

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

EFFECTO EN LA REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA DE UNA MEMBRANA DE PLGA  
MODIFICADA A NIVEL MICRO-TOPOGRÁFICO CON PLASMA DE OXÍGENO Y  
FUNCIONALIZADA CON UNA CAPA INORGÁNICA DE ÓXIDO DE SILICIO

ANTONIO BATISTA CRUZADO

SEVILLA, 2015



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
Departamento de Estomatología  
C/ Avicena s/n

D. Daniel Torres Lagares, Profesor Titular del Departamento de Estomatología, y D. Gabriel Castillo Dalí, Doctor en Biología e Investigador del Departamento de Estomatología, como directores:

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado “Efecto en la regeneración ósea guiada de una membrana de PLGA modificada a nivel micro-topográfico con plasma de oxígeno y funcionalizada con una capa inorgánica de óxido de silicio”, presentado por D. Antonio Batista Cruzado ha sido realizado bajo nuestra dirección, siendo conforme para su presentación como Tesis Doctoral y ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe.

En Sevilla, y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado a 25 de Agosto de 2015.



Prof. Daniel Torres Lagares



Dr. Gabriel Castillo Dalí

## ABREVIATURAS

?: Porcentaje

3D: Tres dimensiones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AK: Anticuerpo

ALP: Fosfatasa alcalina

ATP: Adenosín trifosfato

BG: Vidrios bioactivos

BMUs : Unidades óseas multicelulares

BT: Azul de toluidina

Cel: Célula

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

D: Día

H: Hidrogeno

HA: Hidroxiapatita

IT: Ingeniería tisular

MEC: Matriz extracelular

MG: May Growmball-Giemsa

Mm: Milímetro

OB: Osteoblasto

OC: Osteoclasto

OPG: Osteoprogeterina

OSS: Óseo

PET: Tereflalato de Polietileno

PLGA: Ácido poliláctico-co-poliglicólico

P-O<sub>2</sub>: Plasma de oxígeno

RANK: Receptor activador del factor nuclear

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear

ROG: Regeneración ósea guiada

RTG: Regeneración tisular guiada

SEM: Microscopía electrónica de barrido

Sem: Semana

Si: Silicio

SiO<sub>2</sub>: Óxido de silicio

Tº: Temperatura

Ti: Titanio

TiO<sub>2</sub>: Óxido de Titanio

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato de sodio resistente

VK: Von Kossa

A mis padres y a Blanca, por hacerme rico en valores,  
en estudios, en cultura y en cariño. La sencillez como  
personas es un grado reservado sólo a los que viven  
una vida plena y da muestra de la mucha inteligencia  
que encierran en su interior.

## AGRADECIMIENTOS

**Daniel Torres Lagares:** Director incansable de trabajos y estudios. Referente de persona trabajadora y del camino docente. Profesor volcado en el trabajo en equipo, llegando a superponer el interés colectivo al personal. Muchas gracias por tu apoyo y por tu dedicación.

**Gabriel Castillo Dalí:** Director emprendedor, trabajador innegable, siempre en busca de recursos y con nuevas ideas que aportar. Muchas gracias por contribuir con tu conocimiento y por tus muchas horas de trabajo.

**José Luis Gutiérrez Pérez:** Hombre de múltiples aptitudes y valores. Líder innato y comprometido con la sociedad, pensador perenne y velador de las cosas bien hechas. Muchas gracias por las puertas abiertas.

**Pablo Galindo Moreno:** Profesor enamorado de la docencia hasta límites incalculables. La formación y la investigación es su razón de ser. Sin su compromiso como profesor nunca habría conocido la magnificencia de la Odontología. Muchas gracias por el camino que hemos recorrido juntos y por ser un buen amigo.

**Elena Sánchez Fernández:** A mi primera profesora de Cirugía Bucal muchas gracias por transmitirme el amor hacia esta gran carrera y por ser nexo de unión entre Granada y Sevilla.

**José Liébana Ureña:** Maestro de Maestros, benditas sean las ramas que al tronco salen. Nunca olvidaré el origen. Muchas gracias por recoger el germen y sembrarlo a buen recaudo.

**Centro de Cirugía Mínimamente Invasiva:** Muchas gracias a todos los responsables institucionales, equipo veterinario y personal auxiliar que hicieron posible la experimentación animal.

**Blanca Moreno Manteca:** Por su complicidad, por su apoyo y por su comprensión. Por llenarme de luz cuando no veía el final del camino y por darme fuerzas cuando ya escaseaban. No existen suficientes expresiones de gratitud porque lo bello al corazón es difícil a la palabra. Muchas gracias por tu gran ayuda.

**Mis padres y mis hermanos:** A mi familia que siempre unida y apoyándonos los unos en los otros hemos conseguido crecer y superar los obstáculos de la vida. Mi alegría es que mis pasos os llenen de orgullo.

**Equipo de Cirugía Bucal de Sevilla:** Gracias por recibirme en vuestro equipo con los brazos abiertos y haberme hecho uno más entre vosotros.

**Compañeros de Granada:** Gracias a todos los que me antecedieron y con su ejemplo me ayudaron: Miguel, Gustavo, Ildefonso, etc.

## ÍNDICE

CERTIFICADO DE DIRECTOR Y CO-DIRECTOR FIRMADO ...	¡Error! Marcador no definido.
ABREVIATURAS .....	3
AGRADECIMIENTOS.....	6
ÍNDICE.....	8
1. RESUMEN .....	11
2. INTRODUCCIÓN .....	15
2.1. Biología ósea .....	15
<i>Desarrollo</i> .....	15
<i>Células óseas</i> .....	16
<i>Composición del hueso</i> .....	17
<i>Modelado y remodelado</i> .....	19
<i>Cicatrización ósea</i> .....	21
2.2. Regeneración ósea guiada (ROG) .....	22
<i>Concepto</i> .....	22
<i>Membranas</i> .....	24
<i>Injertos óseos</i> .....	27
<i>Factores de crecimiento utilizados en la reparación del hueso</i> .....	33
2.3. Biomaterial.....	35
<i>Biomateriales en medicina y odontología</i> .....	36
<i>Evolución de los biomateriales</i> .....	38
<i>Mecanismos para el desarrollo de nuevos tejidos</i> .....	41
<i>Citotoxicidad de los biomateriales</i> .....	42
<i>Necesidad de ensayos celulares y animales</i> .....	44
2.4. Polímeros .....	45
<i>Polímeros naturales</i> .....	46
<i>Polímeros sintéticos</i> .....	46
<i>PLGA. Diseños morfológicos</i> .....	49
<i>Técnicas de elaboración de andamios poliméricos para ingeniería de tejidos</i> .....	52



<i>Aplicaciones biomédicas y farmacológicas de los polímeros</i> .....	57
2.5. Iones inorgánicos. SiO <sub>2</sub> .....	61
<i>Rol de los iones inorgánicos en el metabolismo óseo</i> .....	63
<i>Vidrios bioactivos basados en SiO<sub>2</sub></i> .....	65
2.6. Nanomedicina aplicada a la regeneración tisular.....	67
<i>Importancia de las matrices tridimensionales</i> .....	68
<i>Importancia de la superficie y la interfaz sustrato–matriz extracelular</i> .....	69
2.7. Funcionalización del PLGA.....	71
<i>Técnica de funcionalización superficial de la membrana de PLGA</i> .....	73
<i>El plasma de oxígeno</i> .....	74
<i>Dióxido de silicio</i> .....	74
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>77</b>
<b>4. OBJETIVO</b> .....	<b>78</b>
4.1 Objetivo general.....	78
4.2 Objetivos específicos.....	78
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	<b>795.f</b>
5.1. Material.....	79
<i>Membranas de estudio</i> .....	79
<i>Fabricación de las membranas de estudio</i> .....	79
<i>Ejemplares para la experimentación animal</i> .....	82
5.2. Método.....	83
<i>Descripción del estudio</i> .....	83
<i>Procedimiento quirúrgico</i> .....	83
<i>Sacrificio</i> .....	86
<i>Procesamiento de las muestras</i> .....	87
<i>Estudio morfométrico</i> .....	94
<i>Análisis estadístico</i> .....	102
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>103</b>
6.1. Evaluación cualitativa de la estructura y densidad ósea global.....	103
6.2. Nivel de regeneración ósea (porcentaje óseo neoformado).....	104
6.3. Superficie ósea mineralizada (milímetros hueso neoformado por día).....	106
6.4. Actividad resortiva (número de osteoclastos por milímetro).....	107

---

6.5. Presencia de aposición (actividad osteoblástica) .....	109
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>110</b>
<i>Modelo in vitro vs in vivo</i> .....	110
<i>Aportación del modelo animal</i> .....	113
<i>Trascendencia de los biomateriales en la cirugía regenerativa</i> .....	115
<i>Importancia de los polímeros de PLGA</i> .....	117
<i>Importancia de la rugosidad y del plasma de oxígeno</i> .....	120
<i>Importancia de la funcionalización con SiO<sub>2</sub> y la osteogénesis.</i> .....	124
<i>Relevancia de los resultados histomorfométricos</i> .....	126
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>131</b>

## 1. RESUMEN

Este propósito de Tesis Doctoral tiene como fin la valoración de un nuevo tipo de membrana de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA) modificada con un tratamiento físico de plasma de oxígeno (P-O<sub>2</sub>) para favorecer su degradación en el tejido receptor y variar su topografía a escala nanométrica y, con óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) con el fin de promover la osteogénesis. Las membranas de PLGA se saben que son biocompatibles, reabsorbibles, y ejercen un efecto barrera para evitar la colonización del espacio óseo a regenerar por el tejido conjuntivo adyacente.

Hemos realizado una introducción donde se ha hecho una revisión del uso del SiO<sub>2</sub> tanto a nivel general como en odontología, así como de los diferentes materiales utilizados en ingeniería tisular, sus composiciones químicas moleculares, técnicas de fabricación, perspectivas y aplicaciones actuales en biomedicina.

Como hipótesis se establecieron que las membranas reabsorbibles estudiados (SiO<sub>2</sub>/PLGA + P-O<sub>2</sub>) son estables y biocompatibles, y que los defectos óseos regenerados con ellas generan una mayor proporción de hueso neoformado en comparación con las membranas control (PLGA). Para ello utilizamos cuatro conejos de la raza New Zeland a los que a cada uno se les realizó dos defectos críticos de 11mm de diámetro no auto-regenerables. Tras un mes de cicatrización se sacrificaron y se les realizó la biopsia.

El objetivo principal de este proyecto es testar *in vivo* una membrana artificial, reabsorbible y modificada para evaluar su viabilidad y posible utilización en humanos para llevar a cabo tratamientos de regeneración ósea guiada (ROG)

Para poder comparar el efecto potencial osteoinductor y osteoconductor de estas membranas y estructurar una valoración con mayor significancia estadística, hicimos un análisis histomorfométrico cuantitativo del porcentaje óseo neoformado mediante Von Kossa (nitrato de plata), una comparación cualitativa de la estructura integral y densidad ósea regenerada (osteoides, médula, adipocitos y presencia o no de inflamación anormal) mediante azul de toluidina, un estudio cuantitativo nivel de resorción ósea (osteoclastos por milímetro) mediante TRAP, una comparación cualitativa de la presencia normal de aposición osteoblástica mediante ALP, y un análisis

cuantitativo de los milímetros de hueso neoformado por día mediante calceína, respecto a los controles, tras un mes de regeneración. Los resultados arrojaron valores significativos de un rendimiento mucho mayor de las membranas de estudio frente a los controles, con  $p < 0,05$  para todas las diferencias entre los valores de estudio cuantitativos, y obteniendo por todo ello una valoración positiva de la influencia de estas membranas en la regeneración ósea. Podemos concluir que el óxido de silicio favorece la formación ósea.

## ABSTRACT

This project of doctoral thesis aims at evaluating a new type of polylactic acid-co-polyglycolic membrane (PLGA) physically modified with treatment of oxygen plasma (P-O<sub>2</sub>) to promote their degradation in the receptor tissue and vary nanoscale topography and silicon oxide (SiO<sub>2</sub>) to promote osteogenesis. PLGA membranes are known to be biocompatible, absorbable, and have an effect barrier to prevent colonization of bone regenerate space by the adjacent connective tissue.

We have made an introduction where it has made a review of the use of SiO<sub>2</sub> both generally and in dentistry, the different materials used in tissue engineering, their molecular chemistries, manufacturing techniques, perspectives and current applications in biomedicine.

Our established hypothesis was that resorbable membranes of the study (SiO<sub>2</sub> / PLGA + P-O<sub>2</sub>) are stable, biocompatible, and bone defects regenerated with this kind of membrane have a greater proportion of newly formed bone compared to control membranes (PLGA). We use four New Zealand rabbits to study bone regeneration in two critical defects of 11 mm diameter (no self-regenerated). After a month of healing they were sacrificed and underwent biopsy.

The main objective of this project is to test a modified membrane *in vivo* and to evaluate its feasibility and possible use in humans to perform treatments GBR (GBR)

To compare the osteoinductive and osteoconductive potential effect of these membranes, we made a quantitative histomorphometric analysis of the percentage of bone newly formed by Von Kossa (silver nitrate), a qualitative comparison of the integral structure and bone density generated (osteoid bone, adipocytes and presence or absence of abnormal inflammation) using toluidine blue, a quantitative study of level of bone resorption (osteoclasts per mm) by TRAP, a qualitative comparison of the normal presence of osteoblastic apposition by ALP, and a quantitative analysis of newly formed bone millimeters per day by calcein, relative to controls, after a month of regeneration. The results showing a much higher performance between the study membranes vs

controls, with  $p < 0.05$  for all the values of quantitative study and obtaining all this a positive assessment of the influence of these membranes on bone regeneration.

## 2. INTRODUCCIÓN

Para poder entender la regeneración ósea, que es el campo de actuación de nuestro trabajo, en primer lugar describiremos la biología ósea a nivel histológico, los diferentes mecanismos de regulación de la regeneración y remodelación ósea, así como los factores de crecimiento implicados. Todo ello con el fin de comprender la biodinámica ósea que establece la regeneración ósea.

A continuación nos centraremos en la regeneración ósea guiada, haciendo hincapié en las diferentes técnicas y procesos, así como en los distintos materiales que se usan habitualmente en odontología.

Por último nos centraremos en los materiales que hemos utilizado en el trabajo de investigación que nos ocupa.

### 2.1. Biología ósea

El hueso es un tejido dinámico, sensible a una amplia variedad de factores y con una capacidad inherente que le permite la transcripción de estímulos mecánicos en señales bioquímicas y que le permite mejorar su capacidad para adaptarse y mantener las necesidades fisiológicas de la estructura ósea<sup>1,2,3</sup>. Este potencial adaptativo es el resultado de eventos anabólicos y catabólicos regulados y sinérgicos que conducen a un adecuado metabolismo y homeostasis del esqueleto<sup>4</sup>. Existen múltiples factores que ejercen efecto en este sistema y son de distinto tipo: bioquímicos, hormonales, celulares, biomecánicos, etc<sup>5,6,7</sup>.

### Desarrollo

Durante la embriogénesis, el esqueleto se forma o bien por un proceso de osificación directo o indirecto. En el caso del maxilar y la mandíbula, las células mesenquimales se condensan y experimentan una diferenciación directa en

osteoblastos, proceso conocido como osteogénesis intramembranosa. Por el contrario, el cóndilo, los huesos largos y las vértebras se forman inicialmente a través de una plantilla de cartílago, que sirve como un esbozo que es gradualmente reemplazado por hueso. La formación cartílago dependiente se conoce como crecimiento endocondral<sup>8</sup>.

El hueso perdido como resultado de una lesión, enfermedad o trauma atraviesa un proceso de reparación que es esencialmente una combinación de procesos osteogénicos intramembranos y endocondrales<sup>9</sup>.

### Células óseas

Dentro del hueso es posible identificar diferentes componentes celulares como las células precursoras de la osteogénesis, los osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y los elementos hematopoyéticos de la médula ósea.

Las tres principales células responsables de la homeostasis del esqueleto son:

- Los osteoblastos: Son las células responsables de la formación de los huesos. Derivan de las células osteoprogenitoras de la médula ósea y son responsables de la síntesis de la matriz ósea inmadura conocida como osteoide. Sintetizan los componentes de la matriz orgánica y median en la mineralización de la matriz. Se localizan en las superficies óseas y realizan la deposición de la matriz activa, y cuando dicha actividad llega a su fin, algunos de ellos se diferencian en osteocitos, mientras que otros permanecen en las superficies del periositio o endostio como células de revestimiento del hueso. Las células de revestimiento son células alargadas que cubren una superficie de tejido óseo y no muestra actividad sintética<sup>10</sup>.
- Los osteocitos pueden ser definidos como los orquestadores del proceso de remodelación del hueso. Poseen formas estrelladas y se encuentran atrapados dentro de la matriz ósea mineralizada en unos espacios conocidos como lagunas. Mantienen una red de procesos citoplasmáticos



conocidos como dendritas. Dichas proyecciones citoplasmáticas osteocíticas se extienden a través de compartimentos cilíndricos encerrados denominados como canalículos. A través de éstos llegan a diferentes áreas contactando con vasos sanguíneos y con otros osteocitos. La red de osteocitos es, por lo tanto, un canal de comunicación que es sensible al potencial de membrana debido al estrés causado por la dirección de fluido dentro de los espacios de los canalículos como resultados de los estímulos mecánicos. Las señales mecánicas son traducidas en mediadores bioquímicos que contribuyen a la orquestación de eventos anabólicos y catabólicos dentro del hueso. Esta disposición le permite a los osteocitos participar en la regulación de la homeostasis del calcio en la sangre, detectar la carga mecánica y transmitir dicha información a otras células dentro del hueso para posteriormente orquestar funciones osteoblásticas y osteoclasticas<sup>11</sup>.

- Los osteoclastos son células especializadas multinucleadas que se originan en la línea hematopoyética de monocitos-macrófagos. Estas células tienen capacidad para desarrollarse y adherirse a la matriz ósea para luego secretar ácido y enzimas líticas que degradan y descomponen los minerales y componentes orgánicos del hueso y del cartílago calcificado. El proceso de degradación de la matriz da como resultado la formación de un compartimento extracelular especializado conocido como la laguna de Howship<sup>10</sup>.

### Composición del hueso

El hueso es un tejido conjuntivo especializado que está compuesto de elementos orgánicos e inorgánicos. La matriz orgánica del hueso constituye aproximadamente el 30-35% del peso total del hueso y está formado por un 90% de colágeno tipo I. El 10% restante se compone de proteínas no colágenas, proteoglicanos, glicoproteínas, hidratos de carbono y lípidos. La matriz orgánica es sintetizada por los osteoblastos y

cuando aun se encuentra sin mineralizar es conocida como osteoide. Dentro de las fibras de colágeno, se produce la deposición de los iones de calcio y fosfato que se establecen y forman, en última instancia, cristales de hidroxapatita. Las proteínas no colágenas ayudan a la propagación del mineral y la mineralización completa de la matriz. La iniciación de la nucleación mineral dentro del osteoide se produce dentro de unos pocos días de la secreción, pero la terminación y la maduración son completadas en el transcurso de varios meses.

Además de proporcionar al hueso la resistencia y la rigidez para proteger los órganos sensibles, la mineralización del osteoide permite el almacenamiento de minerales que contribuyen a la homeostasis sistémica (Figura 1).

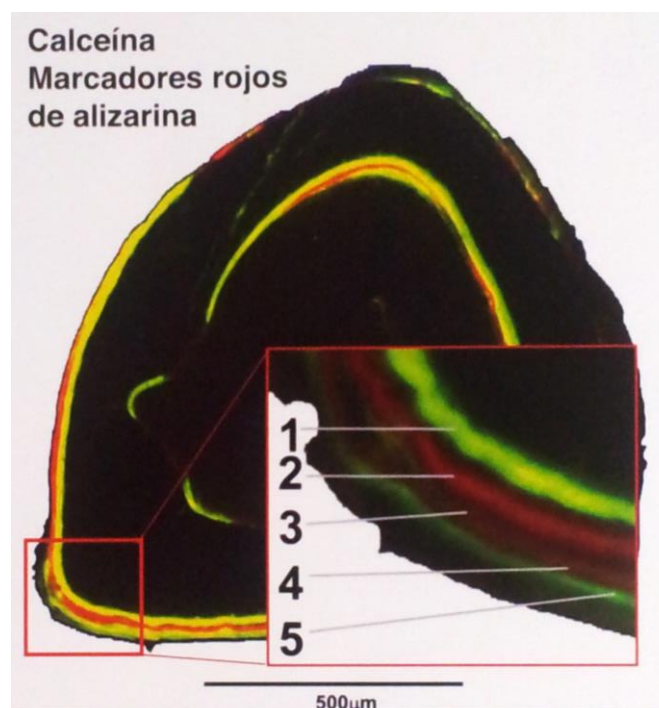


Figura 1: La tasa de formación de hueso puede ser analizada mediante el uso de fluorocromos. La calceína en verde marca el frente de mineralización cuando se administra a intervalos diferentes

## Modelado y remodelado

El hueso es un tejido altamente dinámico que posee la capacidad de adaptarse según las necesidades fisiológicas. Por lo tanto, el hueso ajusta sus propiedades mecánicas de acuerdo a los requerimientos metabólicos y mecánicos<sup>12</sup>. El mecanismo de adaptación esquelética es realizado principalmente por procesos de reabsorción y formación ósea denominada generalmente como remodelación ósea. El hueso es reabsorbido por los osteoclastos y a continuación es depositado por las células osteoblásticas<sup>13</sup>. Desde la perspectiva del remodelado óseo, se ha propuesto que los osteoclastos pueden reconocer y dirigirse a los sitios del esqueleto que tienen una integridad comprometida e iniciar el proceso de remodelado óseo con el propósito de inducir la regeneración ósea<sup>14</sup> (Figura 2).

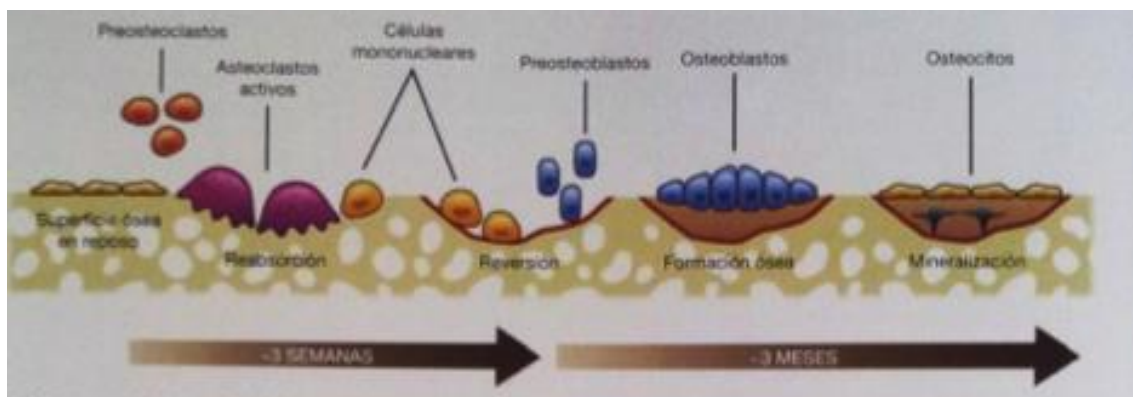
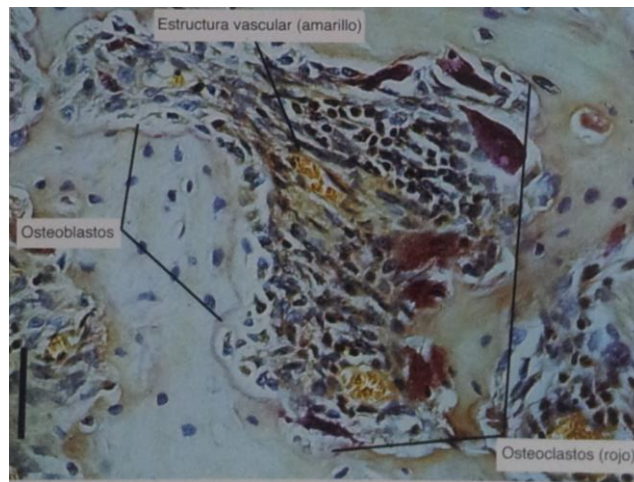


Figura 2: Remodelado óseo.

El proceso de remodelado óseo tiene lugar en las unidades ósea multicelulares (BMUs). Una BMU está compuesta por un frente de osteoclastos que residen en la superficie del hueso recién reabsorbido denominado frente de reabsorción; un compartimento que contiene vasos y pericitos y, una capa de osteoblastos presentes en la matriz orgánica recién formada conocida como frente de deposición. El número de unidades óseas multicelulares nuevas y activas están reguladas por una amplia variedad de hormonas y citosinas, las cuáles determinan la sincronización espacio-temporal y la conexión de los elementos anabólicos y catabólicos de remodelado (Figura 3).



**Figura 3: El frente de reabsorción se vincula a la tinción de las células con fosfatasa ácida tártaro-resistente (TRAP).**

Uno de los mecanismos de conexión mejor estudiados en el remodelado óseo es la activación de los osteoclastos mediada por el ligando de receptor activador para el factor nuclear (RANKL). RANKL es una citosina producida por los osteoblastos y otras células y reside en la superficie de dichas células. Las células producen RANKL en respuesta a hormonas sistémicas y citosinas (IL-6). El contacto celular entre las células que expresan RANKL y de precursores de los osteoclastos que expresan el receptor activador del factor nuclear (RANK) induce la diferenciación, fusión y activación de los osteoclastos. La modulación de este mecanismo de unión se produce a través de una molécula conocida como osteoprogesterina (OPG). La OPG se une al RANKL antes de que tenga oportunidad de unirse al RANK. Por lo tanto, la OPG suprime la capacidad de aumentar la reabsorción ósea. La OPG ha sido propuesta como un agente terapéutico activo para el tratamiento de trastornos óseos, particularmente la osteoporosis, ya que representa un mecanismo seguro y controlado para modificar la tasa de remodelación ósea (Figura 4).

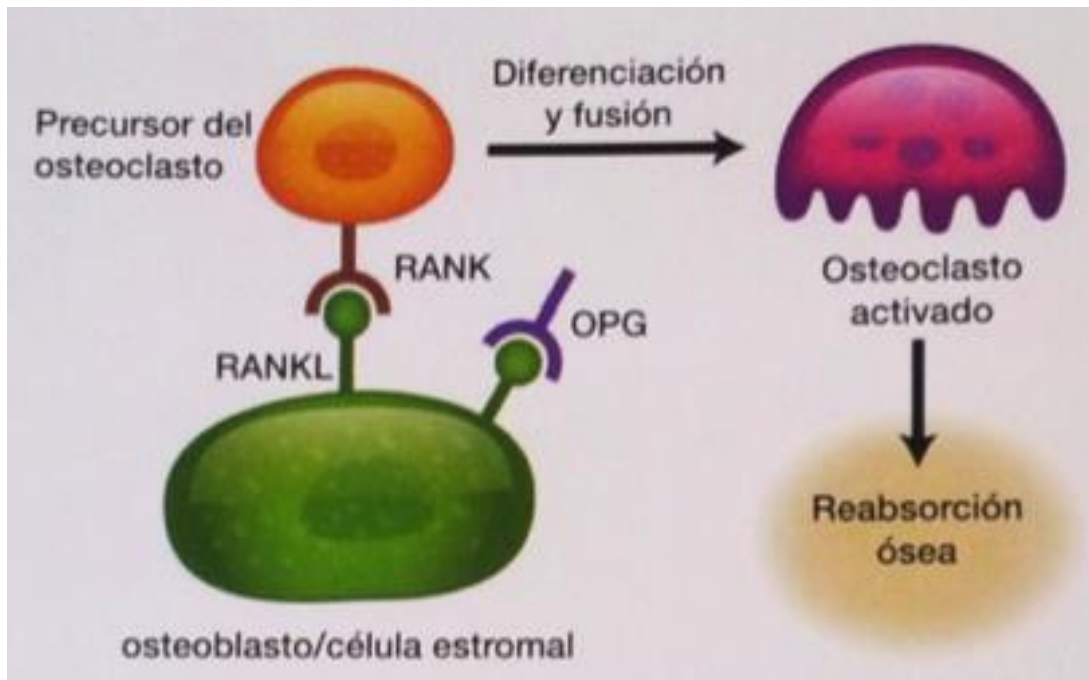


Figura 4: Conexión entre formación y reabsorción ósea.

### Cicatrización ósea

La cicatrización de un tejido lesionado conduce a la formación de un tejido que difiere en la morfología o función del tejido original. Este tipo de cicatrización se llama reparación. La regeneración tisular, por otro lado, es un término más utilizado para describir la cicatrización que conduce a la completa restauración de la morfología y función del tejido dañado.

La cicatrización del tejido óseo incluye tanto fenómenos de regeneración como de reparación, dependiendo del carácter de la lesión. Por ejemplo, una fractura ósea adecuadamente estabilizada cicatrizará mediante regeneración, mientras que un defecto mayor en el hueso a menudo cicatrizará mediante reparación. Existen ciertos factores que pueden interferir en la formación de tejido óseo después de una lesión como:

1. Fracaso de la vascularización en la herida.

2. Inadecuada estabilización del coágulo y del tejido de granulación en el defecto.
3. Crecimiento interno de tejidos no óseos con una alta actividad proliferativa.
4. Contaminación bacteriana.

La cicatrización de una herida incluye cuatro fases:

1. Coagulación de la sangre.
2. Limpieza de la herida.
3. Formación de tejido.
4. Modelado y remodelado tisular.

Dichas fases se producen en una secuencia ordenada pero pueden superponerse en un sitio dado de tal manera que, en algunas áreas de la herida, el tejido en formación puede estar en progreso, mientras que en otras áreas el modelado de tejidos es el evento que predomina.

## **2.2. Regeneración ósea guiada (ROG)**

Aunque el tejido óseo posee un gran potencial de regeneración y puede recuperar su estructura y función originales por completo, algunos defectos óseos a menudo no pueden lograr cicatrizar mediante tejido óseo de forma completa. Para solventar este problema hay descritas diferentes técnicas bajo el nombre de regeneración ósea guiada con el fin de facilitar y mejorar la cicatrización ósea.

### **Concepto**

La ROG es una técnica quirúrgica que persigue la formación de hueso nuevo para el relleno de defectos óseos perimplantarios, o en áreas óseas deficitarias. Esta técnica

está indicada en todos aquellos procedimientos quirúrgicos en los que las condiciones para la regeneración ósea estén limitadas o se prevea dificultosa, con el fin de resolver el problema que aparece a partir de la existencia de una velocidad de crecimiento diferente entre los distintos tipos de tejido. Melcher estudió el potencial regenerativo del periodonto. Distintos estudios han concluido que sólo el ligamento periodontal y el hueso son capaces de conseguir una regeneración de los tejidos periodontales<sup>15, 16</sup>.

El proceso de ROG fue descrito por Gottlow<sup>17</sup>, y consistía en eliminar de la zona quirúrgica todos los tejidos que no favorecen la regeneración ósea por medio de membranas que impiden el contacto de la herida ósea con el epitelio y el tejido conectivo. La oclusión celular de la membrana evita la migración de células epiteliales y conectivas con una velocidad de crecimiento superior a la de las células óseas al interior del defecto óseo, preservándolo para su colonización por las células óseas y permitiendo así la regeneración del defecto óseo.

Este proceso se basa en el uso de barreras o membranas físicas para evitar que las células del epitelio gingival y del tejido conjuntivo invadan durante la cicatrización las zonas que van a ser regeneradas. De esta forma se favorece que las células osteoprogenitoras puedan proliferar para formar hueso nuevo.

Como resultado de los experimentos con animales y aplicaciones clínicas en seres humanos, la regeneración ósea guiada se ha convertido en un método aceptado clínicamente para el aumento óseo en situaciones con un inadecuado volumen para la colocación de implantes dentales. El defecto óseo, a diferencia del periodontal, no involucra la participación de epitelio invadiendo la zona de regeneración. Como consecuencia, en la ROG la membrana utilizada separa dos espacios que contienen células mesenquimáticas pluripotenciales, capaces de generar de manera equivalente tanto tejido óseo como tejido fibroso<sup>18, 19</sup>.

En esta técnica, la membrana proporciona protección adicional a la herida, disminuyendo el choque de las fuerzas que inciden sobre ella y garantizando la diferenciación de las células mesenquimatosas hacia osteoblastos, en lugar de hacia fibroblastos. Un defecto con paredes óseas conservadas (defecto cerrado) puede cicatrizar con el simple uso de hueso autólogo, siempre que el mismo, conjuntamente con el coágulo de sangre permanezca estable dentro del espacio a regenerar. En un

defecto con ausencia de una o más paredes óseas (defecto abierto), la regeneración puede ser obstaculizada debido a factores como la falta de espacio causado por el colapso de tejidos superficiales, o la inestabilidad del coágulo debido a micro-movimientos durante la fase de cicatrización. En estos casos la membrana además de cumplir con la función de barrera mecánica, cumple con la función de mantenedor de espacio, creando a nivel del defecto óseo un ambiente cerrado delimitado por un lado por las paredes óseas residuales y del otro lado por la membrana que sirve de pared provisional durante el período de cicatrización. Este ambiente debe ser espacioso y protegido, de manera que el coágulo sea estable en las primeras fases de cicatrización y de esta forma no se interrumpa el proceso de regeneración ósea. Mientras menor es el número de paredes óseas residuales, mayor será la necesidad de emplear biomateriales osteoinductivos. Por otra parte, los injertos de hueso autólogo representan la alternativa más adecuada para reparar defectos óseos complejos.

Dado que las membranas en las que basamos nuestro estudio están orientadas a futuras aplicaciones clínicas de regeneración ósea guiada (ROG) in vivo, su desarrollo responde a una técnica en la que hay que sopesar varios factores: la absorción de la membrana debe producirse en el plazo adecuado para la regeneración; el proceso de absorción debe realizarse con una reacción inflamatoria mínima compatible con la regeneración; y la pérdida de distintos grupos de polímeros deben afectar lo menos posible al pH para no influir en el proceso de reparación.

Resultados clínicos positivos con ácido poliláctico, poligalactina o poliglicólico en diversos grados han sido descritos por diferentes autores<sup>18</sup>.

## Membranas

Las membranas oclusivas que se usan en ROG podemos clasificarlas en diferentes grupos según su naturaleza y degradación. Según su capacidad reabsortiva podemos diferenciarlas en membranas reabsorbibles y no reabsorbibles, y dentro de cada uno de estos apartados tenemos las que son de origen animal y las sintetizadas en



laboratorio. En nuestro estudio nos centraremos en las membranas reabsorbibles sintéticas, en concreto en las de PLGA.

### Membranas Reabsorbibles Sintéticas

Son películas de biomateriales poliméricos de naturaleza orgánica usados como barrera en el tratamiento de defectos óseos críticos que son difícilmente recuperables de manera óptima. Las características ideales de las membranas reabsorbibles según Scantlebury<sup>20</sup> son:

- Biocompatibilidad.
- Integración tisular.
- Oclusión celular.
- Manejabilidad clínica.
- Mantenimiento del espacio.

Presentan las características de ser biodegradables y ser reabsorbidas por el propio organismo sin generar una respuesta inmune de rechazo<sup>19</sup>. Estas membranas a su vez, actúan como matrices que permiten el crecimiento de las células en su interior, y están diseñadas para inhibir o retardar la migración apical del tejido conjuntivo durante la fase de cicatrización. Este efecto es el resultado del fenómeno conocido como “inhibición por contacto”, reduciéndose así la formación de bolsas en la superficie externa de la membrana. Se ha demostrado además una buena adhesión y vascularización de los tejidos en los que se hallan colocadas. El empleo de membranas reabsorbibles es necesario para evitar una segunda cirugía invasiva para retirar la membrana no absorbible que puede dañar el tejido en regeneración y producir inflamación indeseada.

Una de las razones para el uso de membranas reabsorbibles sintéticas en lugar de las de origen animal como las de colágeno es evitar el miedo y rechazo por parte de los pacientes, que suele ser habitual, a una probable infección cruzada. Así mismo,

pueden mejorar su viabilidad para tratamiento con ROG si presentan también la capacidad de osteoinducción. La mejora de las propiedades osteoinductivas podría conseguirse a través de la funcionalización superficial de estas membranas poliméricas de tal manera que la incorporación de capas delgadas de depósitos de cristales a escala nanométricas cree una superficie de topografía más compleja que incremente la capacidad osteoinductora.

### Membranas de PLGA

El ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA) es un polímero sintético biodegradable, biocompatible, termoplástico y el más simple de los poliéster alifáticos lineales. Puede prepararse a partir de ácido glicólico por medio de la policondensación o ciertas formas de polimerización. Los poliésteres sintéticos biodegradables como el poliglicólico (PGA), poliláctico (PLA) y sus derivados como el copolímero poliláctico-co-glicólico (PLGA) están siendo ampliamente usados en regeneración ósea. El poliglicolato se ha conocido desde 1954 como una fibra dura de formación polimérica. En la actualidad el poliglicolato y sus copolímeros con o sin ácido láctico son ampliamente utilizados como material para la síntesis de suturas absorbibles y se están evaluando en otras áreas del campo biomédico. Estos materiales han ofreciendo generalmente buena biocompatibilidad y procesamiento. Sin embargo, han aparecido numerosos problemas durante el uso de estos biopolímeros cuando son aplicados en ingeniería de tejidos, por ejemplo, problemas asociados al PLGA respecto a la hidrofobicidad, que comprometen su resistencia mecánica y facilitan la liberación de restos ácidos por degradación, disminuyendo el pH favoreciendo la proliferación bacteriana y los procesos inflamatorios. Para intentar paliar estos inconvenientes se han incorporado en el PLGA materiales inorgánicos a modo de composites, como la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP) o cristales bioactivos, actualmente en estudio<sup>19, 21-27</sup>.

Todo lo anterior explica por qué las investigaciones en el campo de los biomateriales constituyen un ejemplo claro de actividad interdisciplinaria que no puede ser encuadrada de forma única dentro de los límites de las materias universitarias

tradicionales. De esta forma, mientras la ciencia de los biomateriales y la nanomedicina estudian los parámetros que definen las interacciones entre estos materiales con un sistema biológico, la ingeniería de biomateriales incluye la investigación y desarrollo de materiales con control de calidad, tanto en lo que se refiere a su estructura como a su tamaño, tomando como referencia para ello la escala de nanómetros, lo que está dando lugar en el momento presente al desarrollo de la nanotecnología. Esta naturaleza multidisciplinaria hace que tanto la ciencia como la ingeniería de los biomateriales compartan áreas temáticas pertenecientes a variados sectores del conocimiento, como es el caso de las ciencias básicas, las especialidades médicas y la ingeniería.

Tanto en medicina como en biomedicina se hace un profuso uso de los biomateriales en los campos de la cirugía en sus diferentes modalidades (traumatología, oftalmología, cirugía general, etc.), así como en odontología.

Por último, en el campo de la ingeniería, destacan los estudios centrados en las características de los materiales en sí: su composición, mecánica y química. Puede por tanto afirmarse que tanto en la ciencia como en la ingeniería de los biomateriales, más que en ninguno de los otros campos de la tecnología contemporánea, se reúnen investigadores con diferente formación académica, por lo que es necesario mantener una comunicación clara y fluida<sup>18, 19</sup>.

## Injertos óseos

Aunque la ROG es un procedimiento avalado, se puede asociar al uso de injertos de sustitutos óseos, de forma que las membranas cumplirían la función añadida de preservar y estabilizar este injerto, mientras que los materiales de injerto conseguirían mantener el espacio para evitar el colapso.

Según Block y Kent<sup>28</sup>, los injertos deben cumplir con varias características para considerarse ideales:

1. Deben tener capacidad para producir hueso por proliferación celular de osteoblastos viables trasplantados o por osteoconducción de células a lo largo de la superficie del injerto.
2. Poseer la facultad de producir hueso por osteoinducción de las células mesenquimatosas recogidas en el injerto.
3. Remodelación del hueso inicialmente formado en hueso laminar maduro.
4. Mantenimiento del hueso maduro a través del tiempo sin que la función cause pérdida del mismo.
5. Permitir la estabilidad del implante cuando es colocado simultáneamente con el injerto.
6. Bajo riesgo de infección.
7. Fácil de utilizar.
8. Baja antigenicidad.
9. Alto nivel de seguridad (infecciones cruzadas).

Existen varios tipos de injertos óseos, siendo clasificados éstos según su origen, su composición o su localización anatómica.

### Injertos óseos autólogos

El injerto óseo autólogo o autógeno consiste en la utilización de hueso obtenido a partir del mismo individuo que va a recibir el injerto. El injerto de hueso autólogo se considera el *gold standard* en cirugía ósea reconstructiva, debido a que hay menos riesgo de rechazo del injerto, ya que el mismo se originó en el propio cuerpo del paciente, además de ser osteoinductor y osteoconductor a la vez. Sin embargo, diversos inconvenientes asociados al uso de este tipo de injerto han fomentado la búsqueda de alternativas. Varios de esos inconvenientes son:

- Reabsorción impredecible de alrededor del 60% de injertos en bloque córtico-esponjoso.

- Morbilidad de la segunda área quirúrgica.
- Cantidad limitada de material disponible.

En defectos pequeños podemos conseguir hueso autólogo de zonas donantes intra-orales, si por el contrario el defecto es extenso debemos recurrir a zonas donantes extra-orales.

### Aloinjertos

Este tipo de injertos óseos son obtenidos de un donante y utilizado en otro individuo de la misma especie. Son almacenados en bancos óseos y pueden usarse como aloinjerto óseo liofilizado (*freeze-dried bone allograft/FDBA*), o aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (*desmineralized freeze-dried bone allograft/DFDBA*). Cada uno de ellos tiene sus características, aunque básicamente destacan que el FDBA y el DFDBA tienen una baja inmunogenicidad, obteniendo mejores resultados en ROG. Son biocompatibles y tienen moléculas osteoinductivas como son las proteínas morfogenéticas.

Al desmineralizar el FDBA éste pierde estabilidad mecánica, por lo que si vamos a regenerar un defecto no contenido con DFDBA lo deberemos combinar con un material que nos permita mantener el espacio. La concentración de proteínas morfogenéticas se ha visto que varía en función del banco del que obtenemos el DFDBA, por tanto su capacidad osteoinductiva puede variar.

Podemos usar aloinjertos en bloques o particulados, y de hueso cortical o esponjoso. Tiene como ventajas que es osteoconductor, de cantidad ilimitada y no requiere de zona donante. Como inconvenientes está la controversia sobre su capacidad osteoinductiva y su reabsorción (más rápida DFDBA que FDBA).

### Xenoinjertos

Son de origen animal o de minerales derivados de corales calcificantes o algas.

Xenoinjerto de origen animal: el hueso bovino esponjoso se ha usado extensamente debido a su similitud con el hueso humano. Se le elimina el componente orgánico mediante un tratamiento de calor, mediante un método químico o con la combinación de ambos para evitar el riesgo de reacciones inmunogénicas y transmisión de enfermedades.

El hueso mineral bovino desproteínizado (DBBMs) es un material biocompatible y osteoconductor. Existe controversia sobre la reabsorción de este material. Se ha observado en estudios *in vitro* que algunos osteoclastos son capaces de proliferar en la superficie de DBBM y producir su reabsorción, pero alrededor de este material se observan pocos y pequeños osteoclastos (en comparación con hueso nativo), por lo que su reabsorción es menos pronunciada<sup>18</sup>. Los estudios histomorfométricos no observan disminución del volumen después de un año de usar este biomaterial<sup>29</sup>.

Algunos autores han observado que es un material de muy lenta reabsorción, mientras otros lo consideran un material no reabsorbible.

### Materiales Aloplásticos

Son materiales biocompatibles que pueden hacer crecer hueso o tejido blando adyacentes a ellos por aposición sin evidencia de reacción tóxica.

Se clasifican en:

- a) Reabsorbibles o no reabsorbibles.
- b) Densos o porosos: Los densos prácticamente no se reabsorben y solamente se utilizan para ganar volumen de tejido blando.
- c) Cristalinos o amorfos.

Si se colocan estos materiales en contacto directo con tejido blando, se encapsulan.

La reabsorción se da por dos vías: mediados por la solución (pH ácido) o por las células (mucho más lenta). Cuanta más pequeña es la partícula, más rápida es la reabsorción. Entre sus desventajas están su elevado costo, el no ser un material osteoinductor y la posible reacción de cuerpo extraño del receptor del injerto.

### Mecanismos biológicos de los injertos óseos

Los mecanismos biológicos que proporcionan una base para el injerto óseo son la osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis.

La **osteogénesis** se produce cuando los osteoblastos viables y los precursores de los osteoblastos son trasplantados con el injerto dentro del defecto, donde se pueden establecer centros de formación ósea. Los injertos de hueso autógeno son ejemplos de trasplantes con propiedades osteogénicas.

La **osteconducción** ocurre cuando el material no vital del injerto sirve como un andamiaje para el crecimiento interno de los osteoblastos. Este proceso es generalmente seguido por una reabsorción gradual del material del injerto. El hueso cortical autógeno y los aloinjertos óseos pueden ser ejemplos de materiales de injerto con propiedades osteoconductoras. Tales materiales de injerto, así como los derivados de hueso o sustitutos óseos sintéticos, con o sin factores de crecimiento, poseen propiedades similares osteoconductoras. Sin embargo la degradación y la sustitución por hueso viable son a menudo pobres. Si el material implantado no es reabsorbible, cuyo caso es para la mayoría de los injertos de hidroxiapatita, la incorporación se limita a la aposición de hueso en la superficie del material, pero no ocurre el proceso de sustitución durante la fase de remodelado.

La **osteoinducción** implica la formación de hueso nuevo mediante la diferenciación de células locales no comprometidas de tejido conjuntivo en células formadoras de hueso bajo la influencia de uno o más agentes inductores. La matriz ósea desmineralizada y las proteínas morfogenéticas óseas son ejemplos de dichos materiales de injerto.

Con frecuencia, ocurre que los tres mecanismos básicos de formación ósea están implicados en la regeneración del hueso. De hecho, la osteogénesis sin osteoconducción y osteoinducción es poco probable que ocurra ya que casi ninguna de las células transmitidas mediante los injertos de hueso esponjoso autógeno sobrevive al trasplante. Así, el material de injerto funciona predominantemente como una plataforma para invadir las células del huésped. Además, los osteoblastos y osteocitos del hueso circundante carecen de la capacidad de migrar y dividirse, lo que a su vez significa que el trasplante es invadido por células mesenquimales no involucradas que más tarde se diferencian en osteoblastos.

Sobre esta base, es apropiado definir tres condiciones básicas como prerequisite para la regeneración ósea.

1. Suministro de células formadoras de hueso o de aquéllas que son capaces de diferenciarse en células formadoras de hueso.
2. Presencia de estímulos osteoinductivos para iniciar la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos.
3. Presencia de un entorno osteoconductor que forme un andamiaje sobre el que pueda proliferar el tejido invasor y en donde células osteoprogenitoras estimuladas puedan diferenciarse en osteoblastos y formar hueso.

Actualmente, varios productos biológicamente activos están disponibles con la intención de mejorar la proliferación y diferenciación celular, permitiendo un proceso de señalización anabólica más rápida y predecible entre el injerto y el huésped (Tabla 1).



Biomaterial	Ejemplo
Autoinjerto	Rama mandibular, mentón, calota, cresta iliaca
Aloinjerto	Hueso liofilizado calcificado, hueso liofilizado descalcificado
Xenoinjerto	Matriz mineral de origen bovino, hidroxiapatita derivada de bovino (HA)
Aloplásticos	HA: HA densa, HA porosa, HA reabsorbible Fosfato tricálcico (TCP), cemento de fosfato de calcio Polímeros para reemplazo de tejidos duros Vidiro bioactivo (SiO <sub>2</sub> , CaO, Na <sub>2</sub> O, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) Carbonato de calcio derivado de coral
Polímeros y colágenos	Colágeno Poli (láctico-co-poliglicólico) (PLGA) Metilcelulosa Ácido hialurónico Chitosan
Factores de crecimiento	Derivado de la matriz del esmalte Proteínas morfogenéticas PDGF

Tabla 1: Distintos materiales utilizados en ROG.

### Factores de crecimiento utilizados en la reparación del hueso

En el mismo momento que se hace la incisión quirúrgica, un coágulo de sangre se forma en el sitio de la herida, liberando factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) provenientes de la degranulación plaquetaria<sup>30, 31</sup>.

Estos mitogénicos atraen a células madre mesenquimales (MSC) y a fibroblastos para que emigren al sitio de la herida ósea y estimulen la proliferación y la diferenciación de precursores osteoblásticos<sup>32</sup>. El proceso de neogénesis tisular es seguido por la formación de un tejido de granulación que constituye una fuente de futuras células de tejido conjuntivo, tales como osteoblastos, fibroblastos del ligamento periodontal o

cementoblastos<sup>33</sup>. Para la regeneración del hueso alveolar, las células mesenquimales son transformadas en células osteoprogenitoras mediante la expresión localizada de BMP<sup>34</sup>.

Los enfoques en la cicatrización de heridas usando factores de crecimiento que tengan como propósito la restauración del hueso que soporta el diente, el ligamento periodontal y el cemento, han avanzado el campo de la medicina regenerativa oral y periodontal. Varios estudios en la reconstrucción oral y craneofacial han evaluado el impacto de las estrategias de transporte de los factores de crecimiento usando células productoras del factor de crecimiento, proteínas o genes que codifican los factores de crecimiento<sup>35</sup>.

La Figura 5 destaca los diversos sistemas de transporte, biomateriales de injerto y reemplazo óseo y factores de crecimiento utilizados clínicamente. Los avances en la clonación molecular han puesto a disposición cantidades ilimitadas de factores de crecimiento óseos recombinantes para aplicaciones en la ingeniería de tejidos del complejo facial incluyendo el hueso alveolar. Factores de crecimiento recombinantes conocidos por promover la cicatrización de la piel y los huesos, tales como PDGF<sup>36,37</sup>, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF)<sup>38,39</sup>, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF)<sup>40</sup> y BMP<sup>41</sup> se han utilizado en ensayos preclínicos y clínicos para el tratamiento de defectos óseos periodontales grandes, así como alrededor de implantes dentales<sup>14,30</sup>. La BMP-2 está actualmente aprobada por la FDA para la reparación local de la cresta alveolar y los procedimientos de elevación del seno, mientras que el PDGF está aprobado para la reparación de grandes defectos óseos asociados con dientes periodontales afectados y para la reparación tisular de tejidos blandos en defectos de recesión.

Inflamatoria	PDGF	Plaquetas	Aumenta la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos
	TGF- $\beta$	Plaquetas, leucocitos, fibroblastos	Aumenta la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos Expresión autocrina- generación de citocinas adicionales (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PPDG, y quimioquinas)
Proliferativa	VEGF	Plaquetas, leucocitos, fibroblastos	Aumenta la permeabilidad vascular
	EGF	Macrófagos, células mesenquimáticas, plaquetas	Estimula la proliferación y la migración endotelial
	FGF-2	Macrófagos, células endoteliales	Estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de MEC Aumenta la quimiotaxis, la proliferación y la diferenciación de células endoteliales
	KGF (FGF-7)	Queratinocitos, fibroblastos	Estimula la proliferación y la migración epitelial
	PDGF	Macrófagos, células endoteliales	Estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de ECM Aumenta la quimiotaxis, la proliferación y la diferenciación de células endoteliales
	TGF- $\beta$	Macrófagos, leucocitos, fibroblastos	Estimula la proliferación y la migración epitelial Estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de MEC Inhibe las proteasas y aumenta la producción de inhibidor
	VEGF	Macrófagos	Aumenta la quimiotaxis de células progenitoras endoteliales Estimula la proliferación de células endoteliales
	Remodelado óseo, síntesis de matriz	BMP-2-4	Osteoblastos
BMP-7		Osteoblastos	Estimula la diferenciación de osteoblastos y condroblastos
FGF-2		Macrófagos, células endoteliales	Estimula la migración de células progenitoras mesenquimáticas
IGF-II		Macrófagos, fibroblastos	Estimula la proliferación de osteoblastos y la síntesis de ECM
PDGF		Macrófagos	Estimula la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos Estimula la proliferación de células progenitoras mesenquimáticas
TGF- $\beta$		Fibroblastos, osteoblastos	Induce la apoptosis de células endoteliales y fibroblastos Induce la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos Estimula la quimiotaxis y la supervivencia de los osteoblastos
VEGF		Macrófagos	Quimiotaxis de células madre mesenquimáticas, efecto antiapoptótico sobre las células formadoras de hueso, promoción de la angiogénesis

Figura 5: Diversas moléculas con implicación en la regeneración ósea y utilizadas clínicamente.

### 2.3. Biomaterial

El concepto actual de biomaterial es el de cualquier material, no necesariamente biológico, que es tolerado por el organismo y puede, por tanto, tener un uso protésico o inducir un proceso reparativo en la búsqueda de la *restitutio ad integrum* del tejido lesionado. Este último concepto implica además que el tejido dañado es sustituido por otro de idénticas características de tal modo que, en el caso que nos ocupa, el resultado final sea un tejido óseo y no un tejido cicatricial funcionalmente inadecuado e incapaz de restaurar la función perdida.

## Biomateriales en medicina y odontología

En medicina, los biomateriales tienen un alto valor añadido. Su desarrollo y uso se ha hecho profuso en sus diferentes campos, destacando el de la ingeniería tisular, área en expansión que, asentada en los conocimientos básicos de la histología, tiene por objeto construir tejidos nuevos, funcionalmente activos, a partir de células procedentes de cultivos desarrollados previamente y de biomateriales de distinta naturaleza que sirven como soporte o andamiaje<sup>42</sup>.

La ingeniería tisular se asienta en los conocimientos histológicos y recibe asimismo aportaciones de otras disciplinas fundamentales que ayudan al logro final del objetivo propuesto: la construcción de un nuevo tejido vivo y funcional capaz de sustituir con eficacia al tejido original dañado.

### Biomateriales cerámicos

Entre los distintos grupos de biomateriales que se utilizan en medicina y odontología encontramos los denominados cerámicos. Si bien en principio su principal ventaja parecía ser la baja reactividad química, es decir, su carácter inerte y por tanto su biocompatibilidad, se ha demostrado que no todas las biocerámicas son inocuas, dándose la circunstancia de que gran parte de las utilizadas en cirugía reconstructiva presentan bioactividad. Estos productos se introdujeron en la década de los setenta, cuando comenzaron a detectarse fracasos en los materiales que hasta ese momento se utilizaban, como el acero, aleaciones de cobalto y el polimetilmetacrilato.

Entre las cerámicas más desarrolladas se encuentran los biovidrios, empleadas principalmente en la reparación de huesos, debido a su eficiente capacidad de integración con el tejido vivo. Así mismo, se avanza en la investigación de los cementos quirúrgicos, provistos de actividad biológica, lo que ha dado pie a una mejora de la fijación y estabilización del implante a largo plazo, ya que la acción de dichos rellenos promueve la diferenciación celular e induce la formación de depósitos de hidroxiapatita

proveniente del medio biológico en la zona de contacto entre el cemento y el hueso, lo que posibilita el crecimiento de tejido nuevo.

### Biomateriales metálicos

Otro grupo de biomateriales son los denominados metálicos. El principal límite para su utilización es la tolerancia por el organismo, por lo que es determinante la cantidad de producto que pueden llegar a aportar a los tejidos vivos. Así mismo, es también imprescindible que tengan una buena resistencia a la corrosión<sup>43</sup>.

En el momento actual se investiga en la mejora de las propiedades mecánicas de las aleaciones usadas de forma habitual, así como en lograr que sus superficies tengan texturas adecuadas que provoquen la respuesta biológica deseada.

Bajo esta premisa, se han desarrollado microelectrodos en dispositivos neurológicos que resisten la corrosión, especialmente el fenómeno de tensión – corrosión (*stress*, corrosión, *cracking*) inducida por el medio biológico.

También se está prestando una especial atención a las propiedades súper elásticas de diferentes aleaciones, como la de níquel y titanio, así como al fenómeno de memoria de forma. Este conocimiento se ha aplicado para la creación de dispositivos tubulares expansibles (*stents*), usados en medicina con el propósito de mantener abiertos conductos tales como arterias, venas, uretra y tráquea, evitando así su colapso. El término superelástico describe la capacidad de algunas aleaciones metálicas de sufrir grandes deformaciones y retornar a la forma original una vez que la fuerza que la genera desaparece. Por ejemplo, un acero inoxidable común sufre deformaciones elásticas de un 0,5%, mientras que las aleaciones utilizadas en los *stents*, alcanzan deformaciones de hasta un 11%<sup>43</sup>.

### Biomateriales poliméricos

Por último encontramos el grupo de los biomateriales poliméricos. La gran variedad de fórmulas y la versatilidad de diseño (fibras, tejidos, películas, bloques) de

estos materiales los han convertido en los componentes utilizados de forma más frecuente en la fabricación de dispositivos biomédicos. Clásicamente se han clasificado en naturales y sintéticos, si bien funcionalmente se diferencian en bioestables: de carácter permanente y particularmente útiles para sustituir de forma parcial o total tejidos u órganos lesionados o destruidos, y biodegradables: es decir, de carácter temporal, y por tanto con una funcionalidad limitada, ceñida al tiempo en el que el problema subsista. Así mismo, se desarrollan materiales híbridos formados por la combinación de productos de naturaleza sintética y natural.

### **Evolución de los biomateriales**

Los primeros polímeros degradables desarrollados y los más comúnmente utilizados son los obtenidos a partir del ácido poliglicólico (PGA) y del ácido poliláctico (PLA), los cuales han encontrado multitud de usos en la industria médica, comenzando con las suturas biodegradables que fueron aprobadas en 1960. En 1980, Nyman y cols.<sup>15</sup>, publicaron un estudio sobre el principio de la RTG para regenerar hueso alveolar. En ese trabajo utilizaron ya barreras para prevenir la aparición de repoblación de células ajenas al tejido óseo vecino en el área lesionada tratada. La meta de la ingeniería tisular era superar las limitaciones de los tratamientos convencionales basados en el trasplante de órganos y la implantación de biomateriales para producir una fuente de órganos “artificiales” inmunológicamente tolerantes y sustitutos de tejidos que puedan crecer con el paciente. Desde entonces, numerosos dispositivos basados en PGA y PLA han sido desarrollados en forma de copolímeros, los cuales han sido aceptados como materiales de uso biomédico. Estos implantes deben permitir una reparación permanente de órganos y tejidos dañados, sin la necesidad de terapias suplementarias, las cuales hacen al tratamiento más caro a largo plazo. La utilización de esta metodología implicaría la disminución de muchos de los problemas relacionados con otras técnicas como: segundas intervenciones costosas y dolorosas de extracción de materiales no reabsorbibles, en caso de tejidos de autoinjertos la disponibilidad del donantes o en

caso de aloinjertos las reacciones de rechazo o el riesgo de infección y formación de tejido fibroso, asociados a los implantes permanentes<sup>16, 17</sup>.

Actualmente nos encontramos en la tercera generación de biomateriales. Los materiales diseñados en esta generación buscan interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, y combinan las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material, por lo que cada vez los criterios se van acercando más a lo que sería el biomaterial ideal.

La ingeniería de tejidos es una de la áreas con más potencial dentro de la medicina regenerativa. Su principal objetivo es crear materiales que induzca una reacción controlada por parte del tejido vivo y eliminarse completamente por vías metabólicas. Es decir, materiales bioactivos y bioabsorbibles, como los polímeros biodegradables principalmente, que presentan capacidad de degradarse gracias a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas. Actualmente son los materiales más atractivos para la elaboración de andamios en ingeniería de tejidos.

Los andamios elaborados a partir de este tipo de polímeros ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales, por ello, en la actualidad los polímeros continúan en amplio crecimiento y sus aplicaciones son cada vez mayores dentro del campo de la medicina, mejorando las propiedades de los materiales ya existentes y desarrollando nuevos polímeros reabsorbibles por el organismo para aplicaciones biomédicas específicas, como es el caso de la ROG<sup>19, 44-50</sup>.

Numerosos materiales metálicos, cerámicos y poliméricos de orígenes biológicos o sintéticos han sido usados y propuestos como *scaffolds* en reconstrucción de tejido óseo, observándose una dramática reducción del uso de materiales membranosos no reabsorbibles frente al uso de los materiales reabsorbibles. Tradicionalmente, las reparaciones de los grandes defectos óseos y condrales constituyeron y todavía son un reto para cirujanos del sistema musculo-esquelético. La regeneración ósea y la posibilidad de hacer crecer hueso han ocupado parte del afán investigador de traumatólogos y cirujanos ortopedas durante siglos. Un gran defecto óseo se consideraba frecuentemente irrecuperable por lo que en ocasiones los pacientes que los padecían se clasificaban como candidatos a la amputación.

Las necesidades de regeneración ósea incluyen no solamente los defectos postraumáticos sino también los causados por otras patologías musculoesqueléticas como tumores, enfermedades inflamatorias, osteopenia, infecciones y necrosis entre otras, y, sobre todo, defectos óseos relacionados con ciertas técnicas quirúrgicas como osteotomías, aunque, por su frecuencia, merecen mención especial las osteolisis provocadas por el desgaste y la producción de partículas desprendidas de biomateriales empleados en reconstrucciones osteoarticulares. Uno de los problemas más tempranos es la inflamación, cuyos mediadores extracelulares secretados hacen que ésta reacción destructiva ósea persista y se haga crónica.

Los grandes avances que se han producido en ingeniería tisular han dado lugar a la aparición de técnicas que en la actualidad prometen ventajas relacionadas con la implantación quirúrgica de armazones osteoconductores, con transportadores de agentes biológicamente activos u osteoinductores, y finalmente con el trasplante de células aisladas o en soportes. Frecuentemente, osteoconductores, osteoinductores y células óseas indiferenciadas se combinan para tratar defectos óseos. Para los tratamientos de los defectos óseos segmentarios post-traumáticos, tradicionalmente se han venido utilizando técnicas como el acortamiento de la extremidad, el aporte de hueso autólogo no vascularizado, la osteogénesis por distracción así como la transposición de hueso vascularizado y aloinjertos. Sin embargo, actualmente también se han descrito sistemas de relleno con sustitutivos óseos sintéticos como la hidroxiapatita o el fosfato tricálcico entre otros derivados. Las sustituciones óseas en cirugía oncológica son otra de las indicaciones para las nuevas tecnologías.

Aparte de las indicaciones citadas, como también se ha mencionado, la incidencia alta de osteolisis provocadas por el empleo de biomateriales constituye una fuente importante en la demanda de investigación tanto para la preservación del tejido y su buena función como para su regeneración en los casos de destrucción. Por más de tres décadas, las artroplastias totales, principalmente las de cadera y rodilla mejoraron notablemente la calidad de vida de los pacientes.



## Mecanismos para el desarrollo de nuevos tejidos

En la actualidad se han desarrollado tres mecanismos fundamentales para la creación de un nuevo tejido:

1. En primer lugar, el diseño y posterior crecimiento de los tejidos fuera del cuerpo para más tarde implantarlos a fin de reparar o sustituir los tejidos dañados. Ejemplo de este mecanismo es la creación de piel artificial para su utilización en las quemaduras.
2. En segundo lugar se ha inducido la creación de un nuevo tejido utilizando el implante de dispositivos con determinados tipos de células o libres de éstas y el uso de los adecuados factores de crecimiento y estímulo del sustrato biológico en el que se asienta el biomaterial que generalmente configura el dispositivo. Prueba de esta modalidad es la regeneración tisular guiada para estimular la regeneración ósea.
3. Un tercer mecanismo para desarrollar nuevos tejidos consiste en dispositivos internos o externos diseñados mediante el aislamiento de células del organismo y situarlas sobre o dentro de matrices estructurales y ubicar el sistema de nuevo en el organismo o bien hacerlo funcionar desde fuera. Para ello, ha tenido que evolucionar la idea que sobre la matriz extracelular se tenía, que la consideraba como un mero soporte. Hoy sabemos que es un sistema dinámico integrado por diversas moléculas y que su organización varía con los diferentes tejidos. Este conocimiento es uno de los pilares de la ingeniería de tejidos para la elaboración de este tercer tipo de dispositivo, a fin de crear un sustrato ideal para el injerto en el que se produzca el correcto desarrollo y diferenciación celular. La utilización de implantes biocompatibles compuestos por moléculas poliméricas sembradas con células autólogas es una de las estrategias a considerar. El posterior agregado de factores de crecimiento y diferenciación celular incrementará potencialmente la calidad del tejido a reemplazar, aparte de la

necesidad de proveer de un adecuado medio ambiente para el desarrollo celular y tisular, hecho crucial que mantendrá la función celular y el correcto desarrollo del tejido neoformado. Las características básicas que deben tener estos polímeros son:

- Una alta porosidad.
- Gran superficie de contacto celular.
- Estructura constante.
- Forma tridimensional.
- Buena biocompatibilidad.

Su función será la de dirigir el crecimiento celular, bien sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas sobre él<sup>18, 51, 19, 52-55</sup>.

Es importante desarrollar métodos más rápidos y menos costosos que los actuales y que puedan aplicarse sobre sistemas celulares, esto es, *in vitro*, de forma que se evalúe la interacción de nuevos materiales con el medio biológico. Estos desarrollos solucionarían los problemas de biocompatibilidad y reducirían el gran número de ensayos en animales y en humanos *in vivo* que actualmente se llevan a cabo para obtener tal información. Además, podrían predecir con un alto grado de certidumbre el rendimiento biológico del material sometido a estudio. Así mismo, se sigue en la búsqueda de materiales de referencia para la estandarización de los estudios de la relación del biomaterial con la sangre y los tejidos, y la definición de los procesos de esterilización adecuados a las distintas formulaciones y diseños existentes, según Gardner y Peel<sup>42</sup>.

### Citotoxicidad de los biomateriales

La capacidad de los diferentes tóxicos para ocasionar el daño celular, es decir, la citotoxicidad, va a depender de las propiedades físicas y químicas de éstos, si bien su vía común final va a consistir en incidir sobre un sistema enzimático, dando lugar a una

inhibición que será reversible o irreversible. Por otro lado, tal acción estará localizada de forma selectiva sobre sitios específicos de la célula. Tal es el caso de las lesiones sobre la membrana, en las que generalmente se ve alterada la estructura lipoprotéica y con ello la permeabilidad de ésta, lo que conlleva la salida de nutrientes o de iones<sup>56-58</sup>.

Otro nivel de actuación es el endocelular, donde a su vez los bloqueos pueden ocasionarse por diversos mecanismos (ciclo de Krebs, síntesis de ácidos grasos, etc.).

Por último, la lesión de estas sustancias puede tener también como objetivo a veces las organelas celulares, tales como las mitocondrias (responsables de los mecanismos de oxidación), el sistema microsómico (los ribosomas (síntesis de proteínas), el sistema retículo – endoplásmico (inducción enzimática y biodegradación) o las lesiones del núcleo (replicación del DNA y síntesis de proteínas nucleares)).

### Citotoxicidad *in vitro*

La valoración de la citotoxicidad puede llevarse a cabo en diferentes fases. Por una parte encontramos las pruebas iniciales, que más abajo desarrollaremos. Incluyen éstas los modelos para el estudio de la citotoxicidad *in vitro*, en la que los materiales han de ponerse en contacto directo con células cultivadas en laboratorio.

A través de esta metodología se evalúa la morfología celular, las alteraciones en la síntesis de proteínas, la respiración mitocondrial, así como distintas actividades colorimétricas, metabólicas, enzimáticas, hormonales, y radiométricas, por lo que son pruebas que se pueden estandarizar fácilmente.

Además, este tipo de investigaciones evalúan la sensibilidad celular frente a los diferentes biomateriales y reducen por tanto la probabilidad de posteriores fracasos de biocompatibilidad en pruebas *in vivo*, las cuales resultan ser más caras y demandan un tiempo más prolongado.

### Citotoxicidad en pruebas secundarias

Otros tipos serían las llamadas pruebas secundarias. Consisten en evaluar las reacciones inflamatorias y/o inmunes provocadas por biomateriales, usando para ello animales de experimentación.

### Citotoxicidad en pruebas de aplicación clínica

Por último, encontramos las pruebas de aplicación clínica. Se trataría de evaluar los efectos de los biomateriales odontológicos sobre el tejido específico objeto de la aplicación terapéutica. Para ello se utilizan preferentemente primates y seres humanos.

En definitiva, todo el desarrollo de estas pruebas de biocompatibilidad permite evaluar con la máxima efectividad las propiedades de los materiales dentales con la única finalidad de evitar riesgos para la salud del paciente<sup>52-55, 59-64</sup>.

### Necesidad de ensayos celulares y animales.

Tras tomar una primera visión de la viabilidad físico-química del material *in vitro*, el estudio *in vivo* es fundamental para tener constancia fidedigna de la bondad de los cambios introducidos en las membranas de regeneración ósea respecto a la cicatrización ósea. Por supuesto, el modelo animal debe ser un mamífero, por proximidad al ser humano. En este sentido, el empleo del conejo como animal de experimentación es ampliamente aceptado, debido a que supone costes razonables, requiere una infraestructura que generalmente se encuentra disponible en los laboratorios de cirugía experimental y su intervención y manipulación resulta sencilla. La experiencia en el uso del conejo de la raza New Zeland es amplia, desde hace décadas, en estudio de regeneración ósea, ya sea aplicada a materiales de relleno óseo o membranas más o menos avanzadas. Además, el sacrificio de los animales a intervalo de un mes postcirugía permitirá establecer una gradación temporal de la forma en que el proceso de cicatrización y regeneración acontece en los distintos animales y defectos estudiados.

El estudio clínico, el análisis de imagen y el estudio morfoestructural e histomorfométrico permitirá definir, en la fase final del proyecto, la idoneidad de la membrana empleada en la regeneración ósea guiada<sup>21, 27, 65, 66</sup>.

## 2.4. Polímeros

Actualmente existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico, representados por los polímeros biodegradables, aunque existen ciertos materiales cerámicos los cuales también son reabsorbibles. La naturaleza del biomaterial ha sido tema de extensos estudios con diferentes materiales como metales, cerámica, vidrio, polímeros sintéticos y naturales y sus combinaciones. Las propiedades de estos *scaffolds* en ingeniería de tejido óseo se han examinado de forma exhaustiva incluyendo los aspectos relativos a la degradación, a las propiedades mecánicas, a la entrega de citoquinas, iones, porosidad y tamaño de poro<sup>51,19</sup>.

Respecto a la naturaleza de estos polímeros, podemos decir que existen dos grandes familias, los polímeros de origen sintético, como por ejemplo el ácido poliláctico, y los de origen natural, como el colágeno ó dextrano (Figura 6).

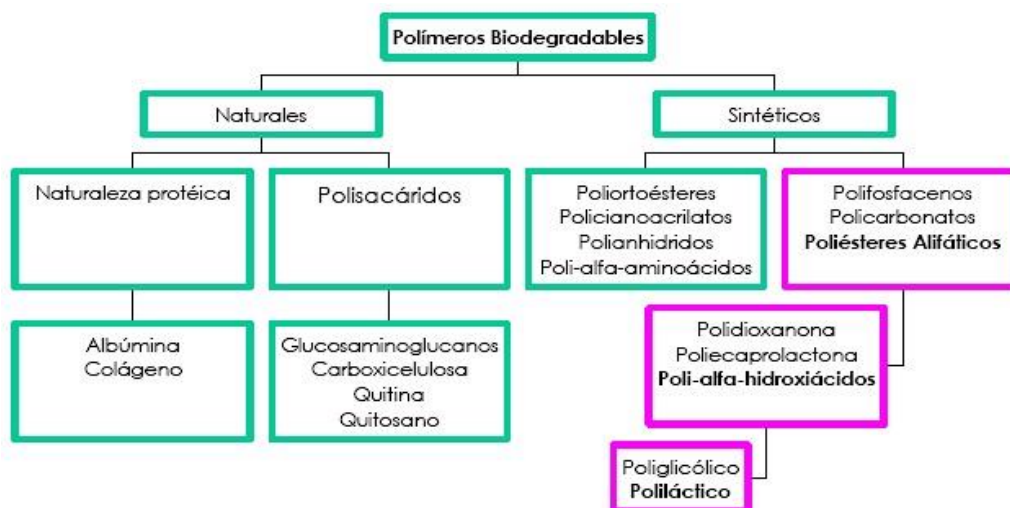


Figura 6: Polímeros biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas.

## Polímeros naturales

La mayor parte de ellos pueden ser fabricados en forma de discos, films o microesferas, pero también se pueden unir covalentemente a fármacos. Se pueden distinguir polímeros de tipo proteínico: colágeno, gelatina, fibrina, albúmina y proteínas, polisacáridos (quitosán), poliaminoácidos, pseudoaminoácidos, celulosa, o bien polímeros de tipo carbohidrato: almidón, dextrano, quitina y ácido hialurónico.

La biodegradación depende del tamaño del implante, de su forma, densidad, lugar de implantación y peso molecular<sup>51</sup> (Tabla 2).

## Polímeros sintéticos

### Ácido poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico, PLA, es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, que ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares. La síntesis del ácido poliláctico se lleva a cabo por la polimerización por apertura de anillo del diéster cíclico. Debido a que el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, el uso de este hidroxiláctico es generalmente considerado como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico. Los poliésteres alfa, como el PLA y sus derivados como el PLGA se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada *in vivo* por la presencia de enzimas, lo cual conlleva a la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico en este caso). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica. En las Figuras 7, 8 y 9 se muestran estos datos y algunas de sus propiedades dentro del organismo.

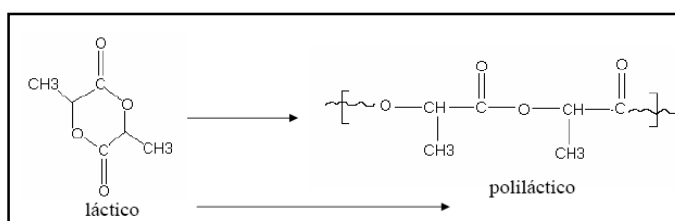


Figura 7: Síntesis del ácido poliláctico.

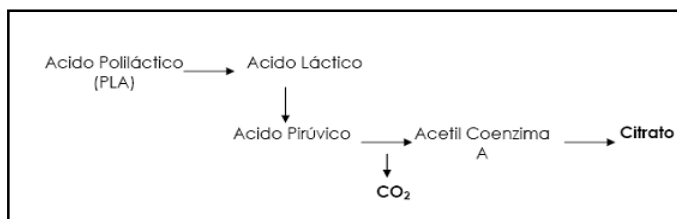


Figura 8: Ruta metabólica del ácido poliláctico.

Algunas propiedades del ácido poliláctico en comparación con el acero y el hueso cortical (100).				
Material	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	E (GPa)	Tiempo Degradación(meses)
L-PLA	173-178	60-65	2,7	> 24
DL-PLA	Amorfo	55-60	1,9	12-16
Hueso			10-20	
Acero			210	

Figura 9: Propiedades del ácido poliláctico en el organismo.

El PLA es actualmente utilizado en multitud de aplicaciones de reparación tisular, siendo una de las aplicaciones más recientes el uso del PLA en el campo de la ingeniería de tejidos, la cual se basa en generar tejidos a partir de células del mismo paciente cuyo crecimiento es guiado *in situ* mediante andamios reabsorbibles. Este tipo de terapia ha sido estudiada para la regeneración de diferentes tejidos como lo son el tejido cutáneo, hepático y el cardiovascular. Otros tejidos como el óseo y el cartílago se encuentran en fase de estudio en estos momentos para optimizar los resultados.

### Ácido poliglicólico (PGA)

Es el poliéster alifático lineal más simple. Es degradable hidrolíticamente, y se utilizó para desarrollar la primera sutura sintética totalmente absorbible, en la década de los 70. También es empleado como mecanismo de fijación ósea (clavos óseos).

Mediante la dimerización del ácido glicólico se obtiene el monómero, el cual polimeriza por apertura de anillo produciendo un material de alto peso molecular y con un porcentaje de monómero residual comprendido entre el 1% y el 3%.

Al igual que el ácido poliláctico, el poliglicólico se sintetiza y degrada en el organismo dando una sustancia no tóxica que es metabolizada de la misma manera por el ciclo del ácido cítrico, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 10.

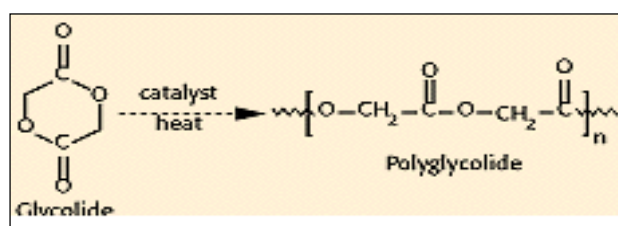


Figura 10: Síntesis del poli (ácido glicólico) PGA.

### Copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA)

Encuadrados dentro de la familia de los poli- $\alpha$ -hidroxiácidos, se han usado para la liberación de esteroides, agentes anticancerígenos, péptidos, proteínas, antibióticos, anestésicos y vacunas.

Sus propiedades fisicoquímicas vienen determinadas por la arquitectura del copolímero y el peso molecular, aunque al tratarse de copolímeros la composición también juega un papel importante.

En la Figura 11 se muestra el esquema de síntesis del ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA) a partir de ácido láctico y glicólico, ambos ácidos naturales presentes biológicamente en el interior celular.

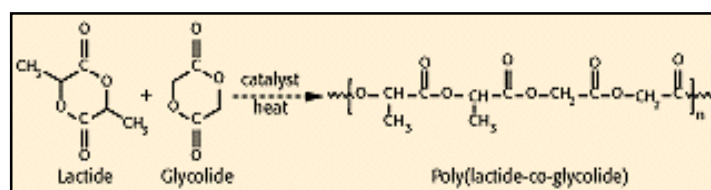


Figura 11: Síntesis del ácido poliláctico-co-glicólico a partir de sus monómeros.



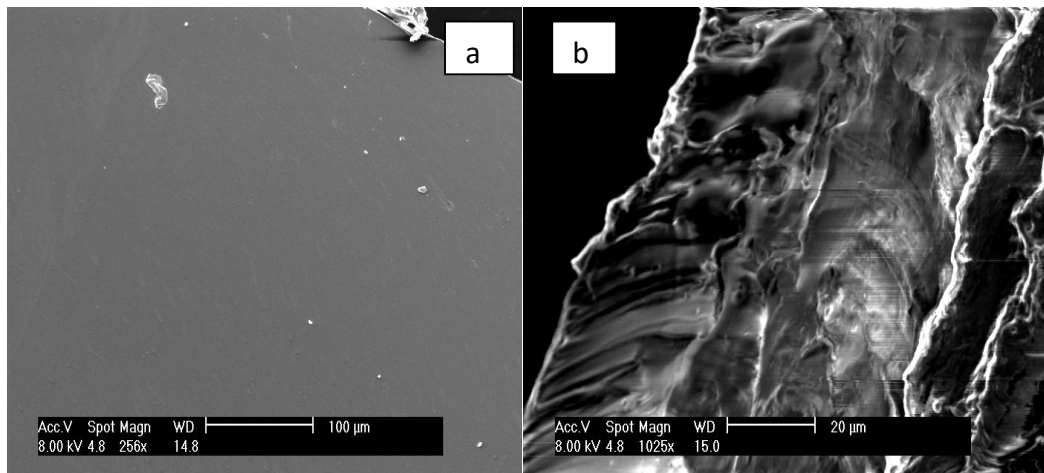
Los materiales bioreabsorbibles son interesantes porque se eliminan sin necesidad de una nueva cirugía. En general, son materiales que se degradan sin dar productos tóxicos para el organismo, siendo éstos eliminados posteriormente.

Los biopolímeros más utilizados como materiales reabsorbibles son los hidroxiácidos que se degradan hasta la mitad de su masa en pocos meses. A la vista de las estadísticas que se realizan sobre el número de fallos producidos en la implantación de materiales poliméricos sintéticos puede afirmarse que actualmente las funciones que llevan a cabo los implantes fabricados en materiales sintéticos pueden llegar a ser tan buenas como los órganos naturales a los que sustituyen <sup>18, 19, 51, 67</sup>.

### PLGA. Diseños morfológicos

#### Membranas 2D

Se componen de láminas finas de scaffolds estructurados en fibras de dimensiones micro/nano-métricas. Estas fibras, hiladas en forma de láminas, establecen un substrato favorable a la adhesión y crecimiento celular. Son fabricadas mediante metodologías de base nanotecnológica basadas en el uso de plasmas fríos y de *magnetron sputtering*, entre otras. Se muestra un ejemplo tipo de estas membranas en la Figura 12 a y b.



**Figura 12:** 12a: Micrografía de superficie de una membrana tipo de PLGA a SEM. Figura 12b: Microestructura interna de la membrana a FSEM alta resolución.

### Discos y cilindros 3D

Se trata de masas de poliláctico cilíndricas a modo de relleno de cavidades óseas peri-implantarias. Los tamaños y curvaturas dependen de la zona tratada.

### Esferas 3D

Desde hace pocos años ha aumentado el uso de estos polímeros de PLGA en forma de inyectables conteniendo microesferas. La Figura 13a muestra una micrografía en la que se puede apreciar la homogeneidad de las microesferas, y la Figura 13b su proceso de degradación al ponerse en contacto con los fluidos del cuerpo produciendo fragmentos de polímero más pequeños.

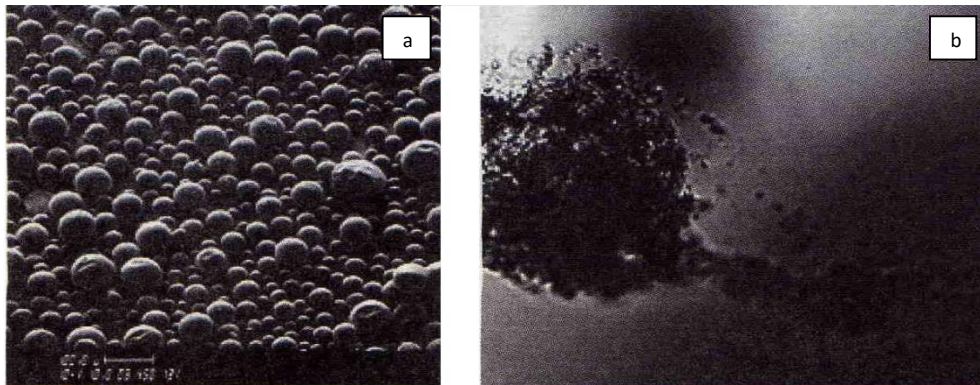


Figura 13: Figura 13a: Microesferas de PLGA. Figura 13b: Degradación de una micropartícula.

Los beneficios que proporciona este sistema son, entre otros, una magnífica biocompatibilidad y una excelente reproducibilidad tanto en el proceso de microencapsulación como en el de liberación del principio activo. Con este sistema de microesferas 3D se ha elaborado un anticonceptivo inyectable que contiene microesferas portadoras de esteroides. En otros casos, como es el de la liberación de determinadas proteínas, péptidos o antígenos se han encontrado problemas. Por ejemplo, en el caso de dispositivos que contienen la hormona del crecimiento aparece una notable pérdida de actividad después de pocos días, que se atribuye a interacciones entre el polímero y la hormona. Por el contrario en otros casos, como es el de la hormona luteínica, se han encontrado muy buenos resultados, debido a que los polipéptidos de bajo peso molecular son muy estables tanto en presencia del copolímero como de sus residuos de bioerosión<sup>18, 19, 51</sup>.

#### Otros tipos de *scaffolds*

Nanotubos de carbono (SWNTs): han sido propuestos como la carga ideal para la siguiente generación de nanomateriales, debido a sus características mecánicas excelentes.

Geles de liberación controlada de drogas: hidrogeles diversos están comenzando a utilizarse en aplicaciones de contacto con sangre y fluidos oculares debido a la baja adsorción de proteínas que poseen y a la capacidad de lubricación. Se trata de geles

poliméricos de disolución controlada, que portan microvesículas de drogas para tratamiento de patologías específicas. En las Figuras 14a y 14b se muestran dos ejemplos del mecanismo de acción de estos scaffolds en forma de gel.

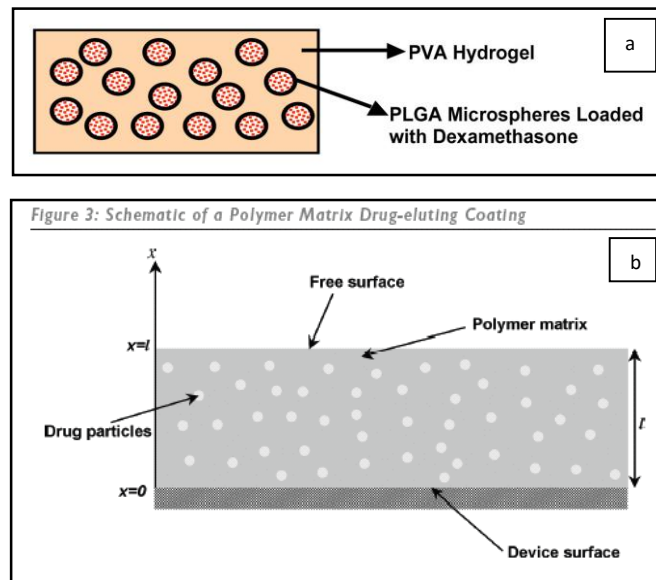


Figura 14a y 14b: Esquemas tipo de un sistema terapéutico en gel.

### Técnicas de elaboración de andamios poliméricos para ingeniería de tejidos

Las estructuras poliméricas porosas pueden ser obtenidas a través de numerosos métodos. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio.

Algunas de las técnicas utilizadas hoy en día para la fabricación de andamios porosos se encuentran resumidas en la Figuras 15 y 16.

Polímero	Tiempo de eliminación (meses)
Poliácido D-Láctico	12-16
Poliácido L-Láctico	18-24
PLGA	6-12
Policaprolactona	18-24
Poliglicol	2-4
Polihidroxitirato	18-24
Poliésteres de fosfato	12-24
Poliortoésteres	12-24
Polianhídridos de alcanos	0.2-4
Polianhídridos aromáticos	6-12
Gelatina	0.2-1
Celulosa oxidada	0.2-1
Colágeno	0.2-1
Pseudopoliaminoácidos	2-24
Poliiminocarbonatos	4-12
Polifosfacenos	6-18
Polipropilénfumarato	12-24

Tabla 2: Tiempo de degradación de los principales polímeros en investigación.



Figura 15: Imagen tridimensional de algunas matrices y técnicas de elaboración de andamios poliméricos para ingeniería de tejidos.

<i>Método</i>	<i>Capa Modificada</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Técnica</i>
Mecánicos	Modificación de la topografía a escalas micrométricas	Diferentes rugosidades	Pulido, blasting, grinding
Litográficos	Modificación de la topografía a escalas micro y nanométrica	Diferentes rugosidades y patrones	Fotolitografía, Láser, haz de electrones, capas coloidales
Químicos	Alteración de la superficie químicamente		Inmersión en ácidos, peróxidos, ...
	Depósito de películas delgadas por Sol-Gel	Propiedades fisico-químicas diferentes	Sol-Gel
	Depósito de películas delgadas por evaporación térmica	Propiedades fisico-químicas diferentes	CVD, PECVD
	Adsorción y autoensamblado de bio-moléculas		Métodos Bioquímicos SAM's, LB,...
Físicos	Depósito de películas delgadas en forma de spray	Películas porosas	Spray Térmico, flama, sónico
	Depósito de películas delgadas por evaporación física	Películas densas, duras y resistentes al desgaste y corrosión	Sputtering, Arco catódico, Evaporación, haz de iones
	Modificación de las capas superficiales	Implantación iónica	Nitruración, iones de Ca, P, Na, etc.
	Funcionalización	Grupos amino, hidroxilos, carboxilos o epóxicos	Descargas gaseosas

Figura 16: Métodos y técnicas de modificación superficial clasificados así como el efecto de dichas modificaciones sobre las propiedades superficiales.

## Unión de fibras

Esta técnica consiste en la elaboración de redes interconectadas mediante la unión de fibras. Para esto se utilizan dos polímeros diferentes como el PLA y el PGA. Las fibras del PGA son alineadas con la forma final de la estructura deseada, y son embebidas en una solución de PLA/cloruro de metileno. Después de la evaporación del solvente, los polímeros son calentados por encima de su temperatura de fusión. Finalmente el PLA es disuelto en cloruro de metileno, dejando las fibras de PGA unidas de forma tal que forman una estructura porosa. Esto se puede conseguir ya que el PGA es insoluble en el cloruro de metileno. Dada la especificidad del solvente, del par de polímeros y de sus temperaturas de fusión, esta técnica es de difícil aplicación con otros polímeros. En general, casi todas estas técnicas pueden ser utilizadas no sólo para

elaborar esponjas poliméricas, sino también para generar materiales compuestos porosos. Para esto, se añaden las partículas o fibras de la fase de refuerzo (fosfato de calcio) en la fase inicial de la elaboración de las estructuras.

### *Gel casting*

Este método consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico como la acetona. La solución polimérica es colocada 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.

### *Disolución y colado con liberación de partículas*

En este método se incorpora a la solución polimérica una proporción determinada de partículas minerales (cloruro de sodio) u orgánicas (sacarosa).

La mezcla es luego colada en un molde donde el solvente se evapora o puede ser procesada por *freeze-drying* (técnica recientemente utilizada en la fabricación de geles de poliláctico ó colágeno para la liberación controlada de drogas).

Una vez evaporado el solvente, las partículas son disueltas en agua dejando a su paso los diferentes poros. Con esta técnica se pueden conseguir porcentajes de porosidad bastante elevados. El tamaño de los poros dependerá de las partículas utilizadas.

### *Laminación de membranas*

Es similar a la técnica conocida como *Laminated Object Manufacturing* (LOM) usada en la creación rápida de prototipos.

Consiste en la utilización de diferentes *films* porosos generalmente obtenidos a partir de la técnica de disolución y colado con liberación de partículas, y colocados uno

sobre otro unidos con la ayuda de la impregnación con cloroformo en la superficie, para obtener estructuras tridimensionales de forma compleja.

### Separación de fases

El polímero se disuelve en un solvente como el dioxano a una temperatura baja. La separación líquido-líquido, y posteriormente 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, el solvente utilizado y la estrategia de enfriamiento juegan un papel fundamental en la morfología final de los poros.

### Saturación con gas

Para esto se utilizan especímenes poliméricos sólidos previamente prensados, los cuales son expuestos a altas presiones de CO<sub>2</sub> permitiendo así la saturación del polímero con el gas. Se crea una inestabilidad termodinámica al reducir la presión del gas a niveles ambientales que conlleva la nucleación y expansión del CO<sub>2</sub> disuelto, generando así macroporos. La mayor ventaja de este proceso es que no utiliza solventes orgánicos.

La mayor desventaja es que el producto final es poco poroso en la superficie y además permanece un cierto porcentaje de porosidad cerrada en el interior del material. Para solucionar estos problemas se está utilizando esta técnica en combinación con partículas solubles en agua.

### Liofilización

Esta técnica es similar a la separación de fases. Consiste en liofilizar soluciones congeladas del polímero con ácido acético glacial o benceno. La morfología de las



esponjas depende notablemente del polímero y del solvente. Por ejemplo, el benceno, induce una estructura de tipo capilar, mientras que el ácido acético produce una estructura de tipo librillo.

## Aplicaciones biomédicas y farmacológicas de los polímeros

### Equipos e instrumentos quirúrgicos

Los materiales más usados son aquellos de origen sintético y que no son biodegradables, como polietileno, polipropileno, policloruro de vinilo, polimetilmetacrilato o policarbonato.

### Aplicaciones permanentes dentro del organismo

Las aplicaciones más importantes son las prótesis o implantes ortopédicos, elementos de fijación como cementos óseos, membranas y componentes de órganos artificiales, entre otros. Entre los materiales más utilizados se encuentran: polímeros fluorados como el teflón, poliamidas, elastómeros, siliconas, poliésteres, policarbonatos, etc.

En el caso de prótesis vasculares, al ser un implante expuesto al contacto con la sangre, la propiedad fundamental requerida es que el material no provoque coagulación. Considerando este requisito, se aplican fibras y espumas de politetrafluoroetileno expandido, poliuretanos segmentados y silicona porosa.

Otro de los campos donde los polímeros empiezan a tener una presencia significativa son los dispositivos de fijación ósea. Una de las opciones en este campo la constituyen los cementos óseos, que son mezclas de materiales cerámicos con polímeros sintéticos rígidos como el polimetilmetacrilato. También se han desarrollado numerosos estudios e investigaciones en el campo de implantes biodegradables que permitan solucionar las dificultades anteriores. Los polímeros o copolímeros de PLGA

son los más empleados para esta aplicación, gracias principalmente a su biocompatibilidad.

### Aplicaciones temporales dentro del organismo

Actualmente, las suturas representan el campo de mayor éxito dentro de los materiales quirúrgicos implantables. El principal motivo es que consisten en materiales biodegradables o bioabsorbibles (principalmente polímeros biodegradables) de manera que la aplicación dentro del organismo pasa de ser permanente a ser temporal.

### Farmacológica

Entre las aplicaciones temporales dentro del organismo hay que destacar también los sistemas de liberación de fármacos. Los polímeros son esenciales para todos los nuevos sistemas de liberación desarrollados. En farmacéutica pueden aplicarse los biopolímeros en terapias inteligentes para:

- Modificar la liberación selectiva de fármacos.
- Localizar selectivamente fármacos en el organismo.
- Mejorar el sobrepaso fármacos a través de barreras tisulares.
- Proteger la estabilidad de los fármacos.

### Matrices o *scaffolds*

Otra aplicación temporal de vanguardia es la de matrices en ingeniería de tejidos. Los polímeros, particularmente los biodegradables, se emplean en el campo de la ingeniería de tejidos como andamiajes temporales en los que las células pueden crecer y formar tejidos, es el caso del poliláctico y sus copolímeros de PLGA, pero para ello necesitan adecuar su biocompatibilidad, su ratio de degradación, su estabilidad

mecánica a la fuerza, la porosidad, el tamaño del poro, su microestructura, topografía, estructura tridimensional, química de superficie así como la elección del diseño y fijación.

En el caso del tejido óseo, los materiales más utilizados en la actualidad para el desarrollo de las estructuras tridimensionales son los poli- $\alpha$ -hidroxiácidos, las hidroxiapatita (HA), y algunos polímeros de origen natural como el colágeno, el quitosán o la quitina. En muchos casos las superficies de los materiales son modificadas con diferentes proteínas y factores de crecimiento que estimulan la respuesta celular, y activan los genes responsables de la diferenciación y mineralización del tejido. A pesar de que actualmente existen diferentes polímeros biodegradables para el desarrollo de estos andamios, el PLA, PGA y sus copolímeros, continúan siendo los más populares y de mayor uso<sup>68-75</sup>.

En la Figura 17 se recogen algunos tipos de biopolímeros para dispositivos y similares en biotecnología.

En la Figura 18 se encuentran algunos de los compuestos para ingeniería de tejidos y sus modificaciones químicas elaborados hasta este momento.

Polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en Ingeniería de Tejidos (4)	
Polímero	Aplicaciones
PLA-PGA	Hueso, Cartilago
Polianhídridos	Hueso, Liberación controlada de fármacos
Poliortoéster	Liberación controlada de fármacos
Policaprolactona	Dispositivos biodegradables de fijación
Policarbonato	Hueso, dispositivos de fijación, liberación controlada de fármacos
Polifumarato	Hueso

Figura 17: Polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en ingeniería de tejidos.

Matriz polimérica	Fase de refuerzo
PCL	HA
PLLA	HA
PLA	Bioglass
Quitosano	TCP, vidrio de fosfato de calcio
PGA	Apatita carbonatada
PLLA	TCP
PDLA	Bioglass
PLLA	Nano HA
Colágeno/PLLA	Nano HA
PLA/PGA	Nitrato de calcio tetrahidratado+amoniohidrógeno fosfato

Figura 18: Algunos de los materiales compuestos para ingeniería de tejidos, desarrollados hasta el momento.

En la Tabla 3 se recogen a modo de resumen algunas de las aplicaciones médicas más extendidas en cada biomaterial.

<b>Biopolímeros</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Polímeros sintéticos no degradables</b>	
Polimetacrilato de metilo (PMMA)	Cemento óseo, dientes artificiales, lentes intraoculares
Polimetacrilato de hidroxietilo (PHEMA)	Lentes de contacto blandas
Epoxis	Materiales protectores, composites de fibra
Fluorocarbonados	Injertos vasculares, catéteres y parches
Hidrogeles y Elastómeros de poliéster	Catéteres y antiadhesivos
Poliacetales	Válvulas cardiacas, partes estructurales
Poliamidas y sus elastómeros	Suturas, catéteres y tapamiento de heridas
Policarbonatos	Membranas de oxigenación y hemodiálisis, conectores
Poliésteres	Injertos vasculares, globos para angioplastia y suturas
Poli (etercetonas) e (imidas)	Componentes estructurales, catéteres y ortopedia
Poli (metilpenteno)	Materiales protectores para dispositivos extracorporales
Poli (olefinas)	Suturas, globos de angioplastia, catéteres, jeringas
Elastómeros de poli(olefinas)	Tubos, corazones artificiales, catéteres
Poli(olefinas) de alta cristalinidad	Globos de angioplastia
Poli(sulfonas)	Componentes estructurales y ortopedia
Poli(uretanos)	Catéteres, corazón artificial, prótesis y recubrimientos
Poli (cloruro de vinilo)	Tubos y bolsa de sangre
Siliconas	Implantes de cirugía plástica, catéteres, válvulas de corazón, membranas permeables al oxígeno, prótesis.
Poli(etileno) de ultra alto peso molecular	Tejidos de alta resistencia
Copolímero de estireno-acrilonitrilo /SAN	Prótesis mamarias
Poliestireno	Kit de diagnóstico, material monouso del laboratorio
Poliacrilonitrilo	Membranas para diálisis
<b>Biorreabsorbibles</b>	
Poli (aminoácidos),	Liberación controlada, péptidos de adhesión celular
Poli (anhídridos)	Liberación controlada
Poli (caprolactonas)	Suturas y liberación controlada
Copolímeros de ácido láctico y glicólico	Suturas, liberación controlada, discos óseos
Poli (hidroxibutiratos) y (ortoésteres)	Liberación controlada, discos óseos
Colágeno	Recubrimientos y reconstrucción tisular
<b>Macromoléculas bioderivadas</b>	
Albúmina entrecruzada	Recubrimientos de injertos vasculares y agente para contraste de ultrasonidos
Acetatos de celulosa	Membranas de hemodiálisis
Citosina	Recubrimientos y liberación controlada
Colágeno y Elastina	Recubrimientos y órganos híbridos
Gelatina entrecruzada	Recubrimiento para corazón artificial

**Tabla 3: Principales aplicaciones de los biopolímeros para los scaffolds en biomedicina.**

## 2.5. Iones inorgánicos. SiO<sub>2</sub>

Un punto común de las estrategias de la ingeniería tisular (IT) son las estructuras tridimensionales, *scaffold*, fabricadas con materiales artificiales o naturales y que tienen un gran porosidad y poros interconectados<sup>76-78</sup>. Estos *scaffolds* no solo deben proveer de una estructura pasiva para las células óseas, sino que deben estimular la proliferación y diferenciación osteoblástica<sup>79</sup>. Se han construido en muchas ocasiones y con éxito, *scaffolds* con una porosidad y propiedades mecánicas deseadas. Se han hecho a partir de cerámicas bioactivas y vidrios, polímeros biodegradables y composites<sup>77,78</sup>. A la hora de fabricar estas estructuras se han propuesto diferentes técnicas como sol-gel y *electro-spinning*<sup>80,81</sup>. Los biomateriales inorgánicos más estudiados (debido a su similitud con la fase inorgánica del hueso) son los fosfatos de calcio (CaP), hidroxiapatita (HA) y beta-fosfato-tricálcico (TCP)<sup>76,82,83</sup>. Estos materiales son biocativos, osteoconductivos y son capaces de pegarse al hueso directamente<sup>84</sup>. Además hay muchos estudios que demuestran *in vitro* e *in vivo* que la HA<sup>86-91</sup> y CaP<sup>92-95</sup> sostienen la adhesión, diferenciación y proliferación de las células osteogénicas tipo osteoblastos. Más aún, se ha demostrado que la mezcla de HA y TCP son osteoinductivas e inducen la expresión genética de las células óseas<sup>94,96,97</sup>.

Los vidrios bioactivos como 45S5 Bioglass<sup>85</sup> y otros compuestos basados en silicatos o fosfatos representan otro grupo importante de biomateriales bioactivos e inorgánicos usado como *scaffolds* en ingeniería tisular ósea<sup>78,85,98,99</sup>. Los vidrios bioactivos (BG) exhiben unas propiedades únicas siendo osteoinductivos, tienen la capacidad de pegarse al tejido blando y duro y forman una capa de HA carbonatada cuando se expone a fluidos biológicos<sup>82,84</sup>. Esta capa es responsable la unión tan fuerte entre los BG y el hueso humano<sup>82,84,85</sup>. Recientemente se ha podido observar que los iones de la disolución de Bioglass (Si, Ca, P) estimulan la expresión de muchos genes de células osteoblásticas<sup>100</sup>. Además los BG han demostrado tener capacidad angiogénica *in vivo* e *in vitro*<sup>101-103</sup>, posibles efectos antibacterianos<sup>104-112</sup> y antiinflamatorios<sup>101</sup>.

Para entender las propiedades de los materiales inorgánicos es imprescindible conocer el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de sus iones en una disolución orgánica. Algunos elementos como el Sr, Cu, Zn, o Co presentes en el cuerpo humano, son conocidos por su efecto anabólico en el hueso<sup>113-115</sup>, nuevas investigaciones se están desarrollando para introducir iones terapéuticos en los *scaffolds*. Como se ha dicho anteriormente la relación de los iones en un ambiente fisiológico afecta favorablemente el comportamiento de las células humanas y mejora la bioactividad de los *scaffolds*. Por ello, los esfuerzos en la investigación están puestos en incorporar esos iones en diferentes CaP y BG para mejorar el rendimiento biológico de los materiales. Por ejemplo algunos estudios muestran la mejora de la bioactividad de la HA dopada con Si<sup>116, 117</sup> y los vidrios de silicio dopados con Sr<sup>118</sup> (Figura 19).

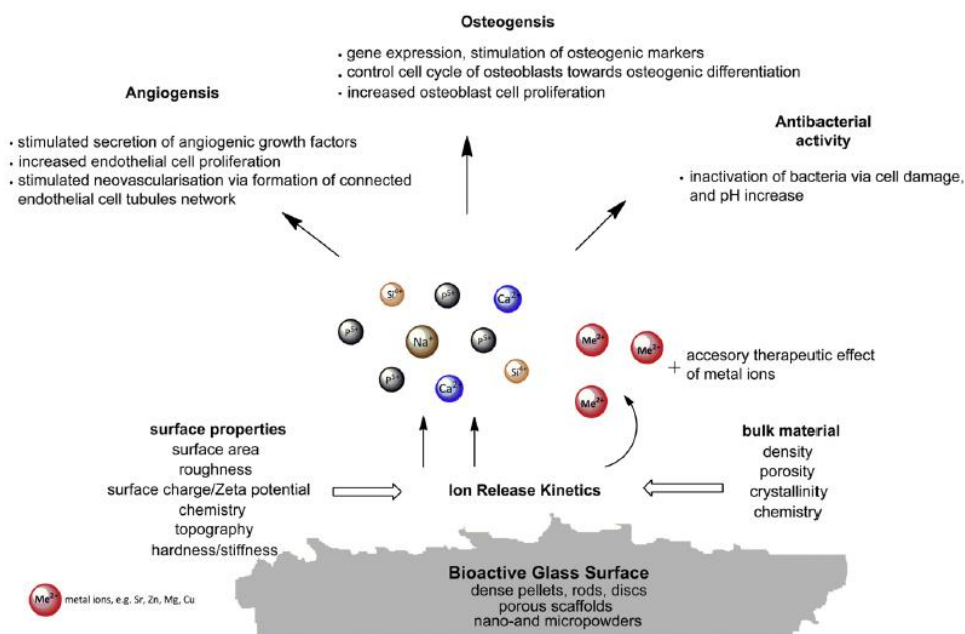


Figura 19: Respuesta biológica a los iones.

Hay diferentes métodos directos e indirectos para evaluar la respuesta de las células a los biomateriales (Figura 20).

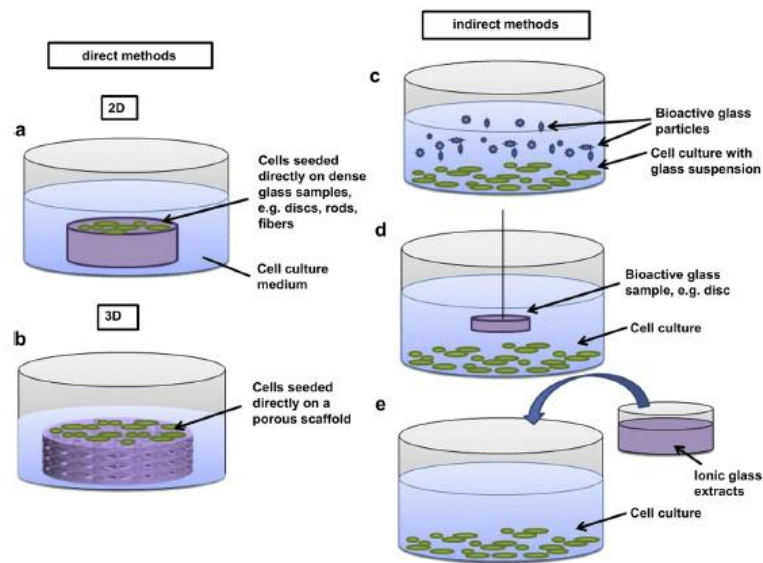


Figura 20: Diferentes métodos para analizar la respuesta celular.

### Rol de los iones inorgánicos en el metabolismo óseo.

El hueso humano es dinámico, altamente vascularizado y con la capacidad de remodelarse gracias al proceso de formación ósea por los osteoblastos y reabsorción ósea por los osteoclastos<sup>119</sup>. El proceso de formación ósea y de reabsorción ósea está regulado por una gran variedad de agentes locales y sistémicos<sup>120</sup> incluyendo factores de crecimiento y hormonas. Además, iones inorgánicos como el calcio<sup>121-124</sup> el fósforo<sup>125</sup>, el silicio<sup>126-128</sup> intervienen en el metabolismo óseo y tienen un papel importante en la angiogénesis, el crecimiento y la mineralización ósea (Figura 21).

Ion	Biological response in vivo / in vitro
Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• essential for metabolic processes, formation and calcification of bone tissue</li> <li>• dietary intake of Si increases bone mineral density (BMD)</li> <li>• aqueous Si induces HAp precipitation</li> <li>• <math>\text{Si}(\text{OH})_4</math> stimulates collagen I formation and osteoblastic differentiation</li> </ul>
Ca	<ul style="list-style-type: none"> <li>• favours osteoblast proliferation, differentiation and extracellular matrix (ECM) mineralization</li> <li>• activates Ca-sensing receptors in osteoblast cells, increases expression of growth factors, e.g. IGF-I or IGF-II</li> </ul>
P	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stimulates expression of matrix la protein (MGP) a key regulator in bone formation</li> </ul>

Figura 21: Respuesta biológica de los iones.

Los iones actúan como enzimas e influyen en la señales y los efectos metabólicos que ocurren durante la formación de los tejidos<sup>129</sup>. Estas propiedades de los materiales hacen que sus iones sean atractivos como agente terapéuticos<sup>130</sup>.

Es importante saber la concentración extracelular de los iones porque pueden afectar a partir de una concentración determinada de manera negativa. Así concentraciones de Ca > 10 mmol son citotóxicas<sup>122</sup>.

Además del Ca y P, en la formación de la apatita ósea hay otros iones que son considerados prometedores en la mejora de la formación ósea como el Si, Sr, Zn, Cu, Mg y B.

El silicio es un elemento importante en la osteogénesis<sup>131</sup>. Tiene un efecto estimulante sobre la actividad celular, es decir, proliferación, diferenciación y mineralización por osteoblastos<sup>132-134</sup>. Algunos autores afirman que la adición de silicio a los fosfatos alcalinos puede aumentar la actividad de estas enzimas y la producción de proteínas en los osteoblastos<sup>135</sup>. Otros autores afirman que el suministro de silicatos a pacientes osteoporóticos en lugar de bifosfonatos, produce un importante aumento de la densidad ósea observada en el fémur y la columna vertebral<sup>131</sup>.

Asimismo el óxido de silicio es un elemento esencial de los procesos metabólicos asociados con la formación y calcificación del tejido óseo<sup>126, 127</sup>. Se han detectado altas concentraciones de Si en etapas tempranas de la calcificación de la matriz ósea<sup>127</sup>. El Si acuoso es capaz de inducir la precipitación de HA<sup>136</sup>. Además el Si dietético aumenta la densidad mineral ósea en hombres y mujeres posmenopáusicas<sup>137</sup>. Un estudio en ratas con déficit de Ca mostraron que un suplemento de Si causó efectos positivos en la densidad ósea gracias a la reducción de la reabsorción<sup>138</sup>. También Nielsen y cols.<sup>139</sup> han sugerido que el Si tiene una función bioquímica en el crecimiento óseo que afecta al volumen de colágeno óseo y a las proteínas de la matriz extracelular como las osteopontinas. El ácido ortosilicato Si(OH)<sub>4</sub> estimula la formación de colágeno I por parte de los osteoblastos y estimula la diferenciación osteoblástica<sup>128</sup>.



## Vidrios bioactivos basados en SiO<sub>2</sub>

Desde que Hench y cols<sup>140</sup> descubrieron el primer material de silicato bioactivo, ahora llamado 45S5 Bioglass (45SiO<sub>2</sub>-25CaO-25Na<sub>2</sub>O-6P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) con sus propiedades biológicas únicas, ha habido mucha investigación sobre la ingeniería tisular. Sin embargo, hasta Xynos<sup>100</sup>, el trabajo investigador no se centró en las interacciones moleculares iónicas, en su entorno fisiológico. Muchos estudios muestran efectos osteogénicos de los vidrios de silicatos bioactivos que se resumen en la Tabla 4.

Glass composition by mol%	Ions released	Conc. [ppm]	Result	Remarks, Conclusions	Ref.
"4555" 46.1SiO <sub>2</sub> -24.3Na <sub>2</sub> O- 27.0CaO-2.6P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Si Ca P Na	16.5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ionic dissolution products directly stimulated the up-regulation of most genes in HOC (up to fivefold) known for their relevant role in bone metabolism</li> <li>• Osteoblast number increased to 150%</li> <li>• Increase in osteoblast number implies increase in cell proliferation.</li> <li>• Si concentration shortens osteoblast growth cycle and promotes the proliferation.</li> <li>• Upregulation of <i>BSP</i> and <i>ALP</i> in FOB cells</li> <li>• Increased cell proliferation (MG 63) on BG pellets (2D) compared to control (Thermanox®) amongst which non-crystallized BG shows best results</li> <li>• Significantly higher cell proliferation on BG-based scaffolds (3D) compared to control</li> <li>• BG extracts create an extracellular environment for support of osteoblast phenotype expression</li> <li>• Increased osteoblast differentiation and enhanced ECM deposition and mineralization</li> <li>• Increased osteocalcin (OCN) and collagen I synthesis</li> <li>• High viability of osteoblasts (5a05-2), murine fibroblasts (L929) and murine lymphocytes (SRD10 T) treated with BG extracts</li> <li>• But decreased osteoblast and fibroblast proliferation</li> <li>• 50 % increase in osteoblast proliferation</li> <li>• Increased collagen production</li> <li>• Extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, via bioglass dissolution, increases the mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> in osteoblast cells</li> <li>• Good attachment, proliferation and nodule formation of osteoblast</li> <li>• Good osteoblast attachment on BG scaffold</li> <li>• Nodules formation and mineralization after 10 days of seeding (without supplements of mineralization agents)</li> <li>• Higher Si concentrations (&gt; 120 ppm) of ions lead to apoptosis</li> <li>• No statistically significant effect on proliferation of HOC</li> <li>• Upregulation of several genes in HOC, e.g. <i>gp130</i>, <i>MAPK3/ERK1</i>, <i>MAPKAPK2</i>, and <i>ICF-L</i></li> <li>• 100% increase in osteoblast proliferation</li> <li>• Stimulated differentiation of bone marrow cells into osteoblast cells in BG (77S as well as control 45S5) conditioned medium</li> <li>• 77S BG caused inhibition of osteoblast cell formation</li> </ul>	Which released ion responsible is unclear	[26]
		30.4			
		2937.0			
		16.58			
		88.35			
		30.45			
		2938.0			
		55.48			
		72.70			
		23.45			
		3341.66			
-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	
-	-	14.5 – 19.4	-	-	-
-	-	47.5 – 49.9	-	-	-
-	-	24.6 – 23.6	-	-	-
-	-	4983.8 – 4895.8	-	-	-
"MBG 85" 85SiO <sub>2</sub> -10CaO -5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	59.2	-	-	[110]
-	-	64.0	-	-	-
-	-	16.9	-	-	-
"BG605" 59.9SiO <sub>2</sub> -38.4CaO -1.7P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	58.06	-	No glass dissolution studies on the BG were performed; ion conc. in culture medium is unknown	[130]
-	-	70.07	-	-	-
-	-	20.02	-	-	[56]
"S520" 52SiO <sub>2</sub> -21Na <sub>2</sub> O-7K <sub>2</sub> O -18CaO-2P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	30	-	-	-
-	-	90	-	-	[117]
-	-	10	-	-	-
-	-	47.7	-	-	-
-	-	0	-	-	[120]
-	-	67.63	-	-	-
"S85" 60SiO <sub>2</sub> -36CaO-4P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	50.02	-	-	[115]
-	-	95.8	-	-	-
-	-	26.4	-	-	-
-	-	50.2	-	-	-
-	-	95.8	-	-	[116]
-	-	26.4	-	-	-
-	-	203.11	-	-	-
-	-	47.06	-	-	[111]
-	-	6.88	-	-	-
"77S" 80SiO <sub>2</sub> -16CaO-4P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	-	-	-	[136]

\*) absolute ion concentration in the cell culture medium after treatment with BG

Tabla 4: Respuesta biológicas a los silicatos.

Un descubrimiento importante de Xynos<sup>100</sup> fue que los productos disueltos de 45S5 Bioglass son capaces de regular la expresión génica de los osteoblastos.

Kaufmann<sup>141</sup> confirmó esos resultados observando la expresión de muchos genes (osteocalcina, osteonectina, osteopontina) en osteoblastos y aumentando la fosfatasa alcalina.

Estudios similares con vidrios bioactivos de sol-gel han sido descritos. Por ejemplo un derivado sol-gel de 77S (mol%: 80SiO<sub>2</sub>-16CaO-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ha demostrado promover la osteoinducción y mejorar la mineralización celular<sup>142</sup>.

Desde que se ha comprobado la importancia de la vascularización en la regeneración ósea, ha habido muchas investigaciones centradas en los efectos angiogénicos de los biomateriales<sup>143</sup>. La vascularización de los tejidos duros juega un papel primordial en la remodelación ósea actuando como reservorio y conducto para las células óseas, factores de crecimiento y permitiendo que se transmitan señales metabólicas<sup>144</sup>. La vascularización del *scaffold* debe mejorar el metabolismo óseo. Por ello, muchos estudios están centrados en investigar el potencial de estimulación de los vidrios bioactivos en la angiogénesis, usando células endoteliales y fibroblastos<sup>145, 146</sup>.

Los iones de los vidrios de silicato han demostrado estimular la osteogénesis y la angiogénesis gracias a la activación de muchos genes asociados con la formación ósea y la vascularización<sup>147</sup>.

Los numerosos estudios llevados a cabo en los vidrios bioactivos confirman la hipótesis de que los iones liberados por los vidrios bioactivos estimulan los genes de las células hacia el camino de la regeneración<sup>148</sup>.

Para mejorar la bioactividad de los vidrios se han incorporado varios metales a la red del silicato. El principal objetivo es aumentar la osteogénesis, la angiogénesis y la promoción de las propiedades antibacterianas. Estos estudios incluyen Co, Zn, Cu, Sr, Zn, Mg, Ag, y F<sup>147</sup>. El control de los iones metálicos liberados desde los *scaffolds* inorgánicos es considerado un buen enfoque para mejorar la capacidad biológica de los *scaffolds* (Figura 22).

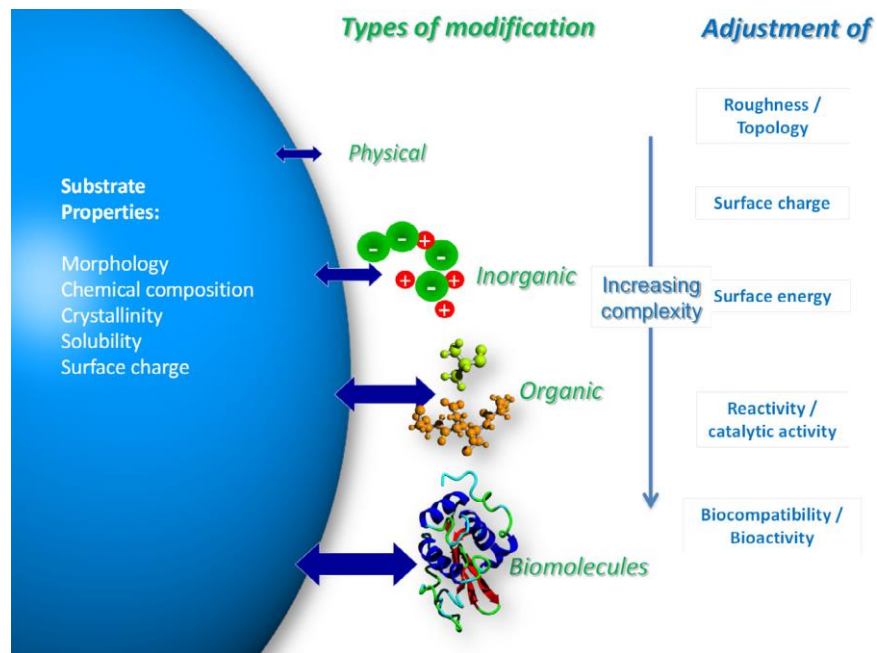


Figura 22: Propiedades del sustrato, el tipo de modificación y el impacto sobre las características de la superficie del material.

## 2.6. Nanomedicina aplicada a la regeneración tisular

La nanomedicina es una ciencia que estudia el desarrollo de materiales biomédicos a escala microscópica, así como sus modificaciones químicas y estructurales. Esta parte de la ciencia se apoya fundamentalmente en la física, la química cuántica, y la electrónica. La ingeniería de tejidos es una rama de la nanomedicina que se basa en la utilización de técnicas nanotecnológicas con las características mencionadas para crear materiales bioactivos y bioabsorbibles, capaces de estimular la respuesta celular y molecular de forma controlada, para que actúen como soportes temporales en la reparación de defectos tisulares. Dentro de esta área existen dos tendencias principalmente, la primera consiste en el desarrollo de andamios tridimensionales acelulares ó *scaffolds*, que servirán para alojar las diferentes células una vez implantados *in vivo*. La segunda tendencia consiste en el desarrollo de matrices tridimensionales, que inicialmente son colonizados por las células progenitoras bajo condiciones *in vitro*, y luego son implantados en el paciente para reemplazar el tejido dañado<sup>149-150</sup>.

## Importancia de las matrices tridimensionales

Las matrices tridimensionales son dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas y las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica y, además, definen la arquitectura del tejido. Las células interactúan con estos dispositivos de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, mientras que sintetizan su propia matriz extracelular, que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido, y sirve como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros.

Las matrices tridimensionales para ingeniería tisular ósea (ITO) deben satisfacer ciertos criterios<sup>18, 19</sup>:

1. Biocompatibilidad; Los materiales y sus subproductos de degradación no deben presentar efectos tóxicos (genotóxicos o citotóxicos) o causar respuesta inmune permitiendo la integración adecuada al tejido hospedador. Deben ser antisépticos y esterilizables.
2. Porosidad; Deben tener poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases y para la remoción de desechos metabólicos como resultado de la actividad celular, lo cual es fundamental en el hueso, debido a sus características metabólicas, ya que se esperan altas tasas de transferencia de masa, incluso cuando se realizan procesos *in vitro*.
3. Tamaño del poro; El tamaño ideal del poro según la ITO varía entre 200 y 900  $\mu\text{m}$ .
4. Propiedades de la superficie; Tanto las alteraciones químicas como topográficas de la superficie pueden controlar y afectar a la adhesión y proliferación celular. Las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción, que es el proceso mediante el cual las células osteogénicas y vasculares migran a la superficie de la matriz tridimensional a través de un

- coágulo de fibrina, que se establece después de implantado el material, para promover la reparación.
5. Osteoinducción; Es el proceso mediante el cual las células madre y osteoprogenitoras son reclutadas en el sitio de regeneración ósea y estimuladas para diferenciarse hacia la línea osteogénica y segregar matriz ósea mineralizada.
  6. Propiedades mecánicas; Dependen del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el implante.
  7. Biodegradabilidad; Para la fabricación de las matrices se deben utilizar materiales que tengan tasas de resorción progresivas que igualen a las de formación ósea, transfiriendo las cargas de manera gradual, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente. La necesidad de un fácil procesado y la capacidad de conformarse en distintas formas son otros requisitos que deberían cumplirse.
  8. Material radiolúcido; Es preferible a la hora de diferenciar radiográficamente el nuevo hueso del material implantado.

### Importancia de la superficie y la interfaz sustrato–matriz extracelular

Actualmente hay consenso en que la complejidad del micro-medioambiente tridimensional que envuelve a las células *in vivo*, incluyendo los cambios en el tiempo de fuerzas y estímulos, influyen de modo significativo en los mecanismos de respuesta celular en términos de cambios fenotípicos, morfológicos y funcionales. Así ha surgido en la última década el concepto de mecanotransducción, basado en la hipótesis de que la topografía de la superficie sobre la que descansan las células adherentes es capaz de inducir cambios en la morfología nuclear y en la transcripción génica, modificándose, por tanto la expresión fenotípica de modo que la respuesta celular y de la matriz extracelular a las características tridimensionales y estructurales de los *scaffolds* va a ser el aspecto fundamental que condicione el diseño y desarrollo de una nueva generación de biomateriales utilizados para la reparación de los tejidos lesionados.

La respuesta inicial del huésped al biomaterial es una reacción inflamatoria desencadenada por el trauma quirúrgico. En estos estadios iniciales, las células comienzan entonces la deposición de una capa de proteínas no colágenas sobre la superficie del biomaterial, que regulan la adhesión celular y la mineralización. Las células, como los osteoblastos que crecen ancladas a una matriz extracelular (ECM), necesitan adherirse al sustrato antes de poder iniciar su funcionamiento normal. Esa capacidad de adherirse al sustrato es lo que permite la señalización desde la ECM al núcleo mediante cascadas de proteínas intracelulares intermediarias. Asimismo, los materiales capaces de estimular la adhesión osteoblástica pueden incrementar su diferenciación funcional regulando genes osteoespecíficos que intervienen en la neogénesis de matriz mineralizada y formación de tejido óseo. Se admite que la topografía de la superficie tiene un papel determinante sobre la adhesión osteoblástica, su migración y metabolismo, modificando y controlando el proceso de diferenciación osteoblástica<sup>67, 151-155</sup>.

Los *scaffolds* para osteogénesis deben mimetizar la morfología ósea, la estructura y función para poder optimizar la integración dentro del tejido implantado. La porosidad y el tamaño del poro juegan un papel crítico en la formación de hueso *in vitro* e *in vivo*. El tejido óseo tiene una morfología trabecular con porosidad del 50-90%. Los poros son necesarios para la formación del tejido óseo, ya que permiten la migración y la proliferación de los osteoblastos y las células mesenquimales, así como su vascularización. Además, una superficie porosa mejora el enclavamiento mecánico entre el implante biomaterial y el hueso circundante natural, proporcionando una mayor estabilidad mecánica a esta interfaz crítica. La necesidad de porosidad en la regeneración ósea ha sido demostrada en distintos estudios<sup>54</sup>.

La porosidad se define como el porcentaje de espacio vacío en un sólido, y es una característica morfológica independiente del material. El tamaño mínimo necesario de poro requerido para regenerar hueso mineralizado se considera generalmente en torno a 100  $\mu\text{m}$ <sup>44, 150, 156, 157</sup>, aunque ha sido demostrada una mejor osteogénesis a tamaños de poro de más de 300  $\mu\text{m}$  ya que facilita una mejor vascularización y oxigenación del tejido. Un menor tamaño de los poros (75-100  $\mu\text{m}$ ) provoca desmineralización interna y los poros más pequeños (10-44  $\mu\text{m}$  y 44-75  $\mu\text{m}$ ) son obturados por tejido fibroso. Para

controlar las dimensiones del poro y su densidad en el *scaffold* se pueden aplicar distintas variaciones, tal como se ha descrito anteriormente<sup>44, 67, 150, 156, 157-161</sup>.

## 2.7. Funcionalización del PLGA

El poliglicolato se ha conocido desde 1954 como una fibra dura de formación de polimérica. En la actualidad el poliglicolato y sus copolímeros con o sin ácido láctico son ampliamente utilizados como material para la síntesis de suturas absorbibles y se están evaluando en otras áreas del campo biomédico. Puede prepararse a partir de ácido glicólico por medio de la policondensación o ciertas formas de polimerización.

Estos materiales han ofreciendo generalmente buena biocompatibilidad y procesamiento. Sin embargo han aparecido numerosos problemas durante el uso de estos biopolímeros cuando son aplicados en ingeniería de tejidos, por ejemplo, problemas asociados al PLGA respecto a la hidrofobicidad, que comprometen su resistencia mecánica y facilitan la liberación de restos ácidos por degradación, disminuyendo el pH y favoreciendo la proliferación bacteriana y los procesos inflamatorios. Para intentar paliar estos inconvenientes se han incorporado en el PLGA materiales inorgánicos a modo de composites, como la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP) o cristales bioactivos, actualmente en estudio<sup>18, 19, 43, 44, 51</sup>.

Las características ideales de las membranas reabsorbibles de PLGA según Scantlebury<sup>20</sup>, son:

- Biocompatibilidad.
- Biodegradabilidad.
- Integración tisular.
- Oclusión celular.
- Manejabilidad clínica.
- Mantenimiento del espacio.

Estas matrices en forma de membrana presentan las características de ser reabsorbidas por el propio organismo sin generar una respuesta inmune de rechazo, y a su vez, actúan como matrices que permiten el crecimiento de las células en su interior. Están diseñadas para inhibir o retardar la migración apical del tejido conjuntivo durante la fase de cicatrización reduciéndose así la formación de bolsas en la superficie externa de la membrana, y se ha demostrado además una buena adhesión y vascularización de los tejidos en los que se hallan colocadas.

La mejora de las propiedades osteoinductivas puede conseguirse a través de la funcionalización superficial de estas membranas poliméricas de tal manera que la incorporación de capas delgadas de depósitos de cristales a escala nanométricas cree una superficie de topografía más compleja que incremente la capacidad osteoinductora<sup>56-58, 162, 163</sup>.

El diseño adecuado de una topografía de superficie afecta a su potencial adhesivo y a la capacidad de las células para adherirse en la interfase célula-sustrato, y nos ayuda a dirigir y organizar la adhesión y diferenciación de las células óseas en migración para conseguir una buena reparación tisular. La calidad de la adhesión celular condicionará la morfología, capacidad de proliferación y diferenciación celular. Por tanto, el material empleado debe ser capaz de reclutar células formadoras de hueso, osteoblastos, y acondicionar adecuadamente el ambiente extracelular de forma que puedan sintetizar hueso nuevo de calidad óptima. En la última década, se ha reportado la fabricación de matrices porosas mediante diferentes técnicas, entre las que se destacan: *gas foaming*, *solvent casting/particulate leaching*, *rapid prototyping* y *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foaming*, que permiten el procesamiento de materiales metálicos, cerámicos (hidroxiapatita, fosfato tricálcico) y poliméricos, de origen natural (colágeno, ácido hialurónico, fibrinógeno, quitina, chitosán) o sintéticos (policarbonatos, polímeros de PLA, PGA y sus derivados copolímeros)<sup>21-27, 44, 149, 150, 157</sup>.

Hay tres razones fundamentales por las que la adición de una fase inorgánica en una matriz polimérica resulta interesante en un sustrato para ingeniería de tejidos:

1. La bioactividad del polímero aumenta debido a la incorporación de una fase bioactiva.



2. La introducción de la fase inorgánica podría modificar de forma positiva el patrón de degradación del polímero.
3. La incorporación de esta segunda fase modifica el comportamiento mecánico del material, así como la integridad estructural del andamio.

Actualmente se están estudiando multitud de funcionalizaciones para favorecer la osteoinducción de los osteoblastos de la zona anatómica donde son insertadas quirúrgicamente y así favorecer la síntesis de materia mineral y regenerar el defecto óseo con hueso autólogo neoformado<sup>18, 19, 43, 44, 50, 67 151-153, 163-167</sup>. Algunas de estas modificaciones o mejoras en las matrices extracelulares respecto a la regulación del metabolismo, función, activación y señalización en la regeneración ósea en estudio se muestran en la Tabla 5.

Factores de crecimiento: TGF- $\beta$ , PDGF, BDGF, VEGFs, FGF, IGFs	Colágeno, Ac.Hialurónico, Calcio, Chitosán, Hormonas: PTH, Vit.D3
Proteínas: BMP's, Osteogenina Péptidos: RGD	Fosfato Tricálcico ( $\beta$ -TCP)
Fragmentos génicos, Antitumorales, Activadores, Inhibidores y ARNi	Óxidos metálicos: TiO <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub>  HA

Tabla 5: Principales nanocomposites utilizadosw a modo de modificaciones para las matrices de PLGA.

### Técnica de funcionalización superficial de la membrana de PLGA

Con el fin de promover una mayor osteointegración se realizan modificaciones en la superficie de las membranas. Estas modificaciones incluyen procesos de recubrimiento con capas inorgánicas de óxidos metálicos con propiedades

potencialmente bioactivas, es decir superficies que puedan formar un enlace químico directo entre el hueso y la superficie del implante (fijación activa), equivalente al concepto de osteointegración utilizado por primera vez por Brånemark, para describir el comportamiento de implantes dentales de titanio en contacto con el hueso. Estos procesos tienen lugar a temperaturas próximas a la ambiente y no afectan a la integridad de la membrana polimérica. Nos centraremos en los siguientes puntos en un estudio introductorio del dióxido de silicio y el plasma de oxígeno ya que estos elementos se integran en nuestro estudio.

### El plasma de oxígeno

El plasma de oxígeno es un tratamiento físico superficial para promover el contacto celular con el poliláctico y promover su degradación. Las condiciones de trabajo para este proceso intermedio de funcionalización con plasma de oxígeno pueden encontrarse en distintas referencias. Así mismo, puede encontrarse una descripción de la metodología experimental por la cual depositar una capa nanométrica inorgánica a modo de nanocomposite sobre la membrana de PLGA en distintos artículos de la literatura<sup>158-161, 168</sup>.

### Dióxido de silicio

El sílice se produce comúnmente en la naturaleza como una piedra arenisca y puede existir en una forma amorfa o una variedad de formas cristalinas (cuarzo, tridimita y cristobalita). El sílice es insoluble en todos los ácidos con la excepción del fluoruro de hidrógeno y se disuelve en bases como soluciones de KOH y NaOH. La concentración de hidroxilos superficiales del sílice amorfo es de aproximadamente de cinco grupos hidroxilo por nm<sup>2</sup>, que corresponde a un hidroxilo por átomo de silicio.

Muchos estudios se han centrado en como interaccionan el titanio y las células osteogénicas<sup>169</sup> ya que este material está considerado el *gold standard* en los procesos de osteointegración<sup>170</sup>. Hay muchos estudios en los que se intenta favorecer los

osteogénesis mediante la deposición en la superficie de apatita<sup>171</sup>, fosfato cálcico<sup>172,173</sup> o mediante procesos biomiméticos de adsorción de proteínas<sup>174</sup>.

Es importante destacar que el titanio no es el único biomaterial que interacciona biológicamente con el hueso. Hay otros materiales que han demostrado un correcto contacto con el hueso como es el tantalio<sup>175</sup>, niobio<sup>176</sup>, aleaciones cromo-cobalto<sup>177</sup> o zirconio<sup>178</sup>. Para que el hueso se adhiera a estos materiales es necesaria la formación de una capa que contenga hidroxiapatita<sup>179</sup>. Es por esto que tras los estudios de Hench y cols. en los que se describía la capacidad de los biocristales, materiales con un alto contenido en sílice, para estimular el depósito de apatita sobre él sin interfase alguna, se propuso el empleo del sílice como un biomaterial en regeneración ósea<sup>180-182</sup>. Estos biocristales proporcionan un ambiente donde las proteínas de la matriz extracelular ósea son adsorbidas dando como resultado que la adhesión y la proliferación de los osteoblastos sea más rápida que con otros materiales<sup>183, 184</sup>.

El empleo del sílice se basa en su capacidad de unirse directamente al hueso. Es lo que se conoce como *bone-bonding* o unión directa al hueso a nivel químico mediante intercambio iónico, siendo los biocristales los únicos materiales capaces de promover esta reacción de estimulación y desarrollo de las células ósea para la reparación del tejido óseo<sup>183, 185</sup>. Aunque hay autores como Davies<sup>186,187</sup> que rechazan esta idea porque según ellos la adhesión es mecánica y se produce mediante una matriz mineralizada que se invagina e interdigita con la superficie del material llamada *cement line*. Este autor mantiene que la unión a los biocristales se produce por una retención micromecánica y no por un intercambio iónico real.

### Bioactividad del óxido de silicio

Se ha establecido en los últimos años que los efectos más destacados del óxido de silicio se basan en su tasa de liberación para formar el fosfato cálcico.

Diferentes estudios constatan que el sílice disuelto aumenta la expresión de determinados genes relacionados con la diferenciación y proliferación celulares<sup>188</sup>. No sólo se trata de una respuesta mecánica a la superficie, sino que existe una respuesta

directa al dióxido de sílice disuelto en el ambiente extracelular que da lugar a diferentes factores implicados en la osteogénesis, como son, entre otros, la fosfatasa alcalina, la sialoproteína ósea, la osteopontina, la osteocalcina, la osteonectina, la BMP-2 y la Cbfa1/Runx2<sup>189-191</sup>.

En base a estas propiedades se ha propuesto el sílice en forma soluble como recubrimiento de implantes y en membranas. En este sentido, algunos autores refieren una pobre adhesión y proliferación celular al disolverse rápidamente<sup>192</sup>.

Anderson y cols.<sup>179</sup> con el objetivo de analizar los recubrimientos de sílice puro y desligarlo de los demás componentes de los biocristales concluyeron que la topografía por sí sola no es capaz de explicar la mineralización temprana en estas superficies, donde se liberan una cantidad diaria de 1 ppm/ml de óxido de silicio que es absorbida por los osteoblastos aumentando la formación de nódulos mineralizados, una mayor adsorción de colágeno y que puede influir en la expresión de osteocalcina y otras proteínas implicadas en el proceso de mineralización, coincidiendo con otros autores<sup>192, 193</sup>.

### 3. HIPÓTESIS

1. Las membranas reabsorbibles de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA) texturizadas con un tratamiento físico de plasma de oxígeno y funcionalizadas a escala nanométrica con óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) generan una mayor proporción de hueso neoformado cuando son testadas *in vivo*, en conejos de la raza New Zeland, tras un mes de cicatrización, en comparación con las membranas de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA) sin las nombradas modificaciones.

2. Las membranas son biocompatibles y estables al ser evaluadas *in vivo*, y en los tejidos óseos donde son colocadas mediante técnicas quirúrgicas para conseguir una regeneración ósea guiada no producen respuesta inflamatoria apreciable.

## 4. OBJETIVO

### 4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad regenerativa ósea de las membranas de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA) *in vivo*, texturizadas con un tratamiento físico de plasma de oxígeno (P-O<sub>2</sub>) y funcionalizadas a escala nanométrica con óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>), en defectos críticos generados en la calota de conejos de la raza New Zeland tras un mes de cicatrización tras la intervención quirúrgica.

### 4.2. Objetivos específicos

1.- Valorar cualitativamente la estructura y densidad ósea de los defectos regenerados con las membranas de estudio (SiO<sub>2</sub>/PLGA/P-O<sub>2</sub>) frente al grupo control regenerados con (PLGA sencillo) tras un mes desde la intervención.

2.- Cotejar cuantitativamente el nivel de regeneración ósea (porcentaje de hueso neoformado) en los defectos tratados con las membranas de estudio, frente a los controles.

3.- Cotejar cuantitativamente la superficie ósea mineralizada (milímetros hueso neoformado por día), formada en los grupos de estudio frente a los controles.

4.- Cotejar cuantitativamente la actividad resortiva (osteoclastos por milímetro) en los grupos de estudio, frente a los controles.

5.- Valorar cualitativamente la presencia positiva normal de aposición (actividad osteoblástica) en los grupos de estudio, frente a los controles.

El objetivo final de este proyecto multidisciplinar es facilitar el desarrollo de una membrana biocompatible, de origen artificial y modificada para optimizar sus propiedades en un modelo animal de regeneración ósea guiada, como paso previo a estudios clínicos más avanzados en humanos en un futuro próximo.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

El presente trabajo de investigación estudia *in vivo* membranas de PLGA modificadas a escala nanométrica con un pretratamiento de plasma de oxígeno para poner de manifiesto su viabilidad real en procedimientos de regeneración ósea guiada.

### 5.1. MATERIAL

#### Membranas de estudio

Todas las membranas se fabricaron en el ICMSE (Instituto de Ciencias de los Materiales de Sevilla). Las membranas que se han utilizado en este trabajo son matrices laminares orgánicas reabsorbibles, de naturaleza polimérica elaboradas a partir de ácido láctico y glicólico hasta su derivado ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA), de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de espesor y dimensiones de 1x1 cm, modificadas a escala nanométrica con óxido de silicio ( $\text{SiO}_2/\text{PLGA}$ ) y plasma de oxígeno ( $\text{P-O}_2$ ).

Las membranas testadas en este estudio fueron:

1. PLGA (ácido poliláctico-co-poliglicólico), utilizadas como grupo control.
2.  $\text{SiO}_2/\text{PLGA}+\text{P-O}_2$  (ácido poliláctico-co-poliglicólico funcionalizadas a escala nanométrica con partículas de óxido de silicio, y un pretratamiento superficial de plasma de oxígeno), utilizadas como grupo experimental.

#### Fabricación de las membranas de estudio

Todas las membranas del estudio fueron elaboradas por el ICMSE (Instituto de Ciencias de los Materiales de Sevilla), a partir procesos de evaporación conocidos<sup>75</sup>.

### Fabricación de las membranas del grupo PLGA sencillo (Control)

Para su preparación se añadió 0,15g de perlas de poliláctico-poliglicólico en proporción 75% ácido poliláctico + 25% ácido poliglicólico (Purasorb®, Holanda), previamente atemperadas, en 10 ml de disolvente orgánico diclorometano líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), y se procedió a su disolución en agitador magnético caliente. Tras su completa disolución se procedió a su secado en platillo de teflón, donde el PLGA adquirió su morfología final laminar membranosa. Posteriormente se procedió al corte manual, esterilización con luz ultravioleta durante 30 minutos por ambas caras, y aislamiento almacenado en sobres plastificados hasta su uso en quirófano.

En la Figura 23 se ilustra una imagen tipo de una de las membranas de PLGA control de nuestro estudio a escala macroscópica y a microscopía electrónica (SEM).

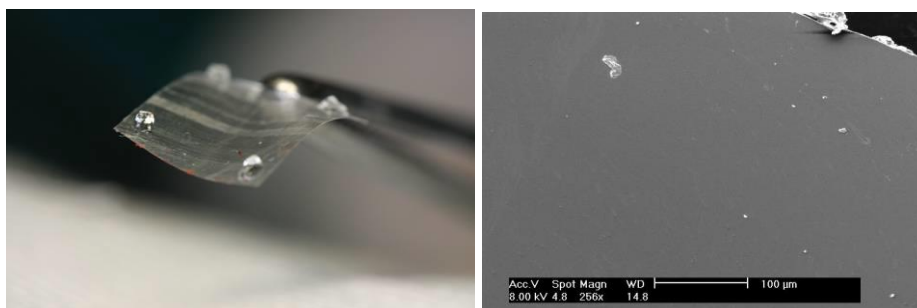


Figura 23: a;(Izq); Membrana tipo de PLGA a escala real. b;(Dcha); Imagen superficial de la membrana tipo de PLGA a microscopía electrónica de barrido (SEM).

### Fabricación de las membranas del grupo $\text{SiO}_2/\text{PLGA}+\text{PO}_2$

Es éste un procedimiento idéntico al grupo anterior. Una vez realizado le siguen dos tratamientos consecutivos:

1. El primero de ellos es un pretratamiento físico superficial de plasma de oxígeno ( $\text{P-O}_2$ ), antes de la deposición de la capa inorgánica sobre su superficie. Este tratamiento de plasma produce la modificación superficial de la membrana de PLGA y aumenta su rugosidad debido al *etching* producido por el plasma.



Este tratamiento facilita la degradación de las membranas de PLGA haciéndola más sensible a medios líquidos de cultivo favoreciendo su degradación. También produce una mejora de la adherencia entre la capa nanométrica inorgánica y la propia membrana de PLGA. Estos procesos tienen lugar a temperaturas próximas a la ambiente y no afectan a la integridad de la membrana polimérica.

Las condiciones de trabajo para este proceso intermedio de funcionalización con plasma de oxígeno pueden encontrarse en un trabajo previo, así como una descripción de la metodología experimental utilizada para depositar la capa nanométrica inorgánica sobre la membrana de PLGA<sup>194</sup>.

Un esquema de este conjunto de procesos se presenta en la Figura 24, donde se muestra cómo en una primera etapa el tratamiento con el plasma de oxígeno produce la activación superficial de la membrana de PLGA aumentando su rugosidad.

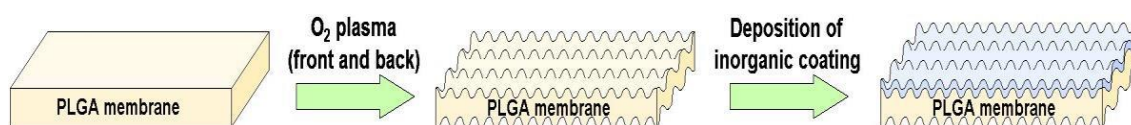


Figura 24: Funcionalización superficial de las membranas.

2. Posteriormente se procedió a añadir el segundo tratamiento con nanopartículas de óxido de silicio en la superficie de las membranas con el fin de promover una mayor osteointegración tisular. Estas modificaciones incluyen procesos de recubrimiento con capas inorgánicas bioactivas de varias decenas de nanómetros de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) con propiedades potencialmente bioactivas, es decir, superficies que puedan formar un enlace químico directo entre el hueso y la superficie del implante (fijación activa).

Para ello se realizó un proceso de deposición química desde fase vapor asistida por plasma (PECVD) a temperatura ambiente, en una cámara de vacío acoplada a un generador de microondas de tipo SLAN, empleando un plasma de oxígeno y como precursor tetraisopropóxido de silicio (TTIP, Sigma-Aldrich, EE.UU). La deposición se hizo

siguiendo metodologías de base nanotecnológica basadas en el uso de plasmas fríos y de *magnetron sputtering*.

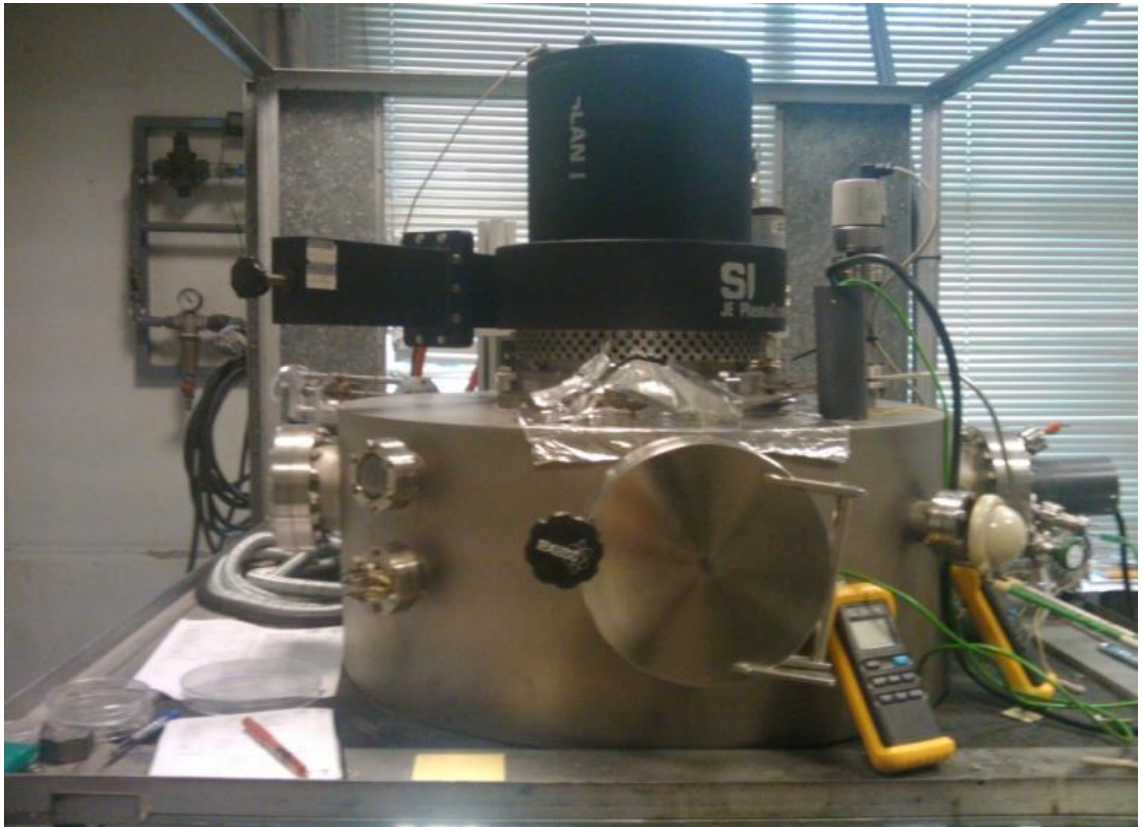


Figura 25: Funcionalizador de nanopartículas de silicio (SLAN).

### Ejemplares para la experimentación animal

Para este estudio se utilizaron cuatro conejos de experimentación (raza New Zealand, color: blanco, edad: 6 meses, peso: 3,5 Kg), proporcionándoles agua y alimentación diaria de tipo mantenimiento “Harlan Teckland Lab Animal Diets” (2030) (Harlan, España). Estos ensayos de experimentación animal cuentan con el permiso del Comité de Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla y con el permiso del Comité Ético de Experimentación Animal del CCMi Jesús Usón.

## 5.2. MÉTODO

### Descripción del estudio

Tras un análisis previo de rendimiento global *in vitro* en varios modelos de membranas poliméricas modificadas de PLGA reabsorbibles, se procedió a realizar un estudio comparativo de regeneración ósea guiada *in vivo* de la membrana que ofreció mejor resultado. Para ello se utilizaron cuatro conejos de experimentación, en cuya calota (zona frontal del cráneo) se les efectuaron dos defectos críticos (no autoregenerables) de 11mm de diámetro y separados por 0,5 cm de hueso sano. En uno de ellos se colocó las membranas de estudio (SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>), y en el otro, las membranas controles (PLGA sencillo). Posteriormente se les facilitó reposo durante un mes, y tras el sacrificio de los ejemplares, se enviaron las muestras de calota al laboratorio para hacer un análisis comparativo cualitativo y cuantitativo de todos los defectos, para elaborar una evaluación objetiva y estadística de la efectividad y viabilidad de estas membranas.

### Procedimiento quirúrgico

Las intervenciones, así como el sustento de los animales y sacrificio de los mismos se efectuaron en el CCMI (Centro de Cirugía de Mínima Invasión de Cáceres). Durante la intervención se contó con la ayuda de dos odontólogos cirujanos al frente, dos odontólogos asistentes, un veterinario, un anestesiólogo, un biólogo, y un grupo de auxiliares clínicos de la especialidad.

Se comenzó con la sujeción de los animales y control de sus constantes vitales. Para el proceso de anestesia se utilizó inducción intravenosa con midazolán 0,25mg/kg y propofol 5mg/kg, mantenimiento con gas inhalatorio de sevofluorano 2,8% aspirado y analgesia con ketorolaco 1,5mg/kg y tramadol 3mg/kg.

Una vez sedados y preparados los conejos, se realizó una incisión entre las bases de las orejas comunicándola con una incisión en la línea media de la calota (de

aproximadamente 5 cm) con hoja de bisturí nº15. Consecutivamente se despegó y diseccionó la capa epitelial, conectiva y muscular con un periosteotomo de Prichard, controlando en todo momento el sangrado mediante compresión y aspiración. Posteriormente se produjo la exposición de la superficie externa del cráneo y el lavado de la zona con solución salina (suero fisiológico). Despegados los colgajos triangulares, se separaron mediante sutura de 2/0 colgando de ellos dos mosquitos para dejar despejado el campo de intervención. Se identificaron dos estructuras: la cresta sagital del hueso parietal, y la salida del nervio facial. Entre ambas estructuras, a ambos lados de la línea media se realizaron dos defectos óseos separados cada uno de ellos por 6 mm, con una trefina puesta en un contraángulo de implantes con irrigación de suero fisiológico estéril. La trefina utilizada fue la de Helmut Zepf, de diámetro interno de 11 mm, de dientes 2,35 mm y longitud 30mm, ref.08.910.13 (Helmut Zepf Medizintechnik GMBH, Alemania). Con dicha trefina y a una velocidad de 2000 rpm se marcó el defecto con una profundidad de 1 mm. El hueso se eliminó usando piezocirugía y controlando la profundidad a 2 mm mediante sonda periodontal. Una vez realizados los defectos, éstos se cubrieron con las distintas membranas de PLGA, organizadas según el grupo asignado al defecto tal y como muestra la Figura 26.

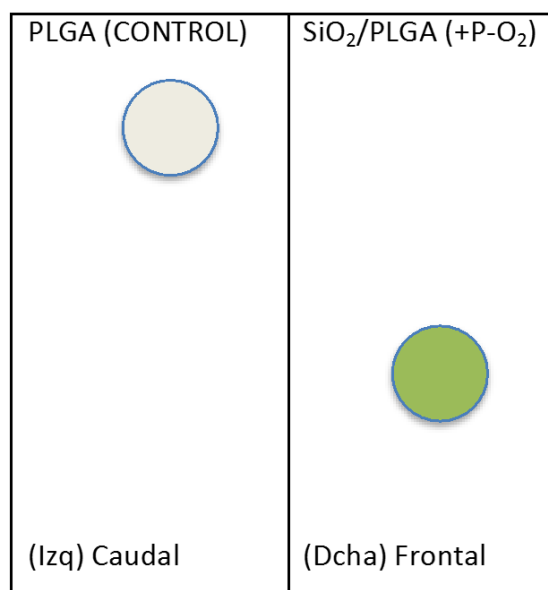
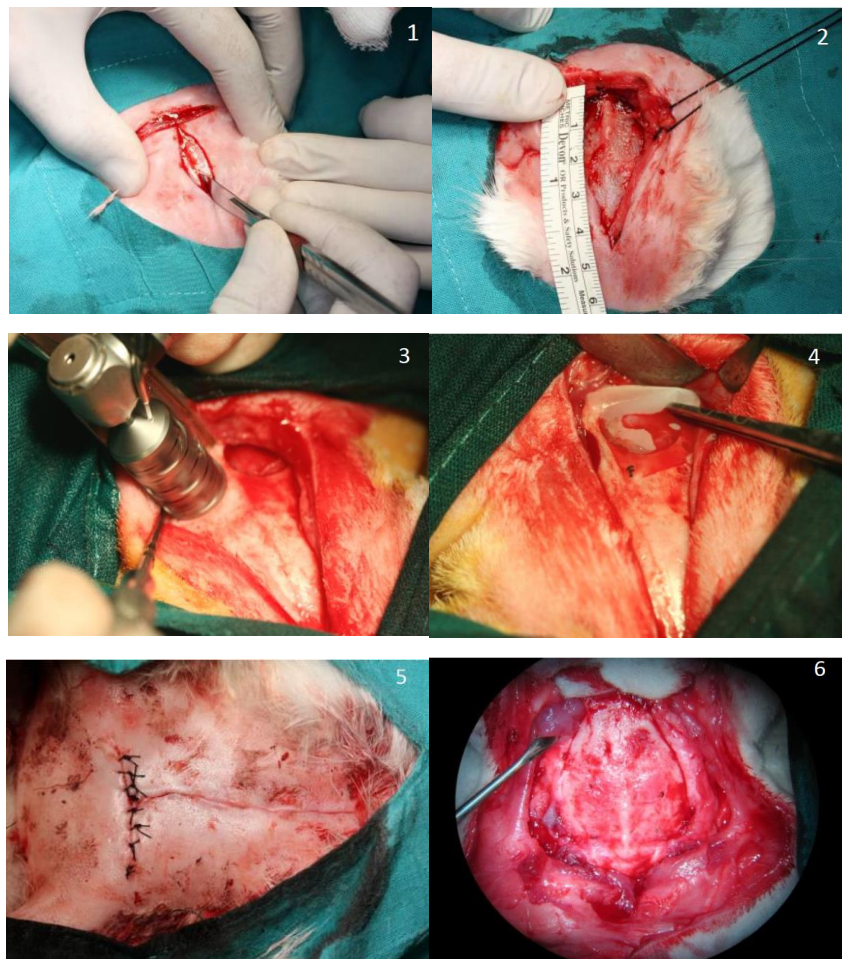


Figura 26: Organización posicional de las membranas.

Las membranas de PLGA se fijaron con un adhesivo hemostático fisiológico Tissucol® (Baxter, EE.UU.) aprobado por la FDA, el cual contiene fibrinógeno y fibrina humanas. El adhesivo fue colocado en el reborde óseo adyacente a los defectos para fijar mejor la membrana, consiguiendo una adecuada fijación y poca movilidad de las membranas al desplazar el colgajo a su posición inicial. Se procedió a la sutura en dos planos; una primera de 4/0 en el plano de periostio subepidérmico, y una segunda de 2/0 no reabsorbible en el plano epidérmico. Se efectuaron puntos simples con la mejor aproximación posible de bordes, y se finalizó la intervención con el limpiado de la herida, (Figura 27). El tiempo aproximado de la intervención quirúrgica fue de una hora por cada ejemplar. Posteriormente se les administró analgesia antiinflamatoria con buprenorfina (0.05 mg/kg) y carprofeno (1 ml/12.5 kg pv), y reposo programado de un mes.



**Figura 27:** Imágenes de la operación. (1 y 2); Incisión y desplazamiento tisular. (3); Trefinado. (4); Colocación de las membranas en los defectos óseos. (5); Sutura de la herida. (6); Visión de los defectos óseos regenerados tras el sacrificio.

## Sacrificio

Los conejos fueron sacrificados al mes de la intervención utilizando una dosis letal vía intravenosa de cloruro potásico, lo que les provocó un paro cardíaco.

Las muestras fueron obtenidas para su posterior estudio a partir de la calota de cada ejemplar, cortadas en plano sagital anatómico, y tras la separación de la masa cerebral y lavado con suero fisiológico, se procedió al corte y marcado de las piezas individualmente de la siguiente manera:

1. Precorte (3x3cm): En cuadrado de 3cm en total como máximo, para cada lado (tal como se aprecia en el esquema abajo).
2. Marcado: Corte en triángulo de la esquina caudal izquierda de cada calota, en vista dorsal del animal (como se indica en el esquema de la Figura 28).
3. El proceso de precorte de las cabezas y el tallado de la esquina de las calotas se efectuó de uno en uno, con irrigación de suero fisiológico, y lo más rápido posible para evitar la desecación de las células (Figura 29).
4. Fotografiado de las piezas junto a la etiqueta del código de ejemplar del conejo tanto en el precorte como en el corte de la esquina.
5. Fijación: Se introdujeron las calotas (aun húmedas de suero) en frascos que se rellenaron con etanol 70°C (a 4°C) hasta un dedo del tope del frasco.
6. Traslado al laboratorio conservadas en hielo seco (CO<sub>2</sub> a baja temperatura y alta presión).

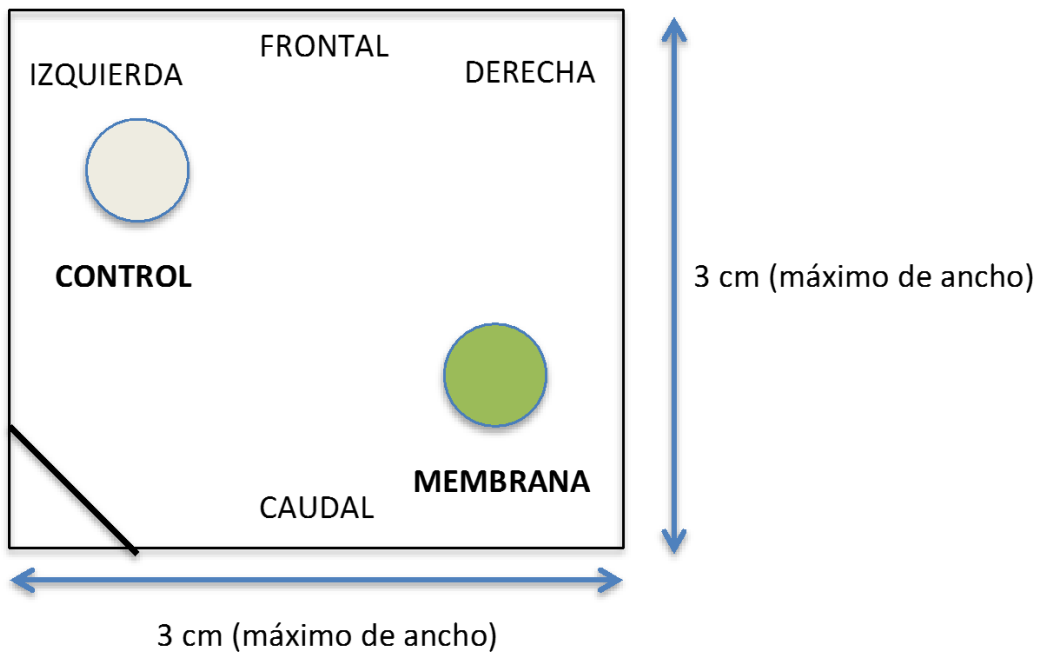


Figura 28: Esquema del precorte y marcado en la calota. (Nota: Referimos siempre Izq/Dcha y Frontal/Caudal del animal, no del operador. En vista dorsal de la calota (no ventral-cerebral).

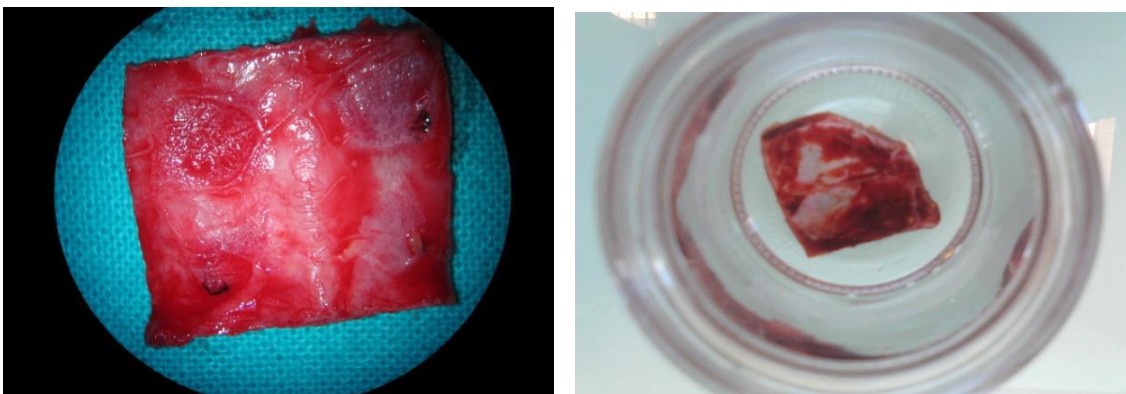


Figura 29: (a); Calota precortada tras sacrificio. (b); Muestra de calota marcada y preparada en fijación para traslado al laboratorio.

### Procesamiento de las muestras.

El procesado de las muestras y su tratamiento histológico tras la fijación de las muestras precortadas, en etanol de 70° durante 48h a 4°C (Figura 30), se efectuó en el laboratorio histológico de la Faculté de Chirurgie Dentaire. EA: 2496 (Universidad Paris

V – René Descartes), y siguiendo el protocolo que se explica a continuación para todas las variables de estudio hasta el comienzo de las pruebas para microscopía.

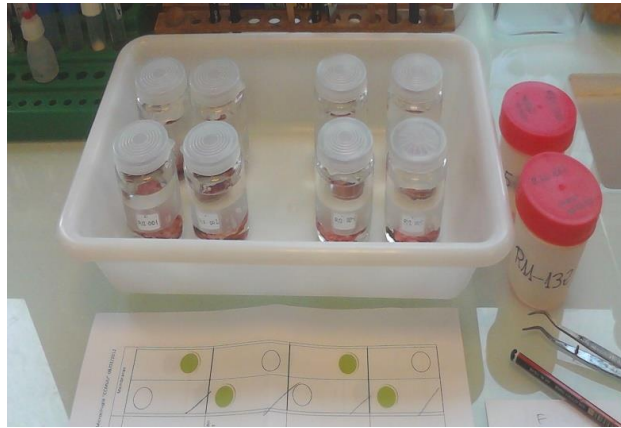


Figura 30: Pretratamiento de las muestras, fijación fría etanol 70° (4°C).

## Pretratamiento y tratamiento tisular

### Deshidratación

Se comenzó metiendo las muestras de calota en etanol de 95° en frigorífico (4°C) durante 48 horas. Seguidamente se sumergieron cuatro veces en etanol absoluto durante una hora cada uno a 4°C. Por último se introdujeron en xileno con un pase de tres horas.

### Impregnación

Se sumergieron las muestras en Solución-1: (xileno + metil metacrilato; en proporción 1:1) durante dos horas en fregadero con vasija a presión hídrica al vacío, y mezclando en agitador.



Posteriormente se sumergieron en Solución-2: (metil metacrilato + dibutil-x; en proporción 1:1) durante dos horas en fregadero con vasija presión hídrica, y se guardaron a 4°C hasta comenzar la inclusión.

En la Figura 31 se muestra una imagen con el material empleado para el proceso;



Figura 31: Impregnación y preinclusión a alta presión.

## Inclusión

Se procedió a sumergir completamente las muestras en una solución líquida de resina tipo metil metacrilato (MMA) Merck (Merck & Co., EE.UU.) en frascos de cristal cilíndricos para fabricar los bloques. Para ello se añadió una mezcla equitativa de la Solución A (peróxido orgánico de benzoilo (BPO)) y la Solución B (dioctil adipato (DMPT) + Butil-x).

Previamente estas soluciones se mezclaron con agitador con palomita y fueron presolidificados durante una semana a -20°C. La inclusión se realizó colocando las muestras centradas en el interior y se vertió la mezcla de soluciones A y B lentamente.

## Polimerización

La polimerización se llevó a cabo de manera pasiva en nevera a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 48h, como se ilustra en la Figura 32.

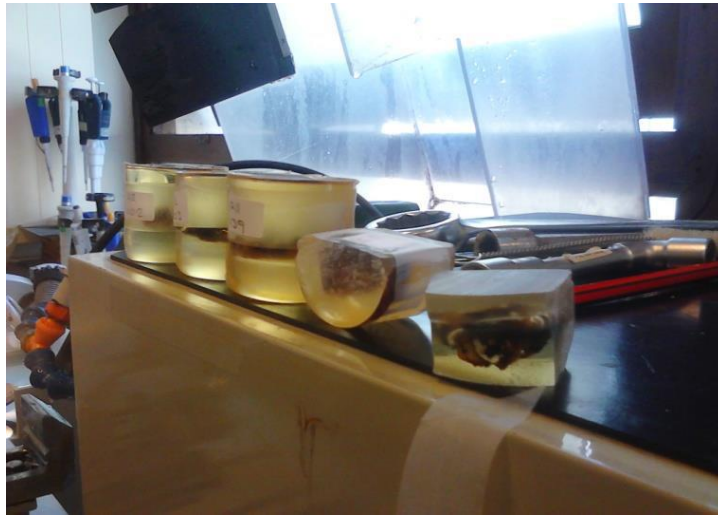


Figura 32: Inclusión y polimerización en bloques.

## Tallado

Tras ruptura manual de los frascos de vidrio con martillo de madera para extraer los bloques de resina solidificada con las muestras en el interior, se efectuó el tallado de los mismos en forma de media luna horizontal y siguiendo el plano perpendicular al eje sagital, en sierra hidráulica modelo G-Brot 95370 (Brot Technologies; G.Brot SA; Francia), previo estudio de la zona de corte y la orientación de los defectos (Figura 33).



Figura 33: Corte y tallado de los bloques en sierra hidráulica.

## Pulido

El pulido de los bloques se efectuó en una pulidora-lijadora automática de disco de G-Brot 95370 (Brot Technologies; G.Brot SA; Francia) a 25 rpm y con perfusión hídrica continua (Figura 34).



Figura 34: Pulido en lijadora de disco.

## Cortes histológicos

Los procesos de microcorte fueron realizados en un microtomo especial para resinas de metacrilato modelo Jung Polycute (Jung, Alemania), con cuchilla de tungsteno mixta. Las características de los cortes fueron: 5  $\mu\text{m}$  de espesor a nivel de la zona medial del defecto óseo de cada muestra (para minimizar la varianza intermuestral), en series de diez sobre portamuestras de cristal pretratados con albúmina y fijados con etanol de 80° (Figura 35).



Figura 35: Microtomo especial para metacrilato Jung Polycute (Jung, Alemania).

El tejido cortado fue estirado suavemente con pincel, aplanándolo y secándolo con pañuelo suave de papel, y preservándolo con film de plástico transparente con prensa durante 24 horas. Posteriormente fue secado al aire y colocado en caja portamuestras gradillada, como se ilustra en la Figura 36.



Figura 36: Almacenaje de muestras.

### Deplastificación

La deplastificación se realizó con dos baños de 20 minutos en solución deplastificante GEA (2-methoxyethyl acetato) (Sigma-Aldrich, EE.UU.), y una posterior hidratación mediante inmersión en etanol de 70° y etanol de 40° durante diez minutos cada uno, y un baño en agua destilada durante cinco minutos.

### Coloraciones y marcajes

Los procesos de marcaje y coloración fueron realizados manualmente y de forma individual siguiendo los protocolos estandarizados clásicos para cada una de las variables de estudio.

Las variables de estudio y el método de las coloraciones empleadas para cada una de ellas fueron las siguientes.

## Estudio morfométrico

Evaluación cualitativa de la estructura y densidad ósea global de los defectos regenerados con las membranas de estudio ( $\text{SiO}_2/\text{PLGA}/\text{P-O}_2$ ), frente a los controles (PLGA sencillo)

Para evaluar cualitativamente la estructura y la densidad global de los defectos regenerados tras un mes de cicatrización con las membranas de estudio, se utilizó la tinción de azul de toluidina (BT).

Esta coloración es la técnica de rutina habitual para un análisis rápido de contraste en un tejido. Además, el azul de toluidina se comporta como un colorante ortocromático (color azul), o metacromático (color violeta-rojo), dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida, coloreando metacromáticamente las estructuras ricas en proteoglicanos sulfatados, como el heparán sulfato, presente por ejemplo en el cartílago joven (condroblastos y matriz inmadura) y en los gránulos de las células cebadas. Por lo tanto, el tejido osteoide (tejido óseo de novo con alto porcentaje de matriz colagenosa de tipo I) y el hueso maduro (con mayor proporción de mineral) se observarán con distinta tonalidad de azul ya que poseen distinto pH.

Para esta coloración se sumergieron las muestras en portamuestras durante 10 minutos en colorante azul de toluidina (Merk and Co. EE.UU.) al 1% a pH 3,6 ajustado con ácido clorhídrico, tras lo cual se escurrieron y se pasaron a un baño en tampón acetato de sodio calibrado a pH 3,8 durante 30 segundos, y se dejaron secar al aire durante dos horas hasta su montaje. Los utensilios necesarios para esta coloración se muestran a continuación en la Figura 37.



Figura 37: Kit de coloración para azul de toluidina (BT).

El montaje de las muestras se efectuó utilizando el siguiente protocolo;

- Dos pases de 15 segundos en alcohol butílico terciario.
- Un pase de 15 segundos en solución 1:1 de alcohol butílico terciario + tolueno.
- Dos pases de 15 segundos en tolueno.
- Se colocó una gota de Jarabe de Apati y una vez eliminadas rápidamente las posibles burbujas generadas, colocar el cubreobjetos cuidadosamente.
- Secado al aire durante dos horas.

En la Figura 38 se ilustra una imagen con el material empleado para el montaje.



Figura 38: Montaje típico en portamuestras con cubreobjetos.

Para llevar a cabo la evaluación cualitativa del estudio morfométrico de la estructura y densidad del hueso neoformado en cada caso se adquirió una imagen central de 6 mm de lado para cada defecto y para el hueso original (de los flancos del defecto) con objetivo 5x mediante el microscopio óptico “Zeiss Axioscop Plus” (Zeiss Microscopy, LLC; EE.UU). Se valoraron tomando en cuenta la cantidad de osteoide (violeta), la presencia de hueso maduro (azul oscuro) y la cantidad de tejido medular y adipocitos (tejido blanco con microesferas grises de células en formación, y bolsas de ácidos grasos).

Con estas imágenes se evaluaron de forma cualitativa la estructura y densidad ósea global de los defectos regenerados con las membranas de estudio ( $\text{SiO}_2/\text{PLGA}/\text{P-O}_2$ ), frente a los controles (PLGA sencillo).

#### Nivel de regeneración ósea (porcentaje de hueso neoformado) en los defectos tratados con las membranas de estudio frente a los controles

Para analizar cuantitativamente el porcentaje óseo neoformado se eligió la coloración Von Kossa (VK) (Sigma-Aldrich, EE.UU.), que se emplea para detectar la materia mineral calcificada mediante plata molecular. Esta técnica de marcaje corresponde a un método de sustitución del calcio por plata. El nitrato de plata se une



sólo a la parte aniónica de las sales de calcio (fosfatos o carbonatos), compuesto que es de color amarillo y que expuesto al sol o a la luz adquiere color negro por reducción de la plata.

Para llevar a cabo esta coloración se les añadió a cada corte histológico tres gotas de nitrato de plata al 5% durante 30 minutos en oscuridad. Seguidamente se le aplicaron tres lavados de tres minutos en agua destilada. Tras esto, se sumergieron en carbonato de sodio formaldehído durante dos minutos, y se lavaron en agua destilada durante unos segundos. El montaje de las muestras es idéntico al empleado en el apartado anterior para el azul de toluidina. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio óptico Zeiss Axioscop Plus (Zeiss Microscopy, LLC; EE.UU) y la cámara SONY 3CCD (DSP) (Sony Corp, Japón) junto con el software Smart Matrox Intelicam 8.0 (Matrox Imaging, Reino Unido) (Figura 39).



Figura 39: Microscopio de óptico de campo claro + ordenador personal de cuantificación y análisis de datos estadísticos.

Para calcular el porcentaje óseo neoformado se procedió a un enfoque con objetivo 10x para distinguir los límites del defecto óseo regenerado. Una vez localizado se procedió al enfoque con objetivo 4x para obtener imágenes digitales integrales, por separado, de los defectos y el hueso original a cada lado de los defectos. Para la cuantificación del nuevo tejido regenerado y su comparación con el original se analizaron las zonas de estudio en dirección de distal (externa) a proximal (interna),

mediante análisis por regiones ROI de 11 mm (para cada defecto) y de 5 mm (en el hueso original). Posteriormente se transformó la imagen a blanco/negro por selección manual de umbrales gamma, y se calculó automáticamente los porcentajes medios totales de blanco y negro mediante el software informático Fiji-Image J 1.0 (JAVA, EE.UU.)

### Superficie ósea mineralizada (milímetros de hueso neoformado por día) en los grupos de estudio frente a los controles

Para cuantificar los milímetros de superficie ósea mineralizada por día se eligió el marcaje con calceína, que se utiliza para poner de manifiesto la fijación del calcio tisular de nueva aposición. El par calceína / demeclociclina son marcadores fluorescentes, que emiten luz de diferente longitud de onda bajo fluorescencia. Son administrados por vía intravenosa y señalizan los procesos anabólicos de fijación ósea tisular. Esta prueba ofrece una visión medible a microscopio óptico del tejido óseo neoformado presentando dos líneas de diferenciación que corresponden con el hueso regenerado a uno y ocho días previos al sacrificio de los ejemplares ya que en esos momentos se les administró al animal los marcadores. El análisis histomorfométrico de la presencia del marcador y la distancia entre las señales es un método eficaz para determinar y cuantificar los mecanismos de crecimiento óseo y de adaptación funcional.

El protocolo de administración para los ejemplares fue el siguiente:

- Administración vía intravenosa de 5ml de la solución-1: 45mg de calceína + 0,1g de carbonato de sodio (SIGMA C0875; Sigma-Aldrich, EE.UU.) en 5 ml de suero fisiológico, a razón de 30mg/kg animal, ocho días antes del sacrificio.
- Administración vía intravenosa de 5ml de solución-2: 45mg de demeclociclina hidrocloreto (SIGMA A6140; Sigma-Aldrich, EE.UU.) en 5ml de suero fisiológico, el día previo al sacrificio.

Una vez cortadas las muestras, éstas se montaron sin tinción alguna con una gota de etanol 80° sobre el porta y colocando suavemente el cubremuestras en cada material.

Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio óptico Zeiss Axioscop Plus (Zeiss Microscopy, LLC; EE.UU) y la cámara SONY 3CCD (DSP) (Sony Corp, Japón) junto con el software Smart Matrox Intelicam 8.0 (Matrox Imaging, Reino Unido) (Figura 39).

Para la cuantificación de los milímetros de hueso neoformado por día se adquirieron imágenes con los instrumentos citados anteriormente con objetivo 20x y zoom 1,5, y se midió la distancia entre las marcas lineales naranja y verde, respectivamente de cada marcador fluorescente, y correspondientes al hueso aposicionado entre los días uno y ocho días antes del sacrificio. La medición se realizó en las regiones centrales de cada muestra y el hueso original. Posteriormente, se hizo una conversión proporcional entre las medias de las distancias medidas y el objetivo de adquisición empleado en el método, trasladando de este modo las medidas a milímetros. Finalmente dividiendo entre siete días, se obtuvieron los milímetros de hueso neoformado por día en cada defecto en ambos grupos.

#### Actividad resortiva (osteoclastos por milímetro) en los grupos de estudio, frente a los controles

Para comparar cuantitativamente los osteoclastos por milímetro de perímetro óseo de cada muestra, se utilizó la técnica de evidencia de la fosfatasa ácida tartrato de sodio resistente (TRAP).

La TRAP es una hidrolasa ácida exclusiva de osteoclastos y preosteoclastos liberada al medio circundante por estas células durante la resorción ó reabsorción ósea para facilitar la disolución del hueso, y que se relaciona con el grado de vitalidad del tejido óseo. Esta coloración enzimática pone de evidencia la actividad osteoclástica del tejido óseo analizado marcando los osteoclastos de color rojizo.

Para ello se preparó la siguiente mezcla madre mediante agitación con palomita imantada y filtración en papel:

- 10 mg de naftol ASTR fosfato (SIGMA N-600; Sigma-Aldrich, EE.UU.)
- 50  $\mu$ l de NN dimetilformamida
- 10 ml de tampón acetato de sodio anhidro (SIGMA S-2889; Sigma-Aldrich, EE.UU.) 0,1M en agua destilada, y mezclado con 100 $\mu$ l de ácido acético glacial (en campana de gases).
- 2 x 115mg de tartrato de sodio (SIGMA S-4797; Sigma-Aldrich, EE.UU.)
- 10mg de Fast Red TR Salt (ALDRICH 368881; Sigma-Aldrich, EE.UU.)
- Se finaliza la mezcla filtrando en papel y ajustando el pH a 5,2.

Tras escurrir muy bien las láminas, se añadió a cada muestra tres gotas de esta solución madre, se colocaron en caja portamuestras humidificadas con papel de filtro mojado en agua y se incubaron una hora a 37°C en estufa (Figura 40).



Figura 40: Kit de tinción y estufa de secado para tratamientos enzimáticos (TRAP y ALP).

Una vez finalizado este periodo se lavaron las muestras en agua destilada durante cinco minutos, y se contrastaron con azul de toluidina al 1% durante un minuto.

El montaje de estas muestras fue al agua únicamente, añadiendo dos gotas de agua sobre las muestras y colocando el cubremuestras suavemente eliminando las posibles burbujas. Se mantuvo la hidratación permanentemente en refrigerador.

Para comparar cuantitativamente la actividad resortiva del tejido óseo neoformado y del hueso original mediante la TRAP, cuyo resultado positivo son agregados rojizos celulares, se adquirieron imágenes a objetivo 4x de cada defecto óseo y del hueso original, y se cuantificó el número de osteoclastos por campo, tanto en las zonas de estudio, como en los controles y el hueso original. Posteriormente se calculó el promedio del número proporcional de osteoclastos por milímetro en la zona de los defectos (11 mm), y del hueso original (5 mm), lo que nos permitió valorar objetivamente el nivel resortivo aproximado del tejido analizado.

Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio óptico Zeiss Axioscop Plus (Zeiss Microscopy, LLC; EE.UU) y la cámara SONY 3CCD (DSP) (Sony Corp, Japón) junto con el software Smart Matrox Intelicam 8.0 (Matrox Imaging, Reino Unido) (Figura 39).

#### Evaluación cualitativa de la aposición (actividad osteoblástica) en el grupo de estudio frente al control

Para poner de manifiesto la actividad osteoblástica se utilizó la coloración enzimática de la fosfatasa alcalina (ALP). La ALP es una enzima característica de osteoblastos y preosteoblastos. Es una enzima hidrolasa marcadora de diferenciación osteosintética, responsable de formar colágeno tipo I y nódulos calcificados.

Para realizar esta técnica se preparó una solución madre en oscuridad:

- 5,32 mg naftol ASTR fosfato (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en 100µl de dimetil formamida con agitación.
- 8 mg de Fast Blue RR Salt (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- 10 ml de tampón Tris 0,1M ph 9 (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- 3,33 mg de cloruro de magnesio.

- Finalmente se filtró la preparación con papel y se ajustó el pH a 9.

Se preincubaron las muestras en portamuestras durante diez minutos en una disolución de Tris-Triton al 0,1% mezclado previamente durante cinco horas, y elaborado mediante 5 ml de Triton X-100 + 45 ml de Tris 0,1 M (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Seguidamente se enjuagaron las láminas en tampón Tris 0,1 M a pH 9.

Posteriormente se incubaron las muestras con tres gotas de la solución madre durante 30 minutos a 37°C en estufa, y se enjuagaron en tampón Tris 0,1 M a pH 9 (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

Para evaluar cualitativamente la presencia de actividad osteosintética positiva normal en los osteoblastos del tejido estudiado se utilizó la técnica de la ALP, cuyo resultado positivo son células marcadas de color azul-violeta (osteoblastos).

Para ello se empleó un método de adquisición similar al de la TRAP, y se observó la presencia positiva normal de osteoblastos en cada uno de los defectos y el hueso original. Estas imágenes se incluyen para ilustrar objetivamente el nivel de aposición de los defectos de estudio frente a los controles.

Para observar los detalles celulares y conseguir una buena discriminación, se utilizó un zoom x2 previa a la adquisición de las imágenes, que se realizó utilizando el microscopio óptico Zeiss Axioscop Plus (Zeiss Microscopy, LLC; EE.UU) y la cámara SONY 3CCD (DSP) (Sony Corp, Japón) junto con el software Smart Matrox Intelicam 8.0 (Matrox Imaging, Reino Unido) (Figura 39).

### **Análisis estadístico**

Para la valoración estadística de los resultados obtenidos se utilizó el análisis no paramétrico de U de Mann Whitney para comparación de los resultados obtenidos en ambos grupos de estudios, mediante el software STATVIEW F-4.5 en ordenador Mac.

## 6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son los siguientes:

### 6.1. Evaluación cualitativa de la estructura y densidad ósea global

Tras los ensayos con la coloración azul de toluidina (BT) se obtuvieron imágenes globales cualitativas de la estructura y densidad de los defectos regenerados tras un mes. Respecto al hueso original y los controles, se observó una estructura más estable y de mayor densidad ósea en los defectos regenerados con las membranas de  $\text{SiO}_2/\text{PLGA} + \text{P-O}_2$  frente a control. En los defectos óseos del grupo de estudio no se observó presencia de inflamación anormal, y se identificó una mayor semejanza con el hueso original que en los defectos controles, con mayor densidad de tejido medular (Figuras 41-43).

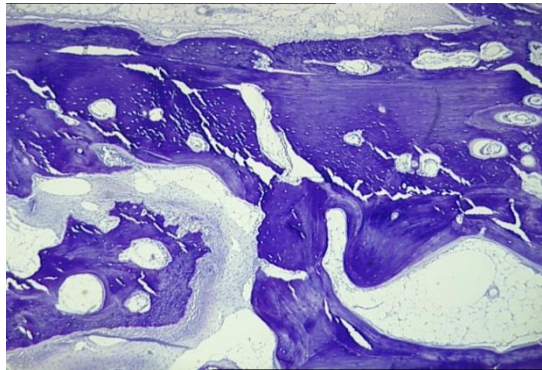


Figura 41: Coloración BT en hueso original. Zonas marginales del defecto. Objetivo 5x.

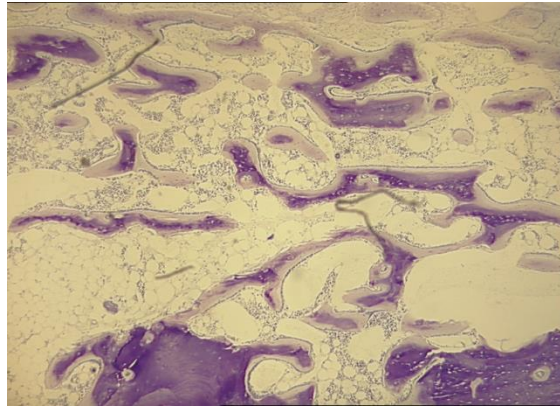


Figura 42: Control PLGA.

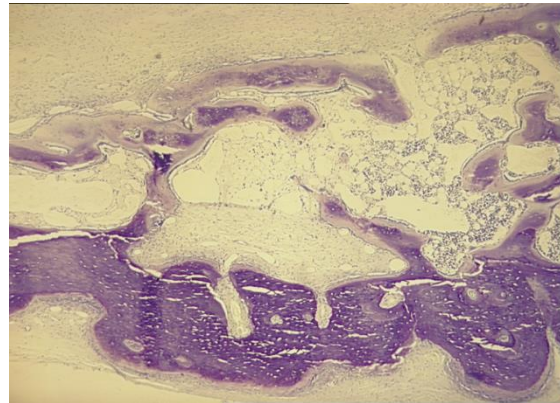


Figura 43 : SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>.

Microscopía óptica. Coloraciones. Azul de Toluidina (BT); Comparación de los niveles de hueso estructural en los diferentes nanocomposites respecto al control, tras un mes de regeneración; Objetivo 5x.

## 6.2. Nivel de regeneración ósea (porcentaje óseo neoformado)

Las capturas digitales obtenidas tras la coloración de nitrato de plata (VK) ilustran las formaciones de fosfato cálcico durante la regeneración de los defectos óseos tras un mes de cicatrización, y confirman una mayor densidad de calcio mineral en las membranas del tipo SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>, respecto a los controles de PLGA sencillo.

Tomando los valores promedios y la desviación estándar de los resultados cuantitativos obtenidos en el estudio tras los análisis con coloración de Von Kossa (VK), se obtuvieron los siguientes resultados: los datos de porcentajes óseos neoformados medidos a un mes de reposo tras el postoperatorio fueron de 39,72 % ± 3,53 en las



membranas funcionalizadas de estudio, frente a un  $30,57\% \pm 1,96$  en las membranas control ( $p < 0,05$ ) (Figuras 44 y 45).

Así mismo, los datos de las membranas funcionalizadas con silicio y plasma de oxígeno ofrecen menor diferencia respecto al nivel de hueso original que los defectos regenerados con las membranas controles, con un dato de  $+2,90\% \pm 9,3$  frente al  $-12,03\% \pm 5,1$  de los controles, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6).

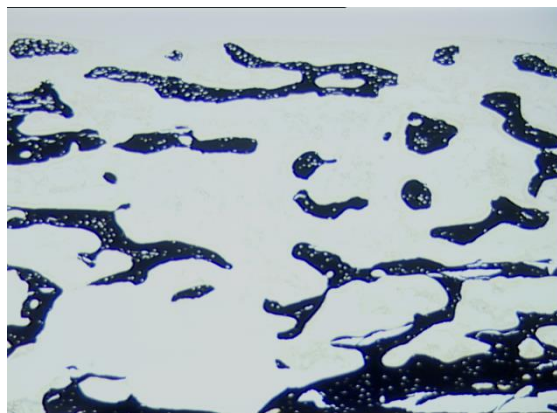


Figura 44: Control PLGA.

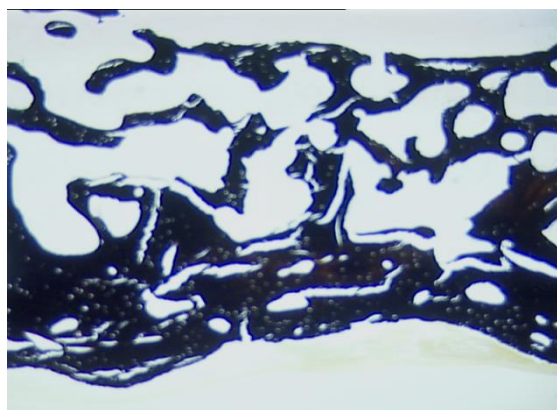


Figura 45: SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>.

Microscopía óptica. Mineralización. Von Kossa: Comparación de los niveles de mineralización entre los tratamientos respecto al control, tras un mes postcirugía; Objetivo 5x.

% HUESO NEOFORMADO (H.N.)	PLGA (CONTROL)	SiO <sub>2</sub> /PLGA+ P-O <sub>2</sub>	H. O.
<b>MEDIA</b>	30,57 % ± 1,96	39,72 % ± 3,53	42,6 % ± 3,95
<b>DIFERENCIA (H.O. – H.N.)</b>	-12,03 % ± 5.1	+2,90 % ± 9,3	

Tabla 6: Porcentaje óseo neoformado. Diferencias respecto al nivel de hueso original (H.O.). En ambas comparaciones entre grupo experimental y control se obtuvo  $p < 0,05$ . También se obtuvo  $p < 0,05$  en la comparación entre hueso original y control, en la primera fila.

### 6.3. Superficie ósea mineralizada (milímetros hueso neoformado por día)

Los resultados tras los ensayos con administración de marcadores a uno y ocho días previos al sacrificio muestran en microscopía de fluorescencia un espesor de capa ósea mineralizada del doble en el caso de defectos regenerados con membranas de SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub> (0,065 mm/día ± 0,015), frente a las membranas control (0,032 mm/día ± 0,01), (Figuras 46 y 47). Los datos semanales son de 0,455 mm/sem. ± 0,01 y de 0,224 mm/sem. ± 0,01 respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7).

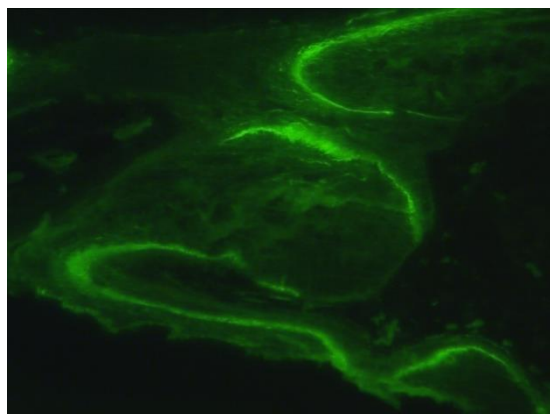


Figura 46: Control PLGA.

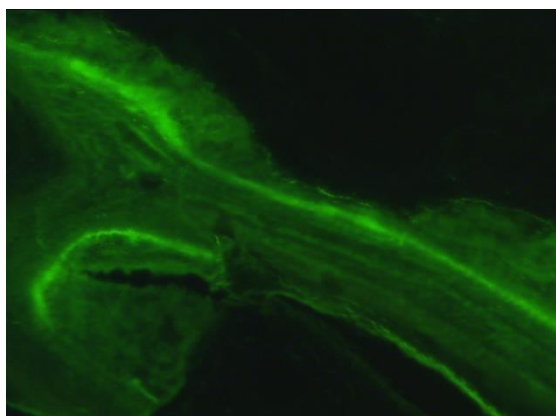


Figura 47: SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>.

Fluorescencia. Estudio de la calcéina: milímetros de hueso neoformado por día. Objetivo 10x.

Mm hueso / día	PLGA (CONTROL)	SiO <sub>2</sub> /PLGA + P-O <sub>2</sub>
<b>Media (mm/día)</b>	0,032 mm/día ± 0,005	0,065 mm/día ± 0,015

Tabla 7: Milímetros de hueso neoformado por día respecto al control. En las comparaciones entre grupo experimental y control se obtuvo  $p < 0,05$ .

#### 6.4. Actividad resortiva (número de osteoclastos por milímetro)

Las imágenes obtenidas tras los análisis con enzimología con TRAP muestra una evidente actividad osteoclástica positiva normal, destacando un aumento de la actividad resortiva en los defectos regenerados con las membranas de SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub> con valores de 13,58 osteoclastos(Oc)/mm ± 0,85 frente a 9,21 Oc/mm ± 0,6 en las membranas control, como se muestra en las Figuras 48 y 49.

Al mismo tiempo, las membranas que ofrecen menor diferencia cuantitativa respecto al nivel de resorción ósea medidas en el hueso original son también las funcionalizadas con silicio y plasma de oxígeno, con un resultado de - 7,92 Oc/mm ± 3,1 frente a -12,29 Oc/mm ± 1,1 en las controles con PLGA sencillo ( $p < 0,005$ ) (Tabla 8).

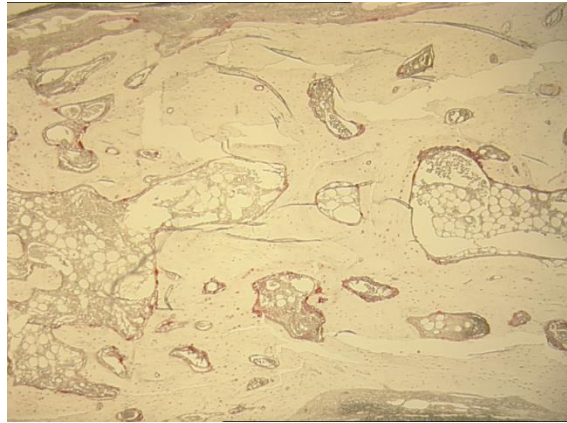
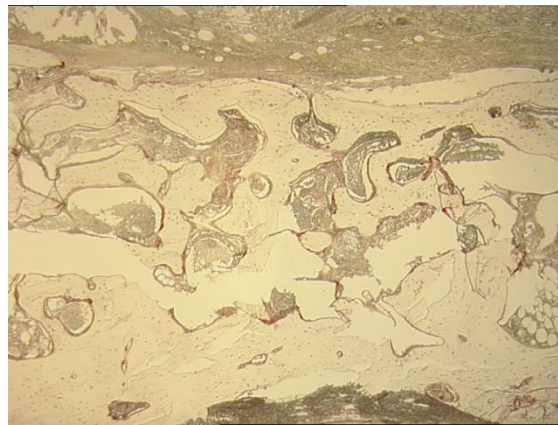


Figura 48: Control PLGA.

Figura 49: SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>.

Enzimología; Balance resorción/aposición. Evidencia de fosfatasa ácida tartrato de sodio resistente (TRAP) de osteoclastos tras un mes de regeneración; Objetivo 5x.

Oc / mm	PLGA (CONTROL)	SiO <sub>2</sub> /PLGA + P-O <sub>2</sub>	H.O.
<b>MEDIA</b>	9,21 Oc/mm ± 0,6	13,58 Oc/mm ± 0,85	21,51 Oc/mm ± 1,8
<b>DIFERENCIA (H.O. – H.N.)</b>	- 12,29 Oc/mm ± 1,1	- 7,92 Oc/mm ± 3,1	

Tabla 8: Osteoclastos por milímetro. Diferencias entre el número medio de osteoclastos por milímetro respecto al hueso original. H.O: Hueso Original; H.N: Hueso neoformado; Oc: Osteoclasto. En todas las comparaciones se obtuvo  $p < 0,005$ .

### 6.5. Presencia de aposición (actividad osteoblástica)

Se ha realizado una evaluación cualitativa de las membranas de estudio mediante la evidencia de la fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos tras un mes de regeneración.

Todas las muestras muestran una vitalidad tisular y nivel de aposición ósea aparentemente normal respecto al tejido original, observándose hileras de osteoblastos, marginales al tejido óseo en formación, en cada una de las muestras. Se observó mayor densidad de los mismos en los defectos regenerados con las membranas de estudio, tal y como se ilustra en las Figuras 50 y 51.

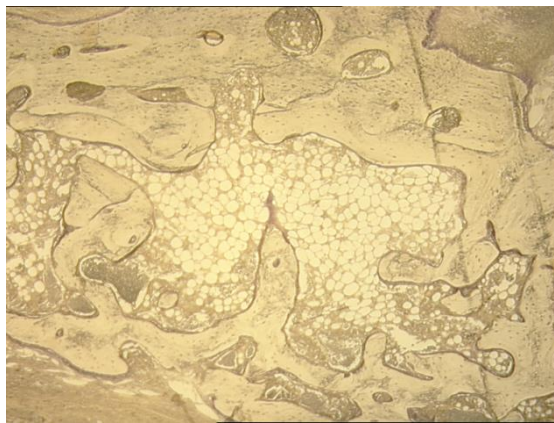


Figura 50: Control PLGA.

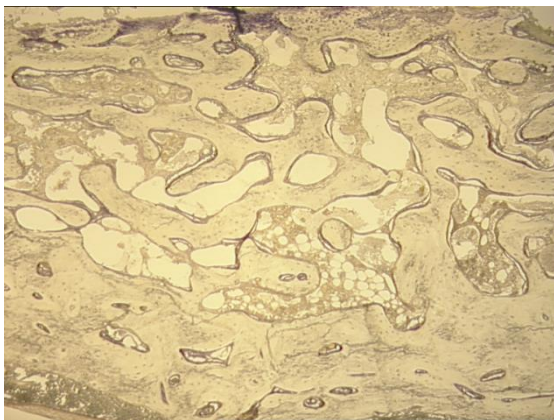


Figura 51: SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>.

Enzimología; Evidencia de la fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos tras un mes de regeneración: Objetivo 5x.

## 7. DISCUSIÓN

En nuestro modelo de estudio comparativo se usaron matrices laminares a modo de barreras intertisulares en forma de membranas reabsorbibles de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA), con el fin de evaluar las diferencias funcionales que aportaban el uso de varios nanocomposites metálicos, así como la modificación con plasma de oxígeno en el proceso de regeneración ósea guiada (ROG) en conejos de experimentación.

Las cirugías necesarias para crear estos defectos, así como las condiciones de estabilización han alcanzado a lo largo de estos años altas cotas de estandarización, por lo que el resultado de nuestro estudio podría ser comparado, salvando las diferencias, con otras experiencias, ayudando a valorar la mejora que hemos obtenido en nuestra innovación<sup>45, 46, 55, 63, 64, 195</sup>.

### Modelo *in vitro* vs *in vivo*

A fin de determinar si el nuevo material se ajusta a los requisitos de biocompatibilidad y estabilidad mecánica antes de su uso clínico, debe someterse a unas pruebas rigurosas tanto inicial *in vitro* y luego *in vivo*.

La experiencia *in vitro* se utiliza principalmente como una primera prueba para estudiar la toxicidad aguda y citocompatibilidad, para evitar el uso innecesario de los animales en las pruebas de materiales que son tóxicos a nivel celular. El término biocompatibilidad a menudo se utiliza incorrectamente junto al término *in vitro*. Pruebas de biocompatibilidad sólo se pueden utilizar en el caso de animales o humanos (*in vivo*), siendo el término correcto citocompatibilidad para ensayos *in vitro*<sup>196, 197</sup>. El cultivo de células *in vitro* se centra en el crecimiento de células, donde se recogen las células desde el tejido nativo y proliferan en una suspensión o unido a una superficie. En ensayos *in vitro* obtenemos información con respecto a la citotoxicidad, genotoxicidad, la proliferación y diferenciación celular<sup>198</sup>. Los estudios *in vitro* también

son útiles para la detección de nuevos materiales y la liberación de aditivos potencialmente dañinos incorporados durante el proceso de fabricación<sup>199</sup>.

Sin embargo, la caracterización *in vitro* no es capaz de demostrar la respuesta del tejido a los materiales, solo la respuesta de células individuales. Las pruebas *in vitro* pueden sobrestimar el nivel de toxicidad de los materiales ya que los estudios se limitan a los efectos agudos de la toxicidad debido a la corta vida de las células cultivadas<sup>199</sup>. El cultivo de órganos *in vitro* mantiene tejidos u órganos (en parte o conjunto), que pueden permitir una cierta diferenciación y preservación de la arquitectura y de la función, aunque la falta de factores sistémicos y la falta de vascularización que limita los nutrientes, el suministro de oxígeno, y la eliminación de residuos hacen muy difícil la extrapolación de los resultados a la situación *in vivo*.

En este trabajo de investigación se pone a prueba por primera vez, tras estudios previos *in vitro* favorables con osteoblastos humanos, el comportamiento *in vivo* de un material polimérico biocompatible y reabsorbible tratado físicamente con plasma de oxígeno y modificado a escala nanométrica con óxido de silicio, para evaluar su rendimiento en procesos de regeneración ósea guiada en conejos de experimentación.

Además de los estudios *in vitro*, la experimentación animal en mamíferos es fundamental para valorar los efectos que las modificaciones a nivel estructural y molecular tienen en la regeneración ósea, y poder extrapolarlo a pacientes humanos de alta demanda en un futuro próximo. Por un lado, la cicatrización ósea es un proceso complejo en el que se implican no sólo células, sino también factores de crecimiento, sales minerales, etc. que no pueden ser reproducidos de forma fiable en laboratorio, sino que es preciso obtenerlas en un ser vivo. Por otro lado, la regeneración de un defecto óseo implica la creación de dicho defecto.

Esto no es posible fuera de un modelo vivo, pues es necesario un entramado óseo maduro con células viables en el que se produzcan todas las cascadas de señales celulares y químicas tras la agresión quirúrgica y que llevarán a la cicatrización del defecto de forma autónoma por parte del organismo. Dicha reparación a veces será *ad integrum* y otras veces no, dependiendo de las capacidad del organismo en cuestión, de las características del defecto (que debe ser similar en todos los grupos de estudio) y de

las condiciones locales que presente la zona intervenida. En este último punto es donde se pretende incidir en el proyecto de investigación para mejorar la cicatrización ósea<sup>67</sup>.

A la hora de decidir sobre la especie animal hay varios factores que hay que tener en cuenta. Según Schimandle y Boden <sup>200</sup>, los factores de selección de animales son: el coste de adquisición y de cuidado de los animales, disponibilidad de los animales, aceptabilidad para la sociedad, tolerancia a la cautividad y facilidad para su espacio de habitabilidad. Otros factores que influyen son el cuidado, el mantenimiento, facilidad para la manipulación, resistencia a la infección y la enfermedad, características biológicas análogas a los seres humanos, tolerancia a la cirugía, instalaciones adecuadas y personal de apoyo. Además de esto la vida útil de las especies deben ser adecuadas para la duración del estudio. En nuestro caso es muy importante las características específicas del hueso y su posterior extrapolación de los resultados a la situación humana.

Las normas internacionales en relación a las especies que son adecuadas para la implantación de materiales óseos, subrayan que los perros, ovejas, cabras, cerdos y conejos son animales adecuados. Aunque la rata es una de las especies más utilizadas en la investigación médica, no se puede tomar en cuenta en este tipo de ensayos debido a las diferencias entre los huesos humanos y el de las ratas, y la limitación para crear varios defectos.

En nuestro caso, el conejo es uno de los animales más usados para la investigación médica, se utiliza en aproximadamente el 35% de los estudios de investigación musculo-esqueléticos<sup>201</sup>. Esto es en parte debido a la facilidad de manejo y tamaño. El conejo también alcanza su madurez esquelética en breve, alrededor de los seis meses de edad<sup>202</sup>. En cuanto a su estructura es evidente que hay grandes diferencias entre la anatomía ósea del conejo y el humano tanto en el tamaño, la forma y en la carga debido a las diferencias en las posturas entre las dos especies. Hay muy poca literatura sobre las diferencias entre la composición y la densidad ósea humana y la de los conejos, pero se han descrito algunas similitudes en la densidad mineral ósea (DMO) y en la resistencia a la fractura entre conejos y seres humanos<sup>203</sup>. En comparación con otras especies, como primates y algunos roedores, el conejo tiene un recambio esquelético y óseo más rápido<sup>202, 204</sup>. Aunque hay que tener esta consideración a la hora de extrapolar



los resultados en humanos, los conejos se utilizan comúnmente para el cribado de materiales antes de hacer una prueba en un modelo animal mayor.

### Aportación del modelo animal

Actualmente hay consenso en que la complejidad del micro-medioambiente tridimensional que envuelve a las células *in vivo*, incluyendo los cambios en el tiempo de fuerzas y estímulos, influye de modo significativo en los mecanismos de respuesta celular en términos de cambios fenotípicos, morfológicos y funcionales. Los modelos animales proveen de datos necesarios y adecuados antes de proceder con las aplicaciones humanas<sup>65, 67, 152, 195</sup>.

Una de las principales limitaciones del cultivo óseo es la falta controlada de carga fisiológica, ya que el hueso sin carga aumenta la resorción, como se puede apreciar en los pacientes después de un reposo prolongado<sup>205</sup>. Por estos motivos los modelos animales son esenciales para evaluar la biocompatibilidad, la respuesta de los tejidos y la función mecánica antes de la utilización clínica en el ser humano. Los modelos animales permiten la evaluación de los materiales en diferentes situaciones con o sin carga, en diferentes intervalos de tiempo y en diferentes calidades de tejido (por ejemplo hueso sano u osteopenia) y edades. Mientras que los modelos animales pueden representar la situación clínica, mecánica y fisiológica, hay que recordar que es sólo una aproximación, y que cada modelo animal tiene unas ventajas y desventajas.

La regeneración ósea no sólo implica el crecimiento celular, ni la secreción de matriz ósea, sino también la creación y maduración de un tejido óseo de acuerdo a unas características estructurales necesarias para que pueda ejercer las funciones mecánicas propias de dicho tejido. Dicha maduración estructural es imposible de recrear fuera de un ser vivo. Por todo ello, y habiendo quedado demostrado la completa replicabilidad de los procesos aplicados en este ensayo, puede considerarse este estudio de origen como una gran ayuda en procesos de ROG para posteriores investigaciones clínicas de mayor complejidad.

Podemos afirmar que el uso de la calota ha sido acreditado en numerosos estudios, y presenta importantes ventajas frente a otras localizaciones de la anatomía del conejo que también podrían utilizarse:

- El hueso presenta una amplia medular en sentido horizontal y un doble diploe (interno y externo). El diploe interno, que no debe dañarse, asegura la no realización de un mayor daño que el deseado. La medular asegura un alto aporte de sangre y células al defecto.
- La arquitectura macroscópica del defecto en dicho hueso, que es plano, sin la convexidad propia de los huesos largos, favorece la adaptación de la membrana sobre el mismo, asegurando que no habrá despegamiento de la misma durante la experiencia, y haciendo que sea fiable todo el diseño propuesto.
- El origen de la calota, por osificación membranosa, frente a la osificación endocondral, es similar a la de los huesos maxilares en el humano, por lo que la cercanía entre ambos huesos es mayor que la que encontraríamos entre otros huesos.
- El tamaño de la calota del conejo, cuando se utilizan defectos medianos posibilita la realización de varios defectos, lo que permite que cada defecto tenga su control en el mismo animal, lo que permite disminuir el número de animales a estudiar, siempre que el efecto de la intervención a evaluar sea local, no sistémico, como el caso que nos ocupa.
- El tamaño de los defectos, de 11 mm de diámetro, se decidió en base a bibliografías previas sobre la importancia de creación de defectos óseos críticos (no autoregenerables) por el propio organismo, y poder así elaborar una conclusión firme sobre la viabilidad de estas membranas en procesos ROG in vivo y su recomendación en futuro uso en ensayos clínicos en humanos <sup>18, 42, 61, 206</sup>.

Finalmente, las muestras obtenidas tras el sacrificio de los animales de experimentación deben ser convertidas en datos cuantitativos y objetivos que permitan comparar dimensiones como el crecimiento óseo, la presencia de osteoide y su

cantidad, la cantidad y calidad del hueso neoformado (pudiendo diferenciarlo del residual tras crear el defecto), etc.

### Trascendencia de los biomateriales en la cirugía regenerativas

Los requerimientos de nuevo hueso para restaurar o reemplazar el tejido óseo perdido o dañado es una de las mayores necesidades clínicas en la traumatología en la actualidad, siendo el daño total o parcial de tejido y la pérdida de la función de un órgano uno de los problemas más graves y costosos de la salud humana. Inicialmente, esos problemas se han abordado mediante el trasplante de órganos y tejidos alogénicos. Sin embargo, esta opción se ve limitada por la baja disponibilidad de donantes, los prejuicios y molestias derivadas, la complicación de la técnica y los efectos secundarios derivados del proceso<sup>21, 44</sup>. La ingeniería tisular, sin embargo, gracias a sus continuas investigaciones en el desarrollo de nuevos materiales para la reparación y la regeneración de tejidos, ha generado un gran avance en el siglo XXI, dando lugar al desarrollo de *scaffolds* y composites diseñados y modificados para ROG<sup>71, 207</sup>.

Esta emergente área (la ingeniería de tejidos óseos), está diseñando y desarrollando materiales que pueden reensamblar la estructura nativa del hueso, centrándose principalmente en polímeros sintéticos para mimetizar la matriz extracelular proteica principal (MEC) del hueso, colágeno tipo I. Con el fin de regenerar completamente el hueso, están siendo evaluadas incorporaciones de metales y minerales como los óxidos metálicos y la hidroxiapatita (HA), a modo de sustratos de nanocomposites en los *scaffolds*, para ser implantados en los defectos óseos<sup>206</sup>.

Los grandes avances que se han producido en ingeniería tisular han dado lugar a la aparición de técnicas que en la actualidad prometen ventajas como las que podrían estar relacionadas con la implantación quirúrgica de armazones osteoconductores, con transportadores de agentes biológicamente activos u osteoinductores, y finalmente con el trasplante de células aisladas o en soportes. Frecuentemente, elementos osteoconductores, osteoinductores y células óseas e indiferenciadas se combinan para

tratar defectos óseos. Para los tratamientos de los defectos óseos segmentarios post-traumáticos, tradicionalmente se han venido utilizando técnicas como:

- Aporte de hueso autólogo no vascularizado.
- La osteogénesis por distracción así como la transposición de hueso vascularizado.
- Aloinjertos.

Las sustituciones óseas en cirugía oncológica son otra de las indicaciones para las nuevas tecnologías. Aparte de las indicaciones citadas, como también se ha mencionado, la incidencia alta de las osteolisis provocadas por el empleo de biomateriales constituye una fuente importante en la demanda de investigación tanto para la preservación del tejido y su buena función como para su regeneración en los casos de destrucción.

Estudios recientes sugieren que el incremento de sobrecarga hospitalaria de las artroplastias en los próximos 20 años será notable. Las prótesis primarias de cadera, en algunos países aumentarán hasta en un 174%, mientras que las de rodilla llegarán a un 673%.

Se incrementará también el número de recambios de prótesis que alcanzará el doble del actual en el año 2015 para las rodillas y en 2026 para las caderas. En general, las cifras de aumento de cirugías de revisión que se calculan entre los años 2005 y 2030 serán de un 137% para las caderas y un 601% para las rodillas. Entre 1990 y 2002, en Estados Unidos, la cirugía de revisión para las prótesis totales de caderas oscilaba entre un 15,2% y un 20,5% (media de 17,5%) y entre 7,5% y 9,7% (8,2% promedio) para las rodillas <sup>45, 47-50, 54, 55, 63, 64, 151-155</sup>.

Todo ello demuestra, en definitiva, no sólo la justificación de este trabajo de investigación, sino la eficiencia y relevancia de este tipo de materiales biocompatibles reabsorbibles de tercera generación en la práctica clínica humana para regeneración tisular guiada (RTG) y concretamente en la variante ósea (ROG), tanto en estos

momentos como en épocas venideras donde el continuo desarrollo de estas modificaciones promete grandes e interesantes expectativas.

### Importancia de los polímeros de PLGA

Hay una gran variedad de membranas poliméricas reabsorbibles que permiten procedimientos de regeneración ósea en un solo paso, reduciendo así las molestias, costes y las posibles complicaciones para el paciente. Estos recubrimientos poliméricos son especialmente interesantes en biomedicina debido tanto a la diversidad de sus propiedades químicas y físicas como a su similitud con los tejidos humanos. Estas membranas son biocompatibles, no tóxicas, no inmunogénicas y actúan como soporte durante la formación de hueso, pero no tienen propiedades bioactivas que promuevan la osteogénesis<sup>208-212</sup>.

Se sabe que el PLGA se degrada por hidrólisis y es eliminado del organismo a través del ciclo de Krebs como dióxido de carbono y agua, por lo tanto, han sido utilizados con éxito como membranas reabsorbibles para la regeneración ósea guiada. Además está aprobado por la FDA (*Food and Drugs Administration*, EE.UU.) para multitud de aplicaciones, por lo que son utilizados comúnmente en investigaciones biomédicas<sup>51</sup>. Actualmente, los polilácticos, poliglicólicos y sus copolímeros y derivados son los polímeros biodegradables más comúnmente usados en ingeniería tisular, y el copolímero PLGA presenta mejores propiedades de degradación controlada que sus constituyentes monoméricos<sup>213</sup>. Sin embargo, el propio polímero es bastante bioinerte y no promueve una respuesta biológica significativa en las células óseas<sup>214</sup>.

Algunos autores discuten sobre su biocompatibilidad porque los productos derivados de su degradación disminuyen el pH causando inflamación y reacción a cuerpo extraño *in vivo*<sup>215</sup>. Además los productos de la degradación ácida tienen el potencial de inhibir la formación de cristales de apatita<sup>216</sup>, inhibiendo a priori la osteointegración. Sus propiedades hidrofóbicas influyen negativamente en la adhesión celular, sin embargo para intentar reducir la inflamación y mejorar la biocompatibilidad del PLGA, se han añadido diferentes partículas con resultados muy positivos en el PLGA:

nanopartículas de titanio<sup>195, 217</sup>, partículas de hueso desmineralizado<sup>215</sup>, y partículas de nanoapatita<sup>218</sup>.

De esta forma se han desarrollado diferentes materiales a base de PLGA en forma de *scaffolds*, *films*, membranas, y nanopartículas. Las mejoras en el PLGA hace que cuando se utilizan como membranas estén dando muy buenos resultados en los procesos de regeneración ósea, y además se le están incorporando nuevos materiales para mejorar algunos de los puntos débiles antes mencionados<sup>219-221</sup>. Los *scaffolds* se usan para regenerar tejidos junto con células madres, y las nanopartículas de PLGA han demostrado un amplio beneficio en los campos de la endodoncia, caries, cirugía, implantes y periodoncia<sup>222</sup>.

Como *scaffolds* se pueden utilizar solos, como transportadores de células o de fármacos<sup>223</sup>. Entre sus muchos campos de actuación están la regeneración del tejido cardiaco, la ciatrización y la regeneración ósea. Entre sus aplicaciones están las de transportar rhBMP-2 para promover la regeneración ósea<sup>224</sup>, añadir simvastatina que mejora la formación ósea<sup>225</sup> y la utilización de beta fostato tricálcico<sup>226</sup> que mejora las propiedades del material.

A nivel microscópico, diferentes términos han sido utilizados para describir a las nanopartículas: nanovehículos, nanosistemas, nanotubos y nanocristales. Entre sus ventajas está que penetran fácilmente en las células, aumenta la eficiencia del fármaco y mejora la actividad antibacteriana del medicamento<sup>227</sup>. El concepto de utilizar sistemas que mantengan concentraciones terapéuticas de medicamentos ha sido estudiado durante décadas con el objeto de minimizar los efectos de los fármacos libres<sup>228</sup>. Las micro y nanopartículas son los sistemas preferidos por su flexibilidad en la preparación y uso<sup>229</sup>. Una amplia variedad de sustancias han sido añadidas al PLGA para que se liberen lentamente y ayuden en el tratamiento periodontal y regenerativo: amoxicilina<sup>230</sup>, tetraciclina<sup>231</sup>, clorhexidina<sup>232</sup> y corticoides como la dexametasona<sup>233</sup> y todos con resultados esperanzadores.

En general, los procesos de adición de factores de promoción ósea o biomateriales a las membranas de PLGA parecen mejorar los resultados<sup>195, 234, 235</sup> en la regeneración del tejido óseo. Como en el caso nuestro que la adición de SiO<sub>2</sub> y el

tratamiento con plasma de oxígeno promueve más la regeneración ósea que las membranas de PLGA solas.

Además de sus propiedades bioactivas, las características de la superficie son muy influyentes para la adhesión y el crecimiento celular y deben ser estudiadas con esmero a la hora de plantear el paso de un biomaterial a un medio ambiente biológico, donde cierta hidrofiliidad en los materiales ayudará a las conexiones entre las células y el *scaffold* para controlar la adhesión celular y mantener las expresiones fenotípicas de diferenciación<sup>20</sup>. El test mecánico también debe desarrollarse bajo condiciones fisiológicas, ya que todos los *scaffolds* se desarrollan para ser usados en un cuerpo vivo donde hay multitud de fluidos tisulares y una temperatura de 37°C<sup>71</sup>. Según Liao, el PLGA tiene un excelente módulo de elasticidad que es equivalente al de los ligamentos interóseos<sup>236</sup> que le confiere unas excelentes propiedades mecánicas.

En cuanto a las perspectivas sobre este tipo de materiales, es evidente el gran avance científico y tecnológico que ha traído consigo la incursión de los biopolímeros en el área de la salud, al permitir una mejora sobre los sistemas terapéuticos convencionales en aras de obtener líneas de trabajo tendentes a lograr terapias inteligentes a la medida de cada paciente o situación patológica.

Nuestro *scaffold* de poliláctico-co-poliglicólico en forma de membranas ha resultado de fácil manejo y manipulación, no observándose desplazamiento tras la implantación. Así mismo, no se observó inflamación anormal ni signos claros o síntomas de alergia, reacción inmunológica o incompatibilidad en ninguno de los defectos tras el periodo de reposo analizado, el material implantado fue bien tolerado por el tejido blando subyacente sin evidencias de necrosis, considerándose por tanto al PLGA como alternativa viable y recomendable para los procesos de ROG *in situ*.

Los defectos situados en el cráneo y la cara, en contraste con otros huesos corporales, necesitan de materiales de degradación rápida de alrededor de semanas, para una correcta absorción y de esta forma facilitar el crecimiento y regeneración del tejido óseo donde son implantados. No obstante, todo el material implantado debió ser progresivamente degradado durante el primer período de regeneración y totalmente reemplazado por el nuevo tejido en regeneración, ya que tras cuatro semanas no se

observaron evidencias del mismo en los cortes histológicos tras los análisis de Von Kossa y azul de toluidina, lo que sugiere la biocompatibilidad razonable del mismo<sup>151</sup>.

Tal y como se ha remarcado anteriormente, los requerimientos de los *scaffolds* para ROG son muy complejos, ya que deben tener en cuenta multitud de variables para un correcto comportamiento del material en el tejido implantado y llevar a cabo la función para la cual está diseñado<sup>150, 237-239</sup>.

### Importancia de la rugosidad y del plasma de oxígeno

Los procesos por los que se produce la adhesión celular están determinados por las propiedades físicas y químicas de su superficie. La adhesión que se produce al inicio entre una célula y la superficie del biomaterial determinará los siguientes procesos como morfología, migración, proliferación y diferenciación<sup>163</sup>. Una vez que se ha producido la adhesión celular, la formación de la capa de apatita se verá determinada por la textura y funcionalidad de la superficie del material, incluyendo la orientación cristalina del sílice superficial<sup>171</sup>.

Es muy interesante determinar de forma aislada el papel que juega cada una de las propiedades superficiales de los biomateriales. Sin embargo, las superficies son muy heterogéneas por los diferentes tipos de grupos químicos funcionales, textura, rugosidad y áreas hidrofílicas e hidrofóbicas. El estudio del efecto causado por cada una de estas propiedades es complejo, porque además la modificación de alguna de ellas tiene efecto en alguna otra.

Tan importante como la composición química de la superficie, es la micro y nanotopografía de la superficie<sup>240,241</sup>. Es por ello que hemos utilizado una superficie nanorugosa fabricada a través de plasma de oxígeno.

Dimensiones menores a la micra influyen en los contactos focales, el citoesqueleto, la adhesión, la morfología y la orientación de las células<sup>242</sup>. En el rango de 1-100 micras la superficie rugosa influye en las células sobre su adhesión, morfología, orientación y formación ósea<sup>242</sup>. En intervalos mayores a 100 micras, los cambios son muy importantes para la micro-retención<sup>243</sup>.



En la osteogénesis, son muy importantes las primeras fases de cicatrización como es la formación del coágulo. Una vez que se forma éste, por adsorción se pegan al elemento de soporte una gran variedad de proteínas sobre su superficie. Las proteínas están formadas por péptidos y a su vez por aminoácidos que son las biomoléculas más pequeñas. Por ello podemos entender que la adsorción de proteínas sobre la superficie es un factor que determina su buena biocompatibilidad. Estas proteínas las podemos entender como ligandos específicos para cada célula que promoverán genéticamente la quimiotaxis, proliferación, crecimiento y diferenciación celular<sup>244</sup>.

Estas proteínas que provienen del plasma o suero del paciente tienen una gran importancia en la adhesión de las plaquetas, liberarán una gran cantidad de factores de crecimiento y quimiotácticos que darán lugar a la proliferación y diferenciación de células osteogénicas, por lo que la adsorción de proteínas a las que se adhieren plaquetas es un factor osteoconductor muy importante<sup>186, 245, 246</sup>.

Algunas de las proteínas que se unen son fibronectina, vitronectina, elastina, laminina y colágeno que tienen un especial interés en la formación de la malla de fibrina del coágulo. Estas proteínas se unen específicamente a las células osteogénicas de una manera única gracias los receptores de membrana. Gracias a estos receptores podemos plantearnos el uso de proteínas específicas de osteoblastos y huir de adhesiones inespecíficas o de células de tejido blando<sup>186, 245</sup>.

Una vez se ha formado la malla de fibrina (gracias a la adsorción de la fibronectina), los osteoblastos se podrán adherir a ésta y migrar por este *scaffold* tridimensional y llegar al metal donde comenzarán a depositar la matriz orgánica de colágeno que se irá mineralizando poco a poco. A esta unión a modo de interdigatación micro-mecánica se le conoce como *cement line*. Por eso una superficie rugosa a la que se pueda adherir más fácilmente las células es crucial para que se forme la matriz ósea por la que se pegará a la superficie de la membrana<sup>186, 245, 246</sup>.

Un diseño adecuado de la topografía de la superficie de la membrana puede mejorar su potencial adhesivo y la capacidad de las células para unirse a la interfaz sustrato-célula; y ayudar a dirigir y a organizar la adhesión y la diferenciación de las células óseas con el fin de facilitar una buena regeneración del tejido<sup>43</sup>. A su vez, la calidad de la adhesión celular está relacionada con la morfología de las células y su

capacidad de proliferación y diferenciación<sup>162, 186</sup>. La topografía de la superficie juega un papel decisivo en la adhesión, la migración, el metabolismo y la diferenciación osteoblástica<sup>57, 58</sup>.

Una modificación topográfica de la superficie de contacto entre la célula y la superficie es de suma importancia. Por lo tanto, la posibilidad de modificar la superficie de una membrana biodegradable con propiedades bioactivas, para crear biomateriales que imiten a la matriz ósea extracelular y estimular la respuesta de los osteoblastos, debería hacerlas más adecuadas para el uso clínico, y es de esperar más mejoras en un futuro próximo<sup>247-249</sup>.

Es importante señalar que los osteoblastos, como otras células que crecen ancladas a una matriz extracelular, se tienen que adherir al sustrato antes de iniciar sus funciones normales<sup>250</sup>. Por lo tanto, estos sustratos rugosos facilitan la adhesión y permiten la señalización desde la MEC a los núcleos via integrinas, citoesqueleto, y cascadas moleculares (es decir, proteínas G, quinasas, y iones), que controlan la proliferación celular y la neoformación de tejido, y puede ser altamente beneficioso en los procesos de regeneración ósea guiada<sup>150, 157, 251</sup>.

Damos por supuesto que la respuesta de las células no sólo depende de la composición química, sino que también de la rugosidad de la superficie<sup>252</sup>, la porosidad<sup>253</sup>, la topografía y el tamaño de la superficie de anclaje<sup>253</sup>. Aunque la hidrofilia se considera muy importante para la adhesión celular, parece que las interacciones entre las células de unión específica y la superficie de las membranas son factores más dominantes<sup>265</sup>.

La porosidad de los *scaffolds* para reparación ósea es un prerrequisito para la integración del material y permitir la colonización de las células osteoprogenitoras y su diferenciación para promover la síntesis de la MEC y la materia ósea de novo. El cambio de la superficie nanométrica de la membrana mediante un tratamiento de plasma de oxígeno podría inducir cambios en la morfología nuclear y en la transcripción génica, modificándose, por tanto la expresión fenotípica<sup>44, 149</sup>.

Las características de la superficie, además de sus numerosas propiedades biomecánicas (grupos funcionales, distribución de carga, degradación controlada, etc.) que posibilitan la osteogénesis *in vivo* al proporcionar un nicho adecuado a las células

madre mesenquimales para diferenciarse hasta líneas osteogénicas, son muy influyentes para la adhesión y el crecimiento celular, donde cierta hidrofiliidad en los materiales ayudará a las conexiones entre las células y el *scaffold* para controlar la adhesión celular y mantener las expresiones fenotípicas de diferenciación<sup>65, 151-154</sup>.

Aplicando vidrios o iones inorgánicos a las células no se consiguen factores como la rugosidad de la superficie, la energía superficial, la carga eléctrica superficial y el tamaño del poro<sup>254, 255</sup> los cuales influyen en el comportamiento celular, por lo que la membrana cumple con estas funciones. En contra, la sola deposición de partículas de SiO<sub>2</sub> o TiO<sub>2</sub> sin el plasma de oxígeno parece causar un aplanamiento de la superficie<sup>251</sup>.

Hay varias formas de modificar la superficie de un material con el fin de mejorar la colonización celular y la diferenciación celular osteogénica. Estos depósitos en la superficie de las membranas deben soportar los procesos de esterilización sin que se vean alteradas sus aplicaciones clínicas<sup>211</sup>.

El uso de plasma ha sido publicado en más artículos aunque según estos autores<sup>256, 257</sup> su uso a gran escala industrial es difícil, debido a los requisitos técnicos y los numerosos parámetros involucrados en la optimización de la membrana.

El plasma de oxígeno aumenta la rugosidad de la membrana<sup>251</sup> y su capacidad para estimular la regeneración ósea (evaluado como la combinación de neoformación ósea, la mineralización, la resorción y la presencia de los osteoclastos, y de osteosíntesis actividad) en mayor medida que la sola aposición de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> y de TiO<sub>2</sub> sobre PLGA<sup>195</sup>.

En nuestra investigación se ha estudiado la modificación de las membranas con plasma de oxígeno y la aposición de nanopartículas de dióxido de silicio sobre la superficie. La originalidad principal del estudio viene dada por la modificación de las membranas a escala nanométrica con nanopartículas de SiO<sub>2</sub> que son aposicionadas por la vía seca<sup>195</sup>.

En nuestro estudio, la combinación del plasma de oxígeno y la aposición de sílice para la funcionalización de las membranas de PLGA ha dado lugar a unos resultados prometedores de regeneración y mineralización ósea<sup>195</sup>.

Sin la adhesión, los osteoblastos no pueden propagarse o diferenciar. Es primordial la adhesión celular sobre la membrana<sup>248, 258, 259</sup>. Las células requieren de un

anclaje a la matriz extracelular para poder proliferar y diferenciarse a posteriori y esto ocurre gracias a la modificación del PLGA con plasma de oxígeno y la aposición de SiO<sub>2</sub>.

### Importancia de la funcionalización con SiO<sub>2</sub> y la osteogénesis

Los poliésteres sintéticos como el poliglicólico (PGA), el poliláctico (PLA), y sus derivados como el (PLGA), se utilizan con mucha frecuencia en la regeneración ósea y la administración de fármacos gracias a sus propiedades mecánicas y poder controlar su degradación<sup>49, 260</sup>. Sin embargo su hidrofobicidad y menor afinidad por las células que los polímeros naturales limitan su aplicación. Esto compromete su resistencia mecánica y facilita la liberación de residuos ácidos de degradación, disminuye el pH, y por lo tanto, favorece la proliferación bacteriana y la respuesta inflamatoria<sup>261</sup>. Para tratar de mitigar estos inconvenientes, se han modificado las superficies de las membranas con materiales inorgánicos como la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP) o los cristales bioactivos<sup>49</sup>. Esta modificación de la superficie mediante compuestos bioactivos se ha desarrollado mucho en los últimos años. Esto se puede llevar a cabo con polímeros sintéticos, incluyendo productos químicos líquidos, tratamientos con gases ionizados, o monocapas de sílice como es nuestro caso, que generalmente requieren unas reacciones complejas y equipos específicos<sup>262</sup>.

La funcionalización de la superficie se aplica porque elementos como el óxido de silicio pueden provocar respuestas biológicas específicas y dirigir el comportamiento celular y conferir propiedades mecánicas adecuadas. Para el tejido óseo en concreto se ha funcionalizado las superficie con scaffolds porosos de sílice<sup>263, 264</sup>, de alúmina<sup>265</sup>, zirconia<sup>263</sup> y fosfato de calcio<sup>264</sup>.

Materiales a base de óxido de silicio tienen muchas aplicaciones en medicina y biotecnología, por ejemplo la reparación ósea<sup>266</sup>, suministrar medicamentos<sup>267-269</sup> y terapias contra el cáncer<sup>270-271</sup>. Debido a su biocompatibilidad y bioactividad, los vidrios a base de sílice están entre los materiales más investigados para la regeneración de tejidos durante los últimos 40 años<sup>266</sup>.

La estabilidad del sílice hace que sea una matriz protectora que evita la degradación de los fármacos o biomoléculas que están ligadas a este componente<sup>274</sup>, mientras que el sílice puede reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos<sup>273</sup>.

El silicio contribuye al fortalecimiento de los huesos gracias a la promoción de la formación ósea, especialmente durante el envejecimiento. Un estudio reciente sobre la influencia del silicio en la proporción OPG-RANKL sugiere que tiene un potencial osteoinductor y osteogénico, ya que combina la regulación de los genes necesarios para la diferenciación, con el potencial para aumentar la proliferación de las células osteogénicas<sup>274</sup>.

El silicio se utiliza para mejorar la bioactividad de los biopolímeros y promover la osteogénesis. Es un material inorgánico de bajo coste, biocompatible, que tiene una excelente estabilidad química y es ideal para modificar la topografía de la superficie<sup>274-276</sup>.

La hipótesis es que la membrana de PLGA puede mantener buenas propiedades mecánicas, mientras ganan propiedades biológicas gracias al componente injertado<sup>260</sup>. Es de vital importancia que el depósito de SiO<sub>2</sub> no altere la membrana de PLGA, para que ésta mantenga sus propiedades mecánicas y biológicas<sup>277</sup>. El SiO<sub>2</sub> es una herramienta valiosa para aumentar la bioactividad de las membranas de PLGA mediante la combinación de señales celulares nanotopográficas y la incorporación de factores bioactivos<sup>277</sup>.

Analizando los resultados de este proyecto, hemos observado que mientras que los defectos controles muestran sólo pequeños nódulos óseos inmaduros y una fina capa cortical endocraneal, el resto de materiales de ensayo presentan una capa de hueso cortical endocraneal densa y gruesa similar al tejido óseo maduro, y una franja exocraneal en estado de formación bastante avanzado, lo que proporciona mejor estabilidad física al tejido neoformado, lo que hace suponer la capacidad osteoinductiva de los materiales nanocomposites utilizados en dichas membranas para reparar el hueso dañado<sup>25, 50, 64</sup>.

Gracias a la incorporación de silicio disminuimos el ángulo de contacto, que es un factor muy importante porque la humectabilidad determina en gran parte la respuesta biológica. Según la literatura un buen ángulo sería entre 50 y 60°<sup>278</sup>. Según el estudio de

Ho<sup>278</sup>, mientras el ángulo de contacto en el titanio es de 75, la incorporación de SiO<sub>2</sub> disminuye a 50°.

El silicio además disminuye la adhesión bacteriana que se da con tanta frecuencia en el PLGA. Algunos micro-organismos orales como *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis*, *S. sanguis*, and *C. Albicans* parecen adherirse muy bien al PLGA en estudios *in vitro* y esto podría dar lugar a una infección bacteriana *in vivo*<sup>279</sup>. Según el estudio de Ho, la incorporación de SiO<sub>2</sub> a la superficie induce la muerte bacteriana<sup>278</sup>.

La incorporación de silicio también ayuda a la fijación celular. Esto se determina estudiando las fibras de actina que contribuyen a la migración celular. Según el estudio de Ho, en el que se tiñen las fibras de actina de las células, la incorporación de SiO<sub>2</sub> incrementa la unión de las células a la superficie en comparación con Ti prístino, por lo que determinan que el Si es un promotor de la fijación celular<sup>278</sup>. Gao<sup>280</sup>, en su estudio *in vitro* demuestra que un revestimiento de SiO<sub>2</sub> sobre partículas de β-TCP mejora sus propiedades biológicas y mecánicas, induce la formación de apatita ósea sobre las partículas de β-TCP y acelera la formación de capas mineralizadas. Se puede apreciar en la histología que aporta, que hay más células unidas al β-TCP/SiO<sub>2</sub> que al β-TCP y que las células producen muchos filopodios y matriz extracelular. Sus resultados demuestran que el SiO<sub>2</sub> mejora la adhesión y diferenciación celular.

El silicio es un elemento importante para la formación de tejido óseo<sup>130</sup> y puede estimular la proliferación y diferenciación celular de los osteoblastos y la mineralización ósea<sup>281</sup>. La fosfatasa alcalina incrementa con niveles mayores de SiO<sub>2</sub> en comparación con las células que están en contacto solo con Ti. Hay más estudios que asocian el Si con la actividad de los osteoblastos incluyendo la proliferación y mineralización<sup>282</sup>.

### Relevancia de los resultados histomorfométricos

Las técnicas de histomorfometría han demostrado su idoneidad para llevar a cabo este objetivo, desarrollado y contrastado con un análisis estadístico profundo, significativo, y con una valoración completa. En el análisis histomorfométrico, se observa a primera vista una mayor proporción de médula ósea y tejido adiposo en los

defectos controles regenerados mediante ROG con membranas de PLGA sencillas, propio de tejidos inmaduros en fase temprana de cicatrización. Sin embargo, en los defectos regenerados con membranas de PLGA funcionalizadas con óxido de silicio y plasma de oxígeno SiO<sub>2</sub>/PLGA/P-O<sub>2</sub> presentan una proporción mínima de estos tejidos inmaduros y por el contrario evidencian una formación completa de tejido óseo maduro con una capa densa exocraneal y endocraneal. Esos tejidos inmaduros con adipocitos no podrían ser artefactos de la degradación incompleta de las membranas, porque debido a su naturaleza hidrofílica provoca su degradación en medio acuoso en tiempo inferior al utilizado en este ensayo. Así mismo, quedaron demostradas las ventajas a nivel de adhesión celular, morfología, proliferación, diferenciación y relación con la interfase matriz-célula gracias al diseño estructural y la topografía modificada de estas membranas, lo que promovió un aumento de la velocidad de regeneración tisular. Todas las membranas testadas fueron biocompatibles, y mostraron correlación directa entre el tipo de tratamiento nanométrico y el tipo y calidad del tejido resultante tras el mes de regeneración<sup>152, 195</sup>.

Pasadas cuatro semanas tras la implantación, el proceso de sellado óseo sigue aun en proceso, y el remodelado empieza a hacerse notable, observándose degradación del material antiguo y deposición del nuevo hueso, implicando la presencia de poblaciones de células especializadas trabajando en compartimentos diferentes pero muy cercanos, observándose también en este caso la conservación de adipocitos del tejido a modo de reserva energética para la regeneración del trauma ocasionado, demostrado por la presencia de células gigantes multinucleadas positivas mediante análisis de evidencia de la fosfatasa ácida resistente a tartrato de sodio (TRAP)<sup>151,155</sup>.

Encontramos positividad en las pruebas para la detección de osteoblastos en todas las muestras, pero en mayor proporción en los defectos experimentales, demostrando la osteoconducción de los nanocomposites y encontrando evidencia de la migración de estas células al interior de todo el defecto. Los análisis de la fosfatasa alcalina (ALP) muestran actividad osteosintética y un nivel de aposición normal, y propia de osteoblastos activos de tejidos vivos en procesos regenerativos<sup>151</sup>.

Si analizamos detalladamente los datos resultantes del estudio, y tomando en cuenta el nivel de hueso neoformado respecto al control sin membrana y al hueso

original preexistente en la calota, parece evidente que la membrana con nanocomposites de óxido de silicio y pretratamiento con plasma de oxígeno tiene mayor potencial osteoregenerador frente al control<sup>75</sup>. Los ensayos de marcaje con calceína muestran la prueba más concluyente del estudio, mostrando el doble de milímetros de mineral neoformado en los defectos regenerados con las membranas con plasma y silicio respecto a los defectos controles.

Por tanto, el tratamiento con plasma de oxígeno (P-O<sub>2</sub>) en las membranas de este trabajo parece aumentar la capacidad osteoinductora de las mismas, impulsada por los nanocomposites de óxido de silicio, dato que queda respaldado también en los análisis de la fosfatasa ácida (TRAP). Todas las membranas estudiadas son biocompatibles. En todos los casos se encontraron una capa de tejido cortical denso endocraneal junto con una capa de hueso espeso exocraneal, que proporcionan una gran estabilidad al hueso neoformado<sup>195</sup>.



## 8. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en nuestro estudio, en base a los estudios de experimentación animal realizada *in vivo* en conejos raza New-Zeland mediante ensayos de regeneración ósea guiada (ROG) son las siguientes:

1. Las membranas de ácido poliláctico-co-poliglicólico modificadas a escala nanométrica con óxido de silicio y pretratamiento físico de plasma de oxígeno (SiO<sub>2</sub>/PLGA +P-O<sub>2</sub>), en comparación a los controles sin estas modificaciones (PLGA sencillo), presentan un rendimiento más adecuado, disminuyendo notablemente las diferencias estructurales de los defectos cicatrizados y estudiados un mes tras la intervención quirúrgica respecto al hueso original preexistente, en este grupo frente al grupo control.
2. La adición de nanocomposites de óxido de silicio junto con el pretratamiento físico de plasma de oxígeno a las membranas sencillas de PLGA tiene como efecto, mostrado claramente en los resultados de nuestro estudio, un aumento de la capacidad regeneradora del tejido óseo en los defectos estudiados: densidad ósea, porcentaje de hueso neoformado, actividad osteoblástica y actividad osteoclástica.

3. No se han observado signos de inflamación tisular anormal, reacción alérgica o incompatibilidad física o química de ningún tipo en ninguna de las muestras analizadas, por lo que puede afirmarse que las membranas estudiadas son biocompatibles con el tejido óseo sobre el que se han utilizado.
  
4. A raíz de nuestros resultados, es aconsejable la realización de futuros estudios para avanzar en una posible aplicación de las membranas desarrolladas en regeneración ósea guiada en humanos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Burger EH, Klein-Nulend J, Van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone - their role in mechanotransduction. *J Nutr.* 1995;125:2020S-3S.
2. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* 1995;57:344-58.
3. Marotti G, Palumbo C. The mechanism of transduction of mechanical strains into biological signals at the bone cellular level. *European Journal of Histochemistry.* 2007;51:15-20.
4. Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: The mechanisms and mechanics of bone adaptation. *Journal of Orthopaedic Science.* 1998;3:346-55.
5. Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2003;14 Suppl 3:S13-18.
6. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4833–41.
7. Wallach S, Farley JR, Baylink DJ, Brenner-Gati L. Effects of calcitonin on bone quality and osteoblastic function. *Calcif Tissue Int.* 1993;52:335-9.
8. Ranly DM. Craniofacial growth. *Dent Clin North Am.* 2000;44(3):457-470
9. Rabie ABM, Deng YM, Samman N, Hägg U. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects. *J Dent Res.* 1996;75:1045-51.
10. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone.* 1992;13:S3-6.
11. Burger EH, Klein-Nulend J, Van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone - their role in mechanotransduction. *J Nutr.* 1995;125:2020S-3S.
12. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006;85:596-607.

13. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: Concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115:3318-25.
14. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: Relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone.* 2002;30:5-7.
15. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 394-401.
16. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1980; 9: 257-265.
17. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the results of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1984; 11: 494-503.
18. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. Review. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32:477-86.
19. Hutmacher D, Hürzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR application. *JOMI.* 1996; 11: 668-78.
20. Scantlebury TV. A decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1993; 64: 1129-37.
21. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol.* 1988; 59: 589-94.
22. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnson MC, Koch G. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *J Periodontol.* 1991; 62: 718-23.
23. Santarelli G, Parodi R, Carusi G. The use of a slowly resorbable collagen barrier in the generation of bone in deep wide defects. A case report. *Int J Periodont Res Dent.* 1996; 16: 1-4.
24. Parodi R, Santarelli G, Carusi G. Application of slow resorbing collagen membrane to periodontal and peri-implant guided tissue regeneration. *Int J Periodont Res Dent.* 1996; 16: 175-81.
25. Galgut P, Potrola R, Waite I. Histologic evaluation of biodegradable and non degradable membrane placed transcutaneously in rats. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 581-5.

26. Lundgren D, Laurell L, Gottlow J. The influence of the design of two different bioresorbable barriers on the results of guided tissue regeneration therapy. An intra-individual comparative study in the monkey. *J Periodontol.* 1995; 66: 605-9.
27. Caffesse RG, Nasjleti CE, Morrison EC, Sanchez R. GTR : Comparison of absorbable and nonabsorbable membranes in dogs. *J Dent Res.* 1994; 73: 380-1.
28. Block MS, Kent JN. Maxillary sinus grafting for totally and partially edentulous patients. *JADA.* 1994;124:139-43.
29. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1996; 47: 256-260.
30. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol.* 2003;74:849-57.
31. Tözüm TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc.* 2003;69:664.
32. Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE, Vrotsos IA. Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontol.* 2003;5:63-70.
33. Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005;84:390-406.
34. Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): How do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci.* 2003;45:57-73.
35. Kaigler D, Cirelli JA, Giannobile WV. Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2006;3:647-62.
36. Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE, Nevins M. Periodontal regeneration in human class II furcations using purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry.* 2003;23:213-25.
37. Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, Kao RT, Mellonig JT, Hinrichs JE, et al. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: Results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol.*

- 2005;76:2205-15.
38. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone*. 1996;19:235-375.
  39. Howard Howell T, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol*. 1997;68:1186-93.
  40. Bonewald LF. Osteocytes: A proposed multifunctional bone cell. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*. 2002;2:239-41.
  41. Gao Y, Yang L, Fang YR, Mori M, Kawahara K, Tanaka A. The inductive effect of bone morphogenetic protein (BMP) on human periodontal fibroblast-like cells in vitro. *J Osaka Dent Univ*. 1995;29:9-17.
  42. Shin M, Abukawa H, Troulis MJ, Vacanti JP. Development of a biodegradable scaffold with interconnected pores by heat fusion and its application to bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84: 702-9.
  43. Biggs M.J.P, Richards R.G, Gadegaard N, Wilkinson C.D.W, Dalby M.J. Regulation of implant surface cell adhesion: characterization and quantification of s-phase primary osteoblast adhesions on biomimetic nanoscale substrates. *J Orthop Res*. 2007; 25: 273–82.
  44. Dalby M.J. Topographically induced direct cell mechanotransduction. *Med Eng Phys*. 2005; 27: 730-742
  45. Lobo SE, Wykrota FH, Oliveira AC, Kerkis I, Mahecha GB, Alves HJ. Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramics and platelet concentrate in critical-size bone defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20: 1137-47.
  46. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008; 58: 424-30.
  47. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, Shi D, Liu L, Zheng Q, Gao C, Wang J. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2010; 20: 109-20.
  48. Shokrgozar MA, Khavandi A, Javadpour J, Shafieyan Y, Farokhi M. Fabrication and

- characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) /hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94:137-45.
49. Jung RE, Kokovic V, Jurisic M, Yaman D, Subramani K, Weber FE. Guided bone regeneration with a synthetic biodegradable membrane: a comparative study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22: 802-7.
50. Wu C, Ramaswamy Y, Zhu Y, Zheng R, Appleyard R, Howard A, Zreiqat H. The effect of mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug-release properties of poly (DL-lactide-co-glycolide) films, P100. *Biomaterials*. 2009; 12: 199-208.
51. Testut L, Latarjet A. *Tratado de Anatomía Humana (actualización 2012)*. Salvat editores. Barcelona, España. 1971. 2012; 2: 1031-98.
52. Popat K.C, Leoni L, Grimes C.A, Desai T.A. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials*. 2007; 28: 3188-97.
53. Rozen N, Lewinson D, Bick T, Meretyk S, Soudry M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2007; 17: 197-213.
54. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008; 2: 100-14.
55. Maréchal M, Eyckmans J, Schrooten J, Schepers E, Luyten FP, Van Steenberghe. Bone augmentation with autologous periosteal cells and two different calcium phosphate scaffolds under an occlusive titanium barrier: an experimental study in rabbits. *J Periodontol*. 2008; 79: 896-904.
56. Rouahi M, Champion E, Hardouin P, Anselme K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopedic materials. *Biomaterials*. 2006; 27: 2829-44.
57. Ivanoff C. J, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12: 128-134.
58. Keller J.C, Schneider G.B, Stanford C.M, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant.Dent*. 2003; 12: 175-81.
59. Linez-Bataillon P, Monchau F, Bigerelle M, Hildebrand H.F. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. *Biomol Eng*. 2002;

- 19: 133-141.
60. Papalexiou V, Novaes A.B.Jr, Grisi M.F, Souza S.S, Taba M.Jr, Kajiwarra J.K. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. *Clin.Oral Implants Res.* 2004; 15: 44-53.
  61. Sader M.S, Balduino A, De Almeida S.G, Borojevic R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16: 667-675.
  62. Popat K.C, Leoni L, Grimes C.A, Desai T.A. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials.* 2007; 28: 3188-3197.
  63. He H, Yan W, Chen G, Lu Z. Acceleration of de novo bone formation with a novel bioabsorbable film: a histomorphometric study in vivo. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37: 378-82.
  64. Tamimi F, Torres J, Kathan C, Baca R, Clemente C, Blanco L, Lopez Cabarcos E. Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 87: 980-85.
  65. Ge Z, Tian X, Heng BC, Fan V, Yeo JF, Cao T. Histological evaluation of osteogenesis of 3D-printed poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) scaffolds in a rabbit model. *Biomed Mater.* 2009; 4: 1088/1748-6041.
  66. Caffesse RG, Dominguez LE, Najsleti CA, Castelli WA, Morrison EC, Smith BA. Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1990; 61: 45-50.
  67. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 106-16.
  68. Christophh. F, Karing H, Karing T. Guided bone regeneration at oral plant sites. *Periodontology.* 2000; 17: 151-75.
  69. Jakob F, Ebert R, & Rudert M, Nöth U, Walles H, Docheva D, Schieker M, Meinel L, Groll J. In situ guided tissue regeneration in musculoskeletal diseases and aging. *Cell Tissue Res.* 2012; 347: 725–35.
  70. Fa-Ming C, Richard M. Shelton, Yang J, Iain L, Chapple C. Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: Role, strategies, and perspectives. *Wiley Periodicals Inc Med.* 2009; 29: 472-513.



71. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontum by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1986; 13: 604-16.
72. Escobar, G, Vasseur O. Métodos histológicos aplicables al Estudio de Tejidos. Facultad de Medicina U. de A. Medellín. 1996; 1ª edición.
73. Childers JR, Ellwood SC. Partial chondrectomy and subchondral bone drilling chondromalacia. *Clin Orthop*. 1979; 144: 114-20.
74. Kreder H J, Moran M, Keeley F W. Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogenic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model. *Clin Orthop*. 1994; 300: 288-96.
75. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone*. 2005; 37: 688-98.
76. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 2010; 31:1465e85.
77. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413e31.
78. Gerhardt L-C, Boccaccini AR. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials* 2010;3:3867e910.
79. Jones JR, Hench LL. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2003;7:301e7.
80. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529e43.
81. Moroni L, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008;19:543e72.
82. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487e510.
83. Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatitebased biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res* 1998;13:94e117.

84. Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Mater* 1998;46:2519e27
85. Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc* 1998;81:1705e28.
86. Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T, Di Silvio L. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. *J Microsc (Oxf)* 2004;215:100e10.
87. Hott M, Noel B, BernacheAssolant D, Rey C, Marie PJ. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1997;37:508e16.
88. Rouahi M, Champion E, Hardouin P, Anselme K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials* 2006;27:2829e44.
89. Shu R, McMullen R, Baumann MJ, McCabe LR. Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2003;67A:1196e204.
90. Sun JS, Liu HC, Chang WHS, Li J, Lin FH, Tai HC. Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: an in vitro study. *J Biomed Mater Res* 1998;39:390e7.
91. Ogata K, Imazato S, Ehara A, Ebisu S, Kinomoto Y, Nakano T, et al. Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *J Biomed Mater Res A* 2005;72A:127e35.
92. Ehara A, Ogata K, Imazato S, Ebisu S, Nakano T, Umakoshi Y. Effects of alpha-TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. *Biomaterials* 2003;24:831e6.
93. Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawachi G, Gonda Y, et al. The effect of the microstructure of beta-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomaterials* 2007;28:2612e21.
94. Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, et al. Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF-kB ligand expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A* 2009;15:3991e4000.

95. Wang J, Jd Boer, Kd Groot. Proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells on biomimetically and electrolytically deposited calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res A* 2009;90A:664e70.
96. Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Umezue H, Arai K, Kudo N, et al. Osteoinduction with highly purified beta-tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials* 2006;27:4419e27.
97. Sun L, Wu L, Bao C, Fu C, Wang X, Yao J, et al. Gene expressions of collagen type I, ALP and BMP-4 in osteo-inductive BCP implants show similar pattern to that of natural healing bones. *Mater Sci Eng C* 2009;29:1829e34.
98. Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15:543e62.
99. Boccaccini AR, Blaker JJ. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 2005;2:303e17.
100. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001;55:151e7.
101. Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng* 2005;11:768e77.
102. Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:199-207.
103. Leu A, Leach J. Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharm Res* 2008;25:1222e9.
104. Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials* 2001;22:1683e7.
105. Gorriti MF, López JMP, Boccaccini AR, Audisio C, Gorustovich AA. In vitro study of the antibacterial activity of bioactive glass-ceramic scaffolds. *Adv Eng Mater* 2009;11:B67e70.
106. Hu S, Chang J, Liu M, Ning C. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:281e6.

107. Jones J, Ehrenfried L, Saravanapavan P, Hench L. Controlling ion release from bioactive glass foam scaffolds with antibacterial properties. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:989e96.
108. Leppäranta O, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Hupa M, et al. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:547e51.
109. Munukka E, Leppäranta O, Korkeamäki M, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, et al. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:27e32.
110. Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand* 1998;56:161e5.
111. Yli-Urpo H, Närhi T, Söderling E. Antimicrobial effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4) on oral micro-organisms in vitro. *Acta Odontol Scand* 2003;61:241e6.
112. Zhang D, Leppäranta O, Munukka E, Ylanen H, Viljanen MK, Eerola E, et al. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:475e83.
113. Saltman PD, Strause LG. The role of trace minerals in osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 1993;12:384e9.
114. Beattie JH, Avenell A. Trace element nutrition and bone metabolism. *Nutr Res Rev* 1992;5:167e88.
115. Nielsen F. New essential trace elements for the life sciences. *Biol Trace Elem Res* 1990;26e27:599e611.
116. Balas F, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M. In vitro bioactivity of siliconsubstituted hydroxyapatites. *J Biomed Mater Res A* 2003;66A:364e75.
117. Vallet-Regí M, Arcos D. Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants. *J Mater Chem* 2005;15: 1509e16.
118. Gentleman E, Fredholm YC, Jell G, Lotfibakhshaiesh N, O'Donnell MD, Hill RG, et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 2010;31:3949e56.

119. Cortizo AM, Molinuevo MS, Barrio DA, Bruzzone L. Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1171e80.
120. Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int* 2001;69:121e9.
121. Hinoi E, Takarada T, Yoneda Y. Glutamate signaling system in bone. *J Pharmacol Sci* 2004;94:215e20.
122. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 2005;26: 4847e55.
123. Marie PJ. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 2010;46:571e6.
124. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. Effects of extracellular calcium concentration on the glutamate release by bioactive glass (BG60S) preincubated osteoblasts. *Biomed Mater* 2009;4:045011.
125. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008; 58: 424-30.
126. Carlisle E. Silicon: a requirement in bone formation independent of vitamin D1. *Calcif Tissue Int* 1981;33:27e34.
127. Carlisle EM. Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* 1970;167:279e80.
128. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003;32: 127e35.
129. Sun ZL, Wataha JC, Hanks CT. Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation. *J Biomed Mater Res* 1997;34:29e37.
130. Mourino V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *J Royal Soc Interface* 2010;7:209e27.
131. Fielding G, Bose S. SiO<sub>2</sub> and ZnO dopants in threedimensionally printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis in vivo. *Acta Biomaterialia* 2013;9:9137–48.

132. Obata A, Tokuda S, Kasuga T. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly (lactic acid) composites. *Acta Biomaterialia* 2009;5:57–62.
133. Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, Pearce SG, et al. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials* 2007;28:1376–84.
134. Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2007;28:4023–32.
135. Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, et al. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2006;79:723–30.
136. Damen JJM, Ten Cate JM. Silica-induced precipitation of calcium phosphate in the presence of inhibitors of hydroxyapatite formation. *J Dent Res* 1992;71:453e7.
137. Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP, Powell JJ. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the framingham offspring cohort. *J Bone Miner Res* 2004;19:297e307.
138. Kim M-H, Bae Y-J, Choi M-K, Chung Y-S. Silicon supplementation improves the bone mineral density of calcium-deficient ovariectomized rats by reducing bone resorption. *Biol Trace Elem Res* 2009;128:239e47.
139. Nielsen FH, Poellot R. Dietary silicon affects bone turnover differently in ovariectomized and sham-operated growing rats. *J Trace Elem Exp Med* 2004;17:137e49.
140. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 1972;2:117e41.
141. Kaufmann E, Ducheyne P, Shapiro IM. Evaluation of osteoblast response to porous bioactive glass (45S5) substrates by RT-PCR analysis. *Tissue Eng* 2000;6:19e28.
142. Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials* 2005;26:3873e9.
143. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci* 2010;10:12e27.

144. Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res* 2006;21:183e92.
145. Leu A, Stieger SM, Dayton P, Ferrara KW, Leach JK. Angiogenic response to bioactive glass promotes bone healing in an irradiated calvarial defect. *Tissue Eng Part A* 2009;15:877e85.
146. Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2004;25:5857e66.
147. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757-74
148. Hench LL. Genetic design of bioactive glass. *J Eur Ceram Soc* 2009;29: 1257e65.
149. Lim J.Y, Dreiss A.D, Zhou Z, Hansen J.C, Siedlecki C.A, Hengstebeck R.W, et al. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials*. 2007; 28: 1787-97.
150. Zimmerman B, Arnold M, Ulmer J, Blümmel J, Besser A, Spatz J.P, Geiger B. Formation of focal adhesion-stress fiber complexes coordinated by adhesive and non-adhesive surface domains. *IEE Proc. Nanobiotechnol*. 2004; 151: 62-6.
151. Vigier S, Catania C, Baroukh B, Saffar JL, Giraud-Guille MM, Colombier ML. Dense Fibrillar Collagen Matrices Sustain Osteoblast Phenotype In Vitro and Promote Bone Formation in Rat Calvaria Defect. *Tissue Eng Part A*. 2011; 7-8: 889-98.
152. Chhabra V, Gill AS, Sikri P, Bhaskar N. Evaluation of the relative efficacy of copolymerized polylactic-polyglycolic acids alone and in conjunction with polyglactin 910 membrane in the treatment of human periodontal infrabony defects: a clinical and radiological study. *Indian J Dent Res*. 2011; 1: 83-9.
153. Wang Y, Shi X, Ren L, Yao Y, Zhang F, Wang DA. Poly(lactide-co-glycolide)/titania composite microsphere-sintered scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 93(1): 84-92.
154. Aboudzadeh N, Imani M, Shokrgozar MA, Khavandi A, Javadpour J, Shafieyan Y, Farokhi M. Fabrication and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide)

- /hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94: 137-45.
155. Fuchs RK, Faillace ME, Allen MR, Phipps RJ, Miller LM, Burr DB. Bisphosphonates do not alter the rate of secondary mineralization. *Bone*. 2011; 49: 701-5.
156. Kikuchi L., Park J. Y, Victor C, Davies J.E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. *Biomaterials*. 2005; 26: 5285-95.
157. Riveline D, Zamir E, Balaban N.Q, Schwarz U.S, Ishizaki T, Narumiya S. et al. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mdia1-dependent and rock-independent mechanism. *J Cell Biol*. 2001; 153: 1175–85.
158. López-Santos C, Yubero F, Cotrino J, Barranco A, González-Elipe A.R. Plasmas and atom beam activation of the surface of polymers. *J. Phys. D: Appl. Phys*. 2008; 225-309.
159. Borrás A, Cotrino J, Agustín R. González-Elipe A.R. Type of Plasmas and Microstructures of TiO<sub>2</sub> Thin Films Prepared by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition.. *Journal of the Electrochemical Society*. 2007; 154: 152-7.
160. Barranco A, Cotrino J, Yubero F, Espinós J.P, Benítez J, Clerc C, González-Elipe A.R. Síntesis of SiO<sub>2</sub> and SiO<sub>x</sub>CyHz thin films by microwave plasma CVD. *Thin Sol. Films*. 2001; 150-8.
161. Lafont J, Blanquaert F, Colombier ML, Caruelle JP, Saffar JL, Barritault D, Effets des RGTA sur la cicatrisation osseuse. *Innovation et Technologie en Biologie et Médecine*. 1997; 1: 21-5.
162. Park B.S, Heo S.J, Kim C.S, Oh J.E, Kim J.M, Lee G, et al. Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 74: 640-51.
163. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000; 21: 667-81.
164. Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, Atala A, Yoo JJ. In vitro evaluation of a poly (lactide-co-glycolid)/collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* 2006; 27: 3466-3472.
165. Heidemann W, Jeschkeit-Schubbert S, Ruffieux K, Fischer JH, Jung H, Krueger G, et al. pH-stabilization of predegraded PLLA by an admixture of water-soluble sodiumhydrogenphosphate – results of an in vitro- and in vivo study. *Biomaterials*. 2002; 23: 3567–74.



166. McNamee HP, Ingber DE, Schwartz MA. Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J Cell Biol.* 1993; 121: 673-8.
167. Lin CH, Dong Q-S, Wanga L, Zhang J-R, Wub L, Liu B-L. Dental implants with the periodontium: A new approach for the restoration of missing teeth. *Medical Hypotheses.* 2009; 72: 58–61.
168. Lafont J, Baroukh B, Berdal A, Colombier ML, Barritault D, Caruelle JP, Saffar JL. RGTA11, a new heating agent, triggers developmental events during healing of craniotomy defects in adult rats. *Growth Factors.* 1998; 16: 23-38
169. Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:683-92.
170. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977;16:1-132.
171. Chong SC, Loo J, Lee PS, Ma J. Biomimetic processing of bioactive interface on silicon substrates. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials.* 2008;85:368-77.
172. Ning CQ, Mehta J, El-Ghannam A. Effects of silica on the bioactivity of calcium phosphate composites in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16:355-60.
173. Vaahtio M, Peltola T, Hentunen T, Ylänen H, Areva S, Wolke J, et al. The properties of biomimetically processed calcium phosphate on bioactive ceramics and their response on bone cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17:1113-25.
174. Soumetz FC, Pastorino L, Ruggiero C. Human osteoblast-like cells response to nanofunctionalized surfaces for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials.* 2008;84:249-55.
175. Kato H, Nakamura T, Nishiguchi S, Matsusue Y, Kobayashi M, Miyazaki T, et al. Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone. *J Biomed Mater Res.* 2000;53:28-35.
176. Johansson CB, Albrektsson T. A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone. *Clin Oral*

- Implants Res. 1991;2:24-9.
177. Peterson LJ, McKinney Jr. RV, Pennel BM, Klawitter JJ, Weinstein AM. Clinical, radiographic, and histological evaluation of porous rooted cobalt-chromium alloy dental implants. *J Dent Res.* 1980;59:99-108.
  178. Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Review zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials.* 2009;88:519-29.
  179. Anderson SI, Downes S, Perry CC, Caballero AM. Evaluation of the osteoblast response to a silica gel in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 1998;9:731-5.
  180. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 1972;2:117e41.
  181. Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science.* 1984;226:630-6.
  182. Hench LL, Wilson J. Biocompatibility of silicates for medical use. *Ciba Found Symp.* 1986;121:231-46.
  183. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials.* 1999;20:2287-303.
  184. Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials.* 2008;85:573-82.
  185. Vallet-Regí M, Salinas AJ, Arcos D. From the bioactive glasses to the star gels. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17:1011-7.
  186. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003;67:932-49.
  187. Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials.* 2007;28:5058-67.
  188. Allen LT, Fox EJP, Blute I, Kelly ZD, Rochev Y, Keenan AK, et al. Interaction of soft condensed materials with living cells: Phenotype/transcriptome correlations for the hydrophobic effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6331-6.
  189. Gao T, Aro HT, Ylänen H, Vuorio E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in saos-2 osteoblasts in vitro.

- Biomaterials. 2001;22:1475-83.
190. Gupta G, Kirakodu S, El-Ghannam A. Dissolution kinetics of a si-rich nanocomposite and its effect on osteoblast gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2007;80:486-96.
  191. Jell G, Stevens MM. Gene activation by bioactive glasses. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17:997-1002.
  192. Areva S, Ääritalo V, Tuusa S, Jokinen M, Lindén M, Peltola T. Sol-gel-derived TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> implant coatings for direct tissue attachment. part II: Evaluation of cell response. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:1633-42
  193. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004;25:2941-8.
  194. Emsley J. *Nature's Building Blocks, An A-Z guide to elements*. Popular sciences, Oxford 2003; 4-65.
  195. Castillo-Dalí G, Castillo-Oyagüe R, Terriza A, Saffar JL, Batista A, Barranco A, et al. In vivo comparative model of oxygen plasma and nanocomposite particles on PLGA membranes for guided bone regeneration processes to be applied in pre-prosthetic surgery: A pilot study. *J Dent* 2014;42:1446-57.
  196. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells and Materials*. 2007;13:1-10.
  197. Richards RG, Stiffanic M, Owen GR, Riehle M, Ap Gwynn I, Curtis ASG. Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. *Cell Biol Int*. 2001;25:1237-49.
  198. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dental Materials*. 1996;12:186-93.
  199. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, et al. Cell culture methods for testing Biocompatibility. *Clin Mater*. 1994;15:173-180.
  200. Schimandle JH, Boden SD. Spine update: The use of animal models to study spinal fusion. *Spine*. 1994;19:1998-2006.

201. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998;18:118-23.
202. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1988;255(4).
203. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng.* 1998;8:1-9.
204. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanés F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.* 2006;35:34-41.
205. Vico L, Chappard D, Alexandre C, Palle S, Minaire P, Riffat G, et al. Effects of a 120 day period of bed-rest on bone mass and bone cell activities in man: Attempts at countermeasure. *Bone Miner.* 1987;2:383-94.
206. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, Cheng Z, Chan CK, Ramakrishna S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone.* 2009; 45: 4-16.
207. Becker W, Becker B, Prichard J. A surgical and suturing method: three case report", *Journal of Periodontics.* 1987; 12: 816-819.
208. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnology Journal.* 2011;6:1187-97
209. Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: Biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:567-76.
210. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: Current experimental and clinical evidence. *BMC Med* 2012;10.
211. Gribova V, Auzely-Velty R, Picart C. Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: From cell adhesion to tissue engineering. *Chem Mater* 2012;24:854-869.
212. Tirri T, Rich J, Wolke J, Seppälä J, Yli-Urpo A, Närhi TO. Bioactive glass induced in vitro apatite formation on composite GBR membranes. *J Mater Sci Mater Med.*

- 2008;19:2919-23.
213. Hardwick R, Scantlebury TV, Sánchez R. Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge. *Guided Bone Regeneration in implant dentistry*. Quintessence. 1994; 4: 01-136.
214. Pamula E, Filová E, Bačáková L, Lisá V, Adamczyk D. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2009;89:432-43.
215. Yoon SJ, Kim SH, Ha HJ, Ko YK, So JW, Kim MS, et al. Reduction of inflammatory reaction of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) using demineralized bone particles. *Tissue Engineering - Part A*. 2008;14:539-47.
216. Rhee S-, Seung JL. Effect of acidic degradation products of poly(lactic-co-glycolic)acid on the apatite-forming ability of poly(lactic-co-glycolic)acid-siloxane nanohybrid material. *J Biomed Mater Res Part A* 2007;83:799-805.
217. Liu H, Slamovich EB, Webster TJ. Less harmful acidic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition. *International Journal of Nanomedicine*. 2006;1:541-5.
218. Ji W, Yang F, Seyednejad H, Chen Z, Hennink WE, Anderson JM, et al. Biocompatibility and degradation characteristics of PLGA-based electrospun nanofibrous scaffolds with nanoapatite incorporation. *Biomaterials*. 2012;33:6604-14.
219. Aimetti M, Pigella E, Romano F. Clinical and radiographic evaluation of the effects of guided tissue regeneration using resorbable membranes after extraction of impacted mandibular third molars. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 2007;27:51-9.
220. Karfeld-Sulzer LS, Ghayor C, Siegenthaler B, Gjoksi B, Pohjonen TH, Weber FE. Comparative study of NMP-preloaded and dip-loaded membranes for guided bone regeneration of rabbit cranial defects. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014.
221. Amano Y, Ota M, Sekiguchi K, Shibukawa Y, Yamada S. Evaluation of a poly-L-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration on bone

- defects in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:155-63.
222. Virlan MJR, Miricescu D, Totan A, Greabu M, Tanase C, Sabliov CM, et al. Current uses of poly(lactic-co-glycolic acid) in the dental field: A comprehensive review. *Journal of Chemistry.* 2015;2015.
223. Davies JE, Matta R, Mendes VC, Perri De Carvalho PS. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *Organogenesis.* 2010;6:161-6.
224. Kawakatsu N, Oda S, Kinoshita A, Kikuchi S, Tsuchioka H, Akizuki T, et al. Effect of rhBMP-2 with PLGA/gelatin sponge type (PGS) carrier on alveolar ridge augmentation in dogs. *J Oral Rehabil.* 2008;35:647-55.
225. Liu Y-, Ou M-, Liu H, Gu M, Lv L-, Fan C, et al. The effect of simvastatin on chemotactic capability of SDF-1 $\alpha$  and the promotion of bone regeneration. *Biomaterials.* 2014;35:4489-98.
226. Yoshida T, Miyaji H, Otani K, Inoue K, Nakane K, Nishimura H, et al. Bone augmentation using a highly porous PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2. *J Periodont Res.* 2015;50:265-73.
227. Kashi TSJ, Eskandarion S, Esfandyari-Manesh M, Marashi SMA, Samadi N, Fatemi SM, et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *International Journal of Nanomedicine.* 2012;7:221-34.
228. Wang Y, Yang X, Liu W, Zhang F, Cai Q, Deng X. Controlled release behaviour of protein-loaded microparticles prepared via coaxial or emulsion electrospray. *J Microencapsul.* 2013;30:490-7.
229. Xu Q, Hashimoto M, Dang TT, Hoare T, Kohane DS, Whitesides GM, et al. Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery. *Small.* 2009;5:1575-81.
230. Sousa FFO, Luzardo-Álvarez A, Pérez-Estévez A, Seoane-Prado R, Blanco-Méndez J. Development of a novel AMX-loaded PLGA/zein microsphere for root canal disinfection. *Biomedical Materials.* 2010;5(5).

231. Liu D, Chen W-, Lee C-, Wu S-, Wang Y-, Chung T-. Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets. *J Microencapsul.* 2004;21:643-52.
232. Yue IC, Poff J, Cortés ME, Sinisterra RD, Faris CB, Hildgen P, et al. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials.* 2004;25:3743-50.
233. Son JS, Choi Y-, Park E-, Kwon T-, Kim K-, Lee K-. Drug delivery from hydroxyapatite-coated titanium surfaces using biodegradable particle carriers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials.* 2013;101 B:247-57.
234. Park JK, Yeom J, Oh EJ, Reddy M, Kim JY, Cho D-, et al. Guided bone regeneration by poly(lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid bi-layer films for periodontal barrier applications. *Acta Biomaterialia.* 2009;5:3394-403.
235. Kimura A, Watanabe T, Shimizu T, Okafuji N, Mori R, Furusawa K, et al. Bone repair of rabbit mandibular transection using rhBMP-2 and atelocollagen gel. *Eur J Med Res.* 2006;11:355-8.
236. Liao S, Wang W, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T, Tamura K, Cui F, Watari F. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/ PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 2005;26:7564–71.
237. Diener A, Nebe B, Lüthen F, Becker P, Beck U, Neumann H.G, Rychly J. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials.* 2005; 26: 383-392.
238. Park SH, Park DS, Shin JW, Kang YG, Kim HK, Yoon TR, Shin JW. Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA. *J Mater Sci Mater Med.* 2012; 23: 2671-8.
239. Schwarz U.S, Bischofs I.B. Physical determinants of cell organization in soft media. *Med. Eng. Phys.* 2005; 27: 763–772.
240. Flemming R, Murphy C, Abrams, G, Goodman S, Nealy P. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Biomaterials* 1999; 20: 573–88.
241. Flemming R, Murphy C, Abrams, G, Goodman S, Nealy P. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Biomaterials* 1999; 20: 573–88.
242. Wilkinson CDW, Curtis ASG, Crossan J. Nanofabrication in cellular engineering. *J*

- Vac Sci Technol B 1998; 16: 3132–6.
243. Pilliar RM. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface structured designs. *Implant Dent* 1998; 7: 305–312
244. Ellingsen JE, Thomsen P, Lyngstadaas SP. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontol* 2000. 2006;41:136-56.
245. De Nardo L, Raffaini G, Ebramzadeh E, Ganazzoli F. Titanium oxide modeling and design for innovative biomedical surfaces: A concise review. *Int J Artif Organs*. 2012;35:629-41.
246. Costa D, Garrain P-, Baaden M. Understanding small biomolecule-biomaterial interactions: A review of fundamental theoretical and experimental approaches for biomolecule interactions with inorganic surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2013;101 A:1210-22.
247. Pei M, Li J, McConda DB, Wen S, Clovis NB, Danley SS. A comparison of tissue engineering based repair of calvarial defects using adipose stem cells from normal and osteoporotic rats. *Bone*. 2015;78:1-10.
248. Biggs MJP, Dalby MJ. Focal adhesions in osteoneogenesis. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 2010;224(12):1441-53.
249. Biggs MJP, Richards RG, Dalby MJ. Nanotopographical modification: A regulator of cellular function through focal adhesions. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2010;6(5):619-33.
250. Silva NA, Moreira J, Ribeiro-Samy S, Gomes ED, Tam RY, Shoichet MS, et al. Modulation of bone marrow mesenchymal stem cell secretome by ECM-like hydrogels. *Biochimie* 2013;95:2314–9.
251. Shen H, Hu X, Yang F, Bei J, Wang S. Combining oxygen plasma treatment with anchorage of cationized gelatin for enhancing cell affinity of poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 2007;28:4219–30.
252. Gough JE, Notingher I, Hench LL. Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. *J Biomed Mater Res A* 2004;68A:640e50.
253. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474e91.



254. Schneider A, Francius G, Obeid R, Schwinté P, Hemmerlé J, Frisch B, et al. Polyelectrolyte multilayers with a tunable young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir* 2005;22:1193e200.
255. Mitrossilis D, Fouchard J, Guiroy A, Desprat N, Rodriguez N, Fabry B, et al. Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18243e8.
256. Shen H, Hu X, Bei J, Wang S. The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 2008;29:2388–2399.
257. Saxena S, Ray AR, Kapil A, Pavon-Djavid G, Letourneur D, Gupta B, Meddahi-Pelle A. Development of a new polypropylene-based suture: Plasma grafting, surface treatment, characterization, and biocompatibility studies. *Macromol Biosci* 2011;11:373–382.
258. Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, McMurray RJ, Affrossman S, Wilkinson CDW, et al. Interactions with nanoscale topography: Adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2009;91:195-208.
259. Orita T, Tomita M, Kato K. Regulation of cellular responses to macroporous inorganic films prepared by the inverse-opal method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;84:187-97.
260. Chen G, Xia Y, Lu X, Zhou X, Zhang F, Gu N. 2013. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. *J Biomed Mater Res Part A* 2013;101A:44–53.
261. Khang G, Jeon JH, Lee JW, Cho SC, Lee HB. Cell and platelet adhesions on plasma glow discharge-treated poly(lactide-co-glycolide). *Biomedical Materials Engineering* 1997;7:357–68.
262. Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog Polym Sci* 2007;32: 698–725.
263. Kim HW, Kim HE, Knowles JC. Hard-tissue-engineered zirconia porous scaffolds with hydroxyapatite sol-gel and slurry coatings. *J Biomed Mater Res, Part B* 2004;70B:270–7.

264. Duan B, Wang M. Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor. *J R Soc Interface* 2010;7:S615–29.
265. Comas H, Laporte V, Borcard F, Miéville P, Krauss Juillerat F, Caporini MA, et al. Surface functionalization of alumina ceramic foams with organic ligands. *ACS Appl Mater Interfaces* 2012;4:573–6.
266. Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2013;9:4457–86.
267. Basaldella E, Legnoverde M. Functionalized silica matrices for controlled delivery of cephalexin. *J Sol–Gel Sci Technol* 2010;56:191–6.
268. Manzano M, Aina V, Areán CO, Balas F, Cauda V, Colilla M, et al. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization. *Chem Eng J* 2008;137:30–7.
269. Radin S, El-Bassyouni G, Vresilovic EJ, Schepers E, Ducheyne P. In vivo tissue response to resorbable silica xerogels as controlled-release materials. *Biomaterials* 2005;26:1043–52.
270. Lin C-H, Cheng S-H, Liao W-N, Wei P-R, Sung P-J, Weng C-F, et al. Mesoporous silica nanoparticles for the improved anticancer efficacy of cis-platin. *Int J Pharm* 2012;429:138–47.
271. Hocine O, Gary-Bobo M, Brevet D, Maynadier M, Fontanel S, Raehm L, et al. Silicalites and mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Int J Pharm* 2010;402:221–30.
272. Treccani L, Yvonne Klein T, Meder F, Pardun K, Rezwan K. Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomaterialia*. 2013;9:7115-50.
273. Meng H, Liong M, Xia T, Li Z, Ji Z, Zink JI, et al. Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver doxorubicin and P-glycoprotein siRNA to overcome drug resistance in a cancer cell line. *ACS Nano* 2010;4:4539–50.
274. Wang X, Schröder HC, Wiens M, Ushijima H, Müller WEG. Bio-silica and bio-polyphosphate: Applications in biomedicine (bone formation). *Curr Opin Biotechnol*. 2012;23:570-8.

275. Puddu V, Perry CC. Peptide adsorption on silica nanoparticles: Evidence of hydrophobic interactions. *ACS Nano*. 2012;6:6356-63.
276. Tang Y, Zhao Y, Wang X, Lin T. 2014. Layer-by-layer assembly of silica nanoparticles on 3D fibrous scaffolds: Enhancement of osteoblast cell adhesion, proliferation, and differentiation. *J Biomed Mater Res Part A* 2014;102A:3803–3812.
277. Terriza A, Vilches-Pérez JI, De La Orden E, Yubero F, Gonzalez-Caballero JL, González-Elipe AR, et al. Osteoconductive potential of barrier NanoSiO<sub>2</sub> PLGA membranes functionalized by plasma enhanced chemical vapour deposition. *BioMed Research International*. 2014;2014.
278. Ho C, Ding S. Novel SiO<sub>2</sub>/PDA hybrid coatings to promote osteoblast-like cell expression on titanium implants. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3:2698-707.
279. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Carvalho C, Lang M, Follo M, Braun G, et al. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on rapid prototyping-produced 3D-scaffolds manufactured as bone replacement materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2008;87:933-43.
280. Gao C, Wei P, Feng P, Xiao T, Shuai C, Peng S. Nano SiO<sub>2</sub> and MgO improve the properties of porous  $\beta$ -TCP scaffolds via advanced manufacturing technology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16:6818-30.
281. Meretoja VV, Tirri T, Malin M, Seppälä JV, Närhi TO. Enhanced osteogenicity of bioactive composites with biomimetic treatment. *BioMed Research International*. 2014;2014.
282. Huang S, Wu B, Ding S. Stem cell differentiation-induced calcium silicate cement with bacteriostatic activity. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3:570-80.