



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA
Y PSICOBIOLOGÍA

Un Nuevo Copolímero para la Regeneración
Tisular. Estudio Biomecánico y Densitométrico

D^a Raquel Lax Pérez

2015

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

UNIVERSIDAD DE MURCIA



FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA Y EMBRIOLOGÍA

Un Nuevo Copolímero Para la Regeneración Tisular. Estudio Biomecánico y Densitométrico.

Directores:

-**Dr. Jose Luís Peris Serra.** Investigador Senior. Área I+D

Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV). Universidad Politécnica de Valencia.

-**Dra. Matilde Moreno Cascales.** Profesor Titular de Anatomía Humana. Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

-**Dr. Manuel Medina Quirós.** Profesor Asociado de Traumatología y Ortopedia. Dpto. de Cirugía, Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

Doctorando:

Dña. Raquel Lax Pérez

Licenciada en Medicina y Cirugía

2015

Dedicada a mis hermanos

Ángel y M^a Isabel

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

AGRADECIMIENTOS:

Mi más profundo agradecimiento a los profesores José Luis Peris Serra, Matilde Moreno Cascales y Manuel Medina Quirós por su esfuerzo, interés y dedicación en la consecución de esta tesis.

A Victor Primo Capella por tu valiosa colaboración en el trabajo y tu apoyo constante.

Al Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV) por darme la oportunidad de realizar la tesis y todo el personal que allí trabaja y que ha colaborado en este proyecto, muy especialmente a José Luis y Victor. A las compañeras de laboratorio Isabel Roger López y Amalia Gómez Pérez por su ayuda durante el desarrollo del experimento.

A mis amigos y compañeros de los Hospitales Universitarios Santa Lucía y Reina Sofía gracias por vuestras enseñanzas de la profesión, por vuestra amistad y apoyo en los momentos difíciles.

A mis amigos, en especial Maribel, Sofía, Helena, Ana, Luisa, Cristina, Pepa, Ángel, Antonio, Fran, Miguel y José Luis.

A los ausentes Pepa, Carmen, Isabel y Ángel os recuerdo con cariño.

A mis padres Carlos y M^a del Carmen; a mis hermanos Ángel y M^a Isabel y a mis sobrinos M^a del Mar, Ángel y Carlos, por nuestro ánimo, apoyo y confianza a la hora de realizar cualquier proyecto.

Índice

ÍNDICE	I
I. INTRODUCCIÓN	5
1. EL TEJIDO ÓSEO	8
1.1 Materia orgánica del hueso	9
1.1.1 Componente celular	9
1.1.2 Matriz ósea extracelular (MEC) o sustancia intercelular	13
1.2. Componente mineral o inorgánico del hueso.....	16
1.3. Características macroscópicas del hueso	16
1.4. Características microscópicas del hueso	17
1.5. Propiedades mecánicas de los huesos	19
2. PROCESO DE CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS	23
3. DEFINICIÓN DE DEFECTO ÓSEO DE TAMAÑO CRÍTICO	25
3.1 Causas de defectos óseos en la práctica clínica	25
3.1.1 Pseudoartrosis y defectos congénitos (pseudoartrosis congénitas)	26
3.1.1.1. Clasificación de las pseudoartrosis	27
3.1.1.2 Tratamiento de las pseudoartrosis	30
3.1.1.3. Etiopatogenia de las pseudoartrosis	31
3.1.2 Infecciones	31
3.1.3 Tumores	34
3.1.4. Defectos óseos en cirugía de revisión protésica	37
3.2. Soluciones actuales a los defectos óseos.....	40
3.2.1. Injerto óseos	40
3.2.1.1 Clasificación de los injertos óseos	42
3.2.1.2. Fases de regeneración del injerto óseo	47

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

3.2.2. Biomateriales	48
3.2.2.1 Metales y aleaciones	50
3.2.2.2. Ceramias y biovidrios	51
3.2.2.3. Polímeros para la aplicación de ingeniería tisular: el ácido poliláctico	53
3.2.3. Factores de crecimiento y sus aplicaciones clínicas en la regeneración ósea	58
3.2.3.1. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)	59
4. INGENIERÍA TISULAR	62
4.1. Pilares básicos de la ingeniería tisular. Definición y aplicaciones.....	62
4.1.1 Componente celular	64
4.1.2. Andamios; Scaffold; matrices de soporte. Características de la Membrana Extracelular.....	65
4.1.2.1 Características del andamio	66
4.1.2.2 Tipos de andamios según su composición	67
4.1.2.3 Diseño y esterilización de los andamios.....	69
4.1.2.4 Método de fabricación de los andamios en la ingeniería tisular	70
4.1.3. Señales celulares	74
4.2. Nanotopografía en la ingeniería de los tejidos	75
4.2.1. Tipos de Nanoestructuras	76
4.2.1.1. Nanotubos.....	76
4.2.1.2. Nanopartículas	78
4.2.1.3. Nanofibras	78
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	81
III. MATERIAL Y MÉTODOS	85
1. ESTUDIO EXPERIMENTAL	87

1.1.	Modelo animal	87
1.2.	Diseño experimental	92
1.3.	Preparación y caracterización de las matrices de soporte	94
1.4.	Procedimiento quirúrgico	95
1.4.1.	Preanestesia y preparación del animal	95
1.4.2.	Anestesia	96
1.4.3.	Cirugía	98
1.4.4.	Eutanasia	100
2.	ESTUDIOS BIOMECÁNICOS	100
2.1.	Ensayo de flexión a cuatro puntos	102
2.2.	Ensayo de torsión	112
3.	DENSITOMETRIA POR TOMOGRAFIA	115
4.	ANALISIS ESTADISTICO	118
IV.	RESULTADOS	123
1.	ESTUDIO BIOMECÁNICO DE FLEXIÓN EN 4 PUNTOS	125
1.1.	Perfil Polar de Rigidez a Flexión (PPRF)	126
1.1.1.	A las 8 semanas	126
1.1.2.	A las 16 semanas	129
1.2.	Índice de rídez (SI), índice de área (AR) e índice de planitud (FR)	132
1.2.1.	A las 8 semanas	132
1.2.2.	A las 16 semanas	135
2.	ESTUDIO BIOMECÁNICO DE TORSIÓN.....	141
2.1.	Par torsor máximo (PTR), tenacidad recuperada (TR) y rigidez recuperada (RR)	141
2.1.1.	A las 8 semanas	141
2.1.2.	A las 16 semanas	146
3.	DENSITOMETRÍA POR TOMOGRAFÍA	150

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

3.1.	Reconstrucciones en 3 dimensiones	150
3.1.1.	A las 8 semanas	150
3.1.2.	A las 16 semanas	151
3.2.	Análisis densitométricas (PV y PD)	152
3.2.1.	A las 8 semanas	152
3.2.2.	A las 16 semanas	155
V.	DISCUSIÓN	161
1.	Morfología del callo a partir de imágenes de TAC	168
2.	Ensayos mecánicos	171
2.1.	Ensayos de flexión a cuatro puntos	172
2.2.	Ensayos de torsión	176
3.	TAC y densitometría.....	181
VI.	CONCLUSIONES	187
VI.	BIBLIOGRAFÍA	191

I. INTRODUCCIÓN

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

En ocasiones los traumatólogos nos encontramos, por diferentes causas, ante defectos del tejido óseo que no podemos reparar. En estas situaciones clásicamente hemos recurrido al aporte extra de hueso para rellenar el defecto óseo, con la idea de que la osteointegración del hueso añadido consiga la consolidación y por tanto la recuperación funcional de la región afecta.

La pérdida de tejido óseo puede aparecer como consecuencia de infecciones, tumores, traumatismos, defectos congénitos o pseudoartrosis, y representa un problema no resuelto en la cirugía ortopédica reconstructiva actual. La transferencia de injerto óseo pediculado, la osteogénesis por distracción y los injertos óseos (autoinjertos y aloinjertos) son por ahora los procedimientos más utilizados. Sin embargo, a pesar de las ventajas, cada una de estas técnicas presenta también limitaciones. Así, la transferencia de injerto óseo vascularizado es un procedimiento complejo, y puede fracasar debido a trombosis venosa o isquemia arterial. La osteogénesis por distracción puede generar la infección de los elementos de fijación externa, fractura, retardo de consolidación, y pseudoartrosis. El empleo de hueso autólogo, además de proporcionar una cantidad limitada de hueso (Fitzgibbons y col. 2011), puede producir morbilidad en el lugar de extracción (dolor, infección, hematoma, fracturas...) (Andrew 1998).

En las últimas décadas se han estudiado diferentes alternativas para tratar los defectos óseos:

- aloinjertos óseos de cortical y esponjosa,
- cerámicas,

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- matriz ósea desmineralizada,
- materiales biológicos de médula ósea (células madre y células progenitoras),
- diversos compuestos y materiales osteoinductivos químicos o físicos (factores de crecimiento, estimulación eléctrica y ultrasónica), etc.

Los contactos con el Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV) nos proporcionaron la posibilidad de iniciar un trabajo de investigación para profundizar en el conocimiento de nuevos biomateriales que pudieran aplicarse clínicamente en la solución de este problema.

Para entender la importancia de estos biomateriales consideramos necesario recordar las características morfológicas del tejido óseo y el proceso de consolidación de las fracturas.

1. **El tejido óseo.**

El **tejido óseo** es un tejido conectivo especializado que constituye el principal componente de los huesos en los vertebrados. Está formado por células y componentes extracelulares calcificados, que forman la matriz ósea. El hueso está constituido por materia orgánica (30%) e inorgánica o mineral (70%) (Delgado Martínez 2015) (Miller 2009). Se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión.

Desempeña varias funciones en el organismo: (Forriol Campos 2009; Miller 2009; Delgado Martínez 2015)

- **Función mecánica:** Permite la protección de órganos vitales ante traumatismos. Proporciona un cuadro rígido para órganos y tejidos blandos desempeñando la función de sostén. Mediante la fijación de los tendones al hueso se permite el movimiento.

I. Introducción

- **Función metabólica:** Participa en el almacenamiento de minerales y factores de crecimiento además de intervenir en el metabolismo de la glucosa a partir de la secreción de la hormona osteocalcina.
- **Función hematopoyética:** La médula ósea roja contenida en los hueso realiza la síntesis de las células sanguíneas.

1.1 Materia orgánica del hueso

La materia orgánica representa el 30% de la composición del hueso seco y en ella quedan integrados los elementos celulares (en una proporción del 2%) y la sustancia intercelular o matriz ósea extracelular (MEC) (en un 98%) (Miller 2009; Delgado Martínez 2015).

1.1.1 Componente celular:

Hay cuatro tipos de células óseas específicas: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células de revestimiento (Figura 1).

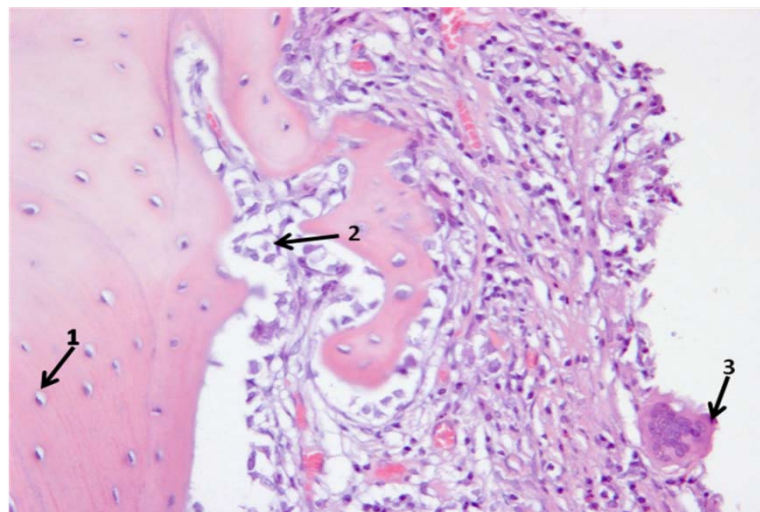


Figura 1. Diferentes tipos celulares presentes en el hueso en m.o con tinción H.E. : osteocito (1), osteoblasto(2) y osteoclasto (3). Imagen cedida por Dr. A.J Martínez Torrano.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- **Osteoblastos:**

Los osteoblastos son células mononucleares responsables de la formación ósea. Se originan a partir de células madre mesenquimales localizadas en la superficie perióstica y endóstica llamadas preosteoblastos, que bajo la influencia de factores de crecimiento se diferencian en osteoblastos. Producen colágeno y sustancia fundamental (material amorfo e hidratado compuesto por glucosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas de adherencia) que son los componentes de la matriz ósea. Los osteoblastos generan un tejido denominado osteoide, que tras un periodo de maduración se mineraliza, constituyendo la plantilla sobre la que se organiza la estructura ósea. Morfológicamente presenta una forma redondeada y un citoplasma rico en orgánulos que le confiere un aspecto polar. Lo encontramos en la interfase entre la superficie del hueso en formación y también en otros tejidos como la medula ósea y el periostio. Secretan una gran variedad de macromoléculas como son el colágeno, la fosfatasa alcalina, la osteonectina, la fibronectina, la vitronectina, la osteopontina y la sialoproteína de hueso. Los osteoblastos determinan la mineralización de la matriz mediante la secreción de fosfatasa alcalina, y posiblemente también influyan en la organización de ésta, aunque se desconoce completamente el mecanismo.

- **Osteocitos:**

Los osteocitos son osteoblastos que han madurado al quedar atrapados en las lagunas dentro de la matriz ósea. Suponen el 90% de las células del hueso maduro. Tienen baja actividad de síntesis, pero se cree que son los responsables del control local de la remodelación. Morfológicamente destaca su capacidad para establecer redes que permiten la comunicación entre los canalículos óseos y las células superficiales del

hueso. Los osteocitos monitorizan la carga mecánica y el daño tisular en los huesos, así como la respuesta de adaptación del hueso a la formación o la resorción ósea. Según indica Cuenca López, es posible detectar la carga mecánica a través del movimiento de los fluidos del sistema canalicular y de las alteraciones en la matriz (Cuenca-Lopez 2010). La reparación de los sitios dañados mediante el recambio óseo se desencadena, posiblemente, por apoptosis de los osteocitos (Forriol Campos 2009). Además, como indica Charles-Harris Ferrer en su tesis (Charles-Harris Ferrer 2007), los osteocitos, en la matriz ósea, desempeñan funciones pro-osteolíticas (Burkhardt 1976) y de regulación de la homeostasis del fosfato (Feng 2006) y del calcio. (Teti y Zallone 2009)

- **Osteoclastos**

Los osteoclastos son células multinucleadas, especializadas en la resorción ósea (destrucción del tejido óseo), función que está en equilibrio con la formación ósea llevada a cabo por los osteoblastos. Derivan de los mismos precursores hematopoyéticos que dan lugar a monocitos y macrófagos. Morfológicamente, son células muy voluminosas, redondeadas y con abundantes núcleos (3 a 20) y poseen un protoplasma rico en fosfatasa. (Forriol Campos 2009). En la superficie de su membrana tienen configurada el área para la reabsorción, por lo que encontramos numerosos lisosomas. Los osteoclastos reabsorben la fase mineral del hueso mediante la secreción de hidrogeniones, que bajan el pH del medio líquido. Esto conduce a la liberación de Ca_2 , $(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ y H_2PO_4 e hidroxapatita, de ahí que los osteoclastos intervengan en la homeostasis de la calcemia como respuesta a la hormona paratiroidea y a la calcitonina. La fase orgánica del hueso se degrada por medio de una serie de proteasas de cisteína. Cuando el osteoclasto completa su ciclo de resorción, desaparece por apoptosis (Forriol Campos 2009; Miller 2009).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- **Células de revestimiento**

Son células aplanadas y con escasos orgánulos, que se corresponden a osteoblastos que han concluido la síntesis de matriz ósea. En el adulto pueden cubrir hasta el 80 % de las superficies trabeculares y endocorticales y están separadas del límite mineralizado del hueso por una fina capa de tejido conectivo. Al igual que los osteoblastos, están conectadas entre sí y con los osteocitos, mediante uniones comunicantes. Constituyen una capa celular de revestimiento o membrana ósea funcional, que separa el compartimento óseo de los fluidos intersticiales, permitiendo la comunicación entre la superficie del hueso y los osteocitos de la matriz ósea. Además regula el intercambio iónico y también produce factores locales que participan en el control de la fase inicial de remodelado óseo. Por efecto de diversos estímulos, estas células dejan libre la superficie del hueso, permitiendo la llegada de los osteoclastos. Las células de revestimiento habitualmente no presentan actividad mitótica, pero al ser estimuladas se pueden transformar de nuevo en osteoblastos.

Otras células que podemos encontrar formando parte del tejido óseo, aunque en pequeñas proporciones son los mastocitos. (Gannon y col. 2001; Delgado Martínez 2015). Estas células sintetizan y secretan histamina y heparina, así como un amplio espectro de enzimas que degradan la de matriz extracelular, factores de crecimiento, factores proangiogénicos y citoquinas. Muchas de estas moléculas también influyen en el reclutamiento, diferenciación y la actividad de los osteoclastos, fenómenos que apuntan a la diferenciación de los mastocitos en el recambio óseo.

1.1.2 Matriz ósea extracelular (MEC) o sustancia intercelular

I. Introducción

La matriz ósea está formada en un 90% por fibras de colágeno y otras proteínas no colágenas.

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano. La subunidad de colágeno, llamada tropocolágeno, es una fibra de unos 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro compuesta por tres cadenas polipeptídicas en dextra hélice. Los aminoácidos se disponen de forma regular dentro de cada hebra de polipéptido siguiendo la secuencia: glicina-X-Y, donde X representa varios residuos de aminoácidos y la Y casi siempre es la prolina o hidroxiprolina. El colágeno se reúne en un patrón organizado dentro de la microestructura del hueso y modula los sitios de calcificación del hueso (ver Figura 2) (Miller 2009; Delgado Martínez 2015).

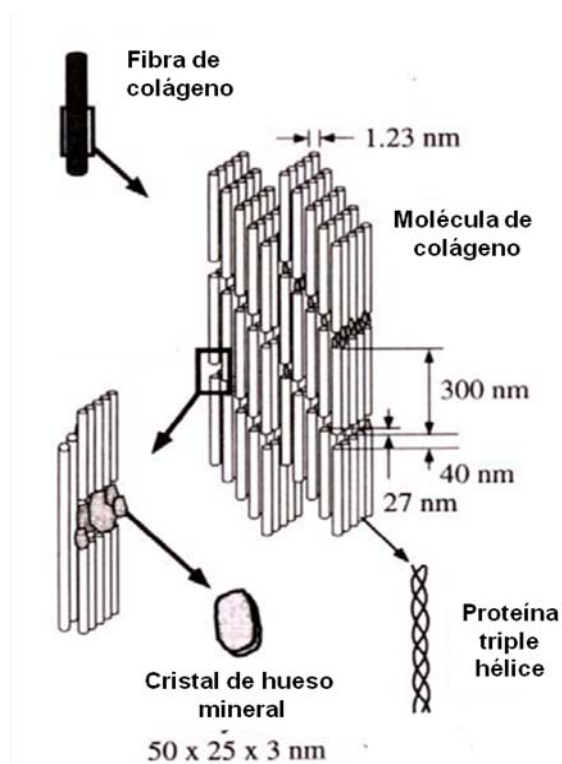


Figura 2: Distribución de las fibras de colágeno y cristales de hidroxiapatita dentro de la microestructura del hueso (Modificado de Rho y col., 1998).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Las proteínas no colágenas del hueso desempeñan un papel importante en la remodelación ósea y en la osteogénesis. En este grupo se destacan: los factores de crecimiento, las citoquinas, las osteonectinas, la osteopontina, la osteocalcina, las sialoproteínas de hueso, el ácido hialurónico, la trombospondina, los proteoglicanos, los fosfolípidos y las fosfoproteínas. (Glimcher 1989; Rho y col. 1998). Las funciones de las proteínas no colágenas quedan resumidas en la tabla 1.

<i>Proteínas no colágenas</i>	<i>Función</i>
Fosfatasa alcalina	Fosfotransferasa, transportadora de Ca^{2+} ; hidroliza inhibidores de deposición mineral, como los pirofosfatos.
Osteonectina	Media la deposición de Hidroxiapatita HA; se une a factores de crecimiento; debe tener influencia en el ciclo celular de la proteína antiadhesiva
Ácido hialurónico	Ocupa espacios destinados a ser hueso. Constituye una matriz extracelular que permite lubricar, absorber, transportar los nutrientes en las células y eliminar los residuos. Desde un punto de vista biomecánico, en el hueso tiene la capacidad de absorber los impactos.
Osteocalcina	Regula la actividad de los osteoclastos y sus precursores, marca el punto de cambio entre resorción y formación ósea. Regula la maduración mineral.
Trombospondina	Acoplamiento celular, se une a la heparina, plaquetas, colágeno tipo I y C, trombina, fibrinógeno, laminina, plasminógeno, e inhibidor del activador del plasminógeno.
Fibronectina	Se une a células, fibrina, heparina, gelatina, colágeno. Organiza el citoesqueleto intracelular. Ayuda a crear una red cruzada en la MEC, uniéndose a otros componentes de la MEC.
Vitronectina	Proteína de acoplamiento celular debido a sus sitios de unión para integrinas, se une al colágeno, heparina, plasminógeno, e inhibidor del activador del plasminógeno.
Osteopontina	Se une a células, inhibe la mineralización y la sintetasa de óxido nítrico, regula la proliferación, la reparación tisular, e inicia la mineralización.
Sialoproteína ósea	Se une a células, al Ca^{2+} , debe iniciar la mineralización
Albúmina	Transporta proteínas; inhibe el crecimiento del cristal de HA.

Tabla 1: Funciones de las proteínas no colágenas que se encuentran en el hueso.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

1.2. Componente mineral o inorgánico del hueso

El componente mineral o inorgánico del hueso, representa el 70% del hueso seco. Se genera con el proceso de mineralización de la matriz ósea en el que interviene los osteoblastos al precipitar las sales que almacenan en su interior (Forriol Campos 2009). Las vesículas de la matriz desarrolladas en los osteoblastos y los condrocitos de 100nm de diámetro, contienen calcio e iones de fosfato inorgánico. Éstas son las que incitan la formación de cristales de hidroxiapatita, construyendo bloques de mineralización ósea (Harmey y col. 2004). La mayor parte del componente mineral de hueso es similar HA natural ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), y se dispone en forma de cristales que están compuestos en un 80 % de fosfato tricálcico, un 10% de carbonato cálcico y numerosas trazas de otros elementos. Estos cristales se disponen ordenados en la misma dirección que las fibras colágenas. El 90% del calcio, el 85% del fósforo y entre el 40 y el 60% del sodio del organismo, se asocian a los cristales minerales del hueso.

La unión del colágeno con la hidroxiapatita es lo que confiere al hueso sus excepcionales propiedades mecánicas, siendo más resistente que el acero (Forriol Campos 2009). Según indica Charles-Harris Ferrer (Charles-Harris Ferrer 2007) basándose en los trabajos de Wainwright (Wainwright 1976), Glimcher (Glimcher 1989) y Horne (Horne y col. 2005), las propiedades mecánicas del hueso se deben a la impregnación de la matriz orgánica con los cristales HA.

1.3. Características macroscópicas del hueso

Macroscópicamente en el hueso se distingue una parte cortical y otra esponjosa (ver Figura 3).

El hueso cortical o compacto es muy denso y está formado sólo por canales microscópicos. Constituye las paredes externas de los huesos y se encarga principalmente de la función de protección y soporte del esqueleto. Representa el 80% del total de la masa ósea del cuerpo humano. Es más denso y con menor porosidad que el esponjoso.

El hueso esponjoso o trabecular supone el 20% de la masa ósea. Está formado por trabéculas que constituyen entramados de interconexiones. Lo podemos encontrar en el cuerpo vertebral, la cresta iliaca, el esternón, en las zonas metáfiso-epifisiarias de los huesos largos y en el feto (Forriol Campos 2009; Miller 2009; Delgado Martínez 2015)

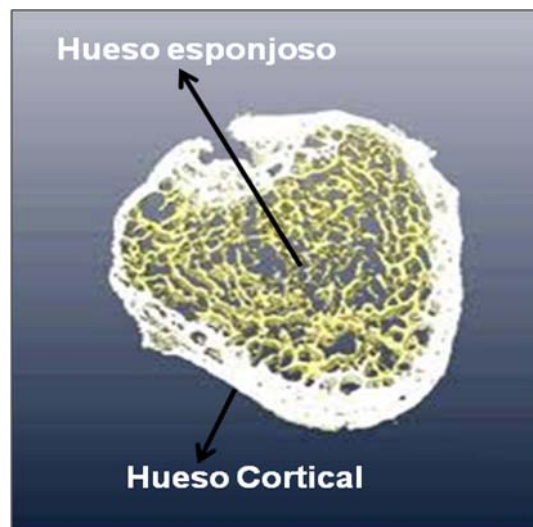


Figura 3 Reconstrucción tridimensional de una sección transversal de un hueso largo que muestra la cortical y regiones esponjosa, (Ratoc system engineering CO.LTD, 2006).

1.4. Características microscópicas del hueso

Desde un punto de vista microscópico, el hueso como tejido, se puede dividir en dos tipos (Forriol Campos 2009; Miller 2009; Delgado Martínez 2015) :

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Hueso fibrilar o primitivo: presente en el embrión y en el recién nacido, en el callo de la fractura, en la zona metafisaria del hueso en crecimiento y en algunos procesos tumorales. En su matriz, las fibras de colágeno no se orientan uniformemente y sus diámetros son variables. Poseen gran número de células también organizadas anárquicamente. Es la respuesta del organismo a la necesidad de formar hueso rápidamente. Mecánicamente se comporta de forma isotrópica (responde del mismo modo independientemente de la dirección de la fuerza aplicada).

- Hueso laminar o maduro: lo encontramos en huesos maduros. Es producto de la remodelación del hueso existente. Posee una organización paralela y definitiva de las fibras de colágeno, constituyendo la laminilla ósea. Es anisotrópico (opone mayor resistencia cuando la dirección de la fuerza es paralela al eje longitudinal de sus fibras). El hueso laminar contiene pequeñas cavidades llamadas lagunas, que están conectadas entre sí por medio de canales tubulares llamados canalículos. Los osteocitos quedan atrapados dentro de estas lagunas, desde donde reciben y transmiten nutrientes y estímulos, a través de los canalículos. Las láminas de hueso cortical de los adultos se disponen siguiendo un patrón organizado cuyas unidades se denominan osteonas y estas constituyen los sistemas de Havers. La osteona consiste en un canal central osteónico o Haversiano, que está rodeado por anillos concéntricos de láminas de matriz. Entre los anillos de la matriz, los osteocitos se encuentran en las lagunas. Los canales osteónicos contienen vasos sanguíneos que se localizan paralelos al eje longitudinal del hueso. A través de los canalículos se establecen bucles de conexión con vasos de la superficie del hueso (Figura 4).

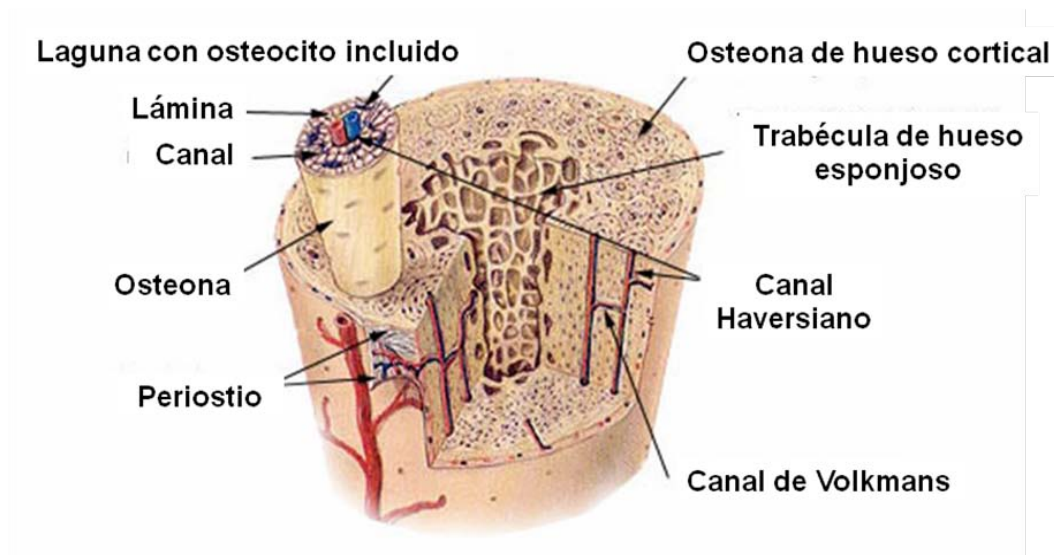


Figura 4: La microestructura del hueso cortical y trabecular (adaptado de US: National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEERS), 2006).

El hueso tiene la capacidad de auto-reparación de su estructura, siendo capaz de adaptar su masa, forma y propiedades según las necesidades mecánicas o fisiológicas. Esta capacidad de adaptación se debe a que el hueso es un lecho vivo y contiene células que trabajan continuamente para regenerarse y repararse. (Forriol Campos 2009; Miller 2009; Delgado Martínez 2015).

1.5. Propiedades mecánicas de los huesos

Desde el punto de vista biomecánico, el hueso posee propiedades mecánicas diferentes según se trate de hueso esponjoso o cortical.

La disposición tridimensional del hueso esponjoso en trabéculas que delimitan cavidades llenas de material orgánico, permiten absorber la energía procedente de los impactos que se transmiten a través de las articulaciones. Además también permite minimizar las fuerzas de tensión generadas por la posición estática. La medición de las

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

propiedades del hueso esponjoso es mucho más compleja que en el caso del hueso cortical, debido a las pequeñas dimensiones de las trabéculas. Como indica Charles-Harris Ferrer (Charles-Harris Ferrer 2007) las diferencias entre los módulos de elasticidad del hueso cortical y del esponjoso son debidas a la densidad ósea. Cuando se aplica sobre el hueso una carga mecánica que supera la resistencia propia del tejido óseo, se produce una fractura. En consecuencia se produce la interrupción de la transmisión de cargas a lo largo del hueso y se puede genera un movimiento relativo entre los segmentos de la fractura.

Desde un punto de vista biomecánico, el fenómeno de reparación tiene como objetivo último restablecer la transmisión normal de cargas y eliminar el espacio entre los extremos de la fractura, mediante la restauración de la estructura tisular original. Si las condiciones que rodean al hueso lo permiten, el hueso volverá a adquirir la normalidad funcional y estructural, gracias a la instauración del proceso de reparación. La consolidación de la fractura consiste en la aparición y evolución de un conjunto de tejidos con unas propiedades mecánicas y una disposición espacial, que hacen recuperar progresivamente al hueso su rigidez y resistencia. Este proceso está constituido por distintas fases que se solapan en el tiempo y alcanzan diferentes etapas en cada zona del callo.

A partir del ensayo de White (White 1977), García-Roselló (García Roselló 2004) indica que biomecánicamente se distinguen 4 fases en la reparación ósea. Los trabajos de White (White 1977), valoraban cada unas de las fases de consolidación de la fractura, realizando osteotomías en tibias de conejo. Según la fase de consolidación en que se encontraba la tibia, se le realizaba un estudio biomecánico mediante ensayos a

I. Introducción

torsión., para conocer los parámetros: par torsor máximo, desplazamiento angular, energía absorbida y rigidez torsional, que nos permitieran determinar la resistencia del hueso en cada fase de la reparación ósea (Figura 5).

- **Fase I:** El hueso rompe por la línea de fractura mostrando bajos valores de rigidez, comportamiento elástico y curva con pendiente mínima.

- **Fase II:** El hueso rompe por la línea de fractura mostrando elevados niveles de rigidez y un comportamiento de tejido duro.

- **Fase III:** El hueso rompe parcialmente por la zona de osteotomía inicial y, en parte, por el hueso sano mostrando una elevada rigidez.

- **Fase IV:** La fractura ocurre fuera de la lesión, mostrando elevados valores de rigidez, resistencia y energía hasta la rotura.

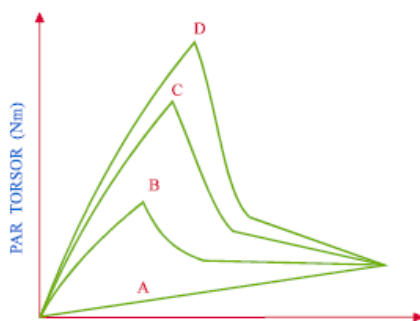


Figura 5. Gráfica en la que aparecen cuatro curvas representativas de cada una de las fases de reparación. A) Fase I. B) Fase II. C) Fase III. D) Fase IV. Modificado de García-Roselló (García Roselló 2004).

El proceso de reparación tiende a restaurar las propiedades mecánicas del hueso intacto.

El aumento de la rigidez y resistencia del callo de fractura a lo largo del proceso de reparación, se relaciona con dos efectos. Por un lado, se produce un incremento en el área de la sección transversal del hueso en la región de reparación con un aumento de

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

callo perióstico y por otro, una evolución de las propiedades mecánicas de los materiales en dicha zona. Esa mejora en las propiedades mecánicas se debe por un lado, a la disminución de la porosidad (al reemplazarse el hueso inmaduro por hueso trabecular) y, por otro, al incremento del contenido mineral.

García-Roselló (García Roselló 2004) determina a partir de los trabajos de Chakkalakal (Chakkalakal y col. 1990) y Markel (Markel y col. 1990) la relación que existe entre el contenido mineral del callo y la rigidez del hueso. Conforme el hueso se va mineralizando, aumenta la sección transversa del callo (máxima en la etapa media de reparación) y evoluciona de menor a mayor rigidez (Aro y col. 1989) .

Se han realizado numerosos estudios encaminados a evaluar las propiedades mecánicas de los callos en reparación y su evolución geométrica, desde las etapas iniciales de formación del hematoma hasta la restauración total de las propiedades iniciales del hueso. García Roselló (García Roselló 2004) recoge las conclusiones de diferentes trabajos a este respecto (Aro y col. 1990; Markel y col. 1990; Markel y col. 1991; Chehade y col. 1997; den Boer 2002; Klein y col. 2003) y estas son que:

- El callo alcanza su mayor tamaño en torno a la mitad del proceso de reparación, a partir de este momento empieza a disminuir hasta el tamaño normal.
- Desde un punto de vista tisular, el tejido incipiente de bajas propiedades mecánicas va siendo reemplazado por tejidos más resistentes que van incrementando la rigidez y la resistencia del hueso en reparación.
- La osificación comienza por la zona perióstica externa que va creando un puente óseo que une los extremos fracturarios lo que permite el comienzo de la osificación en la porción endóstica. A medida que la zona que queda entre las

corticales dispone de suficiente capacidad para soportar cargas, durante el proceso de remodelación ambos callos comienzan a ser resorbidos.

2. Proceso de consolidación de las fracturas:

El proceso de consolidación tras un traumatismo se establece en base a la formación del hematoma en el foco de fractura, como consecuencia de la lesión de células, vasos sanguíneos, matriz ósea, periostio y musculatura circundante. Este proceso se desarrolla en cuatro etapas secuenciales que se superponen en el tiempo, y que corresponden a las fase de inflamación, reparación, osificación y remodelación. (Delgado Martínez 2015) (Figura 6)

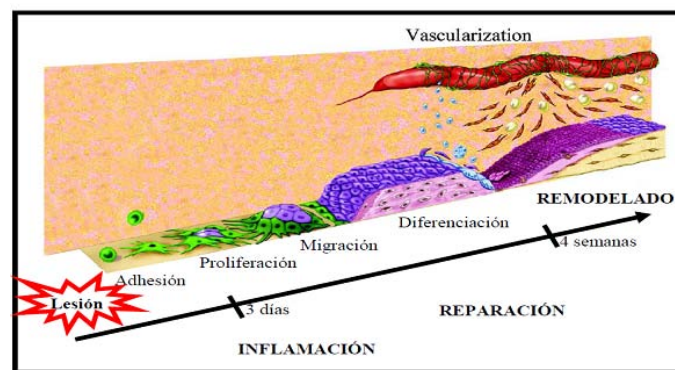


Figura 6: Etapas de la fase de consolidación según Munuera (Munuera Martínez 2006) resumida en tres fases principales: inflamación, reparación y osificación-remodelado.

a) Fase de inflamación: La lesión vascular interrumpe el aporte sanguíneo a los osteocitos. Los mediadores de la inflamación liberados por las plaquetas y demás células lesionadas, provocan vasodilatación y la aparición de un exudado plasmático que lleva al edema agudo. A medida que disminuye la reacción inflamatoria, el tejido

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

necrótico y el exudado plasmático son reabsorbidos y los osteoblastos se encargan de producir nueva matriz ósea.

b) **Fase de reparación:** Se produce la formación de callo blando en la fractura. Según indica Munuera, los trabajos de Goldereg y Buckwalter, han permitido conocer como el proceso de consolidación es estimulado por factores quimiotácticos liberados en la fase previa y por proteínas de la matriz expuestas por la desorganización tisular (Goldberg y Buckwalter 2005). La organización del hematoma de la fractura proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración y proliferación celular, además de la síntesis de matriz ósea. En este estado el microambiente a nivel del foco de fractura es ácido por falta de irrigación, pero a medida que el proceso avanza el pH se va alcalinizando progresivamente. Cuando los extremos de la fracturas se necrosan son reabsorbidos por los osteoclastos, lo que permite que los vasos periósticos aporten los brotes vasculares que inician la reparación. En este estadio la fosfatasa alcalina alcanza su nivel de actividad máximo, favoreciendo el inicio de la mineralización del callo óseo. Las células mesenquimales pluripotenciales del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la nueva formación ósea. La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación (desde el coágulo de fibrina que pasa a tejido fibroso, después a fibrocartílago que finalmente se mineraliza y da lugar al tejido óseo inmaduro).

c) **Fase de osificación:** Se produce la osificación del callo de la fractura que acontece a las dos semanas. Tras la calcificación del callo, este se invade por vasos sanguíneos con células que se diferencian a osteoblastos y osteoclastos .

d) **Fase de remodelación:** Es la última fase del proceso de consolidación en la que se sustituye el hueso inmaduro del callo óseo por hueso laminar, proceso que continúa

con la reabsorción de las trabéculas mal orientadas por los osteoclastos que las adaptarán a las líneas de fuerza que deben soportar. La finalización del proceso de remodelación consigue que se recuperen las propiedades mecánicas originales del hueso.

3. Definición de defecto óseo de tamaño crítico.

Se considera que un defecto tiene tamaño crítico cuando condiciona una pérdida de tal envergadura, el propio hueso es incapaz de recuperarse mediante su regeneración natural (Hollinger y Schmitz 1997). En estos casos, los procesos de reparación precisaran, para conseguir la restitución ósea, de la utilización de biomateriales en estructuras de soporte o andamiaje tridimensional (Salvado Muñoz y col. 2005) (Salvado Muñoz y col. 2005), de disponer de un ambiente mecánico óptimo, de que la vascularización de la zona sea adecuada, (Ip 2002) y de la presencia de factores osteogénicos y celulares. En resumen, conseguir las características de osteoinducción y osteoconducción descritas por diferentes autores (Oh y col. 2002).

3.1 Causas de defectos óseos en la práctica clínica.

A continuación se van a desarrollar algunas de las causas más frecuentes en la práctica clínica que ocasionan defectos importante en el hueso, que por si mismo el organismo es incapaz de solucionar. Destacamos: La pseudoartrosis, las infecciones, los tumores y los defectos en a cirugía de revisión protésica.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

3.1.1 Pseudoartrosis y defectos congénitos (pseudoartrosis congénitas).

Se considera pseudoartrosis a la falta absoluta de consolidación de una fractura apareciendo una falsa articulación a nivel del foco de la misma.

En nuestro medio la incidencia de la pseudoartrosis (3-4%) tiene una importante repercusión económica a dos niveles. En primer lugar en estos pacientes es necesario realizar varias cirugías para conseguir la curación del defecto. Además se prolonga mucho el tiempo de incapacidad laboral. La necesidad de más procedimientos quirúrgicos aumenta en las pseudoartrosis; en las fracturas abiertas y, exponencialmente, en aquellas que están infectadas.

Desde el punto de vista teórico, los trastornos cronológicos de la consolidación de las fracturas se diferencian en dos cuadros: pseudoartrosis y retardo de consolidación .

Se considera pseudoartrosis a la falta absoluta de consolidación de una fractura apareciendo una falsa articulación a nivel del foco de la misma. Puede localizarse en epífisis, metáfisis o diáfisis, siendo estas últimas las más frecuentes.

Los signos clínicos y radiológicos que hacen sospechar la presencia de una pseudoartrosis son:

- Movilidad anómala a nivel del foco de fractura.
- Esclerosis de los bordes de la fractura y pseudocápsula perióstica.
- En las fracturas diafisarias, la presencia de un opérculo óseo que produzca el cierre completo del canal medular.

Hay autores que denominan retardos de la consolidación a las fases iniciales de una pseudoartrosis. Sin embargo, otros distinguen ambos procesos describiendo el retardo

de consolidación como un retraso en la evolución del callo de fractura cuya consolidación se acaba produciendo sin variar el tratamiento (en un periodo de hasta 9 meses); mientras que en la pseudoartrosis, a pesar de una correcta inmovilización nunca llega a consolidar, aceptando como límite de tiempo esos 9 meses.

Recientemente Bhandari y colaboradores (Bhandari y col. 2012) han indicado la falta de consenso entre los cirujanos ortopedas a la hora de definir retardos en la consolidación y pseudoartrosis. Esta variabilidad persiste tanto a la hora del diagnóstico como del enfoque terapéutico. En definitiva, es necesario estandarizar las definiciones y proseguir la investigación sobre los factores pronósticos y las herramientas diagnosticas precisas para evaluar la consolidación de la fractura.

3.1.1.1. Clasificación de las pseudoartrosis

Los criterios académicos más utilizados a la hora de clasificar las pseudoartrosis, tienen en cuenta el origen y el aspecto anatómico del callo.

I) Según el origen las pseudoartrosis se clasifican en:

1. **Pseudoartrosis congénita:** es muy poco frecuente. Consiste en un defecto de formación de un hueso en el que en este aparece una solución de continuidad en el momento del nacimiento. Se localiza sobre todo en la tibia.

2. **Pseudoartrosis adquiridas:**

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

a) Pseudoartrosis post-traumáticas: es la forma de presentación más frecuente, pero determinar cuantitativamente su etiología es todavía muy difícil (Mehta y col. 2012). Se han descrito como los principales factores implicados el tabaquismo, lesión vascular y grado de lesión de las partes blandas circundantes a la fractura (Bhandari y col. 2012). Presenta mayor incidencia en los huesos largos y sobre todo a nivel diafisario, siendo las zonas más afectadas el fémur (3-10%), tibia (4-13%) y húmero (2-15%). Se han definido clínicamente como la asociación entre la ausencia de unión ósea desde un punto de vista radiográfico junto a problemas para alcanzar una rigidez mínima de 7 Nm/º después de 20 semanas de evolución e incapacidad para soportar cargas mecánicas a los 6 meses de evolución (Marsh 1998). Fracturas localizadas en zonas con precaria vascularización, hacen que tengan más probabilidad de desarrollar pseudoartrosis. (Escarpenter 2007)

b) Pseudoartrosis postquirúrgicas: Se da en dos circunstancias: en la artrodesis y en las osteotomías correctoras de desalineación.

II) Según el Aspecto anatómico del callo: es uno de los criterios de clasificación más antiguos utilizados en la pseudoartrosis. Según indica Forriol, los trabajos clásicos de Weber y Cech (1976) y más tarde los de Judet y Judet (1978), permiten dividir las pseudoartrosis en dos grandes grupos según la viabilidad de los extremos de los fragmentos óseos y el aporte sanguíneo (Forriol Campos 2010).

1) Hipertróficas o vasculares o viables o reactivas: la falta de consolidación es debida a problemas mecánicos, por falta de estabilización de los extremos fractuarios (Figura 7).

No obstante se encuentran bien vascularizadas y tienen capacidad de reacción biológica.

a) “Pata de elefante” (callo abundante e hipertrófico).

b) “Pezuña de caballo” (moderada hipertrofia).

c) Hipotróficas (callo ausente).

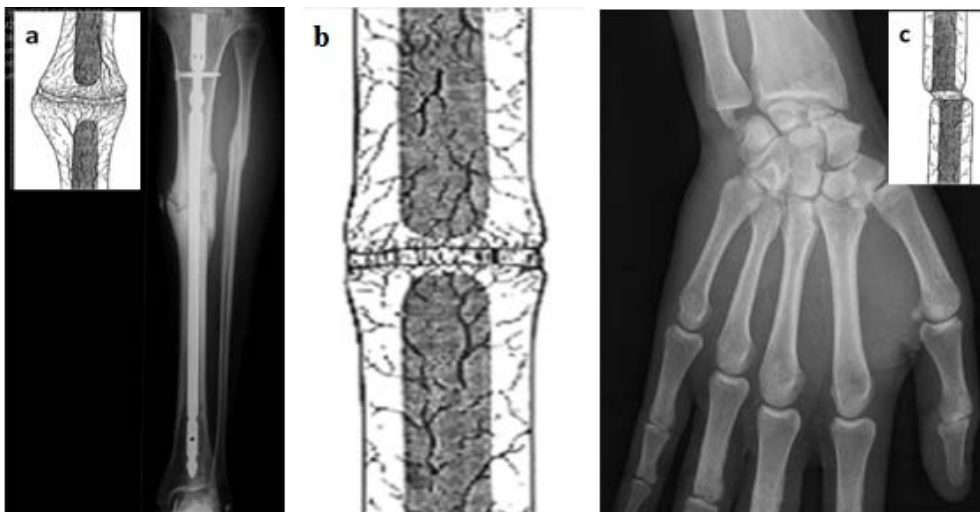
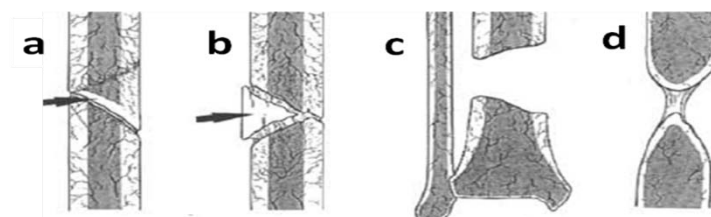


Figura 7: Pseudoartrosis viables: **a)** en pata de elefante **b)** pezuña de caballo
c) hipoatrófica

2) Atróficas o avasculares o no viables o no reactivas: existe pérdida de fragmentos intermedios y sustitución por tejido cicatricial. Presentan pobre vascularización de la zona y biológicamente no son reactivas. (Figura 8)



Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Figura 8: Pseudoartrosis no viables. **a)** Distrófica con cuña de torsión: necrosis parcial de la cuña de torsión. **b)** Necrótica por conminución: necrosis total del fragmento intermedio. **c)** Por pérdida de sustancias. **d)** Artrófica arreactiva.

3.1.1.2 Tratamiento de las pseudoartrosis

El correcto tratamiento de cualquier pseudoartrosis está basado en la estabilidad mecánica, el adecuado aporte vascular y el estímulo biológico. Es necesario realizar una adecuada limpieza de los extremos para eliminar la fibrosis. En las pseudoartrosis infectadas llega a ser necesaria la resección de los extremos óseos.

Según recoge Vicario Espinosa (Vicario y col. 2007) los trabajos de Albee y Chutro, realizados a principios del siglo XX, establecen que el autoinjerto constituye el principal tratamiento para la consolidación ósea al actuar como estimulador biológico. El autoinjerto óseo, además de mantener propiedades como osteoconductor y osteoinductor, características de otros tipos de sustitutos óseos, mantiene la capacidad osteogénica. Los autoinjertos vascularizados añaden otra ventaja, el aporte vascular, que constituye otro de los pilares del tratamiento de las pseudoartrosis. (Soucacos y col. 2006) Se pueden utilizar distintos tipos de autoinjertos en el tratamiento de la pseudoartrosis: autoinjerto de cresta ilíaca, aspirado de médula ósea, el recambio de clavo intramedular fresado y los injertos vascularizados (libres o pediculados). La literatura establece tasas de éxito al emplear injerto de cresta ilíaca en el tratamiento de la pseudoartrosis entre el 87 y el 100% (Sen y Miclau 2007). No obstante los autoinjertos pueden fallar hasta en un 30% de los casos debido a que:

I . Introducción

-La limpieza de la zona no haya sido correcta (desbridamiento quirúrgico del tejido que se interpone entre los extremos del hueso) (Vicario y col. 2007).

- La vascularización de la zona es precaria (Escarpenter 2007).

-Foco infeccioso mal eliminado (Ekkernkamp 1996).

- La severidad inicial de la fractura y de las partes blandas es tan importante que presenta mayor predisposición a la evolución hacia pseudoartrosis (López-Oliva 2006).

-Ocurre la trombosis del pedículo en casos de utilizar injertos vascularizados (Soucacos y col. 2006).

3.1.1.3. Etiopatogenia de las pseudoartrosis

En la etiopatogenia de la pseudoartrosis influyen una serie de factores que podemos agrupar en generales (edad, déficit vitamínicos y nutricionales, medicamentos y hábitos tóxicos) locales (gravedad de la lesión y pérdida ósea e infección de la fractura) y debidos al tratamiento (estabilización mecánica y carga mecánica compresiva).

3.1.2 Infecciones.

Osteomielitis es el término que define la infección del hueso cortical y medular causada por organismos piógenos (Lew y Waldvogel 2004; Chihara 2010). El anidamiento del germen en el hueso, se produce cuando hay una alta inoculación del microorganismo, cuando hay un trauma que conduce a daños en el hueso o bien por la presencia de cuerpos extraños. Estas situaciones se ven favorecidas por la escasez de mecanismos de defensa que presenta el hueso, el pobre patrón vascular que posee y la

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

rigidez de la estructura ósea (Delgado Martínez 2015). Una vez que el hueso está infectado se produce la llegada de los leucocitos que en su intento de eliminar al germen produce liberación de encimas que también correen el hueso. El pus se extiende por los vasos sanguíneos del hueso dando lugar a abscesos, dejando en el hueso áreas desvitalizadas conocidas como secuestro óseo.

Según la vía de llegada de los gérmenes se distingue diferentes patrones de osteomielitis: infección hematógena, por inoculación directa (en traumatismos penetrantes) y por extensión de vecindad (Figura 9).

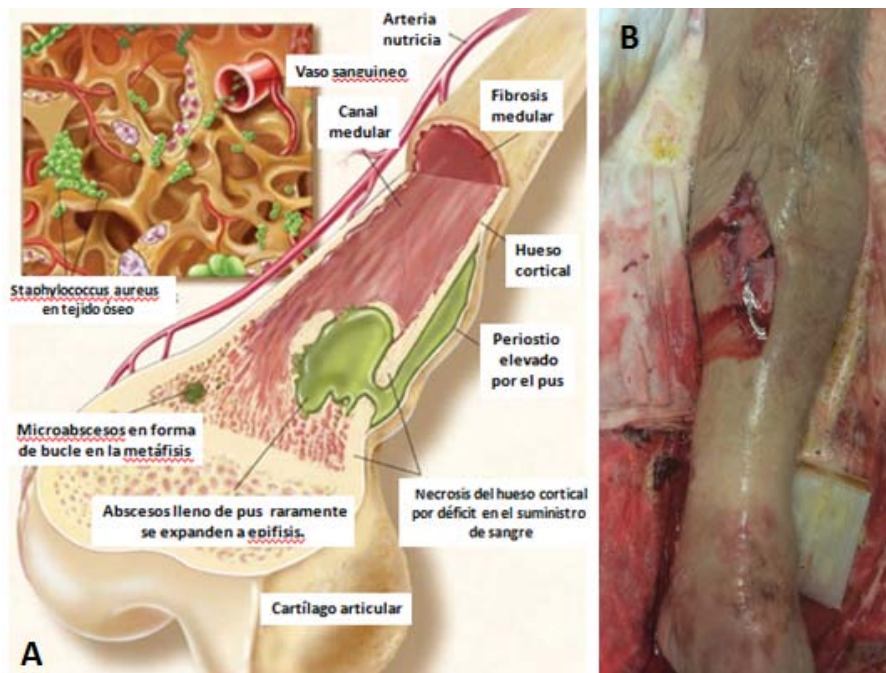


Figura 9: A) Patogenia de la osteomielitis hematogena (tomado de Muñoz-Espeleta JP). B) Inoculación directa en fractura abierta de tibia.

El tratamiento de las infecciones requieren antibioterapia y, cuando esta no es suficiente, un tratamiento quirúrgico asociado, tal y como indican en los protocolos

I. Introducción

más actualizados que resumimos en los tres puntos siguientes (Delgado Martínez 2015) :

A. Curación de la infección:

- Desbridamiento masivo (resección quirúrgica que debe incluir todos los sequestros y tejidos necróticos, granulomatosos, fibrosos y mal vascularizados) hasta dejar hueso sangrante y viable sigue siendo el tratamiento a seguir desde Cierny (1995), como indican los trabajos de Forriol (Forriol Campos 2010), Leotau (Leotau Rodríguez 2010), Chichara y Segreti (Chihara 2010), Horwitz (Horwitz 2012) y Delgado (Delgado Martínez 2015).

- Retirada del implante.

- Estabilización ósea.

- Poliantibioterapia.

- Otras medidas propuestas son el lavado aspiración continuo y el aporte local de antibióticos con polimetilmetacrilato (PMMA) (Forriol Campos 2010; Horwitz 2012; Delgado Martínez 2015).

B. Cobertura de partes blandas (Parrett y col. 2006; Cordero-Ampuero 2007).

- Cierre tradicional por segunda intención.

- Cura con sistemas de vacío (Pelissier y col. 2003).

- Cobertura con colgajos.

C. Reconstrucción ósea:

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Autoinjerto (técnica de Papinau, autoinjerto vascularizado como el osteocutáneo de cresta iliacas, miocutáneo de peroné y sóleo, osteocutáneo lateral del brazo) (Forriol Campos 2011; Delgado Martínez 2015)
- Aloinjerto.
- Osteogénesis por distracción (transporte óseo) (Forriol Campos 2010).

3.1.3 Tumores.

Los tumores óseos primarios son infrecuentes por lo que es necesario que el diagnóstico y tratamiento sean realizados por un equipo multidisciplinar entrenado. Al aumentar la supervivencia de éstos pacientes, ha sido necesario adoptar técnicas quirúrgicas duraderas y en la mayoría de los casos cirugías conservadoras de miembros, para mantener la máxima funcionalidad. El objetivo principal y más importante de los cirujanos ortopédicos oncológicos es conseguir un adecuado margen quirúrgico. La cirugía conservadora del miembro hace referencia a los tipos de técnicas quirúrgicas para restaurar la continuidad esquelética después de la resección focal del tumor óseo. El objetivo principal de la cirugía conservadora es el control local del tumor, debiendo abandonar cualquier intento de reconstrucción que comprometa la prioridad de una resección amplia en sentido (Aboulafia 2014). En 2009 Forriol define la resección amplia como la resección completa del tumor incluyendo un manguito de tejido normal para evitar la recurrencia de tumores malignos (hasta 10%). Considera resección radical cuando se extirpa todo el tumor y su compartimento, aunque este procedimiento es muy poco utilizado en traumatología por la dificultad para la reconstrucción (Forriol Campos 2009).

La cirugía conservadora del miembro incluye tres etapas (Forriol Campos 2009; Delgado Martínez 2015).

a) **Resección del tumor:** se realiza según los márgenes quirúrgicos oncológicos para cada tumor. Los márgenes pueden ser:

- Intercalar: resección de un segmento del hueso respetando la articulación

(Figura 10).

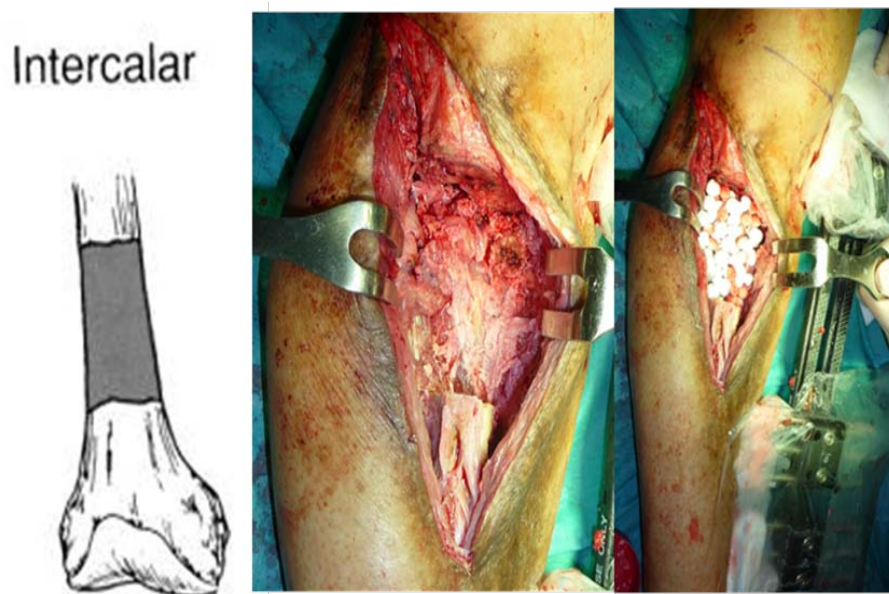


Figura 10: Resección intercalar de tumor reconstruido mediante técnica de transporte óseo con fijador externo en tibia proximal. Imagen cedida por Dr. Salcedo Cánovas.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Intraarticular: resección a través de la articulación (Figura 11).



Figura 11: Resección intraarticular de tumor reconstruido con aloinjerto y prótesis de rodilla. Imagen cedida por Dr. Valcárcel Díaz.

- Extraarticular: resección de la articulación en su totalidad, incluyendo ambas superficies articulares (Figura 12).



Figura 12: Resección extraarticular de tumor reconstruido con endoprótesis de rodilla. Imagen cedida por Dr. Valcárcel Díaz.

b) **Reconstrucción del defecto óseo:** tras reseca el tumor hay que intentar realizar una reconstrucción que proporcione una funcionalidad superior a la obtenida con la amputación. Las alternativas para la reconstrucción incluyen:

- Autoinjertos.
- Transporte óseo (Figura 10).
- Endoprotesis (Figura 12).
- Aloinjertos (Figura 11).
- Combinación de los anteriores (aloinjerto-prótesis) (Figura 11).

La elección del tipo de procedimiento depende del tumor, el paciente y la experiencia del cirujano.

c) **Reconstrucción y cobertura de las partes blandas.** Mediante técnicas de cirugía plástica (transposiciones musculares, injertos libres o pediculares de la piel o musculocutáneos), se pretende dar una buena vascularización de la zona y una adecuada cobertura muscular para los diferentes tipos de reconstrucciones óseas, consiguiendo con ello un cierre de la herida sin tensión (Forriol Campos 2010).

3.1.4. Defectos óseos en cirugía de revisión protésica

En los últimos años ha ocurrido un incremento de forma logarítmica de la cirugía de revisión protésica (cadera y rodilla), justificado por la cantidad de implantes realizados anualmente y el aumento de la esperanza de vida de los pacientes. Los defectos óseos que aparecen pueden ser la causa del aflojamiento o la consecuencia de la retirada de la prótesis. También pueden estar relacionados con el desgaste del polietileno que se

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

interpone entre el cotilo y la cabeza femoral y la reacción osteolítica que lo acompaña.

(Murcia-Mazon 2000).

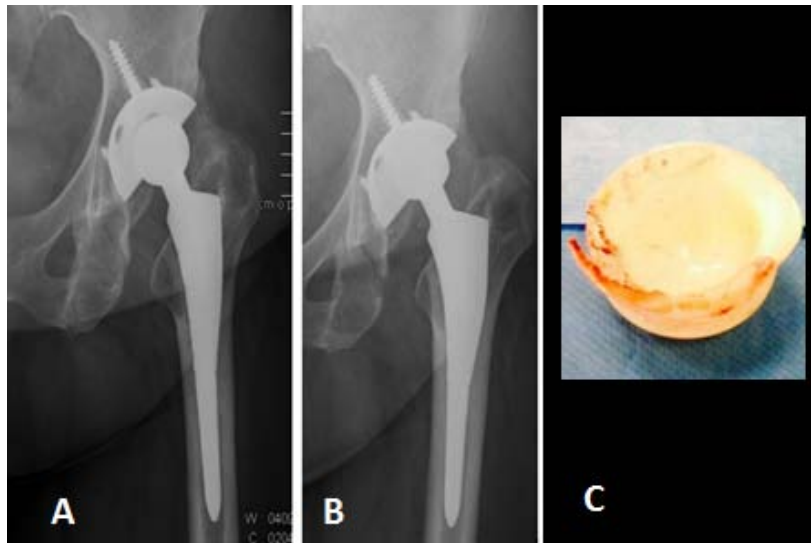


Figura 13: A) PTC normal (cabeza centrada) B) PTC con desgaste del polietileno (excentricidad de la cabeza femoral) C) Desgaste del polietileno apreciado tras la retirada del material.

El desgaste del polietileno provoca la producción de partículas que conducen a la osteólisis de la interfase hueso-prótesis y posteriormente, el aflojamiento protésico (figura 13). La tasa umbral de desgaste a partir de la cual aumenta mucho el riesgo de osteólisis se ha definido en 0,1 mm/año (Murcia-Mazon 2008). Las partículas más activadoras de la osteólisis son las que tienen un tamaño entre 0,5-5 μm , pues desencadenan la respuesta inmune mediada por macrófagos, con la subsiguiente expresión de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Esta última tiene como consecuencia final la diferenciación y activación de los osteoclastos, dando lugar a la reabsorción ósea y el aflojamiento de los implantes (Figura 14).

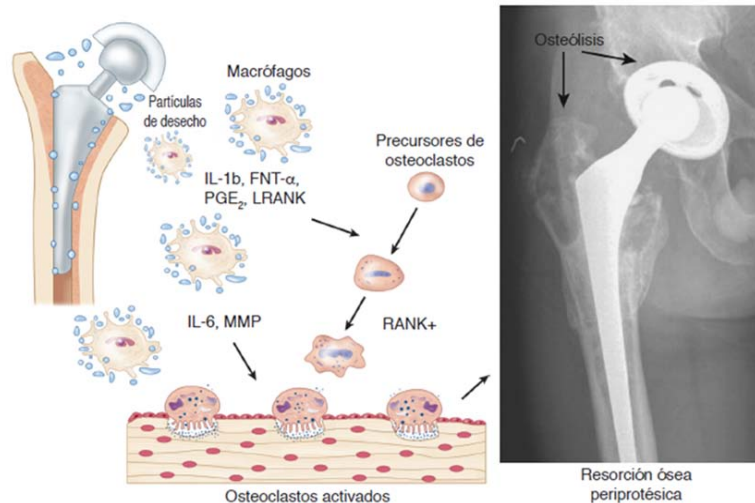


Figura 14: Fisiopatología de la osteólisis mediada por partículas de desgaste. Extraído de Talmo y col (2006). (Talmo y col. 2006)

La osteólisis es típica del polietileno de alta densidad no entrecruzado, pero también se ha observado aunque en menor medida, en otros pares de fricción como el metal-metal, cerámica y polietileno altamente entrecruzado. (Delgado Martínez 2015)

La descripción y clasificación de los defectos óseos, acetabulares y femorales, es fundamental para determinar la estrategia de tratamiento. El patrón del defecto óseo a su vez, varía dependiendo de si el componente empleado ha sido o no cementado. Todos estos datos están recopilados en la monografía sobre Cirugía de revisión de las artroplastias de cadera, realizada en 2008 por Murcia Mazón. En ella se especifica que dichas clasificaciones fueron realizadas por Paprosky (Figura 15) y cuáles son las estrategias de tratamiento a seguir (Figura 16).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

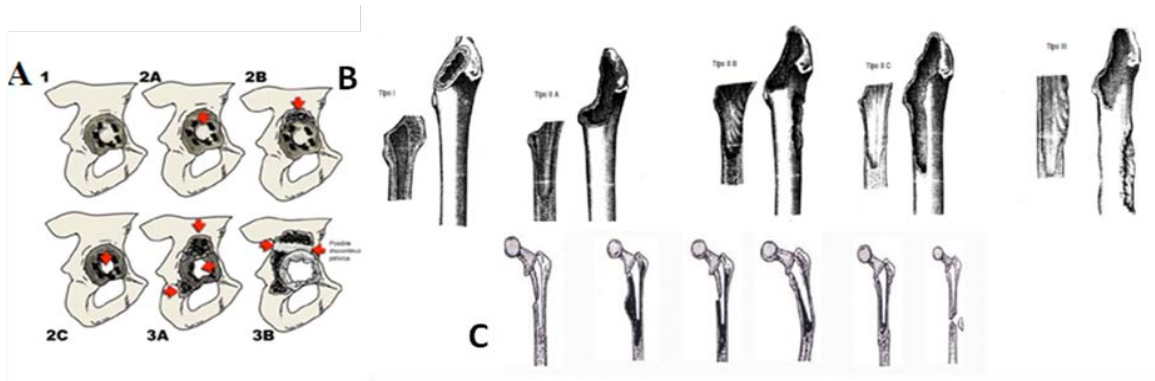


Figura 15: Clasificación de Paprosky: A) Defectos óseos acetabulares. B) Defectos óseos femoral C) defectos óseos femorales según la clasificación de la AAOS.

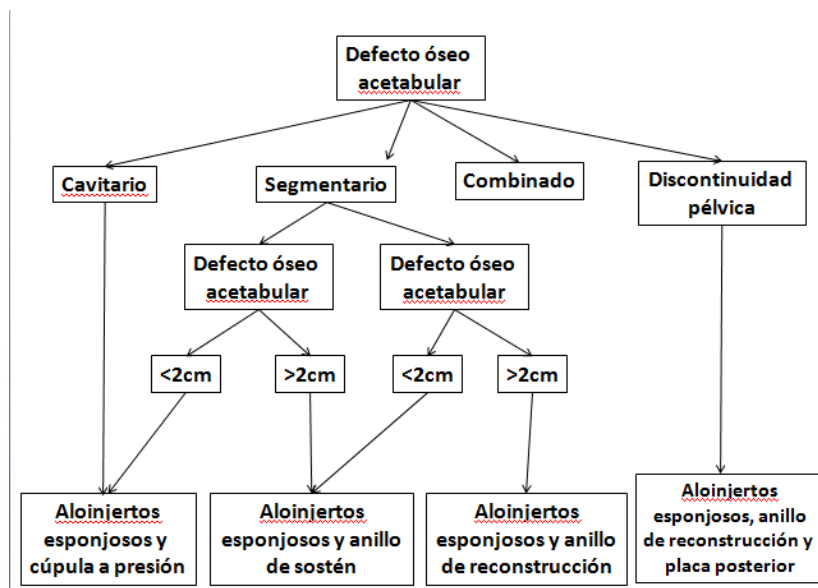


Figura 16: Algoritmo de indicaciones quirúrgicas en revisión acetabular.

3.2. Soluciones actuales a los defectos óseos.

3.2.1. Injerto óseos

El hueso es uno de los pocos tejidos del cuerpo humano que tiene la capacidad de regenerarse debido a las propiedades osteogénica, osteoinductora y osteoconductora

que posee. Un injerto óseo debería presentar unas características similares a las del hueso vivo, que resumimos a continuación:

- Osteogenicidad: es la capacidad de formación ósea, que depende fundamentalmente de las células, osteoblastos y células indiferenciadas (Buckwalter y col. 1996). La osteogenicidad de un injerto depende por tanto del tipo y número de células que posee. Puede alterarse y mejorarse gracias a sustancias como el fosfato de octacálcico (Barrere y col. 2003; Barrere y col. 2003) o añadiendo células mesenquimales pluripotenciales, que podrían adquirir la capacidad osteogénica mediante la variación de sustratos sintéticos o variaciones en su ambiente. (Harris y col. 2004; Meinel y col. 2004).

- Osteoinducción: Es la capacidad para promover la transformación fenotípica de células mesenquimales en células formadoras de hueso (osteoblastos). No es una propiedad exclusiva de la matriz ósea y sus proteínas. Fundamentalmente depende del contenido de factores de crecimiento. La osteopromoción es la capacidad para mejorar o estimular la cascada natural de la reparación ósea. (Mohan y Baylink 1991) No todos los injertos presentan esta propiedad. Se ha descrito que los aloinjertos óseos esterilizados y conservados (Vicario y col. 2007) y los biomateriales como el titanio también la tienen.

- Osteoconducción: Es la capacidad que tienen el hueso, de constituir una estructura para permitir el crecimiento óseo. No es un proceso aleatorio sino que sigue un patrón espacial ordenado y predecible. Un injerto osteoconductor precisa tener una estructura tridimensional determinada que constituya un andamio a través de cuyos canales se produzca el crecimiento óseo, que necesita del aporte vascular desde los

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

tejidos colindantes, para constituir ambiente mecánico adecuado. Además debería tener capacidad de reabsorción para eliminarse cuando el proceso de reparación ósea haya finalizado (Stevenson y col. 1997; Barrere y col. 2003; Barrere y col. 2003).

En conclusión un injerto es osteogénico cuando tiene células viables, es osteoinductor si tiene factores de crecimiento y osteoconductor si tiene una estructura tridimensional sólida (matriz).

En la tabla 2, se exponen los diferentes injertos óseos y las diferencias que presentan entre ellos:

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

Tabla 2: Diferencias entre los diferentes tipos de injertos y sustitutos óseos (Barrack 2005; Roche Albero 2011)

3.2.1.1 Clasificación de los injertos óseos

Según establece Delgado, los injertos óseos se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios (Delgado Martínez 2015):

I. Introducción

1º. Composición tisular:

a) Injerto cortical: Se utiliza para rellenar defectos segmentarios. Presenta menos componte celular (5%), pero más soporte estructural. Se reincorporan mediante un remodelado haversiano (debilita hueso), seguido de depósito de hueso nuevo.

b) Injerto esponjoso: Se emplea para el relleno de defectos segmentarios. Confiere menos soporte estructural, pero mayor osteoconducción y probablemente, mayor osteogenesis y osteoinducción. Se revasculariza más rápidamente y se integra antes en el huésped. Los osteoblastos depositan hueso nuevo sobre las trabéculas antiguas, que posteriormente se remodelan (sustitución progresiva).

2º Características anatómicas: zona de origen (tibia, cabeza femoral, etc.), talla o forma.

3º Aporte sanguíneo:

a) Vascularizado: preserva vasos sanguíneos originales o suturados a una arteria local. Técnicamente más difíciles de realizar, pero se integra mejor.

b) No vascularizado o libre.

4º. Método de conservación:

a) Fresco: Presenta mayor antigenicidad porque mantiene células viables, lo que facilita la integración (osteogénico).

b) Congelado: menor antigenicidad. Conserva factores de crecimiento (osteoinductor).

c) Liofilizado: congelado en seco. El menos antigénico. No conserva factores de crecimiento, tan solo aporta estructura (osteoconductor).

5º Manipulaciones adicionales: desmineralización, irradiación, etc.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

6º Disparidad genética entre donante y receptor:

- a) Autoinjerto: del mismo individuo.
- b) Isoinjerto: gemelos monocigóticos (raro).
- c) Aloinjerto: miembros distintos de una misma especie.
- d) Xenoinjerto: distintas especies.

7º Lugar de implantación:

- a) Ortotópico: se implanta en la misma región anatómica de origen, por ejemplo la tibia de cadáver que sustituye a una tibia en el paciente.
- b) Heterotópico: lugares distintos del de procedencia del hueso, por ejemplo injerto de cresta iliaca para rellenar un defecto en la tibia.
- c) Transporte óseo: esta técnica fue descrita por Ilizarov. Consiste en realizar una fractura en uno de los extremos óseos, para desplazar éste, con ayuda de un fijador con aguja transfixiante, del resto del hueso permitiendo aumentar la longitud del mismo (Alcantara Martos 2010), (Figura 17).

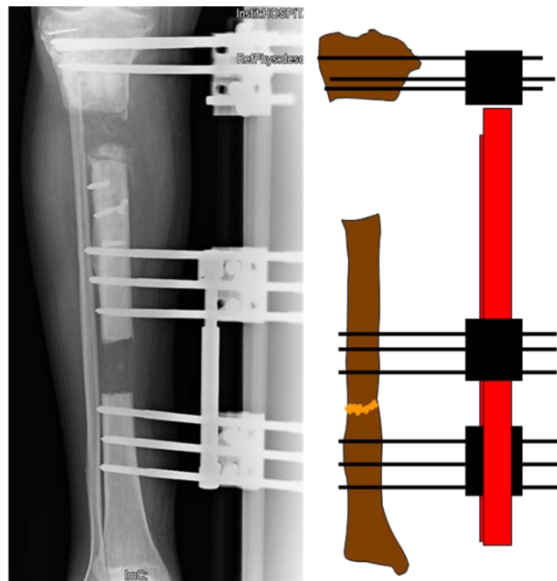


Figura 17: Defecto óseo en tibia proximal tratado con técnica de transporte óseo. Imágenes cedidas por Dr. Salcedo Cánovas.

I. Introducción

- Consideramos interesante hacer unos comentarios sobre los injertos óseos con mayor capacidad de regeneración ósea (autoinjerto, aspirado de médula ósea y aloinjerto o injerto homólogo).

- **Autoinjerto:**

El injerto autólogo de hueso esponjoso, continúa siendo el injerto de referencia para el tratamiento de defectos óseos. (Vicario Espinosa 2004) Se caracteriza por ser osteoinductor (factores de crecimiento), osteoconductor (armazón de hidroxapatita y colágeno) y osteogénico (células mesenquimales y osteoblastos).

No desencadena reacción irritativa ni transmite enfermedades. Sus principales inconvenientes siguen siendo: la morbilidad de la zona donante, la escasa cantidad disponible y el limitado soporte mecánico que proporciona a la zona receptora. (Vicario Espinosa 2004).

Las indicaciones ideales del injerto autólogo esponjoso, quedan limitadas a defectos menores de 6 cm sobre un lecho bien vascularizado y no infectado (Vicario Espinosa 2004). En función de la vascularización se pueden distinguir distintos tipos de autoinjerto:

- No vascularizado (de esponjosa o de cortical). La zona donante más empleada es la cresta iliaca, que tiene la capacidad de facilitar injerto cortical y/o esponjoso. Como en el resto de zonas donantes (las costillas, peroné, metáfisis tibial, etc) se han descrito complicaciones hasta en el 25-40% de los pacientes, entre ellas: la formación de hematomas, lesiones nerviosas, trastornos estéticos y dolor crónico en la zona donante. (Vicario Espinosa 2004).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- **Vascularizados (simples y compuesto).** El simple está constituido sólo por hueso y vasos. El más utilizado es el procedente de peroné aunque también presenta inconvenientes como la dificultad técnica, la cantidad de injerto disponible limitado y la morbilidad del sitio donante. (Vicario Espinosa 2004) El injerto vascularizado compuesto está formado por hueso, vasos y partes blandas.

- **Aspirado de médula ósea:**

La utilización de la médula ósea como injerto autólogo, se basa en la capacidad de totipotencialidad que tienen las células hematopoyéticas frescas, para diferenciarse en células precursoras mesenquimales osteogénicas (Reyna Olivera 2005). Posee propiedades osteoconductoras y ostoinductoras, pero no aportan soporte estructural, por lo que es necesario combinarlo con otros materiales que le proporcionen dicho (Zarate-Kalfopulos y Reyes-Sanchez 2006). Generalmente se obtiene de cresta iliaca, aunque también se puede conseguir del cuerpo vertebral. El contenido celular depende fundamentalmente de la edad del sujeto aunque se puede aumentar la capacidad osteogénica de las células aspiradas, seleccionando los precursores (Reyna Olivera 2005).

- **Aloinjerto o injerto homólogo**

Se realiza entre individuos distintos de una misma especie. Como ventajas presenta: disponibilidad ilimitada, no ocasiona comorbilidad en la zona donante y posibilita injertos tanto esponjosos como corticales (Vicario Espinosa 2004; Valdes y col. 2009); también cuenta con propiedades osteoconductoras y proporciona un buen soporte estructural (Zarate-Kalfopulos y Reyes-Sanchez 2006).

Entre los inconvenientes destacamos que carece de células viables y por ello de capacidad osteogénica; precisa de donantes (vivos o cadáver) y para su almacenamiento y control es necesario un banco de hueso (Ortiz-Cruz 2000). Además pueden transmitir enfermedades (se estima que la probabilidad de transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es de 1 por millón); desencadenar respuesta inmunitaria (Vicario Espinosa 2004); su incorporación suele ser incompleta, y en el caso del aloinjerto de cortical, además, más lenta.

3.2.1.2. Fases de regeneración del injerto óseo

La incorporación del injerto óseo, como indican Zárate-Kalfópulos y Reyes-Sánchez, es un proceso complejo que depende del tipo de injerto utilizado y de la zona receptora (Zarate-Kalfopulos y Reyes-Sanchez 2006). Se distinguen tres fases:

- Fase temprana (1 a 3 semanas): en la zona adyacente a la cortical ósea, alrededor del injerto, se produce una osificación de tipo membranoso y la transformación del hematoma postoperatorio en tejido fibroblástico.
- Fase intermedia (4 a 5 semanas): Aparición de una zona de osificación endondral, alrededor de la zona central cartilaginosa que aparece como consecuencia de la incorporación y remodelación del injerto óseo.
- Fase tardía (6 a 10 semanas): formación hueso cortical en la zona central y comienzo del proceso de remodelación ósea.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

3.2.2. Biomateriales.

Las limitaciones que presentan las técnicas para la sustitución de defectos óseos antes señaladas, han llevado al desarrollo de materiales sintéticos para intentar la regeneración del tejido óseo. Dentro de esta categoría encontramos una gran variedad de materiales, cerámicos y poliméricos principalmente, de los cuales hablaremos más adelante.

Roche-Albero (Roche Albero 2011) nos proporciona una de las definiciones más completas de biomaterial, explicándolo como una sustancia biocompatible, natural o sintética, o combinación de éstas sustancias, que puestas en contacto con los tejidos vivos o los fluidos biológicos, no afectan de forma adversa al organismo y permiten tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. En nuestro caso el sustituto óseo ideal sería un biomaterial que fuera osteoinductor, biocompatible (no presente ningún tipo de reacción biológica adversa), reabsorbible y que pudiera degradarse de forma paulatina a medida que se formase el nuevo tejido, transfiriendo así las cargas de forma progresiva al hueso neoformado. Además los productos de su degradación deberían ser de fácil eliminación y no tóxicos (Navarro Toro 2005; Roche Albero 2011).

Según la reacción bioquímica que genere el material implantado en el organismo receptor, se pueden distinguir tres tipos de biomateriales (Navarro Toro 2005; Roche Albero 2011).

1-Materiales inertes o casi inertes, con escasa reacción química. Son materiales muy poco solubles cuando están dentro del cuerpo humano. La respuesta inmune que

generan consiste en la formación de tejido fibroso alrededor del mismo (cápsula fibrosa) y la inflamación crónica en la zona. Este proceso compromete con el tiempo, la resistencia mecánica y la biocompatibilidad del implante (Navarro Toro 2005; Roche Albero 2011). Ejemplo de estos materiales serían los metales y las aleaciones.

2-Materiales bioactivos. Generan una respuesta biológica específica que consiste en la formación de hueso en la interfase tejido y material implantado. Como ejemplos de estos materiales encontraríamos algunas cerámicas, vitro-cerámicas y biovidrios, que se caracterizan por formar enlaces con el tejido adyacente. Sin embargo la fuerza de los enlaces que se establece entre el tejido y el material, el tiempo que tardan en generarse, el mecanismo por el que se forman y el grosor de la capa que generan, varían según el material del que se trate (Navarro Toro 2005; Roche Albero 2011).

3-Materiales reabsorbibles. Tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y degradarse cierto tiempo después de ser implantado, dando lugar a productos no tóxicos que pueden ser eliminados por el organismo. Son, por tanto, materiales bioactivos (fomentan una respuesta celular más precisa o activan a ciertos genes) y reabsorbibles. Ejemplo de estos materiales serían los polímeros biodegradables y ciertas cerámicas reabsorbibles (Navarro Toro 2005; Roche Albero 2011).

Los biomateriales más utilizados para la regeneración ósea, así como sus aplicaciones están recogidos en la Tabla 2.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Materiales	Aplicaciones
Metales y aleaciones	Osteosíntesis (placas, tornillos, clavos...) Implantes dentales
Cerámicas y biovidrios	Relleno de cavidades y defecto óseos
Polímeros naturales o sintéticos	Liberación de fármacos Ingeniería de los tejidos

Tabla 2: Principales biomateriales para la regeneración ósea y sus aplicaciones.

3.2.2.1 Metales y aleaciones

Los implantes metálicos se han utilizado en traumatología y ortopedia gracias a sus propiedades mecánicas. Pero presentan una resistencia mucho mayor a la del hueso, lo que conduce a un conflicto de tensiones y, dada su facilidad para la corrosión, a una reacción biológica del organismo que puede dar lugar al aflojamiento y rechazo (García Abujeta y col. 2004; Roche Albero 2011). Las aleaciones metálicas más utilizadas para realizar implantes son: el acero inoxidable (316L), aleaciones Cromo-Cobalto con molibdeno y níquel (Cr-Co-Mo y Cr-Co-Ni-Mo) y las aleaciones de Titanio (Ti-6Al-4V). Cada una de ellas presentan diferentes propiedades, ventajas y desventajas dependiendo de sus usos y finalidades (Bianchi 2009).

Aleaciones inertes como el cromo-cobalto y metales como el titanio, presentan una estructura tridimensional que favorece la incorporación ósea aunque no han logrado el crecimiento satisfactorio de tejido óseo sobre su superficie (Roche Albero 2011).

En la actualidad una de las sustancias más valoradas es el tantalio, que es un metal de transición muy duro, con gran resistencia mecánica que, permite elaborar estructuras porosas intercomunicadas, en las que se produce un crecimiento óseo muy rápido, sin interfaz fibrosa (Fernandez-Fairén 2008). En ortopedia se ha utilizado como recubrimiento de la superficie porosa de cotos y en reconstrucción de defectos óseos (cirugía de recambio, cirugía tumoral y elementos para artrodesis espinal intersomatica). (Forriol Campos 2009; Marco Martínez 2010)

3.2.2.2. Cerámicas y biovidrios

Algunas cerámicas han demostrado ser bioactivas y con capacidad osteoconductora, (Roche Albero 2011) lo que permite que crezca el hueso al unirse químicamente a su superficie tridimensional.

Para desempeñar su función osteoconductora, las cerámicas deben de tener unas determinadas características de porosidad (tamaño del poro entre 100 y 500 μm) y un volumen total de poro entre el 75-80%. De esta forma permiten que llegue la vascularización a los poros, y pueda generarse un área de adherencia para las células osteogénicas (Zarate-Kalfopulos y Reyes-Sanchez 2006).

Las cerámicas pueden dividirse en cuatro grupos (García Barea 2007) :

a) **Tipo I:** Son cerámicas densas y no porosas (casi inertes). Permiten el crecimiento del hueso sobre las irregularidades de la superficie resultando una fijación morfológica.

Ejemplo: Alúmina

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

b) **Tipo II:** Son cerámicas porosas e inertes, donde la fijación al hueso deriva de la colonización de éste, permitiendo una fijación mecánica. Destacamos la alúmina porosa y los metales recubiertos de hidroxiapatita.

c) **Tipo III:** son cerámicas, vidrios y vitrocerámicas de superficie reactivas, densas y no porosas. La unión al hueso se establece mediante enlaces químicos formando una fijación bioactiva. Destacan los vidrios y las cerámicas bioactivas (hidroxiapatita y cerámica de fosfato de calcio). Las cerámicas bioactivas generalmente tienen mayor fuerza y mejores propiedades que los vidrios bioactivos, pero ambos tienen menos resistencia a la fractura que el hueso cortical. La hidroxiapatita y los compuestos de fosfato cálcico son los materiales más utilizados en la práctica clínica por poseer estas propiedades osteoconductoras. Sin embargo, poseen poca capacidad para soportar cargas en flexión y compresión, pudiéndose romper con facilidad. (Zarate-Kalfopulos y Reyes-Sanchez 2006).

d) **Tipo IV:** son cerámicas reabsorbibles, entre las que destacan el sulfato tricálcico y las sales de fosfato cálcico.

Los biovidrios son cadenas siliciofosfatadas que pueden unirse iónicamente con diferentes compuestos, permitiendo así la osteointegración mediante la unión química al hueso. Destacan por su excelente osteoconductibilidad, bioactividad (capacidad para liberar células) y biodegradabilidad controlable, propiedades que los convierten en un sustituto óseo prometedor (García Barea 2007). Según la composición pueden dividirse en biovidrios de base SiO_2 (con escasa tasa de reabsorción) y los de base fosfato P_2O_5 (con amplio rango de velocidades de degradación).

3.2.2.3 Polímeros para la aplicación de la ingeniería tisular: El

ácido poliláctico

Los polímeros son biomateriales que se están utilizando para aplicaciones biomédicas desde hace más de cincuenta años. Esto es debido a que sus propiedades físicas, químicas y mecánicas están próximas a las de los tejidos vivos y a que su procesamiento, obtención y degradabilidad son fáciles de conseguir (Roche Albero 2011).

Los polímeros biodegradables pueden ser naturales o sintéticos, como se muestra en la figura 18.

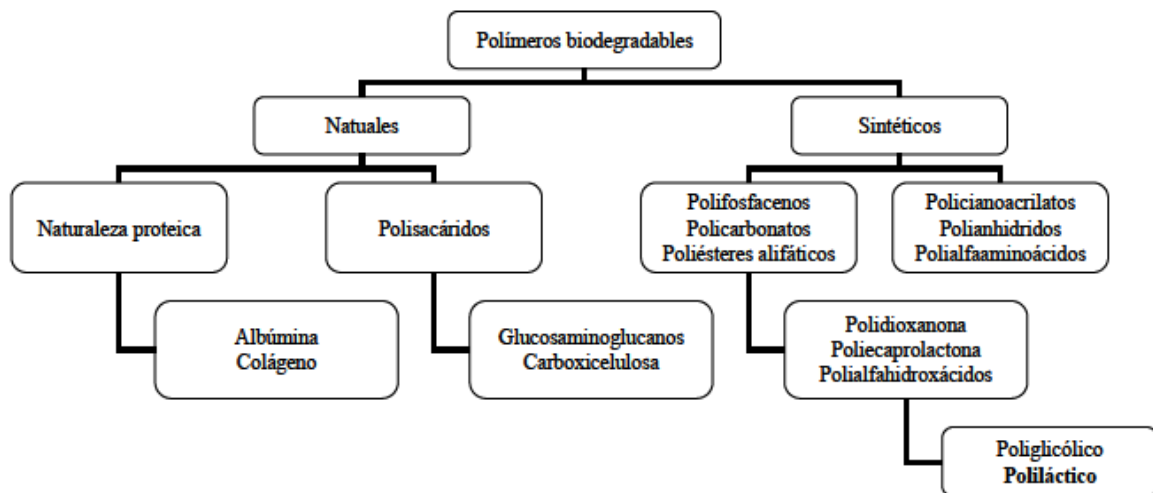


Figura 18: Tipos de polímeros biodegradables. (Karageorgiou 2005)

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Las características que deben tener los polímeros reabsorbibles utilizados en la fabricación de implantes son las siguientes (Roche Albero 2011):

- Proporcionar la resistencia y rigidez inicial, que irá perdiéndose a medida que el proceso de reparación avance.
- Capacidad para reabsorberse totalmente y que los subproductos de la degradación no sean tóxicos, de forma que puedan ser eliminados por vía renal y pulmonar gracias a su hidrosolubilidad.
- Posibilidad de poder ser esterilizados sin perder las propiedades anteriores.

Actualmente en el mercado se disponen de los siguiente polímeros reabsorbibles: ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polidioxanona, poligliconato y co-polímeros de los dos primeros.

Las principales ventajas de los polímeros naturales son el reconocimiento biológico y que la degradación es rápida, aunque pueden desencadenar una reacción inmunológica en el huésped. Para disminuir esta última y aumentar la resistencia a la degradación enzimática o química, se puede utilizar un pre-tratamiento químico o físico.

Sus principales inconvenientes son su baja reproducibilidad y la posibilidad de que incluyan impurezas patógenas (Roche Albero 2011).

Los polímeros sintéticos, presentan una alta reproducibilidad y biodegradabilidad. La facilidad para fabricarlos permite controlar las propiedades mecánicas (forma, porosidad y tamaño del poro). La facilidad de degradación evita la necesidad de reintervenir al paciente para retirarlo. Como inconveniente destacaríamos la falta de actividad biológica, posiblemente por ser muy hidrofóbicos (Roche Albero 2011).

Existen diversos polímeros sintéticos y cada uno tiene sus aplicaciones clínicas (Tabla 3) (Navarro Toro 2005). Nos centraremos en la descripción del ácido poliláctico (PLA) por ser uno de los componentes del biomaterial utilizado en este trabajo.

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

Tabla 3: Polímeros sintéticos biodegradables y sus aplicaciones en Ingeniería de los Tejidos (Navarro-Toro, 2005).

- **Ácido poliláctico:**

Uno de los materiales poliméricos sintéticos más utilizados es el ácido poliláctico (PLA). Es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino y reabsorbible. Se caracteriza por ser biocompatible y estar aprobado por el Organismo para el Control de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration). Se ha utilizado clínicamente para suturas, dispositivos de fijación de fracturas óseas, sistemas de liberación de fármacos y dispositivos vasculares. El PLA se obtiene a partir

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

de la condensación de ácido L-láctico o mediante la polimerización de anillos abiertos de un di-éster cíclico del ácido láctico (Figura 19) (Navarro Toro 2005).

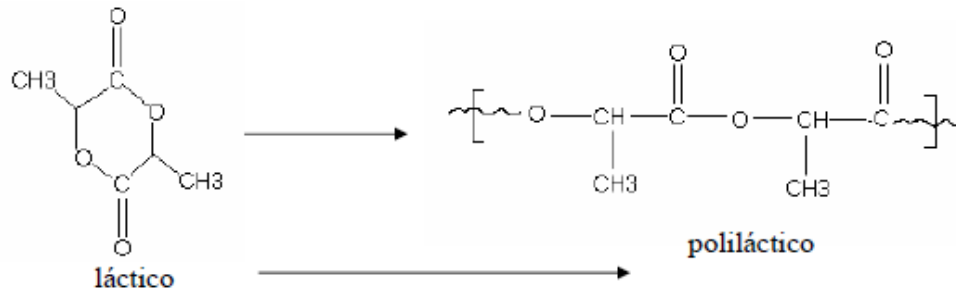


Figura 19: Formulación del ácido láctico y poliláctico. (Navarro Toro 2005)

PLA es una molécula quiral, que puede presentar dos isómeros ópticos: L-láctico (PLLA) y D-láctico (PDLA) (Figura 20). El PLLA es un polímero semicristalino, que puede pasar a vidrio cuando la temperatura (T_g) se encuentra entre 50-65°; su temperatura de fusión (T_m) oscila entre 170-190°C y comienza a degradarse a partir de los 24 meses. El PDLA es un polímero amorfo, con una T_g entre 50-60°C y que inicia la degradación en torno a los 12-16 meses.

Como ocurre con todos los polímeros, las propiedades mecánicas y la degradación del PLA están determinadas por la cristalinidad, T_g y el peso molecular (Navarro Toro 2005; Roche Albero 2011).

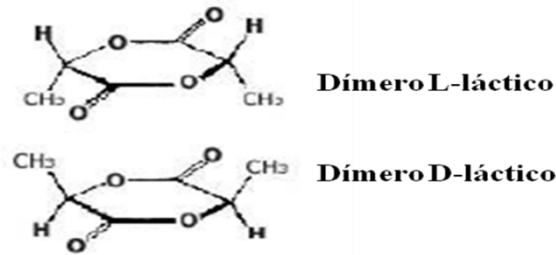


Figura 20 : Los esteroisómeros L-láctico y D-láctico del ácido poliláctico y sus polímeros (Navarro-Toro, 2005)

El PLLA se degrada por hidrólisis produciendo monómeros de ácido láctico, que se incorporan a nuestro proceso fisiológico celular de degradación, iniciando la ruta metabólica del ácido láctico (Figura 21). Por este motivo, el PLLA es de los polímeros polilácticos más frecuentemente empleados en la ingeniería de los tejidos (Navarro Toro 2005; Charles-Harris Ferrer 2007; Roche Albero 2011), aunque se ha descrito que la acidificación del medio tras degradarse en ácido láctico podría ocasionar toxicidad en los tejidos circundantes (Charles-Harris Ferrer 2007).

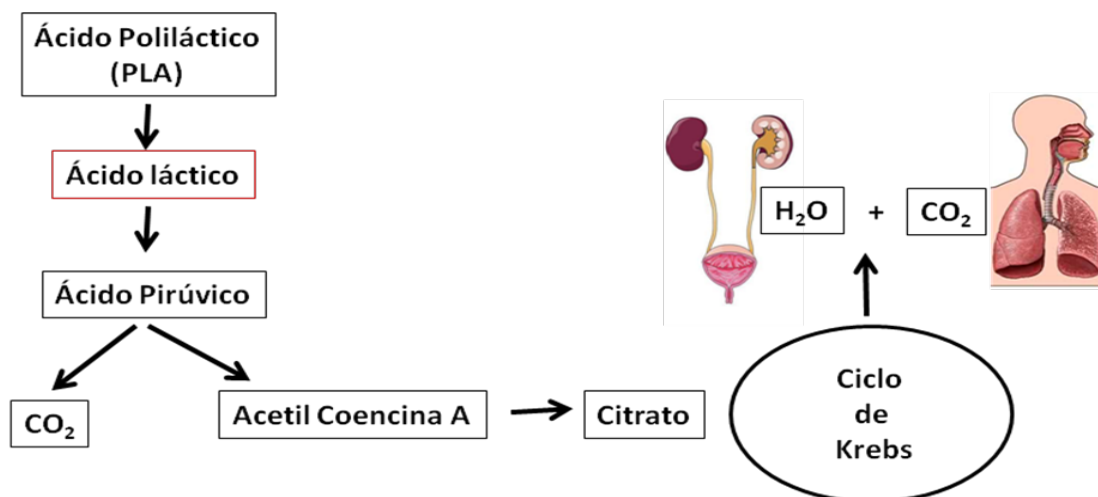


Figura 21: Esquema simplificado de la degradación del PLA por el metabolismo (modificado de Charles-Harris Ferrer M., 2007).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Actualmente las aplicaciones clínicas del PLLA en traumatología son como anclaje para ligamentos y reparación de meniscos, suturas, tornillos y clavos para la fijación de fracturas (Charles-Harris Ferrer 2007).

3.2.3. Factores de crecimiento, BMP y sus aplicaciones clínicas en la regeneración ósea

Los factores de crecimiento son proteínas segregadas por células, que actúan sobre otras células dianas con una acción concreta, induciendo a la división celular o promoviendo la síntesis de matriz extracelular. Esta acción puede ser autocrina, paracrina o endocrina, de ahí que los factores de crecimiento tengan efectos en múltiples tipos de células y promuevan una variedad de funciones celulares en tejidos muy distintos. La mayor parte de los factores de crecimiento se unen a receptores específicos y la respuesta es proporcional a la concentración del factor de crecimiento y el número de receptores en cada célula (Forriol Campos 2010; Roche Albero 2011). Se han descrito numerosos factores de crecimiento relacionados con el aparato locomotor que se dividen en:

- Factores de crecimiento transformantes (TGF);
- Factores de crecimiento insulinoides (IGF);
- Factores de crecimiento fibroblásticos (FGF);
- Factores de crecimiento plaquetarios (PDGF);
- Factores de crecimiento epidérmicos (EGF) y
- Otros péptidos activos.

Los llamados factores osteogénicos están involucrados en procesos de formación ósea; remodelación, como quimiotaxis; proliferación y diferenciación de las células encargadas de la reabsorción ósea, y la formación de vasos, nervios y de elementos medulares (Forriol Campos 2010).

3.2.3.1. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)

Son proteínas pleiotrópicas con múltiples y diferentes acciones biológicas. Pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes β (TGF- β), y como indica Roche-Albero (Roche Albero 2011) basándose en el trabajo de Urist (Urist 1965), controlan los aspectos fundamentales del modelado de las extremidades, y están implicadas en la diferenciación y proliferación de los condrocitos y osteoblastos. Regulan la hematopoyesis, la síntesis de matriz extracelular, el mantenimiento celular y la apoptosis. Son los únicos factores de crecimiento morfogénéticos, ya que no sólo estimulan la multiplicación celular, sino que también son capaces de transformarlas en células osteoprogenitoras. Se han descrito más de veinte tipos diferentes de BMPs, (Fajardo 2009) considerándose como osteoinductores las BMP-2, 4, 6, y 7. Un resumen de los efectos de BMP se recoge en la tabla Tabla 4 (Forriol Campos 2010).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

BMP	FUNCIÓN
BMP-2	Osteoinducción, diferenciación osteoblastos, apoptosis
BMP-3 (Osteogenina)	BMP más abundante en el hueso, inhibe la osteogénesis
BMP-4	Osteoinductiva, desarrollo pulmones y ojos
BMP-5	Condrogénesis
BMP-6	Diferenciación osteoblastos, condrogénesis
BMP-7 (Osigraft®)	Osteoinducción, desarrollo de riñones y ojos
BMP-8 (OP-2)	Osteoinductiva
BMP-9	Sistema nervioso, Sistema reticuloendotelial, hepatogénesis
BMP-10	Sistema cardiaco
BMP-11 (GDF-8 miostatina)	Patrón mesodérmico y tejido nervioso
BMP-12 (GDF-7)	Induce formación de tendones
BMP-13 (GDF-6)	Induce formación de tejidos tendinosos y ligamentosos
BMP-14 (GDF-5)	Condrogénesis, mejora la reparación del tendón y formación de hueso
BMP-15	Modifica la actividad de la folitropina

Tabla 4: Función y efecto de las principales proteínas morfogenéticas óseas (extraído de Forriol, 2010)

I. Introducción

Actualmente las aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento se limitan al tratamiento de los retrasos de consolidación y pseudoartrosis y a las artrodesis vertebrales (Forriol Campos 2010). Los tipos de BMP más usados actualmente que ha sido autorizados por la Agencia Europea de Medicamentos son:

- BMP-7 (OP-1): Es sintetizada como proteína osteogénica recombinante. Tiene capacidad osteoinductora y osteoconductora. Se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento de las pseudoartrosis atróficas de huesos largos, escafoides, fracturas abiertas de tibia y artrodesis lumbares posterolaterales. Su nombre comercial es Osigraft®. En Europa se ha autorizado para el tratamiento de las pseudoartrosis de tibia, en pacientes en los que ha fracasado la consolidación con el autoinjerto (Delgado Martínez 2015).

- BMP-2: Es osteoinductiva. Clínicamente ha sido autorizada en Europa para la artrodesis lumbar intersomática (aumenta la tasa de artrodesis en comparación con el autoinjerto solo, teniendo también efecto en pacientes fumadores) y en fracturas abiertas de tibia (donde parece que reduciría el número de procedimientos de aporte de injerto, reintervenciones y de infecciones) (Delgado Martínez 2015).

- Se está investigando sobre las BMP-4 y BMP-14 (growth differentiation factor 5 o GDF-5). También se está investigando acerca de la modificación del equilibrio entre las BMP y sus inhibidores, suprimiendo los inhibidores de las BMP (chordin, nogging) para potenciar la osteoinducción (Delgado Martínez 2015).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Existe preocupación acerca de la posible oncogenicidad de las BMP. Esto se debe a que tumores como los osteosarcomas y los condrosarcomas expresan receptores para las BMP y a que algunos estudios han demostrado mayor número de casos diagnosticados de cáncer tras la aplicación de BMP en artrodesis lumbar. Por este motivo FDA y la EMEA contraindican la utilización de rhBMP-2 en pacientes con diagnóstico previo de cáncer, y desaconsejan aplicar rhBMP-7 en lugares próximos a procesos tumorales o infecciones activas. (Delgado Martínez 2015)

4. Ingeniería tisular

4.1. Pilares básicos de la ingeniería tisular. Definición y aplicaciones.

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinario que permite aislar células del organismo, multiplicarlas en medios de cultivos, combinarlas con materiales biocompatibles e introducirlas en pacientes, para la reparación, restauración y regeneración de las mismas o de tejidos dañados por lesiones o enfermedades (Venugopal y col. 2008; Henson y Getgood 2011).

El concepto clásico de la reparación tisular ha cambiado. A diferencia de la reparación, en la que se forma un tejido cicatricial con características diferentes al original, la regeneración tisular permite la reparación integral del tejido dañado. El hueso, la córnea, el hígado y el tejido embrionario, son capaces de restituirse sin cicatrices al cabo de un tiempo.

Como indica Charles-Harris Ferrer (Charles-Harris Ferrer 2007) en su tesis doctoral, los tres pilares básicos de la ingeniería de tejidos son (Figura 22):

I. Introducción

- a) Las células. Son sanas, no inmunogénicas, fáciles de aislar y altamente reactivas a distintos estímulos del ambiente.
- b) Los andamios (scaffold, en inglés) transportadores o matrices de soporte. Sobre ellos se anclan, diferencian y proliferan las células cultivadas, pudiendo ser transportadas con seguridad en el organismo. El andamio se degrada con el tiempo conforme se va regenerando el tejido. De esta forma se elimina por completo, no quedando restos del "cuerpo extraño" en el lugar de la implantación. Así desaparece la inflamación crónica que genera y, permite que el tejido recién creado pueda realizar su función.
- c) Las señales celulares para la creación de tejido, pueden ser bioquímicas y biomecánicas. El proceso de formación de los tejidos es una cascada de fenómenos que deben sucederse de forma ordenada y secuencial, en el que se distinguen diferentes procesos: migración, diferenciación y maduración celular, todos ellos dirigidos por moléculas bioactivas de señalización (Larena Pellejero 2007).

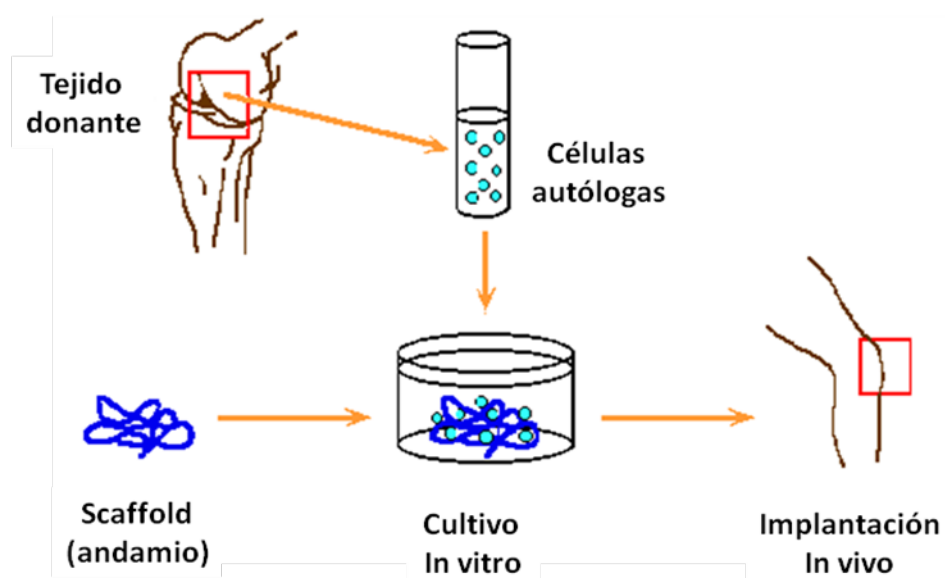


Figura 22: Fases de la ingeniería tisular para la fabricación de andamios y la implantación in vivo, de células aisladas. Extraído de Charles-Harris Ferrer 2007.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

La ingeniería de los tejidos se desarrolla en cirugía ortopedia y traumatología, para encontrar solución a los grandes defectos óseos en ortopedia ocasionados por enfermedades o traumatismos (Venugopal y col. 2010; Bhandari y col. 2012). El rechazo, la inflamación crónica y la escasez de donantes son algunos de los desafíos con los que nos encontramos a la hora de descubrir tejidos de sustitución (Baker y col. 2009; Henson y Getgood 2011).

Todos los esfuerzos de la nanotecnología van encaminados a conseguir biomateriales con una distribución espacial interna adecuada para guiar la regeneración, la adhesión y la diferenciación celular tridimensionalmente. El objetivo es fabricar implantes con estructuras similares a los tejidos que debemos regenerar. Estos biomateriales, deben incorporar en su seno moléculas de señalización que se liberen gradualmente para iniciar el proceso. También precisan vasos que distribuyan el oxígeno y nutrientes necesarios para la creación de nuevos tejidos. Los biomateriales para la reparación del sistema esquelético presentan unas características específicas puesto que tienen que responder a unas sollicitaciones biomecánicas muy especiales (Queipo de Llano 2007).

4.1.1 Componente celular

Según indica Charles-Harris Ferrer (Charles-Harris Ferrer 2007) basándose en los trabajos de diferentes autores (Terada y col. 2000; Griffith y Naughton 2002), el componente celular es uno de los componentes básicos y esencial en todas las aplicaciones de la ingeniería de los tejidos. En función de su procedencia, las células pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas, con las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas, a la hora de su utilización (Delgado Martínez 2015). Además, las

células utilizadas pueden ser adultas o embrionarias; las células adultas pueden encontrarse en diferentes fases de maduración y diferenciación. Las células embrionarias presentan la capacidad de regeneración y diferenciación en distintos linajes celulares, y aunque su aplicación en la ingeniería de los tejidos es prometedora, aún deben resolverse cuestiones éticas y problemas técnicos.

Durante esta etapa las células han de mantener su fenotipo inicial (Charles-Harris Ferrer 2007). El tipo de célula elegida debe garantizar que no presente patógenos y que el suministro de nutrientes es suficiente, para poder mantenerse vivas por cierto tiempo *in vitro*. Lo primero que hay que conseguir es que las células se adhieran a la superficie exterior del andamio y luego que sean capaces de migrar a través de él es necesario que los andamios presenten sitios de adhesión celular (Charles-Harris Ferrer 2007).

4.1.2. Andamios; Scaffold; matrices de soporte. Características de la Membrana Extracelular.

El otro componente importante de la ingeniería de los tejidos son los andamios. Debido a que intentan imitar a la MEC, han de desempeñar funciones semejantes a las de ella (Baker y col. 2009) entre las que se encuentran:

- a) Estructural: proporciona soporte a las células así como sustrato para la migración y la supervivencia celular.
- b) Bioquímica: secuestra factores de crecimiento y otras señales químicas que regulan el destino celular.
- c) Biológica: presenta secuencias de péptidos bioactivos que pueden unirse a los receptores directamente y activar vías de señalización intercelular. La MEC está

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

constituida por un complejo de proteínas y polisacáridos como el ácido hialurónico, proteoglicanos, glicaminoglicanos y elastina.

Conocer el tamaño y las características topográficas de los elementos de la MEC, que son las que determinan el comportamiento celular, es clave para intentar reproducirlas en la creación de andamios. (Venugopal y col. 2008; Baker y col. 2009)

En la elección del andamio influye tanto el material utilizado como el diseño, que determinan las características estructurales: la porosidad y la capacidad de interacción con las células y los materiales circundantes (Charles-Harris Ferrer 2007).

4.1.2.1 Características del andamio

El papel de los biomateriales en la ingeniería de los tejidos es el de actuar como estructuras de soporte para que las células se adhieran y se organicen en un tejido (Venugopal y col. 2010). La estructura del andamio determina el transporte de nutrientes, metabolitos y reguladores moleculares, desde y hacia las células. La composición química del andamio tiene una importante función tanto en la adhesión celular como en la diferenciación. Sus propiedades han de coincidir con las del tejido nativo para garantizar la integridad mecánica del tejido que se forma y proporcionar un soporte físico que facilite la mecano-transducción entre células y su entorno (Radisic y col. 2004).

Para ello es necesario que presenten estas características:

- Alta porosidad con un tamaño de poro adecuado para facilitar la implantación y la difusión celular a través de toda la nanoestructura.

I. Introducción

- Que sea biodegradable para que puedan ser absorbidos por los tejidos de su entorno, y así evitar su extracción quirúrgica. La degradación ha de ser adecuada al grado de formación de los nuevos tejidos, es decir, mientras las células generan su propia matriz las nanoestructuras proporcionan integridad estructural al cuerpo y van desapareciendo cuando el nuevo tejido ya está correctamente implantado.
- Debe ser biocompatible y presentar un buen contacto en la interfase matriz-tejido.
- Favorecer la vascularización.
- Buena adhesión celular.
- Estabilidad volumétrica.
- Buen contacto en la interfase matriz-tejido que permita la estabilidad mecánica.
- Cohesión interna y elasticidad adecuadas que prevengan la rotura de la matriz y tenga buena resistencia frente a la movilidad dinámica y a la deformación estática.
- Anisotropía estructural equivalente a la organización tisular que reemplaza.
- Requerimientos específicos que favorezcan la implantación quirúrgica, como son la fluidez adecuada en el momento de la implantación con la posterior solidificación in situ y maleabilidad por presión.

4.1.2.2 Tipos de andamios según su composición

Los andamios se pueden clasificar según la naturaleza de sus componentes, en andamios sintéticos, biológicos y mixtos (Charles-Harris Ferrer 2007).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Los **andamios sintéticos** son adecuados para el uso clínico, utilizándolos como soporte.

Se obtienen de manera que sea reproducible su fabricación, pudiéndose modificar su estructura y composición química en función de las necesidades del tejido al que han de reemplazar. Tienen un riesgo mínimo de provocar respuesta inmune en el huésped.

Existen diferentes tipos: *mallas de polietileno* (Charles-Harris Ferrer 2007) *implantes de carbono* (van der Zande y col. 2011; Venkatesan y col. 2012) o *polímeros de ácido poliláctico*. (van der Zande y col. 2010; Ciapetti y col. 2012) En los últimos años se ha creado una nueva generación de materiales sintéticos bioabsorbibles, que está siendo investigada por uso comercial. Estos nuevos materiales son *los polímeros de ácido poliláctico, poliglicólico, polidioxanona, ε-caprolactona, policarbonatos y sus copolímeros* (van der Zande y col. 2011; Ciapetti y col. 2012; Venkatesan y col. 2012).

En los andamios **biológicos**, se pueden destacar los de *origen proteico* y los constituidos por *hidratos de carbono*. La proteína más comúnmente utilizada es el *colágeno*. Entre los andamios compuestos por hidratos de carbono, destacan el ácido hialurónico y el quitosano (Henson y Getgood 2011).

Los andamios mixtos (Henson y Getgood 2011) son el resultado de combinar los materiales biológicos con los sintéticos. Ejemplos de éstos serían: *biovidrio-colágeno-fosfatidilserina* (Xu y col. 2011), *colágeno/ácido poliláctico (PLA)*, *Vidrio bioactivo con policaprolactona, calcio-fosfato bifásico* (Roohani-Esfahani y col. 2012) . Muchos de ellos, están en las primeras etapas de las pruebas de biocompatibilidad por lo que no existen aún datos disponibles para su evaluación (Henson y Getgood 2011).

4.1.2.3 Diseño y esterilización de los andamios.

I. Introducción

Las características físicas y químicas de la estructura del andamio, tanto a nivel macro como microscópico, son imprescindibles para que las células puedan adherirse adecuadamente. Además dichas características han de ser reproducibles. Macroscópicamente, la forma y composición del andamio determinara su citotoxicidad y la capacidad de las células para penetrar en su estructura. Microscópicamente el tamaño del poro, su orientación, interconectividad y la composición química de la superficie afectan la absorción de proteínas y la adhesión celular. Según indica Charles-Harris Ferrer (Charles-Harris Ferrer 2007) los andamios utilizados en tejido musculoesquelético presentan una porosidad entre 30-98% y el módulo de Young varían entre los 100KPa a 100MPa.

Otra cuestión a tener en cuenta al diseñar un andamio, es el efecto que la esterilización tiene sobre las propiedades químicas, mecánicas y de superficie del andamio. Así los tratamientos térmicos afectan al material al producir reacciones de oscurecimiento no enzimático. El formaldehído altera la estructura de la membrana, produciendo tal debilidad en la misma que impide su manipulación. Otros métodos de esterilización como el autoclave, las radiaciones ultravioleta, las gamma y el óxido de etileno, pueden interferir en la estructura geométrica de los polímeros del andamio, debido a los complejos mecanismos de degradación hidrolítica que producen. A pesar de todos los inconvenientes, el método más adecuado para la esterilización de estructuras geométricas complejas es el uso de las radiaciones, aunque puede conllevar a la degradación de las cadenas del polímero cuando se aplican dosis superiores de 2 Mrad (Navarro Toro 2005).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

4.1.2.4 Método de fabricación de los andamios en la ingeniería

tisular

Las estructuras poliméricas porosas pueden ser obtenidas a través de numerosos métodos. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio. Las más utilizadas son el *gel casting*, la separación de fases inducida térmicamente, la saturación con gas y el proceso de electrospinning (Charles-Harris Ferrer 2007), algunas de las cuales han sido utilizadas para desarrollar el biomaterial empleado en este trabajo por lo que las describiremos a continuación.

- Método ***gel casting***: consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico como la acetona. Esta solución polimérica se coloca en un molde hasta alcanzar consistencia de gel. Seguidamente el gel es procesado mediante diferentes concentraciones de acetona, etanol y agua para así obtener una estructura microporosa (Figura 23). La principal ventaja de este método es la sencillez y reproducibilidad del mismo, ya que no requiere aparatos sofisticados. Entre las desventajas, se incluyen limitaciones intrínsecas de grosor en el proceso de filtrado de partículas y limitadas propiedades mecánicas. Fue desarrollado en 1994 por el grupo de estudio de Milos, para la obtención, entre otros, de los polímeros de poliláctico y poliglicólico. Ha sido utilizado por varios autores para fabricar andamios compuestos, aunque hay otros, que cuestionan la homogeneidad e interconexión de los poros del andamio obtenidos mediante esta técnica (Charles-Harris Ferrer 2007).

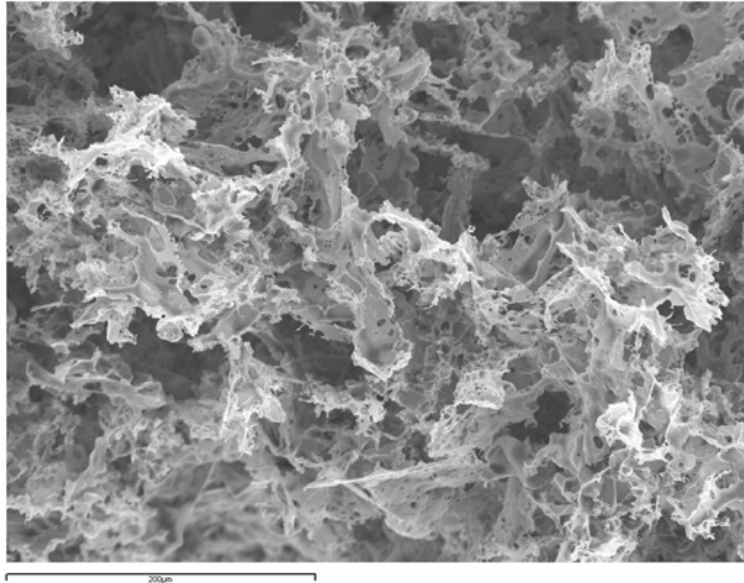


Figura 23: Imagen de microscopia de escáner de un compuesto: cristal biodegradable/andamio PLA hecho por gel casting (Navarro 2006).

- **Método de separación de fases inducida térmicamente (TIPS):** fue aplicado por primera vez en andamios de PLA por Schugens y colaboradores., en 1996. Posteriormente, como recoge Charles-Harris Ferrer (Charles-Harris Ferrer 2007), varios autores han utilizado esta técnica para fabricar sus andamios (Guo y col. 1999; Roether y col. 2002; Ciapetti y col. 2003). Este método, es el que se ha utilizado para la fabricación del andamio que se estudia en esta Tesis. El polímero se disuelve en un solvente como el dioxano a una temperatura baja. La separación líquido-líquido y luego sólido-líquido es inducida al bajar la temperatura de la solución. Subsecuentemente se elimina el solvente solidificado por medio de la sublimación del mismo dejando así el andamio polimérico. La concentración del polímero y la estrategia de enfriamiento juegan un papel fundamental en la morfología final de los poros, obteniendo una espuma microestructural (Figura 24). La principal ventaja del método de separación de fase, es que tanto la morfología como la orientación del poro

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

pueden ajustarse alterando los parámetros termodinámicos y cinéticos del procesamiento. Sus desventajas incluyen el uso de disolventes potencialmente tóxicos y la presencia de un elevado grado de anisotropía de la porosidad. Este último hecho puede ser beneficioso para determinadas aplicaciones biomédicas o industriales, tales como la regeneración nerviosa, las membranas de filtrado, mecánica de materiales de amortiguación, embalaje, etc. (Charles-Harris Ferrer 2007).

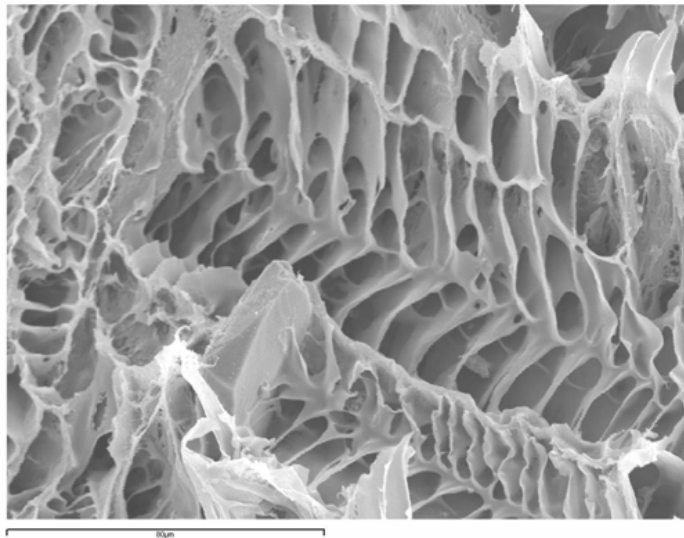


Figura 24: Imagen microscopia electrónica de barrido de un compuesto: cristal biodegradable/andamio PLA realizados por método separación de fases de la. (Navarro 2006)

- **Saturación con gas o el proceso de “gas foaming”:** se utiliza para fabricar espumas altamente porosas sin el uso de disolvente orgánico ya que los disolventes orgánicos pueden dejar residuos que provoquen efectos tóxicos *in vitro* y causen inflamación *in vivo*. Ha sido empleado, como indica Charles-Harris Ferrer (Charles-Harris Ferrer 2007) por diferentes autores/grupos. El proceso consiste en saturar la mezcla de polímero con gas a elevadas temperaturas y presiones. El rápido descenso de temperatura y presión crea una inestabilidad termodinámica que estimula la

enucleación y el crecimiento de poros de gas, dentro del polímero (Figura 25). El proceso de “*gas foaming*”, produce elevadas porosidades (hasta el 93%), además variando la temperatura, la presión y las tasas de reducción de parámetros, se pueden modular los tamaños de los poros. La mayor desventaja es la pobre interconectividad de los poros entre sí (Charles-Harris Ferrer 2007).

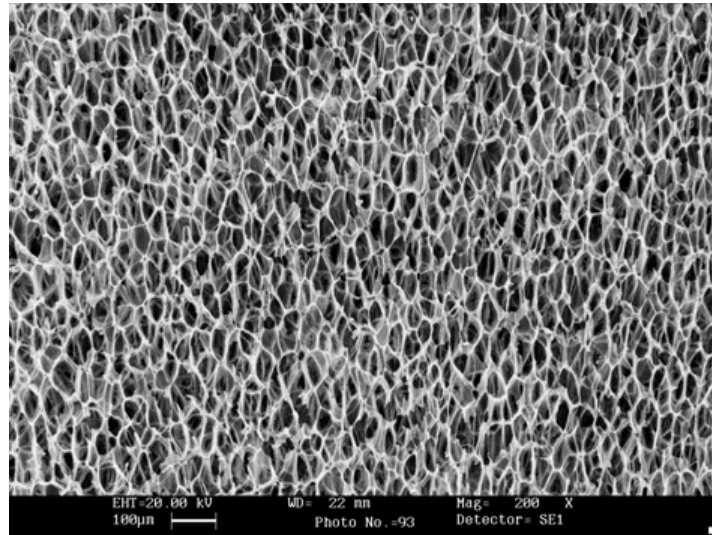


Figura 25: Imagen de microscopia de escaneo de un compuesto: cristal biodegradable/PLA hecha por el proceso de “*gas foaming*” (Navarro y col., 2006).

- **Proceso de *electrospinning*:** utiliza un campo eléctrico para controlar la formación y el depósito de fibras de polímero sobre un sustrato. Actualmente uno de los mayores retos de las técnicas de producción de andamios convencionales, es conseguir andamios complejos con formas determinadas. La gran ventaja del proceso de *electrospinning* es la posibilidad de crear formas complejas tridimensionales (hojas y formas cilíndricas) y garantizar la interconectividad de los poros. La fabricación del andamio se realiza capa por capa, hasta completar su forma. Con el proceso de *electrospinning*, se está consiguiendo imitar la estructura de la matriz extracelular natural (MEC), al producir de fibras de hasta 5 nm. Esta técnica es una de las más

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

utilizadas para la creación de fibras cuyo diámetro oscila en el rango de micrómetros hasta pocos nanómetros. Permite fabricar nanofibras a partir de polímeros naturales y sintéticos, como: colágeno (Col), gelatina, quitosano (CTS), seda, fibrina, poliDI-lactico-glicolico, poli láctico, poliuretano, policaprolactona, etc (Venugopal y col. 2010).

4.1.3. Señales celulares:

Una vez las células han colonizado el andamio, se debe iniciar la proliferación de las mismas con el fin de producir el tejido que está siendo reemplazado. Las señales de proliferación llegan a través de integrinas, factores de crecimiento, citoquinas y estímulos mecánicos (Figura 26). La vía de señalización mediada por las integrinas es realmente compleja. Las células están unidas a las proteínas de la MEC a través de integrinas. Las integrinas aplican fuerza de tracción sobre las células, que se transmite a lo largo de la MEC. De esta forma oculta sitios de unión de las células con otras estructuras proteicas. Charles-Harris Ferrer concluye, a partir de los trabajos de diferentes autores, que la forma de interactuar de la MEC difiere respecto a los andamios artificiales pues mientras que la MEC interactúa activamente con las células, los andamios lo hacen de forma pasiva (Charles-Harris Ferrer 2007).

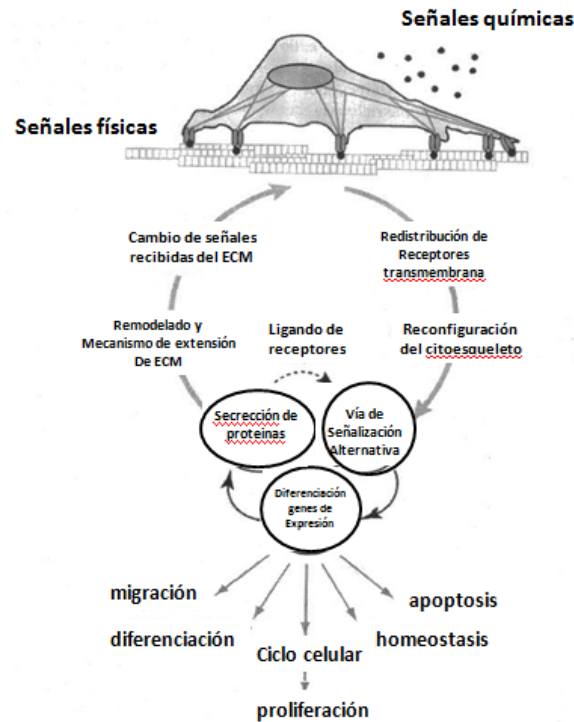


Figura 26: Esquema del dinamismo recíproco entre las células y la matriz extracelular. Modificado de Vogel y Baneyx (Vogel y Baneyx 2003).

Añadir factores de crecimiento a los andamios puede ayudar a la inducción de la proliferación y la diferenciación celular, aunque lo que no está claro aún, son sus dosis y distribución dentro de los andamios. Sin duda, la señalización y la mecanotransducción celular, son las que determinan el fenotipo, la proliferación y la diferenciación de las células (Charles-Harris Ferrer 2007).

4.2. Nanotopografía en la ingeniería de los tejidos.

La matriz extracelular actúa como un “bio-andamio” que desempeña tres funciones: estructural, química y biológica, pudiendo de esta manera, dirigir las actividades celulares de proliferación, diferenciación y apoptosis (Daley 2008). El tamaño y la

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

localización de las nanoestructuras puede provocar grandes cambios en la actividad transcripcional celular (Baker y col. 2009) y determinar la diferenciación de las células madre hacia linajes específicos (Charles-Harris Ferrer 2007; Baker y col. 2009). Por estos motivos los cambios en la topografía de las nanoestructuras pueden alterar el fenotipo celular. Como indica Charles-Harris Ferrer, diferentes trabajos demuestran que modificaciones en la nanoestructura, como por ejemplo a nivel de las ranuras, producen alteraciones de la adhesión celular, al limitar las áreas disponibles de contacto y alterar, por tanto, el patrón de formación del tejido (Charles-Harris Ferrer 2007). El tamaño del nanoporo se ha relacionado con la modulación de genes implicados en el ciclo celular, proliferación y transducción de señales. El trabajo de Mauney y colaboradores, indica que las células mesenquimales expresan diferentes perfiles de genes según se cultiven sobre poros de 20nm o de 200nm (Mauney y col. 2007).

4.2.1. Tipos de Nanoestructuras

En la ingeniería de los tejidos, destacan tres tipos de nanoestructura: nanotubos; nanopartículas y nanofibras.

4.2.1.1. Nanotúbulos: Son estructuras tubulares con diámetro del tamaño del nanómetro, que pueden obtenerse a partir de materiales orgánicos o inorgánicos. Se han utilizado tanto para modular el comportamiento de las células a través de su conductividad eléctrica (Schindeler y col. 2008) como para soporte mecánico (Bhattacharyya y col. 2008; Shokuhfar y col. 2008). También se han utilizado para aumentar la rugosidad de la superficie de los andamios y mejorar así la

adhesión celular (Li y col. 2008; Ouyang y col. 2008). De igual modo pueden ser utilizados, mediante la medición de cambios de conductividad eléctrica, como sensores moleculares para determinar, en particular, la cantidad de una molécula que se ha absorbido en superficie.

Los nanotubos de carbono son estructuras cilíndricas enrolladas a partir de hojas de grafeno. Según la forma en que se enrollan estas hojas, los nanotubos de carbono adquieren diferente estructura electrónica, pudiendo ser semi-conductores o metálicos (Zhang 2004). Dependiendo del número de hojas que compongan la pared tubular, se pueden clasificar en nanotubos de pared única (con un diámetro 0.7-1.5nm) o múltiple (con un diámetro 2-10nm para la capa interior) a estos últimos habría que añadir unos 0.7nm adicionales por cada una de las capas que presente. Debido sus propiedades mecánicas y su buena conductividad, los nanotubos de carbono son especialmente prometedores en la fabricación de compuestos poliméricos con alta resistencia pues mejoran las características mecánicas y conductividad de los mismos, mostrando propiedades únicas tanto eléctricas como mecánicas, ópticas, térmicas y magnéticas. Esto es de especial relevancia en medicina, ya que los campos eléctricos pueden estimular la curación de diversos tejidos (Aaron 2004). Así, un compuesto de polímero biocompatible reforzado con nanotubos de carbono conductores se puede utilizar como material para implantes de nueva generación, ya que podría estimular el crecimiento celular y la regeneración tisular, facilitando la transferencia de la señal fisiológicas (Supronowicz y col. 2002). Estudios recientes apuntan a que los nanotubos de carbono podrían ser excelentes sustitutos óseos in vivo ya que estimulan la proliferación osteoblástica. (Abarrategi 2008; Sitharaman y col. 2008) Sin embargo, los datos acerca de la bioseguridad de

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

estos productos aún son escasos y controvertidos, habiéndose descrito toxicidad en relación a su administración transdérmica, transmucosa o inhalatoria (van der Zande y col. 2010) variando la misma de forma considerable según el tamaño del nanotúbulo y las impurezas residuales del proceso de obtención (Venkatesan y col. 2012).

El crecimiento de osteoblastos en andamios compuestos de nanotubos de carbono es significativamente mayor que en los andamios poliméricos convencionales. Esto es debido a que inducen la mineralización en estadios precoces, siendo esta propiedad biomimética una función de vital importancia para de la mineralización ósea (Lo y col. 2014) de ello se deduce una interacción de los nanotubos de carbono con el metabolismo celular (Venkatesan y col. 2012).

4.2.1.2. Nanopartículas

Son materiales microscópicos de tamaño no superior a 100nm, obtenidos a través de métodos pirolíticos que pueden tomar diferentes formas: esféricas y en cajas (regulares o irregulares). Baker (Baker y col. 2009) menciona su utilidad para la síntesis, refuerzo de andamios y también para mejorar la biocompatibilidad de los mismos. Además basándose en diferentes artículos, indica como otro de sus usos, es el de transporte de moléculas de interés terapéutico como medicamentos (Debbage 2009), genes (Kievit y col. 2009) y de factores bioactivos (Chen y col. 2010).

4.2.1.3. Nanofibras

Son fibras poliméricas con tamaño inferior a 500 nm. Pueden obtenerse a partir de tres métodos de fabricación diferente (electrospinning, separación de fases y autoensamblaje). Cada método de fabricación le confiere unas características

diferentes a la estructura del andamio y también, cada una, aporta sus propias ventajas.

La asociación de varias sustancias cuyos beneficios ya eran conocidos nos ha permitido generar un nuevo material, empleado en este trabajo, constituido por nanotubos de carbono, ácido poli-L-Láctico (polímero) e hidroxiapatita (cerámico). Los nanotubos de carbono le proporcionan resistencia, flexibilidad y biocompatibilidad (Venkatesan y col. 2012; Venkatesan y col. 2012); el polímero de ácido poli-L-Láctico aporta un soporte con propiedades fisicoquímicas y mecánicas adecuadas para una matriz ósea con capacidad de reabsorción (Navarro Toro 2005; Charles-Harris Ferrer 2007; Roche Albero 2011) y la hidroxiapatita le confiere la capacidad de osteoconducción (García Barea 2007; Roche Albero 2011).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Basándonos en la revisión bibliográfica realizada, en la presente Tesis Doctoral se analiza la hipótesis de que un copolímero o estructura de soporte (*scaffold*) óseo constituido por diversos elementos: micro-hidroxiapatita (mHA), ácido poliláctico (PLLA) y nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT), dopado con o sin proteína morfogenética tipo 2 (rhBMP-2), permite la regeneración total de defectos óseos de tamaño crítico en huesos largos. Para ello, se ha realizado dos tipos de estudios:

- a) **Biomecánico** (ensayos no destructivos de flexión a cuatro puntos y ensayos destructivos de torsión) con el fin de valorar si las características mecánicas del hueso regenerado en cuanto a rigidez y resistencia eran comparables a las del hueso sano
- b) **Radiológico** mediante tomografía axial (TAC) para determinar la morfología del callo óseo conseguido tras la implantación del biomaterial y el análisis **densitométrico** para cuantificar el volumen y densidad del callo óseo regenerado.

Con el fin de validar esta hipótesis, se ha planteado el objetivo de determinar si el copolímero implantado en defectos óseos de tamaño crítico en radio de conejo permite la regeneración ósea total con idénticas características biomecánicas, morfológicas y densitométricas a las de un hueso sano. Para ello, se definieron dos tipos de estudios:

1. Determinar las **propiedades biomecánicas** a flexión y torsión del hueso regenerado y compararlas con las observadas en el hueso contralateral intacto.
2. Determinar la **morfología** y las **características densitométricas** del callo óseo regenerado, comparándolas con las del hueso contralateral sano.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

El estudio se ha realizado sobre un modelo experimental que a continuación desarrollaremos.

1. Estudio experimental.

1.1. Modelo animal

La investigación básica sobre la reparación de defectos óseos de tamaño crítico en humano, precisa de la creación de modelos experimentales a los que se les puedan realizar los correspondientes estudios biomecánicos. Los modelos utilizados pueden ser de origen animal, sintético, cadavérico y teórico-analítico. Con ellos se pretende representar de una forma simplificada la realidad, y así reflejar y explicar algún aspecto del aparato locomotor que quiera estudiarse.

Es necesario evaluar el modelo animal que se va a utilizar para poder extrapolar los resultados obtenidos a los humanos. Los primates son los animales que poseen una mayor similitud con la biología ósea de los humanos; pero la difícil disponibilidad, la transmisión de enfermedades y la dificultad de manejo, hacen que no suelen utilizarse para estos estudios (Sheehan y col. 2003). Los modelos animales de gran tamaño (perro, cerdo, oveja) requieren mucho espacio de estabulación y más gasto que los pequeños. Presentan como ventajas que el tamaño del hueso, músculo y las cargas que generan en la zona del defecto óseo, así como los implantes e instrumental empleado, son comparables al humano. Como inconveniente encontramos que el tipo de hueso, que poseen los animales rumiantes como la oveja y la cabra, alcanza más rápidamente la rigidez y resistencia que los animales con sistemas haversianos (Nunamaker 1998). Wippermann y colaboradores. observaron que el periostio de la

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

oveja es lo suficientemente osteogénico como para resolver defectos de tamaño crítico a los tres meses de implantar periostio como transportador osteoconductor (den Boer 1999; Wippermann 1999) Por ello, esta capacidad del periostio dificulta la interpretación de la eficacia de un factor osteogénico/transportador. La utilización del perro como modelo animal de experimentación, también es controvertido. El perro presenta una hiperrespuesta frente algunos factores osteogénicos, que complica la extrapolación de resultados a humanos (Boyan y col. 1999; Sciadini y Johnson 2000; Salkeld y col. 2001; Pinel y Pluhar 2012).

Animales de pequeño tamaño (ratón, rata, conejo) tienen la ventaja de que es más sencilla su estabulación. El inconveniente que presentan los pequeños roedores (ratones y ratas) es que en su estructura ósea primitiva no incluyen los sistemas haversianos, por lo que no deben ser utilizados para el estudio de la forma, función y propiedades de los sistemas haversianos (Nunamaker 1998).

Cada vez se están utilizando más los modelos animales para el estudio de factores de crecimiento (Seeherman y col. 2003). Se ha demostrado que se requieren mayores dosis de estos factores para modelos animales de gran tamaño comparados con las dosis que se utiliza en roedores y lagomorfos. Los pequeños animales poseen un mayor número de células que pueden responder a los factores de crecimiento y, por ello, presentan una mayor capacidad de formación de hueso. Pero, paradójicamente, el excesivo tiempo que permanece el transportador en roedores y conejos puede interferir con la rápida formación de hueso. Por el contrario, este prolongado tiempo de permanencia del transportador, puede ser eficaz en grandes animales donde la formación de hueso es más lenta (Seeherman y col. 2003).

III. Material y Métodos

La edad de los animales empleados durante la experimentación también es un factor a tener en cuenta. Los animales que se encuentran en fase de crecimiento, muestran una resolución más rápida y reproducible en la restitución ósea, que los animales con mayor edad.

El conejo es un modelo animal ampliamente empleado en el estudio de la reparación de defectos óseos de tamaño crítico. Se entiende por un defecto de tamaño crítico aquel que genera una lesión de tal envergadura que el propio hueso es incapaz de recuperarse mediante la regeneración natural del hueso de modo que los procesos de reparación estudiados estarán llevados a cabo exclusivamente por la influencia de los biomateriales (Schmitt y col. 1999). Según Bruder un defecto segmentario de tamaño crítico, es 1,5 veces el diámetro del hueso (Bruder y col. 1998). Autores como Kaito y colaboradores (Kaito, Myoui y col. 2005); Geiger y colaboradores (Geiger, Bertram y col. 2005); Pekkarinen y colaboradores (Pekkarinen, Jamsa y col. 2006); Wang y colaboradores (Wang, Pei y col. 2010); Luca y colaboradores. (Luca, Rougemont y col. 2011); Roohani-Esfahani y colaboradores (Roohani-Esfahani, Lu y col. 2012); Leucht y colaboradores (Leucht, Jiang y col. 2013); Sagar y colaboradores (Sagar, Pandey y col. 2013); Chen y colaboradores (Chen, Lei y col. 2013); Wang y colaboradores (Wang, He y col. 2013); Lansdowne y colaboradores (Lansdowne, Devine y col.2014); Reyes y colaboradores (Reyes, Delgado y col. 2014).entre otros, habían validado el modelo de defecto de tamaño crítico con defectos de 15 mm en conejos, realizando osteotomía en diáfisis de huesos largos (tibia, fémur, radio y cúbito). La utilización de osteotomías en el radio para generar defectos de tamaño crítico, tiene la ventaja de no precisar de estabilización externa, ya que la membrana interósea que mantiene unidos cúbito y radio, les proporciona estabilidad (Jiang, Nukavarapu y col 2010). La forma cilíndrica

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

de la diáfisis del radio del conejo, permite que al fabricar un biomaterial con morfología cilíndrica, sea fácil adaptarlo al defecto óseo creado. Otra ventaja de la utilización del radio, es que se evita los problemas derivados del pataleo continuo del animal, que podrían hacer fracasar la experimentación al desplazar el implante.

Hay que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados que el hueso de conejo no comparte las mismas propiedades reparativas que el hueso de los humanos (Ham 1972).

Criterios de inclusión:

En nuestro trabajo hemos utilizado conejo de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*, L) adulto, hembra, nulíparas, mayores de veinte semanas, con el fin de asegura el cierre completo de la fisis de los huesos largos y evitar posibles interferencias del crecimiento óseo en la evolución del proceso de consolidación de la fractura. Como modelo para generar un defecto de tamaño crítico, realizamos una osteotomía transversa en el radio, dejando un espacio interfragmentario de 15 mm.

La elección de este tipo de animales responde básicamente a las siguientes razones:

- Utilización de un modelo animal documentado
- Elevada disponibilidad
- Fácil acceso quirúrgico a la diáfisis del radio
- Amplia tolerancia a los medicamentos empleados y escasos riegos anestésicos.

Criterios de exclusión:

III. Material y Métodos

Aparición de complicaciones durante el proceso de consolidación del defecto crítico.

Muerte del ejemplar antes de cumplir el tiempo establecido para el sacrificio predeterminado.

Instalaciones:

Los animales con veinte semanas de edad eran trasladados desde la granja ISOQUIMEN S.L (nº registro B9900039) que se encuentra acreditada como centro de cría y suministrador (D.O.G.C. Nº2450, Decreto 214/1997, Art.15) hasta la sala de cuarentena del estabulario del Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV), donde permanecían durante un período de aclimatación de cuatro semanas hasta alcanzar la madurez esquelética, momento en el que pasaban a la sala de experimentación. Los animales fueron estabulados en jaulas individuales; se les suministraba diariamente una ración de 150-200 g de pienso comercial de adultos y se les permitía un acceso *ad libitum* al agua. Las condiciones ambientales se mantenían constantes: T = 20-21°C, humedad relativa del 70-80%, 10-15 renovaciones de aire/h, sin recirculación y 16 h/día de iluminación. Además se realizó gradación de sobrepresión desde la sala de experimentación, sala de cuarentena, sala de almacenamiento y limpieza. Tanto las instalaciones como las condiciones de estabulación (jaulas, temperatura, humedad, ciclos de renovación de aire, gradación de sobrepresión, etc.) cumplen todos los requisitos estipulados por la Normativa de la Comunidad Europea en relación a la protección de animales de experimentación (86/609/EC, de 24 de Noviembre de 1986) y dicho estabulario se encuentra acreditado por la Consellería de Agricultura y Pesca de la Generalitat Valenciana con el número de registro CV-46-06.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

1.2. Diseño experimental

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es conocer si la utilización del biomaterial propuesto (copolímero avanzado compuesto por ácido poli-L-láctico, micro hidroxapatita y nanotubos de carbono de pared simple) en defectos de tamaño crítico en huesos largos, permite la correcta regeneración del defecto; y si el tejido óseo regenerado presenta morfología y comportamiento mecánico comparables al hueso sano.

La parte experimental de nuestro trabajo consta de dos fases claramente diferenciadas:

- En la primera fase, se lleva a cabo la caracterización del tamaño que debe tener el defecto óseo para que sea considerado crítico. Para ello se realiza una experiencia previa con 6 conejos a los que se les crea un defecto en la diáfisis radial de 0,5 cm (dos conejos), 1 cm (dos conejos), y 1,5 cm (dos conejos). En el conejo, el periodo de consolidación de las fracturas dura 12 semanas (García Roselló 2004). No obstante para algunos autores, en el conejo, entre las 2^º y la 8^º semana ya existen cambios importantes en las características mecánicas del callo de fractura (Terjesen y Svenningsen 1986). Posteriormente, a las 16 semanas de haber generado el defecto óseo, se sacrifican los animales y se realiza el estudio histológico de la zona. Comprobamos, como indican otros autores que un defecto de 15 mm en la diáfisis del radio, no consigue consolidación de la zona del defecto (Geiger y col. 2005; Kaito y col. 2005; Pekkarinen y col. 2006; Roohani-Esfahani y col. 2012; Lansdowne y col. 2014).
- En la segunda fase, se valora la efectividad del material (copolímero) desarrollado en el marco del proyecto europeo (*Intelligent nanocomposite for bone tissue repair and*

regeneration, NANOBIOCOM, NMP3-CT-2005-516943) asociado o no a rhBMP-2, en la consolidación de los defectos óseos de tamaño crítico generados en los animales de experimentación. En esta fase se utilizan 30 conejos con las características descritas en la fase inicial. En todos ellos se crea, en una de las patas, un defecto óseo de tamaño crítico de 15 mm en la zona central de la diáfisis radial, utilizando la pata contralateral, como control de las propiedades mecánicas del hueso de los animales experimentales.

El diseño del trabajo se resume a continuación en la tabla 5:

TRATAMIENTO	PERIODO		TOTAL
	8 SEMANAS	16 SEMANAS	
Autoinjerto	6	6	12
Copolímero con rhBMP2	6	6	12
Copolímero sin rhBMP2	6	-	6
TOTAL	18	12	30

Tabla 5. Diseño de los grupos experimentales.

El total de conejos utilizado se divide en tres grupos según el tratamiento utilizado:

- Tratamiento A: 12 animales tratados con autoinjerto.
- Tratamiento B: 12 animales, a los que se les aplicó en la zona del defecto, para mejorar la osteoconductividad del material, copolímero enriquecido o dopado con proteína ósea recombinante (rhBPM-2).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Tratamiento C: 6 animales a los que se aplicó ,en la zona de defecto, copolímero (matriz de soporte NANOBIOCOM).

Se valoraron los resultados del tratamiento aplicado, en dos periodos: a las 8 y 16 semanas.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Politécnica de Valencia y se realizaron siguiendo las directrices de la normativa europea 86/609/CEE (24/11/86); el Reglamento español RD 1201/2005 y el Reglamento local 13/2007, con respecto a la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio.

1.3. Preparación y caracterización de las matrices de soporte.

El material utilizado en esta Tesis, es un andamio compuesto por nanotubos de carbono, ácido poli-L-Láctico (polímero) e micro-hidroxiapatita (cerámico).

A continuación se documenta el proceso de formación del biomaterial, con cada uno de sus componentes:

La espuma de nanocompuesto de ácido poli-L-láctico (PLLA) fue preparada mediante separación de fases líquido-líquido de la solución de polímero y la eliminación posterior de solvente (Whang y col. 1999). Se utilizaron nanotubos de carbono con una pared de una única capa (Single-Walled Carbon NanoTube, SWCNT) y partículas de micro-hidroxiapatita (mHAp) a una concentración del 1% en peso que se disociaron en una proporción de 84/16 (v/v) en una mezcla de agua destilada y desionizada con 1,4-dioxano, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Después de esto, se disolvió el

III. Material y Métodos

polímero de PLLA (al 15% (w/v) en la suspensión preparada, mediante calentamiento a 83°C en el baño de ultrasonidos, hasta la completa disolución del polímero. La suspensión de PLLA, SWCNT y mHAP así obtenida se enfrió a -16°C, manteniéndola durante toda la noche, para poder realizar la separación de fases líquido-líquido. Los disolventes se eliminaron por liofilización durante 6 días. Luego las muestras de espuma obtenidas se almacenaron en un desecador hasta su caracterización.

Así, se obtuvo un andamio altamente macroporoso. La porosidad y el diámetro del tamaño del poro de la espuma, se determinó por un porosímetro de intrusión de mercurio. La matriz de soporte mostró una porosidad del 85% y un diámetro de poro de aproximadamente 50 micras. Los andamios se configuraron con una forma de cilindro de 4 mm de diámetro y 15 mm de longitud.

1.4. Procedimiento quirúrgico.

1.4.1. Preanestesia y preparación del animal:

Los conejos se pre-anestesian con 2,5 mg/kg de xilaxina (Ronpun® al 2%) y 17,5 mg/kg de Ketamina (Imalgène®) por vía intramuscular. La dosis preanestésica se inyecta en los músculos semitendinosos o semimembranosos. El tiempo de acción de la mezcla preanestésica es de unos 10-15 minutos, tiempo que se aprovecha para sujetar al animal a la mesa operatoria. Se realiza el pelaje de la pata delantera izquierda con una máquina depilatoria (Olsten®). Se limpia y prepara la zona a operar con una solución antiséptica Betadine® (povidona yodada al 10%). A continuación el animal es cubierto con paños estériles dejando únicamente visible la pata en el campo quirúrgico. Se

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

aplica un ungüento oftálmico en ambos ojos para evitar la sequedad corneal. Se realiza profilaxis antibiótica con una dosis de 3,5 mg/Kg de enrofloxacin (Baytril® 25mg/mL) en el mismo acto quirúrgico.

1.4.2. Anestesia:

La inducción a la anestesia se realiza con 2,5 mg/kg de Propofol (Lipuro® al 1%) y el mantenimiento de la misma, con una dosis de 21 mg/kg/h. Se administra por vía intravenosa a través de una vena marginal de la oreja. Para la colocación del catéter es preciso vasodilatar las venas de la zona, para que se vean y tengan mejor accesibilidad, por lo que se aplica en la oreja con un algodón impregnado con alcohol etílico al 95% (Figura 28).



Figura 28. Inyección solución anestésica a través de la vena marginal de la oreja.

III. Material y Métodos

El clorhidrato de ketamina es el anestésico disociativo más común administrado en conejos. Suele emplearse como parte de un régimen anestésico o como inductor de la anestesia previo a la anestesia general. Es muy seguro. Sus efectos farmacológicos y fisiológicos fueron revisados por Fragen y colaboradores (Fragen y col. 1987). Administrado en solitario produce acciones simpático-miméticas que aumentan el ritmo cardíaco y la presión arterial. La analgesia que genera es buena. A bajas dosis clínicas no deprime la respiración, pero en altas dosis la respiración es rápida jadeante y poco efectiva, lo que puede ser mal interpretado como una anestesia superficial. La muerte por sobredosis suele ocurrir por parada respiratoria. Los anestésicos disociativos producen en el conejo ciertos reflejos activos oculares y laríngeos, los ojos permanecen abiertos y se observa rigidez muscular y espasticidad tónica. Experiencias anteriores realizadas en el Instituto de Biomecánica de Valencia se han llevado a cabo en conejos con este tipo de anestésico.

Entre las ventajas que presenta la utilización del propofol destacan una inducción rápida con escasa acumulación en el organismo. (Sebel y Lowdon 1989) Esta característica permite el mantenimiento anestésico en cirugía mayor, bien administrado en infusión continua, o bien en bolos, con una recuperación rápida tras su retirada. En cirugía menor el propofol se presenta como una droga muy adecuada, disminuyendo la incidencia de complicaciones en el período postoperatorio inmediato. Otra ventaja radica en la ausencia de irritación, y posterior necrosis tisular, tras la inyección perivascular. Como inconvenientes encontramos que la administración a dosis altas (≥ 10 mg/kg/ev) produce sedación de corta duración con escasa depresión de reflejos y efecto antinociceptivo, mientras que dosis mayores o infusiones más prolongadas producen parada respiratoria y muerte (Ypsilantis y col. 2006). La apnea

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

ocurre frecuentemente en conejos, ratones, gatos y cerdos especialmente a dosis altas (Silva 2011).

1.4.3. Cirugía

El procedimiento quirúrgico se realiza exclusivamente en el radio izquierdo, dejando el derecho como control para estandarizar los resultados biomecánicos (Blokhuis y col. 2001). La principal ventaja del diseño de experimentación unilateral es la protección frente a alguna posible interacción con el tratamiento aplicado a un mismo conejo, que podría llevar a confundir los resultados. Un inconveniente es que se necesitan un mayor número de animales para realizar la experiencia. Los diseños bilaterales (Welch y col. 1998) requieren un menor número de animales; las comparaciones de resolución ósea se hacen en el mismo animal, evitando así las diferencias que pueden existir entre los diferentes animales de la misma especie utilizados, pero hay un alto riesgo de confundir efectos sistémicos ya que se ha observado que en pacientes politraumatizados la velocidad de reparación ósea aumenta significativamente. Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de elegir un diseño unilateral o bilateral es la carga que va a ser soportada en las extremidades. En los diseños unilaterales la carga es soportada prácticamente por la extremidad intacta en las primeras fases de reparación. Mientras que en el bilateral, los animales soportan la carga en ambas extremidades (Seeherman y col. 2003).

Tomando las correspondientes medidas de asepsia, se realiza una incisión en la piel a lo largo de la parte lateral de la extremidad delantera del conejo, de superficial hasta llegar al radio. Una vez en hueso, mediante disección roma del periostio, se realiza una

exposición de 3-4 cm del mismo. Utilizamos una sierra oscilante de alta velocidad, para crear un defecto óseo de 15 mm en la parte media de la diáfisis del radio, incluyendo el periostio (Figura 29). Para evitar la necrosis térmica de los extremos irrigamos con abundante solución salina fisiológica durante el proceso de corte del hueso.



Figura 29. Ubicación del andamio en la parte media de la diáfisis del radio del conejo.

Tras la colocación de los andamios en el defecto óseo, realizamos el cierre por planos mediante sutura reabsorbible 4-0, y colocamos un vendaje, para proteger la herida quirúrgica.

Para el control del dolor postoperatorio, pautamos una única dosis de anti-inflamatorios (flunixinameglumina 1 mg/kg -Finadyne® 50 mg/mL-) y de analgésicos (0,4 mg/kg Butorfanol -Torbugesic®10 mg/mL-). Como profilaxis antibiótica administramos una única dosis de 3,5 mg/kg de enrofloxacin (Baytril® 25mg/mL) en el mismo acto quirúrgico a todos los conejos aunque se repitió, en los casos que se consideró necesario, otra dosis diaria durante las primeras 48h siguientes a la cirugía. Al quedar intactos tanto el cúbito de la extremidad intervenida como la extremidad

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

contralateral, se permitió la carga de forma inmediata tras la cirugía. ya que el cubito de la extremidad intervenida proporciona la estabilidad necesaria al actuar como un fijador externo.

1.4.4. Eutanasia

Los conejos fueron sacrificados a las 8 y 16 semanas respectivamente según el tratamiento recibido y el periodo de estudio al que habían sido asignados (tabla 5). Para ello, se utilizó una sobredosis de pentobarbital (Dolethal®). Diseccionamos tanto la extremidad delantera del conejo que había sido intervenida como la contralateral, desarticulamos el complejo tanto del codo como de la muñeca, y dejando cubito y radio. Después extirpamos las partes blandas y procedimos a congelar las muestras a -25°C.

2. Estudios biomecánicos

Los ensayos mecánicos aportan información objetiva de forma cuantitativa para el estudio del proceso de consolidación de los defectos óseos (Guede 2013). Tanto en la práctica clínica como a nivel experimental, se han empleado ensayos mecánicos *in vivo* para realizar seguimientos de la evolución del callo de fractura. Experimentalmente se emplean también ensayos *in vitro* realizados sobre especímenes anatómicos intervenidos quirúrgicamente que proporcionan una información más real de las propiedades biomecánicas del hueso en ese momento, aunque no permiten el estudio de la evolución del callo de fractura. Además con éstos ensayos, se elimina la

III. Material y Métodos

variabilidad debida a parámetros relacionados principalmente con la interposición de las partes blandas y el tono muscular, que no son controlados en los ensayos *in vivo*.

Para evaluar mecánicamente el hueso reparado se realizan dos tipos de ensayos *in vitro*:

- Ensayos sensibles a la asimetría ósea que se produce durante el proceso de reparación y, por ello es importante la orientación del espécimen durante la realización del ensayo. En este bloque se enmarcan los ensayos de flexión no destructivos, para los que es necesario especificar el plano en el que se aplica la carga y los resultados se referencian, por tanto, al plano elegido. (Foux y col. 1990; Foux y col. 1993; Uthoff 1993; Chehade y col. 1997; Foux y col. 1997; Guede 2013).
- Ensayos no sensibles a la asimetría del hueso y del callo, que no dependen de la orientación de la pieza al realizar el estudio. En este grupo se encuentran los ensayos en los que la fuerza o vector del momento aplicado están alineados con el eje del hueso como son los ensayos destructivos de tracción– compresión (Claes 1995) y los de torsión. (Luppen y col. 2002; Einhorn 2003; Klein-Nulend y col. 2003).

En nuestro trabajo realizamos dos tipos de ensayos mecánicos *in vitro*:

- Ensayos no destructivos de flexión a cuatro puntos.
- Ensayos destructivos de torsión.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

A continuación describimos la metodología empleada en estos ensayos, muy semejante a la utilizada por otros autores en estudios anteriores. (García Roselló 2004; Cuenca-Lopez 2010).

2.1. Ensayo de flexión a cuatro puntos

Los **ensayos de flexión** son utilizados comúnmente en multitud de experiencias para evaluar las características mecánicas de huesos largos (Miclau y col. 1995; Jazrawi y col. 2000; García Roselló 2004; Cuenca-Lopez 2010; Guede 2013). Se trata de ensayos **no destructivos**, donde al no llegar a romper el hueso, sólo se puede determinar la rigidez de éste.

De estos ensayos se obtienen las gráficas del perfil polar de rigidez (PFRP) y a partir de estas gráficas, se obtienen tres parámetros importantes: índice de rigidez, índice de áreas e índice de planitud.

Los ensayos de flexión, atendiendo al modo de aplicación de la carga, se dividen en dos tipos (Figura 30):

- a) Flexión a tres puntos.
- b) Flexión a cuatro puntos.

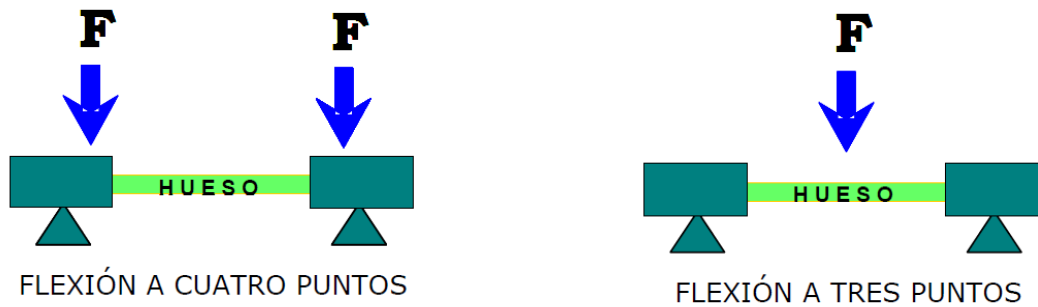


Figura 30. Configuración de los ensayos de flexión.

En ambos casos la muestra se coloca sobre dos soportes.

- En el ensayo de flexión a tres puntos la fuerza se aplica, por la parte superior, en el centro de la pieza, por lo que ocurre una deformación local en ese punto. En este tipo de ensayo, el momento de flexión no es uniforme a lo largo de la muestra, siendo máximo en el lugar donde se aplica la carga, por lo que es en este punto donde se estima el módulo de Young (Figura 31) (Turner y Burr 1993; Yu y col. 2008; Jiang y col. 2010; Hernandez Flores 2011; Guede 2013; Alfortawei 2014; Harada y col. 2014).

- En el ensayo de flexión a cuatro puntos dos fuerzas iguales se aplican simétricamente en la cara superior de la pieza, de manera que el momento de flexión se reparte uniformemente por la región situada entre ambos puntos de aplicación. Este tipo de ensayo muestra claras *ventajas* frente al de tres puntos, puesto que se logra un momento uniforme a lo largo del hueso entre las dos fuerzas aplicadas, por lo que no influye la morfología que tenga el callo óseo formado (Figura 31) (Stevenson y col. 1997; Park y col. 2012; Salom Taverner 2012; Guede 2013).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

El objetivo del ensayo de flexión a cuatro puntos es la determinación de la rigidez del hueso regenerado en la zona del defecto óseo, en el momento en que se sacrifica al animal,

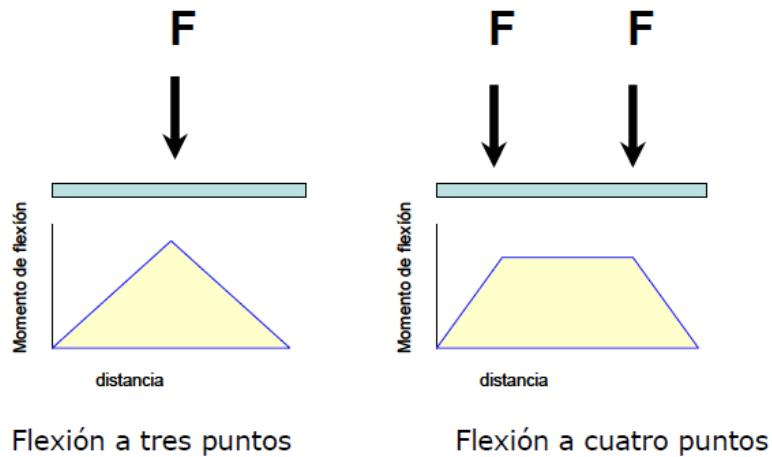


Figura 31. Representación de los momentos vectoriales en los ensayos de flexión a tres y cuatro puntos.

En nuestra tesis hemos realizado los ensayos de flexión a cuatro puntos por los motivos anteriormente mencionados. El estudio se ha llevado a cabo en 12 planos diferentes a lo largo del eje longitudinal del hueso siguiendo una modificación del procedimiento propuesto por Foux y colaboradores (Foux y col. 1990; Forriol Campos 2010). Para ello se ha rotado el hueso a intervalos de 30° en la máquina de ensayos, hasta completar una vuelta completa. El hecho de evaluar la rigidez en diferentes planos se justifica porque la estructura del callo no es uniforme en todo su diámetro, lo que condiciona que varíe la rigidez de los huesos según el plano donde se realiza el ensayo de flexión (Lovejoy y col. 1976; Ruff 1983; Ruff y Hayes 1983; Ruff y Hayes 1983). Es importante tener estos aspectos en cuenta al valorarla ya que si elegimos

III. Material y Métodos

aleatoriamente un solo plano para realizar el ensayo, podríamos estar sobreestimando o subestimando los valores de rigidez registrados.

En nuestro estudio hemos registrado 12 valores de rigidez para cada hueso, correspondientes a los 12 planos ensayados. Estos valores se representan gráficamente dando lugar a una elipse o perfil polar de rigidez (PPRF).

Hemos utilizado el protocolo de ensayo descrito por Foux y Bramer (Foux y col. 1990; Foux y col. 1993; Bramer y col. 1998).

Una vez descongeladas las muestras a temperatura ambiente, se retiraron los tejidos blando cuidadosamente. No fue posible separar el cúbito del radio, debido a la hipertrofia radial, la formación de tejido cicatricial y la presencia de unión fibrosa en la zona de implantación del material. La muestra ósea, se envolvió en una gasa empapada en solución salina para mantener la hidratación durante la prueba. Los extremos proximal y distal del complejo de radio-cubito se colocaron en unos cilindros metálicos (copas) que se centraron en el eje del mismo, y se fijaron al rellenar estos con metal de Wood (Oest y col. 2007). El exterior de las copas presenta 12 facetas pequeñas. El dispositivo así conseguido, se coloca en el banco de pruebas (Instron 8874), que registra la carga y el desplazamiento.

La prueba de flexión de cuatro puntos se llevó a cabo aplicando dos fuerzas iguales en los extremos de las dos mordazas (Figura 32), lo que permitió la translación en el plano horizontal, perpendicular al plano de flexión del hueso. La flexión se realizó a una velocidad constante de 1,5 mm/minuto y con una carga máxima de 50 N.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Seleccionamos esta carga en base a estudios previos (Meffert y col. 1999) que indicaban que la resistencia máxima a la flexión en la pata del conejo está comprendida entre 100 y 200 N. De esta forma al aplicar una carga de 50 N, disponemos, como mínimo, de un rango de seguridad del 50% para evitar la rotura del hueso.



Figura 32: Configuración de la muestra para la realización del ensayo de flexión.

El ensayo se va realizando por planos, obteniéndose gráficas similares a la observada en la Figura 33, donde se mide el desplazamiento según la fuerza aplicada (curvas de carga deformación).

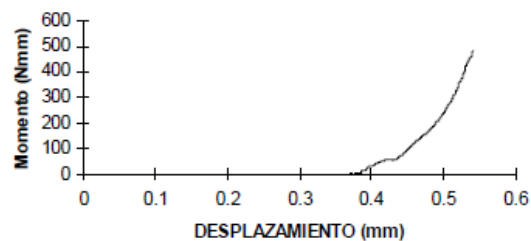


Figura 33: Gráfica representativa de un ensayo de

flexión en uno de los planos.

Después de cada ensayo, se giraba la probeta 30° y se realizaba el ensayo en el siguiente plano. Este procedimiento se repitió 12 veces, hasta completar una vuelta (Figura 34).

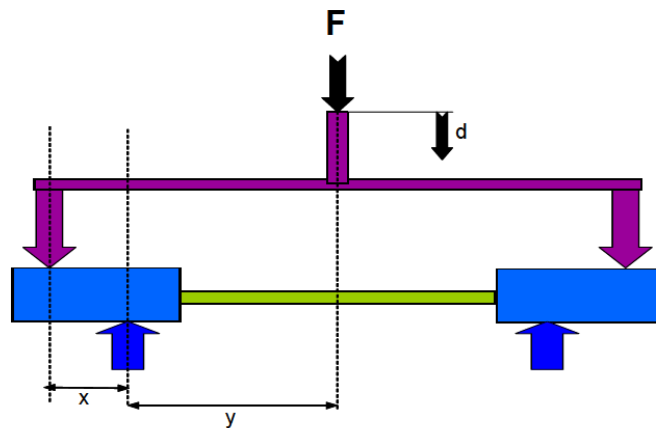


Figura 34. Esquema de la configuración del ensayo de flexión a cuatro puntos.

Del estudio completo en cada hueso, se obtuvo la gráfica de regresión lineal de las curvas de carga-deformación. De ellas obtenemos el valor de la rigidez en cada uno de los 12 planos, que se corresponden con el cociente de carga-deformación.

Para el cálculo de la rigidez a flexión $(EI)_{hueso}$ se aplica la ecuación 1 donde x e y corresponden a las distancias entre los puntos representados en la Figura 34, d es el desplazamiento que sufre la muestra tras la aplicación de la fuerza (F). $(EI)_c$ se corresponde con la rigidez del material de las cazoletas.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

$$(EI)_{hueso} = \frac{[F/d]^{1/2} x^2 y}{\left[1 - \left[\frac{F}{d} \right] \frac{x^3}{6(EI)_c} \right]}$$

Ecuación. 1 : Rigidez a flexión.

Teóricamente, considerando que la rigidez es simétrica en cada plano (la misma para una orientación de 0° y 180°), asumiendo que los tejidos presentan las mismas rigideces a compresión que a tracción, la distribución polar de la rigidez a flexión adquiere la forma de una elipse centrada en el origen y, por tanto, se define por tres parámetros (semieje mayor a, semieje menor b y ángulo de inclinación α (Figura 35) (Foux y col. 1990).

Para cada probeta, los 12 valores de rigidez a la flexión se representaron en coordenadas polares y se realizó análisis de regresión elíptica, resultando una elipse.

Las elipses de ambos radios de cada conejo (el osteotomizado y el contralateral sano) se trazaron en el mismo conjunto de coordenadas.

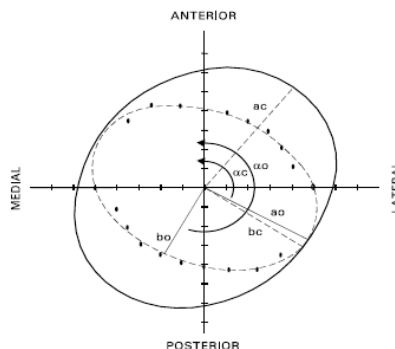


Figura 35: Elipses del radio intervenido y el contralateral.

La ecuación de la elipse que se obtiene del PPRF es la siguiente (ecuación 2):

$$R^2 = \frac{A}{B + \cos 2(\theta - \alpha)}$$

Ecuación 2: Ecuación de la elipse obtenida del PPRF.

Donde **R** es el vector del radio en el punto donde la dirección de la elipse coincide con la del ángulo de orientación de la placa (**θ**); **α** es el ángulo de inclinación de la elipse, medido desde la dirección y al eje menor, y **A** y **B** son función de los semiejes **a** y **b** de la elipse y están definidos por las ecuaciones siguientes (ecuación 3):

$$A = \frac{2a^2b^2}{a^2 - b^2} \qquad B = \frac{a^2 + b^2}{a^2 - b^2}$$

Ecuación 3: Parámetros que definen la ecuación de la elipse.

Para determinar la elipse que mejor se ajusta al PPRF, se asigna a la variable R los valores de rigidez a flexión obtenidos experimentalmente para cada ángulo θ y se realiza una regresión no lineal mediante el método de Levenberg-Marquardt, incluyendo como variable dependiente la R^2 , como variable independiente el ángulo θ y como parámetros a determinar A, B y α .

La verdadera importancia del cálculo de estas elipses radica en la obtención a partir de ellas de **tres parámetros** (índice de rigidez, relación de áreas e índice de planitud) que

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

aportan información respecto a la eficiencia de la reparación del hueso (Foux y col. 1990). Estos parámetros están estandarizados permitiendo conocer la relación entre el hueso osteotomizado y su contralateral sano, por lo tanto los valores obtenidos son adimensionales referidos al hueso intacto contralateral. A continuación definiremos cada uno de estos parámetros:

- **Índice de rigidez** (Stiffness-Index, **SI**) (ecuación 4), es el más importante. Se obtiene dividiendo la rigidez medida en cada uno de los doce planos estudiados del hueso osteotomizado (EI_{os}) entre la rigidez en los mismos planos de su contralateral sano (EI_c). De este modo conseguimos obtener resultados estandarizados, y de este cociente se elige el valor mínimo. Así se representa la dirección del plano de carga donde se da una mayor diferencia entre la rigidez del hueso sano y el osteotomizado. Este índice nos indica el plano donde el valor de rigidez es menor.

$$SI = [(EI)_{os} / (EI)_c]_{min}$$

Ecuación 4: Ecuación que define el índice de rigidez.

El **Índice de área** (Área-Ratio, **AR**) (ecuación 5) nos permite evaluar la rigidez del hueso de una forma global respecto a la de su contralateral sano, partiendo de los valores del semieje mayor (a) y semieje menor (b) que definen la elipse. Es una forma de analizar la relación que existe entre las superficies de ambas elipses, representándose con ella la relación entre la rigidez total en cada uno de los casos. El valor de esta relación varía entre 0 y 1. Cuánto más se aproxime a la unidad el valor del radio osteotomizado, más similar será su rigidez a la del radio intacto.

$$AR = (ab)_{os} / (ab)_c$$

Ecuación 5: Ecuación que define la relación de áreas.

El **Índice de planitud** (Flatness-Ratio, FR) o aplanamiento de la elipse (ecuación 6). Nos indica lo polarizados que están los valores de rigidez del hueso regenerado al compararlo con los del hueso sano. Se define como la relación entre las planitudes de ambas elipses, de forma que los valores inferiores a 1 indican que la planitud de la rigidez del callo es inferior a la del hueso, es decir, que el callo presenta una rigidez menos simétrica que en el hueso sano. A medida que el callo vaya reparando y remodelándose, la elipse debería ir orientándose y acercando su excentricidad a la del hueso sano.. Cuando se alcanza el valor de 1, indicaría que no existen diferencias entre el hueso control y el osteotomizado.

$$FR = (b/a)_{os} / (b/a)_c$$

Ecuación 6: Ecuación que define el índice de planitud.

Es importante tener presente que el PPRF de los huesos esta en relación directa con la estructura geométrica de los mismos.

Una vez completados los ensayos de flexión, los huesos fueron sometidos a un estudio destructivo de torsión.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

2.2. Ensayo de torsión.

El ensayo destructivo de torsión, es un método estandarizado que ha sido empleado por numerosos autores (White 1977; Markel y col. 1990; Luppen y col. 2002; Klein-Nulend y col. 2003; Klein y col. 2003).

El objetivo del ensayo de torsión es la obtención de información relacionada con las características de resistencia del hueso en reparación mediante este tipo de carga, en el que la fuerza aplicada alcanza el punto de rotura del material.

Los ensayos de torsión simulan patrones de fractura al aplicar fuerzas de carga iguales en todas las secciones del hueso. Estos ensayos no se ven influenciados por la longitud del hueso y orientación de éste al aplicarla.(Burstein y Frankel 1971; Levenston y col. 1994).

Una vez llevadas a cabo las pruebas de flexión, se cambia la configuración del banco de pruebas (Instron 8874) y se aplica un momento de torsión a una velocidad de 15°/min, registrando simultáneamente el momento torsor y el giro relativo entre los extremos de la muestra. El comportamiento viscoelástico del tejido óseo le permite absorber mayor cantidad de energía a velocidades elevadas, mientras que pequeñas variaciones en la velocidad de aplicación pueden provocar grandes diferencias en la absorción de energía (White 1977). Por este motivo y para minimizar los efectos inerciales, hemos realizado nuestros ensayos a baja velocidad.

Los callos incipientes presentan un comportamiento plástico y es difícil llevarlos a rotura, por tanto de fin de ensayo es la rotura del hueso reparado o un giro relativo máximo entre mordazas de 90°.

Mediante este ensayo obtenemos un tipo de gráfica similar a la que se muestra en la Figura 36.

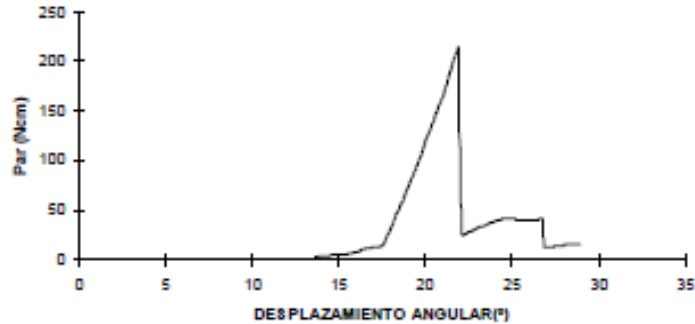


Figura 36: Gráfica par torsor-desplazamiento obtenida del ensayo a torsión.

Los parámetros obtenidos a partir de esta gráfica (figura 36) son:

- 1. Par torsor máximo (Ncm):** es el valor en el que el hueso se rompe. Se obtiene directamente a partir de la curva par torsor-desplazamiento angular, siendo el par torsor máximo o resistencia a torsión el valor máximo que alcanza la curva.
- 2. Tenacidad o energía absorbida (Ncm°):** energía que absorbe el hueso hasta su rotura. Corresponde al área de la gráfica desde que el hueso empieza a deformarse hasta su punto de rotura (Área sombreada de la figura 37).
- 3. Rigidez torsional (Ncm/°):** relación que existe entre la carga aplicada y el desplazamiento observado. Corresponde a la pendiente de la curva en su zona lineal α (White 1977).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

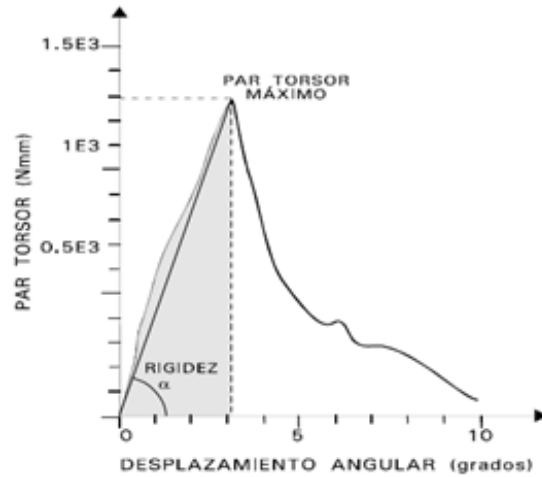


Figura 37: Gráfica de la curva par torsor-desplazamiento angular (White 1977).

De los parámetros obtenidos del ensayo de torsión es de especial interés el **par torsor máximo**, que es aquel punto en el que el hueso llega a la rotura. Este parámetro nos aporta información sobre la resistencia del hueso ante este tipo de carga.

Al igual que los valores de los parámetros de flexión, estos también se muestran adimensionales referidos al hueso contralateral sano, de tal manera que se adquiere el valor de 1 cuando el parámetro analizado coincide con el valor del hueso contralateral sano.

Con el objeto de normalizar los valores obtenidos para cada uno de los parámetros, se expresan la relación entre los valores de los huesos operados frente a sus contralaterales sanos como porcentajes.

- Porcentaje del par torsor recuperado frente al hueso contralateral sano (PTR):

$$PTR = \frac{(Par\ torsor)_{os}}{(Par\ torsor)_c} \times 100$$

- Porcentaje de la Tenacidad recuperada frente al hueso contralateral sano (TR):

$$TR = \frac{(Tenacidad)_{os}}{(Tenacidad)_c} \times 100$$

- Porcentaje de la rigidez recuperada frente al hueso contralateral sano (RR):

$$RR = \frac{(Rigidez\ torsional)_{os}}{(Rigidez\ torsional)_c} \times 100$$

3. Densitometría por tomografía.

Con la finalidad de conocer la morfología y las características densitométricas del callo de regeneración conseguido se realizaron estudios de tomografía axial computerizada (TAC), tanto de las patas operadas como de sus contralaterales sanas. El estudio se realizó en las instalaciones de la empresa Exploraciones Radiológicas S.A. (ERESA, Valencia). El equipo utilizado para ello fue un LightSpeed 16 (General Electric Healthcare). La captura de las imágenes de todos los huesos se realizó en tres tandas, siendo los parámetros de captura los siguientes:

-80 KV, 152 mAs.

-Tamaño de pixel: 0,262 mm.

-Campo de visión: 2,15 a 2,30 cm-Distancia de corte: 0,625 mm.

Durante los escaneos se utilizó un patrón seriados de disoluciones de K_2HPO_4 , con el objetivo de poder transformar los valores observados de nº de Hounsfield (HU) de los cortes de TAC en valores de densidad (mg/cm^3) (Augat 1997).

El procesado de las imágenes TAC obtenidas, así como las reconstrucciones 3D y el posterior estudio densitométrico de las muestras, se llevó a cabo con el software

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Mimics v8.11 (Materialise, Bélgica). La segmentación del tejido óseo a partir de la cual se obtiene la reconstrucción 3D, se realizó estableciendo como límite inferior el criterio de Kirker-Keade y colaboradores (Kirker-Head y col. 2007). Este criterio establece que el límite inferior de hueso calcificado corresponde al 25% de la densidad máxima encontrada en el hueso donde se realiza la medición. En el caso que nos atañe se determinó que la densidad máxima en el hueso sano era de $1940 \text{ mg/cm}^3 \text{ K}_2\text{HPO}_4$, y por tanto el límite inferior de densidad seleccionado para el cálculo de las reconstrucciones 3D es de $485 \text{ mg/cm}^3 \text{ K}_2\text{HPO}_4$.

Con objeto de inducir el menor error posible en las determinaciones densitométricas realizadas a partir de las reconstrucciones 3D, se seleccionó una región de interés que comprendía el conjunto completo callo – implante y un margen superior e inferior de la interfase formada por el callo y el hueso sano (Figura 38).

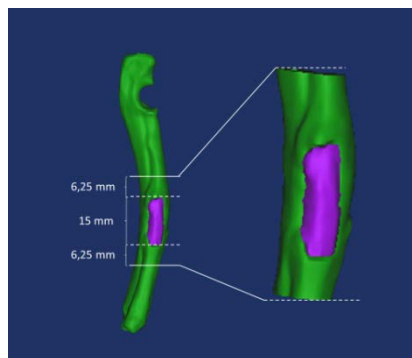


Figura 38: Región de interés seleccionada para el estudio densitométrico de los callos de reparación.

A partir de éstas reconstrucciones de la zona de interés, se determina el volumen total del tejido óseo y la densidad media del callo de regeneración.

- **Volumen total del tejido óseo.** Se obtiene mediante la generación de una isodensidad (partir de las imágenes de TAC y tras el procesamiento del software) en la cual se selecciona todo el tejido que posee una densidad mayor a 360 unidades de Hounsfield (HU), cifra a partir de la cual se considera que el tejido seleccionado es tejido óseo mineralizado.
- **Densidad media del tejido** en la zona de estudio. Este valor corresponde a la densidad media del total del volumen seleccionado.

Para facilitar la interpretación de los resultados, estos parámetros se normalizan estableciendo la relación entre el hueso osteotomizado y el sano, por lo que los valores obtenidos son adimensionales y referidos respecto al lado intacto:

- Porcentaje de volumen de hueso formado respecto al hueso contralateral sano:

$$PV = \frac{(Volumen)_{os}}{(Volumen)_c} \times 100$$

- Porcentaje de la densidad recuperada respecto al hueso contralateral sano:

$$PD = \frac{(Densidad)_{os}}{(Densidad)_c} \times 100$$

4. Análisis estadístico

Previo al estudio estadístico, se calcularon las tablas descriptivas de cada tratamiento y periodo de sacrificio, donde se recopilan los datos de número de especímenes tratados (N válida), la media y desviación estándar (DE). También se realizó la representación gráfica de los valores mediante el diagrama de cajas y arbotantes (Figura 39).

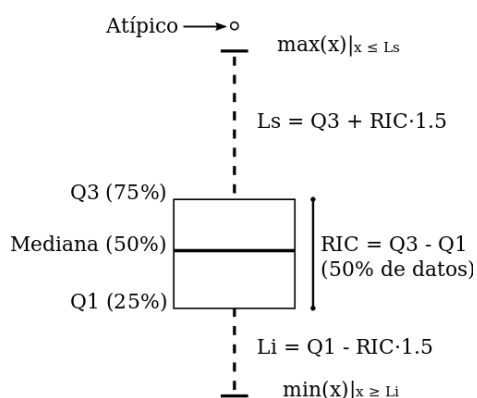


Figura 39: Interpretación de los diagramas de cajas.

El análisis de los resultados se basa en la comparación entre las medias de las variables de interés, con la finalidad de conocer si los tratamientos utilizados tienen un efecto similar.

Se utilizan diferentes métodos de comparación en función de las características del conjunto de datos y del número de medias a comparar. El test ANOVA es el método utilizado para realizar una comparación entre varias medias. Para garantizar una correcta aplicación del mismo deben de cumplirse tres premisas:

1. Independencia: cada serie de datos debe ser independiente de las demás, esto es, los datos de una serie no deben estar correlacionados con los de otra.

III. Material y Métodos

2. Normalidad: la distribución interna de cada serie debe ser normal.
3. Homogeneidad: las varianzas de las series deben ser iguales.

En nuestro estudio se cumplen las dos primeras condiciones para la aplicación del test de análisis de varianza ANOVA, por lo que sólo habrá que determinar homogeneidad de las varianzas a comparar, utilizando para ello, el test de Levene.

En caso de no cumplimiento de la condición de homogeneidad, el método alternativo seleccionado para la comparación entre variables, es el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Con el objetivo de complementar los resultados obtenidos con el test ANOVA, se realiza un test de contraste de comparación múltiple con desviación estándar combinada, que nos permite realizar comparaciones entre medias de manera pareada.

En la Figura 40 se describe el procedimiento estadístico utilizado en nuestro trabajo.

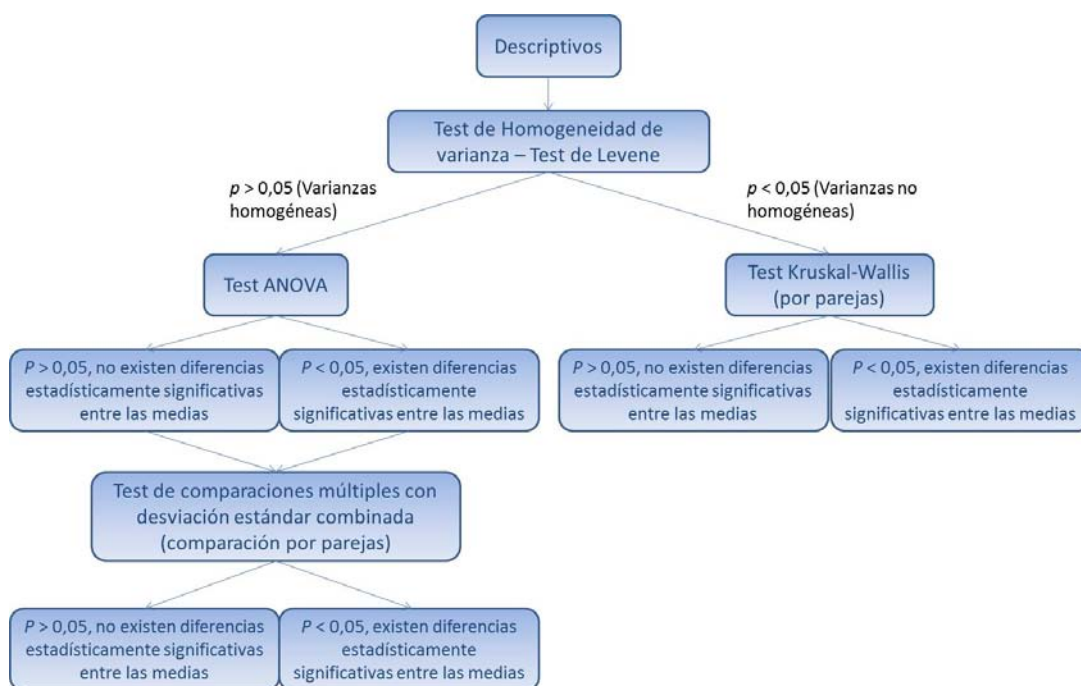


Figura 40: Procedimiento seguido para el estudio estadístico de más de dos medias.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

En aquellas ocasiones dónde sólo se comparan dos medias (Periodo de 16 semanas) el método de comparación de medias seleccionado es el test t de Welch (Figura 41).

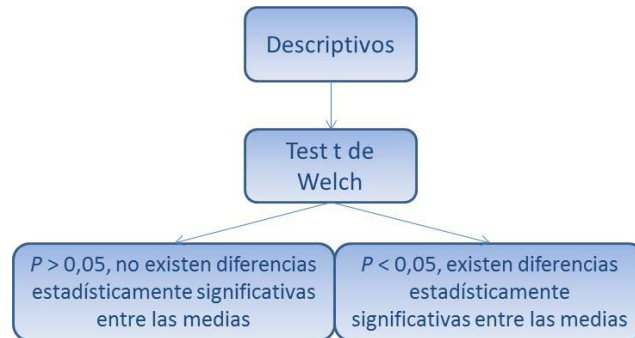


Figura. 41: Procedimiento seguido para el estudio estadístico de dos medias.

Todas las herramientas estadísticas empleadas en el análisis de resultados del presente trabajo se encuentran implementadas en el paquete R (Versión 3.2.2). (R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

IV. RESULTADOS

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

A continuación presentamos de forma descriptiva los resultados de los ensayos biomecánicos (flexión a cuatro puntos y torsión) y del estudio densitométrico.

Para ello, hemos utilizado dos tipos de gráficas:

- Elipses del perfil polar de rigidez a flexión (PPRF), para el ensayo de flexión
- Gráficas de cajas y arbotantes tanto para los ensayos biomecánicos (flexión y torsión) como para el estudio densitométrico.

1. Estudio biomecánico de flexión en 4 puntos

El objetivo del ensayo a flexión a cuatro puntos es determinar la rigidez del callo regenerado en 12 planos distintos, atendiendo al tratamiento utilizado y al momento en el que se realiza el sacrificio del animal (8 o 16 semanas) siguiendo el diseño de experiencias resumido en la tabla 6.

Tratamientos	Periodo		TOTAL
	8 semanas	16 semanas	
A Autoinjerto	6*	6	12*
B Copolímero con rhBMP-2	6	6	12
C Copolímero sin rhBMP-2	6	-	6
TOTAL	18*	12	30*

* No se incluye en el estudio un animal perteneciente al grupo de autoinjeto de 8 semanas por presentar una doble pseudoartrosis en la ostetomía realizada.

Tabla 6: Diseño de los grupos experimentales.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

1.1. Perfil Polar de Rigidez a Flexión (PPRF)

A partir de los valores de rigidez en los distintos planos, obtenidos en el ensayo de flexión a cuatro puntos, se crearon las gráficas del perfil polar de rigidez (PPRF). En ellas se presentan los valores medios de rigidez del hueso osteotomizado según el plano estudiado, para cada grupo de tratamiento y periodo, respecto al hueso contralateral sano. Ello permite presentar, de manera cualitativa, las posibles diferencias existentes en cuanto a comportamiento a flexión entre ambos tipos de hueso.

1.1.1. A las 8 semanas:

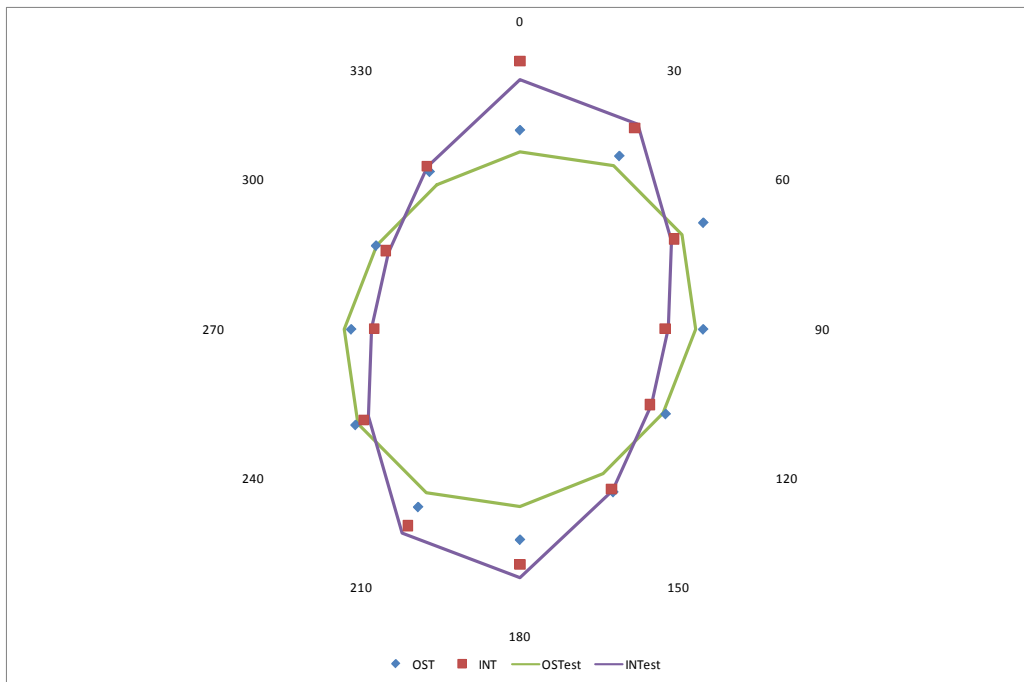
A las 8 semanas de evolución podemos observar cómo las elipses de los huesos tratados con autoinjerto, copolímero con rhBMP-2 y sin rhBMP-2 son diferentes a las elipses que presentan el hueso intacto.

Así en la gráfica 1, observamos cómo la elipse del hueso tratado con autoinjerto (línea de color verde, indicadores azules) es diferente a la del sano (línea color morado, indicadores en rojo).

El defecto óseo tratado con autoinjerto ofrece una elipse que se asemeja en mayor medida a una circunferencia.

En el caso del hueso intacto, el eje menor de la elipse es más corto, mostrando una mayor polaridad en los planos que se encuentran a 0°; 30°; 150°, 180°; 210° y 330°. Al superponer ambas gráficas observamos que en la del autoinjeto existe una desviación

evidente en esos mismos planos, en los que presenta un menor valor de rigidez.

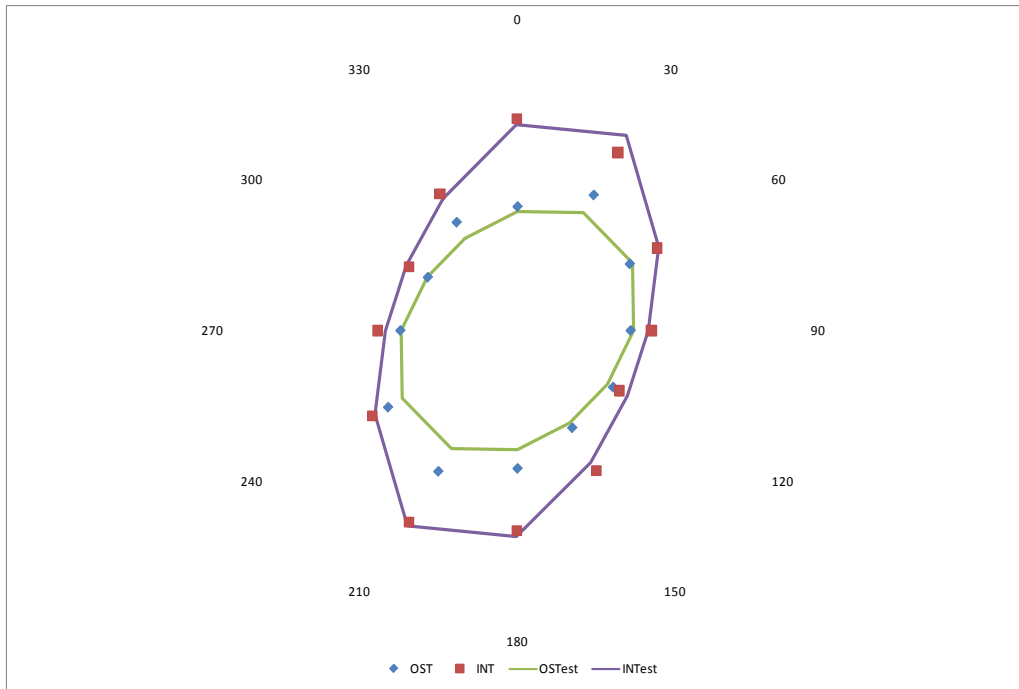


■ valores del radio intacto ◆ valores del radio osteotomizado

Gráfica 1: Perfil polar de rigidez a la flexión del autoinjerto a la 8ª semana.

En la gráfica 2, se compara los valores del hueso tratado con copolímero enriquecido con rhBMP-2 (color verde) con los del hueso sano (color azul). Ambas graficas presentan una morfología elíptica, aunque la elipse del hueso tratado presenta valores menores de rigidez en todos los planos, siendo estas diferencias más marcadas en los planos situados a 0°; 30°; 180° y 210°. Cabe destacar una similitud mayor entre ambas elipses en cuanto a morfología, presentando las dos un eje mayor orientado en el plano 30°-210°.

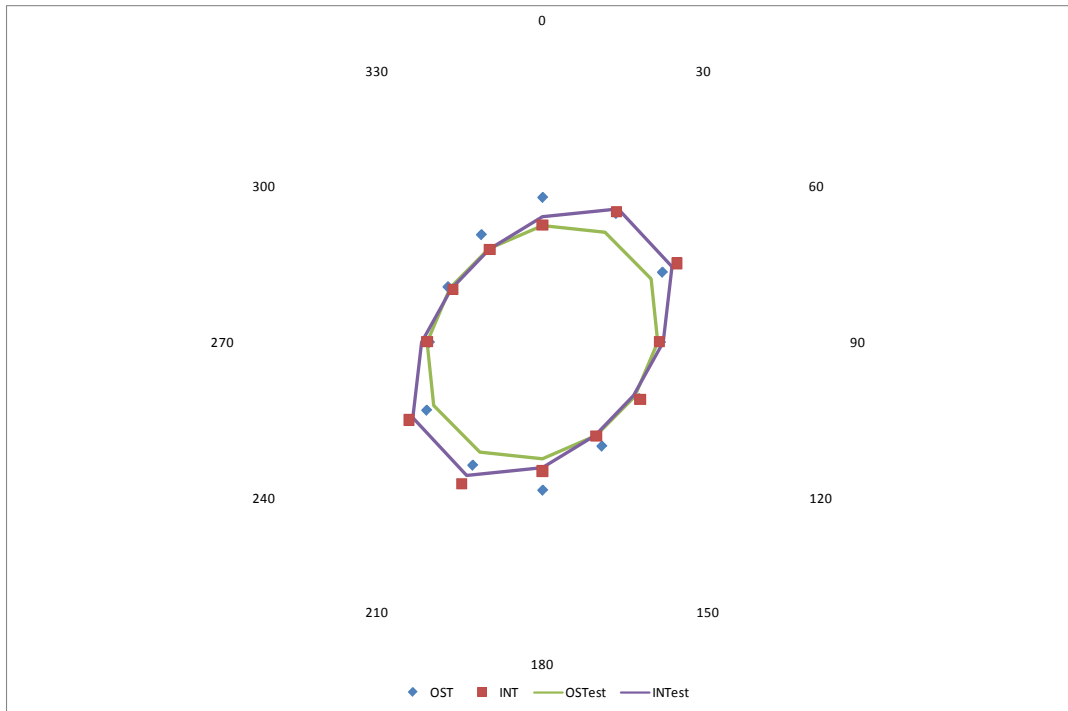
Nuevo copolímero para la regeneración tisular.



■ valores del radio intacto ◆ valores del radio osteotomizado

Gráfica 2: Perfil polar de rigidez a la flexión del copolímero con rhBMP-2, 8ª semana.

En la gráfica 3 se compara los valores del hueso tratado con copolímero sin rhBMP-2 (color verde) con los del hueso sano (color azul). Se observa como ambos grupos presentan una elipse de morfología similar, teniendo como eje mayor el comprendido entre 60° y 240°. pero con una menor rigidez respecto al hueso intacto, en los planos situados a 30°; 60°; 210° y 240°.



■ valores del radio intacto ◆ valores del radio osteotomizado
■ ■

Gráfica 3: Perfil polar de rigidez a la flexión del copolímero sin rhBMP-2 a la 8ª semana.

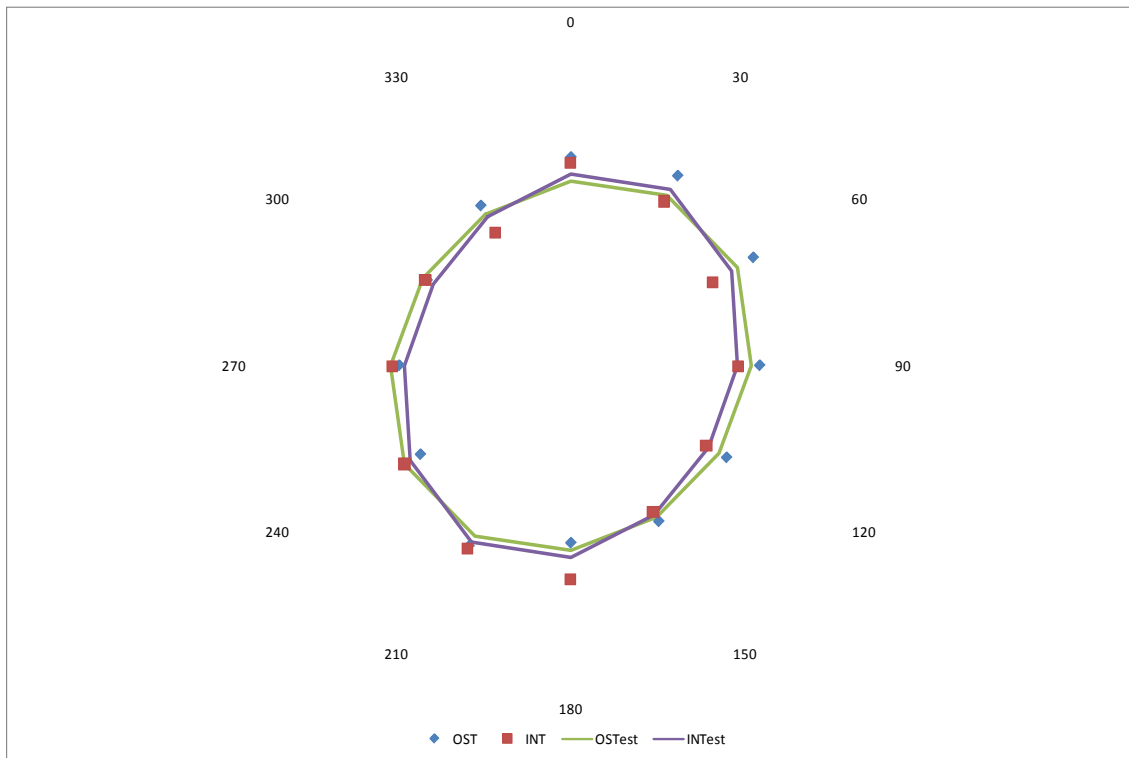
En todos los casos la morfología de las gráficas de los huesos que han recibido los distintos tratamientos son diferentes a la del hueso sano. Así la observada en el grupo de autoinjerto, es más circular. En ambos grupos tratado con copolímero (tanto con como sin rhBMP-2), existe una tendencia a recuperar la morfología del PPRF del hueso sano.

1.1.2. A las 16 semanas.

A las 16 semanas de evolución, sólo fue posible obtener resultado de dos grupos, el tratado con autoinjerto (gráfica 4) y el tratado con copolímero con rhBMP-2 (gráfica 5).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

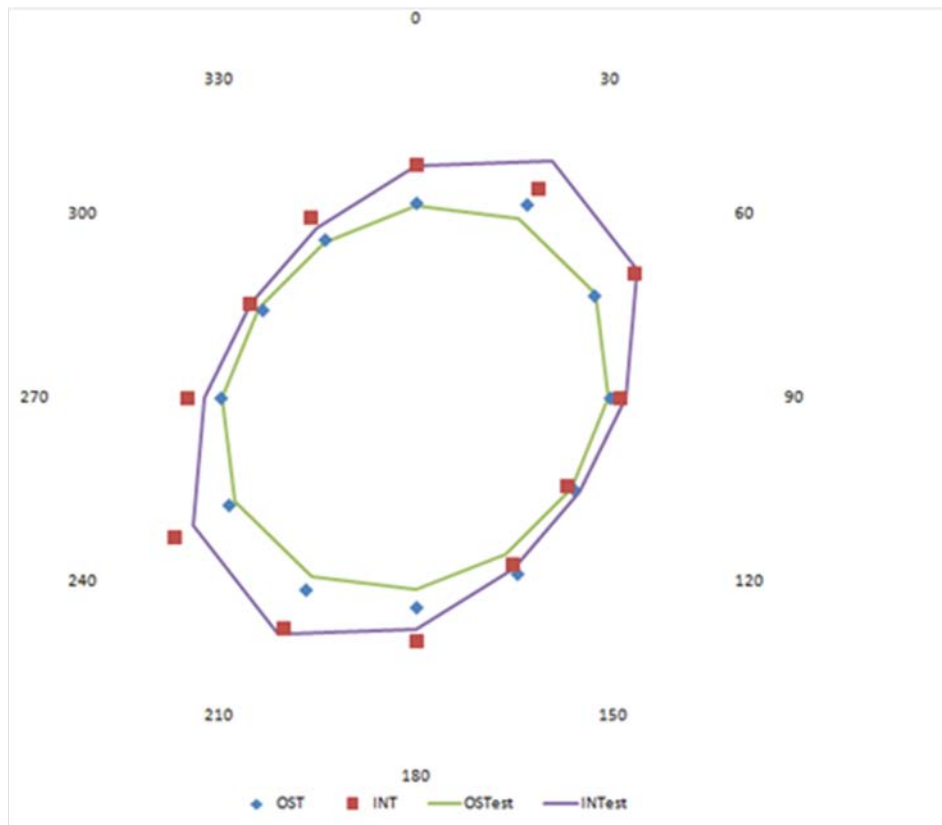
En la gráfica 4, se compara los valores del hueso tratado con autoinjerto (línea color verde, indicadores azules) con los del hueso sano (línea color morado e indicadores en rojo). Ambas gráficas presentan una morfología elíptica superponible, ya que el perfil polar de rigidez del autoinjerto en este periodo, es casi idéntico al mostrado por el hueso intacto.



■ valores del radio intacto ◆ valores del radio osteotomizado

Gráfica 4: Perfil polar de rigidez a la flexión del autoinjerto a la 16ª semana.

En la gráfica 5, se comparan los valores del grupo tratado con copolímero dopado con rhBMP-2 (línea color verde, indicadores azules) respecto al hueso sano (línea color morado, indicadores en rojo). En este periodo de sacrificio ambas gráficas presentan una morfología elíptica, aunque los huesos tratados con copolímero con rhBMP-2, continúan presentando menor rigidez respecto al sano en todos los planos y de forma más marcada en los situados a 0°; 30°; 60°; 180°; 210° y 240°.



■ valores del radio intacto

◆ valores del radio osteotomizado

Gráfica 5: Perfil polar de rigidez a la flexión del copolímero con rhBMP-2, 16ª semana.

Ambos tratamientos utilizados en el periodo de 16 semanas, presentan morfología elíptica, siendo la gráfica del hueso tratado con autoinjerto prácticamente idéntica a la del hueso sano, mientras que la del hueso tratado con copolímero dopado con rhBMP-2 es una elipse que tiende a la forma de PPRF del hueso sano, manteniendo menor rigidez en todos los planos.

A las 16 semanas podemos observar como la gráfica del grupo autoinjerto se ha modificado, pasando de tener de la forma circular a las 8 semanas a una forma elíptica superponible a la del hueso intacto.

Al comparar los resultados entre las 8 y las 16 semanas en el grupo tratado con copolímero con rhBMP-2 continúa presentando una gráfica con forma elíptica que se

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

asemeja a la forma del hueso sano, pero con menor rigidez en todos los planos, aunque no tan acentuada como ocurría a las 8 semanas.

1.2. Índice de rigidez (SI), índice de área (AR) e índice de planitud (FR).

El tratamiento de los datos de flexión, además de obtener las gráficas PPRF para la interpretación cualitativa del comportamiento a flexión, permite calcular los siguientes parámetros: el índice de rigidez (SI), el índice de área (AR), y el índice de planitud (FR). Los resultados quedan agrupados para cada uno de estos parámetros, según el periodo de tiempo al que pertenezcan (8 semanas en la tabla 7 y 16 semanas en la tabla 8).

1.2.1. A las 8 semanas:

Tal y como se muestra en la tabla 7, durante el periodo de 8 semanas no encontramos diferencias estadísticamente significativas tanto si consideramos los tres tratamientos simultáneamente como si lo hacemos de manera pareada (Comparaciones múltiples) para las variables de estudio AR y FR. Esta circunstancia puede observarse de manera gráfica en los diagramas de cajas y arbotantes correspondientes (gráfica 6 y 7).

En cambio, se detectan diferencias estadísticamente significativas en la variable "Índice de rigidez" (SI) ($p=0.023$). Gracias al test de comparaciones múltiples realizado se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos autoinjerto y copolímero rhBMP-2 ($p=0,03$), y también en entre los grupos tratados *con copolímero* con y sin rhBMP-2 ($p=0,01$). Estas diferencias se observan gráficamente en el diagrama de cajas y arbotantes correspondiente (gráfica 8).

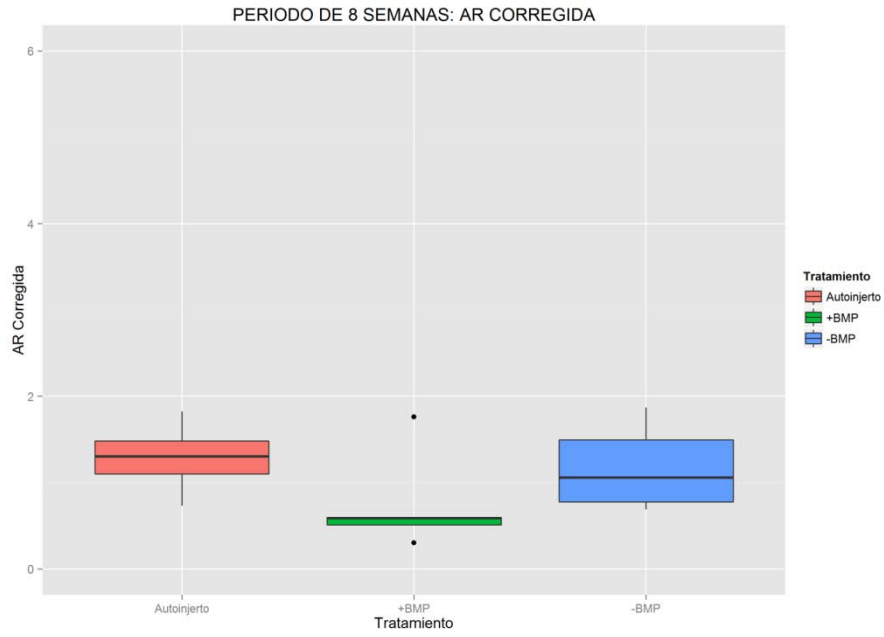
Por otra parte, hay que reseñar que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas para la variable de estudio SI en el periodo de 8 semanas entre los grupos tratados con autoinjerto y los tratados con copolímero sin rhBMP-2.

Descriptivos					<i>p-value</i>			
					ANOVA	Comparaciones múltiples		
Variable de estudio	Tratamiento	N válida	Media	DE	A vs B vs C	A vs B	A vs C	B vs C
AR	Auto (A)	5	1,287	0,41	0,23	0,11	0,69	0,19
	+BMP (B)	6	0,751	0,58				
	-BMP (C)	6	1.167	0.487				
FR	Auto (A)	5	0,737	0,34	0,52	0,32	0,33	0,95
	+BMP (B)	6	1,035	0,58				
	- BMP (C)	6	1,017	0,41				
SI	Auto (A)	5	0,769	0,09	0,023	0,03	0,71	0,01
	+BMP (B)	6	0,512	0,06				
	-BMP (C)	6	0,807	0,24				

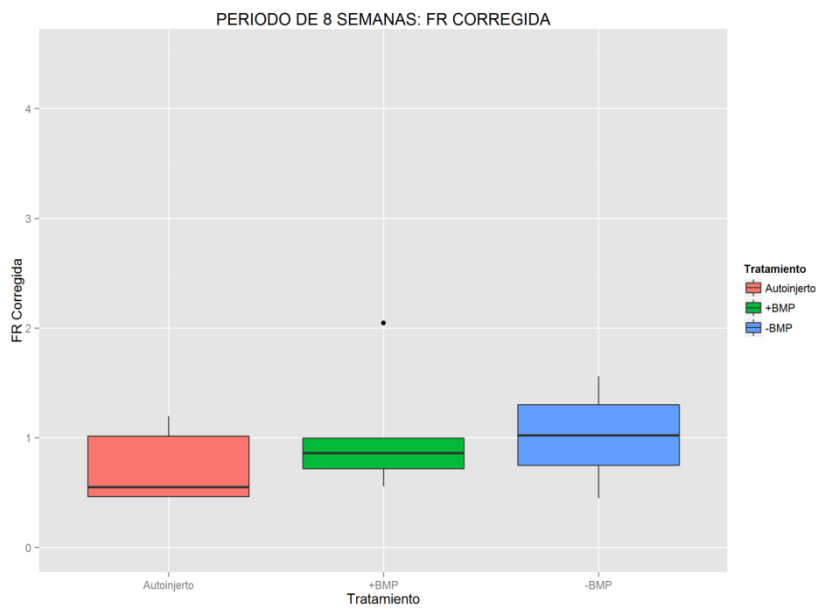
AR: Índice de área. FR: Índice de planitud. SI: Índice de rigidez. DE: Desviación estandar. Auto(A): especímenes tratados mediante autoinjerto. +BMP(B): especímenes tratados con copolímero más rhBMP-2. -BMP (C): especímenes tratados con copolímero sin rhBMP-2.

Tabla 7: Comparativa del ensayo de flexión a 4 puntos valores a las 8 semanas.

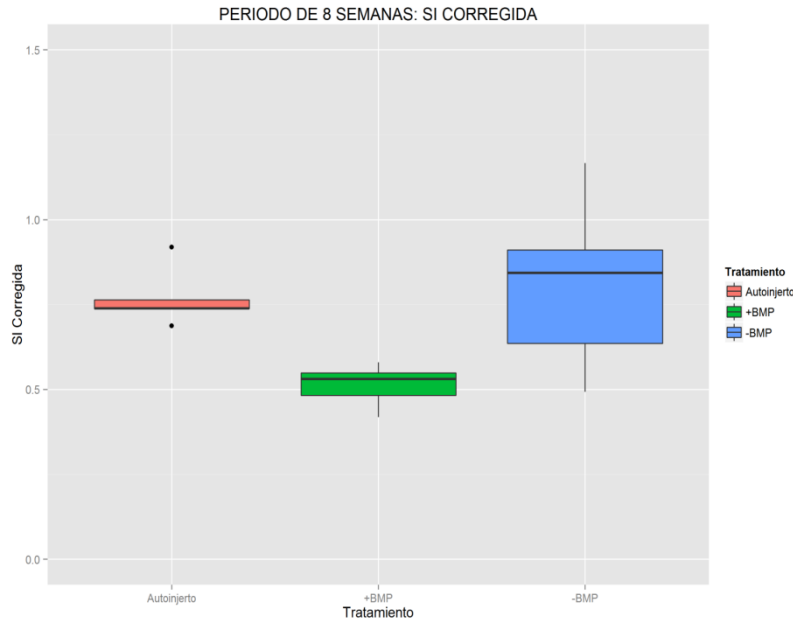
Nuevo copolímero para la regeneración tisular.



Gráfica 6: Índice de área (AR) a las 8 semanas para los tres subgrupos de tratamiento.



Gráfica 7: Índice de planitud (FR) para los 3 subgrupos de tratamiento a las 8 semanas.



Gráfica 8: Índice de rigidez (SI) a las 8 semanas para los tres subgrupos de tratamiento.

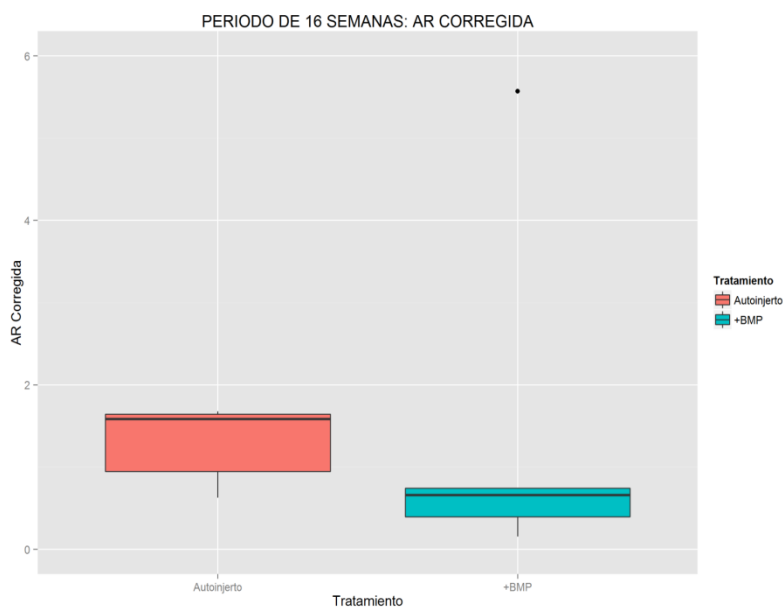
1.2.2. A las 16 semanas:

Respecto al periodo de 16 semanas, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos autoinjerto y copolímero con rhBMP-2 para las variables AR y FR. Estas observaciones se presentan de manera gráfica en los diagramas de cajas correspondientes (gráficas 9 y 10). En cambio, sí que se encuentran diferencias estadísticamente significativas para la variable SI entre el grupo tratado con autoinjerto y el grupo tratado con copolímero dopado con rhBMP-2 ($p=0,03$) (Tabla 8 y Gráfica 11).

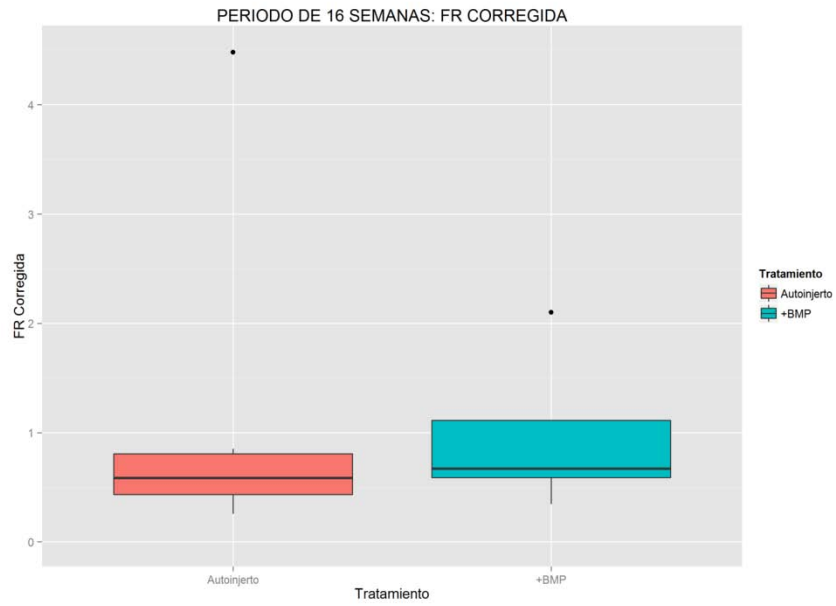
Descriptivos					Test t-Student
Parámetro	Tratamiento	N válida	Media	DE	p-value
AR	Auto (A)	6	1,31	0,48	0,86
	+ BMP (B)	5	1,50	2,28	
FR	Auto (A)	6	1,19	1,62	0,76
	+ BMP (B)	5	0,96	0,69	
SI	Auto (A)	6	0,92	0,25	0,03
	+ BMP (B)	5	0,60	0,15	

AR: Índice de área. FR: Índice de planitud. SI: Índice de rigidez. DE: Desviación estandar. Auto(A): especímenes tratados mediante autoinjerto. +BMP(B): especímenes tratados con copolímero más rhBMP-2. -BMP(C): especímenes tratados con copolímero sin rhBMP-2.

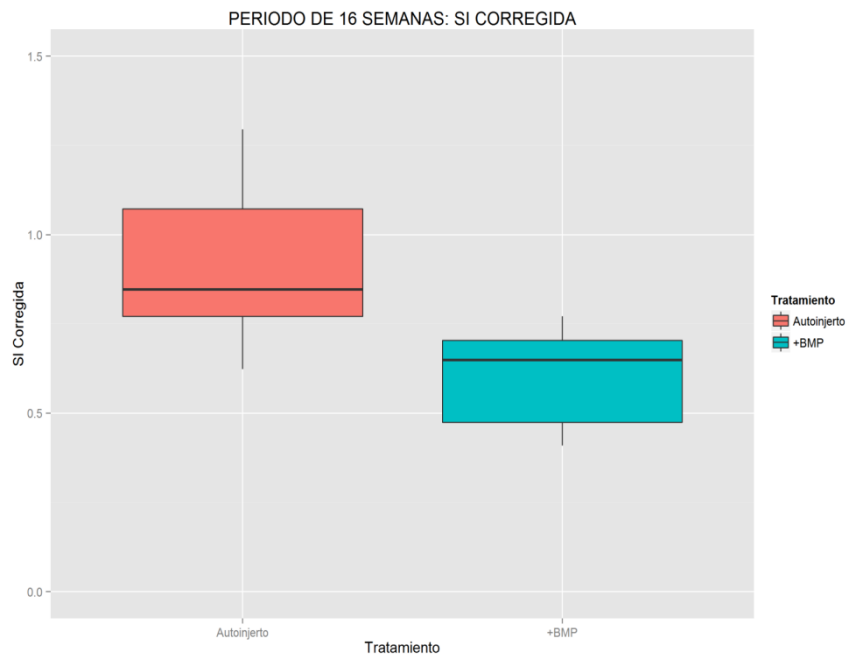
Tabla 8: Comparativa del ensayo de flexión a 4 puntos a las 16 semanas.



Gráfica 9: Índice de área (AR) a las 16 semanas para los dos subgrupos de tratamiento disponibles.



Gráfica 10: Índice de planitud (FR) para los dos subgrupos disponibles a las 16 semanas.



Gráfica 11: Índice de rigidez (SI) a las 16 semanas para los dos subgrupos de tratamiento.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

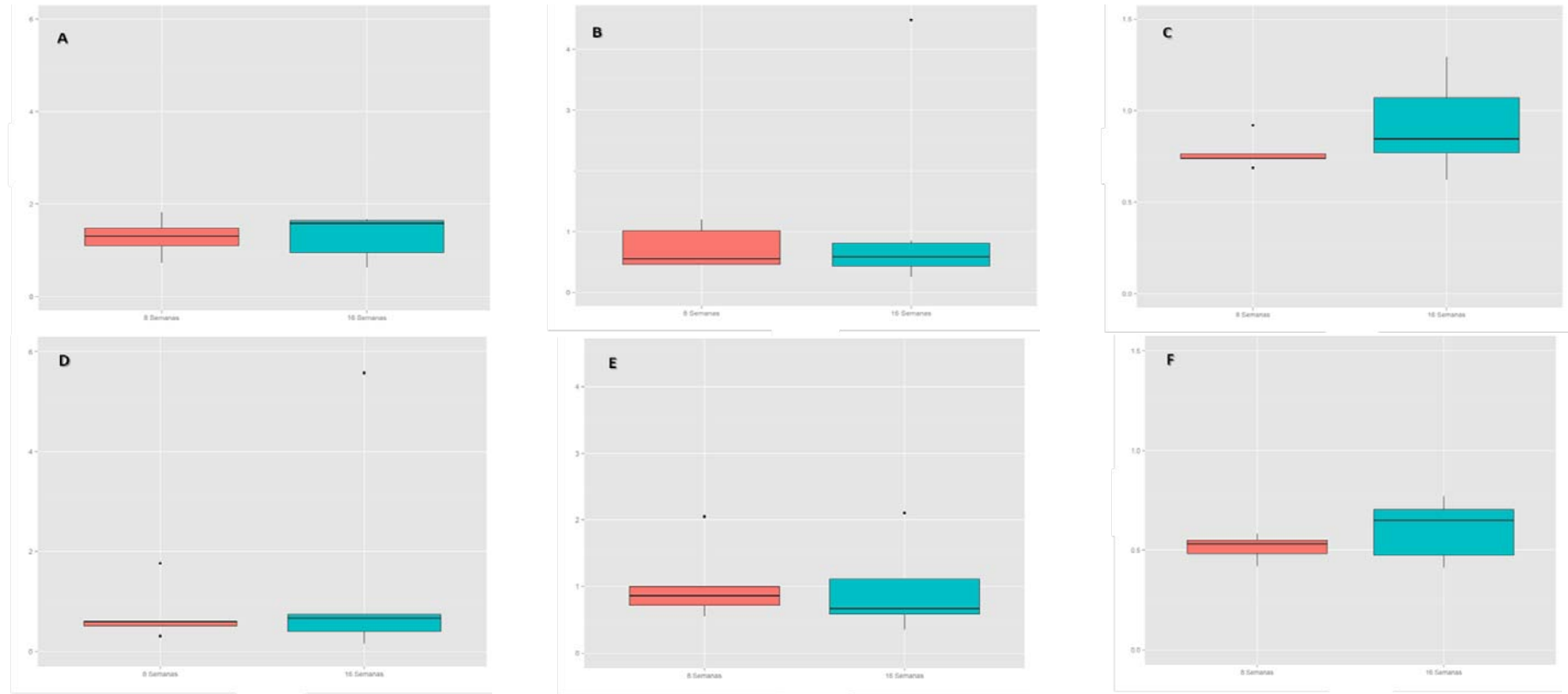
Si comparamos los resultados entre las 8 y las 16 semanas, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables del estudio (AR, FR, SI) para los grupos de tratamiento autoinjerto y copolímero +rhBMP, tanto a las 8 como a las 16 semanas (gráfica 12 y tabla 9).

Variable de estudio	8 semanas			16 semanas			Test t Student
	N	Media	DE	N	Media	DE	p-value
AR	5	1.29	0.41	6	1.31	0.48	0.9
FR	5	0.73	0.34	6	1.19	1.62	0.5
SI	5	0.77	0.08	6	0.91	0.25	0.2

AR: Índice de área, FR: índice de planitud, SI: índice de rigidez, N: número de casos, DE: desviación estandar.

Tabla 9: Ensayo de flexión a las 8 y a las 16 semanas.

IV. Resultados



Gráfica 12: Tratamiento con autoinjerto: AR (A), FR (B) y SI (C) y tratamiento con copolímero + rhBMP-2: AR (D), FR (E) y SI (F) a las 8 y a las 16 semanas.

2. Estudio biomecánico de Torsión.

2.1. Par torsor máximo (PTR), tenacidad recuperada (TR) y rigidez recuperada (RR).

Los ensayos a torsión, proporcionan información relacionada con las características mecánicas del hueso tras aplicarle un par torsor hasta provocar la rotura del material. A partir de las gráficas par torsor aplicado vs. ángulo obtenidas durante los ensayos mecánicos de torsión realizados, se calcularon las variables más comunes en este tipo de ensayo (par torsor máximo o resistencia a torsión (PTR), tenacidad (TR) y rigidez recuperada (RR)). En el caso que nos ocupa, las variables de estudio finales se calcularon relacionando los valores del hueso tratado en reparación frente a los del hueso contralateral intacto, expresando dicha relación en porcentaje. De esta forma, valores próximos al 100% indicarían el valor correspondiente al hueso sano.

Del mismo modo que en casos anteriores, se analizan estadísticamente las posibles diferencias entre tratamientos para cada uno de los dos periodos de estudio considerados, 8 y 16 semanas. En las tablas 10 y 11 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en dicho análisis, incluyendo una estadística descriptiva y los resultados del estudio comparativo entre grupos.

2.1.1. A las 8 semanas:

En el periodo de 8 semanas, cabe destacar que el grupo con autoinjerto alcanza una media de PTR superior incluso al 100% lo que indica valores superiores a los alcanzados por el hueso sano. Respecto a las comparaciones (tabla 10), se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las variables PRT (ANOVA, $p=0,03$) y RR (ANOVA, $p=0,023$) cuando se analizan los tres grupos simultáneamente.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

					<i>p-value</i>			
Descriptivos					ANOVA	Comparaciones múltiples		
Variable de estudio	Tratamiento	N válida	Media % recuperación	DE	A vs B vs C	A vs B	A vs C	B vs C
%PTR	Auto (A)	5	109,4	12,35	0.03	0,04	0.01	0.47
	+BMP (B)	6	80,54	29,92				
	-BMP (C)	6	71,01	19,26				
%TR	Auto (A)	5	110.77	18.97	0.20	0.93	0.12	0.13
	+BMP (B)	6	109,00	44.92				
	-BMP (C)	6	78.15	27.01				
%RR	Auto (A)	5	127.23	24.58	0.023	0.01	0.18	0.11
	+BMP (B)	6	69.78	34.92				
	-BMP (C)	6	100.47	32.95				

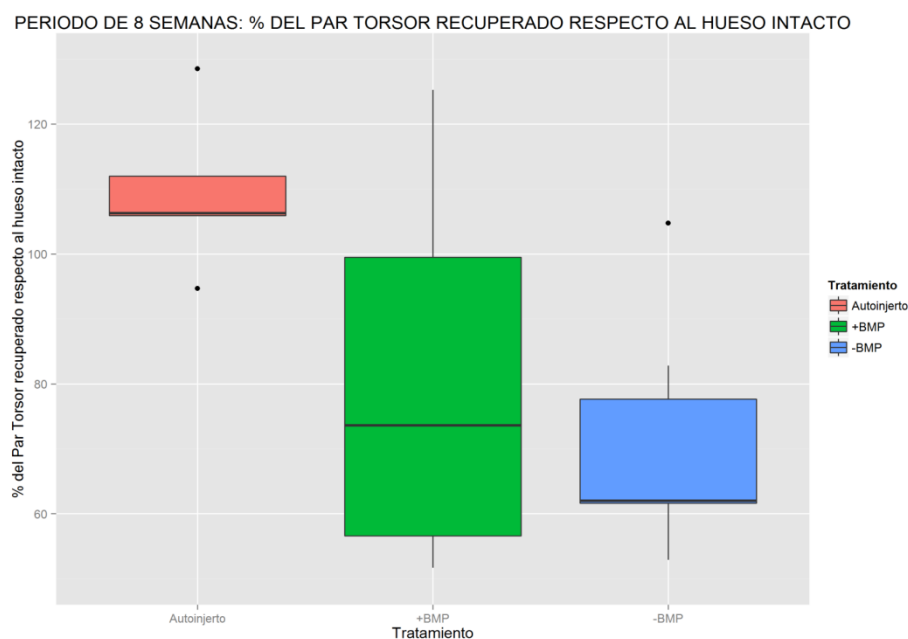
PTR: par torsor máximo recuperado. TR: tenacidad recuperada. RR: rigidez recuperada. N: número de casos. DE: desviación estándar. Auto(A): especímenes tratados mediante autoinjerto. +BMP(B): especímenes tratados con copolímero más rhBMP-2. -BMP (C): especímenes tratados con copolímero sin rhBMP-2.

Tabla 10: Comparativa del ensayo a torsión a las 8 semanas.

IV . Resultados

En el caso de la variable **par torsor máximo recuperado** o resistencia máxima a torsión (PTR), el test de comparaciones múltiples revela diferencias estadísticamente significativas entre los grupos autoinjerto y copolímero con BMP-2 ($p=0,04$), y autoinjerto y copolímero sin BMP-2 ($p=0,01$). Estos resultados indican que el grupo tratado con autoinjerto presenta valores de resistencia a torsión a las 8 semanas de evolución significativamente superiores a los de los grupos tratados con el copolímero en estudio, tanto dopado con rhBMP-2 o sin ella. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos tratados con el copolímero.

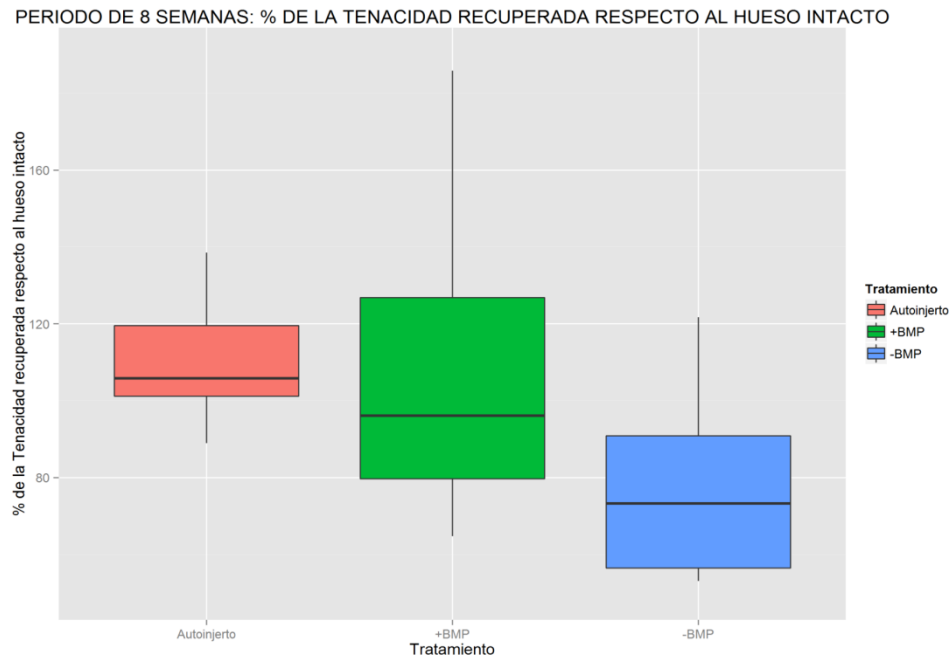
En la gráfica 13 se presenta el diagrama de cajas y arbotantes correspondiente a esta variable.



Gráfica 13: PTR de los tres grupos de tratamiento a las 8 semanas.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

En el caso del análisis de la **tenacidad recuperada** (TR) no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el comportamiento de los tres tratamientos (autoinjerto, copolímero con rhBMP-2 y sin rhBMP-2) (tabla 10 y gráfica 14).

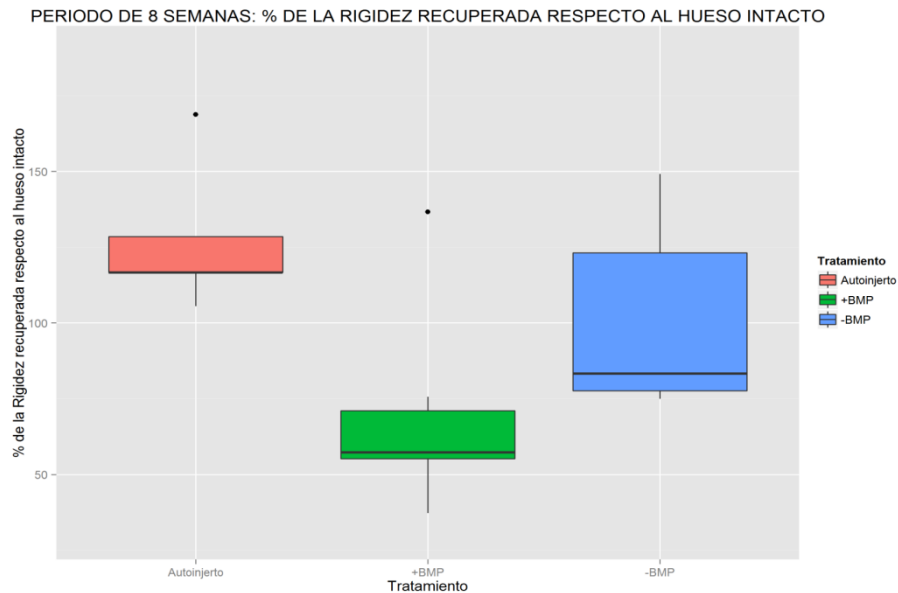


Gráfica 14: PTR de los tres grupos de tratamiento a las 8 semanas.

Respecto a la variable **rigidez recuperada** (RR) valorada a las 8 semanas, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con autoinjerto (127%) y el grupo copolímero dopado rhBMP-2 (70%) ($p=0,01$).

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con el copolímero con y sin rhBMP-2 ($p=0,11$) debido a la elevada dispersión de los datos, aunque en el diagrama de cajas y arbotantes (gráfica 15) aparentemente las cajas presentan morfología diferente.

Tanto el grupo tratado con autoinjerto como el tratado con copolímero sin dopaje de BMP-2 muestran valores de rigidez similares al del hueso sano (127% y 100%, respectivamente).



Gráfica 15: RR de los tres grupos de tratamiento a las 8 semanas.

Del análisis del conjunto de variables analizadas a las 8 semanas de evolución se desprende que sólo el grupo tratado con autoinjerto ha alcanzado valores similares a las del hueso sano para todas las variables biomecánicas analizadas, mientras que el grupo tratado con copolímero con rhBMP2 alcanza valores de hueso intacto sólo en el caso de la tenacidad o capacidad de absorber energía; y en el caso del hueso tratado con copolímero no dopado sólo alcanza valores similares a los del hueso sano en el caso de la variable de rigidez recuperada. Todo ello indica que tan sólo el grupo tratado con autoinjerto se asemeja a un hueso sano a las 8 semanas tras la osteotomía, mientras que los grupos tratados con copolímero (con y sin rhBMP-2) todavía no han alcanzado los valores de un hueso sano.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

2.1.2. A las 16 semanas

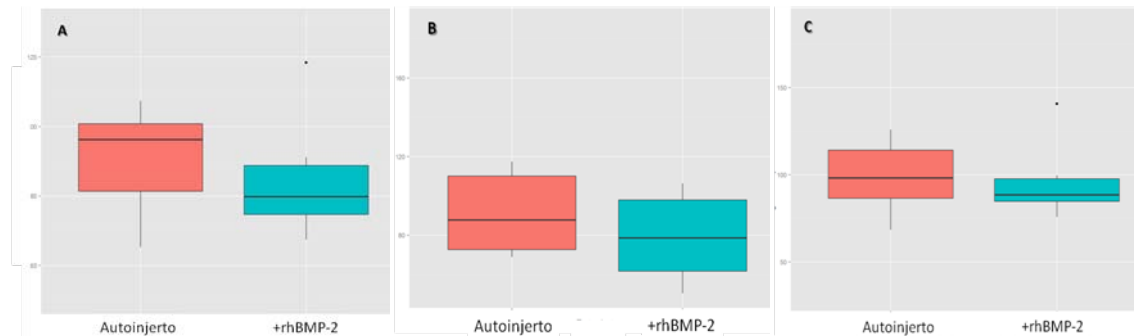
Al realizar el análisis de los grupos a las 16 semanas de evolución, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo autoinjerto y copolímero dopado con rhBMP-2 tanto en los parámetros PTR ($p=0,6$), TR ($p=0,4$) y RR ($p=0,8$), como se aprecian en la tabla 11 y gráfica 16.

<i>Descriptivos</i>					<i>Test t Student</i>
Parámetro	Tratamiento	N válida	Media % recuperación	DE	p-value
PTR	Auto (A)	6	90.65	16,04	0,58
	+ BMP (B)	6	85,05	18,16	
TR	Auto (A)	6	91.19	21.93	0.37
	+ BMP (B)	6	79.09	23.21	
RR	Auto (A)	6	98.85	21.34	0.85
	+ BMP (B)	6	96.33	23.18	

PTR: par tursor máximo recuperado. TR: tenacidad recuperada. RR: rigidez recuperada. N: número de casos. DE: desviación estándar. Auto(A): especímenes tratados mediante autoinjerto. +BMP(B): especímenes tratados con copolímero más rhBMP-2.

Tabla 11: Comparativa del ensayo a torsión a las 16 semanas.

Es de destacar el hecho de que el grupo tratado con copolímero dopado con rhBMP-2 tiene un comportamiento muy similar al del grupo tratado con autoinjerto al que se considera como “*gold standard*” y casi en todos los casos a excepción de la tenacidad, se observan valores similares a los del hueso sano.



Gráfica 16: Resultados de los parámetros de torsión para autoinjerto. **A:** Par torsor recuperado frente al hueso intacto. **B:** % de la tenacidad recuperada frente al hueso intacto. **C:** % de la rigidez recuperada frente al hueso intacto.

En las tablas 12 y 13, observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de torsión estudiados (PTR, TR y RR) conforme pasa el tiempo de reparación, tanto en el grupo autoinjerto (tabla 12 y gráfica 17) como en el copolímero +rhBMP-2 (tabla 13 y gráfica 18).

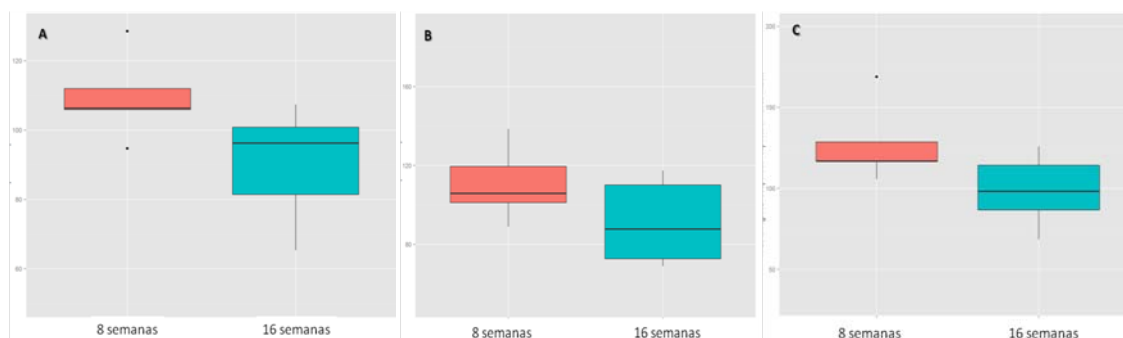
Para el grupo tratado con autoinjerto, al comparar los parámetros de torsión obtenidos a las 8 y 16 semanas, observamos que, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas (tabla 12, gráfica 17) se observa que los valores de las tres variables disminuyen con el tiempo hasta alcanzar valores muy similares a los de un hueso sano.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

Descriptivos								
8 semanas				16 semanas			Test	t
VARIABLE	N	Media	DE	N	Media	DE	p-value	
%PTR	5	109.47	12.35	6	90.65	16.04	0.06	
%TR	5	110.7	18.97	6	91.19	21.93	0.15	
%RR	5	127.23	24.58	6	98.85	21.34	0.07	

PTR: par torsor recuperado. TR: tenacidad recuperada. RR: rigidez recuperada. N: número de casos. DE: desviación estándar.

Tabla 12: Ensayo de torsión a las 8 y a las 16 semanas del grupo tratado con autoinjerto.

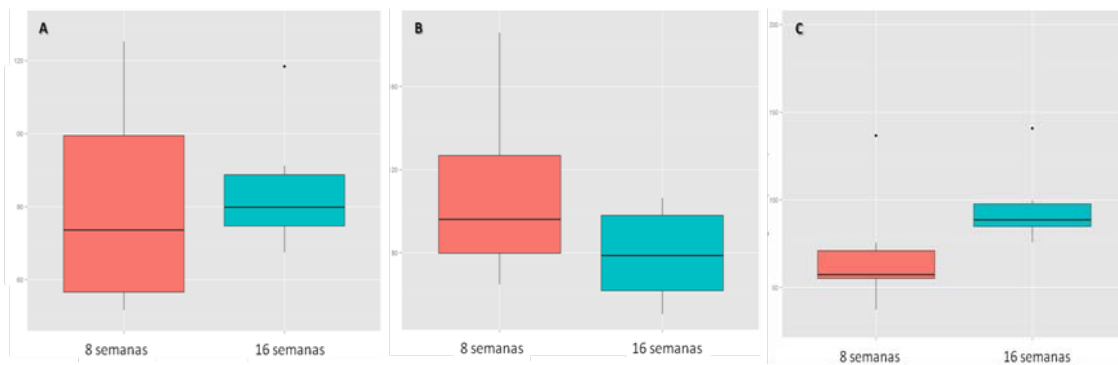


Gráfica 17: Resultados de los parámetros de torsión para autoinjerto. Par torsor recuperado frente al hueso intacto (A), porcentaje de la tenacidad recuperada frente al hueso intacto (B) y porcentaje de la rigidez recuperada frente al hueso intacto (C) a las 8 y a las 16 semanas.

En el caso del grupo tratado con copolímero dopado con rhBMP-2 (tabla 13, gráfica 19) no se observan diferencias estadísticamente significativas debidas a la elevada dispersión de los datos por lo que resulta difícil realizar un análisis detallado de la evolución en este grupo.

<i>Descriptivos</i>							
8 semanas				16 semanas			<i>Test t</i>
<i>VARIABLE</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>p-value</i>
%PTR	6	80.55	29.92	6	85.05	18.16	0.7
%TR	6	109	44.9	6	79.09	23.21	0.2
%RR	6	69.78	34.92	6	96.33	23.18	0.15

Tabla 13: Ensayo de torsión a las 8 y a las 16 semanas en el grupo de copolímero dopado con BMP-2. PTR: par torsor recuperado. TR: tenacidad recuperada. RR: rigidez recuperada. N: número de casos. DE: desviación estándar.



Gráfica 18: Resultados de los parámetros de torsión para el copolímero con rhBMP-2. Par torsor recuperado frente al hueso intacto (A), porcentaje de la tenacidad recuperada frente al hueso intacto (B) y porcentaje de la rigidez recuperada frente al hueso intacto (C) a las 8 y a las 16 semanas.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

3. Densitometría por tomografía

3.1. Reconstrucciones en 3 dimensiones.

A partir de reconstrucciones tridimensionales obtenidas de las imágenes de TAC, podemos valorar cualitativamente la morfología del callo regenerado en el radio, según el tratamiento utilizado y el momento del sacrificio (8 y 16 semanas).

3.1.1. A las 8 semanas.

En los radios tratados con autoinjerto se consigue la consolidación en todos los planos a las 8 semanas (figura 42).

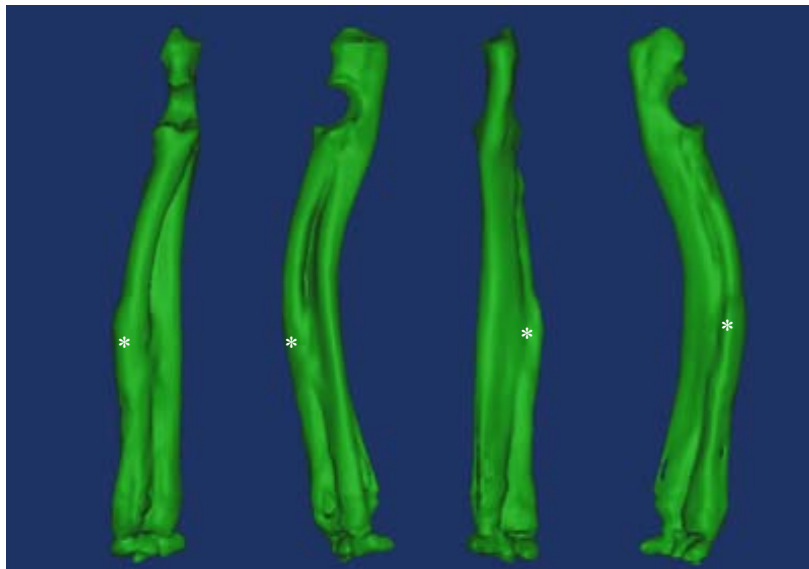


Figura 42: Reconstrucción tridimensional a partir de los datos de tomografía del radio tratado con autoinjerto a las 8 semanas. Se observa la consolidación completa de la zona (*).

En los radios tratados con copolímero con y sin rhBMP-2, la morfología del callo regenerado es muy similar. En ambos casos, se observan áreas hipertróficas de hueso que rodea la zona del andamio, el cual aún no se ha reabsorbido (figura 43 y 44).

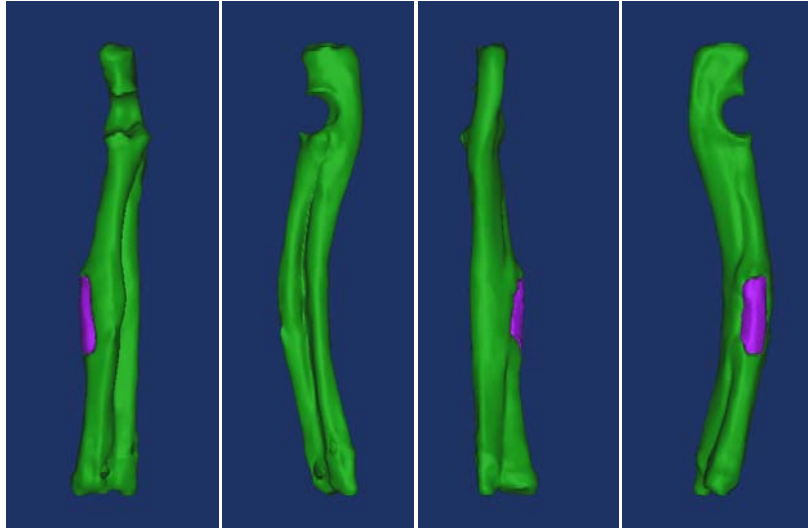


Figura 43: Reconstrucción tridimensional a partir de los datos de tomografía del radio tratado con copolímero con rhBMP-2 a las 8 semanas. El área marcada en morado representa el andamio.

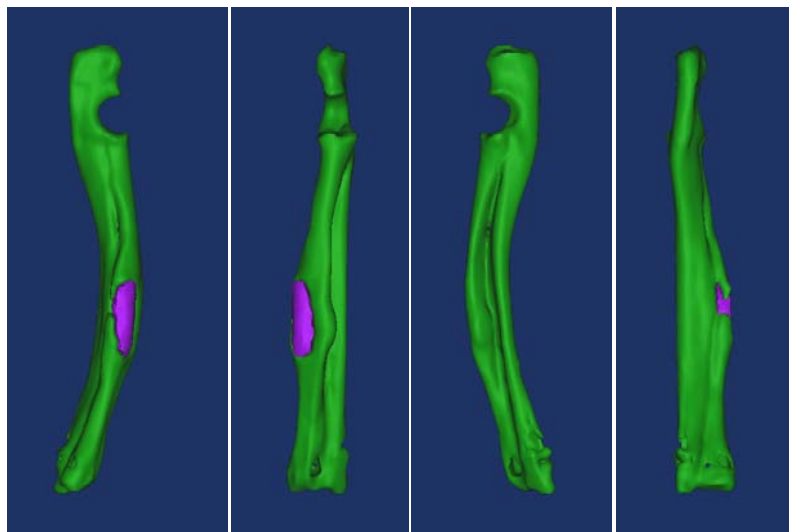


Figura 44: Reconstrucción tridimensional a partir de los datos de tomografía del radio tratado con copolímero sin rhBMP-2 a las 8 semanas. El área marcada en morado representa el andamio.

3.1.2. A las 16 semanas

En la 16ª semana, el defecto del radio tratado con copolímero con rhBMP-2, está prácticamente regenerado en todos los planos, aunque el andamio sigue sin

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

reabsorberse en su totalidad. El hueso neoformado parece empujar al copolímero hacia el exterior de la superficie ósea (figura 45).

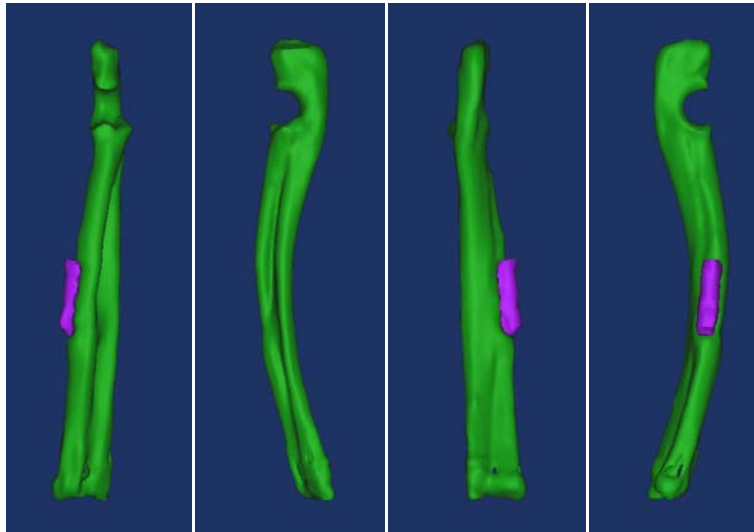


Figura 45: Reconstrucción tridimensional a partir de los datos de tomografía del radio tratado con copolímero con rhBMP-2 a las 16 semanas. El área marcada en azul representa el andamio.

3.2. Análisis densitométrico (PV y PD).

A partir de las reconstrucciones tridimensionales se lleva a cabo el análisis de las variables densitométricas referidas al callo de fractura de cada uno de los huesos del estudio, tal y cómo se describe en el apartado de material y métodos.

3.2.1. A las 8 semanas

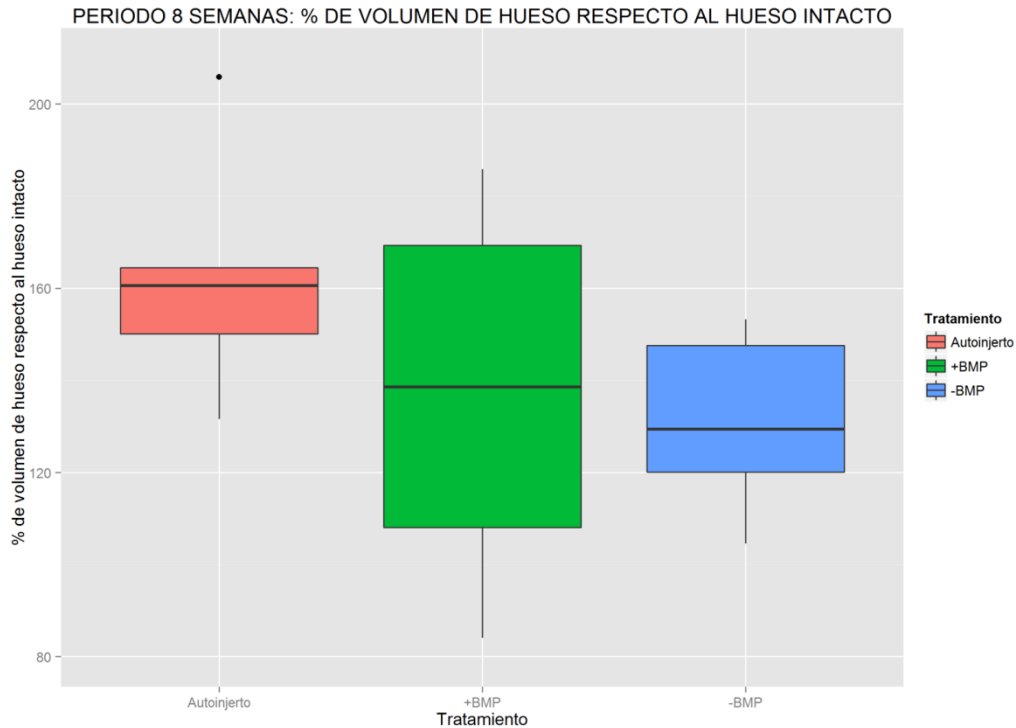
En la tabla 14 se incluyen los valores obtenidos a las 8 semanas de los porcentajes de volumen (PV) y densidad (PD) respecto al hueso sano en los grupos tratados con autoinjerto, copolímero con rhBMP-2 y sin rhBMP-2.

<i>Descriptivos</i>					<i>p-value</i>			
					<i>ANOVA</i>	<i>Comparaciones múltiples</i>		
<i>Variable</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>N válida</i>	<i>Media % recuperación</i>	<i>DE</i>	<i>A vs B vs C</i>	<i>A vs B</i>	<i>A vs C</i>	<i>B vs C</i>
%PV	Auto (A)	5	162,53	27,39	0,3	0,2	0,1	0,7
	+BMP (B)	6	137,44	41,67				
	-BMP ©	6	131,23	19,37				
%PD	Auto (A)	5	99,46	4,55	0,12	0,09	0,06	0,7
	+BMP (B)	6	102,98	2,76				
	-B©(C)	6	103,57	2,48				

Tabla 14: Comparativa del estudio densitométrico a las 8 semanas. PV: volumen de hueso formado respecto al hueso contralateral intacto. PD: porcentaje de densidad recuperada respecto al hueso contralateral intacto. N: número de casos. DE: desviación estándar. Auto (A): especímenes tratados mediante autoinjerto. +BMP (B): especímenes tratados con copolímero más rhBMNP-2. -BMP (C): especímenes tratados con copolímero sin rhBMP-2.

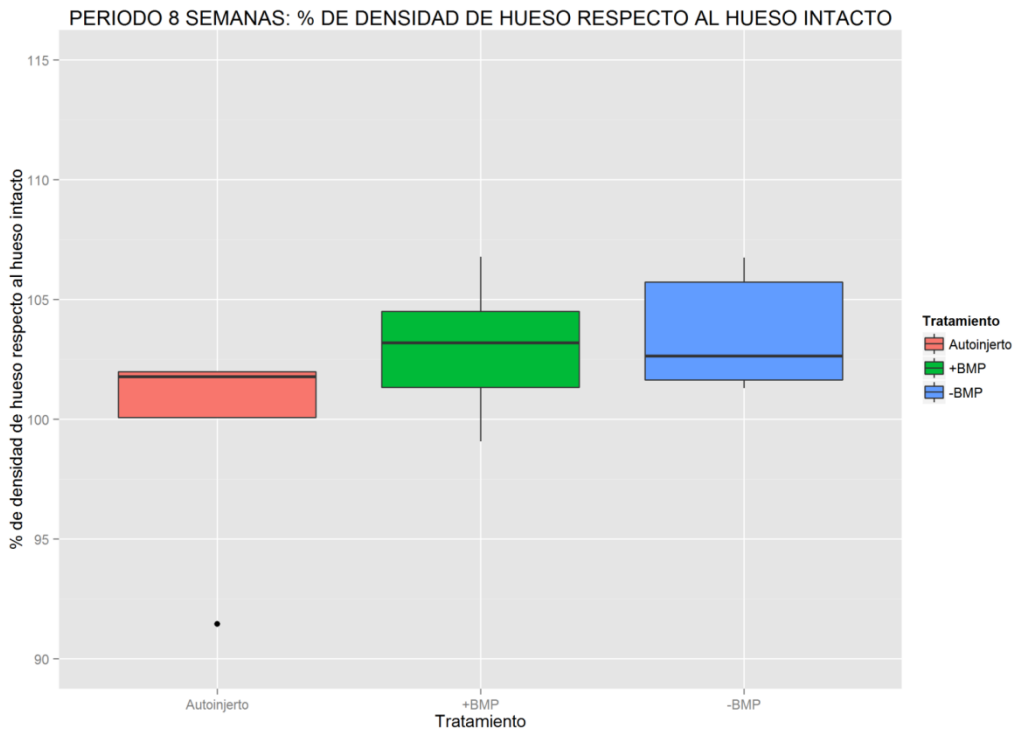
En relación al porcentaje de volumen regenerado (PV) los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de tratamiento respecto al lado sano aunque en todos los casos dichos valores, son superiores a los del hueso intacto (gráfica 19).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.



Gráfica 19: Porcentaje de volumen de hueso regenerado respecto al intacto para los tratamiento autoinjerto, copolímero con rhBMP-2 y sin rhBMP-2 a las 8 semanas.

En el caso de la densidad ósea recuperada (PD), se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupo tratado con autoinjerto y los grupos tratados con copolímero tanto dopado con rhBMP-2 ($p=0.09$) como sin rhBMP-2 ($p=0.06$). En la tabla 14, se aprecia que los grupos tratados con copolímero presentan mayor densidad ósea (gráfica 20).



Gráfica 20: Porcentaje de densidad de hueso regenerado respecto al intacto para los tratamientos autoinjerto, copolímero con rhBMP-2 y sin rhBMP-2 a las 8 semanas.

3.2.2. A las 16 semanas:

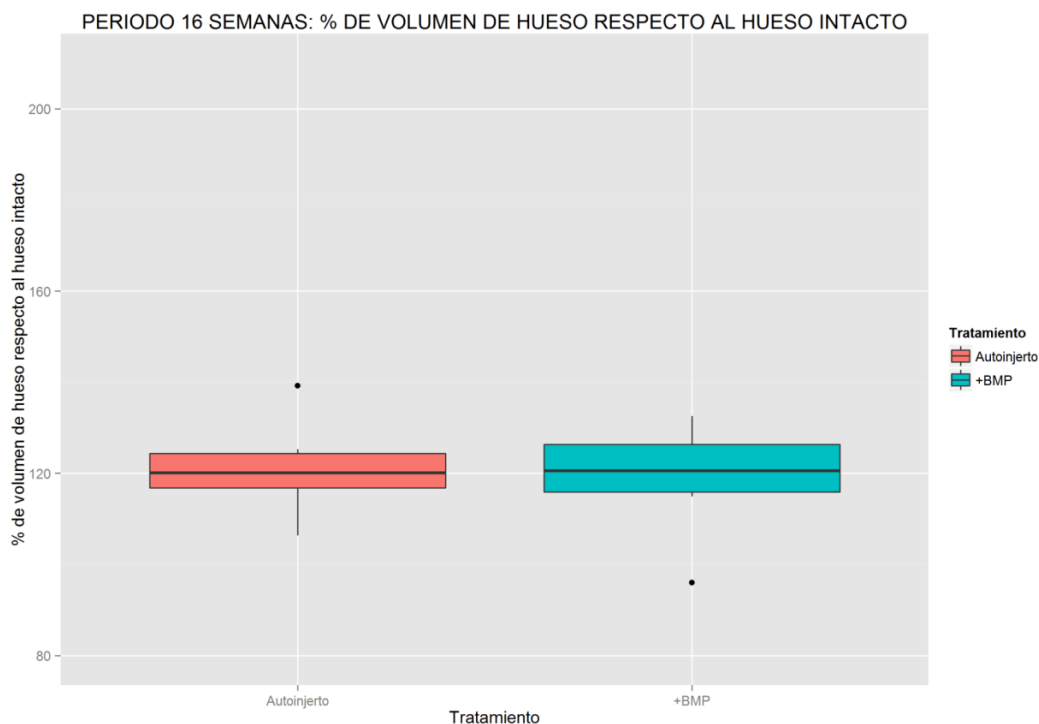
Los valores de PV y PD están recogidos en la tabla 15. En ella observamos que, no encontraríamos diferencias estadísticamente significativas para el parámetro PV entre los huesos tratados con autoinjerto y los tratados con copolímero dopado rhBMP-2 ($p=0,72$) (gráfica 21). Por el contrario en el parámetro PD, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,04$) entre los grupos (gráfica 22), observando una mayor densidad ósea en el caso del grupo tratado con copolímero dopado con rhBMP-2.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

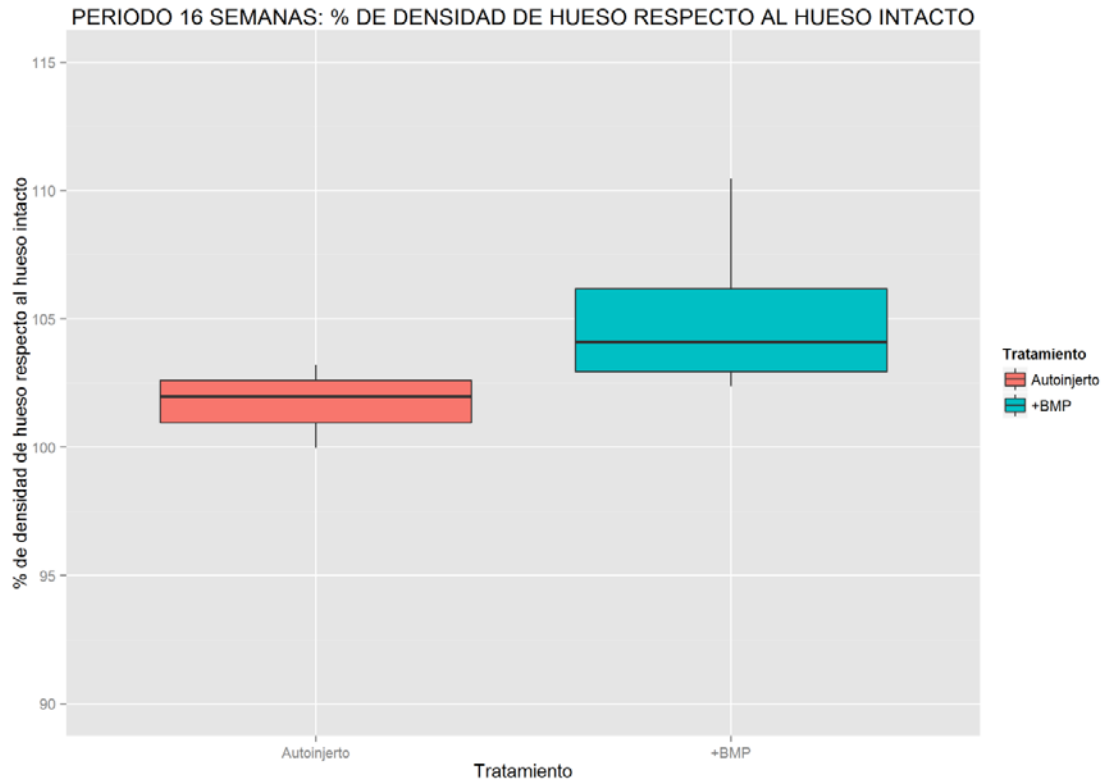
<i>Descriptivos</i>					<i>Test de Welch</i>
Variable	Tratamiento	N válida	Media recuperación %	DE	p-value
% PV	Auto (A)	5	121,22	10,89	0,72
	+BMP (B)	6	118,7	12,76	
% PD	Auto (A)	5	101,75	1,25	0,04
	+BMP (B)	6	105,08	3,06	

PV: % volumen de hueso formado respecto al hueso contralateral intacto. PD: porcentaje de densidad recuperada respecto al hueso contralateral intacto. N: número de casos. DE: desviación estándar. Auto(A) especímenes tratados mediante autoinjerto. +BMP(B): especímenes tratados con copolímero más rhBMP-2. -BMP (C): especímenes tratados con copolímero sin rhBMP-2

Tabla 15: Comparativa del estudio densitométrico a las 16 semanas.



Gráfica 21: Porcentaje de volumen de hueso regenerado respecto al intacto para los tratamientos autoinjerto y copolímero con rhBMP-2 a las 16 semana.



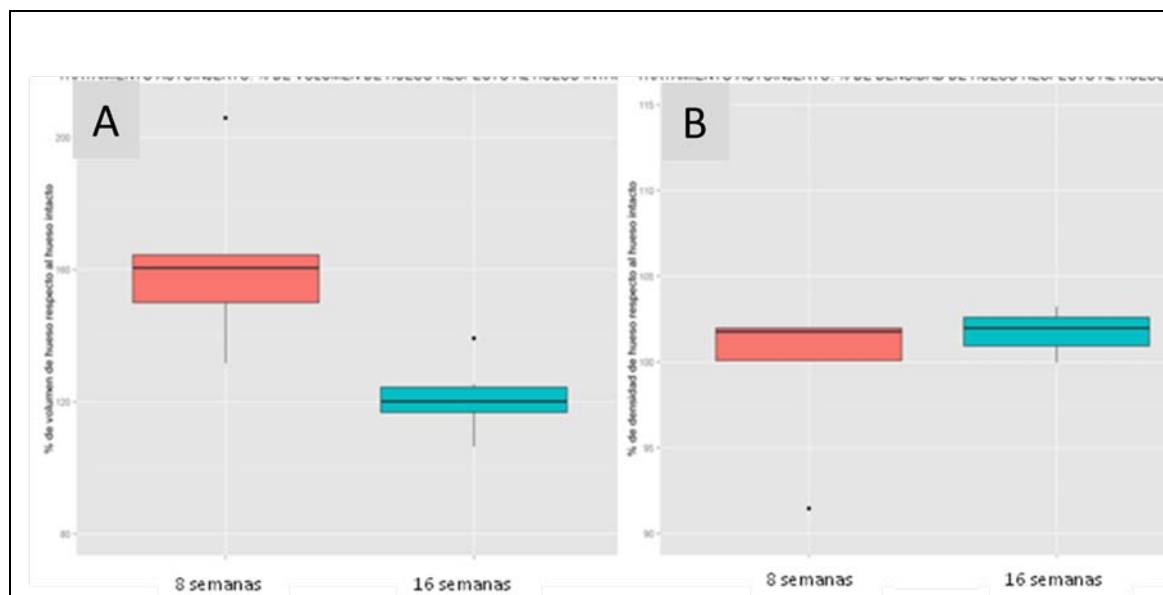
Gráfica 22: Porcentaje de densidad de hueso regenerado respecto al intacto para los tratamientos autoinjerto y copolimero con rhBMP-2 a las 16 semanas.

Si comparamos como varían los parámetros densitométricos (PV y PD) para cada uno de los tratamientos, entre las 8 y las 16 semanas (gráfica 23), observamos que en grupo donde se ha utilizado autoinjerto existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de volumen (tabla 16) entre los dos periodos estudiados. A las 8 semanas un volumen claramente superior al de un hueso sano (162%). A las 16 semanas se reduce hasta llegar al 121%. En cambio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3$), en el porcentaje de densidad ya que en ambos períodos los valores de densidad muy similares a los de un hueso sano.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

VARIABLE	<i>Descriptivos</i>						<i>Test Welch</i>
	8 semanas			16 semanas			
	N	Media	DE	N	Media	DE	<i>p-value</i>
%PV	5	162,53	27,39	6	121,22	10,89	0,007
%PD	6	99,46	4,55	6	101,75	1,25	0,33

Tabla 16: Valores medios del estudio densitométrico realizado a las 8 y 16 semanas en el grupo tratado con autoinjerto. %PV: porcentaje de volumen de hueso recuperado respecto al hueso contralateral intacto. %PD: porcentaje de densidad recuperada respecto al hueso contralateral intacto. N: número de casos. DE: desviación estándar.



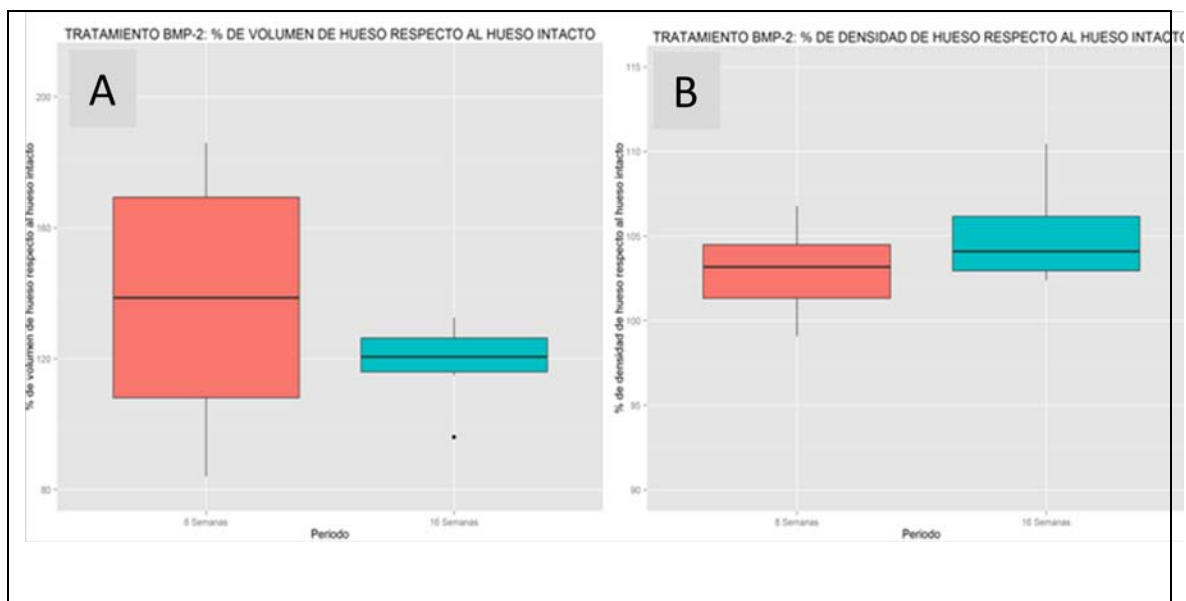
Gráfica 23: Resultados de los parámetros densitométricos para el grupo de tratamiento autoinjerto a las 8 y 16 semanas. a) %Volumen recuperado b) %Densidad recuperada.

En el grupo de animales tratado con copolímero con rhBMP-2, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros PV y PD entre los dos periodos estudiados (tabla 17 y gráfica 24). El volumen de hueso regenerado (PV) no ha alcanzado el volumen del hueso intacto en ninguno de los dos periodos analizados (tabla 17).

No ha sido posible realizar un análisis detallado de los valores de densidad ósea (PD) en los periodos de tiempo estudiados debido a la elevada dispersión detectada.

VARIABLE	<i>Descriptivos</i>						<i>Test Welch</i> <i>p-value</i>
	8 semanas			16 semanas			
	N	Media	DE	N	Media	DE	
%PV	6	80.55	29.92	6	85.05	18.16	0.7
%PD	6	109	44.9	6	79.09	23.21	0.2

Tabla 17: Valores medios del estudio densitométricos realizado a las 8 y 16 semanas en el grupo tratado con rhBMP-2. %PV: porcentaje de volumen de hueso regenerado respecto al hueso contralateral intacto. %PD: porcentaje de densidad recuperada respecto al hueso contralateral intacto. N: número de casos. DE: desviación estándar.



Gráfica 24: Resultados de los parámetros densitométricos para el copolímero con rhBMP-2 a las 8 y 16 semanas. a) %Volumen recuperado b) %Densidad recuperada.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

V. DISCUSIÓN

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

La utilización de injertos autólogos y aloinjertos para reparar los defectos óseos, se ha incrementado en las últimas décadas de forma exponencial (Giannoudis y col. 2005; Delloye 2007; Beckmann y col. 2015). No obstante, las complicaciones asociadas a la toma de injertos autólogos, cifradas entre el 6 y 20 %, así como los potenciales riesgos de carácter infeccioso e inmunológico relacionados con los aloinjertos, son un obstáculo para su aplicación práctica (Andrew 1998; Gil Albarova 2003; Giannoudis y col. 2005). Debido a estos inconvenientes y a los problemas relacionados con su disponibilidad, adquisición y elevado coste económico, en la actualidad existe un gran interés en la búsqueda de alternativas a los injertos óseos como “sustitutivos óseos”. En este sentido, los biomateriales sintéticos constituyen una opción que ofrece muy buenas expectativas.

La sustitución o reemplazamiento del tejido óseo ha sido objeto de investigación durante muchos años por su alto interés en el campo de la cirugía reconstructiva osteoarticular, dada la evidente necesidad de sustituir el tejido óseo en situaciones determinadas como consecuencia de traumatismos, infecciones, tumores, malformaciones y revisiones protésicas, que suponen graves problemas tanto para el paciente como para el cirujano (Calori y col. 2011; Beckmann y col. 2015; Emara 2015).

Los “sustitutos óseos” deben reunir tres requisitos esenciales: ser biocompatibles, osteoconductores y permitir la formación progresiva de hueso a través de un proceso de resorción lento “screeping substitution” (Zarate-Kalfopulos y Reyes-Sanchez 2006; Delloye 2007).

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

El biomaterial “ideal” debería ser el resultado de la combinación de materiales que contengan matrices osteoconductoras, células osteogénicas y/o agentes osteoinductivos con el fin de proporcionar los tres elementos fundamentales para la regeneración ósea: una matriz osteoconductora que proporcione el andamiaje adecuado para el crecimiento del tejido óseo en su interior; factores osteoinductores que aporten los componentes físicos y/o químicos capaces de inducir las diferentes fases del proceso de reparación ósea y por último células osteogénicas que se diferencien según los distintos estadios de la regeneración ósea. Todo ello supone que el desarrollo de un biomaterial de estas características sea una tarea interdisciplinar (Venugopal y col. 2008; Henson y Getgood 2011).

Siguiendo esta línea de trabajo, el grupo de investigación del IBV, en el marco del programa de investigación Europeo (NANOBIOCOM, NMP-3-CT-2005-516943), inició el desarrollo de un nuevo biomaterial constituido por: micro-hidroxiapatita (mHAp), ácido poli-L-láctico (PLLA) y nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT), dopado con o sin proteína morfogenética tipo 2 (rhBMP-2) (Primo-Capella 2009). Este copolímero combina por una parte materiales osteoconductores como la mHAp, los nanotubos de carbono (SWCNT) que confieren estabilidad estructural y estimula el crecimiento celular, una matriz polimérica con capacidad de degradación (PLLA) y la adsorción en algún grupo experimental de proteína morfogenética tipo 2 (rhBMP-2) que presenta capacidad osteoinductora.

Los materiales osteoconductores son capaces de proporcionar el andamiaje que facilita el crecimiento del tejido óseo en su interior. Uno de los principales factores que influyen en la osteoconducción es la porosidad del material: el tamaño de poro, el

volumen total de poros del material, es decir, la relación entre el volumen del poro y el volumen de la muestra, y finalmente la interconexión entre los poros (Xin 2008; Ikeda y col. 2009; Qi y col. 2009; Delabarde 2010; Sicchieri y col. 2012). El tamaño medio del diámetro del poro oscila entre 150 a 200 μm , teniendo en cuenta que cambios en dicho diámetro pueden modificar la actividad celular de esa zona (Charles-Harris Ferrer 2007; Baker y col. 2009; van der Zande y col. 2010; Roche Albero 2011). Como indica van der Zande (van der Zande y col. 2010), los andamios con tamaño medio de poro entre 120 y 190 micras presentan mayor adhesión celular y mejor capacidad de migración de las células hacia el centro del andamio. Conforme decrece el tamaño del poro (menor de 85 micras) disminuye la adhesión celular y la migración, pero esto no lleva consigo una disminución significativa de la proliferación celular.

El método de fabricación del biomaterial es otro factor crítico para conseguir unas características mecánicas y morfológicas determinadas, que permitan la regeneración del tejido óseo (Zhang 2004; Xin 2008; Ikeda y col. 2009; Delabarde 2010; Sicchieri y col. 2012).

La Ingeniería de Tejidos tiende a la creación de materiales compuestos, cuya asociación proporciona al andamio mayor integridad estructural, bioactividad y capacidad de degradación (Gross y Rodriguez-Lorenzo 2004; Liu y Ma 2004; Charles-Harris Ferrer 2007; Meyer 2009; Roche Albero 2011). Un ejemplo de esto lo encontramos al añadir un material cerámico inorgánico (HA, fosfato tricálcico, etc) a una matriz polimérica (PLLA, PLGA, etc), para evitar la toxicidad en los tejidos circundantes puesto que el compuesto inorgánico neutraliza la acidez generada por la degradación del polímero (Gross y Rodriguez-Lorenzo 2004; Charles-Harris Ferrer

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

2007). Además está demostrado que la asociación de ambos compuestos presenta mayor capacidad osteogénica que cualquiera de ellos por separado (Delabarde 2012; Kim y col. 2012; Liao y col. 2012; Sotoudeh y col. 2012; Wang y col. 2012; Wang y col. 2013; Jamshidi Adegani y col. 2014; Liao y col. 2014; Shim y col. 2014; Ferreira y col. 2015). No obstante, la débil unión entre ambos hace que estos compuestos sean propensos a la rotura. Con objeto de mejorar las propiedades mecánicas de este tipo de compuestos, se modifica el método de fabricación consiguiendo las características de tamaño de poro, cristalinidad y orientación de las fibras que les permite soportar mayor carga a la compresión (Delabarde 2010; Liu y col. 2013; Lyu y col. 2013).

Para mejorar la estabilidad del compuesto formado por HA y PLLA y favorecer la proliferación celular, en nuestro estudio asociamos al andamio los nanotubos de carbono (CNT). Se ha demostrado que el añadir a las matrices poliméricas los nanotubos de carbono, se consigue favorecer la proliferación celular de dos maneras: por una parte aumentando la porosidad del andamio (Venkatesan y col. 2012; Venkatesan y col. 2012) y por otra, modulando la actividad de los osteoblastos gracias a las propiedades de conductividad eléctricas de los CNT (Lavine 1987; Spitalsky 2010) (Lavine 1987; Spitalsky 2010). Otra ventaja es mejorar las propiedades biológica del compuesto por la disminución de la toxicidad de los CNT (Meyer 2009; Venkatesan y col. 2012; Venkatesan y col. 2012).

La adición de proteína morfogenética (rhBMP-2; rhBMP-7) o cualquier otro factor de crecimiento (GDF-5, VEGF, TGF- β 3) (Liang y col. 2010; Lock y Liu 2011; Hernandez y col. 2012; Jung y col. 2012; Schofer y col. 2012; Shao y col. 2012; Lee y col. 2013; Reyes y col. 2014; Ronca y col. 2014; Shim y col. 2014; Yu y col. 2014;

Quinlan y col. 2015). mejoran la adhesión y proliferación de las células mesenquimáticas (Osyczka y col. 2004; Patel y col. 2008; Haidar y col. 2009; Fu y col. 2010).

La actividad de las rhBMP y otros factores de crecimiento en la zona de defecto crítico, dependen de la dosis utilizada y de la capacidad del andamio de liberarlos de forma controlada mientras acontecen los fenómenos de consolidación (Chen y col. 2013; Shim y col. 2014; Quinlan y col. 2015). Otros autores como van der Zande (van der Zande y col. 2010) no considera que añadir rhBMP-2 a su compuesto, aporte efecto significativo sobre la diferenciación celular y por el contrario hace referencia a efectos indeseables por expresión de genes tumorales a los que puede dar lugar. Por este motivo, a pesar de que el uso de la rhBMP-2 esté probado desde hace años (Khan y Lane 2004), su utilización sigue siendo controvertida (Duan 2008; Valdes y col. 2009; Chou y col. 2011; Liu y col. 2013; Wink y col. 2014).

La combinación de la micro-hidroxiapatita, la matriz de ácido poli-L-láctico y los nanotubos de carbono de pared simple proporcionan al copolímero que hemos utilizado las características necesarias para que, mientras ocurre la regeneración ósea, el andamio se degrade paulatinamente. Es por estos motivos por los cuales lo consideramos como un material novedoso, con alta capacidad de formación de hueso, que puede ser utilizado como alternativa al autoinjerto, en aquellos casos de defectos óseos de tamaño crítico.

En el proyecto inicial, nuestro trabajo se diseñó para conocer la evolución en el tiempo (8 y 16 semanas) de la efectividad de tres tipos de tratamientos para reparar un defecto de tamaño crítico en radio de conejo. No obstante, debido a un problema en el

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

proceso de fabricación del biomaterial, impidió el suministro del copolímero sin rhBMP-2 en una fecha muy próxima al inicio de la fase de experimentación. Ante la imposibilidad de disponer del biomaterial y la imposibilidad de retrasar la fase de experimentación, realizamos una modificación del diseño experimental prescindiendo, en el periodo de 16 semanas, del grupo de tratamiento en el que se utilizaba copolímero sin rhBMP-2. Nuestra decisión se fundamentaba en que el copolímero dopado con rhBMP-2 podría ofrecer mejores resultados.

1. Morfología del callo a partir de imágenes de TAC

La valoración de la consolidación la realizamos, en un primer momento, a partir de las imágenes tridimensionales del TAC, que nos permiten realizar un estudio morfológico del callo regenerado con cada uno de los tratamientos en cada uno de los periodos de estudio (8 y 16 semanas). De este modo, hemos apreciado que a las 8 semanas, los defectos óseos tratados con autoinjerto consiguen la consolidación completa (figura 42). En este mismo periodo, en las piezas tratadas con los copolímeros con y sin rhBMP-2, la consolidación del defecto óseo no es completa (figuras 43 y 44), como tampoco lo es, en las piezas tratadas con copolímero dopado con rhBMP-2 a las 16 semanas (figura 45). En ambas fases del estudio (8 y 16 semanas) las piezas presentan un comportamiento similar, con zonas de hipertrofia ósea rodeando al andamio que aún no se ha reabsorbido. No obstante, en las piezas tratadas con copolímero dopado con rhBMP-2 se puede considerar prácticamente consolidado aunque el andamio persiste aún en la zona. Coincidimos con los autores

consultados (Burdick 2009; Yanoso-Scholl y col. 2010; Ciapetti y col. 2012; Liao y col. 2012), en que la lenta degradación del andamio permite que el copolímero actúe de soporte estructural mientras el hueso continua regenerándose.

Nuestros datos también coinciden con el estudio realizado por Oest y colaboradores (Oest y col. 2007) que utilizan un compuesto formado por una matriz polimérica a la que se le añade rhBMP-2 y factor de crecimiento $\beta 3$. Dicho compuesto se aplica en la reparación de defectos de tamaño crítico en fémur de rata. El estudio del proceso de consolidación fue valorado a las 16 semanas, y observan que la formación de hueso se produce alrededor de la periferia del andamio.

Jiang y colaboradores (Jiang y col. 2010) hace un estudio comparativo del proceso de consolidación de un defecto de tamaño crítico (15 mm) en cúbito de conejo, utilizando diferentes tipos de andamios compuestos por ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA); ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) con quitosano; heparina, quitosano, ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) con y sin rhBMP-2, realizando el seguimiento a las 6 y 12 semanas con micro-TAC. La mineralización del hueso se produce ,en todos los casos, en los extremos del andamio y en la superficie adyacente al radio. Esto se debe a que los extremos del andamio están en contacto con las células estromáticas de la médula ósea, y el lado del andamio adyacente al radio está también en contacto con el periostio que contiene células osteoprogenitoras. Los mejores resultados se obtienen con los andamios constituidos por heparina, quitosano, ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) con y sin rhBMP-2. En ellos, además de las zonas de consolidación comentadas anteriormente, también presentan áreas de mineralización dentro del andamio. Esto quizás se deba a que las heparinas podrían promover la

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

diferenciación de las células osteoblásticas y ser potenciales portadores de factores de crecimiento (Jiao y col. 2007).

Harada y colaboradores (Harada y col. 2014) utilizan andamios de PLGA sobre los que siembran células madre mesenquimáticas prediferenciadas *in vitro* en condrocitos, para tratar defectos de distinto tamaño (5 mm y 15 mm) en fémures de ratas. Los resultados que observan con micro-TAC a las 4, 8 y 16 semanas, fueron idénticos entre ambos grupos, a pesar de la diferencia de envergadura de defecto que existía entre ellos. Tanto el defecto de 5 mm como el de 15 mm a las 4 semanas presentaban puentes óseos; a las 8 semanas se observaba consolidación con un andamio prácticamente reabsorbido y, finalmente, a las 16 semanas se observaba hueso cortical externo y hueso trabecular en su interior. El andamio utilizado en este trabajo contenía células mesenquimáticas que aportan capacidad osteogénica al imitar la osificación endocondral que ocurre en el desarrollo embrionario del hueso. Cabe la posibilidad que los resultados de consolidación conseguidos por dichos autores son mejores a los obtenidos con el copolímero utilizado en nuestro trabajo, gracias a la presencia de las células mesenquimáticas. No obstante, nuestro copolímero que no las contiene, a las 8 semanas y sin rhBMP-2, por sí sólo, consigue formación de hueso, aunque la reabsorción del andamio no haya finalizado todavía.

Existe controversia en la literatura acerca de la utilización de las rhBMP-2 en los compuestos utilizados para la reparación de defectos óseos de tamaño crítico. De este modo, van der Zande y colaboradores (van der Zande y col. 2010) no consideran que añadir rhBMP-2 a su compuesto (HA+PLLA+SWCNT), aporten efectos significativos sobre la diferenciación celular, aunque indican que se acentúan los efectos indeseables

debidos a la expresión de genes tumorales que se puede producir al añadirla. En cambio, Ciapetti y colaboradores (Ciapetti y col. 2012) que han utilizado el mismo copolímero que el empleado en esta Tesis indican que en la promoción de la mineralización ósea consiguen mejores resultados al añadir rhBMP-2.

Nuestros resultados coinciden con lo expuesto por van der Zande y colaboradores (van der Zande y col. 2010), ya que los resultados observados en el estudio de TAC, nos permite asumir que el copolímero utilizado por sí solo es capaz de permitir la regeneración de defectos óseos de tamaño crítico sin necesidad de un aporte adicional de rhBMP-2.

2. Ensayos mecánicos

El comportamiento biomecánico del hueso resulta extremadamente complejo debido a su carácter heterogéneo, anisotrópo y viscoelástico (Guede 2013).

Los trabajos experimentales realizados sobre regeneración ósea, utilizan distintos métodos de valoración como mediciones radiográficas, histomorfometría, densitometría, medición de marcadores analíticos, ensayos mecánicos y recientemente la microtomografía computerizada (micro-TAC). De todos los métodos, los ensayos mecánicos son probablemente el mejor medio para valorar la resistencia mecánica del tejido regenerado, ya que proporcionan información objetiva y cuantitativa sobre la evolución del proceso de consolidación en los defectos óseos.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

La resistencia del nuevo tejido depende de dos variables: la cantidad (masa ósea) y la calidad ósea (arquitectura tridimensional, mineralización y composición de la matriz).

Nosotros hemos realizado dos tipos de ensayos mecánicos:

- No destructivo de **flexión a 4 puntos**, utilizado en diversos estudios para evaluar las características de rigidez de huesos largos (Foux y col. 1990; Foux y col. 1993; Uhthoff 1993; Claes 1995; Chehade y col. 1997; Foux y col. 1997; Bramer y col. 1998; Jazrawi y col. 2000; Blokhuis y col. 2001; Park y col. 2012; Guede 2013).
- Destructivo: de torsión. Este tipo de ensayo es un método estandarizado y empleado por diversos autores (White 1977; Markel y col. 1990; Goodship 1996; Luppen y col. 2002; Einhorn 2003; Klein y col. 2003; Oest y col. 2007; Guede 2013) para calcular los parámetros de **resistencia, rigidez y tenacidad**.

2.1 Ensayos de flexión a 4 puntos

Los parámetros que mejor pueden expresar el comportamiento de rigidez del hueso regenerado mediante los ensayos a flexión, son la gráficas de Perfil polar de rigidez a flexión (PPRF). A partir de estas, podemos calcular otros parámetros indirectos que también nos permiten valorar la rigidez del hueso regenerado: índice de rigidez (SI), índice de áreas (AR) e índice de planitud (FR). De todos ellos el que proporciona más información es el índice de rigidez (SI) que representa la dirección del plano de carga

donde se produce una mayor diferencia entre la rigidez del hueso sano y la del hueso osteotomizado.

La morfología de las elipses obtenidas de PPRF en nuestro estudio, son diferentes entre los tres tratamientos y también con respecto a la elipse el hueso sano.

El hueso tratado con **autoinjerto** presenta, a las 8 semanas (gráfica 1), una elipse con morfología circunferencial, lo que nos indica que existe una rigidez semejante en todos los planos analizados. Esta morfología circunferencial puede estar relacionada con la formación de un callo simétrico de hueso inmaduro o fibrilar, donde la orientación irregular de las trabéculas hace que el hueso tenga las mismas características mecánicas en cualquier dirección (Delgado Martínez 2015). Al compararla con la del hueso sano, además de la diferencia morfológica entre las gráficas (hueso sano con forma elíptica), encontramos que el hueso tratado con autoinjerto presenta menor rigidez, en determinados planos, y pensamos que esto se debe a que el callo formado aún no ha completado totalmente el proceso de consolidación en aquellos planos en los que presenta bajos valores de rigidez con respecto al hueso sano.

En cambio a las 16 semanas (gráfica 4), este grupo, ha completado el proceso de consolidación también desde un punto de vista biomecánico a flexión, presentando una elipse superponible al hueso sano, no encontrando diferencias entre ambas gráficas.

Los grupos tratados con **copolímero con** (gráfica 2) **y sin rhBMP-2** (gráfica 3), presentan, a las 8 semanas, unas gráficas de morfología elíptica similar a la del hueso sano, pero con menor rigidez, en todos los planos en el caso del copolímero con rhBMP-2 y sólo en algunos, en el caso del copolímero sin rhBMP.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

A las 16 semanas la gráfica del **copolímero dopado con rhBMP-2** (gráfica 4) se aproxima más a la del hueso sano, aunque continúa mostrando una menor rigidez en casi todos los planos, pero es evidente la mejoría respecto a la gráfica inicial de las 8 semanas (gráfica 2). La gran dispersión de datos que presenta este grupo, hace que los valores de rigidez que tenemos sean menores, debido al efecto individuo-dependiente que tienen las rhBMPs (Liu y col. 2013; Wink y col. 2014).

Vemos, por tanto, que la tendencia de las elipses con el paso del tiempo, con independencia del tratamiento utilizado, es acercarse a la del hueso sano.

De la comparación de las gráficas de PPRF, podemos afirmar que el copolímero utilizado consigue a las 8 semanas unas características biomecánicas en flexión, similares a las del hueso sano, con una menor rigidez sólo en algunos planos. Por este motivo creemos que en estas fases tempranas, se puede considerar como un material prometedor para el tratamiento de defectos de tamaño crítico aunque siguen existiendo diferencias con respecto al comportamiento del autoinjerto que consigue presentar a las 16 semanas una distribución de rigidez idéntica a la del hueso intacto.

Al valorar el índice de área (AR) y el índice de planitud (FR) en nuestros grupos experimentales a las 8 y 16 semanas, no encontramos diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 7). En cambio, a las 8 semanas sí es posible encontrar diferencias estadísticamente significativas en el índice de rigidez (SI) entre los grupos autoinjerto (76,9%) /copolímero con rhBMP-2 (51,2%) y entre los grupos copolímero con rhBMP-2 (51,2%) /sin rhBMP-2 (80,7%) (Tabla 7). Estas diferencias se mantienen a

las 16 semanas entre los grupo autoinjerto (92%) /copolímero con rhBMP-2(60%) (Tabla 8).

En el trabajo de Hernández-Flores y colaboradores (Hernandez Flores 2011) se compara mediante un ensayo destructivo a flexión a 3 puntos, el comportamiento biomecánico de un defecto de tamaño no crítico en tibia de ratas, en el momento diferentes (después de la cirugía y a las 3 semanas de evolución de la lesión). Estos autores encuentran diferencias significativas en el AR entre los dos grupos pero en cambio el SI de los dos grupos es similar. Pensamos que esto se debe que los defectos estudiados son muy pequeños (de tamaño no crítico). No obstante la diferencia que existe en el AR entre el defecto recién formado y a las 3 semanas de evolución, indica que conforme pasa el tiempo y el hueso se regenera, aumenta la energía máxima que puede absorber

Park y colaboradores (Park y col. 2012) realizan a las 8 semanas estudios biomecánicos de flexión a 4 puntos en el hueso regenerado, tras tratar un defecto de tamaño crítico en tibia de rata (10 mm) con el andamio constituido por PLGA y células del estroma del tejido adiposo. El resultado que observan es que el hueso regenerado presenta un módulo de elasticidad 4-6 veces menor al calculado para el hueso intacto, es decir que el hueso regenerado tiene el 21,7% de rigidez respecto al sano.

En cambio en nuestro trabajo, a las 8 semanas, hemos conseguimos, el 80% de rigidez respecto al hueso sano con el copolímero sin rhBMP-2 y el 50% con el copolímero con rhBMP-2 (tabla 7). Estos resultados nos permiten decir que la rhBMP-2 (con capacidad osteoinductora) no mejora las características de flexión del hueso

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

regenerado. Pensamos que la estructura del andamio empleado en nuestro copolímero ha sido fundamental para proporcionar estabilidad a la zona mientras se permite el crecimiento de las células osteogénicas a su través, lo que justifica haber obtenido valores de rigidez más elevados que el resto de los autores. Por tanto, podemos considerar a nuestro copolímero sin rhBMP-2, como una opción adecuada para tratar defectos óseos de gran tamaño en zonas sometidas a carga, incluso mejor que los biomateriales propuestos por otros autores.

2.2 Ensayos de torsión

Nuestros resultados de los ensayos de **torsión** a las 8 semanas, muestran diferencias estadísticamente significativas en la variable par torsor máximo recuperado (PTR) al comparar los grupos **autoinjerto** (109,4%) **y copolímero con rhBMP-2** (80,54%) **y sin rhBMP-2** (71,01%) (tabla 10). Que el PTR del grupo autoinjerto sea mayor que el obtenido para los otros dos tratamientos significa, que la regeneración ósea conseguida con el autoinjerto, presenta mayor resistencia a la rotura que los otros dos grupos. En cambio, no encontramos diferencias en el PTR entre los grupos tratados con copolímero con y sin rhBMP-2, lo que nos hace pensar que las rhBMP-2 no influyen en las propiedades mecánicas del hueso.

Oest y colaboradores (Oest y col. 2007) tampoco encuentran diferencias significativas en los ensayos biomecánicos a torsión, para los valores de par torsor máximo (PTR) entre los distintos tratamientos utilizados (andamio con matriz polimérica/matriz polimérica, rhBMP-2 y TGF- β 3) para tratar en defectos de tamaño crítico en fémur de rata.

En el trabajo realizado por Yu y colaboradores (Yu y col. 2008) utilizan los ensayos destructivos a flexión a 3 puntos, para valorar las características biomecánicas del hueso regenerado, en el defectos de tamaño crítico (22 mm x 11mm de diámetro) de cráneo de cabras. Dichos defectos habían sido tratados con dos compuestos diferentes (andamio con PLGA /andamio de PLGA, fosfato tricálcico (TCP) y rhBMP-2). Estos autores observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos al valorar el PTR, presentando el grupo tratado con PLGA el 82,8% respecto al hueso sano, y el grupo tratado con el copolímero formado por PLGA, fosfato tricálcico (TCP) y rhBMP-2 el 53,6%. Estos valores son similares a los obtenidos en nuestro estudio.

El hecho de que la adición de rhBMP-2 al andamio pueda dar lugar a procesos de reparación de defectos óseos de tamaño crítico diferentes, según observamos en las distintas líneas de investigación (Oest y col. 2007; Yu y col. 2008), puede explicarse por el efecto individuo-dependiente, dosis dependiente y el modo de liberación de estas sustancias por parte del andamio que tienen las proteínas morfogenéticas (Liu y col. 2013; Wink y col. 2014), pero parece no tener influencia en las propiedades biomecánicas del hueso.

Jiang y colaboradores (Jiang y col. 2010), compararon los resultados biomécanicos de ensayos destructivos a compresión del hueso regenerado tras aplicar diferentes tratamientos en defectos de tamaño crítico (15 mm) en el cúbito de conejos. El comportamiento biomecánico que presentó el andamio formado solamente por PLGA fue constante durante todo el estudio (12 semanas), en cambio el resto de andamios empleados (quitosano+PLGA/ quitosano, PLGA, heparina y quitosano, PLGA, Heparina,

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

rhBMP-2) presentaron una disminución progresiva de sus características biomecánicas. Los buenos resultados biomecánicos conseguidos con el andamio de PLGA, pueden deberse al soporte estructural que proporcionan, permitiendo el transporte de nutrientes y la realización de las funciones habituales de las células dentro del andamio. A pesar de que el andamio utilizado en nuestro estudio no es idéntico al de estos autores, creemos, igual que ellos, que la estructura del copolímero desempeña una función crucial en el soporte estructural del nuevo hueso regenerado.

Alfotewei y colaboradores (Alfotawei 2014) valoraron a las 12 semanas mediante ensayos destructivos de flexión a 3 puntos, las propiedades biomecánicas del hueso regenerado tras haber generado defectos de tamaño crítico (20 mm) en mandíbula de conejos. Dichos defectos fueron tratados con andamios compuestos de fosfato tricálcico (b-TCP) y células madre mesenquimales. El par tursor máximo recuperado (PTR) fue del 14,7%, el cual es claramente inferior al del lado contralateral sano de esa mandíbula. En este caso, añadir células madre al andamio biodegradable de b-TCP no mejora, las propiedades biomecánico, del hueso regenerado. Si comparamos nuestros resultados con los de estos autores, encontramos que nuestro copolímero con y sin rhBPMP-2 presenta en fases tempranas (8 semanas), mejores resultados en el PTR. Creemos esto es debido a la estructura tridimensional que proporciona nuestro copolímero, que permite el crecimiento óseo estructurado.

Con relacion al otro parámetro estudiadola tenacidad recuperada (TR), en nuestro estudio, a las 8 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los resultados entre los grupos de estudio. Estos datos indican que la capacidad de

absorber energía es muy similar en el hueso regenerado con los tres tratamientos utilizados, aunque el grupo de autoinjerto y copolímero dopado con rhBMP-2 presentan valores ligeramente superiores al hueso sano (110,7% y 109% respectivamente). No obstante el grupo de copolímero sin rhBMP-2 presenta valores aceptables, aunque menores (78,1%) (tabla 10). En cualquier caso, no se han detectado diferencias estadísticamente significativas, a pesar de la disparidad de los datos. Pensamos que ello es debido, posiblemente, a la elevada dispersión que se observa entre los mismos.

Hernández-Flores y colaboradores (Hernández-Flores, Delgado y col. 2011) tampoco encontraron diferencias en la TR entre los dos grupos de estudio: defecto inmediato (46,8%) y el defecto con 3 semanas de evolución (43,9%). A pesar de que los defectos valorados por estos autores eran de tamaño no crítico (1 mm), nosotros conseguimos, a las 8 semanas, una tenacidad recuperada (TR) superior, tanto con el copolímero sin rhBMP-2 (78,1%) como con el copolímero con rhBMP-2 (109%). Esto indica que aplicar en la zona del defecto, andamios con las características apropiadas, favorece a la regeneración ósea, aún siendo defectos de gran tamaño.

Otra variable que hemos analizado partiendo de los ensayos a torsión es **la rigidez recuperada (RR)**. En nuestros resultados a las 8 semanas encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos **autoinjerto y copolímero con y sin rhBMP-2** (tabla 10). A pesar de existir diferencias entre la RR del grupo de autoinjerto y la del grupo copolímero sin rhBMP-2, los valores que obtenemos con ambos tratamientos están muy próximos a los del hueso sano (127% en el grupo **autoinjerto** y 100% en el **copolímero sin rhBMP-2**). En cambio, a pesar de que el diagrama de cajas y

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

arbotantes (gráfica 16) parece mostrar diferencias entre el grupo copolímero con y sin rhBMP-2, estas no son estadísticamente significativas, y quizás se deba, a la elevada dispersión de los datos que presenta el grupo copolímero dopado con rhBMP-2.

Oest y colaboradores (Oest y col. 2007) tampoco encontraron diferencias significativas para los valores de rigidez recuperada (RR), entre los tratamientos con andamio de matriz polimérica y los andamios compuestos por la matriz polimérica y factores de crecimiento (rhBMP-2 y TGF- β 3). Los resultados de estos autores no podemos compararlos con los nuestros, ya que ellos no aportan el valor de rigidez del hueso sano que nos permitiría calcular los porcentajes de rigidez recuperada.

Duan y colaboradores (Duan 2008) compararon la rigidez recuperada (RR) en ensayos de flexión a tres puntos, a las 12 semanas, tras utilizar diferentes tratamientos en defectos de tamaño crítico (15 mm) en fémur de conejo. Los resultados que obtuvieron con un andamio constituido por PLGA asociado a un derivado rhBMP-2 (oligopéptido P24) fue del 87,42% , mientras con el andamio sólo constituido por PLGA del 26,89%.

De los resultados de los trabajos de Oest y Duan, podemos apreciar los diferentes comportamientos que presentan los andamios que asocian rhBMP-2. Mientras que en el estudio de Oest no encuentran mejoría al añadir rhBMP-2 al andamio, en el trabajo de Duan ocurre al contrario, consiguen mejorar la RR del hueso regenerado. (Oest y col. 2007; Duan 2008)

En nuestro estudio, al valorar las variables de torsión a las 8 semanas, sólo el grupo tratado con autoinjerto es el que consigue valores similares al hueso sano en los tres parámetros: PTR, TR y RR (tabla 10). Esto indica que el patrón oro para la regeneración

de los defectos óseos sigue siendo el autoinjerto. No obstante en la práctica clínica nos encontramos con defectos de gran tamaño que no son fácilmente tratables de esta forma. Esto hace que tengamos que buscar alternativas con los biomateriales para regenerar hueso equiparable al sano. Por ello es importante tener en cuenta la influencia que tiene el copolímero en las propiedades del hueso regenerado, aunque hemos apreciado un efecto diferente en cada uno de los grupos. Así en el hueso tratado con copolímero dopado en rhBMP-2 sólo es comparable la tenacidad o capacidad de absorber energía, mientras que en el grupo tratado con copolímero sin rhBMP-2 lo es para la rigidez recuperada.

En cambio, a las 16 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las variables de torsión: PTR, TR y RR entre los grupos autoinjerto y copolímero con rhBMP-2 (tabla 11). Además, el copolímero dopado con rhBMP-2, tiene valores similares al hueso sano en todas las variables, excepto en la tenacidad que consigue el 79% respecto al hueso sano.

3. TAC y densitometría

De las imágenes tridimensionales que obtenemos del TAC y su procesamiento posterior, analizamos la zona del callo regenerado en su totalidad y calculamos el volumen y la densidad para cada uno de los tratamientos y los periodos de tiempo estudiados.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

En nuestro estudio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el PV entre los diferentes tratamientos utilizados para la regeneración del defecto (tabla 16) ni entre los periodos de tiempo estudiados.

A las 8 semanas, el volumen del callo regenerado (PV) con los tres tratamientos es superior al del hueso sano (tabla 14). Posiblemente este hecho se debe a la hipertrofia del callo durante la fase de regeneración, que conlleva a un aumento del volumen en esa zona (figura 44).

Los resultados densitométricos que obtiene Oest y colaboradores (Oest y col. 2007) a las 4 y 16 semanas, indican un aumento significativo en el volumen óseo para los huesos tratados con el andamio formado por matriz polimérica, rhBMP-2 y factor de crecimiento β (TGF- β 3). Además esos valores, aumentan de forma significativa con el paso del tiempo (a las 16 semanas). Estos autores también indican como la adición de factores de crecimiento al andamio, se traduce en un aumento en el volumen óseo, en comparación a los andamios que no los llevan. Quizás los buenos resultados conseguidos con el andamio (matriz polimérica, proteína morfogenética tipo 2 y factor de crecimiento β) se deban al efecto sinérgico de las rhBMP -2 con el factor de crecimiento (TGF- β 3). Nos encontramos con la dificultad de comparar nuestros resultados con los obtenidos por Oest debido a que estos no proporcionan el valor de volumen óseo del hueso intacto, que nos permita determinar el porcentaje de volumen (PV) (Oest y col. 2007).

Jiang y colaboradores (Jiang y col. 2010), las 6 y 12 semanas, tampoco encuentran diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de volumen recuperado respecto al lado sano (PV), entre los distintos tratamientos utilizados (PLGA /

quitosano y PLGA / Heparina, quitosano, PLGA / Heparina, quitosano, PLGA, rhBMP-2) para la reparación de defecto críticos (15 mm) en el cúbito de conejo.

Cao y Kuboyama (Cao 2010), a los 14 días, tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros densitométricos entre los diferentes tratamientos utilizados (hidroxiapatita (HA) / PGA+fosfato tricálcico β (-TCP) en proporción 1:1 / PGA+ β -TCP en proporción 1:3) para tratar defectos de tamaño crítico (3 mm) en cóndilo femoral de rata. Los valores del PV fueron inferiores al 20% respecto al lado sano en todos los tratamientos valorados. En cambio, a los 90 días, observaron como el PV era mayor en los huesos tratados con PGA y fosfato tricálcico β (-TCP) en proporción 1:3, siendo el porcentaje de volumen formado del 98% respecto al hueso sano. Al compararlo con nuestros resultados podemos destacar como nosotros con menos tiempo de evolución (8 semanas) conseguimos mejores resultados del PV tanto con el copolímero dopado con rhBMP-2 (137,4%) como sin dopar (131,2%).

Park y colaboradores (Park y col. 2012) a las 8 semanas, analizaron los resultados densitométricos del andamio formado por PLGA y células del estroma del tejido adiposo . Estos obtuvieron resultados del PV significativamente mayores al del hueso sano, con un valor de 340%. Aunque los resultados obtenidos en nuestro trabajo son muy buenos en relación al PV para el copolímero con y sin rhBMP-2 (137,4% y 131,2% respectivamente) los resultados de estos autores fueron superiores a los nuestros . Quizás la razón de conseguir unos valores de PV tan elevados y superiores al hueso sano, se deba a la capacidad osteogénica de las células del estroma del tejido adiposo utilizado en los andamios por estos autores.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

De los resultados publicados por Park y colaboradores (Park y col. 2012), es destacable como a pesar de que el PV del andamio fue 3,4 veces superior al del hueso sano, sus propiedades biomecánicas, en cambio, fueron inferiores a este. Pensamos que esto pudiera ser debido al tipo de hueso formado por el andamio, de tipo trabecular, y por tanto en comparación con el hueso cortical sano, con una evidente menor rigidez (Caeiro 2013).

En nuestros resultados del parámetro densidad recuperada (PD) a las 8 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos autoinjerto y los tratados con copolímero (con y sin rhBMP.2) (tabla 14).

En cambio, a las 16 semanas, encontramos diferencias estadísticamente significativas en el PD entre los tratamiento autoinjerto y copolímero con rhBMP-2, siendo mayor la densidad ósea en los huesos tratados con copolímero dopado con rhBMP-2 (tabla 15). Esto puede deberse a que el hueso formado con el estímulo de las proteínas morfogenéticas presenta mayor depósito de calcio y por esto se mejora las características de densidad del hueso regenerado (Wink y col. 2014).

Los resultados obtenidos por Cao y Kuboyama (Cao 2010) encuentran diferencias estadísticamente significativas, a las 14 y 90 días, entre los diferentes tratamientos utilizados, presentando siempre la mayor densidad, el grupo tratado con PGA asociado a fosfato tricálcico (β -TCP) en proporción 1:3 y los peores resultados en el grupo tratado con andamio de HA. En cambio, en nuestro estudio, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, en los periodo de 8 y 16 semanas (tabla 16).

Si bien el autoinjerto debe seguir considerandose desde una perspectiva mecánica y densitométrica como la mejor opción en el tratamiento de defectos óseos de tamaño crítico, un biomaterial como el analizado en la presente Tesis Doctoral constituye una adecuada alternativa terapéutica.

Pensamos que sería interesante profundizar en el estudio para valorar el copolímero sin rhBMP-2 a las 16 semanas. De esta forma podríamos determinar el comportamiento de éste en fases más avanzadas de la consolidación y valorar si los resultados del callo regenerado, son tan prometedores como los conseguidos a las 8 semanas.

Por otra parte, puesto que añadir a nuestro copolímero las rhBMP-2 no ha proporcionado una clara ventaja al andamio respecto a no llevarlo, también se podría valorar realizar el estudio del efecto que tendría sobre la consolidación, el asociar al copolímero las células madre derivadas del tejido adiposo. De esta forma le aportaría la capacidad osteogénica a un andamio, que se ha demostrado que proporciona una buena estructura de soporte sobre la que puede regenerarse hueso.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

VI. CONCLUSIONES

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- 1.** Las propiedades biomecánicas del hueso regenerado a partir del copolímero dopado como sin dopar con rhBMP-2, son comparables a las del hueso sano contralateral.

- 2.** Las características densitométricas del hueso regenerado por el copolímero, tanto dopado como sin dopar con rhBMP-2, son semejantes en el estadio precoz del estudio, al hueso sano contralateral.

- 3.** El copolímero “per se” regenera hueso siendo capaz de reparar defectos óseos de tamaño crítico.

- 4.** El autoinjerto sigue considerándose mecánica y densitométricamente como la mejor opción de tratamiento en defectos óseos de tamaño crítico. No obstante, nuestro biomaterial analizado constituye una adecuada alternativa terapéutica

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Aaron, R. K.; Boyan, B. D.; Ciombor, D. M.; Schwartz, Z.; Simon, B. J. (2004). "Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields." Clin Orthop Relat Res(419): 30-37.
- Abarrategi, A.; Moreno-Vicente, C.; Ramos, V.; Aranaz, I.; Sanz Casado, J. V.; Lopez-Lacomba, J. L. (2008). "Improvement of porous beta-TCP scaffolds with rhBMP-2 chitosan carrier film for bone tissue application." Tissue Eng Part A **14**(8): 1305-1319.
- Aboulaflia, A; Ramos Pascua, L. R. (2014). "Monografía AAOS-SECOT. Tumores Malignos." Revista española de cirugía ortopédica y traumatología **1**.
- Alcantara Martos, T; Aznar Zafra, S; Gutierrez Romero, M; Delgado Martinez, A D (2010). "Transporte oseo en defecto óseo femoral. A propósito de un caso." Trauma Fund MAPFRE **21**(1): 28-32.
- Alfotawei, R.; Naudi, K. B.; Lappin, D.; Barbenel, J.; Di Silvio, L.; Hunter, K.; McMahon, J.; Ayoub, A. (2014). "The use of TriCalcium Phosphate (TCP) and stem cells for the regeneration of osteoperiosteal critical-size mandibular bony defects, an in vitro and preclinical study." J Craniomaxillofac Surg **42**(6): 863-869.
- Andrew, H.; Crenshaw, J. (1998). Técnicas y vías de abordaje quirúrgicas.
- Aro, H. T., Wippermann, B. W., Hodgson, S. F. y Chao, E. Y. (1990). "Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing." J Orthop Res **8**(2): 238-246.
- Aro, H. T., Wippermann, B. W., Hodgson, S. F. , y col. (1989). "Prediction of properties of fracture callus by measurement of mineral density using micro-bone densitometry." J Bone Joint Surg Am **71**(7): 1020-1030.
- Augat, P.; Merk, J.; Genant, H. K.; Claes, L. (1997). "Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography." Calcif Tissue Int **60**(2): 194-199.
- Baker, K. C., Bellair, R., Manitiu, M., Herkowitz, H. N. y Kannan, R. M. (2009). "Structure and mechanical properties of supercritical carbon dioxide processed porous resorbable polymer constructs." J Mech Behav Biomed Mater **2**(6): 620-626.
- Barrack, R. L. (2005). "Bone graft extenders, substitutes, and osteogenic proteins." J Arthroplasty **20**(4 Suppl 2): 94-97.
- Barrere, F., Lebugle, A., Van Blitterswijk, C. A. , y col. (2003). "Calcium phosphate interactions with titanium oxide and alumina substrates: an XPS study." J Mater Sci Mater Med **14**(5): 419-425.
- Barrere, F., van der Valk, C. M., Dalmeijer, R. A. , y col. (2003). "Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants." J Biomed Mater Res A **66**(4): 779-788.
- Beckmann, N. A., Mueller, S., Gondan, M. , y col. (2015). "Treatment of severe bone defects during revision total knee arthroplasty with structural allografts and porous metal cones-a systematic review." J Arthroplasty **30**(2): 249-253.
- Bhandari, M., Fong, K., Sprague, S., Williams, D. y Petrisor, B. (2012). "Variability in the definition and perceived causes of delayed unions and nonunions: a cross-sectional, multinational survey of orthopaedic surgeons." J Bone Joint Surg Am **94**(15): e1091-1096.
- Bhattacharyya, S., Siegel, E. R., Achenbach, S. J., Khosla, S. y Suva, L. J. (2008). "Serum biomarker profile associated with high bone turnover and BMD in postmenopausal women." J Bone Miner Res **23**(7): 1106-1117.
- Bianchi, B. E. (2009). "Implantes ortopédicos. Monografía. ."
- Blokhuis, T. J., de Bruine, J. H., Bramer, J. A. , y col. (2001). "The reliability of plain radiography in experimental fracture healing." Skeletal Radiol **30**(3): 151-156.
- Boyan, B. D., Caplan, A. I., Heckman, J. D. , y col. (1999). "Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions." J Orthop Res **17**(2): 246-255.
- Bramer, J. A., Barentsen, R. H., vd Elst, M. , y col. (1998). "Representative assessment of long bone shaft biomechanical properties: an optimized testing method." J Biomech **31**(8): 741-745.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Bruder, S. P., Kurth, A. A., Shea, M. , y col. (1998). "Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells." J Orthop Res **16**(2): 155-162.
- Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. y Recker, R. (1996). "Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function." Instr Course Lect **45**: 387-399.
- Burdick, J. A.; Vunjak-Novakovic, G. (2009). "Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation." Tissue Eng Part A **15**(2): 205-219.
- Burkhardt, R. (1976). "[Bone marrow changes in malignant lymphomas]." Hamatol Bluttransfus **18**: 281-301.
- Burstein, A. H. y Frankel, V. H. (1971). "A standard test for laboratory animal bone." J Biomech **4**(2): 155-158.
- Caeiro, J. R.; González, P.; Guede, D. (2013). "Biomecánica y huesos (II): Ensayos en los distintos niveles jeraquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la reistencia ósea. ." Rev Osteoporos Metab Miner **5**(2): 99-108.
- Calori, G. M., Colombo, M., Ripamonti, C. , y col. (2011). "Polytherapy in bone regeneration: clinical applications and preliminary considerations." Int J Immunopathol Pharmacol **24**(1 Suppl 2): 85-90.
- Cao, H.; Kuboyama, N. (2010). "A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering." Bone **46**(2): 386-395.
- Ciapetti, G., Ambrosio, L., Savarino, L. , y col. (2003). "Osteoblast growth and function in porous poly epsilon -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study." Biomaterials **24**(21): 3815-3824.
- Ciapetti, G., Granchi, D., Devescovi, V. , y col. (2012). "Enhancing osteoconduction of PLLA-based nanocomposite scaffolds for bone regeneration using different biomimetic signals to MSCs." Int J Mol Sci **13**(2): 2439-2458.
- Claes, L. E.; Wilke, H. J.; Kiefer, H. (1995). "Osteonal structure better predicts tensile strength of healing bone than volume fraction." J Biomech **28**(11): 1377-1390.
- Cordero-Ampuero, J.; Esteban, J.; Garcia-Cimbrelo, E.; Munuera, L.; Escobar, R. (2007). "Low relapse with oral antibiotics and two-stage exchange for late arthroplasty infections in 40 patients after 2-9 years." Acta Orthop **78**(4): 511-519.
- Cuenca-Lopez, M. D.; Peris, J. L.; Garcia-Rosello, M.; Atienza, C.; Prat, J.; Becerra, J.; Andrades, J. A. (2010). "Action of recombinant human BMP-2 on fracture healing in rabbits is dependent on the mechanical environment." J Tissue Eng Regen Med **4**(7): 543-552.
- Chakkalakal, D. A., Lippiello, L., Wilson, R. F., Shindell, R. y Connolly, J. F. (1990). "Mineral and matrix contributions to rigidity in fracture healing." J Biomech **23**(5): 425-434.
- Charles-Harris Ferrer, M (2007). Development and Characterisation of Completely Degradable Composite Tissue Engineering Scaffolds Doctoral Thesis, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Cehade, M. J., Pohl, A. P., Percy, M. J. y Nawana, N. (1997). "Clinical implications of stiffness and strength changes in fracture healing." J Bone Joint Surg Br **79**(1): 9-12.
- Chen, S. H., Lei, M., Xie, X. H. , y col. (2013). "PLGA/TCP composite scaffold incorporating bioactive phytomolecule icaritin for enhancement of bone defect repair in rabbits." Acta Biomater **9**(5): 6711-6722.
- Chen, S. J., Huang, C. C. y Chang, H. T. (2010). "Enrichment and fluorescence enhancement of adenosine using aptamer-gold nanoparticles, PDGF aptamer, and Oligreen." Talanta **81**(1-2): 493-498.
- Chihara, S.; Segreti, J. (2010). "Osteomyelitis." Dis Mon **56**(1): 5-31.
- Chou, Y. F., Zuk, P. A., Chang, T. L., Benhaim, P. y Wu, B. M. (2011). "Adipose-derived stem cells and BMP2: part 1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects." Connect Tissue Res **52**(2): 109-118.

- Daley, S. R.; Cobbold, S. P.; Waldmann, H. (2008). "Fc-disabled anti-mouse CD40L antibodies retain efficacy in promoting transplantation tolerance." *Am J Transplant* **8**(11): 2265-2271.
- Debbage, P. (2009). "Targeted drugs and nanomedicine: present and future." *Curr Pharm Des* **15**(2): 153-172.
- Delabarde, C.; Plummer, C. J. G.; Bourban, P. E.; Manson, J. A. E. (2010). "Solidification behavior of PLLA/nHA nanocomposites." *Compos Sci Technol* **70**(13): 1813-1819.
- Delabarde, C.; Plummer, C. J.; Bourban, P. E.; Manson, J. A. (2012). "Biodegradable polylactide/hydroxyapatite nanocomposite foam scaffolds for bone tissue engineering applications." *J Mater Sci Mater Med* **23**(6): 1371-1385.
- Delgado Martínez, A. D. (2015). *Cirugía ortopédica y traumatología*.
- Delloye, C.; Cornu, O.; Druetz, V.; Barbier, O. (2007). "Bone allografts: What they can offer and what they cannot." *J Bone Joint Surg Br* **89**(5): 574-579.
- den Boer, F. C.; Bramer, J. A.; Blokhuis, T. J.; Van Soest, E. J.; Jenner, J. M.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Burger, E. H.; Haarman, H. J. (2002). "Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture." *Bone* **31**(1): 158-164.
- den Boer, F. C.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Wippermann, B. W.; van Lingen, A.; Vink, G. Q.; Boshuizen, K.; Haarman, H. J. (1999). "New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry." *J Orthop Res* **17**(5): 654-660.
- Duan, Z.; Zheng, Q.; Guo, X.; Li, C.; Wu, B.; Wu, W. (2008). "Repair of rabbit femoral defects with a novel BMP2-derived oligopeptide P24." *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **28**(4): 426-430.
- Einhorn, T. A. (2003). "Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development." *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**: 82-88.
- Ekkernkamp, A.; Muhr, G.; Josten, C. (1996). "[Infected pseudarthrosis]." *Unfallchirurg* **99**(12): 914-924.
- Emara, K. M.; Diab, R. A.; Emara, A. K. (2015). "Recent biological trends in management of fracture non-union." *World J Orthop* **6**(8): 623-628.
- Escarpenier, J. (2007). "Factores de riesgo para la aparición de pseudoartrosis en las fracturas diafisarias." *Rev Cubana Ortop Traumatol* **9**(1).
- Fajardo, M.; Liu, C. J.; Egol, K. (2009). "Levels of expression for BMP-7 and several BMP antagonists may play an integral role in a fracture nonunion: a pilot study." *Clin Orthop Relat Res* **467**(12): 3071-3078.
- Feng, J. Q.; Ward, L. M.; Liu, S.; Lu, Y.; Xie, Y.; Yuan, B.; Yu, X.; Rauch, F.; Davis, S. I.; Zhang, S.; Rios, H.; Drezner, M. K.; Quarles, L. D.; Bonewald, L. F.; White, K. E. (2006). "Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." *Nat Genet* **38**(11): 1310-1315.
- Fernandez-Fairén, M.; Murcia-Mazón, A.; Iglesias, R.; Querales, V.; Sevilla, P.; Gil, J. (2008). "Osteointegración de vástagos de tantalio poroso implantados en necrosis avasculares de la cadera." *Acta Orthop Mex* **22**(4): 215-221.
- Ferreira, L. B., Bradaschia-Correa, V., Moreira, M. M., Marques, N. D. y Arana-Chavez, V. E. (2015). "Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria." *J Biomater Appl* **29**(7): 965-976.
- Fitzgibbons, T. C., Hawks, M. A., McMullen, S. T. y Inda, D. J. (2011). "Bone grafting in surgery about the foot and ankle: indications and techniques." *J Am Acad Orthop Surg* **19**(2): 112-120.
- Forriol Campos, F (2009). *Manual de cirugía ortopédica y traumatología*.
- Forriol Campos, F. (2009). "Growth factors in cartilage and meniscus repair." *Injury* **40 Suppl 3**: S12-16.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Forriol Campos, F. (2010). "Proteínas morfogénicas óseas y su aplicación clínica." Rev esp cir ortop traumatol **54**(Supl 1): 2-10.
- Forriol Campos, F.; Denaro, L.; Longo, U. G.; Taira, H.; Maffulli, N.; Denaro, V. (2010). "Bone lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep." Strategies Trauma Limb Reconstr **5**(2): 71-78.
- Forriol Campos, F.; Longo, U. G.; Alvarez, E.; Campi, S.; Ripalda, P.; Rabitti, C.; Maffulli, N.; Denaro, V. (2011). "Scanty integration of osteochondral allografts cryopreserved at low temperatures with dimethyl sulfoxide." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **19**(7): 1184-1191.
- Foux, A., Black, R. C. y Uthoff, H. K. (1990). "Quantitative measures for fracture healing: an in-vitro biomechanical study." J Biomech Eng **112**(4): 401-406.
- Foux, A., Uthoff, H. K. y Black, R. C. (1993). "Healing of plated femoral osteotomies in dogs. A mechanical study using a new test method." Acta Orthop Scand **64**(3): 345-353.
- Foux, A., Yeadon, A. J. y Uthoff, H. K. (1997). "Improved fracture healing with less rigid plates. A biomechanical study in dogs." Clin Orthop Relat Res(339): 232-245.
- Fragen, R. J., Weiss, H. W. y Molteni, A. (1987). "The effect of propofol on adrenocortical steroidogenesis: a comparative study with etomidate and thiopental." Anesthesiology **66**(6): 839-842.
- Fu, K., Xu, Q., Czernuszka, J. , y col. (2010). "Prolonged osteogenesis from human mesenchymal stem cells implanted in immunodeficient mice by using coralline hydroxyapatite incorporating rhBMP2 microspheres." J Biomed Mater Res A **92**(4): 1256-1264.
- Gannon, F. H., Glaser, D., Caron, R. , y col. (2001). "Mast cell involvement in fibrodysplasia ossificans progressiva." Hum Pathol **32**(8): 842-848.
- García Abujeta, JL.; , Hernando de Larramendi Martínez, C.; , Muñoz Lejarazu, D.; y Gastaminza Lasarte, G. (2004). "Immunoallergic reactions to materials used in Orthopedic Surgery and Traumatology. I. Internal materials." Patología del Aparato Locomotor **2**(2): 114-125.
- García Barea, A. (2007). "Desarrollo de vitroceramicasy vítreos bioactivos en el tratamiento de defectos oseos segmentarios." Universidad de Zaragoza. Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia.
- García Roselló, M. (2004). "Estudio biomecánico del efecto de la RHBMP-2 y la rigidez de fijación en el tratamiento de reparación de fracturas tibiales en conejo." Universidad Politécnica de Valencia.
- Geiger, F., Bertram, H., Berger, I. , y col. (2005). "Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects." J Bone Miner Res **20**(11): 2028-2035.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. y Tsiridis, E. (2005). "Bone substitutes: an update." Injury **36 Suppl 3**: S20-27.
- Gil Albarova, J.; Garrido Lahiguera, R.; Gil Albarova, R.; Melgosa Gil, M. (2003). "Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia génica en Cirugía Ortopédica y Traumatología." MAPFRE medicina **14**(1): 51-65.
- Glimcher, M. J. (1989). "Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo." Anat Rec **224**(2): 139-153.
- Goldberg, V. M. y Buckwalter, J. A. (2005). "Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: evidence for disease-modifying activity." Osteoarthritis Cartilage **13**(3): 216-224.
- Goodship, A. E. (1996). "Cyclical micromovement and fracture healing." J Bone Joint Surg Br **78**(1): 166-167.
- Griffith, L. G. y Naughton, G. (2002). "Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities." Science **295**(5557): 1009-1014.

- Gross, K. A. y Rodriguez-Lorenzo, L. M. (2004). "Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering." Biomaterials **25**(20): 4955-4962.
- Guede, D.; Gonzalez, P.; Caeiro, J R. (2013). "Biomecánica y hueso (I): conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos." Rev Osteopros Metab **5**(1): 43-50.
- Guo, Z., Dang, G., Wang, Z. y Zhang, H. (1999). "[Bone tissue engineering seeded with bone marrow stromal cells]." Zhonghua Wai Ke Za Zhi **37**(7): 395-398.
- Haidar, Z. S., Hamdy, R. C. y Tabrizian, M. (2009). "Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering." Biotechnol Lett **31**(12): 1825-1835.
- Ham, A.; Harris, W. R. (1972). Repair and transplantation bone. In: the Biochemistry and physiology of bone.
- Harada, N., Watanabe, Y., Sato, K. , y col. (2014). "Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold." Biomaterials **35**(27): 7800-7810.
- Harmey, D., Hesse, L., Narisawa, S. , y col. (2004). "Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders." Am J Pathol **164**(4): 1199-1209.
- Harris, M. T., Butler, D. L., Boivin, G. P. , y col. (2004). "Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs." J Orthop Res **22**(5): 998-1003.
- Henson, F. y Getgood, A. (2011). "The use of scaffolds in musculoskeletal tissue engineering." Open Orthop J **5 Suppl 2**: 261-266.
- Hernandez, A., Reyes, R., Sanchez, E. , y col. (2012). "In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system." J Biomed Mater Res A **100**(9): 2382-2391.
- Hernandez Flores, C.; Delgado, A.; Dominguez Hernandez, V. M.; (2011). "Evaluación biomecánica de un modelo de defecto óseo en tibia de rata." Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica **XXXII**(1): 12-19.
- Hollinger, J. O. y Schmitz, J. P. (1997). "Macrophysiologic roles of a delivery system for vulnerary factors needed for bone regeneration." Ann N Y Acad Sci **831**: 427-437.
- Horne, W. C., Sanjay, A., Bruzzaniti, A. y Baron, R. (2005). "The role(s) of Src kinase and Cbl proteins in the regulation of osteoclast differentiation and function." Immunol Rev **208**: 106-125.
- Horwitz, D S.; Cordero Ampuero, J. (2012). "Monografía AAOS-SECOT. Infecciones." Revista española de cirugía ortopédica y traumatología **56**(Extra 1): 1-127.
- Ikeda, R., Fujioka, H., Nagura, I. , y col. (2009). "The effect of porosity and mechanical property of a synthetic polymer scaffold on repair of osteochondral defects." Int Orthop **33**(3): 821-828.
- Ip, W. Y. (2002). "Polylactide membranes and sponges in the treatment of segmental defects in rabbit radii." Injury **33 Suppl 2**: B66-70.
- Jamshidi Adegani, F., Langroudi, L., Ardeshirylajimi, A. , y col. (2014). "Coating of electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers with willemite bioceramic: improvement of bone reconstruction in rat model." Cell Biol Int **38**(11): 1271-1279.
- Jazrawi, L. M., Bai, B., Simon, J. A. , y col. (2000). "A biomechanical comparison of Schuhl nuts or cement augmented screws for plating of humeral fractures." Clin Orthop Relat Res(377): 235-240.
- Jiang, T., Nukavarapu, S. P., Deng, M. , y col. (2010). "Chitosan-poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: in vitro degradation and in vivo bone regeneration studies." Acta Biomater **6**(9): 3457-3470.

- Jiao, X., Billings, P. C., O'Connell, M. P. , y col. (2007). "Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) modulate BMP2 osteogenic bioactivity in C2C12 cells." J Biol Chem **282**(2): 1080-1086.
- Jung, M. R., Shim, I. K., Chung, H. J. , y col. (2012). "Local BMP-7 release from a PLGA scaffolding-matrix for the repair of osteochondral defects in rabbits." J Control Release **162**(3): 485-491.
- Kaito, T., Myoui, A., Takaoka, K. , y col. (2005). "Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite." Biomaterials **26**(1): 73-79.
- Karageorgiou, V.; Kaplan, D. (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis." Biomaterials **26**(27): 5474-5491.
- Khan, S. N. y Lane, J. M. (2004). "The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications." Expert Opin Biol Ther **4**(5): 741-748.
- Kievit, F. M., Veisoh, O., Bhattarai, N. , y col. (2009). "PEI-PEG-Chitosan Copolymer Coated Iron Oxide Nanoparticles for Safe Gene Delivery: synthesis, complexation, and transfection." Adv Funct Mater **19**(14): 2244-2251.
- Kim, J., McBride, S., Tellis, B. , y col. (2012). "Rapid-prototyped PLGA/beta-TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model." Biofabrication **4**(2): 025003.
- Kirker-Head, C., Karageorgiou, V., Hofmann, S. , y col. (2007). "BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects." Bone **41**(2): 247-255.
- Klein-Nulend, J., Bacabac, R. G., Veldhuijzen, J. P. y Van Loon, J. J. (2003). "Microgravity and bone cell mechanosensitivity." Adv Space Res **32**(8): 1551-1559.
- Klein, P., Schell, H., Streitparth, F. , y col. (2003). "The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions." J Orthop Res **21**(4): 662-669.
- Lansdowne, J. L., Devine, D., Eberli, U. , y col. (2014). "Characterization of an ovine bilateral critical sized bone defect iliac wing model to examine treatment modalities based on bone tissue engineering." Biomed Res Int **2014**: 250958.
- Larena Pellejero, A. (2007). "Aplicaciones de nuevos nanomateriales en cirugía ortopédica y traumatología." Patología del Aparato Locomotor **5** (2): 116-124.
- Lavine, L. S.; Grodzinsky, A. J. (1987). "Electrical stimulation of repair of bone." J Bone Joint Surg Am **69**(4): 626-630.
- Lee, Y. J., Lee, J. H., Cho, H. J. , y col. (2013). "Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration." Biomaterials **34**(21): 5059-5069.
- Leotau Rodriguez, M A. (2010). "Seccion articulos de revision de tema." Revista centro de estudios en salud **1**(12): 135-145.
- Levenston, M. E., Beaupre, G. S. y van der Meulen, M. C. (1994). "Improved method for analysis of whole bone torsion tests." J Bone Miner Res **9**(9): 1459-1465.
- Lew, D. P. y Waldvogel, F. A. (2004). "Osteomyelitis." Lancet **364**(9431): 369-379.
- Li, J., Yuan, X., He, F. y Mak, A. F. (2008). "Hybrid coating of hydroxyapatite and collagen within poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) scaffold." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **86**(2): 381-388.
- Liang, H., Wang, K., Shimer, A. L. , y col. (2010). "Use of a bioactive scaffold for the repair of bone defects in a novel reproducible vertebral body defect model." Bone **47**(2): 197-204.
- Liao, H., Duan, X., Zhang, Z. , y col. (2012). "[In vivo degradable properties of a novel injectable calcium phosphate cement containing poly lactic-co-glycolic acid]." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **26**(8): 934-938.
- Liao, L., Yang, S., Miron, R. J. , y col. (2014). "Osteogenic properties of PBLG-g-HA/PLLA nanocomposites." PLoS One **9**(9): e105876.
- Liu, J., Mao, K., Liu, Z. , y col. (2013). "Injectable biocomposites for bone healing in rabbit femoral condyle defects." PLoS One **8**(10): e75668.

- Liu, X. y Ma, P. X. (2004). "Polymeric scaffolds for bone tissue engineering." Ann Biomed Eng **32**(3): 477-486.
- Lo, K. W., Ulery, B. D., Kan, H. M., Ashe, K. M. y Laurencin, C. T. (2014). "Evaluating the feasibility of utilizing the small molecule phenamil as a novel biofactor for bone regenerative engineering." J Tissue Eng Regen Med **8**(9): 728-736.
- Lock, J. y Liu, H. (2011). "Nanomaterials enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells similar to a short peptide of BMP-7." Int J Nanomedicine **6**: 2769-2777.
- López-Oliva, F.; Madroñero de la Cal, A.; Garcia de las Heras, B.; Martín Buenadicha, E.; Forriol Campos F. (2006). "Evaluation of the efficacy of treating pseudoarthrosis by pulsed electromagnetic fields with a new scale of fracture severity." Patología del Aparato Locomotor **4**(6): 179-186.
- Lovejoy, C. O., Burstein, A. H. y Heiple, K. G. (1976). "The biomechanical analysis of bone strength: a method and its application to platycnemia." Am J Phys Anthropol **44**(3): 489-505.
- Luppen, C. A., Blake, C. A., Ammirati, K. M. , y col. (2002). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid-treated rabbits." J Bone Miner Res **17**(2): 301-310.
- Lyu, S., Huang, C., Yang, H. y Zhang, X. (2013). "Electrospun fibers as a scaffolding platform for bone tissue repair." J Orthop Res **31**(9): 1382-1389.
- Marco Martínez, F., Forriol Camps, F., Vaquero Martín, J., Carranza Bencano, A. (2010). Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Madrid. Editorial Médica Panamericana.
- Markel, M. D., Wikenheiser, M. A. y Chao, E. Y. (1990). "A study of fracture callus material properties: relationship to the torsional strength of bone." J Orthop Res **8**(6): 843-850.
- Markel, M. D., Wikenheiser, M. A. y Chao, E. Y. (1991). "Formation of bone in tibial defects in a canine model. Histomorphometric and biomechanical studies." J Bone Joint Surg Am **73**(6): 914-923.
- Marsh, D. (1998). "Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S22-30.
- Mauney, J. R., Nguyen, T., Gillen, K. , y col. (2007). "Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds." Biomaterials **28**(35): 5280-5290.
- Meffert, R. H., Tis, J. E., Lounici, S. , y col. (1999). "Comparison of two systems for tibial external fixation in rabbits." Lab Anim Sci **49**(6): 650-654.
- Mehta, M., Checa, S., Lienau, J., Hutmacher, D. y Duda, G. N. (2012). "In vivo tracking of segmental bone defect healing reveals that callus patterning is related to early mechanical stimuli." Eur Cell Mater **24**: 358-371; discussion 371.
- Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V. , y col. (2004). "Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds." Biotechnol Bioeng **88**(3): 379-391.
- Meyer, U.; Meyer, T. H.; Handschel, J.; Wiesmann, H. P. (2009). Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine.
- Miclau, T., Remiger, A., Tepic, S., Lindsey, R. y McIlff, T. (1995). "A mechanical comparison of the dynamic compression plate, limited contact-dynamic compression plate, and point contact fixator." J Orthop Trauma **9**(1): 17-22.
- Miller, M. D. (2009). Ortopedia y Traumatología.
- Mohan, S. y Baylink, D. J. (1991). "Evidence that the inhibition of TE85 human bone cell proliferation by agents which stimulate cAMP production may in part be mediated by changes in the IGF-II regulatory system." Growth Regul **1**(3): 110-118.
- Munuera Martínez, L.; Galian Labaca, V.; Andia, I.; Sánchez, M.; Martínez de los Mozos, J. L.; (2006). "Agentes locales en la consolidación ósea: realidades actuales." Rev Ortp Traumatol **50**(Supl.1): 13-21.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Murcia-Mazon, A. (2008). Cirugía de revisión de las artroplastias de cadera, MASSON.
- Murcia-Mazon, A. (2000). Cirugía de revisión de las artroplastias de cadera. SECOT.
- Navarro, M.; Aparicio, C.; Charles-Harris, M.; Ginebra, M. P.; Engel, E.; Planell, J. A. (2006). "Development of a biodegradable composite scaffold for bone tissue engineering: physico-chemical, topographical, mechanical, degradation and biological properties." Advances in Polymer Science **200**: 209-231.
- Navarro Toro, M. (2005). Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea Doctoral thesis, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Nunamaker, D. M. (1998). "Experimental models of fracture repair." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S56-65.
- Oest, M. E., Dupont, K. M., Kong, H. J., Mooney, D. J. y Guldberg, R. E. (2007). "Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects." J Orthop Res **25**(7): 941-950.
- Oh, T. J., Yoon, J., Misch, C. E. y Wang, H. L. (2002). "The causes of early implant bone loss: myth or science?" J Periodontol **73**(3): 322-333.
- Ortiz-Cruz, E. J.; Campo Loarte, J.; Martínez Martín, J.; Canosa Sevillano, R. (2000). "Estructura y organización de un banco de huesos y tejidos." Revista de Ortopedia y Traumatología **44**: 127-138.
- Osyczka, A. M., Diefenderfer, D. L., Bhargava, G. y Leboy, P. S. (2004). "Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone." Cells Tissues Organs **176**(1-3): 109-119.
- Ouyang, H., Zhang, J. B., Liu, Y. , y col. (2008). "[Research on application of modified polyethylene glycol hydrogels in the construction of tissue engineered heart valve]." Zhonghua Wai Ke Za Zhi **46**(22): 1723-1726.
- Park, B. H., Zhou, L., Jang, K. Y. , y col. (2012). "Enhancement of tibial regeneration in a rat model by adipose-derived stromal cells in a PLGA scaffold." Bone **51**(3): 313-323.
- Parrett, B. M., Matros, E., Pribaz, J. J. y Orgill, D. P. (2006). "Lower extremity trauma: trends in the management of soft-tissue reconstruction of open tibia-fibula fractures." Plast Reconstr Surg **117**(4): 1315-1322; discussion 1323-1314.
- Patel, Z. S., Young, S., Tabata, Y. , y col. (2008). "Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model." Bone **43**(5): 931-940.
- Pekkarinen, T., Jamsa, T., Maatta, M., Hietala, O. y Jalovaara, P. (2006). "Reindeer BMP extract in the healing of critical-size bone defects in the radius of the rabbit." Acta Orthop **77**(6): 952-959.
- Pelissier, P., Boireau, P., Martin, D. y Baudet, J. (2003). "Bone reconstruction of the lower extremity: complications and outcomes." Plast Reconstr Surg **111**(7): 2223-2229.
- Pinel, C. B. y Pluhar, G. E. (2012). "Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein in cats and dogs: a review of 13 cases." Can Vet J **53**(7): 767-774.
- Primo-Capella, V. J.; Peris Serra, J. L.; Morales Martín, I.; Bermejo Bosch, I.; Atienza Vicente, C.; Jurado Oñate, M. J.; Lax Pérez, R.; Vicente Vera, J.; Picazo Gabaldón, B. R. (2009). "Proyecto NANOBIOCOM: desarrollo de un nuevo biomaterial para el tratamiento de defectos en tejido óseo." Revista de biomecánica, **51**: 51-54.
- Qi, X., Ye, J. y Wang, Y. (2009). "Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering." J Biomed Mater Res A **89**(4): 980-987.
- Queipo de Llano, A. (2007). Patología de partes blandas del miembro superior. Tratamiento rehabilitador.
- Quinlan, E., Lopez-Noriega, A., Thompson, E. , y col. (2015). "Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the

- controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering." J Control Release **198**: 71-79.
- Radisic, M., Park, H., Shing, H. , y col. (2004). "Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(52): 18129-18134.
- Reyes, R., Delgado, A., Sanchez, E. , y col. (2014). "Repair of an osteochondral defect by sustained delivery of BMP-2 or TGFbeta1 from a bilayered alginate-PLGA scaffold." J Tissue Eng Regen Med **8**(7): 521-533.
- Reyna Olivera, G.; Soto Suarez, I.; Regalado Cruz, R. (2005). " Aplicación de medula osea autologa en retardos de consolidación y pseudoartrosis postraumática." Acta Ortopédica Mexicana **19**(6): 248-251.
- Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L. y Zioupos, P. (1998). "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone." Med Eng Phys **20**(2): 92-102.
- Roche Albero, A. (2011). Estudio y desarrollo experimental de nuevos de material para la reparación ósea Doctoral thesis, Universidad de Zaragoza.
- Roether, J. A., Gough, J. E., Boccaccini, A. R. , y col. (2002). "Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering." J Mater Sci Mater Med **13**(12): 1207-1214.
- Ronca, A., Guarino, V., Raucci, M. G. , y col. (2014). "Large defect-tailored composite scaffolds for in vivo bone regeneration." J Biomater Appl **29**(5): 715-727.
- Roohani-Esfahani, S. I., Lu, Z. F., Li, J. J. , y col. (2012). "Effect of self-assembled nanofibrous silk/polycaprolactone layer on the osteoconductivity and mechanical properties of biphasic calcium phosphate scaffolds." Acta Biomater **8**(1): 302-312.
- Ruff, C. B. (1983). "The contribution of cancellous bone to long bone strength and rigidity." Am J Phys Anthropol **61**(2): 141-143.
- Ruff, C. B. y Hayes, W. C. (1983). "Cross-sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae-a biomechanical investigation: I. Method and general patterns of variation." Am J Phys Anthropol **60**(3): 359-381.
- Ruff, C. B. y Hayes, W. C. (1983). "Cross-sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae-a biomechanical investigation: II. Sex, age, side differences." Am J Phys Anthropol **60**(3): 383-400.
- Salkeld, S. L., Patron, L. P., Barrack, R. L. y Cook, S. D. (2001). "The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone." J Bone Joint Surg Am **83-A**(6): 803-816.
- Salom Taverner, M. (2012). Estudio del efecto de los bifosfonatos (Zolendronato) sobre la consolidación de las fracturas., Universitat de Valencia.
- Salvado Muñoz, M.; , P.;, Martín Rodriguez A., F.;, Collia Fernández , y col. (2005). "Estudio de la regeneración ósea mediante la implantación endomedular de biomateriales." Patología del Aparato Locomotor **3**(1): 24-30.
- Sciadini, M. F. y Johnson, K. D. (2000). "Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model." J Orthop Res **18**(2): 289-302.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. y Little, D. G. (2008). "Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture." Semin Cell Dev Biol **19**(5): 459-466.
- Schmitt, J. M., Hwang, K., Winn, S. R. y Hollinger, J. O. (1999). "Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance." J Orthop Res **17**(2): 269-278.
- Schofer, M. D., Tunnermann, L., Kaiser, H. , y col. (2012). "Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on colonization and bone formation in vivo." J Mater Sci Mater Med **23**(9): 2227-2233.
- Sebel, P. S. y Lowdon, J. D. (1989). "Propofol: a new intravenous anesthetic." Anesthesiology **71**(2): 260-277.

- Seeherman, H., Li, R. y Wozney, J. (2003). "A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors." J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 3**: 96-108.
- Sen, M. K. y Miclau, T. (2007). "Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?" Injury **38 Suppl 1**: S75-80.
- Shao, H., Shao, J., Bian, H. , y col. (2012). "OIC-A006-loaded true bone ceramic heals rabbit critical-sized segmental radial defect." Pharmazie **67**(3): 247-252.
- Sheehan, J. P., Sheehan, J. M., Seeherman, H., Quigg, M. y Helm, G. A. (2003). "The safety and utility of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cranial procedures in a nonhuman primate model." J Neurosurg **98**(1): 125-130.
- Shim, J. H., Kim, S. E., Park, J. Y. , y col. (2014). "Three-dimensional printing of rhBMP-2-loaded scaffolds with long-term delivery for enhanced bone regeneration in a rabbit diaphyseal defect." Tissue Eng Part A **20**(13-14): 1980-1992.
- Shokuhfar, T., Makradi, A., Titus, E. , y col. (2008). "Prediction of the mechanical properties of hydroxyapatite/polymethyl methacrylate/carbon nanotubes nanocomposite." J Nanosci Nanotechnol **8**(8): 4279-4284.
- Sicchieri, L. G., Crippa, G. E., de Oliveira, P. T., Beloti, M. M. y Rosa, A. L. (2012). "Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering." J Tissue Eng Regen Med **6**(2): 155-162.
- Silva, A.; Campos, S.; Monteiro, J.; Venancio, C.; Costa, B.; Guedes de Pinho, P.; Antunes, L. (2011). "Performance of anesthetic depth indexes in rabbits under propofol anesthesia: prediction probabilities and concentration-effect relations." Anesthesiology **115**(2): 303-314.
- Sitharaman, B., Shi, X., Walboomers, X. F. , y col. (2008). "In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering." Bone **43**(2): 362-370.
- Sotoudeh, A., Jahanshahi, G., Jahanshahi, A. , y col. (2012). "Combination of poly L-lactic acid nanofiber scaffold with omentum graft for bone healing in experimental defect in tibia of rabbits." Acta Cir Bras **27**(10): 694-701.
- Soucacos, P. N., Dailiana, Z., Beris, A. E. y Johnson, E. O. (2006). "Vascularised bone grafts for the management of non-union." Injury **37 Suppl 1**: S41-50.
- Spitalsky, Z.; Tasis, D.; Papagelis, K.; Galiotis, C. (2010). "Carbon nanotube–polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties." Progress in Polymer Science **35**: 357–401.
- Stevenson, S., Li, X. Q., Davy, D. T., Klein, L. y Goldberg, V. M. (1997). "Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure." J Bone Joint Surg Am **79**(1): 1-16.
- Supronowicz, P. R., Ajayan, P. M., Ullmann, K. R. , y col. (2002). "Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation." J Biomed Mater Res **59**(3): 499-506.
- Talmo, C. T., Shanbhag, A. S. y Rubash, H. E. (2006). "Nonsurgical management of osteolysis: challenges and opportunities." Clin Orthop Relat Res **453**: 254-264.
- Terada, S., Sato, M., Sevy, A. y Vacanti, J. P. (2000). "Tissue engineering in the twenty-first century." Yonsei Med J **41**(6): 685-691.
- Terjesen, T. y Svenningsen, S. (1986). "Function promotes fracture healing. Plate-fixed osteotomies studies in rabbits." Acta Orthop Scand **57**(6): 523-525.
- Teti, A. y Zallone, A. (2009). "Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited." Bone **44**(1): 11-16.
- Turner, C. H. y Burr, D. B. (1993). "Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial." Bone **14**(4): 595-608.
- Uhthoff, H. K. (1993). "Internal fixation of long bone fractures: concepts, controversies, debates. Interview by Elvira Stahl." CMAJ **149**(6): 837-841.

- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Science **150**(3698): 893-899.
- Valdes, M. A., Thakur, N. A., Namdari, S., Ciombor, D. M. y Palumbo, M. (2009). "Recombinant bone morphogenetic protein-2 in orthopaedic surgery: a review." Arch Orthop Trauma Surg **129**(12): 1651-1657.
- van der Zande, M., Sitharaman, B., Walboomers, X. F. , y col. (2011). "In vivo magnetic resonance imaging of the distribution pattern of gadonotubes released from a degrading poly(lactic-co-glycolic Acid) scaffold." Tissue Eng Part C Methods **17**(1): 19-26.
- van der Zande, M., Walboomers, X. F., Brannvall, M. , y col. (2010). "Genetic profiling of osteoblast-like cells cultured on a novel bone reconstructive material, consisting of poly-L-lactide, carbon nanotubes and microhydroxyapatite, in the presence of bone morphogenetic protein-2." Acta Biomater **6**(11): 4352-4360.
- van der Zande, M., Walboomers, X. F., Olalde, B. , y col. (2011). "Effect of nanotubes and apatite on growth factor release from PLLA scaffolds." J Tissue Eng Regen Med **5**(6): 476-482.
- Venkatesan, J., Pallela, R., Bhatnagar, I. y Kim, S. K. (2012). "Chitosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering." Int J Biol Macromol **51**(5): 1033-1042.
- Venkatesan, J., Ryu, B., Sudha, P. N. y Kim, S. K. (2012). "Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering." Int J Biol Macromol **50**(2): 393-402.
- Venugopal, J., Prabhakaran, M. P., Zhang, Y. , y col. (2010). "Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering." Philos Trans A Math Phys Eng Sci **368**(1917): 2065-2081.
- Venugopal, J. R., Low, S., Choon, A. T., Kumar, A. B. y Ramakrishna, S. (2008). "Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration." Artif Organs **32**(5): 388-397.
- Vicario, C., de Juan, J., Esclarin, A. y Alcobendas, M. (2007). "Treatment of deep wound infections after spinal fusion with a vacuum-assisted device in patients with spinal cord injury." Acta Orthop Belg **73**(1): 102-106.
- Vicario Espinosa, C. (2004). "Los aloinjertos óseos en Cirugía Ortopédica y Traumatología (I)." Patología del Aparato Locomotor **2**(3): 214-232.
- Vogel, V. y Baneyx, G. (2003). "The tissue engineering puzzle: a molecular perspective." Annu Rev Biomed Eng **5**: 441-463.
- Wainwright, D. (1976). "The shelf operation for hip dysplasia in adolescence." J Bone Joint Surg Br **58**(2): 159-163.
- Wang, C., Meng, G., Zhang, L., Xiong, Z. y Liu, J. (2012). "Physical properties and biocompatibility of a core-sheath structure composite scaffold for bone tissue engineering in vitro." J Biomed Biotechnol **2012**: 579141.
- Wang, D. X., He, Y., Bi, L. , y col. (2013). "Enhancing the bioactivity of Poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold with a nano-hydroxyapatite coating for the treatment of segmental bone defect in a rabbit model." Int J Nanomedicine **8**: 1855-1865.
- Welch, R. D., Jones, A. L., Bucholz, R. W. , y col. (1998). "Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model." J Bone Miner Res **13**(9): 1483-1490.
- Whang, K., Healy, K. E., Elenz, D. R. , y col. (1999). "Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture." Tissue Eng **5**(1): 35-51.
- White, A. A.; Panjabi, M. M.; Southwick, W. O. (1977). "Effects of compression and cyclical loading on fracture healing--a quantitative biomechanical study." J Biomech **10**(4): 233-239.
- White, A. A.; Panjabi, M. M.; Southwick, W. O. (1977). "The four biomechanical stages of fracture repair." J Bone Joint Surg Am **59**(2): 188-192.

Nuevo copolímero para la regeneración tisular.

- Wink, J. D., Gerety, P. A., Sherif, R. D. , y col. (2014). "Sustained delivery of rhBMP-2 by means of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: cranial bone regeneration without heterotopic ossification or craniosynostosis." Plast Reconstr Surg **134**(1): 51-59.
- Wippermann, B.; den Boer, F.; Schratt, H.; Donow, C.; Haarman, H.; Tsecherne, H. (1999). "The resorbable calcium phosphate cement alpha BSM in a sheep tibia segmental defect." Trans. Orthop. Res. Soc. **24**: 525.
- Xin, R., Zhang, Q., Chen, J., & Leng, Y. (2008). "Effects of porosity and crystallinity of glass ceramics on the in vivo bioactive response." Biomedical Materials **3**(4).
- Xu, C., Su, P., Chen, X. , y col. (2011). "Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering." Biomaterials **32**(4): 1051-1058.
- Yanosco-Scholl, L., Jacobson, J. A., Bradica, G. , y col. (2010). "Evaluation of dense polylactic acid/beta-tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering." J Biomed Mater Res A **95**(3): 717-726.
- Ypsilantis, P., Mikroulis, D., Politou, M. , y col. (2006). "Tolerance to propofol's sedative effect in mechanically ventilated Rabbits." Anesth Analg **103**(2): 359-365, table of contents.
- Yu, D., Li, Q., Mu, X., Chang, T. y Xiong, Z. (2008). "Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology." Int J Oral Maxillofac Surg **37**(10): 929-934.
- Yu, N. Y., Gdalevitch, M., Murphy, C. M. , y col. (2014). "Spatial control of bone formation using a porous polymer scaffold co-delivering anabolic rhBMP-2 and anti-resorptive agents." Eur Cell Mater **27**: 98-109; discussion 109-111.
- Zarate-Kalfopulos, B. y Reyes-Sanchez, A. (2006). "[Bone grafts in orthopedic surgery]." Cir Cir **74**(3): 217-222.
- Zhang, Q. X.; Yu, Z. Z.; Xie, X. L.; Mai, Y. W. (2004). "Crystallization and impact energy of polypropylene/CaCO₃ nanocomposites with nonionic modifier." Polymer **45**(17): 5985-5994.

