retiró el pelo del área coronal de los cráneos y se desinfectó con clorhexidina 2%. Se realizó una incisión vertical de aproximadamente 4 cm 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 trepina 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 calvaría. Cada animal recibió dos tratamientos diferentes, de forma aleatoria se seleccionaron dos animales para el primer tiempo de seguimiento a seis semanas, en el primero se dejó el lado izquierdo como control vacío (GC) y en el derecho se implantó HA, en el otro espécimen se implantó en el lado izquierdo HA y en el derecho HA/SiO₂. En los tres conejos restantes para el segundo tiempo de seguimiento a doce semanas se procedió de la siguiente manera: conejo 3 lado izquierdo GC y derecho HASiO₂, conejo 4 lado izquierdo HA y derecho HASiO₂, conejo 5 lado izquierdo HA + rhBMP-2/Quitosano (HABQ) y derecho HASiO₂ + rhBMP-2/Quitosano (HASiO₂BQ). Véase fig. 8

Espécimen	Lado Izquierdo	Lado Derecho
Conejo 1	GC	HA
Conejo 2	HA	HASiO ₂
Conejo 3	GC	HASiO ₂
Conejo 4	HA	HASiO ₂
Conejo 5	HABQ	HASiO ₂ BQ

Fig. 8. Diseño de cirugías para implantación de muestras. Conejos 1 y 2 a seis semanas, conejos 3 a 5 a doce semanas.

El diámetro del defecto contenía adecuadamente la muestra, la incisión se suturó por planos, lo que permitió 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. La figura 9 representa el ejemplo de implantación de la muestra.

Los primeros dos sujetos experimentales se sacrificaron a las seis semanas después de la cirugía inicial, los tres restantes se sacrificaron a las 12 semanas, con administración de midazolam y sobredosis anestésica. Al momento del sacrificio pesaban 4Kg.

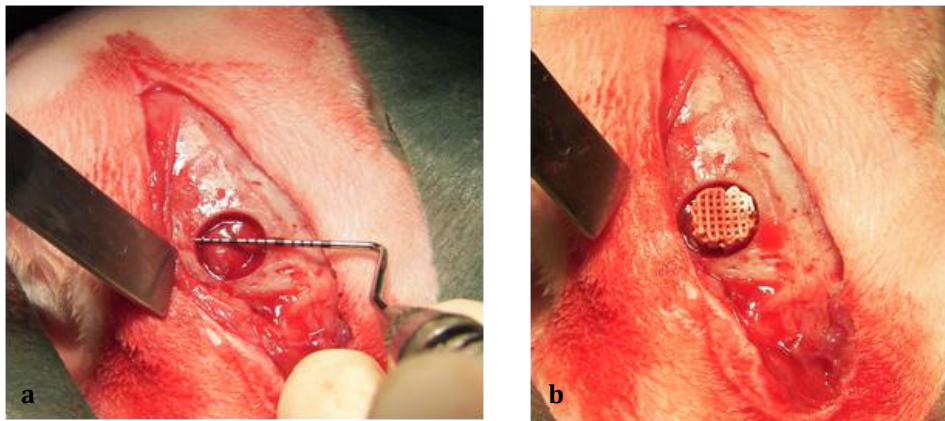


Fig. 9. Ejemplo del procedimiento. **a.** Incisión sagital por planos, osteotomías circulares de 8mm de diámetro con irrigación profusa. **b.** implantación del andamio.

Análisis Macroscópico

Al momento de la recuperación de las muestras, se evaluó el estado de los tejidos periimplantares hacia el periostio y hacia el cerebro, así como el aspecto macro de la integración de las muestras.

Procesamiento histológico

El hueso de la bóveda craneal con los defectos fueron recuperados en bloque y se fijaron inmediatamente en formalina al 10% durante 72 h, se lavó en agua durante 24 h

antes de ser sumergido en DECAL™ (HistoLAB®) para la desmineralización durante 4 días. Se dividió cada mitad de la bóveda, limitada a la muestra implantada y tejido periférico, y se retiraron los restos de tejidos adyacentes. Después de la descalcificación, las muestras se deshidrataron en una secuencia creciente de alcoholes (70-100% etanol absoluto EtOH), seguidos de un tratamiento con xilol, y posterior inclusión en parafina y confección de bloques para su posterior corte en micrótomos motorizados manual Leica RM2155 (Leica Biosystems). Los cortes se realizaron en plano paralelo a la muestra y al defecto, obteniendo secciones de parafina semiseriales de 6µm, capturados en portaobjetos tratados Starfrost (Knittel Glass), los mejores cortes de la zona central del defecto fueron seleccionados para tinciones: Hematoxilina-Eosina (HE) y Tricrómico de Masson (TM).

Hematoxilina-Eosina: La hematoxilina es una tinción que por ser básica, tiñe estructuras ácidas (basófilos) en tonos azules y púrpuras, como por ejemplo los núcleos celulares. En cambio la tinción de Eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Tras el desparafinado de los cortes, la hidratación de los mismos (etanol en concentración decreciente), se realiza la tinción mediante exposición a la hematoxilina y eosina, y el montaje (según protocolo establecido por el IEB).

Tricrómico de Masson: Técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I, que forman fibras gruesas o haces. También evidencia, aunque en menor intensidad, fibras reticulares. Se emplea tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y fibras de colágeno. En este método para la identificación de mineralización tisular, la queratina, los glóbulos rojos y el tejido muscular se tiñen de rojo; las fibras de colágeno y el tejido conectivo se tiñen de verde y los núcleos celulares de lila o marrón. Las fibras de colágeno y tejido

conjuntivo participan en los procesos de osificación, por lo que la aparición de tinción verde destaca estos procesos en los cortes histológicos. Se sigue el protocolo establecido por IEB.

Análisis Morfológico Microscópico (Escala histológica)

Los cortes histológicos de cada animal se analizaron por microscopía de luz (Olympus BX51) a fin de observar los acontecimientos de cicatrización como la inflamación, tejido de granulación, remodelado y formación de hueso nuevo, y la interacción entre el biomaterial y el huésped. Adicional a la descripción cualitativa de los cortes, se evaluaron dos secciones de cada muestra mediante microscopía de luz y se calificó con una escala de clasificación semi-cuantitativa inspirada en trabajos previos (51) (Tabla 2). Las muestras fueron evaluadas para: (1) la calidad de la interfaz hueso-andamio; (2) respuesta del tejido dentro de los macroporos del andamio; y (3) la cantidad de la formación de hueso dentro del defecto. Para este último apartado, se emplearon las imágenes capturadas por microscopía con cámara Olympus DP71 en aumento 2x/0,06 y procesadas en software cell^D 5.1 (Olympus corp.). Se determinó el área de interés que coincidía con el perímetro del defecto, y se midió el área de material residual y de tejido neoformado, expresado en μm^2 y transformado a porcentaje. De la cantidad de tejido neoformado se determinó el porcentaje que correspondía a hueso nuevo. El autor fue el único revisor de la escala, evaluando dos secciones por muestra, y la puntuación obtenida se promedió para cada muestra y grupo para determinar la puntuación global.

Micro tomografía computarizada (μCT)

Las muestras recuperadas en el segundo tiempo de seguimiento (12 semanas) se fijaron durante 72 h en 10% de formalina tamponada neutra y luego se colocaron en etanol al

Tabla 2. Escala para análisis semi-cuantitativo histológico (51)

Respuesta del tejido duro en la interfaz hueso-andamio	Puntaje
Contacto óseo directo al implante sin interfase de tejido blando	4
Remodelación con osteoblastos y/o osteoclastos en superficie	3
La mayoría de los andamios están rodeado por tejido fibroso capsular	2
Tejido fibroso desorganizado (la mayoría del tejido no se dispone como cápsula)	1
Inflamación marcada por abundante presencia de células inflamatorias y tejido mal organizado	0
Respuesta del tejido duro dentro de los poros del andamio	
El tejido en los poros es en su mayoría hueso	4
El tejido en los poros se compone de algo de hueso entre maduro, tejido denso fibroso y/o unos pocos elementos de respuesta inflamatoria y adipocitos.	3
El tejido en los poros es en su mayoría tejido fibroso inmaduros (con o sin hueso) con vasos sanguíneos y fibroblastos jóvenes que invaden el espacio con pocos macrófagos presentes	2
El tejido en los poros se compone principalmente de células inflamatorias y componentes del tejido conectivo en el medio (con o sin hueso) o la mayoría de los poros vacíos o llenos de líquido	1
El tejido en los poros es denso y exclusivamente de tipo inflamatorio (sin presencia del hueso)	0
Extensión de formación de hueso dentro del defecto	
75-100% del defecto consiste en hueso	4
50-74% del defecto consiste en hueso	3
25-49% del defecto consiste en hueso	2
1-24% del defecto consiste en hueso	1
0% del defecto es hueso, o alguna formación de hueso alrededor de los bordes solamente	0

70% durante la duración de las exploraciones con μ CT. Se valoró cualitativamente el proceso de regeneración de los tres últimos conejos, las muestras fueron escaneadas después de la recuperación del implante con un escáner PET/CT Albira ARS (GEM-

IMGING, Oncovision) de alta resolución a 10 μm con un filtro de 0,5 mm de aluminio y una tensión de 45 kV y la corriente de 0,8 mA. La reconstrucción y el análisis volumétrico se realizaron utilizando el software Pmod 3.0 provisto por Albira ARS. Se visualizaron en el plano coronal con una intensidad de color de 300/1800 pixeles.

Variables estudiadas

Según su papel en el experimento se definen las siguientes variables:

Independientes (causa/factor)

Tipo de muestra (hidroxiapatita **HA**, hidroxiapatita con biosilice **HASiO₂**, hidroxiapatita con filmes rhBMP-2/Quitosano **HABQ**, e hidroxiapatita biosilice con filmes de rhBMP-2/Quitosano **HASiO₂BQ**)

Dependientes (efecto)

Variables *in vitro*:

Actividad metabólica y adhesión y proliferación celular

Variables *in vivo*:

Escala histológica (interfase hueso injerto, tejido en macroporos, formación ósea) a las seis y doce semanas.

Área de tejido neoformado y área de biomaterial residual a las seis y doce semanas

Recogida de datos

Todos los procesos de experimentación *in vitro* e *in vivo* se consignaron en diario de

trabajo, se reportaron todos los sucesos clara e inteligiblemente de los diferentes ensayos, procedimientos y técnicas, tanto de procesamiento como de análisis. Se confeccionó una matriz de datos en Excel para la recolección de datos de las variables analizadas.

Análisis estadístico

Todos los datos presentados se expresan como media (+/- desviación estándar) con intervalo de confianza al 95%, y como distribución de frecuencia en porcentajes. Para el trabajo *in vitro* cada experimento se realizó por triplicado y, se determinó la distribución normal con test previo de Shapiro-Wilk. La significación estadística se determinó mediante prueba t student. Para el trabajo *in vivo* se utilizaron para comparar los resultados entre varios grupos el test de Kruskal-Wallis. Todos los análisis se realizaron utilizando el software SPSS 22.0 (IBM SPSS Statistics). En todos los contrastes se rechazó la hipótesis nula con $p < 0,05$

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación de la biocompatibilidad celular *in vitro*

La evaluación cuantitativa de la proliferación de células osteoblásticas sobre las muestras preparadas (HA – HASiO₂), realizadas mediante el ensayo Alamar-Blue® en los días 4 y 7, resalta un aumento de la proliferación celular durante el periodo de cultivo tal y como se muestra en la figura 10. Este hecho confirma, a nivel celular, la excelente biocompatibilidad *in vitro* de las muestras basadas en cerámicas fosfato cálcicas. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad metabólica se refiere, de las células MC3T3 entre las muestras a los 4 y 7 días (p 0,2 y 0,9 respectivamente). Tampoco existieron diferencias entre las mismas muestras en los dos tiempos de observación (p 0,1 HA y p 0,2 HASiO₂). A los 4 días de cultivo, se aprecia un ligero aumento de la actividad metabólica de las células MC3T3 sobre las muestras que contienen biosfílce. En cambio esta tendencia disminuye a 7 días del cultivo, se observaron valores de actividad metabólica similar para los dos tipos de muestra. En general, las muestras permitieron la adherencia y proliferación celular, demostrando el carácter biocompatible y la idoneidad de los materiales para aplicaciones en la regeneración de tejido óseo.

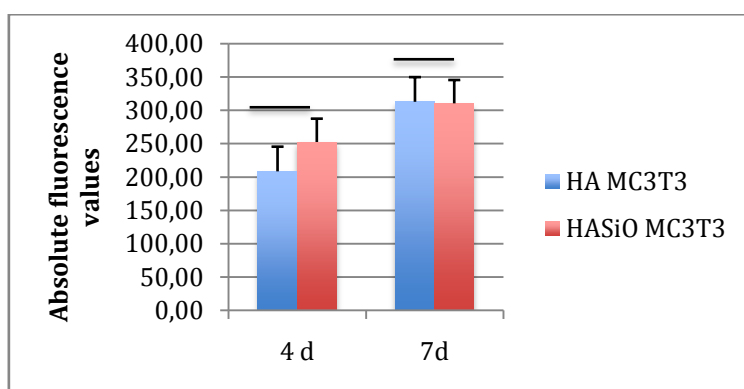


Fig. 10. Actividad metabólica de cultivo de células MC3T3, evaluado Alamar-Blue® expresada en unidades de fluorescencia 530/590. (—) p>0,05 no diferencia significativa entre los andamios.

5.2 Evaluación de la adhesión y proliferación celular *in vitro*

Las imágenes de las figuras 11 y 12 muestran el crecimiento de cultivo celular C2C12-GFP sobre la superficie de las diferentes muestras. En ambas muestras se observa un incremento notable de la presencia celular al aumentar el tiempo de cultivo. No obstante, se destaca notablemente mejor comportamiento de adhesión y proliferación de cultivo en la muestra de HASiO₂, y directamente proporcional al paso de días.

5.3 Evaluación macroscópica *in vivo*

Posterior a las evaluaciones *in vitro*, se llevaron a cabo los experimentos en animales según protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos. En la evaluación macroscópica no se observaron complicaciones generales o locales en ninguno de los animales durante el estudio consiguiendo la supervivencia de todos ellos. No hubo señales de ulceración, infección, o exudado de la herida, ni edema del cuero cabelludo en el sitio de la cirugía. El comportamiento de los animales no se vio alterado después de los procedimientos. Al término de los tiempos de seguimiento, se recuperaron las muestras para la evaluación de la regeneración ósea de los sujetos experimentales. El examen macroscópico de los defectos después de seis semanas no reveló signos de inflamación externa, no obstante en su cara interna, uno de los animales, en el defecto del lado derecho, correspondiente a HASiO₂, tenía adosados restos de tejido encefálico (fig. 13 y 14).

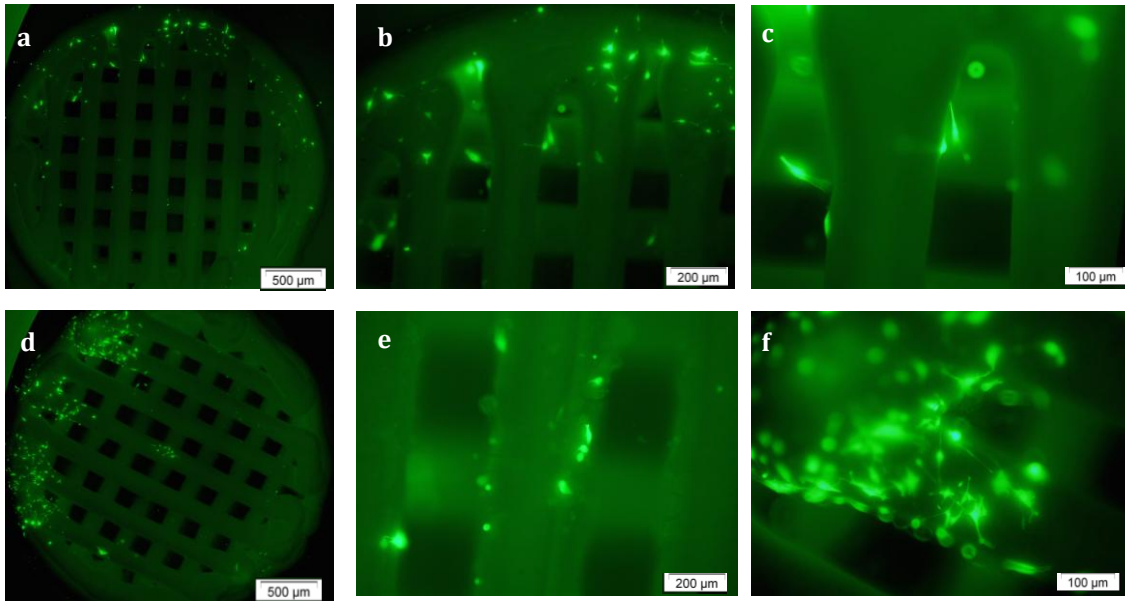


Fig. 11. Imágenes de fluorescencia de las células C2C12 en andamios HA .**a-c.** C2C12-GFP a los 4 días. Nótese crecimiento en la periferia de la muestra. **d-f.** C2C12-GFP a los 7 días. Incremento en proliferación, crecimiento hacia el centro de la muestra. A mayor aumento adhesión de los miofibroblastos fluorescentes sobre la superficie.

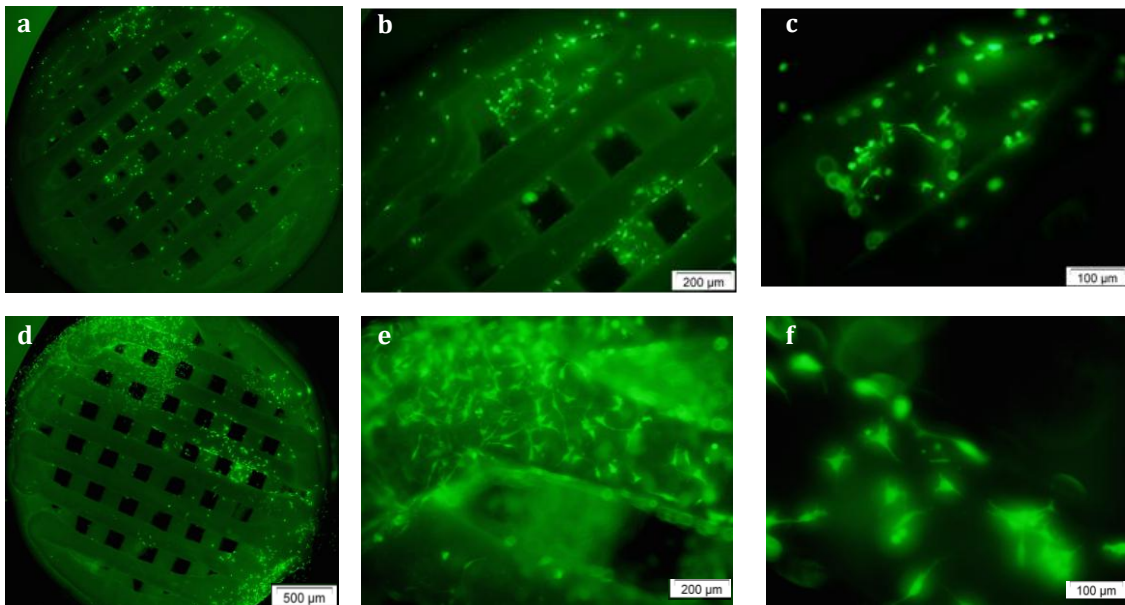


Fig.12.Imágenes de fluorescencia de las células C2C12 en andamios HASiO₂. **a-c.** C2C12-GFP a los 4 días. Nótese crecimiento en la periferia y el centro de la muestra. **d-f.** C2C12-GFP a los 7 días. Células migran y penetra hacia el interior del andamio.

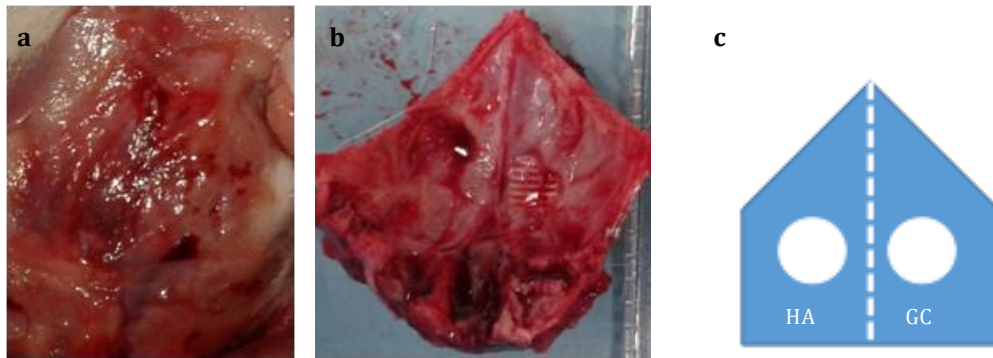


Fig.13. Imágenes macroscópicas de las muestras conejo 1. **a.** aspecto dorsal de la calota y **b.** aspecto ventral. **c.** Diagrama del diseño vista dorsal. hidroxiapatita 3D HA, control vacío GC. 6 semanas

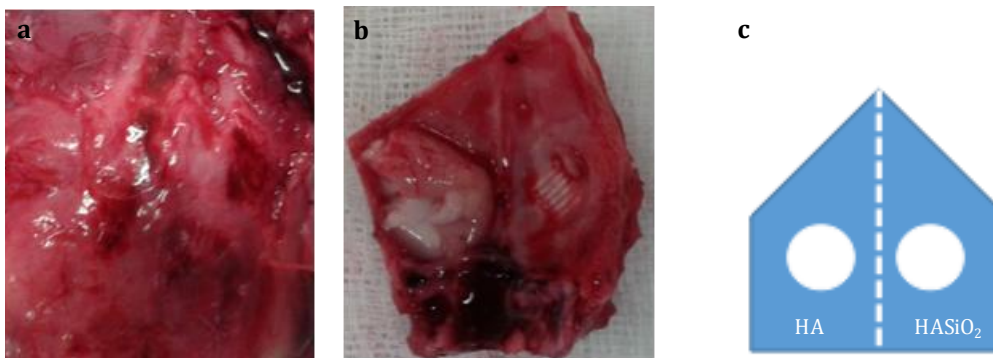


Fig.14. Imágenes macroscópicas de las muestras conejo 2. **a.** Integridad del periostio sobre los defectos, alcanza a traslucirse andamio lado derecho. **b.** Aspecto ventral, nótese restos de tejido encefálico sobre la muestra. **c.** Diagrama del diseño vista dorsal hidroxiapatita 3D HA, hidroxiapatita con biosilice HASiO₂. 6 semanas

A las doce semanas tampoco se observaron signos inflamatorios, todos los andamios parecían estar bien integrados dentro del defecto a pesar de no emplearse medidas de fijación. Se pudo apreciar ligeros indicios de encapsulación o reacción a cuerpo extraño, situación normal en la mayoría de biomateriales implantados. Cabe destacar, la presencia de infiltrado seroso dentro de la muestra y evidente lesión en encéfalo acompañado de aparente pérdida o degradación de la muestra en el sujeto experimental que sufrió lesión en su cara ventral, y coincidente con la HASiO₂ (fig. 15, 16 y 17).

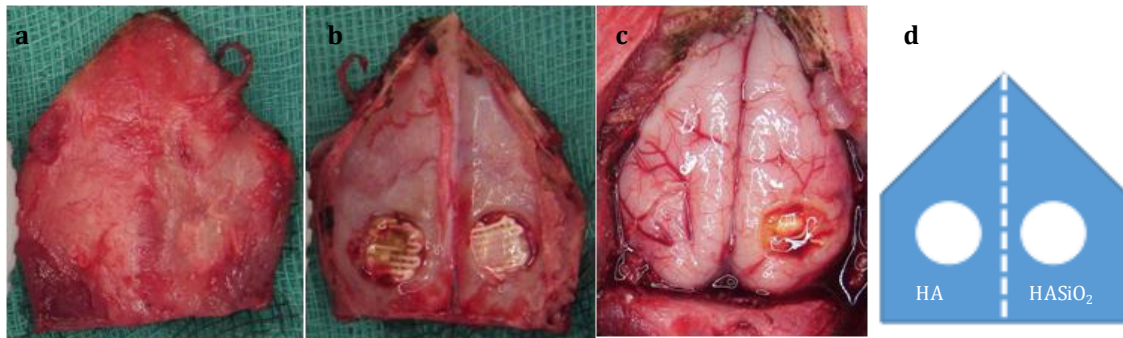


Fig. 15. Imágenes macroscópicas de las muestras conejo 3. **a-c.** nótese en la cara ventral hacia encéfalo aspecto seroso sobre la muestra y mayor degradación, y en cerebro zona inflamatoria. **d.** Diagrama del diseño vista dorsal. hidroxiapatita 3D HA, hidroxiapatita con biosílice HASiO₂. 12 semanas

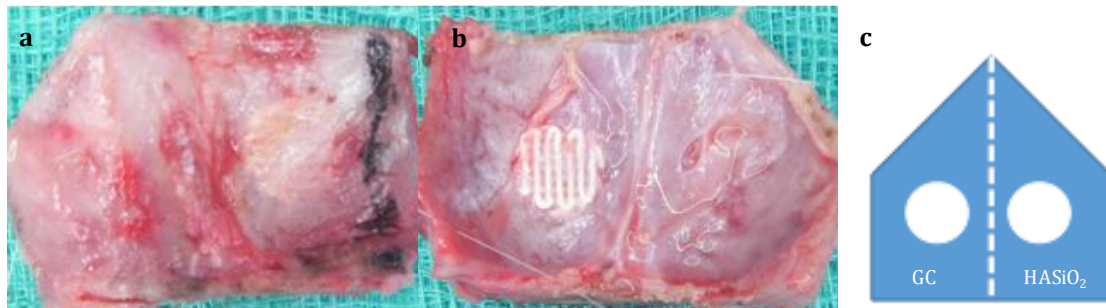


Fig.16.Imágenes macroscópicas de las muestras conejo 4. **a,b.** Aspecto dorsal y ventral, estabilidad e integridad de la muestra dentro del defecto. **c.** Diagrama del diseño vista dorsal. Grupo control GC, hidroxiapatita con biosílice HASiO₂. 12 semanas.

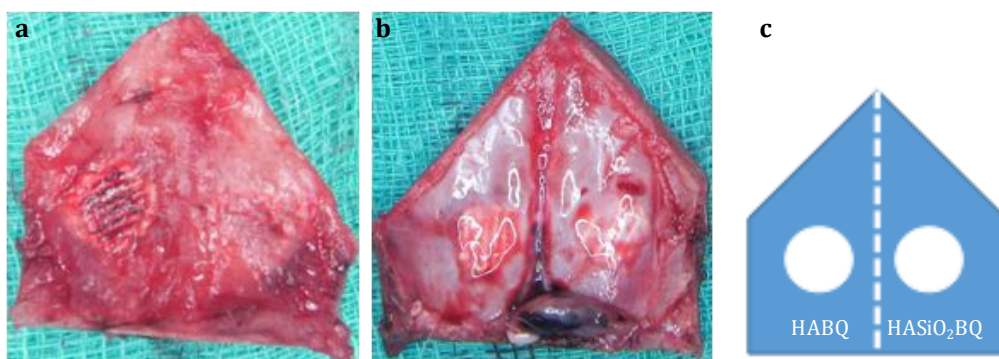


Fig. 17. Imágenes macroscópicas de las muestras conejo 4. **a,b.** Aspecto dorsal y ventral. Estabilidad e integridad de las muestras dentro de los defectos. **c.**Diagrama del diseño vista dorsal. Hidroxiapatita con filme rhBMP-2/Quitosano HABQ, hidroxiapatita con biosílice y filme de rhBMP-2/Quitosano HASiO₂BQ. 12 semanas.

5.4 Micro tomografía computarizada μ CT

Se evaluó mediante μ CT las muestras recuperadas a las 12 semanas. Todas las muestras implantadas se encuentran contenidas dentro del defecto, sin embargo, parece existir mayor aproximación de los bordes del defecto hacia el interior de los andamios en las muestras activadas con rhBMP-2/Quitosano. En las zonas donde hay contacto con la muestra se aprecia densidad ósea semejante a la del tejido antiguo tal y como se muestra en la figura 18. Se aprecia crecimiento de tejido en el interior de todos los andamios, con intensidad semejante a la del tejido óseo periférico. El control vacío no exhibe crecimiento óseo y persiste defecto semicrítico. No obstante no se aprecian diferencias entre los materiales activados o sin proteína. Las imágenes tomográficas coinciden con las macroscópicas y confirman que a las 12 semanas su tasa de resorción parece similar.

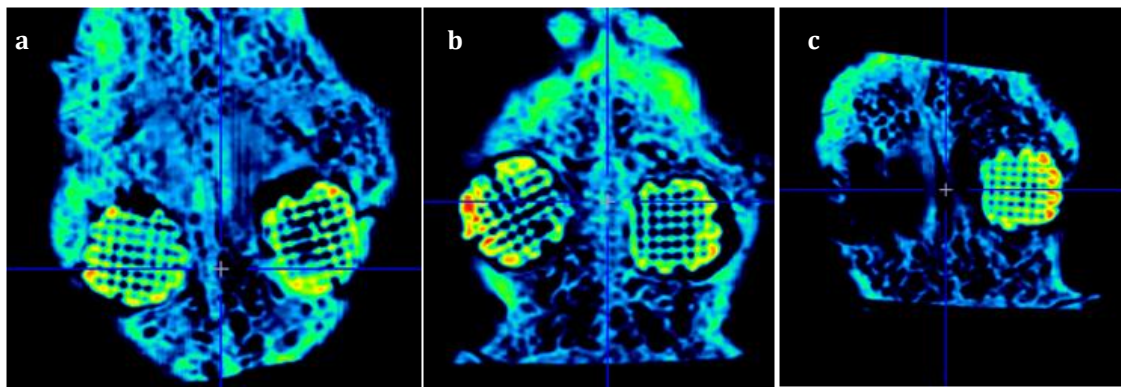


Fig.18. Imágenes correspondientes de la microtomografía computarizada a las 12 semanas. **a.** A la izquierda andamio de HA, a la derecha HASiO₂ notar densidad (azulada) al interior de los andamios, similar a la del tejido circundante. **b.** A la izquierda se muestra andamio de HABQ, a la derecha HASiO₂BQ, se nota mayor aproximación de los bordes del defecto y hacia el interior del andamio. **c.** Muestra izquierda control vacío GC, derecha HASiO₂.

5.5 Análisis histológico por microscopia

En ambos tiempos de observación, 6 y 12 semanas, se observó una cápsula fibrosa delgada alrededor de la parte del periostio de los andamios, así como en algunas interfaces en la frontera del defecto. A las 6 semanas, la mayoría de las muestras mostró crecimiento de tejido conectivo fibroso inmaduro dentro de los poros interconectados del andamio. En ambos grupos este tejido constituye un estroma fibroso, compatible con médula organizada de hueso en proceso de remodelación, con presencia de líneas de inversión (LR), y células mesenquimales fusiformes que intuyen una actividad osteoblástica y osteoclástica (bordes ondulados en LR en la superficie del material). En las ampliaciones de las imágenes se corrobora la presencia de un proceso angiogénico en el interior de los poros, encontrando fácilmente vasos sanguíneos de diferentes calibres, que incluyen venas y arterias, acompañado de respuesta inflamatoria, con presencia de células multinucleadas y macrófagos que rodean el material. En las observaciones de los cortes del grupo con biosílíce parecía existir mayor presencia de vasos sanguíneos. En ambos grupos siempre se observó una unión firme de tejido neoforado con la superficie de los andamios (Fig.19).

A las 12 semanas, el tejido en el interior del poro se encontraba formado en su mayoría por tejido conectivo denso y vascularizado, mejor organizado y dispuesto que el primer tiempo de observación. En la figura 20 se llega a apreciar abundantes líneas de inversión indicadoras de maduración ósea, y mayor remodelado óseo desde la periferia del defecto. En ambos grupos se encuentra la superficie de las barras del andamio rodeado de tejido óseo viable, se observa la presencia de “nidos” de hueso nuevo dentro de los poros sin contacto con hueso antiguo con características de osificación

intramembranosa por presencia de fibras densas y mineralización, sin signos de necrosis o osteolisis. Destaca la presencia de adipocitos (Ad), constituyente de la médula ósea, ocupando parte del espacio del macroporo (Fig.20)

La tinción de Tricrómico de Masson (TM) permite ver formación de tejido óseo de forma específica, ya que tiñe a diferentes intensidades fibras colágenas tipo I. Salvo el grupo control, se observó crecimiento de tejido al interior del defecto y dentro de los poros del andamio. Tanto a las 6 como a las 12 semanas se observó restos del biomaterial (Fig. 21).

A las 12 semanas, en el grupo de HA se observó pequeños focos de mineralización en el interior de los poros, con mayor presencia de tejido conectivo laxo y tejido adiposo, no obstante en todos los casos se apreció contacto íntimo con las barras de los andamios consistente en un tejido denso y organizado. Las muestras HASiO₂ mostraron un patrón de oscificación más consistente, llegándose a observar fibras colágenas muy organizadas alrededor de las barras y dentro de los poros, con un patrón muy laminar e intensamente colonizado por vasos sanguíneos (fig.22).

La tinción de TM para las muestras recubiertas con filme rhBMP-2/Quitano, revelaron mayor cantidad de tejido colágeno denso a las 12 semanas en comparación con las muestras sin recubrir. Tanto HA como HASiO₂ activadas muestran tejido óseo en el interior de los macroporos del andamio y directamente sobre las superficies de las barras del andamio, con osteoblastos alineados. Se encuentra gran cantidad de tejido adiposo que constituye parte del tejido conectivo laxo del estroma medular en el espacio de los macroporos y abundantes vasos sanguíneos de diferentes tamaños, que incluyen tanto venas como arterias y capilares sanguíneos. Al parecer las muestras con biosilíce tienen una densidad fibrilar más uniforme donde se han encontrado mayor número de vasos sanguíneos (fig.23).

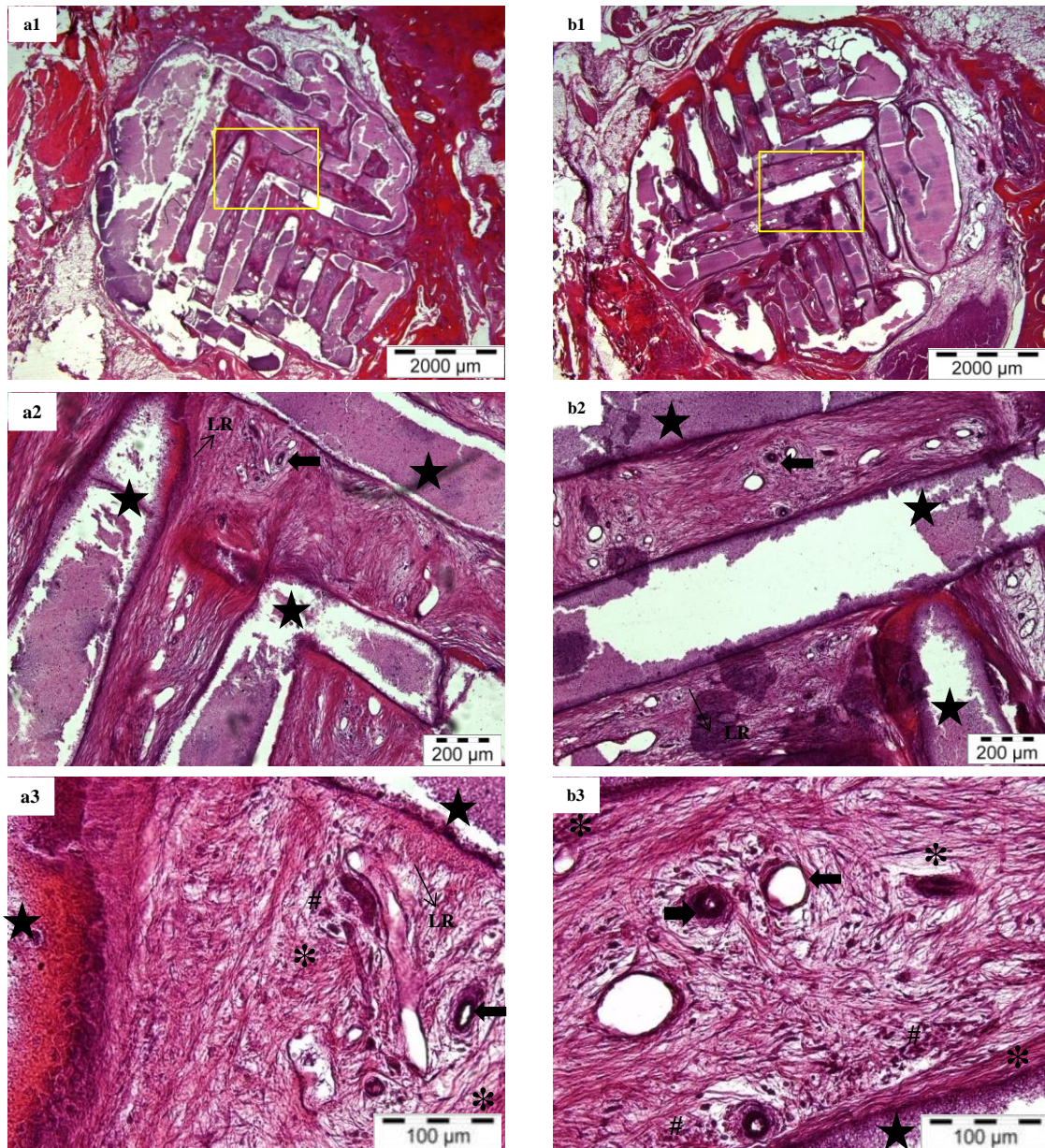


Fig 19. Imágenes correspondientes a la tinción de HE de ambos andamios a las seis semanas. **a1-3.** HA 6 semanas. **a1.** área de interés, crecimiento de tejido al interior del andamio, crecimiento óseo desde los bordes del defecto, escala 2000 µm. **a2.** Tejido fibroso entre los macroporos del andamio, con presencia de vasos sanguíneos (flecha), restos del andamio (estrella), y líneas de inversión basofílicas indicadoras de maduración ósea (**LR**), escala 200 µm. **a3.** Estroma fibroso con proliferación vascular, células mesenquimales indiferenciadas fusiformes (*) y células multinucleadas cercanas a la superficie del andamio, escala 100 µm. **b1-3.** HASiO₂ 6 semanas. **b1.** área de interés. **b2.** Se aprecia tejido conectivo fibrilar alrededor de la superficie de los andamios y proliferación de vasos sanguíneos, presencia líneas de inversión (**LR**). **b3.** Se observa gran cantidad de de arterias y venas (flechas), células multinucleadas (#) y mesenquimales fusiformes (*).

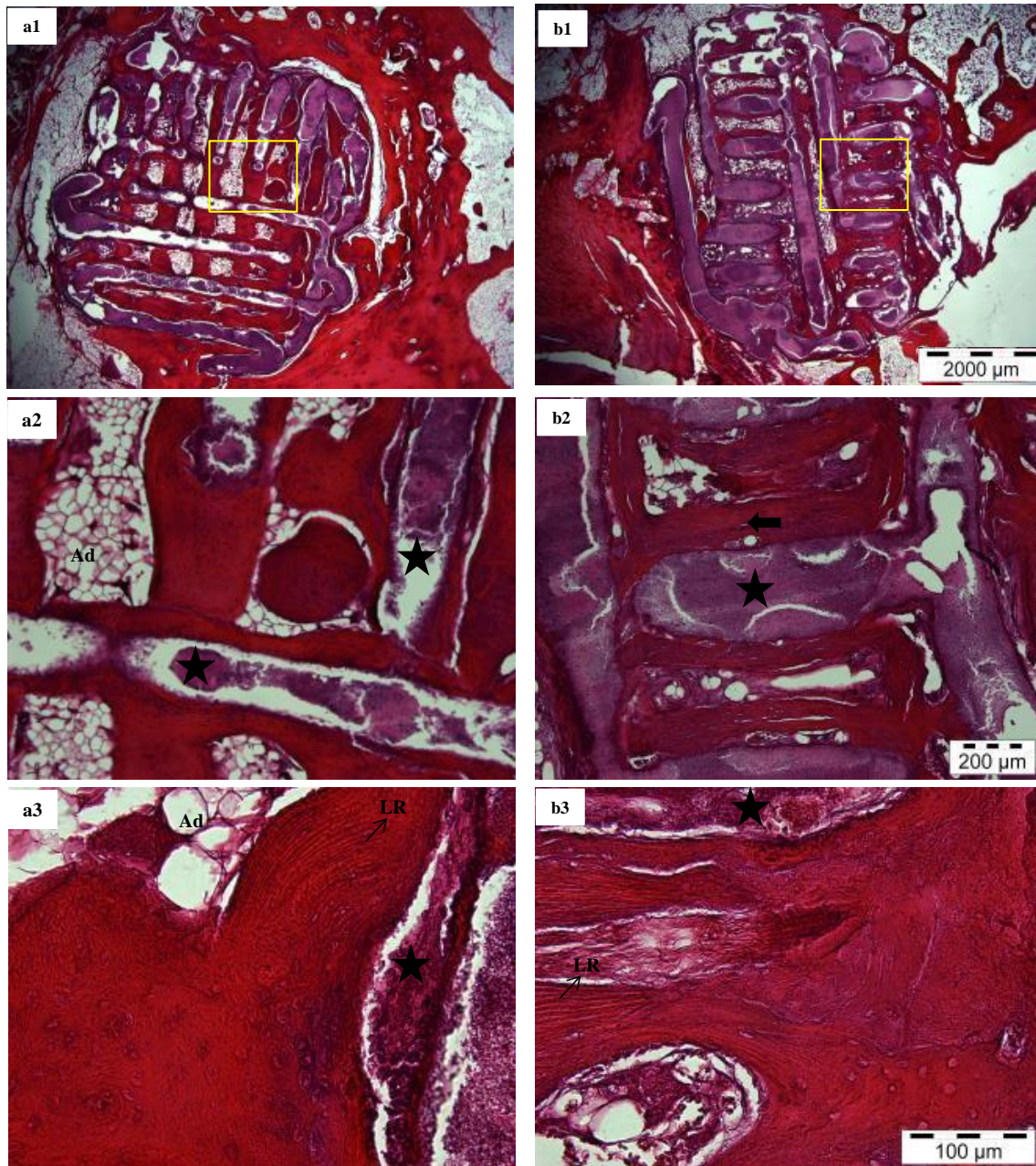


Fig 20. Imágenes correspondientes a la tinción de HE de ambos andamios a las 12 semanas. **a1-3.** HA 12 semanas. **a1.** área de interés, escala 2000 µm. **a2.** Se observa constituyentes celulares de médula ósea, entre otros adipocitos. “nidos” de oscificación entre las barras del andamio, íntimo contacto superficie material-hueso, escala 200 µm. **a3.** Se observan líneas de inversión incrementales, escala 100 µm. **b1-3.** HASiO₂ 12 semanas. **b1.** área de interés. **b2.** Se aprecia la presencia de numerosos vasos sanguíneos y presencia de adipocitos. **b3.** Se observa sobre la superficie del material aposición de tejido conectivo denso, mejor organizado.

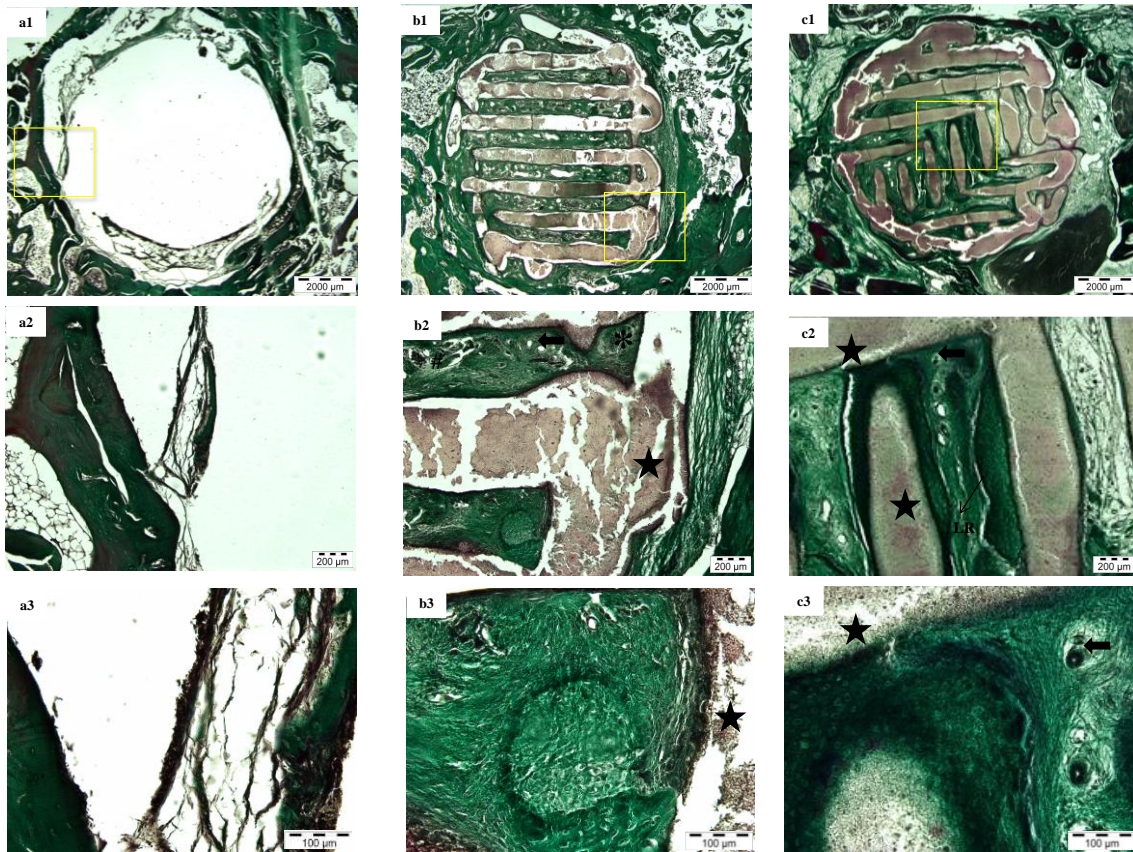


Fig. 21. Imágenes correspondientes a la tinción de TM de los tres tratamientos a las seis semanas. **a1-3** Grupo control. **b1-3** HA. **c1-3** HASiO₂. **a1**. Defecto vacío, aposición de tejido mineralizado desde los bordes del defecto, hacia el interior infiltrado de tejido fibroso incapaz de lograr el relleno completo del defecto, escala 2000 µm. **a2** y **a3** GC mayor aumento. **b1**.área de interés, escala 2000 µm **b2**. Tejido denso fibroso hacia la periferia del andamio, en el interior de los poros tejido conectivo alineado a la superficie del andamio con células mesenquimales fusiformes (*) y células gigantes (#) rodeando el material, sugestivas de reacción a cuerpo extraño. Presencia de vasos sanguíneos (flecha), escala 200 µm. **b3**. Mayor aumento, escala 100 µm. **c1**. área de interés, tejido conectivo laxo en la periferia del defecto, escala 2000 µm . **c2**. Líneas de inversión (LR) en mayor número y contacto con la superficie de biosilice y angiogenesis (flechas). **c3**. Remodelado óseo sobre superficie del andamio, tejido conectivo denso organizado dentro del poro.

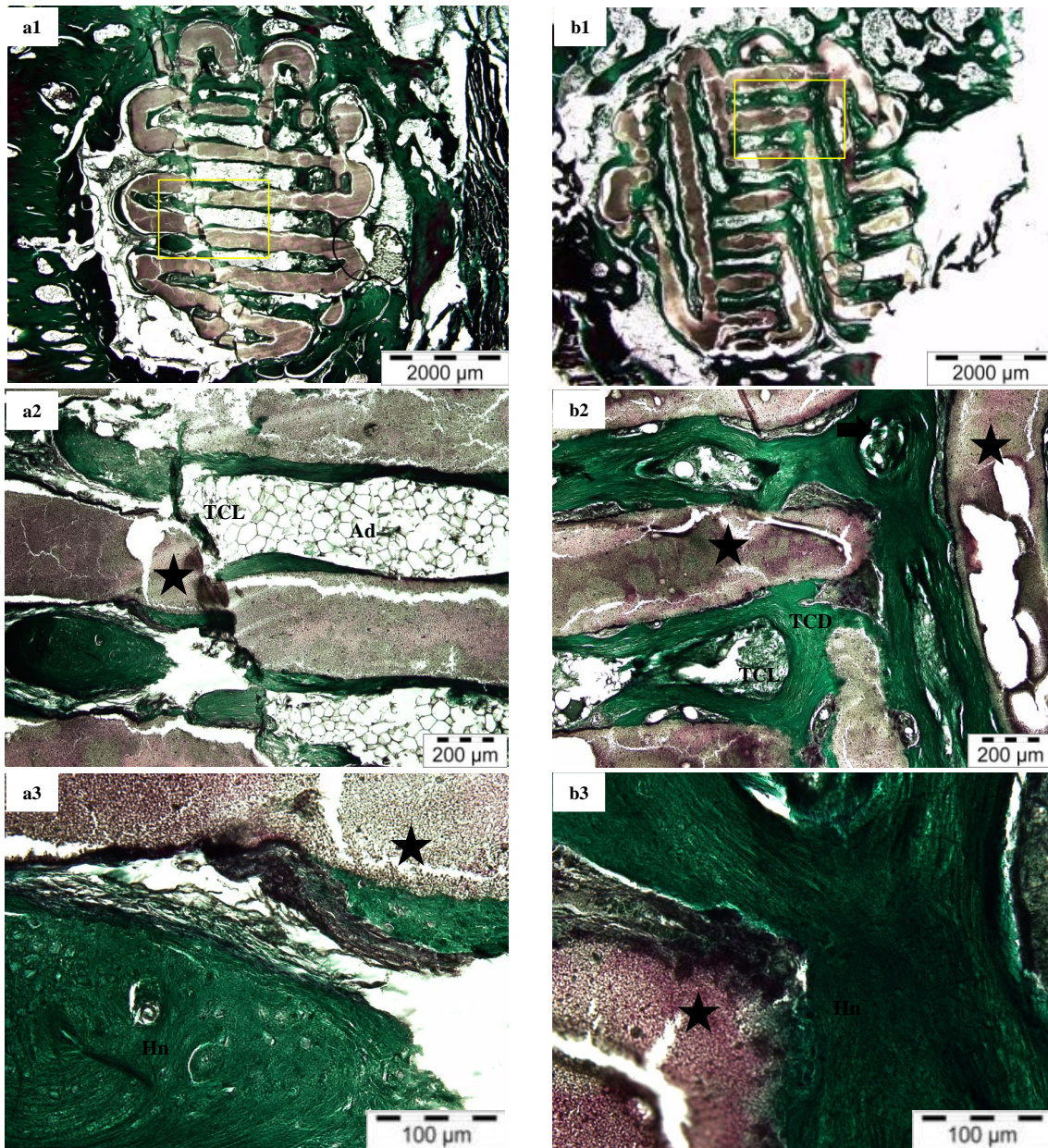


Fig. 22. Imágenes correspondientes a la tinción de TM de los andamios a las 12 semanas. **a1-3** HA **b1-3** HASiO₂. **a1, b1** área de interés, se observan restos del andamio poco biodegradados con crecimiento de tejido en el interior de sus poros, escala 2000 μm. **a2**. al interior de los poros se observa tejido conectivo laxo poblado por adipocitos, focos de osteoide sobre las superficies de las barras. **a3**. Se aprecia foco de tejido denso y disposición concéntrica parecida a osteonas, y hueso nuevo (**Hn**). **b2**. Se observa zonas con tejido conectivo denso (**TCD**), y tejido conectivo laxo (**TCL**) y algunas lagunas de adipocitos, presencia de vasos sanguíneos. **b3**. Mayor aumento.

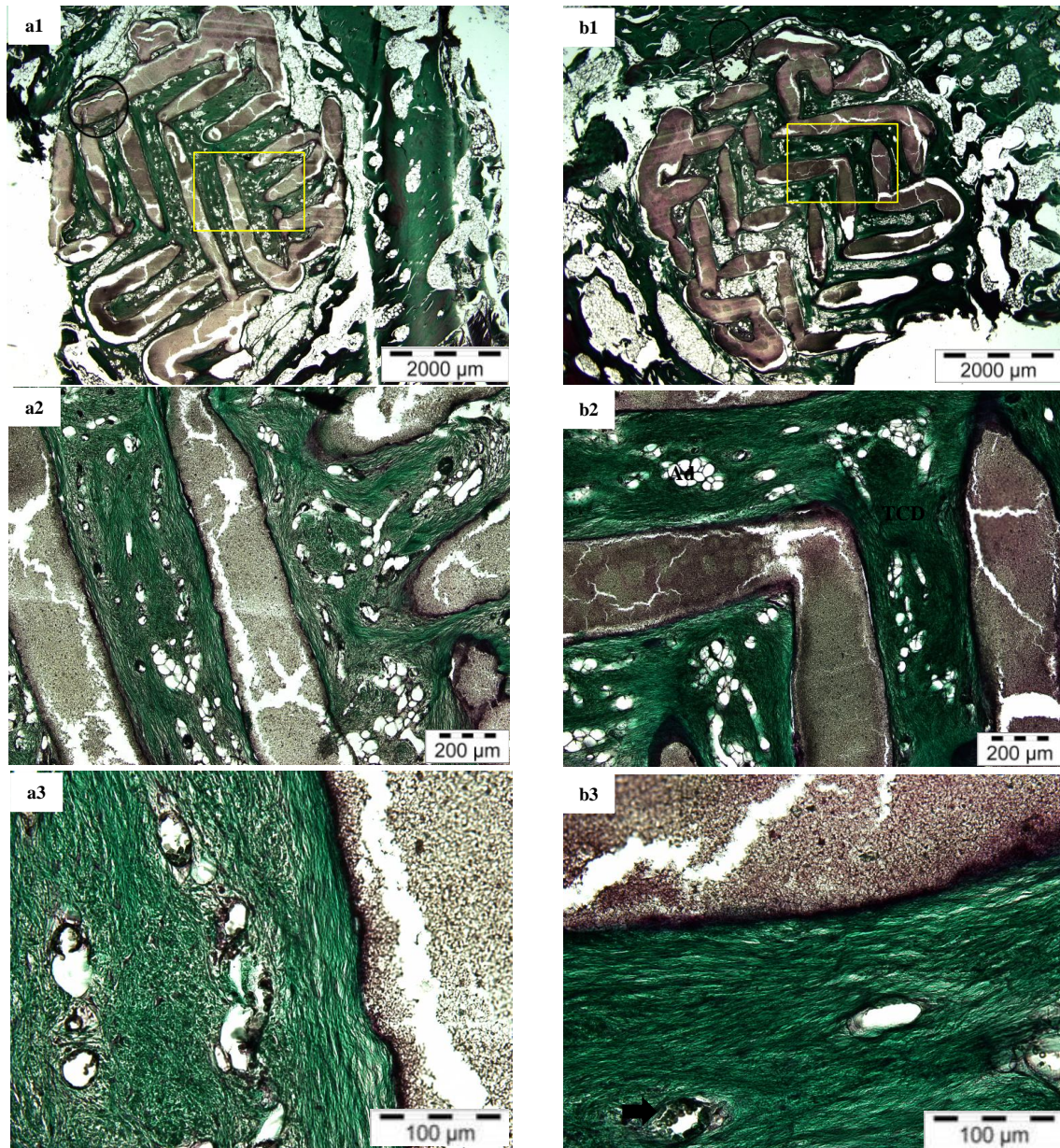


Fig. 23 Imágenes correspondientes a la tinción de TM de ambos tratamientos activados con rhBMP-2/Quitosano a las 12 semanas. **a1-3** HABQ. **b1-3** HASiO₂BQ. **a1,b1**.área de interés, escala 2000 μm, **a2**. abundante tejido adiposo (**Ad**). **a3**. Se aprecia presencia de numerosos vasos sanguíneos y tejido conectivo en maduración. **b2**. Se observa tejido conectivo denso (**TCD**) depositado sobre la superficie del material conteniendo adipocitos (**Ad**). **b3**. Mayor aumento, presencia de vasos sanguíneos (flecha).

5.6 Escala Histológica

No existió diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento en los tiempos de seguimiento ($p > 0,05$). Las características evaluadas en cuanto a relación superficie andamio – tejido óseo, formación ósea dentro de los poros y porcentaje de hueso neoformado se expone en la figura 24. Aunque sin significación estadística todos los grupos de tratamiento mostraron mejorías con el paso del tiempo, y las muestras tratadas con factores de crecimiento alcanzaron la mejor puntuación de crecimiento de tejido óseo dentro de los poros.

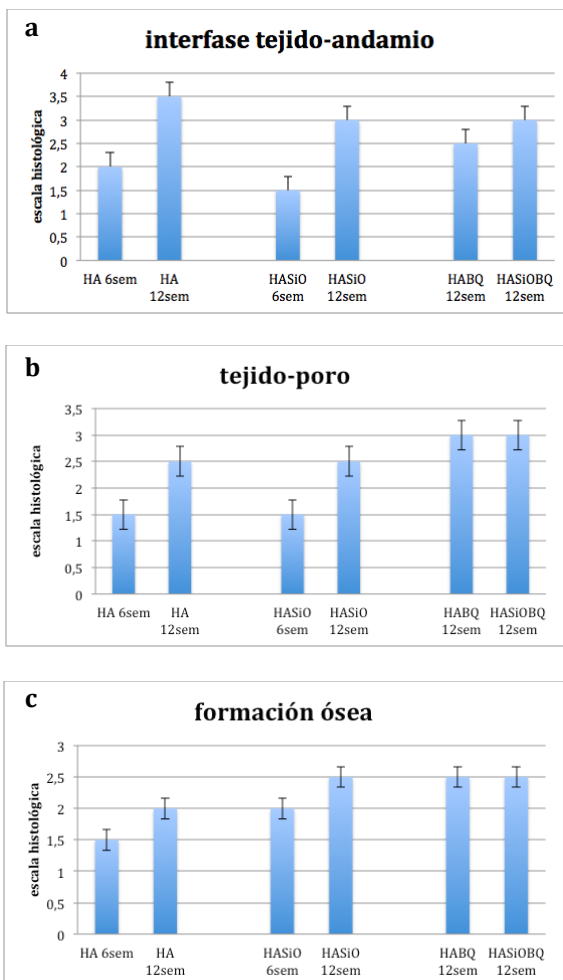


Fig. 24. Resultados de la puntuación histológica. Las puntuaciones de (a) respuesta del tejido duro en la interfaz andamio-hueso, (b) la respuesta del tejido dentro de los poros del andamio, y (c) la cantidad de

formación ósea dentro del defecto a las 4 semanas y 12 semanas para los cuatro grupos examinados (HA, HASiO₂, HABQ, HASiO₂BQ). Las barras de error representan la desviación estándar. No existieron diferencias significativas p>0,05.

La medición histométrica para determinar el porcentaje de tejido neoformado, material residual y tejido óseo mineralizado se refleja en la tabla 3. No existieron diferencias estadísticamente significativas p>0,05 entre los andamios

Tabla 3. Resultados porcentajes de tejido neoformado.

Tiempo cicatrización	Tej.Neoformado %		Material residual %		Tej. óseo %	
	HA	HASiO ₂	HA	HASiO ₂	HA	HASiO ₂
6 semanas	50,78+/- 15,7	51,04+/-7,44	49,22+/-15,7	48,96+/-7,44	37,15+/-9	43,54+/-4
12 semanas	54,32+/-16,87	58,04+/-6,17	45,68+/-7,24	41,96+/-6,17	45,07+/-3,84	52,12+/-3,43

Área en μm^2 expresado en porcentaje % con la desviación estándar SD.

6. DISCUSIÓN

Nuestros resultados *in vitro* muestran una buena biocompatibilidad de ambos andamios evaluados, promoviendo la adhesión y el crecimiento celular de línea pre-mioblastica C2C12-GFP, al igual que la proliferación de la línea celular pre-osteoblastica MC3T3 E1. La comparación de nuestros resultados con la evidencia disponible se ve dificultada por la enorme variedad en los sistemas experimentales *in vitro* utilizados. Las variaciones en el modo de cultivo, bien sea cultivo de células con los extractos de materiales o en contacto directo con el material (partículas, recubrimientos, 3D, etc.) o con la fuente de células utilizada (osteoblastos humanos primarios, células madre mesenquimales, células MG63, células pre-osteoblásticas derivadas de ratón MC3T3, etc.), además el proceso de diferenciación es muy diferente entre las especies y tipos celulares, así como también los tiempos empleados y el método de evaluación (ensayo fosfatasa alcalina ALP, alamar blue, inmunofluorescencia). Este tipo de andamios 3D con diferente configuración de poros se han estudiado previamente con resultados similares a los nuestros. Bae y Cols en 2006 demostraron que la tasa de proliferación y actividad de ALP mejoraba significativamente al incrementar la porosidad entre el 48 – 73% en línea celular de osteosarcoma humano HOS (52). También se ha demostrado que las estructuras combinadas con nanoporos (20-30nm) y macroporos (10-100 μm) de BV permitieron la adhesión, migración y penetración de células MG63 al interior del andamio con una alta tasa de proliferación y viabilidad celular (53). Los andamios usados en este trabajo tienen una estructura con poros interconectados (300-400 μm) similares al hueso trabecular humano, que biológicamente favorecen el crecimiento de vasos y tejidos al interior del andamio. Sin embargo, este tamaño de poros puede suponer una desventaja en experimentación *in vitro*, ya que las células una vez

sembradas pueden migrar por los poros hasta el plástico de la placa multipocillo. Una característica crítica en andamios porosos es la capacidad para que las células sembradas migren y crezcan al interior. La figura 11 y 12 obtenidas por microscopia muestran una correcta adhesión celular a la superficie del material y una propagación adecuada hacia el interior del andamio, en el que la forma y distribución de las células se ve influenciada por el patrón de la superficie del andamio. No obstante, la microscopia no es una técnica suficiente para valorarlo, por eso se recurre a otros métodos como el ensayo histológico y MRI por los que se ha determinado que estos andamios permitían el crecimiento de las células C2C12 sembradas hacia el interior de andamio con un tamaño de poro de 100-130 μm (54). Por todo lo anterior, se realizaron ensayos *in vitro* con otra línea celular para evaluar de otra forma la respuesta celular sobre estos andamios. En esta se emplearon células MC3T3 para determinar la proliferación celular mediante ensayo de Alamar Blue. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los andamios de HA y HASiO₂, sin embargo a los 4 días parecía haber una mayor actividad en los andamios con biosílice, aumentando y estabilizándose con el paso del tiempo para las dos muestras. Esta respuesta temprana en términos de proliferación celular coincide con resultados obtenidos por Bellucci y Cols (55) para composites de HA con BV (BG_Ca / 45S5) a los 4 y 7 días por ensayo de alamar blue sobre otras cerámicas control. Composites de polímeros con HA y biosílice han demostrado mejoras en la adhesión celular, pero no mostraron ningún efecto adicional en procesos de proliferación y diferenciación de células MC3T3. Este hecho parece estar relacionado con la hidrólisis básica que producen los biovidrios, siendo esta alcalinización la que provoca un debilitamiento de la estructura, proporcional al porcentaje de biosílice contenido (56). Experimentaciones con otras líneas celulares demuestran lo contrario, un efecto positivo en la proliferación celular de

materiales con HA/biosilíce comparado HA sola, encontrando diferencias significativas a los 3 y 7 días mediante la determinación de la actividad metabólica por ensayo alamar blue (57). La proliferación celular parece ser más rápida en las superficies con biovidrios, ya que los productos de disolución parece ser suficientes para estimularla.

Una gran variedad de especies se utilizan 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 especies grandes. Además el modelo de bóveda craneal para evaluar regeneración de defectos en zonas de poca carga con diversos biomateriales, se encuentra ampliamente aceptado y resulta similar al hueso mandibular humano, con menor suministro sanguíneo y medula ósea limitada. Sin embargo, se discute la calidad de los resultados de este tipo de estudios, debido a la falta de homogeneidad en los diseños (58, 59). En nuestro estudio, aunque el diámetro del defecto creado casi coincidía con el diámetro del andamio, la osteogénesis era marcada en los bordes del defecto, estuviese o no en contacto con la muestra. Esto se confirma en los controles vacíos, en los que el propio defecto era incapaz de regenerarse por completo a las doce semanas, pero desde los bordes del defecto se sintetizaba una matriz osteoide que iba mineralizando. En nuestro estudio, se observó que el defecto semicrítico de control no se recuperó por completo. Por lo tanto, consideramos que los defectos de calota de conejos que miden 8 mm de diámetro son suficientes para un estudio con un periodo de cicatrización del hueso de 12 semanas.

A pesar de las limitaciones del presente estudio relacionados al tamaño muestral y los métodos de medición histológica semi-cuantitativa, que introducen un sesgo subjetivo, los resultados obtenidos revelan un crecimiento de tejido óseo hacia el interior de los andamio 3D que progresan con el tiempo de seguimiento. Trabajos en el mismo

modelo con andamios 3D de HA, HA biosílice, composites poliméricos/HA y andamios de zirconio/HA con diferente configuración de poros demostraron crecimiento de hueso nuevo entre el 19 – 47%, favoreciendo también la angiogénesis (60-62).

Los hallazgos histológicos muestran diferentes células y tejidos, incluyendo tejido óseo, tejido conectivo y células adiposas, que crecían fácilmente en el andamio 3D. Similares resultados fueron obtenidos en defectos en calvaria de conejo con presentaciones no 3D de HA y biosílice, o en combinación con hueso autólogo y factores de crecimiento (PRP) en tiempos de seguimiento entre 1 a 12 semanas, mostrando en las primeras semanas un componente inflamatorio acompañado de células gigantes multinucleadas en la superficie del material, que se resolvía con el paso de las semanas dando paso a tejido óseo viable (63-65). Moreira y Cols encontraron resultados poco favorables al emplear biovidrios de base sílice en calotas de conejo. Después de 12 semanas revelaron osificación distrófica y una abundante reacción inflamatoria, cuestionando su bioactividad. No obstante, estos resultados mejoraban en el grupo al que adicionaban cultivos celulares de periostio (66). En nuestras muestras con biosílice también es evidente, cercana a la superficie del material, un ligero infiltrado inflamatorio, acompañado de células multinucleadas, células rojas y macrófagos, esto podría explicarse, a que una vez expuesto el material a soluciones fisiológicas, se libera silicio soluble al medio en forma de ácido silícico, a través del intercambio con H^+ y H_3O^+ . Este hecho provoca una alcalinización externa que influye en el metabolismo celular, y favorece la adsorción de proteínas del suero a su superficie. Experimentos *in vivo* han demostrado que esto ralentiza significativamente la formación de la fase mineral ósea (67). La presentación de materiales en partículas puede migrar al tejido circundante, y más en este tipo de defectos, en el que es difícil de mantenerlos, estas partículas se degradan en el tejido blando, produciendo una reacción inflamatoria intensa. Las

partículas liberan calcio dentro del compartimiento extracelular, pudiendo ocurrir una osificación distrófica, que empeora la reacción en el tejido blando. Adicional a esto, durante la intervención de creación del defecto, el instrumental rotatorio de osteotomía puede lesionar el tejido subdural, contribuyendo a esta reacción. De hecho alguna de las muestras implantadas a la evaluación macroscópica en el momento del sacrificio presentaba una reacción a cuerpo extraño en la lámina interna, siendo evidente una mayor biodegradación de la muestra en la proximidad a los tejidos blandos (duramadre) que en la zona central, resultados que coinciden con los obtenidos por Moreira y Cols. (66).

Es bien sabido que la HA presenta una tasa de resorción y solubilidad muy lenta. Estos andamios que pueden persistir en el tiempo tienen aplicación en el campo de la cirugía ortopédica y la cirugía plástica reconstructiva craneofacial. La adición de biosílice, además de mejorar la vascularización, aumenta los marcadores de actividad osteoclastica, relacionados con una degradación más rápida de HASiO_2 (68). Reportes previos demuestran que la fase de óxido de sílice podría degradarse totalmente en un tiempo superior a 8 meses (69), tan pronto se degrada la fase de sílice, las partículas de HA manométricas se exponen y se inicia la formación ósea, quizás por eso el tiempo de seguimiento a las 12 semanas debería de extenderse para valorar nuevos resultados en este tipo de andamios. La propia exposición de HA permite una mayor superficie para formar hueso nuevo, sumado al área de superficie específica de HASiO_2 superior a otras cerámicas, explicaría el mejor contacto hueso-material a este andamio. La morfología del material interfiere con la respuesta biológica y su degradación, nuestros andamios muestran a las 12 semanas una ligera reducción en tamaño, volumen y cambio de forma, siendo necesario ampliar la investigación en el tiempo de degradación de estos andamios.

La incorporación de rhBMP-2 en andamios cerámicos para ingeniería de tejidos aporta características osteoinductoras a los materiales, y puede realizarse por adsorción superficial o por atrapamiento en un material transportador, como el quitosano. Experimentos previos *in vitro* sobre andamios cerámicos 3D con rhBMP-2 determinaron ser adecuados para adhesión celular, proliferación y colonización celular al interior de la estructura, evaluando actividad de ALP en cultivos a los 9 días (54). En nuestro trabajo, esperábamos que el método de atrapamiento de quitosano como liberador de la proteína, diera mejores resultados en regeneración ósea, a vista de los resultados, y con la limitación de solo emplear un espécimen, no encontramos diferencias significativas con los andamios sin activar. Podría explicarse por la dificultad del filme de penetrar al interior del andamio y solo quedarse en la superficie, o en el caso de los andamios con biosílice, por la propia liberación y degradación del sílice localizado en la capa más superficial. Estos resultados coinciden con Lan Levengood y cols, que en modelo porcino en defectos mandibulares, emplearon andamios 3D de fosfato de calcio bifásico con porosidad multiescala (micro y macroporos) activados con atrapamiento de gelatinas microparticuladas como transportador de 5 μm rhBMP-2, encontrando que la proteína no tenía influencia en los microporos de los andamios comparado a los controles (70). Parece que la técnica de activación de los andamios condiciona el comportamiento osteoinductor, Dellinger y cols en 2006 emplearon andamios 3D con BMP-2 (10 μg) en modelo caprino y observaron que la cantidad de tejido óseo aumentó al igual que el contacto íntimo con la superficie con un hueso laminar, a las 4 como a las 8 semanas. No obstante no hallaron diferencias significativas al variar la configuración del microporo (71). En modelo de calvaria de conejo, Jung y cols en 2008 probaron gránulos de cerámicas (HA/TCP) con polímeros (PEG) activados con rhBMP-2 de 10 y 30 μg , controlando la influencia del

periostio y tejido meníngeo con celdas de osteoconducción de titanio, y mediante histomorfometría determinaron que el hueso neoformado a 8 semanas era mayor en los grupos con la proteína.

Estos andamios con poros bimodales, confieren características interesantes a estos materiales, por una parte el macroporo interconectado proporciona el espacio suficiente para el crecimiento de tejido a su interior, y el microporo proporciona mayor superficie de área para disolución local, donde se liberan iones que quedan atrapados en los microporos ($\text{Ca}^{2+} - \text{PO}_4$). Esta sobresaturación de iones sobre el microporo y precipitación de apatita biológica en la superficie parece suficiente para que células madre mesenquimales o osteoprogenitoras reconozcan la superficie y respondan a señales quimiotácticas (70).

La porosidad multiescala de los andamios empleados en este trabajo, es semejante a la del hueso humano, pudiendo facilitar los procesos de regeneración ósea, y convierten a estos materiales en potenciales productos para la ingeniería de tejidos.

7. CONCLUSIONES

Pese a las limitaciones del presente trabajo, y bajo las condiciones experimentales del mismo, podemos concluir:

- Los andamios de HA y HA/Biosílice mediante ensayos de cultivo celular son biocompatibles permitiendo una adecuada adhesión y proliferación celular. No se obtuvieron diferencias significativas en los ensayos *in vitro* pero sí se observó una tendencia a una mejora en la respuesta celular en las muestras de biosílice.
- Los biomateriales 3D a base de HA/Biosílice permiten eventos de regeneración ósea en defectos de calota de conejo.
- No existe diferencia en el proceso de regeneración ósea de andamios 3D de HA y HA/Biosílice activados y sin activar con filmes rhBMP2/Quitosano.
- Las condiciones de experimentación *in vitro* e *in vivo* no son comparables a los procesos biológicos en humanos, se hace necesario ampliar la evidencia disponible sobre estos materiales en ensayos clínicos.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Baron R. Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
2. Eriksen E, Vesterby A, Kassem M, Melsen R, Mosekilde L. Bone remodeling and bone structure. In: Mundy G, Martin T, editors. Physiology and Pharmacology of Bone: Berlin Springer-Verlag; 1993. p. 67-109.
3. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S483-7.
4. Robey P. Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. Principles of Bone Biology: Academic Press Publishers; 2002. p. 225-38.
5. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24(2):218-35.
6. Giannobile W, Rios H, Lang P. Bone as a tissue. In: Lindhe J, Lang N, Karring T, editors. Clinical periodontology and implants dentistry. 1. 5th ed. ed: Blackwell Publishing Ltd; 2008. p. 86-98.
7. Gartner L, Hiatt J. Texto atlas de histología. McGraw-Hill, editor 2008. 114-36
8. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-55.
9. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38.
10. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
11. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(2):E151-7.
12. Abarrategui A. Estudio del quitosano como material portador de rhBMP-2: Desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008.

13. 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.
14. 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.
15. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2011;49(12):832-64.
16. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413-31.
17. Jones JR, Lee PD, Hench LL. Hierarchical porous materials for tissue engineering. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2006;364(1838):263-81.
18. Hench L. Bioceramics. *J Am Ceram Soc*. 1998;81(7):1705-28.
19. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater*. 2012;8(4):1401-21.
20. Navarro-Toro M. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea: Universitat Politècnica de Catalunya 2006.
21. Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Induction Plasma Sprayed Nano Hydroxyapatite Coatings on Titanium for Orthopaedic and Dental Implants. *Surf Coat Technol*. 2011;205(8-9):2785-92.
22. Rey C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. *Biomaterials*. 1990;11:13-5.
23. Peniche C, Solís Y, Davidenko N, García R. Materiales compuestos de quitosano e hidroxiapatita. *Biotechnologia Aplicada*. 2010;27:192-201.
24. Davidenko N, Carrodegua RG, Peniche C, Solis Y, Cameron RE. Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. *Acta Biomater*. 2010;6(2):466-76.
25. Takahashi T, Tominaga T, Watabe N, Yokobori AT, Jr., Sasada H, Yoshimoto T. Use of porous hydroxyapatite graft containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cervical fusion in a caprine model. *J Neurosurg*. 1999;90(2 Suppl):224-30.
26. Yoshida K, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, et al. Enhancement by recombinant human bone morphogenetic protein-2 of bone formation

by means of porous hydroxyapatite in mandibular bone defects. *J Dent Res*. 1999;78(9):1505-10.

27. Xiao W, Fu H, Rahaman MN, Liu Y, Bal BS. Hollow hydroxyapatite microspheres: a novel bioactive and osteoconductive carrier for controlled release of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. *Acta Biomater*. 2013;9(9):8374-83.

28. Thompson ID, Hench LL. Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites. *Proc Inst Mech Eng H*. 1998;212(2):127-36.

29. Gerhardt L, Boccaccini A. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*. 2010;3:3867-910.

30. Jell G, Notingher I, Tsigkou O, Notingher P, Polak JM, Hench LL, et al. Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86(1):31-40.

31. Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng*. 2005;11(5-6):768-77.

32. Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):199-207.

33. Leu A, Stieger SM, Dayton P, Ferrara KW, Leach JK. Angiogenic response to bioactive glass promotes bone healing in an irradiated calvarial defect. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(4):877-85.

34. Day RM, Maquet V, Boccaccini AR, Jerome R, Forbes A. In vitro and in vivo analysis of macroporous biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds containing bioactive glass. *J Biomed Mater Res A*. 2005;75(4):778-87.

35. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91.

36. Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2011;31(7):1245-56.

37. Miranda P, Pajares A, Saiz E, Tomsia AP, Guiberteau F. Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85(1):218-27.

38. Eqtesadi S, Motealleh A, Miranda P, Pajares A, Lemos A, Ferreira J. Robocasting of 45S5 bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the European Ceramic Society*. 2014;34:107-18.

39. Russias J, Saiz E, Deville S, Gryn K, Liu G, Nalla RK, et al. Fabrication and in vitro characterization of three-dimensional organic/inorganic scaffolds by robocasting. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(2):434-45.
40. Michna S, Wu W, Lewis JA. Concentrated hydroxyapatite inks for direct-write assembly of 3-D periodic scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(28):5632-9.
41. Eqtesadi S, Motealleh A, Pajares A, Miranda P. Effect of milling media on processing and performance of 13-93 bioactive glass scaffolds fabricated by robocasting. *Ceramics International*. 2015;41(1, Part B):1379-89.
42. Fu Q, Saiz E, Tomsia AP. Bioinspired Strong and Highly Porous Glass Scaffolds. *Adv Funct Mater*. 2011;21(6):1058-63.
43. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*. 2011;23(4):609-20.
44. Civantos A. Caracterización físico-química y biológica de filmes de quitosano como transportadores de la rhBMP -2 en la regeneración del tejido óseo . Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2014.
45. Lopez-Lacomba JL, Garcia-Cantalejo JM, Sanz Casado JV, Abarategi A, Correas Magana V, Ramos V. Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration. *Biomacromolecules*. 2006;7(3):792-8.
46. Li XW, Yasuda HY, Umakoshi Y. Bioactive ceramic composites sintered from hydroxyapatite and silica at 1,200 degrees C: preparation, microstructures and in vitro bone-like layer growth. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(6):573-81.
47. Santos JD, Jha LJ, Monteiro FJ. In vitro calcium phosphate formation on SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅ glass reinforced hydroxyapatite composite: a study by XPS analysis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1996;7(3):181-5.
48. Suominen EA, Aho AJ, Juhanoja J, Yli-Urpo A. Hydroxyapatite-glass composite as a bone substitute in large metaphyseal cavities in rabbits. *Int Orthop*. 1995;19(3):167-73.
49. Aho AJ, Suominen E, Alanen A, Yli-Urpo A, Knuuti J, Aho HJ. Remodeling of the tibia after grafting of a large cavity with particulate bioactive glass-hydroxylapatite--case report on treatment of fibrous dysplasia with 13 years' follow-up. *Acta Orthop Scand*. 2003;74(6):766-70.
50. Thoma DS, Kruse A, Ghayor C, Jung RE, Weber FE. Bone augmentation using a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based

bone substitute materials with and without recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Oral Implants Research*. 2015;26(5):592-8.

51. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*. 2008;43(5):931-40.

52. Bae CJ, Kim HW, Koh YH, Kim HE. Hydroxyapatite (HA) bone scaffolds with controlled macrochannel pores. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(6):517-21.

53. Wang S, Falk MM, Rashad A, Saad MM, Marques AC, Almeida RM, et al. Evaluation of 3D nano-macro porous bioactive glass scaffold for hard tissue engineering. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2011;22(5):1195-203.

54. Abarrategi A, Moreno-Vicente C, Martinez-Vazquez FJ, Civantos A, Ramos V, Sanz-Casado JV, et al. Biological properties of solid free form designed ceramic scaffolds with BMP-2: in vitro and in vivo evaluation. *PLoS One*. 2012;7(3):e34117.

55. Bellucci D, Sola A, Gazzarri M, Chiellini F, Cannillo V. A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(3):1091-101.

56. Rodenas-Rochina J, Ribelles JL, Lebourg M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(5):1293-308.

57. Tan F, Naciri M, Al-Rubeai M. Osteoconductivity and growth factor production by MG63 osteoblastic cells on bioglass-coated orthopedic implants. *Biotechnol Bioeng*. 2011;108(2):454-64.

58. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(8):915-30.

59. Delgado-Ruiz RA, Calvo Guirado JL, Romanos GE. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res*. 2015.

60. Simon JL, Michna S, Lewis JA, Rekow ED, Thompson VP, Smay JE, et al. In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(3):747-58.

61. Kim HW, Shin SY, Kim HE, Lee YM, Chung CP, Lee HH, et al. Bone formation on the apatite-coated zirconia porous scaffolds within a rabbit calvarial defect. *J Biomater Appl*. 2008;22(6):485-504.

62. Bae S-Y, Park J-C, Shin H-S, Lee Y-K, Choi S-H, Jung U-W. Tomographic and histometric analysis of autogenous bone block and synthetic hydroxyapatite block grafts without rigid fixation on rabbit calvaria. *Journal of Periodontal and Implant Science*. 2014;44(5):251-8.
63. Matsumoto MA, Caviquioli G, Bigueti CC, Holgado Lda, Saraiva PP, Rennó ACM, et al. A novel bioactive vitroc ceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts. *Journal Of Materials Science Materials In Medicine*. 2012;23(6):1447-56.
64. Penteado LA, Colombo CE, Penteado RA, Assis AO, Gurgel BC. Evaluation of bioactive glass and platelet-rich plasma for bone healing in rabbit calvarial defects. *J Oral Sci*. 2013;55(3):225-32.
65. Acar AH, Yolcu U, Gul M, Keles A, Erdem NF, Kahraman SA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(4):606-14.
66. Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Barakat K, Andrus L, Bradford M, Gilsdorf M, et al. Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2005;16(1):63-70.
67. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999;20(23-24):2287-303.
68. Ghanaati S, Barbeck M, Lorenz J, Stuebinger S, Seitz O, Landes C, et al. Synthetic bone substitute material comparable with xenogeneic material for bone tissue regeneration in oral cancer patients: First and preliminary histological, histomorphometrical and clinical results. *Ann Maxillofac Surg*. 2013;3(2):126-38.
69. Henkel KO, Gerber T, Lenz S, Gundlach KK, Bienengraber V. Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(5):606-13.
70. Lan Levengood SK, Polak SJ, Poellmann MJ, Hoelzle DJ, Maki AJ, Clark SG, et al. The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity. *Acta Biomater*. 2010;6(8):3283-91.

71. Dellinger JG, Eurell JA, Stewart M, Jamison RD. Bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds with and without tailored microporosity to deliver bone morphogenetic protein 2. *J Biomed Mater Res A*. 2006;76(2):366-76.