

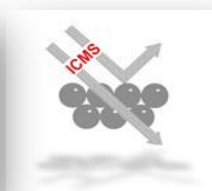
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

NANOCOMPOSITES DE OXIDO DE TITANIO EN
MEMBRANAS SCAFFOLD DE PLGA EN REGENERACION
OSEA GUIADA



GABRIEL CASTILLO DALÍ
Sevilla, 2013



Departamento de Estomatología
Facultad de Odontología



Medalla y Encomienda
Orden Civil de Sanidad

D. DANIEL TORRES LAGARES, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla y D. JOSÉ LUIS GUTIÉRREZ PÉREZ, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla, en calidad de directores del Proyecto de Tesis de la Licenciada en Odontología D. GABRIEL CASTILLO DALI.

CERTIFICAN: que el presente trabajo de investigación “NANOCOMPOSITES DE OXIDO DE TITANIO EN MEMBRANAS SCAFFOLD DE PLGA EN REGENERACION OSEA GUIADA” ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

Sevilla, a 29 de abril de 2013

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada íntegramente a mis padres, y en especial a mi madre, porque es excepcional. Por a la labor incansable, paciencia y cariño que han mostrado conmigo, y porque sin los cuales no habría podido llegar hasta donde he llegado.

A ellos, les doy todo mi reconocimiento y gratitud.

Os quiero,

PRÓLOGO

Alguien me dijo una vez que somos la suma de momentos y sensaciones que nos han curtido día a día, la suma de victorias que hemos ganado y errores que hemos cometido, y la suma de personas que nos han influenciado a lo largo de nuestra vida. Y sin duda, un recorrido duro me ha ayudado a saborear y a valorar mejor el objetivo cumplido al final del trayecto, pero también a conocer mejor, intuir y prevenir las futuras piedras del camino, aún por recorrer.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer al Dr. Daniel Torres Lagares por la oportunidad que me ha brindado en estos tiempos tan difíciles para la investigación y por todo lo que he podido aprender con él.

También quisiera compartir este momento tan especial de mi carrera profesional con todas las personas que han caminado conmigo en vivencias entrañables para el recuerdo, a todos los que me han ayudado directa o indirectamente a conseguir mis sueños. A los que me hacen feliz cada día, y a los que forman o han formado parte de mi vida.

Llegados a este punto, es importante para mí nombrar a aquellos más influyentes;

A mis compañeros y colaboradores de la Facultad de Medicina de Cádiz: En especial a África, M^a Carmen, José M^a, López Cepero, Emilio de la Orden y Curro García Cózar.

A mis compañeros colaboradores de la Faculté de Chirurgie Dentaire de París: En especial a Jean Louis Saffar, Catherine Chaussain, Brigitte Baroukh, Annie Llorens, Mari Laure Colombier, y Elisabeth.

A mis compañeros colaboradores del Centro de Cirugía de Mínima Invasión (CCMI) de Cáceres: En especial a Carmen Calle y Javier Cabezas.

A mis antiguos compañeros y amigos del L.I.B. (H.U.V.R.) de Sevilla: En especial a Elena, Ana G, y María.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Odontología de Sevilla: En especial a José Luis Gutiérrez, Vicente Ríos, Betina Pérez, Maribel González, Carlos Bonilla, Carlos Sáenz y Antonio Batista.

A mis compañeros y amigos del CITIUS: En especial a Modesto Carballo, Asunción Fernández, Juan Luis Ribas, Chelo García, Paco Varela y Cristina.

A todos mis profesores: En especial a Mariano, Covadonga, Mario, Sonia y Ángel.

A todos mis compañeros de Biología /2000-2007/: En especial a Lucky, Ana, Sergio, Rita, Jonay, Vanesa, Sara, Davinia, Celeste, Daniela, Tito, Dani y todos los demás...

A mis compañeros del colegio San Juan Bosco: Sandra, Luisa T., Piña, Gregorio y Ángel Manuel.

A mis antiguos compañeros del Equipo de Natación Club Náutico Sevilla: En especial a Juan Galiano, Eugenia y Javier S.

A mis amigos de París y Montpellier: En especial a Monir, Kiki, Alejandro, María, Bea, Laura, Antonio, Belén, Alonso, Nuria J., Lucía, J. Antonio, Nuria S., Edu, Rafa, Ali, Luca, Agatha, Montse, Hanna, Adán, Luis, Santi, Ana, Silvano y Fer.

Y a mis mejores amigos de Sevilla y Tenerife y compañeros de vida: En especial a Jose María, Fer, Paco, Lu, Julia, Manoli, Oliver, Elsa, Diego, Naza, Ernesto, Nacho, J. Miguel, Sergio, Maeva, Juani, Charli, Jeho, Luis... y a aquellos que se quedaron escondidos en algún rincón de mi memoria.

A ellos, y a toda mi familia, gracias por estar ahí y por formar parte de mi vida, que al fin y al cabo la habéis curtido vosotros.

Un fuerte abrazo a todos.

Gabriel.

ABREVIATURAS

%: Porcentaje
3D: Tres dimensiones
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AK: Anticuerpo
ALP: Fosfatasa alcalina
ATP: Adenosín trifosfato
BT: Azul de toluidina
Cel: Célula
CO₂: Dióxido de carbono
D: Día
H: Hidrogeno
HA: Hidroxiapatita
MEC: Matriz extracelular
MG: May Growmball-Giemsa
Mm: Milímetro
OB: Osteoblasto
OC: Osteoclasto
OSS: Óseo
PET: Tereflalato de Polietileno
PLGA: Ácido poliláctico-co-poliglicólico
P-O₂: Plasma de oxígeno
ROG: Regeneración ósea guiada
RTG: Regeneración tisular guiada
SEM: Microscopía electrónica de barrido
Sem: Semana
SiO₂: Óxido de silicio
T°: Temperatura
TiO₂: Óxido de Titanio
TRAP: Fosfatasa ácida tartrato de sodio resistente
VK: Von Kossa

INDICE

1.- RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1.- ANTECEDENTES	11
2.2.- CICATRIZACIÓN ÓSEA	13
2.3.- REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA (ROG)	26
2.4.- NANOMEDICINA	33
2.5.- AVANCES EN NANOMATERIALES APLICADOS A ROG	40
3. HIPÓTESIS	65
4. OBJETIVOS	66
5. MATERIAL Y METODO	68
5.1 MATERIAL	68
5.1.1- MEMBRANAS DE ESTUDIO	68
5.1.2- FABRICACION DE LAS MEMBRANAS DE ESTUDIO	68
5.1.3- EJEMPLARES DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	71
5.2. METODO	71
5.2.1.- DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	71
5.2.2.- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	72
5.2.3.- SACRIFICIO	74
5.2.4.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	76
5.2.5.- ESTUDIO MORFOMÉTRICO	82
5.2.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
6. RESULTADOS	92
7. DISCUSIÓN	98
8. CONCLUSIONES	110
9. ANEXOS	111
9.1.- AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE EXPER. ANIMAL	111
9.2.- DOCTORADO EUROPEO	112
10. REFERENCIAS	117

1. RESUMEN

Este proyecto de Tesis tiene como propósito la evaluación de un nuevo tipo de membrana de ácido poliláctico-co-políglucólico (PLGA) modificada a escala nanométrica con un pretratamiento físico de plasma de oxígeno (P-O₂) (para favorecer su degradación en el tejido en formación) y la adición de óxido de titanio (TiO₂), en relación a su capacidad para promover la osteoinducción. Se conoce que las membranas fabricadas a partir de PLGA son biocompatibles, reabsorbibles, y que ejercen un efecto barrera que evita la colonización del espacio por el tejido conjuntivo adyacente y su interferencia con el tejido óseo en formación durante el proceso de reparación.

En la introducción de este trabajo, se realiza una revisión descriptiva exhaustiva de los diferentes materiales utilizados en ingeniería tisular, sus composiciones químicas moleculares, técnicas de fabricación, perspectivas y aplicaciones actuales en biomedicina, profundizando en la regeneración tisular ósea en los últimos 25 años.

Una vez documentados y justificados tanto el tema del proyecto como los materiales, técnicas y animales de experimentación elegidos para el ensayo, comenzamos el estudio central de la tesis testando in vivo las membranas modificadas elegidas (TiO₂/PLGA + P-O₂) en comparación frente a los controles de PLGA sencillo, en defectos óseos no autoregenerables de 11 mm de diámetro (dos por animal), generados quirúrgicamente en la calota de cuatro conejos raza New-Zeland, cuyo sacrificio se llevó a cabo tras un mes de reposo postoperatorio.

Para poder comparar el efecto potencial 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 la densidad ósea generada (osteoides,

médula, adipocitos y presencia o no de inflamación anormal) mediante azul de toluidina, un estudio cuantitativo del nivel de resorción ósea (osteoclastos por milímetro) mediante tinción con TRAP, una comparación cualitativa de la presencia normal de aposición osteoblástica mediante la ALP, y un análisis cuantitativo de los milímetros de hueso neoformado por día mediante marcaje con calceína, respecto a los controles, tras un mes de regeneración.

Se obtuvieron valores significativos de un rendimiento mucho mayor de las membranas de estudio frente a las membranas controles, con significación estadística en todas las variables de estudio cuantitativas. Por tanto, concluimos una valoración positiva de la influencia de estas membranas en regeneración ósea en animales mamíferos.

El objetivo final de este proyecto es crear una membrana artificial reabsorbible y modificada a escala nanométrica, testado in vivo, para evaluar su viabilidad y posible utilización en procesos clínicos de regeneración ósea guiada (ROG) en humanos, en un futuro próximo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1.- ANTECEDENTES

El hueso de la cavidad oral es un tejido sensible a procesos infecciosos, traumas, atrofas, deformidades congénitas y tumores óseos como osteoblastomas, osteoclastomas y osteosarcomas, debido, entre otros motivos, a estar situado en una zona de entrada de numerosos microorganismos patógenos. Estos patógenos, además de los accidentes y la edad avanzada, son capaces de ocasionar la pérdida parcial o total del mismo, así como de los dientes que alojan ocasionando una mala estética bucal, capacidad de masticación insuficiente, falta de claridad en el habla e incluso problemas psicológicos, pudiendo reducir drásticamente la calidad de vida del individuo afectado. Para estos casos la medicina regenerativa, en combinación con la ingeniería de nuevos materiales, representa un nuevo campo con buenos resultados y rápido desarrollo que propone un cambio de paradigmas con respecto al principal objetivo del tratamiento médico (1-9). En la Figura 1 se muestra una imagen radiológica de una mandíbula sana.

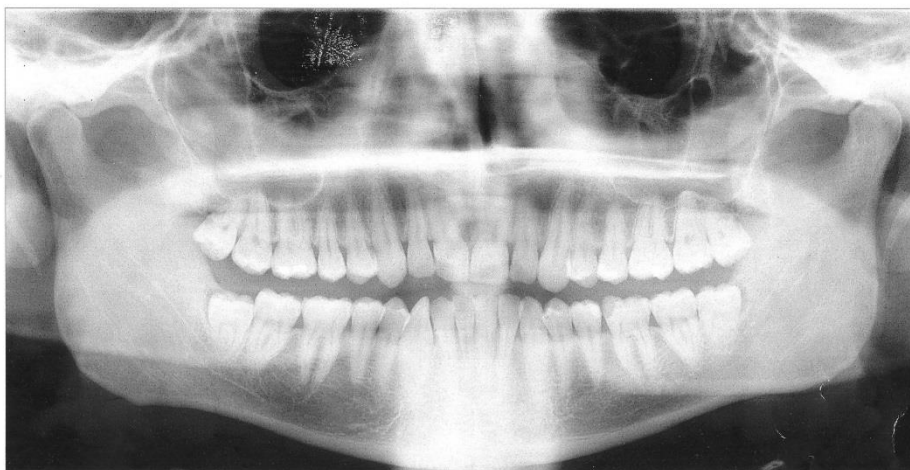


Fig. 1: *Ortopantomografía de una mandíbula sana.*

La técnica de regeneración ósea guiada (ROG) es una técnica realizada a diario en la clínica dental, siendo elevada y en constante aumento la demanda de nuevos productos a casas comerciales para optimizar el resultado. Es la razón por la que la ingeniería de tejidos ha revolucionado las investigaciones ortopédicas creando nuevos materiales biocompatibles mejorados a escala nanométrica, que en combinación con la ROG persiguen mimetizar las propiedades estructurales del tejido original y aportar un soporte estable al nuevo tejido regenerado, bien sea para su utilización en la colocación de implantes dentales o en prótesis bucales fijas o removibles (3-5).

Aproximadamente del dos al diez por ciento de la población sufre pérdidas dentales y este ratio aumenta con la edad. El uso de los biomateriales está actualmente en progresivo aumento, como lo demuestra el hecho de que más de cincuenta millones de personas viven con algún tipo de prótesis. El aumento de la esperanza de vida, además de otros factores sociológicos, entre los que se encuentran la cada vez mayor demanda de seguridad y fiabilidad médica, y el propio desarrollo de ésta y de las técnicas quirúrgicas, han hecho que el requerimiento de los biomateriales se haya incrementado y esto haya potenciado de forma espectacular su desarrollo. Tomando como referencia únicamente a Estados Unidos, el número de procedimientos de injertos óseos anuales sobrepasa anualmente el medio millón de casos, reportando unos gastos de más de dos mil quinientos millones de dólares a los que hay que sumar además la morbilidad y limitaciones de la zona donante.

Utilizando diferentes biomateriales (derivados y sustitutos óseos) y bloques de injerto autógeno se pueden regenerar los tejidos periodontales perdidos o al menos reconstruir la estructura normal y la funcionalidad. Es por todo ello que nos planteamos la fabricación de un nuevo biomaterial reabsorbible que ayude significativamente a la regeneración de las zonas deficitarias óseas y favorezca la reestructuración anatómica y funcional de las mismas (1-22).

2.2.- CICATRIZACION OSEA.

Anatomía, fisiología e histología.

El tejido óseo representa la parte principal del esqueleto, sistema responsable del soporte interno de la estructura corporal, engranaje de las articulaciones, y formación de la serie mieloide y linfoide sanguíneas, haciendo posible el correcto desarrollo de muchas funciones anatómicas y fisiológicas como la protección y sostén, la locomoción, la homeostasis del calcio y la masticación. El hueso también está formado por médula ósea roja, que es un tejido vascularizado e innervado que se encuentra mayoritariamente en el interior de los huesos largos, donde se forman tanto la línea mieloide como gran parte del proceso de la linfoide. Por lo tanto, el hueso es también uno de los principales tejidos con función hematopoyética en el individuo adulto.

El hueso contiene el 99% del calcio del organismo, con lo cual se convierte en el principal reservorio de este catión tan importante para la fisiología muscular, buffer sérico amortiguador en la regulación homeostática sanguínea, y otros muchos procesos.

Hay dos tipos de osificación; membranosa (durante el período fetal), y endocondral (posterior a la lactancia) que tiene lugar sobre un molde cartilaginoso preformado. La formación del hueso está regulada de forma autocrina local a nivel celular, de manera paracrina, y a través de hormonas circulantes en sangre (10).

Histológicamente el hueso es un tejido conjuntivo denso especializado que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. El hueso se organiza macroscópicamente en hueso trabecular o esponjoso, situado en el interior, y con numerosos tabiques y huecos intercomunicantes donde se aloja la médula ósea sin osteonas, y el hueso cortical o denso, relegado a la zona marginal, y mucho más compacto donde se aprecian las osteonas. Los cortes histológicos habituales de tejido óseo tienen estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers que se extienden longitudinalmente.

Los canales de Havers están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos

sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños orificios o lagunas donde se encuentran los osteocitos comunicados con los osteoblastos locales periféricos y la matriz ósea circundante. Estas células intercambian nutrientes con el líquido intersticial a través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. Estos canales junto con las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos reciben el nombre de osteona o sistema de Havers. Las restantes láminas entre osteona se llaman láminas intersticiales.

El hueso está compuesto en un 2% del volumen total por células (osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de recubrimiento, células progenitoras, y adipocitos principalmente). Existe en su composición también una fracción no calcificada u osteoide formado de matriz extracelular MEC especializada de naturaleza orgánica, que presenta algo más de un 90% de fibras de colágeno tipo I (sintetizado por osteoblastos, odontoblastos y fibroblastos) que une las varillas de hidroxiapatita para aportar cierta elasticidad y estabilidad frente a golpes y al movimiento, y alrededor de un 10% de sustancia fundamental formada por proteoglicanos como el condroitínsulfato o el hialuronato, proteínas extracelulares (adhesivas a la matriz), proteínas osteoespecíficas (en la formación ósea, la captación del calcio desde la circulación, y la remodelación), así como una proteína, BGP, que mantiene la hidratación interna del tejido con agua. Además presenta un 65% en peso seco de una matriz mineral en su mayoría cristalina de fracción calcificada de fosfato cálcico y otros iones en forma de varillas de hidroxiapatita (HA) $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ de 3nm de espesor y hasta 60nm de largo en paralelo. Los iones de la superficie de los cristales de HA también están hidratados formando la capa de hidratación, lo que facilita el intercambio de iones entre el cristal y el líquido intersticial.

La fracción inorgánica representa aproximadamente el 50% del peso de la matriz ósea. Los iones más abundantes son el fosfato y el calcio, pero además, el hueso contiene otros iones minoritarios como el magnesio, bicarbonato, sodio, potasio y citrato. Todo ello en conjunto le aporta al tejido gran dureza y resistencia con el mínimo peso posible. Curiosamente el hueso posee una resistencia tensil comparable al hierro

forjado, pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible (10,14). En las figuras 2 y 3 se ilustra un tejido óseo normal;

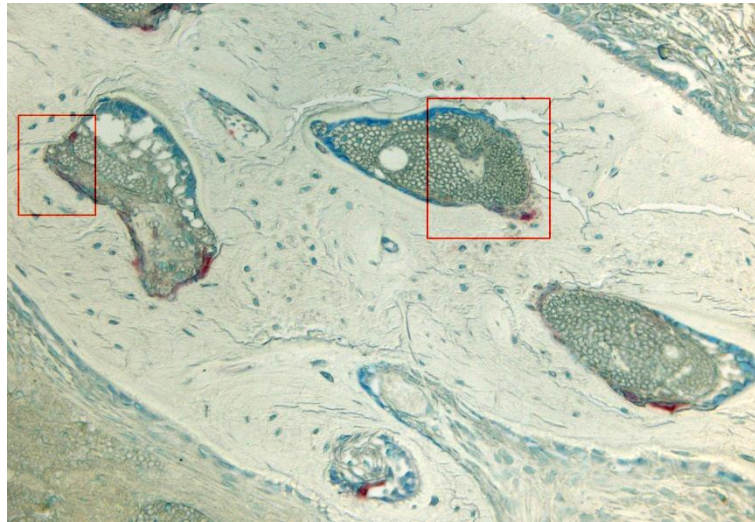


Fig. 2: Tejido óseo normal tras coloración TRAP y BT, objetivo 10x.

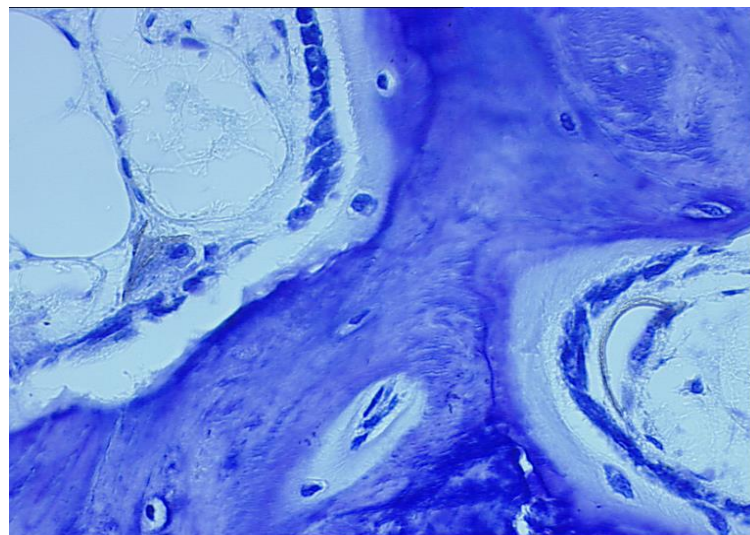


Fig. 3: Tejido óseo normal tras coloración ALP y BT, a objetivo 40x.

Citología.

La fracción celular del tejido óseo está compuesta por:

1. Células osteoprogenitoras (MSC); Aparecen desde el feto, cerca de los centros de osificación principalmente, y derivan de las células madre mesenquimáticas pluripotentes (CFU-F). Se ha demostrado que tienen la capacidad de inducir la formación de hueso por transferencia a tejido conectivo. Durante la formación del hueso, estas células se dividen y desarrollan a células formadoras de hueso (osteoblastos) durante la vida fetal y la etapa de crecimiento, después del desarrollo son sin embargo las que intervienen en el proceso de curación de fracturas.

En las figuras 4 y 5 se muestran imágenes de la médula ósea y sus células progenitoras;

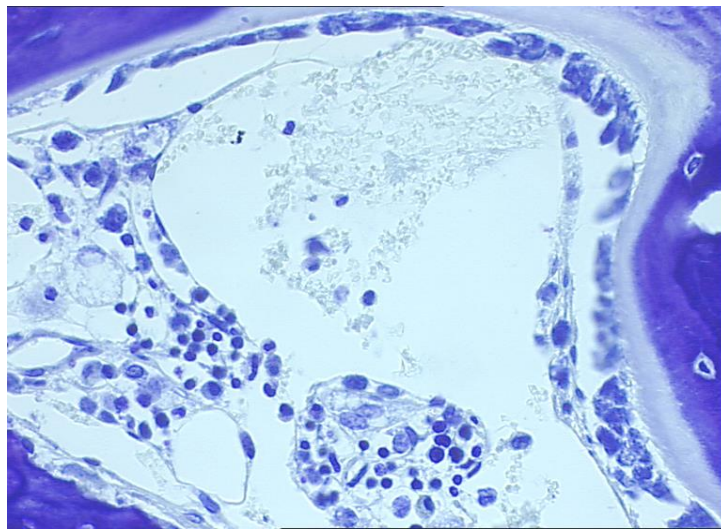


Fig. 4: Médula ósea de tejido óseo normal tras coloración BT, a objetivo 20x.

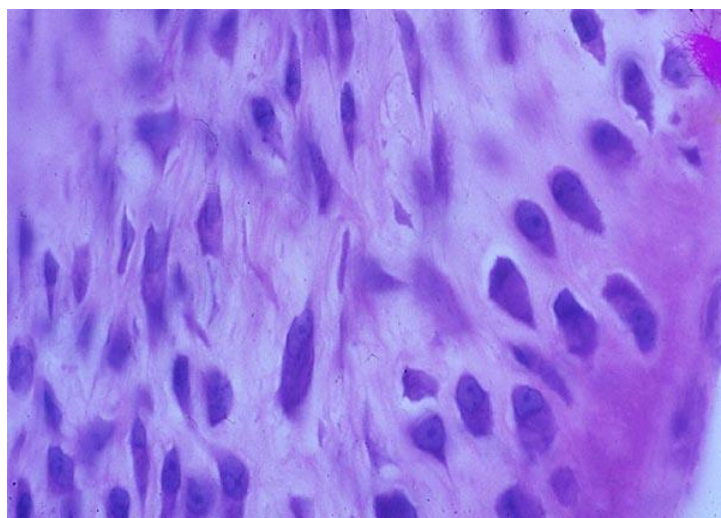


Fig. 5: Células osteoprogenitoras tras coloración BT y TRAP, a objetivo 40x.

2. Osteoblastos; Células osteosintéticas de 20-30 μm de diámetro, con una vida media de entre una a diez semanas, que sintetizan y secretan la matriz ósea orgánica al osteoide a ritmo de 2-3 $\mu\text{m}/\text{día}$ hasta formar hueso maduro. Producen multitud de proteínas y dirigen las fibras de la matriz extracelular para su mineralización. En zonas de formación de hueso es frecuente encontrar una capa de osteoblastos activos semejante a un epitelio de células cúbicas sobre una base de tejido óseo recién formado. El núcleo se encuentra en posición opuesta a la capa de hueso sintetizado, su citoplasma es muy basófilo (H^+) con una gran cantidad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) que es un marcador citológico específico de esta serie celular. Durante la formación de hueso, el 10% de los osteoblastos se sitúan en el tejido óseo en formación y se transforman en osteocitos ramificados en conexión con el resto. En dicho momento son osteocitos de superficie que han finalizado la formación de hueso, y están en comunicación con los otros osteocitos mediante sus prolongaciones celulares en canalículos, que sirven también para mantener la nutrición celular desde el entorno exterior. Estas células de recubrimiento tapizan las superficies óseas internas a modo de una capa de epitelio plano simple y descansan sobre una capa delgada de osteoide, la cual juega un papel fundamental en la resorción ósea puesto que el osteoclasto no puede eliminar hueso si esta capa que recubre está presente (figuras 6 y 7).

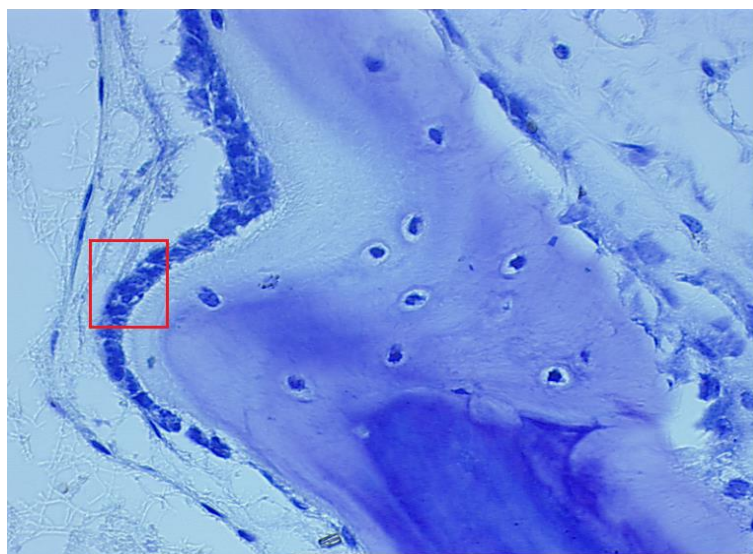


Fig. 6: Banda de osteoblastos de tejido óseo normal tras coloración ALP y BT, a 20x.

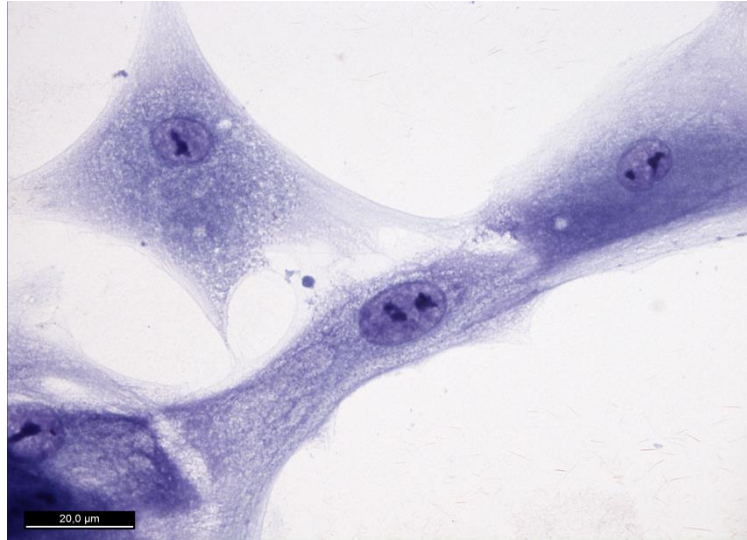


Fig. 7: Imagen de cuatro osteoblastos tras coloración MG-G: detalle de sus uniones intercelulares, adhesiones focales (filopodios, lamelipodios), citoesqueleto, gránulos citoplásmicos, núcleos y nucleolos. Ampliación a 40x.

3. Osteocitos; Células derivadas de los osteoblastos con un marcador celular adicional (CD44), situados en las lagunas óseas de hueso recién formado.

Se alojan allí de forma individual a partir de los osteoblastos que quedan atrapados en la matriz ósea recién formada.

Gracias a su capacidad de actuar como mecanoreceptores de campos piezoeléctricos, pueden detectar microcambios de potencial que se generan con la deformación mecánica del hueso, y tras el señalamiento hacia la superficie y su comunicación a las células de recubrimiento óseo, facilitan el remodelado óseo adecuado por los osteoclastos e intervienen indirectamente en la calidad del tejido óseo local.

A raíz de sus comunicaciones, se liberan colagenasas que eliminan la capa fina de osteoide superficial para que el osteoclasto pueda ejercer su función resortiva (figura 8).

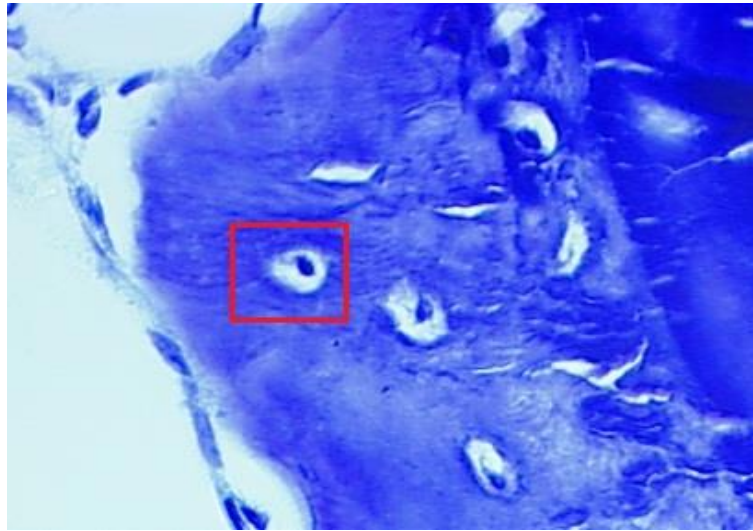


Fig. 8: Osteocito de tejido óseo normal tras coloración ALP y BT. Objetivo 40x.

4. Osteoclastos; Células grandes multinucleadas de unos 100 μ m de diámetro que provienen de la línea de granulocitos y macrófagos en la médula ósea (CFU-GM).

Poseen membrana tipo *microvilli* o de borde típico fruncido localmente. Poseen un movimiento activo, una notable capacidad fagocitadora y significantes vacuolas compuestas fundamentalmente por lisosomas primarios de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que también es un marcador citológico específico y además exclusivo de esta serie.

Estas células degradan y reabsorben el hueso local sobrante e intercambiando o no el calcio al torrente sanguíneo según proceda, y están frecuentemente situados en las cavidades de la superficie del hueso denominadas Lagunas de Howship.

En la figura 9 y 10 se ilustran un grupo de osteoclastos típicos.

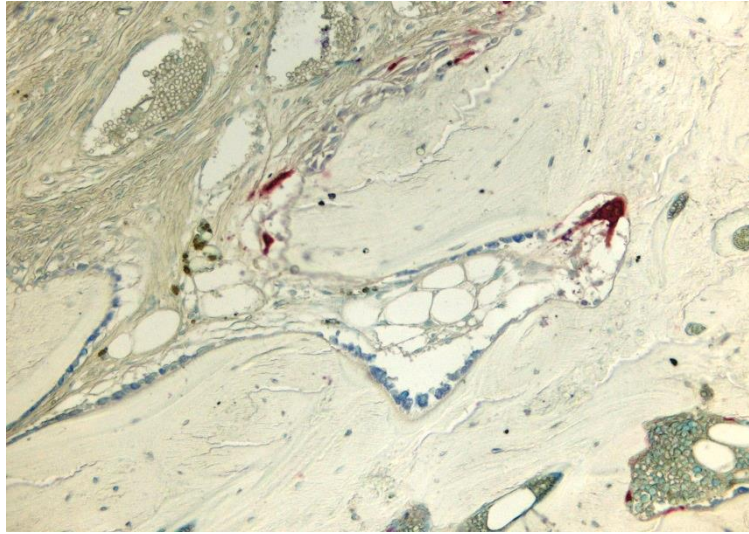


Fig. 9: Osteoclastos de tejido óseo normal tras coloración TRAP, (marcados en rojo), a objetivo 20x.

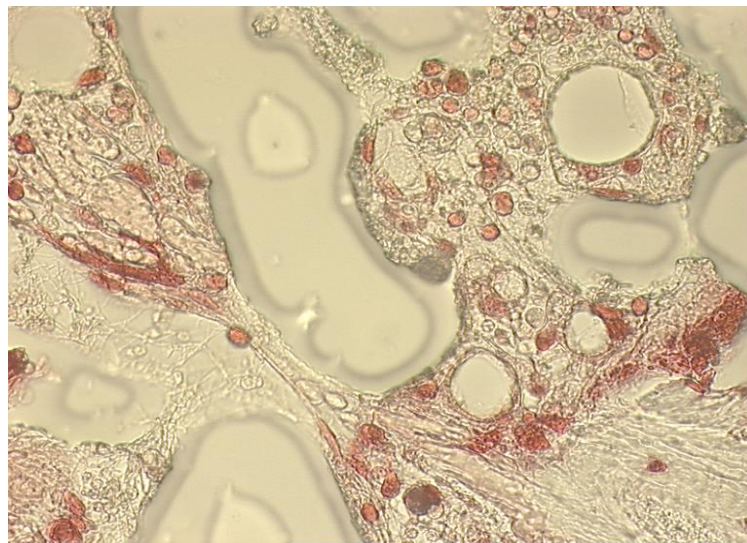


Fig. 10: Osteoclastos de tejido óseo normal tras coloración TRAP (en rojo), a Objetivo 40x.

5. Células accesorias; Adipocitos (que aportan la fuente energética), los capilares sanguíneos nutricios y epi y metafisarios del tejido conectivo endotelial vascular (que aseguran el aporte de nutrientes esenciales), y células sanguíneas de la serie mieloide y linfoide, como eritrocitos (suministro de oxígeno y balance de CO₂) y leucocitos del sistema inmunitario (que defienden frente a posibles infecciones), los nervios locales y vasos linfáticos. Algunas de estas células se ilustran en las figuras 11 y 12.

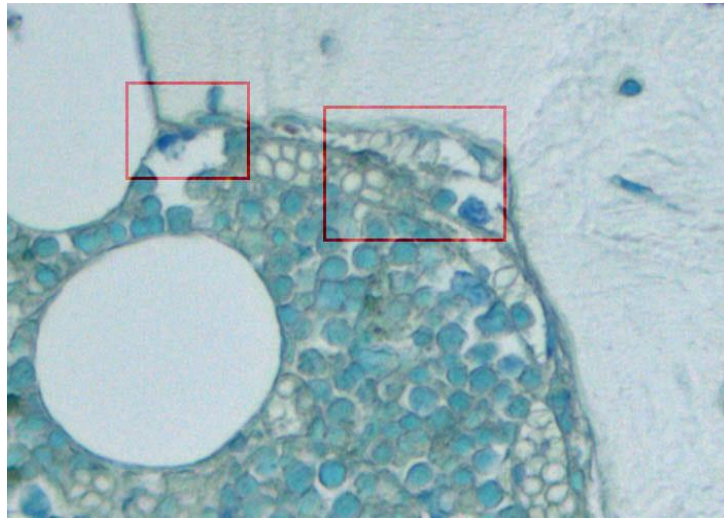


Fig. 11: Adipocitos (blanco) y médula ósea (celeste) de tejido óseo normal tras coloración BT, a objetivo 40x.

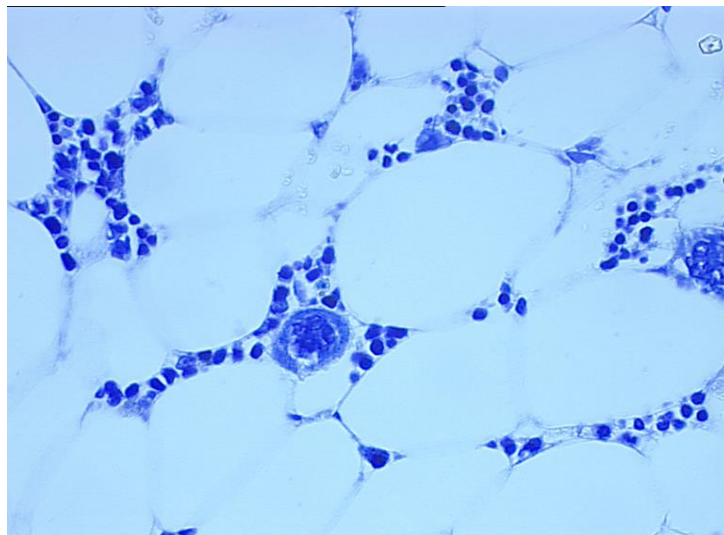


Fig. 12: Adipocitos, granulocitos, preosteoblastos y capilar sanguíneo nutricio de tejido óseo normal tras coloración BT, a Objetivo 40x.

La remodelación ósea es un proceso de sustitución del hueso recién formado y del antiguo por una secuencia de reabsorción-producción en la que participan los osteoclastos y osteoblastos. Esta remodelación es un proceso continuo a lo largo de toda la vida del individuo, y tiene lugar en localizaciones aleatorias. El objetivo de la remodelación es establecer una resistencia mínima del hueso mediante la reparación de sus lesiones microscópicas o microfracturas, y mantener la homeostasia del calcio. En condiciones normales se sustituye la misma cantidad de hueso reabsorbido por hueso

neoformado, ya que si el volumen de hueso reabsorbido no se repone por completo el tejido se debilitaría y se correría el riesgo de fracturas espontáneas.

En los primeros estadios de vida postnatal comienza ya la remodelación ósea, proceso en el cual se reemplaza primeramente el tejido óseo formado por tejido óseo nuevo no laminar, y posteriormente por laminar, durante toda la vida, y donde la actividad de los osteoblastos y osteoclastos está acoplada sinérgicamente como una unidad denominada “unidad remodeladora ósea” produciendo una cantidad balanceada equivalente entre hueso neoformado y resorbido. Es un fenómeno paralelo a la modelación, acto por el cual el resto de huesos no largos adaptan su superficie para conseguir un mantenimiento de forma acorde a la de los huesos de epífisis largas con un mayor crecimiento (10-14).

El proceso de remodelación ósea comienza con la diferenciación y adhesión de los preosteoblastos al sustrato osteosintético gracias al TGF-Cbfa1 y Osterix (factores de diferenciación temprana específica de osteoblastos). Esa capacidad de adherirse al sustrato es lo que permite la señalización desde la membrana celular al núcleo vía integrinas, citoesqueleto y cascadas moleculares de proteínas integrales de membrana, e intracelulares (proteínas G, kinasas, fosfatasa, AMPc e iones), acontecimientos que controlan tanto la proliferación celular, como la secreción (activados por la hormona del crecimiento somatotropina) de matriz ósea orgánica a modo de vesículas, que al poco tiempo sufre mineralización hasta HA, y unión de recubrimiento con colágeno en varios centros de osificación o núcleos óseos que acaban fusionándose rápidamente.

También hay secreción de otras proteínas como la ALP (necesaria para su acción osteosintética), la osteocalcina (proteína calcificadora ósea dependiente de la vitamina K, de unión a la HA que captura el calcio desde la circulación, y específica del tejido óseo en formación), osteonectina y osteopontina (glicoproteínas adhesivas a la membrana extracelular (MEC) y a la HA), y TGF- β (estimulador máximo de osteoblastos e inhibidor de osteoclastos), hasta la completa formación del nuevo tejido. La hormona tiroidea (TH), y en menor medida la testosterona y los estrógenos en el periodo de desarrollo pueril, estimulan y reclutan a los osteoblastos y favorecen la formación ósea. Las proteínas extracelulares de unión a la matriz (BMP) del estroma de

la médula ósea también estimulan la diferenciación terminal de los osteoblastos y estimulan a las células progenitoras. Una vez formadas las osteonas, unidas entre sí hasta la línea de cemento, recluidos los osteoblastos transformados en osteocitos en las lagunas de la matriz, y formada la capa de osteoide (hueso nuevo no mineralizada) bajo las células de recubrimiento, comienza la calcificación del hueso neoformado. A continuación se activan indirectamente los osteoclastos, gracias a la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D3 (1,25 dihidroxicolecalciferol) séricas, que activan receptores específicos de los osteoblastos y secretan factores de crecimiento locales sobre la formación y resorción del hueso como el IGF-I (Factor de crecimiento insulina dependiente), prostaglandinas como la PGE2, y citoquinas como las interleucinas IL-1, IL-6 y IL-11 (que estimulan la formación y diferenciación y proliferación desde preosteoclastos a osteoclastos para remodelar el hueso neoformado y redefinir los bordes de la sutura ósea generada en la zona de cicatriz). Una vez estimulados los osteoclastos maduros vía osteoblástica, mediante receptores celulares de la familia RANK y RANKL, son reclutados también al canal de Havers y comienza el balance resortivo propiamente dicho, junto a las laminilla ósea que afronta el canal y en dirección al exterior, el cual se inicia con la activación enzimática de una ATPasa del plasmalema del osteoclasto, cuya actividad crea un pH ácido de 4 gracias al gradiente de protones H^+ en torno al borde celular de máxima actividad, y por una anhidrasa carbónica que mantiene la concentración zonal de protones. Todo ello favorece la secreción y activación de la TRAP, enzima exclusiva de osteoclastos que provoca un exudado acuoso ácido y la consiguiente lisis del tejido óseo local, y reabsorción e intercambio de calcio si procediera, hasta que se sobrepasa el límite de la osteona original y los osteoclastos dejan de eliminar más hueso. Su actividad es inhibida directamente por la hormona calcitonina. Es en este momento cuando los osteoblastos son estimulados para comenzar de nuevo a sintetizar nuevo osteoide dentro de la cavidad de reabsorción, proceso que se conoce como inversión en el balance. La línea de cementación indica el límite de las laminillas recién organizadas, y se continua la formación hacia el centro de la osteona hasta que quedan de nuevo atrapados dentro de la matriz ósea mineralizada para convertirse en osteocitos receptores de campo, formar

una nueva osteona o sistema de Havers, y cerrar así el ciclo óseo remodelativo de mantenimiento (10) (figuras 13 y 14).

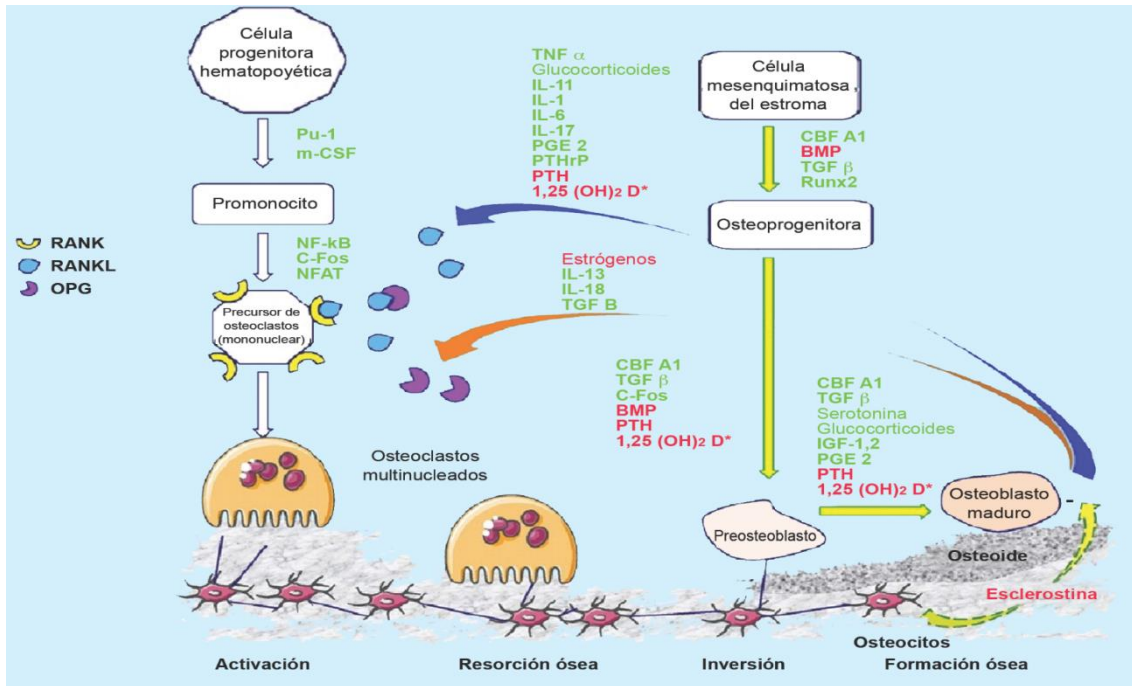


Fig. 13: Remodelación ósea. Se muestra el desarrollo de los osteoblastos y los osteoclastos a partir de sus precursores y su mecanismo de acción. RANK: activador del receptor del factor nuclear kappa B; RANKL: ligando del activador del receptor del factor nuclear kappa B; OPG: osteoprotegerina; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleucina; PGE 2: prostaglandina E 2; PTHrP: péptido relacionado con la hormona paratiroidea; PTH: hormona paratiroidea; 1,25(OH)₂D₃: 1,25-dihidroxitetrahidrovitamina D₃; CBF A1: factor de unión al núcleo alfa 1; BMP: proteína morfogénica ósea; TGF-β: factor de crecimiento transformante beta; IGF: factor de crecimiento similar a la insulina; m-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos; NF-κB: factor nuclear kappa B; NFAT: factor nuclear de células T activadas. *La función de la vitamina D₃ en el hueso es compleja y depende del calcio sérico. Si el calcio sérico es bajo, la vitamina D aumenta la resorción ósea, y si es alto, la vitamina D promueve la formación de hueso.

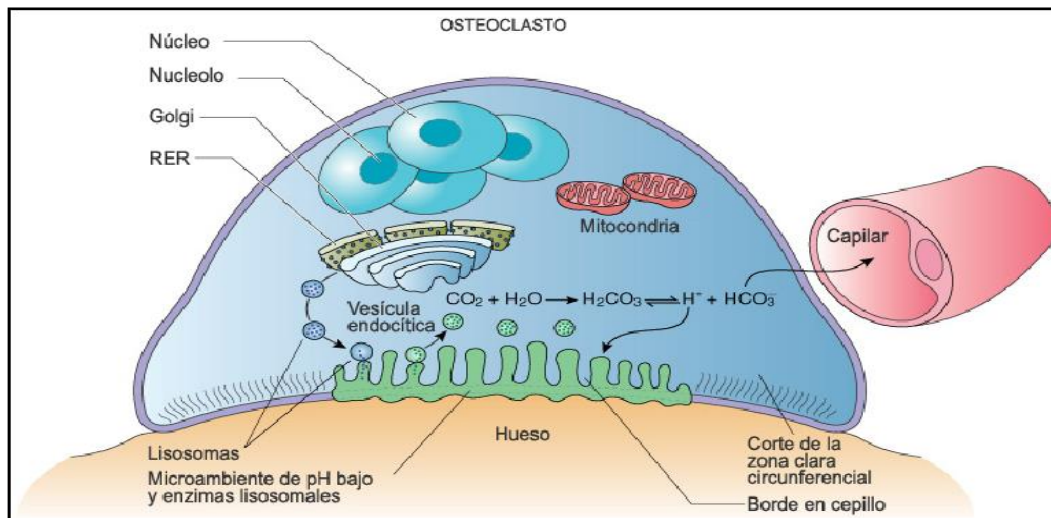


Fig. 14: Esquema del mecanismo resorptivo óseo de un osteoclasto típico.

Cicatrización ósea.

La cicatrización ósea es un proceso de reparación de tejido óseo dañado que comienza con un coágulo de la hemorragia por rotura de vasos sanguíneos y continúa con su posterior eliminación por parte de los macrófagos. El periostio y endostio próximos a la zona de fractura responden con una proliferación intensa de células osteoprogenitoras que forman un collar alrededor de la fractura y que penetran entre los extremos del hueso fracturado formando un anillo conjuntivo de sellado. En este anillo, así como en el tejido conjuntivo localizado entre los extremos del hueso fracturado, surge a partir de los osteoblastos locales un tejido óseo inmaduro debido, tanto a osificación endocondral de los pequeños fragmentos de cartílago existentes por los condriocitos locales, como a osificación intramembranosa. Así, en la zona de reparación, se pueden observar zonas de cartílago, áreas de osificación intramembranosa y endocondral al mismo tiempo. Al cabo de un cierto período de tiempo, este proceso evoluciona hasta la formación de un callo óseo formado por tejido óseo inmaduro (primario) que rodea y se une provisionalmente a los extremos del hueso fracturado. Las tracciones y presiones ejercidas sobre el hueso durante la reparación de la fractura, y tras el retorno del paciente a sus actividades cotidianas normales, dan lugar a la remodelación del callo óseo y a su completa sustitución por tejido conjuntivo lamelar (tejido óseo secundario).

En los casos en los que estas fuerzas cotidianas son idénticas a las ejercidas en el hueso antes de la fractura, su estructura vuelve a ser la que existía anteriormente. A pesar de su gran dureza, el hueso es un tejido conjuntivo que presenta reparación sin formación de una cicatriz, al contrario que el resto de tejidos de este grupo (10).

En la figura 15 se muestra un esquema del proceso.

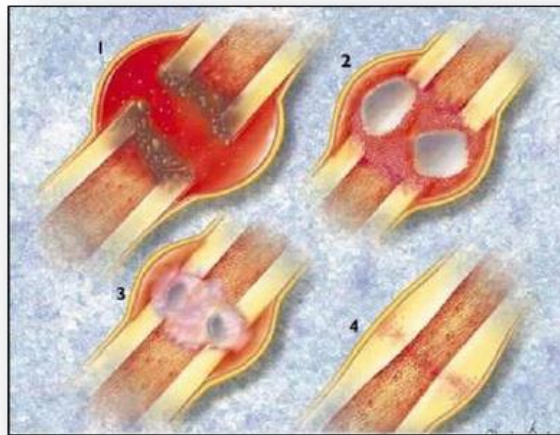


Fig. 15: Esquema del proceso de cicatrización ósea de cubito y radio.

2.3.- REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA (ROG)

La ROG es una técnica quirúrgica que persigue la formación de hueso nuevo en, entre otras situaciones, para el relleno de defectos óseos perimplantarios, o en áreas óseas deficitarias. Esta técnica está indicada en todos aquellos procedimientos quirúrgicos orales 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 (8,10).

El proceso de ROG fue descrito por Gottlow (11), 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 (4, 18).

En esta técnica, la membrana actúa como un segundo colgajo y 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 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 residuas, 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.

Los biomateriales de relleno usados en ROG se clasifican en tres grupos: hueso autólogo, homólogo, heterólogo y materiales aloplásticos (membranas reabsorbibles de colágeno o poliméricas de PLGA entre otros).

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 (4).

Membranas Reabsorbibles

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 son: biocompatibilidad, integración tisular, oclusión celular, manejabilidad clínica y mantenimiento del espacio, según Scantlebury (17). Presentan las características de ser biodegradables y ser reabsorbidas por el propio organismo sin generar una respuesta inmune de rechazo (18). 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. 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 depósitos de cristales a escala nanométricas cree una superficie de topografía más compleja que incremente la capacidad osteoinductora.

Membranas Reabsorbibles 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 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. 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 (18, 23-29).

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, lo que justifica su participación en este desarrollo.

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 (4, 18).

Implantes e injertos, problemas asociados.

Un implante dental ideal debe tener sus propios tejidos perimplantarios, tal como ocurre con el diente natural. El éxito del implante depende de la osteointegración entre el implante y el hueso alveolar. Osteointegración, un término utilizado por primera vez por Branemark (11), como un anclaje directo entre hueso vivo y el implante insertado.

La formación de hueso nuevo en conjunción con la colocación de los implantes dentales está también bien documentada como procedimiento exitoso. Hay un acuerdo general en que la regeneración ósea guiada es difícil de realizar y es exigente con respecto las habilidades y la experiencia del terapeuta.

Uno de los principales problemas asociados a los implantes e injertos es la escasez de hueso propio en la zona receptora, a menudo por causas de senescencia, atrofas, traumas o genética del individuo. Cuando la zona a tratar es muy pobre en hueso receptor como para recibir y mantener un implante o algún otro tratamiento ortopédico, se hace necesario el injerto de hueso autólogo, mediante un proceso quirúrgico tedioso, incómodo y arriesgado para el paciente, o bien usar materiales sintéticos no reabsorbibles que no aportan un total acondicionamiento de la anatomía fisiológica del individuo receptor y puede causar rechazos de diversos tipos, o bien optar por una regeneración ósea guiada, mucho más rápida, indolora y que presenta riesgos quirúrgicos y de incompatibilidad más limitados. Es por ello que mediante la implantación quirúrgica de este tipo de membranas poliméricas reabsorbibles de PLGA a través de la técnica de ROG, puede mejorarse no solo la regeneración ósea, sino también la anatomía fisiológica de la zona tratada, eliminando la necesidad de una segunda cirugía al paciente como en el caso de las no reabsorbibles, y evitando rechazos y complicaciones asociadas al uso de injertos óseos (18, 30-39).

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 (40-46).

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).

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. 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. 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 (47-55).

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. (3, 12, 23, 29).

2.4.- NANOMEDICINA

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 biomateriales 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 (30, 34).

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 (1).

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 terapéutica al tejido original dañado.

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.

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 (39).

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% (39).

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.

En la actualidad se han desarrollado tres mecanismos fundamentales para la creación de un nuevo tejido. 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. 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. 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 y buena biocompatibilidad. Su función será la de dirigir el crecimiento celular, bien sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas sobre él (4, 9, 18, 50-53).

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 (1).

Antiguos materiales en ortopedia.

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 una multitud de usos en la industria médica, comenzando con las suturas biodegradables que fueron aprobadas en 1960. En 1980, Nyman y cols. (8)), 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 (10, 11).

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 (18, 31, 56-61).

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.

Una aproximación biológica al tratamiento de los defectos traumáticos óseos parece bastante intuitiva. Tras la descripción del injerto de hueso autólogo, en sus inicios éste se limitó principalmente a su aplicación en defectos de pequeño tamaño. La osteogénesis por distracción fue introducida posteriormente por Ilizarov con el fin de preservar extremidades con grandes pérdidas óseas, y es más adelante, en la década de los 70 cuando se comienzan a utilizar injertos vascularizados de peroné, y décadas más tarde los de cadera. En la figura 16, se muestra una imagen de una zona donante habitual de hueso, la cadera.

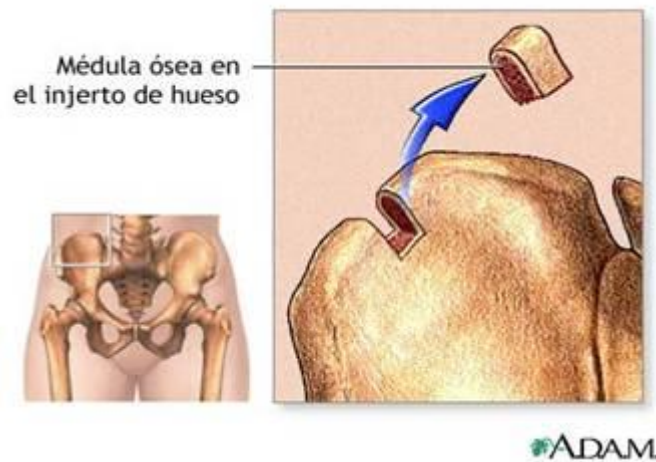


Fig. 16: Hueso de cadera donante in vivo.

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 cajas de titanio así como 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 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. Por más de tres décadas, las artroplastias totales, principalmente las de cadera y rodilla mejoraron notablemente la calidad de vida de los pacientes.

2.5.- AVANCES EN NANOMEDICINA APLICADA A ROG.

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 (4, 18):

- 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 hospedero. 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 μm .
- 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*; Depende 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.

Actualmente hay consenso en que la complejidad del micromedioambiente 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 (62-67).

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 (4, 9, 18, 31, 39).

Las características ideales de las membranas reabsorbibles de PLGA según Scantlebury (17), 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 depósitos de cristales a escala nanométricas cree una superficie de topografía más compleja que incremente la capacidad osteoinductora (42-46, 67-72). 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 *H₂O₂ 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) (23-34). En la figura 17 se nombran algunos de los polímeros biodegradables más usados.

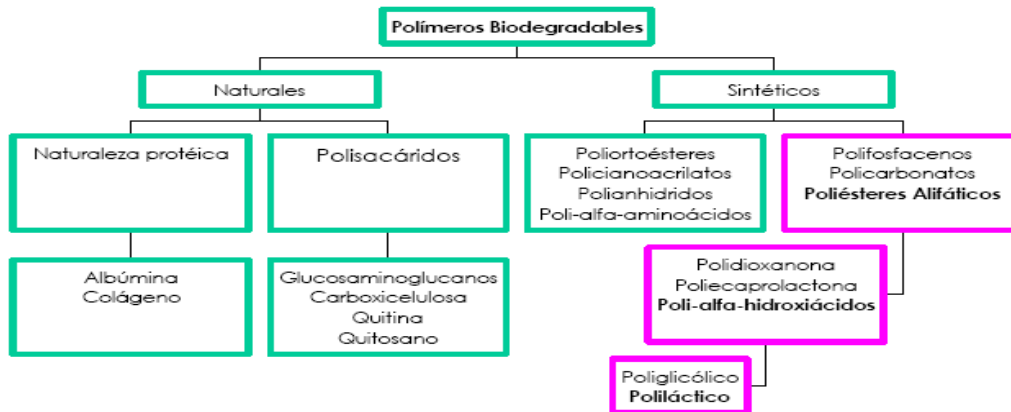


Fig. 17: Polímeros biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas.

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 de estos materiales para formar compuestos, y las propiedades de estos *scaffolds* en ingeniería de tejido óseo se han examinado de forma exhaustiva incluyendo los aspectos de la degradación, las propiedades mecánicas, la entrega de citoquinas, iones, porosidad y tamaño de poro (9, 18).

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. Los principales tipos son;

A) 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 hidroxiaácido 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 18, 19 y 20 se muestran estos datos y algunas de sus propiedades dentro del organismo.

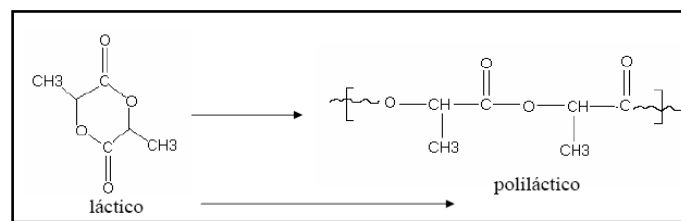


Fig. 18: Síntesis del ácido poliláctico.

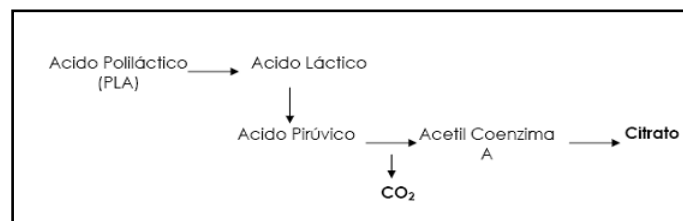


Fig. 19: Ruta metabólica del ácido poliláctico.

Algunas propiedades del ácido poliláctico en comparación con el acero y el hueso cortical (100).				
Material	T _m (°C)	T _g (°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	

Fig. 20: 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 21.

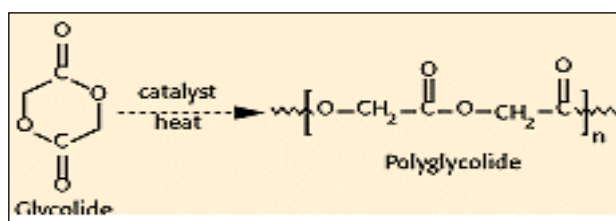


Fig. 21: Síntesis del poli (ácido glicólico) PGA.

Copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA)

Encuadrados dentro de la familia de los poli- α -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 22 se muestra el esquema de síntesis del ácido poliláctico-co-policlicólico (PLGA) a partir de ácido láctico y glicólico, ambos ácidos naturales presentes biológicamente en el interior celular.

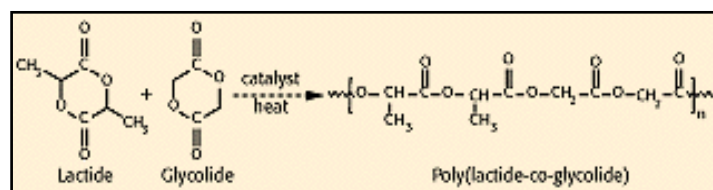


Fig. 22: Síntesis del ácido poliláctico-co-glicólico a partir de sus monómeros.

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 (4, 9, 18, 67).

Otros poliésteres y otros polímeros artificiales menos usados

Dentro de este subapartado se encuentran los polihidroxicanoatos, los polidioxanos, los poligliconatos, los poliortoésteres, las olicaprolactonas, las poliesteramidas, los polifosfacenos, los polianhídridos y los ésteres de polifosfato.

C) 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.

En la siguiente tabla se presentan los tiempos de degradación de los polímeros biodegradables mencionados anteriormente. Debe tenerse en cuenta que la biodegradación depende del tamaño del implante, de su forma, densidad, lugar de implantación y peso molecular (9).

Polímero	Tiempo de eliminación (meses)
Poliácido D-Láctico	12-16
Poliácido L-Láctico	18-24
PLGA	6-12
Policaprolactona	18-24
Poliglicol	2-4
Polihidroxibutirato	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 1: Tiempo de degradación de los principales polímeros en investigación biomédica.

Aplicaciones biomédicas y farmacológicas

1) 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.

2) 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.

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.

3) 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. 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.

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 la tabla 2 se recogen a modo de resumen algunas de las aplicaciones médicas más extendidas en cada biomaterial.

Biopolímeros	Aplicaciones
Polímeros sintéticos no degradables	
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 cardíacas, partes estructurales
Poliámidas 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 (imidaz)	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
Polioléfinas 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
Bioresorbibles	
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
Macromoléculas bioderivadas	
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
Ácido Hialurónico	Recubrimientos, antiadhesivo y antiinflamatorio
Fosfolípidos	Liposomas
Seda	Suturas, recubrimientos experimentales de proteínas
Recubrimientos pasivos	
Albúmina	Tromboresistencia
Cadenas alquílicas	Adsorbe albúmina para la tromboresistencia
Fluorocarbonados e Hidrogeles	Reduce el rozamiento en catéteres
Siliconas libres de sílice	Tromboresistencia
Aceites de silicona	Lubricación para agujas y catéteres
Recubrimientos bioactivos	
Anticoagulantes (ej: heparina)	Tromboresistencia
Antimicrobianos	Resistencia a la infección
Péptidos y Proteínas de adhesión celular	Mejora adhesión celular
Adhesivos tisulares	
Cianoacrilatos	Microcirugía
Pegamento de fibrina	Recubrimiento para injertos vasculares y microcirugía

Tabla. 2: Principales aplicaciones de los biopolímeros para los *scaffolds* en biomedicina.

Técnicas de fabricación de biomateriales scaffolds en regeneración tisular guiada

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 figura 23a y 23b;



Fig. 23a: Imagen tridimensional de algunas matrices y técnicas de elaboración de andamios poliméricos para ingeniería de tejidos.

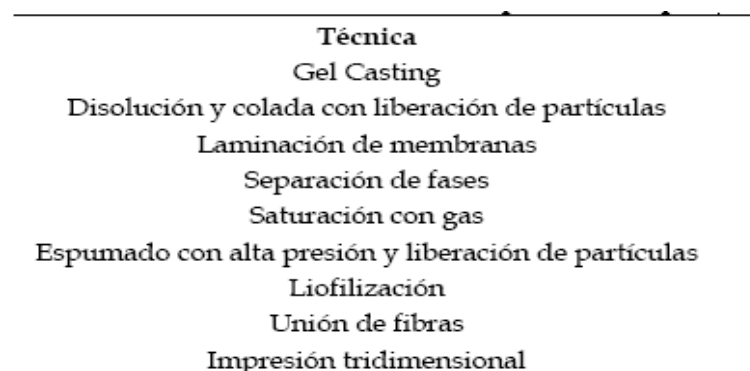


Fig. 23b: Principales técnicas de elaboración de andamios poliméricos para ingeniería de tejidos.

1) *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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) Saturación con gas

Para esto se utilizan especímenes poliméricos sólidos previamente prensados, los cuales son expuestos a altas presiones de CO₂ 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 CO₂ 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.

6) 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.

7) 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, ésta 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.

Existen otros métodos que involucran altas presiones de CO₂ en discos sólidos de un polímero y mezclas de polímeros con cerámicos y fibras. El primero tiene la ventaja de no utilizar disolventes y la desventaja de que la saturación de CO₂ genera poros cerrados, lo cual puede provocar problemas de crecimiento celular. El segundo método, basado en la formación de materiales compuestos permite que los andamios tengan una resistencia compresiva superior a los materiales no reforzados, conteniendo la misma porosidad. Para los tejidos finos tales como hueso y cartílago, el desafío de un tejido-célula construido, es tener características mecánicas similares a las del tejido original. Las fibras proporcionan un área superficial grande en relación al volumen y, por lo tanto, son deseables como matriz en los andamios.

En el caso del tejido óseo, los materiales más utilizados en la actualidad para el desarrollo de las estructuras tridimensionales, son las hidroxiapatita (HA), los poli- α -hidroxiácidos, y algunos polímeros de origen natural como el colágeno, el chitosán 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 (72-79).

En la figura 24 se recogen algunos tipos de biopolímeros para dispositivos y similares en biotecnología.

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

Fig. 24: Polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en ingeniería de tejidos.

En la figura 25 se encuentran tabulados algunos de los compuestos para ingeniería de tejidos y sus modificaciones químicas elaborados hasta este momento.

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

Fig. 25: Algunos de los materiales compuestos para ingeniería de tejidos, desarrollados hasta el momento.

Técnica de funcionalización superficial de membranas poliméricas

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

- La bioactividad del polímero aumenta debido a la incorporación de una fase bioactiva.
- La introducción de la fase inorgánica podría modificar de forma positiva el patrón de degradación del polímero.
- La incorporación de esta segunda fase modifica el comportamiento mecánico del material, así como la integridad estructural del andamio.

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 titanio, el plasma de oxígeno y de las estructuras de PLGA de forma más pormenorizada, ya que estos elementos se integran en nuestro estudio.

El óxido de titanio

El titanio es un elemento metálico de transición de número atómico 22, de color gris plata, de densidad 4507 kg/m³, mucho más ligero que el acero, aunque de precio más elevado. Tiene alta resistencia a la corrosión y gran resistencia mecánica, su punto de fusión es 1675°C. Es un metal refractario abundante en la naturaleza y de escasa conductividad térmica y eléctrica; se considera que es el cuarto metal estructural más abundante en la superficie terrestre y el noveno en la gama de metales industriales. No

se encuentra en estado puro sino en compuesto covalente en forma de dióxidos muy estables de color blanco puro (fig. 26a y b).

Su utilización se ha generalizado en base a sus características, ya que es capaz de soportar condiciones extremas de frío y calor y es resistente al ataque de muchos ácidos. Al mismo tiempo, este metal tiene propiedades biocompatibles, dado que los tejidos del organismo toleran su presencia, por lo que es factible la fabricación de muchas prótesis e implantes de este metal. Tanto el titanio como en el dióxido de titanio tienen un nivel bajo de toxicidad. Respecto a su cancerogenicidad, la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) señala que el titanio no es clasificable como elemento cancerígeno para los humanos. (80).



Fig. 26a: Imagen del Titanio como elemento natural. **Fig. 26b:** Óxido de titanio.

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 (81-85).

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 (4, 18, 31, 39, 43, 61-64, 67-71).

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;

<p>Factores de crecimiento: (TGF-b, PDGF, BDGF, VEGFs, hsGF, FGF, IGFs)</p>	<p>Colágeno, Ac.Hialurónico, Calcio, Chitosán, Hormonas: (PTH, Vit.D3)</p>
<p>Proteínas: (BMP's, Osteogenina). Péptidos: (RGD)</p>	<p>Fosfato Tricálcico (β-TCP)</p>
<p>Fragmentos génicos, Antitumorales, Activadores, Inhibidores y ARNi</p>	<p>Óxidos metálicos: (TiO₂, SiO₂). HA</p>

Tabla. 5: Principales Nanocomposites enhancers a modo de modificaciones para las matrices de PLGA.

Diseños estructurales del PLGA en base a su morfología macroscópica;

1.- 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 27 a y b;

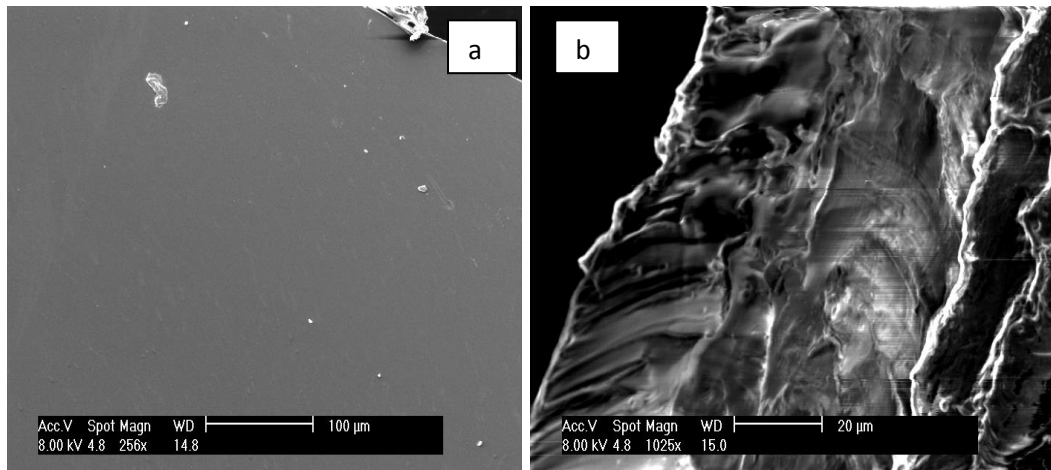


Fig. 27a: Micrografía de superficie de una membrana tipo de PLGA a SEM. **Fig. 27b:** Microestructura interna de la membrana a FSEM alta resolución.

2. Discos y Cilindros 2D:

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

3. Esferas 3D:

Desde hace pocos años ha aumentado el uso de estos polímeros de PLGA en forma de inyectables conteniendo microesferas. La figura 28.a muestra una micrografía en la que se puede apreciar la homogeneidad de las microesferas, y la figura 28.b su proceso de degradación al ponerse en contacto con los fluidos del cuerpo produciendo fragmentos de polímero más pequeños;

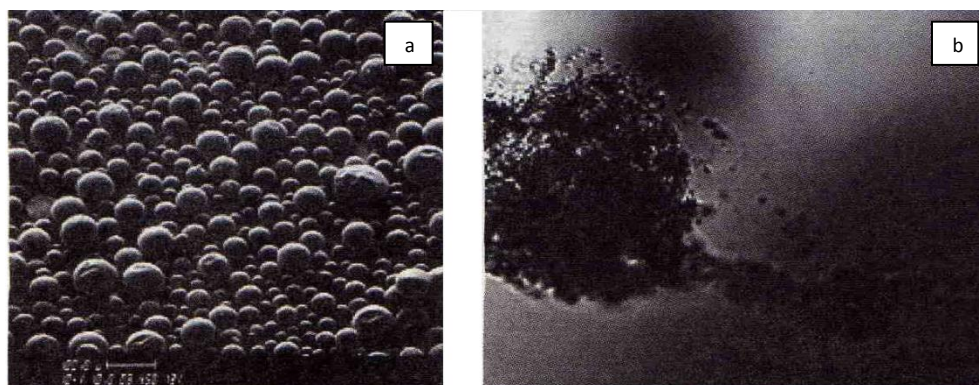


Fig. 28a: Microesferas de PLGA. **28b:** Degradación de una micropartícula.

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 (4, 9, 18).

4.- 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 29a y 29b se muestran dos ejemplos del mecanismo de acción de estos *scaffolds* en forma de gel.

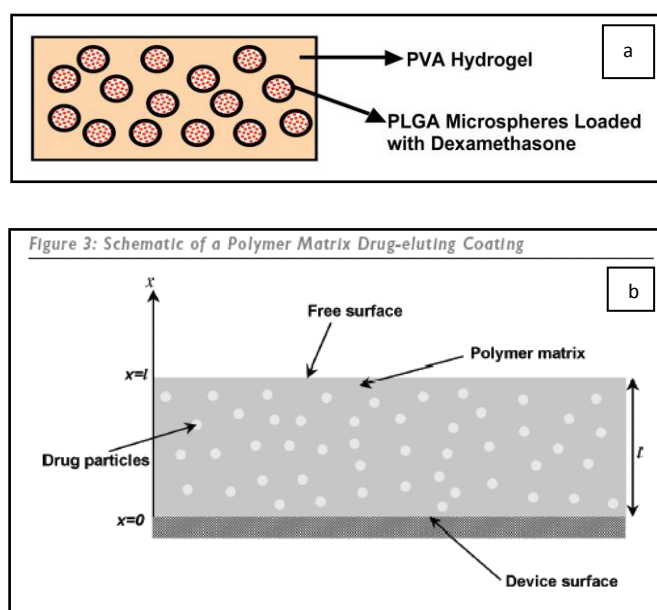


Fig. 29a y 29b: Esquemas tipo de un sistema terapéutico farmacéutico en gel.

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 de 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 (52).

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 μm (31-34), aunque ha sido demostrada una mejor osteogénesis a tamaños de poro de más de 300 μm ya que facilita una mejor vascularización y oxigenación del tejido. Un menor tamaño de los poros (75-100 μm) provoca desmineralización interna y los poros más pequeños (10-44 μm y 44-75 μm) 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 (31-34, 67, 81-84).

3. HIPÓTESIS

1.- Los defectos óseos regenerados con membranas reabsorbibles de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA), funcionalizadas a escala nanométrica con óxido de titanio (TiO₂) y un pretratamiento físico de plasma de oxígeno, generan una mayor proporción de hueso neoformado en comparación con los de las membranas de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA) sin las citadas modificaciones, tras un mes de cicatrización, cuando son testadas *in vivo* en conejos raza New Zeland.

2.- Las membranas son estables y biocompatibles al ser testadas *in vivo*, y producen un proceso inflamatorio inapreciable en los tejidos óseos donde son implantadas mediante técnicas quirúrgicas para regeneración ósea guiada (ROG), tras un mes de cicatrización.

4. OBJETIVOS

1. Objetivo general:

Estudiar la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de las membranas de ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA), modificadas nanométricamente con composites de óxido de titanio (TiO₂) y un pretratamiento físico de plasma de oxígeno (P-O₂), en defectos generados en la calota de conejos raza New Zeland tras un mes de cicatrización tras la intervención quirúrgica.

2. Objetivos específicos:

2.1 Evaluar cualitativamente la estructura y densidad ósea global de los defectos regenerados con las membranas de estudio (TiO₂/PLGA/P-O₂), frente a los controles (PLGA sencillo) tras un mes desde la intervención.

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

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

2.4 Comparar cuantitativamente la actividad resorptiva (osteoclastos por milímetro) en los grupos de estudio, frente a los controles.

2.5 Evaluar 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 coordinado es posibilitar 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 para su uso clínico en humanos en un futuro próximo.

5. MATERIAL Y METODO

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

5.1.1.- 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 μm de espesor y dimensiones de 1x1 cm, modificadas a escala nanométrica con óxido de titanio (TiO₂/PLGA) y plasma de oxígeno (P-O₂).

Las membranas testadas en este estudio fueron:

- PLGA (ácido poliláctico-co-poliglicólico), utilizadas como control del ensayo.
- TiO₂/PLGA+PO₂ (ácido poliláctico-co-poliglicólico funcionalizadas a escala nanométrica con partículas de óxido de titanio, y un pretratamiento superficial de plasma de oxígeno), utilizadas como grupo de estudio.

5.1.2.- 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 (79);

- *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 (CH_2Cl_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 30 se ilustra una imagen tipo de una de las membranas de PLGA Control de este estudio a escala macroscópica y a microscopía electrónica (SEM).

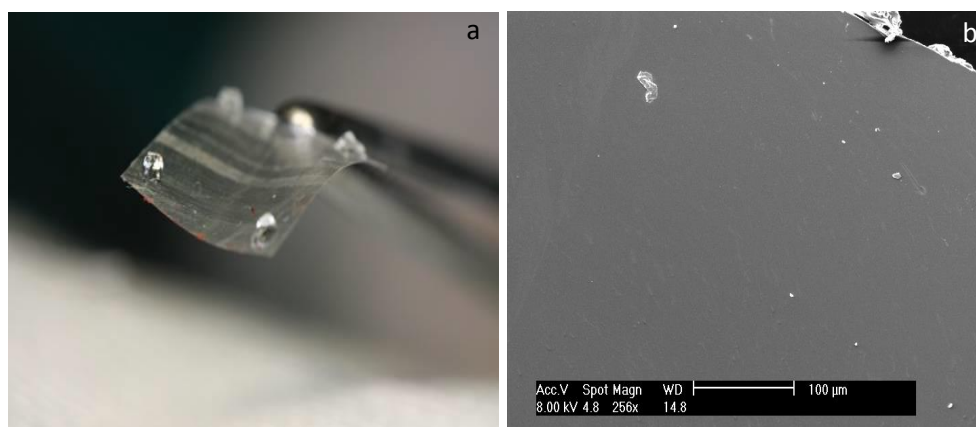


Fig. 30: *a;*(Izq); Membrana tipo de PLGA a escala real. *b;*(Dcha); Imagen superficial de la membrana tipo de PLGA a microscopía electrónica de barrido (SEM).

- *Fabricación de las membranas del grupo $\text{TiO}_2/\text{PLGA}+\text{PO}_2$:*

Procedimiento idéntico al grupo anterior, y a continuación, dos tratamientos consecutivos;

El primero de ellos es un pretratamiento físico superficial de plasma de oxígeno (P-O₂), 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.

Globalmente 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 (80).

Un esquema de este conjunto de procesos se presenta en la Figura 31, 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.

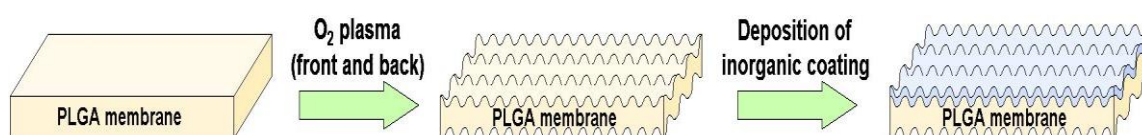


Fig. 31: Funcionalización superficial de las membranas.

Posteriormente se procedió a añadir el segundo tratamiento con nanopartículas de óxido de titanio 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 titanio (TiO₂) 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 titanio (TTIP, Sigma-Aldrich, EE.UU). La deposición se

hizo siguiendo metodologías de base nanotecnológica basadas en el uso de plasmas fríos y de magnetrón *sputtering* (fig. 32).

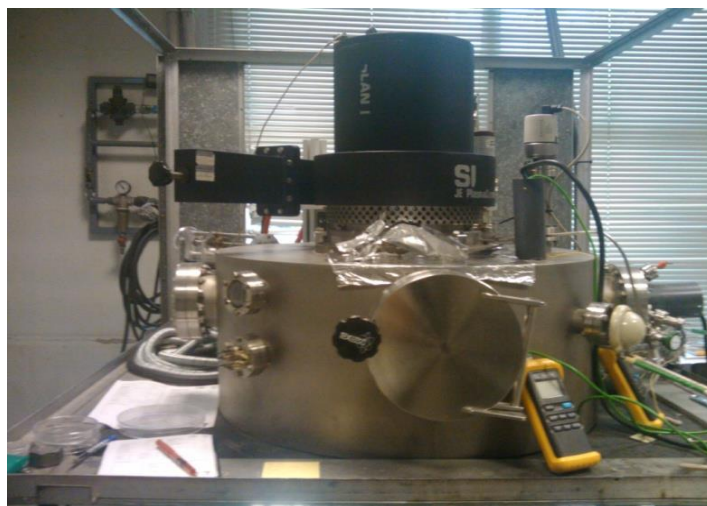


Fig. 32: Funcionalizador de nanopartículas de titanio (SLAN).

5.1.3.- Ejemplares para la experimentación animal.

Para este estudio se utilizaron cuatro conejos de experimentación (raza New Zeland, 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 (Anexo 1).

5.2.- MÉTODO

5.2.1.- 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 (TiO₂/PLGA+P-O₂), 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.

5.2.2.- Procedimiento quirúrgico.

Todas las intervenciones, así como el mantenimiento 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 doctorando, y un grupo de auxiliares clínicos de la especialidad.

Se comenzó con la inmovilización de los animales y control de sus constantes vitales. Para el proceso de anestesia se utilizó inducción intravenosa con Midazolam 0,25mg/kg y Propofol 5mg/kg, mantenimiento con gas inhalatorio de Sevoflurano 2,8% aspirado y analgesia con Ketorolaco 1,5mg/kg y Tramadol 3mg/kg.

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 desde la incisión anterior al frontal en la zona postorbital (de aproximadamente 5 cm) con hoja de bisturí n°15.

Seguidamente se desplazó las capas epitelial, conectiva y muscular con un periosteotomo de Pritchard, controlando en todo momento el sangrado mediante compresión y aspiración. Finalmente se produjo la exposición de la superficie externa del cráneo y el lavado de la zona con solución salina (suero fisiológico).

Una vez despegados los colgajos triangulares, se separaron mediante sutura del 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 sendos lados de la línea media se realizaron dos defectos óseos separados cada uno de ellos por 6 mm, con una trefina montada en micromotor de implantes con irrigación salina. 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 pieza se marcó el defecto con una profundidad de 1 mm, y a 2000 rpm.

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 33;

Conejos (1-4)

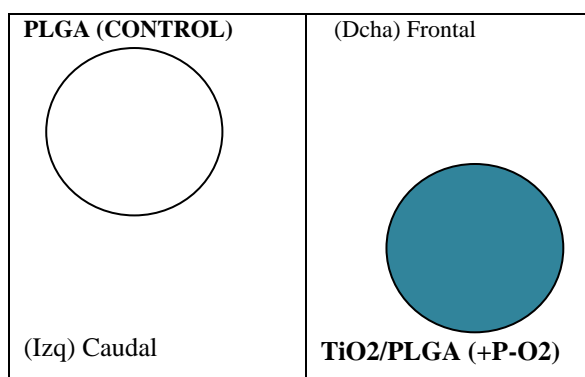


Fig. 33: Organización posicional de las membranas de PLGA en las calotas de los conejos.

Las membranas 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 cuidadosamente colocado en el reborde óseo adyacentes los defectos para fijar mejor la membrana a los mismos, confirmándose una adecuada adhesión y poca movilidad 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, (fig. 34-39).

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.

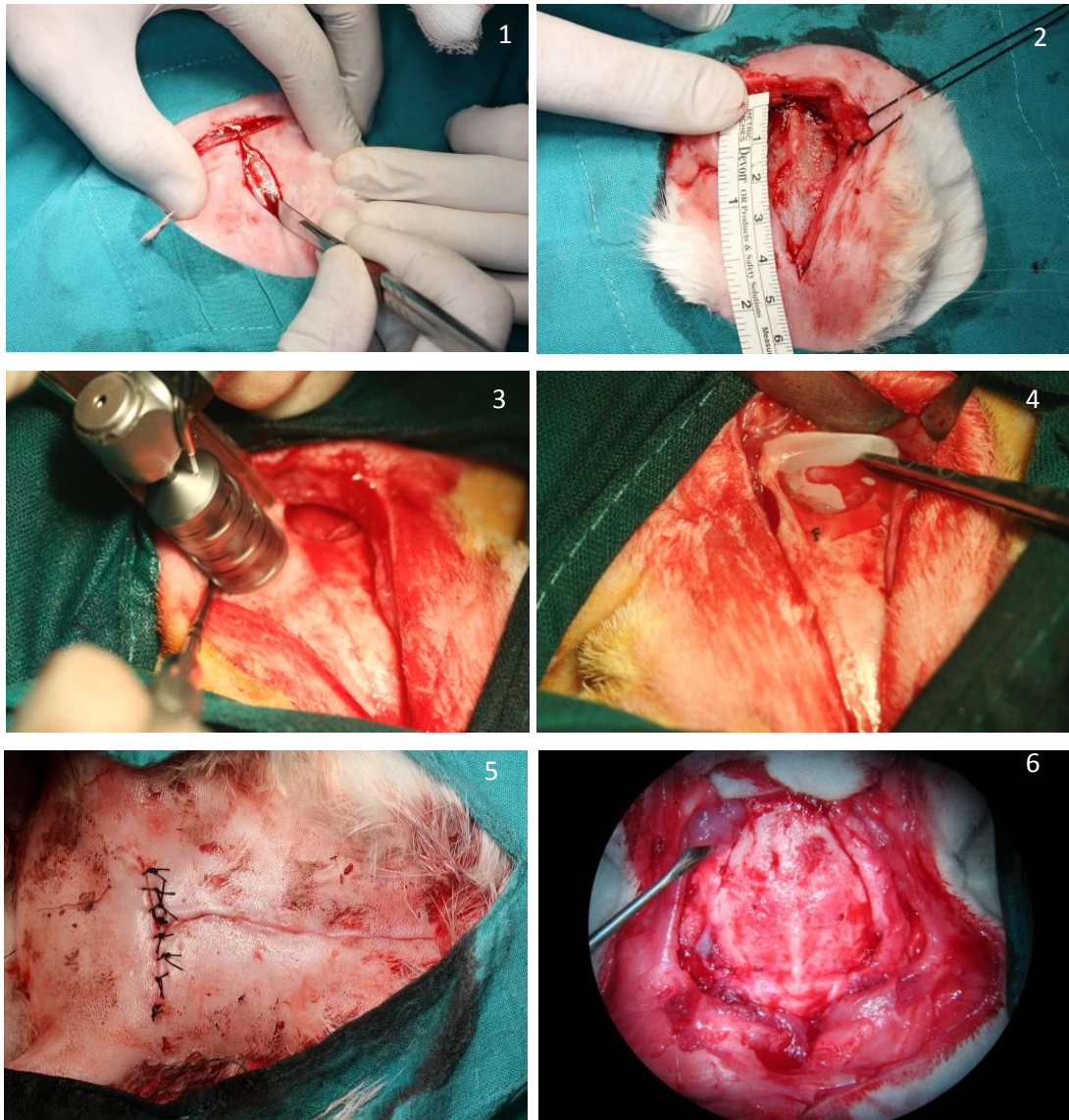


Fig. 34-39: Imágenes de la operación. (1 y 2); Incisión y desplazamiento tisular. (3); Trefinado. (4); Colocación de las membranas en los defectos óseos. (5); Sutura de la herida. (6); Visión de los defectos óseos regenerados tras el sacrificio.

5.2.3.- 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. Se colocaron en etanol de 70° en refrigerador a (4°C) al menos 12-24h antes del sacrificio (es importante que el alcohol esté frío para conseguir una buena fijación celular).
2. Precorte (3x3cm): En cuadrado de 3cm en total como máximo, para cada lado (tal como se aprecia en el esquema abajo).
3. Marcado \triangle : Corte en triángulo de la esquina caudal izquierda de cada calota, en vista dorsal del animal (como se indica en el esquema de la fig 40).

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 desecación de las células (fig. 41).

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 (CO₂ a baja temperatura y alta presión).

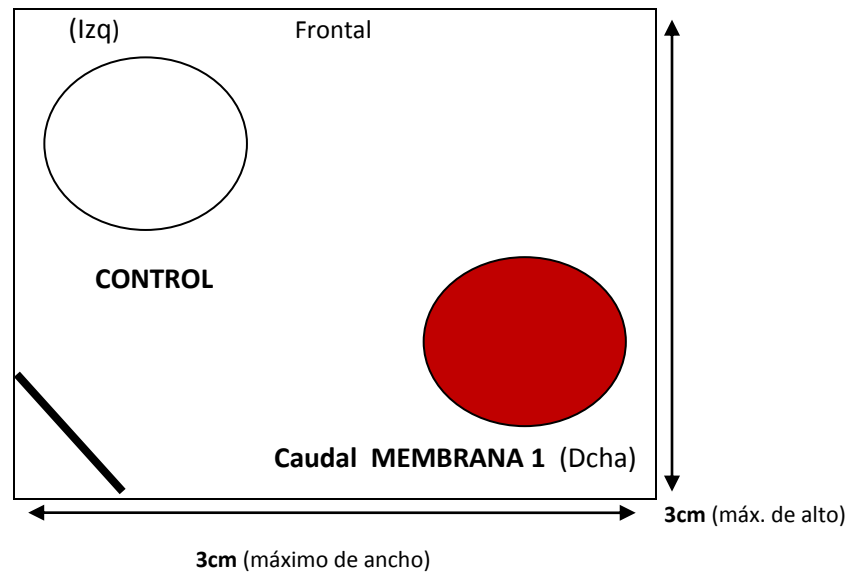


Fig. 40: Esquema del precorte y marcado en la calota. (Nota: Referimos siempre Izq/Dcha y Frontal/Caudal del animal, no del operador. En vista dorsal de la calota, (No ventral-cerebral)).

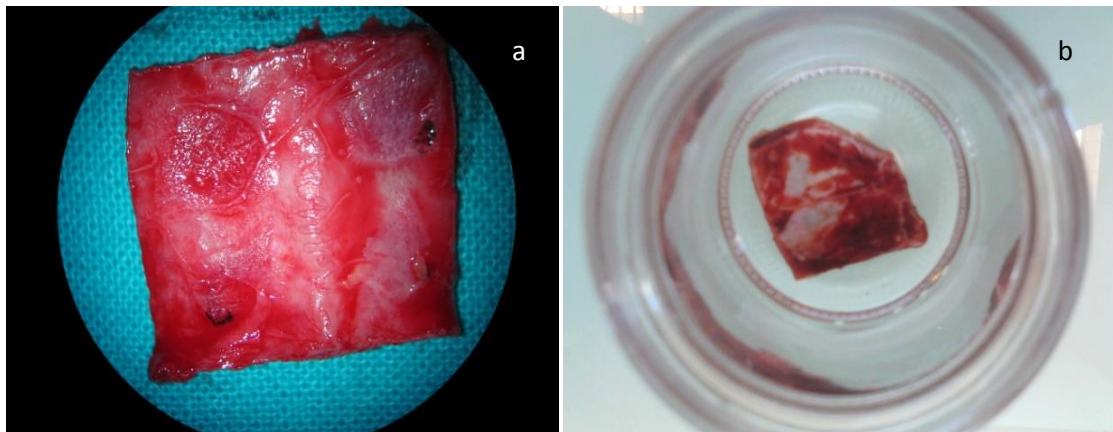


Fig. 41: (a); Calota precortada tras sacrificio. (b); Muestra de calota marcada y preparada fijación y traslado al laboratorio.

5.2.4.- 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 42), 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 químicas y biológicas para microscopía;

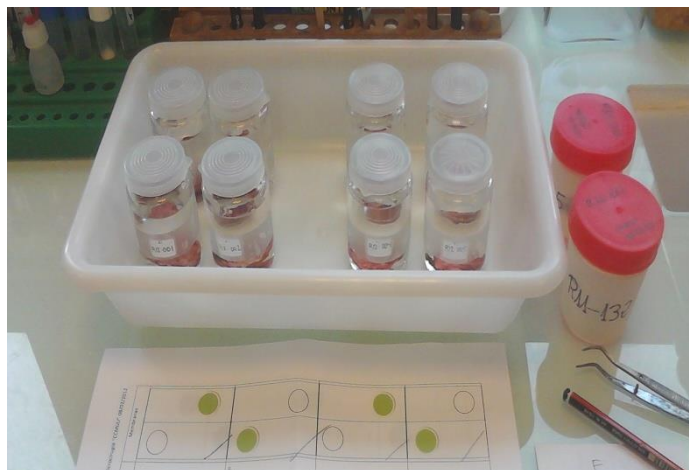


Fig. 42: Pretratamiento de las muestras, fijación fría etanol 70° (4°C).

5.2.4.1. Pretratamiento y tratamiento tisular;

5.2.4.1.1.- 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 metieron en xileno con un pase de tres horas.

5.2.4.1.2.- 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 43 se muestra una imagen con el material empleado para el proceso;



Fig. 43: Impregnación y preinclusión a alta presión.

5.2.4.1.3.- 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.

5.2.4.1.4.- Polimerización;

La polimerización se llevó a cabo de manera pasiva en nevera a -20°C durante 48h, como se ilustra en la Fig. 44;

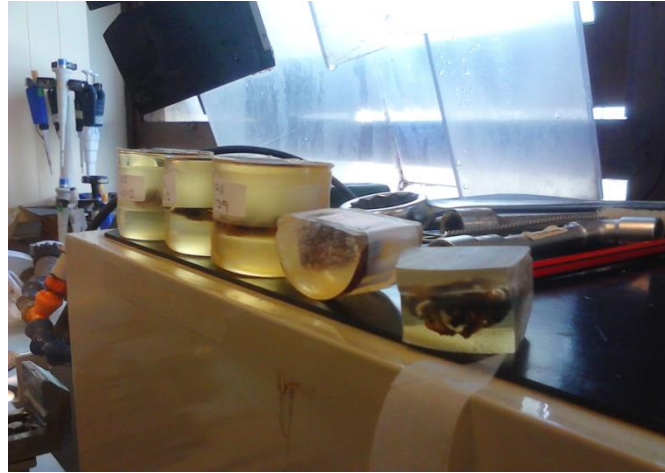


Fig. 44: Inclusión y polimerización en bloques.

5.2.4.1.5.- Tallado;

Previo fresado 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 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, (Fig. 45);



Fig. 45: Corte y tallado de los bloques en sierra hidráulica.

5.2.4.1.6.- 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, (Fig. 46);



Fig. 46: Pulido en lijadora de disco.

5.2.4.1.7.- 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 μ de espesor a nivel de la zona medial del defecto óseo de cada muestra (para minimizar la varianza intermuestral), en series de 10 sobre portamuestras de cristal pretratados con albúmina y fijados con etanol de 80°, (Fig. 47).



Fig. 47: 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 48;



Fig.48: Almacenaje de muestras.

5.2.4.1.8.- 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 10 minutos cada uno, y un baño en agua destilada durante cinco minutos.

5.2.4.2.- 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:

5.2.5.- *Estudio morfométrico.*

5.2.5.1.- Evaluación cualitativa de la estructura y densidad ósea global de los defectos regenerados con las membranas de estudio (TiO₂/PLGA/P-O₂), 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 49;

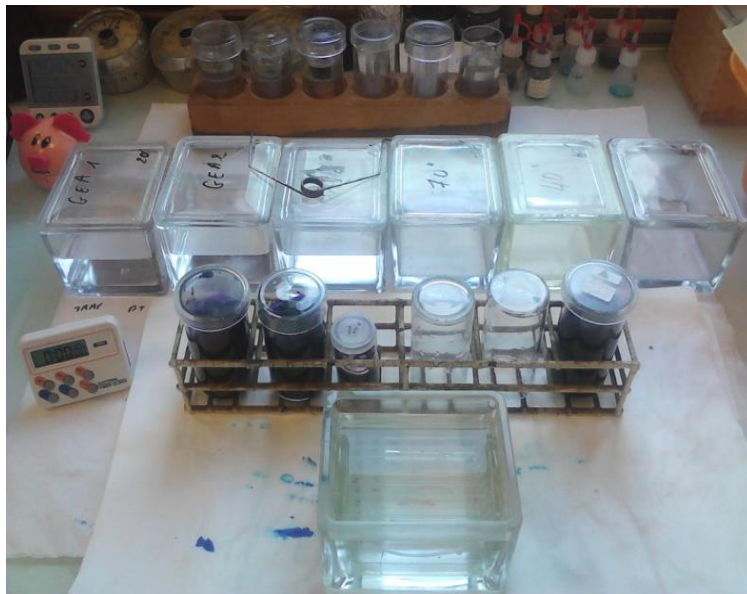


Fig. 49: Kit de coloración para azul de toluidina (BT).

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 50 se ilustra una imagen con el material empleado para el montaje.



Fig. 50: 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 6mm 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 (TiO₂/PLGA/P-O₂), frente a los controles (PLGA sencillo).

5.2.5.2.- 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 2.1 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), (Fig. 51).



Fig. 51: 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 11mm (para cada defecto) y de 5mm (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.).

5.2.5.3.- 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 1 y 8 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), (Fig. 51).

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 1 y 8 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.

5.2.5.4.- Actividad resorptiva (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;

- 10mg de naftol ASTR fosfato (SIGMA N-600; Sigma-Aldrich, EE.UU.)
- 50µl de NN dimetilformamida
- 10ml de tampón acetato de sodio anhidro (SIGMA S-2889; Sigma-Aldrich, EE.UU.) 0,1M en agua destilada, y mezclado con 100µl de ácido acético glacial (en campana de gases).
- 2x 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, (fig 52).



Fig.52: 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 resorptiva 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 (11mm), y del hueso original (5mm), lo que nos permitió valorar objetivamente el nivel resorptivo aproximado del tejido analizado.

Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio óptico “*Zeis 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), (Fig. 51).

5.2.5.5.- 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 marcador 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 10 minutos en una disolución de Tris-Triton al 0,1% mezclado previamente durante cinco horas, y elaborado mediante 5ml de Triton X-100 + 45 ml de Tris 0,1M (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Seguidamente se enjuagaron las láminas en tampón Tris 0,1M 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 0,1M a ph 9 (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

El montaje de estas láminas se efectuó de la misma manera que en el apartado 2.4. 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 “*Zeis 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), (Fig. 51).

5.2.6.- 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 TiO₂/PLGA+ P-O₂ 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 (fig. 53-55).

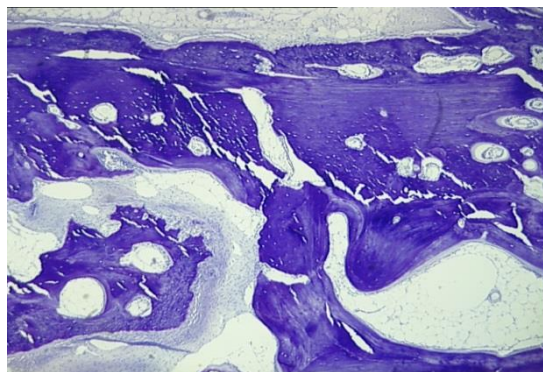


Fig. 53: Coloración BT en hueso original. Zonas marginales del defecto. Objetivo 5x. Zoom 1,5

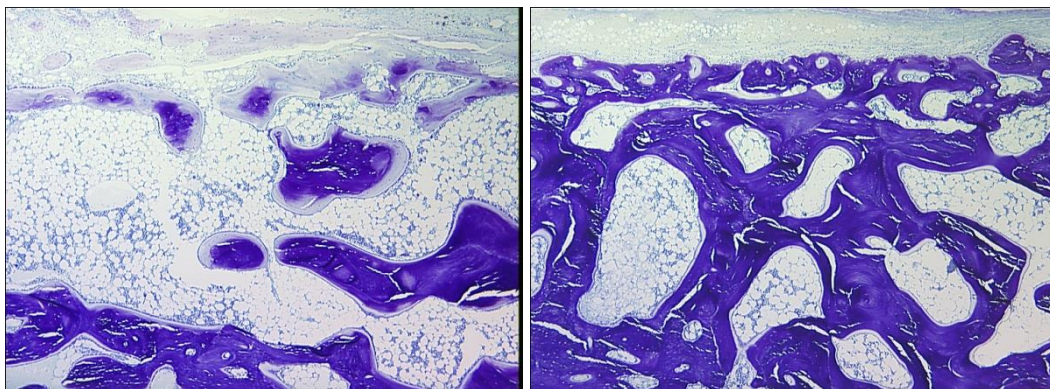


Fig.54: Imagen a BT Control PLGA. Zoom 1,5. Fig.55: Imagen de BT del grupo de estudio. Zoom 1,5

2.2.- 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 TiO₂/PLGA+P-O₂, 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 45,67% ± 6,07 en las membranas funcionalizadas de estudio, frente a un 30,57% ± 1,96 en las membranas control (fig. 56 y 57) ($p < 0,05$).

Así mismo, los datos de las membranas funcionalizadas con titanio 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 +3,05% ± 10,4) frente al -12,03% ± 5,1) de los controles, respectivamente ($p < 0,05$) (Tabla 3).

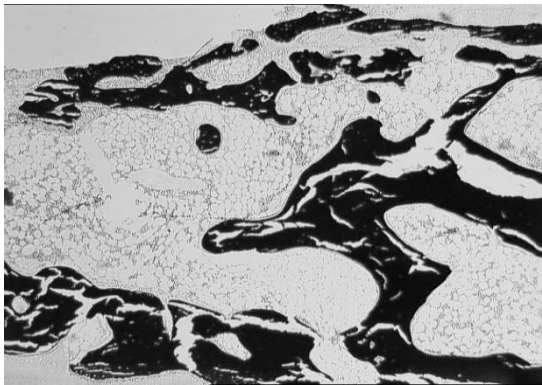


Fig. 56: Imágenes de VK en defectos control. 4x

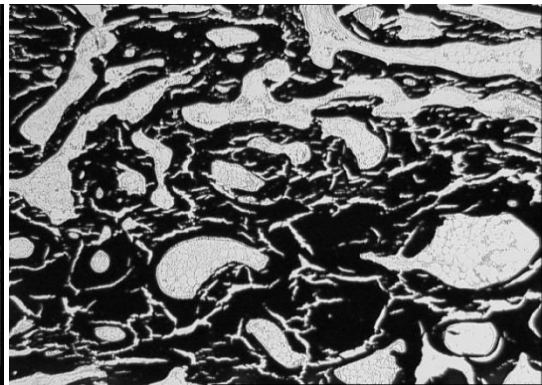
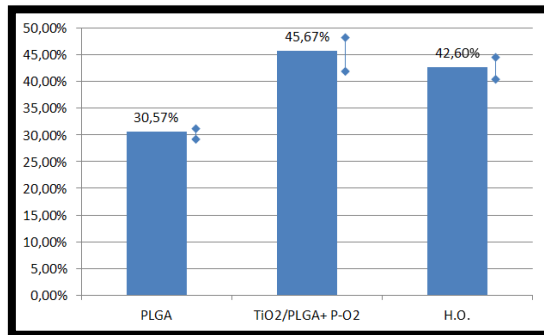


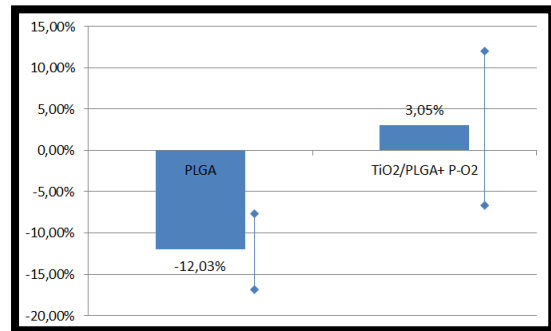
Fig.57: Imágenes de VK en defectos de estudio. Objetivo 4x.Zoom 1,5

% ÓSEO NEOFORMADO	PLGA (CONTROL)	TiO ₂ /PLGA+ P-O ₂	H.O
MEDIA	30,57 % ± 1,96	45,67 % ± 6,07	42,6 % ± 3,95
DIFERENCIA (H.O - H.N)	-12,03 % ± 5.1	+3,05 % ± 10,4	

Tabla.3: Porcentaje óseo neoformado. Diferencias respecto al nivel de hueso original. 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.



Gráfica.1: Porcentaje óseo regenerado medio tras 1 mes de regeneración en ambos tipos de defectos y en hueso original. En las comparaciones entre grupo control experimental y entre control y hueso original se obtuvo $p < 0,05$.



Gráfica.2: Diferencias entre el hueso original y el hueso neoformado en cada tipo de tratamiento respecto al original. En las comparaciones entre grupo experimental se obtuvo $p < 0,05$.

2.3.- 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 TiO₂/PLGA+P-O₂ (0,061 mm/día \pm 0,08), frente a las membranas control (0,032 mm/día \pm 0,01), (fig 58 y 59). Los datos semanales son de 0,427 mm/sem. \pm 0,01 y de 0,224 mm/sem. \pm 0,01 respectivamente ($p < 0,05$) (Tabla 4).

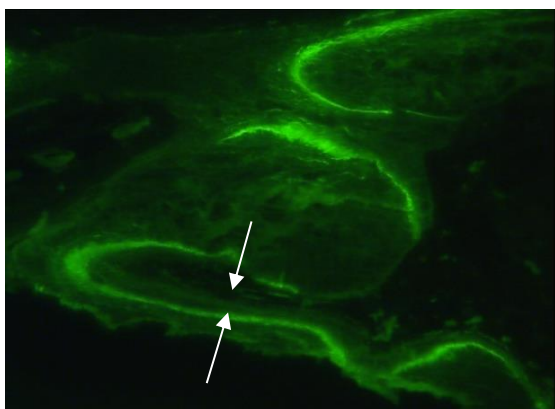


Fig. 58: Imágenes de la calceína. Grupo control. 20x

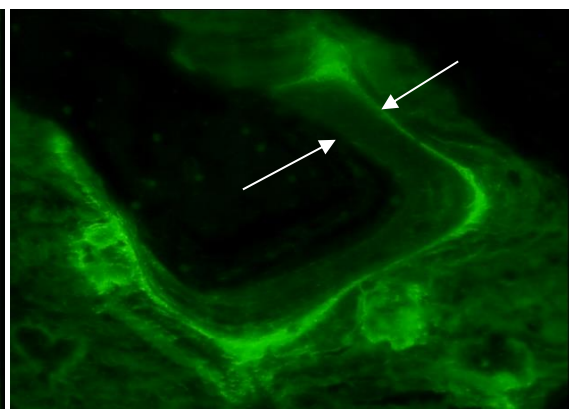
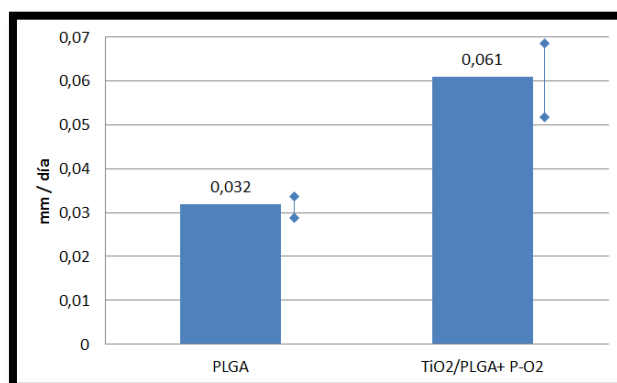


Fig. 59: Imágenes de la calceína. Grupo TiO₂/PLGA+P-O₂. Objetivo 20x. Zoom 1,5.

Mm hueso / día	PLGA (CONTROL)	TiO ₂ /PLGA + P-O ₂
Media (mm/día)	0,032 mm/día ± 0,005	0,061 mm/día ± 0,017

Tabla. 4: Milímetros de hueso neoformado por día respecto al control. En las comparaciones entre grupo experimental y control se obtuvo $p < 0,05$.



Gráfica.3: Milímetros de hueso neoformado por día en cada grupo. En las comparaciones entre grupo experimental y control se obtuvo $p < 0,05$.

2.4.- 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 TiO₂/PLGA+P-O₂ con valores de 15,13 Oc/mm ± 1,6 frente a 9,21 Oc/mm ± 0,6 en las membranas control, como se muestra en las figuras 60 y 61.

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 titanio y plasma de oxígeno, con un resultado de -6,37 Oc/mm ± 3,3 frente a -12,29 Oc/mm ± 1,1 en los controles con PLGA sencillo ($p < 0,005$) (Tabla 5).



Fig. 60: Imágenes de la TRAP, Control PLGA. 4x

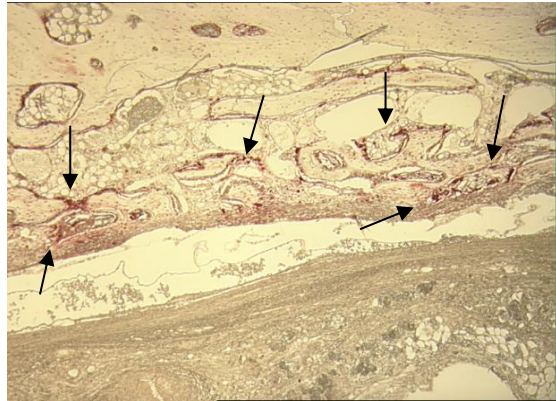
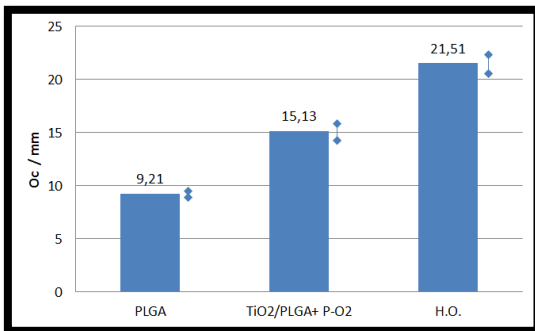


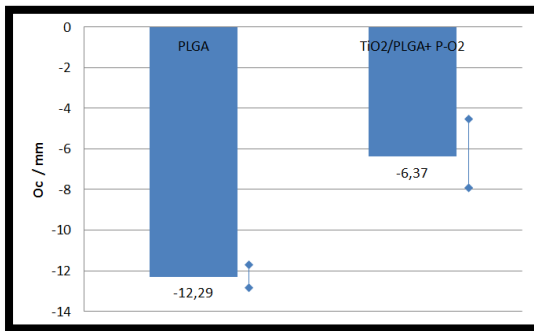
Fig. 61: Imágenes de la TRAP. TiO2/PLGA+P-O2. Objetivo 4x.

Oc / mm	PLGA (CONTROL)	TiO2/PLGA + P-O2	H.O
MEDIA	9,21 Oc/mm ± 0,6	15,13 Oc/mm ± 1,6	21,51 Oc/mm ± 1,8
DIFERENCIA (H.O - H.N)	- 12,29 Oc/mm ± 1,1	- 6,37 Oc/mm ± 3,3	

Tabla. 5: Osteoclastos por milímetro. Diferencias entre el número medio de osteoclastos por milímetro respecto al hueso original. H.O: Hueso Original; H.N: Hueso Neoformado. En todas las comparaciones se obtuvo $p < 0,05$.



Gráfica.4: N° de osteoclastos por milímetro en cada grupo y en el hueso original. En todas las comparaciones se obtuvo $p < 0,05$.



Gráfica.5: Diferencias entre el nivel resorptivo global del hueso original y el neoformado en cada grupo. En las comparaciones entre grupo control y experimental se obtuvo $p < 0,05$.

2.5.- 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 62 y 63.

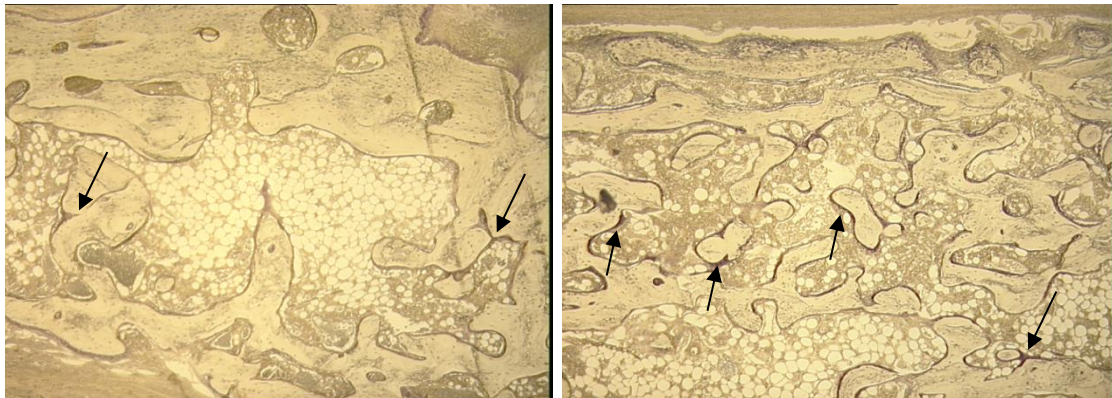


Fig. 62: Imágenes de la ALP, Control PLGA. 4x

Fig.63: Imágenes de la ALP. Grupo TiO₂/PLGA+P-O₂.
Objetivo 4x.

7. DISCUSIÓN

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 (23,31). 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 (19,20).

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 (2).

Comparado con otros métodos tradicionales, la ingeniería de tejido óseo ofrece un nuevo enfoque interesante en reparación ósea, y la multitud de biomateriales desarrollados hasta la fecha aporta un gran avance a todas las áreas de alta demanda donde uno o varios tejidos son deficitarios. Unos de estos biomateriales de elección es el ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA), un tipo de polímero biocompatible, que se degrada por simple hidrólisis y que está aprobado por la FDA (*Food and Drugs Administration*, EE.UU.) para multitud de aplicaciones, por lo que son utilizados comúnmente en investigaciones biomédicas (9).

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, y aunque se han demostrado sus cualidades para permitir osteoconducción y osteogénesis *in vitro*, queda evidente la necesidad de examinar su biocompatibilidad a largo tiempo *in vivo* (16).

Además de sus propiedades mecánicas, 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 (17). El test mecánico también debe de 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 (19).

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 a modo de membranas *scaffolds* modificadas a escala nanométrica con óxido de titanio, y pretratadas físicamente con plasma de oxígeno 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 (67).

Finalmente, 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.

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 algunas ligeras, con otras experiencias, ayudando a valorar la mejora que hemos obtenido en nuestra innovación. Por dicha razón podemos afirmar que el uso de la calota ha sido acreditado en numerosos estudios, y presenta importante ventajas frente a otras localizaciones de la economía 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 pequeños-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 (1, 2, 4, 49).

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.

En nuestro modelo de estudio comparativo se usaron matrices *scaffolds* 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 técnicas de histomorfometría, en las variantes aplicadas al tejido óseo, han demostrado su idoneidad para llevar a cabo este objetivo, desarrollado y contrastado con un análisis estadístico profundo, significativo, y con una valoración completa.

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, las características de la superficie son también muy influyentes en el paso de un biomaterial a un medio ambiente biológico 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 (3, 61-65).

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.

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 (62).

Respecto al grosor del tejido neoformado, se observa un espesor 1,5 veces mayor y más estructurado en los defectos reparados con membranas de TiO₂/PLGA+P-O₂ frente al defecto reparado con membrana sin modificaciones, que además tiene un alto contenido de tejido fibroso.

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 (27, 56, 61-63).

No se observan signos claros de inflamación anormal en ninguno de los casos de estudio, por lo que queda confirmada la biocompatibilidad de estas membranas en regeneración ósea guiada.

Tomando en cuenta el nivel de hueso neoformado respecto al control sin membrana y al hueso original preexistente en la calota, la membrana con nanocomposites de óxido de titanio y pretratamiento con plasma de oxígeno la de mayor potencial oseoregenerador (79).

Pasadas cuatro semanas tras la implantación, el proceso de sellado óseo sigue aún en proceso, y el proceso de remodelado empieza a hacerse notable, observándose degradación del material antiguo y deposición de nuevo hueso, implicando la presencia de poblaciones de células especializadas trabajando en compartimentos diferentes pero muy cercanos. En aquellos defectos tratados con membranas de TiO₂/PLGA + P-O₂, el

proceso de sellado y regenerado se observó completo prácticamente en la mayoría de las muestras. En estos casos también se observó 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)) (76-78).

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 (62).

Por tanto, el tratamiento con plasma de oxígeno (P-O₂) en las membranas de este trabajo parece aumentar la capacidad osteoinductora de las mismas, impulsada por los nanocomposites de óxido de titanio, dato que queda respaldado también en los análisis de la fosfatasa ácida (TRAP).

Las matrices de poliláctico-co-poliglicólico en forma de membranas de PLGA han resultado de fácil manejo y manipulación. Así mismo, no se observaron 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 en regeneración ósea guiada in situ (3, 63, 64).

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.

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 (35-38).

La investigación sobre la regeneración ósea debe orientarse hacia el intercambio fructífero entre las disciplinas que cooperan con la ingeniería de tejidos, que está muy cerca de allanar los problemas de implantación y restauración de la funcionalidad del tejido óseo. Superar el reto redundaría en el beneficio de una gran parte de la población y en una enorme mejoría de su calidad de vida.

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. Estos materiales han ofrecido 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 su relativa hidrofobicidad, la cual le confiere una cierta solubilidad y 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 (4-8, 12-15).

Este tipo de biomateriales poliméricos reabsorbibles como el PLGA y sus derivados funcionalizados están siendo modificados y desarrollados para multitud de líneas de investigación con aplicaciones biomédicas y clínicas de gran importancia mundial, y elevada demanda, además de para RTG y ROG, tales como;

- Tratamientos cardiovasculares y endoteliales (arteriosclerosis...).
- Tratamiento del cáncer.

-
- Tratamiento de artritis.
 - Enfermedades inmunitarias
 - Difusión de vacunas.
 - Terapias génicas (diabetes...).
 - Enfermedad inflamatoria intestinal.
 - *Brain Imaging*.
 - Terapia farmacéutica (control de localización inteligente y difusión selectiva de fármacos, control del dolor, control hormonal, anticonceptivos...).
 - Dispositivos biomédicos.
 - Dispositivos ortopédicos.
 - Cirugía estética.

Dentro de las múltiples aplicaciones de los polímeros cabe mencionar la de formar parte de biosensores. Se tratan de dispositivos capaces de reconocer señales químicas, con una superficie modificada de moléculas que pueden interaccionar de forma específica con el medio biológico.

Las adaptaciones de las superficies constituyen una línea de investigación importante en diferentes campos, como el de la medicina cardiovascular. En este caso, el objetivo es incrementar la compatibilidad con la sangre de los materiales en contacto con ella, disminuyendo el daño a los componentes sanguíneos. Las superficies modificadas también tienen importancia en neurología, en particular en la búsqueda de recubrimientos poliméricos para microelectrodos que permitan una adhesión selectiva de estos al tejido nervioso asegurando un buen contacto que facilite la efectiva transmisión de señales eléctricas (13-17, 21).

Otras aplicaciones son los dispositivos para la liberación de drogas, que permiten la administración de un fármaco de manera localizada y controlada en el lugar donde debe ejercer su acción.

En este sentido, se han creado dispositivos que incorporan una droga en una matriz bioreabsorbible, lo que hace que la liberación y consiguiente disponibilidad de la sustancia esté determinada por la velocidad con que se degrada el polímero que la contiene. Así mismo, como se comentó más arriba, en el ámbito de la ingeniería tisular se ha extendido el uso de estos polímeros como soporte para el implante de células vivas. En el campo de los órganos artificiales, destacan las investigaciones orientadas a retener células hepáticas o pancreáticas dentro de soportes formados por polímeros. Esto permite por un lado la función normal de las células y por otro, la protección de ellas contra el ataque del sistema inmune.

El uso de materiales como soporte de células también tiene un claro ejemplo en cardiología, donde se busca obtener prótesis vasculares en cuya superficie interna se puedan fijar las células endoteliales, lo que no se ha logrado aún con las actuales prótesis comerciales. Recuérdese que, en condiciones fisiológicas, las células endoteliales son las que tapizan la superficie interna de los vasos sanguíneos y del corazón, y constituyen por lo tanto el material biológico que está en contacto directo con la sangre.

El área de la ortopedia es otra de las más estudiadas, de forma particular en la fijación de fracturas, con ventajas patentes frente a los implantes metálicos. Esto es debido a que las características biorreabsorbibles de los biomateriales evita el trauma de una segunda operación para extraer el dispositivo metálico, una vez que se ha soldado la fractura.

Los polímeros también se usan para paliar una complicación común en las intervenciones quirúrgicas: la aparición de adherencias entre diferentes tejidos u órganos vecinos. Ello puede ocasionar trastornos más graves que el que causó la operación. Es común tras una intervención quirúrgica sencilla, como por ejemplo la extirpación de un quiste de ovario, que el tejido manipulado se adhiera a los tejidos de órganos circundantes. Estas adherencias pueden, por ejemplo, impedir la libertad de movimiento del intestino delgado y dar lugar a obstrucciones intestinales (69-76).

Para prevenir la aparición de las adherencias postoperatorias, se están desarrollando delgadas películas de polímeros, en la mayoría de los casos bioabsorbibles, las cuales al evitar el contacto entre diferentes tejidos durante la fase postoperatoria, impiden la generación de adherencias.

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, 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:

- Acortamiento de la extremidad, el aporte de hueso autólogo no vascularizado.
- La osteogénesis por distracción así como la transposición de hueso vascularizado.
- Aloinjertos.

Sin embargo, actualmente también se han descrito sistemas de relleno con cajas de titanio así como sustitutivos óseos sintéticos.

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 en un 174%, mientras 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 (52-66).

Todo ello demuestra, en definitiva, no solo 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 su continuo desarrollo de estas modificaciones promete grandes e interesantes expectativas.

8. CONCLUSIONES

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

1. Las membranas de ácido poliláctico-co-poliglicólico modificadas a escala nanométrica con óxido de titanio y pretratamiento físico de plasma de oxígeno (TiO₂/PLGA +P-O₂), 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 titanio 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.

3. No se han observado signos claros 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 estudiadas en regeneración ósea guiada en humanos.

9. ANEXOS

ANEXO I

AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA



A quien pueda interesar:

El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, habiendo examinado el Proyecto “Nanocomposites de Óxido de Titanio en Membranas Scaffold de PLGA en Regeneración Ósea Guiada” presentado por D. Daniel Torres Lagares emite el siguiente informe,

El proyecto cumple los requisitos exigidos para experimentación en sujetos humanos y en animales, y se ajusta a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Sevilla, a 05 de mayo de 2012.

EL PRESIDENTE DEL COMITE,

Fdo.: Prof. Dr. Fernando Rodríguez Fernández.

ANEXO II

DOCTORADO EUROPEO

RÉSUMÉ

Ce projet de thèse vise à évaluer une nouvelle membrane biopolymérique artificielle d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) modifiée par l'oxyde de titane (TiO₂), construit à l'échelle nanométrique, pour promouvoir la ostéoinduction, et un prétraitement physique du plasma d'oxygène (P-O₂) pour favoriser l'intégration tissulaire et sa dégradation dans le nouveau tissu en formation chez le lapin. Ces membranes sont connu pour être biocompatibles, résorbables, et exercent une barrière pour empêcher la colonisation de l'espace par le tissu adjacent et son interférence avec la formation d'os au cours du processus de réparation.

Dans l'introduction de cette étude, nous passerons en revue les différents matériaux utilisés en biomédecine, les modifications moléculaires et ses techniques de fabrication utilisés en ingénierie tissulaire au cours des 25 dernières années. Les perspectives et les applications actuelles dans le domaine biomédical, plus spécifiquement dans la régénération guidée des tissus osseux.

Une fois documenté et justifié le thème du projet en tant que matériaux, les techniques et les animaux de laboratoire d'essais, nous commençons l'étude centrale de la thèse, avec un plus gros test de régénération osseuse guidée *in vivo* avec les membranes modifiées (TiO₂/PLGA + P-O₂) par rapport aux témoins (PLGA simple), dans les trous osseux non auto-cicatrisants de 11 mm de diamètre (deux pour tette), générés chirurgicalement dans l'os frontal de la coquille de quatre lapins de la même course. Les sacrifices des animaux ont été réalisés un mois de repos après l'acte chirurgical.

Pour comparer l'effet potentiel ostéoinducteur et ostéoconducteur potentielle de ces matrices nous avons fait un analyse histomorphométrique quantitative du pourcentage

d'os néoformé avec Von Kossa (nitrate d'argent), une comparaison qualitative de la structure intégrale et la densité de tissu osseuse régénéré (osteoïde, médulle adipocytes et présence ou pas de inflammation anormale) avec bleu de toluidine, un étude quantitative du le niveau de résorption osseuse (ostéoclast pour millimètre) avec la TRAP, une comparaison du la présence normal de apposition ostéoblastique avec la ALP, et un analyse quantitative de les millimètres par jour d'os néoformé avec la calcéïne, puis un mois de régénération, par rapport aux témoins. Après tester l'influence et avantages de ces membranes dans la régénération osseuse chez les mammifères, nous avons obtenu de bien meilleurs et plus élevée résultats de l'efficacité dans les membranes de l'étude par rapport aux témoins pour tous les variables étudiés.

Le dernier but de ce projet est de créer une membrane artificielle résorbable modifiée à l'échèle nanométrique, puis testé *in vivo*, pour évaluer sa viabilité et possible utilisation en avance á des essais cliniques de régénération osseuse guidée (GBR) chez l'homme dans un avenir proche.

HYPOTHÈSES

1.- Les défauts osseux régénérés avec des membranes résorbables d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA), modifiées à l'échelle nanométrique avec l'oxyde de titane (TiO₂) et un prétraitement physique par plasma d'oxygène (P-O₂), génèrent une plus grande proportion d'os nouveau, par comparaison *in vivo* aux témoins avec PLGA simple, chez les lapins.

2.- Ces membranes de polylactique sont stables et biocompatible lorsqu'elles sont testées *in vivo* et sans un processus inflammatoire dans le tissu osseux lorsqu'elles sont implantées par des techniques chirurgicales de régénération osseuse guidée (GBR).

OBJECTIFS

1. Objectif général:

Étudier la capacité de régénération osseuse *in vivo* des membranes PLGA modifiées à l'échelle nanométrique avec des composites d'oxyde de titane (TiO₂) et prétraitées physiquement avec plasma d'oxygène (P-O₂), lors de tests dans des défauts osseux chirurgicaux chez les lapins de race Nouvelle-Zélande, un mois de cicatrisation après une intervention chirurgicale.

2. Objectifs spécifiques:

2.1 Evaluer qualitativement la structure et la densité osseuse globale dans ces membranes (TiO₂/PLGA/P-O₂), par rapport aux témoins (PLGA simple).

2.2 Comparer quantitativement le niveau de régénération osseuse (pourcentage d'os néoformé) pour les membranes d'étude, par rapport aux témoins.

2.3 Comparer quantitativement la surface osseuse minéralisée, (millimètre pour jour), formée pour ces membranes dans chaque trou par rapport aux témoins.

2.4 Comparer quantitativement l'activité de résorption osseuse, (ostéoclast pour millimètre), de chaque trou régénéré pour ces membranes, par rapport aux témoins.

2.5 Evaluer qualitativement la présence normale d'apposition (activité ostéoblastique) entre les trous régénérés avec des membranes PLGA simples par rapport aux témoins.

Le dernier but de ce projet est de faciliter le développement coordonné d'une membrane biopolimérique artificielle, modifiée à l'échelle nanométrique avec d'oxyde de titane et du plasma d'oxygène, ce qui prouve sa viabilité et les avantages à la réparation des tissus osseux animal *in vivo*. En avance à des études cliniques pour être utilisé dans un avenir proche en (GBR) chez l'homme.

CONCLUSIONS

Les conclusions obtenues dans notre étude, sur la base des études d'expérimentation animale *in vivo* dans des lapins une race New-Zeland au moyen des essais de régénération osseuse guidée (ROG) réalisés sont les suivantes:

1. Les membranes d'acide polilactique-co-poliglicolique modifiées à une échelle nanométrique avec oxyde de titane et pre-traitement avec plasma d'oxygène (TiO₂/PLGA +P-O₂), dans une comparaison aux contrôles sans ces modifications (PLGA simple), ils présentent un rendement plus adéquat, en diminuant remarquablement les différences structurelles des défauts cicatrisés et étudiés un mois après l'intervention chirurgicale par rapport à l'os original préexistant, dans ce groupe en face du groupe contrôle.

2. L'ajout de nanocomposites d'oxyde de titane avec le pre-traitement de plasma d'oxygène aux membranes simples de PLGA a comme effet, montré clairement dans les résultats de notre étude, une augmentation de la capacité régénératrice du tissu osseux dans les défauts étudiés.

3. De clairs signes d'inflammation des tissus anormale n'ont pas été observés, ainsi que des réaction allergique ou incompatibilité physique ou chimique d'aucun type dans les échantillons analysés, par ce qu'il peut prendre appui que les membranes étudiées sont biocompatibles avec le tissu osseux sur celui qui a été utilisé.

4. À la suite de nos résultats, la réalisation d'études futures est conseillée pour avancer dans une application possible des membranes étudiées dans une régénération osseuse guidée chez des humains.

10. REFERENCIAS

1. 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 Mar; 84(3): 702-9.
2. 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(1): 4-16.
3. 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(2): 1088/1748-6041.
4. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. Review. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32(3):477-86.
5. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosemberg E, Sanavi F. GTR in degree II furcation-involved mandibular molars: a clinical study. *J Clin Periodontol*. 1982; 15:247-254.
6. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1996; 47: 256-260.
7. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol*. 1980; 7: 96-105.
8. 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.
9. Testut L, Latarjet A. *Tratado de Anatomía Humana (actualización 2012)*. Salvat editores. Barcelona, España. 1971. 2012; 2: 1031-1098.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Caton J, Wagener C, Polson A, Nyman S, Frantz B, Bowers O. GTR in interproximal defects in the monkey. *Int J Periodont Rest Dent.* 1992; 12: 267-277.
14. Boos AM, Arkudas A, Knese U, Horch RE, Beier JP. Bone tissue engineering for bone defect therapy. *Hand Mikrochir Plast Chir.* 2010; 42(6): 360-8.
15. Hild N, Schneider O, Mohn D, Muller R, Stark W. Two-layer membranes of calcium phosphate/collagen/PLGA nanofibres: In vitro biomineralisation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal Royal Society of Chemistry* 2011, *Nanoscale.* 2011; 3: 401-409.
16. 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.
17. Scantlebury TV. A decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1993; 64: 1129-1137.
18. Huttmacher 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: 668-678.
19. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontal.* 1986; 13: 604-616.
20. Becker W, Becker B, Prichard J. A surgical and suturing method: three case report", *Journal of Periodontics.* 1987; 12: 816-819.

21. Pontoriero R, Nyman S, Lindhe J, Rosenberg E, Sanavi F. Guided Tissue Regeneration in the treatment of furcation defects in man”, en *Journal of Clinical Periodontal*. 1987; 14: 618-620.
22. Winter G. Transcutaneous Implants: Reaction of the skin – implant interface. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994; 5: 99-133.
23. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol*. 1988; 59: 589-594.
24. 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: 718-723.
25. 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.
26. 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: 175-181.
27. Galgut P, Potrola R, Waite I. Histologic evaluation of biodegradable and non degradable membrane placed transcutaneously in rats. *J Clin Periodontol*. 1991; 18: 581-585.
28. 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: 605-609.
29. Caffesse RG, Nasjleti CE, Morrison EC, Sanchez R. GTR : Comparison of absorbable and nonabsorbable membrana in dogs. *J Dent Res*. 1994; 73: 380-381.
30. 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: 1787-1797.

31. Dalby M.J. Topographically induced direct cell mechanotransduction. *Med Eng Phys.* 2005; 27: 730-742.
32. Kikuchi L., Park J. Y, Victor C, Davies J.E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. *Biomaterials.* 2005; 26: 5285-5295.
33. 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: 1175–1185.
34. 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: 62-66.
35. Zimmerman B, Volberg T, Geiger B. Early Molecular Events in the Assembly of the Focal Adhesion-Stress Fiber Complex during Fibroblast Spreading. *Cell Mot. Cytoskeleton.* 2004; 58: 143–159.
36. 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.
37. 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(11): 2671-8.
38. Schwarz U.S, Bischofs I.B. Physical determinants of cell organization in soft media. *Med. Eng. Phys.* 2005; 27: 763–772.
39. 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: 273–282.
40. Cavalcanti-Adam E.A, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz J.P. Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands. *Biophys J.* 2007; 92: 2964–2974.

41. Davies J.E. Understandig peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003; 67(8): 932-949.
42. Park B.S, Heo S.J, Kim C.S, Oh J.E, Kim J.M, Lee G, et al. (2005). 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: 640-651.
43. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000; 21(7): 667-681.
44. Rouahi M, Champion E, Hardouin P, Anselme K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopedic materials. *Biomaterials.* 2006; 27: 2829–2844.
45. Ivanoff C. J, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(2): 128-134.
46. Keller J.C, Schneider G.B, Stanford C.M, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant.Dent.* 2003; 12: 175-181.
47. 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.
48. Papalexiou V, Novaes A.B.Jr, Grisi M.F, Souza S.S, Taba M.Jr, Kajiwara 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.
49. 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(6): 667-675.
50. 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.

-
51. 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(3): 197-213.
 52. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur Cell Mater.* 2008; 2(15): 100-14.
 53. Maréchal M, Eyckmans J, Schrooten J, Schepers E, Luyten FP, Van Steenberghe D. 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(5): 896-904.
 54. 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(6): 378-82.
 55. 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(4): 980-85.
 56. 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(5): 1137-47.
 57. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008; 58(5): 424-30.
 58. 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.
 59. 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(1): 137-45.

-
60. 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(8): 802-7.
 61. 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(2): 199-208.
 62. 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.
 63. 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.
 64. 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.
 65. 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(1): 137-45.
 66. Fuchs RK, Faillace ME, Allen MR, Phipps RJ, Miller LM, Burr DB. Bisphosphonates do not alter the rate of secondary mineralization. *Bone.* 2011; 49(4): 701-5.
 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 (8): 106-16.

-
68. 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.
69. Heidemann W, Jeschkeit-Schubbert S, Ruffieux K, Fischer JH, Jung H, Krueger G, et al. pH-stabilization of predegraded PDLA by an admixture of water-soluble sodiumhydrogenphosphate – results of an in vitro- and in vivo study. *Biomaterials*. 2002; 23(17): 3567–74.
70. 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(3): 673-8.
71. Lin CH, Dong Q-S, Wang L, Zhang J-R, Wu L, Liu B-L. Dental implants with the periodontium: A new approach for the restoration of missing teeth. *Medical Hypotheses*. 2009; 72: 58–61.
72. Christophh. F, Karing H, Karing T. Guided bone regeneration at oral plant sites. *Periodontology*. 2000; 17: 151-175.
73. 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: 725–735.
74. 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(3): 472-513.
75. 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: 604-616.
76. Escobar, G, Vasseur O. Métodos histológicos aplicables al Estudio de Tejidos. Facultad de Medicina U. de A. Medellín. 1996; 1ª edición.
77. Childers JR, Ellwood SC. Partial chondrectomy and subchondral bone drilling chondromalacia. *Clin Orthop*. 1979; 144: 114-120.

-
78. 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: 288-296.
 79. 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(5): 688-98.
 80. Emsley J. *Nature's Building Blocks, An A-Z guide to elements*. Popular sciences, Oxford. 2003; 4-65.
 81. López-Santos C, Yubero F, Cotrino J, Barranco A, González-Elipse A.R. Plasmas and atom beam activation of the surface of polymers. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2008; 225-309.
 82. Borrás A, Cotrino J, Agustín R. González-Elipse A.R. Type of Plasmas and Microstructures of TiO₂ Thin Films Prepared by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition.. *Journal of the Electrochemical Society*. 2007; 154(12): 152-157.
 83. Barranco A, Cotrino J, Yubero F, Espinós J.P, Benítez J, Clerc C, González-Elipse A.R. Síntesis of SiO₂ and SiO_xCyHz thin films by microwave plasma CVD. *Thin Sol. Films*. 2001; 150-158.
 84. 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): 21-25.
 85. 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