



**Universidad
de La Laguna**

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia
Universidad de La Laguna

ARACELI DELGADO HERNÁNDEZ y CARMEN M^a ÉVORA GARCÍA, Profesora Titular y Catedrática del área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de La Laguna, certifican que:

la presente memoria, titulada **“Matrices bioactivas para regeneración ósea”** y presentada por D. Carlos del Rosario Rabadán, ha sido realizada bajo su dirección conjunta, en los laboratorios de la U.D.E. de Tecnología Farmacéutica de este Departamento y, una vez concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste y surta a los efectos oportunos, firman el presente certificado en La Laguna a 24 de agosto de 2015.

Dra. Araceli Delgado Hernández

Dra. Carmen M^a Évora García

Esta tesis ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (Estructuras porosas bioactivas para regeneración ósea - MAT2011-23819) y por Hospiten Holding S.L. (Convenio CI02320701).

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, Carmen Évora y Araceli Delgado, por su trabajo y dedicación durante estos cuatro años.

A mis compañeros de laboratorio, Ricardo y María, por su compañía y ayuda.

A Mabel Soriano, Ana Santoveñas, Pepe Fariña, Esther Sánchez, Alexis Oliva, Obdulía Munguía y Matías Llabrés, por su simpatía y apoyo.

A María Rosa, Juan Carlos, Jordi, Jorge, Antonio, Mario y Cande, por su ayuda y compañía en el Estabulario de la ULL.

A Juan Luis y al Servicio de Microscopía Electrónica de la ULL.

A Alejandro, a Alberto y al Servicio de Microscopía de Fuerza Atómica de la ULL.

A Javier, del Instituto Tecnológico de Canarias, por su ayuda en el desarrollo de matrices que nunca conseguimos.

A Carmen Álvarez y Susana Simões, de la Universidad de Santiago de Compostela, por su trabajo y colaboración.

A Margarita de la Rosa y Diego Molina, por el buen ambiente.

A Idaimis y Cristi, por dejar todo lo que tocaba como si fuese nuevo.

Pero sobre todo, me gustaría agradecerle a Paula, a mis padres, a mis hermanos, primos, tíos, cuñadas y sobrinos, el apoyo y los ánimos para poder llegar hasta aquí.

A mi Abuela, por interesarse cada día que me veía, por el estado de las decapitaciones.

A mis amigos, por estar ahí siempre.

Y a la Farmacia Agua García, por “becarme” y “esponsorizarme”.

AFM: Microscopía de fuerza atómica
ALP: Fosfatasa alcalina
BMP: Proteína morfogenética ósea
BSA: Albúmina de suero bovino
CT: Tomografía computarizada
DCM: Diclorometano
DMEM: Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO: Dimetilsulfóxido
E: Módulo de Young
ECM: Matriz extracelular
EDX: Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X
EMA: Agencia Europea de Medicamentos
FBS: Suero bovino fetal
FDA: Food and Drug Administration
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
G': Módulo elástico o de carga
G'': Módulo viscoso o de pérdida
GF: Factor de crecimiento
GPC: Cromatografía de permeación en gel
HFIP: Hexafluoroisopropanol
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
IGF: Factor de crecimiento insulínico
Medio de cultivo primario: DMEM, β -glicerofosfato, ácido ascórbico y dexametasona
Medio fresco: DMEM, 4.5 g/L de glucosa, 20% de suero fetal bovino, 50 UI/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomina, y 200 mM de L-glutamina estable
MR: Moldeado robotizado
MSCs: Células mesenquimales
P: Porosidad

P127: Pluronic® F-127

PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEO-PPO: poli-(óxido de etileno)-poli-(óxido de propileno)

PFT: modo Peak Force Tapping™

PLGA: Ácido poli (láctico-co-glicólico)

ROI: Región de interés

RP: Prototipado rápido

RT: Temperatura ambiente

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SV: Simvastatina

T908: Tetronic® 908

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β

THF: Tetrahidrofurano

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

XRD: Difracción de rayos X

XTT: 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide

α-CD: α-Ciclodextrina

α-CPP: α-Pirofosfato cálcico

β-TCP: Fosfato β-tricálcico

ρ_{app}: Densidad aparente

ρ_{true}: Densidad real

RESUMEN DE LA MEMORIA	15
INTRODUCCIÓN GENERAL	19
BIBLIOGRAFÍA	32
OBJETIVOS GENERALES	45
CAPÍTULO 1.- SISTEMAS DE B-TCP CONTENIENDO BMP-2, PDGF Y MSCS PARA REGENERACIÓN ÓSEA	49
INTRODUCCIÓN	51
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	54
FABRICACIÓN Y ENSAMBLAJE DE LOS SISTEMAS	54
CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS P- Y AP-SCAFFOLD	56
MARCAJE DE LA BMP-2 CON ¹²⁵ I	57
DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE PDGF Y BMP-2 INCORPORADA EN LOS SISTEMAS P- Y AP-SCAFFOLD	58
CULTIVOS CELULARES	59
- Aislamiento de las MSCs de médula ósea de rata	59
- Siembra y cultivo de las MSCs en las matrices de β -TCP	59
- Ensayo de adherencia y viabilidad celular sobre las matrices de β -TCP	60
- Caracterización de las MSCs sembradas en las matrices	60
ENSAYOS IN VIVO	61
- Técnica quirúrgica	61
- Ensayos de cesión in vivo de los GFs	62
ENSAYOS DE DEGRADACIÓN IN VIVO DE LOS SISTEMAS P- Y AP-SCAFFOLD	64
EVALUACIÓN DEL TEJIDO REGENERADO	65
- Análisis macroscópico y radiológico	65
- Histología, inmunohistoquímica y evaluación histomorfométrica	65
- Análisis estadístico	66
RESULTADOS	67

CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS P- Y AP-SCAFFOLD	67
CULTIVOS CELULARES	71
ENSAYO DE CESIÓN IN VIVO DE LOS GFs	73
ENSAYO DE DEGRADACIÓN IN VIVO DE LOS SISTEMAS P- Y AP-SCAFFOLD	74
EVALUACIÓN DEL TEJIDO REGENERADO	75
- Análisis macroscópico y radiológico	75
- Evaluación histológica	78
- Evaluación histomorfométrica	87
DISCUSIÓN	91
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	98

CAPÍTULO 2.- GELES DE POLOXAMINA/CICLODEXTRINA CONTENIENDO BMP-2 Y SV COMO SISTEMAS PARA REGENERACIÓN ÓSEA **105**

INTRODUCCIÓN	107
OBJETIVOS	109
MATERIALES Y MÉTODOS	110
PREPARACIÓN DEL SISTEMA T	110
PREPARACIÓN DEL SISTEMA T-CD	110
CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS T Y T-CD	111
- Comportamiento viscoelástico	111
- Ensayos de cesión in vitro de la SV	111
ENSAYOS IN VIVO Y EVALUACIÓN DE TEJIDO REGENERADO	112
RESULTADOS	113
CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS SISTEMAS T Y T-CD	113
ENSAYOS DE CESIÓN IN VITRO DE LA SV	114
ENSAYO DE CESIÓN IN VIVO DE LA BMP-2	116
EVALUACIÓN DEL TEJIDO REGENERADO	117
- Análisis macroscópico	117
- Evaluación histológica e histomorfométrica	118
DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	126
BIBLIOGRAFÍA	127

CAPÍTULO 3.- TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA MICROESTRUCTURA Y NANOESTRUCTURA DEL HUESO REGENERADO	131
INTRODUCCIÓN	133
OJETIVOS	135
MATERIALES Y MÉTODOS	136
FABRICACIÓN Y ENSAMBLAJE DE LOS SISTEMAS Ms(50:50), S(50:50) Y S(75:25)	136
CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS Ms(50:50), S(50:50) Y S(75:25)	137
ENSAYOS IN VIVO	137
EVALUACIÓN DEL TEJIDO REGENERADO	137
- AFM	138
- EDX	139
RESULTADOS	140
CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS Ms(50:50), S(50:50) Y S(75:25)	140
ENSAYO DE CESIÓN IN VIVO	141
EVALUACIÓN DEL TEJIDO REGENERADO	142
- Análisis macroscópico y radiológico	142
- AFM	144
- Evaluación histológica	152
- Evaluación histomorfométrica	154
- EDX	155
DISCUSIÓN	156
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	160
DISCUSIÓN GENERAL	165
BIBLIOGRAFÍA	172
CONCLUSIONES	173
ANEXOS	177

Resumen de la memoria

En la presente tesis se diseñaron y elaboraron siete sistemas de diferente naturaleza conteniendo BMP-2 para regeneración ósea, utilizando como modelo un defecto crítico de 8 mm de diámetro en cráneo de rata.

- Dos de ellos consisten en sistemas concéntricos de 8 mm de diámetro externo, fabricados con β -TCP por moldeado robotizado (MR). Ambos presentan un orificio interno de 3 mm de diámetro donde se incorpora un comprimido de microesferas de PLGA 50:50 ó 75:25 conteniendo 6 μ g de BMP-2, pero sólo uno de ellos va recubierto con alginato para la incorporación de 250 ó 500 ng de PDGF. Además, los dos sistemas se combinan con células mesenquimales (MSCs) cultivadas durante 12 horas ó 3 semanas.

- Dos sistemas se caracterizan por ser estructuras inyectables tipo hidrogel: uno de ellos está únicamente compuesto por Tetronic® 908 (T908), mientras que el otro es una mezcla de éste último con α -Ciclodextrina (CD). Estos sistemas se combinan con 3 μ g ó 6 μ g de BMP-2, y con 7,5 μ g, 75 μ g ó 750 μ g de simvastatina (SV).

- Y otros tres sistemas están compuestos por microesferas de PLGA conteniendo 6 μ g de BMP-2 y dispersas en Pluronic® F-127 (P127): estudiamos dos sistemas de microesferas de PLGA 50:50 ó 75:25 tipo sándwich, con dos láminas de electrohilado elaboradas con el mismo polímero que las microesferas, así como un sistema de microesferas de PLGA 50:50 sin láminas de electrohilado.

Aunque no se observó sinergia alguna entre la BMP-2 y el PDGF o la SV, la combinación de ésta con MSCs incrementó el porcentaje de hueso regenerado con respecto a la BMP-2 en un 10 % tras 12 semanas de implantación. Por su parte, con BMP-2 se reparó el 60-80 % del defecto, en función de la dosis administrada y del sistema implantado.

Por último, los sistemas elaborados con microesferas y láminas de electrohilado se evaluaron por microscopía de fuerza atómica (AFM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX), obteniendo resultando similares y concordantes con los obtenidos por histología e histomorfometría.

Introducción general

El envejecimiento de la población mundial es uno de los cambios más significativos que se han presentado en las sociedades desarrolladas desde la segunda mitad del siglo XX. La alta esperanza de vida y el sedentarismo generalizado de la población, resulta en una progresiva disminución de la densidad ósea [Boskey y Coleman, 2010] y consecuentemente, en un aumento de su fragilidad [Cummings y Melton III, 2002]. Además, la pérdida de habilidades motoras asociada a la edad supone que pequeños golpes o caídas tengan consecuencias dramáticas. Por otro lado, las infecciones óseas son causa de necrosis y disfunción tisular, lo que hace necesario, en muchos casos, la resección parcial del hueso infectado [Baro et al., 2002]. Por último, los traumatismos o politraumatismos asociados a accidentes de tráfico, laborales o a deportes de riesgo, no dejan de crecer. Este aumento en la incidencia de fracturas óseas conlleva un alto coste sanitario: requieren de hospitalización, intervención quirúrgica, seguimiento y tratamiento continuado del paciente, y una disminución en la calidad de vida de los afectados [Johnell, 1997].

En condiciones fisiológicas el organismo está diseñado para eliminar las células dañadas y reemplazarlas por células nuevas y funcionales. Este proceso de renovación tisular está guiado por moléculas de señalización, tales como factores de crecimiento (GFs), y por la llegada de células progenitoras capaces de proporcionar un ambiente óptimo para su propia proliferación y su diferenciación en células específicas del tejido dañado [Yalcinkaya et al., 2014]. Inmediatamente después de una fractura ósea se activa un proceso fisiológico en el que las células son atraídas al lugar de la lesión para mediar el proceso inflamatorio y sustituir el hueso necrótico por nueva matriz ósea. En este momento, tanto la estructura ósea como el suministro vascular están alterados, por lo que el restablecimiento de vasos y la sustitución de los osteocitos muertos por células nuevas se hace fundamental.

La formación de hueso es una tarea ardua y compleja que se traduce en un largo periodo de tiempo en el que la capacidad estructural del órgano se ve comprometida. Tras

el hematoma inicial se forma un callo cartilaginoso intermedio capaz de proporcionar cierta estabilidad [Sathyendra y Darowish, 2013]. Detalladamente, los pasos seguidos en la reparación ósea son los siguientes:

- Hematoma.- Tras la fractura se forma el hematoma, principal causante de la llegada de células de la serie blanca, células mesenquimales (MSCs) y GFs.
- Inflamación.- Los macrófagos y los leucocitos llegan a la zona dañada y comienzan a liberar agentes pro-inflamatorios que inician la cicatrización.
- Formación del callo blando.- Es una estructura cartilaginosa transitoria que sirve como guía para la formación del hueso. La inflamación desencadena la división celular y la neovascularización. Las MSCs se diferencian inicialmente en condrocitos, que secretan colágeno y proteoglicanos dando lugar a la formación de cartílago fibroso.
- Remodelación primaria (Callo duro).- Es la osificación del tejido cartilaginoso. El tejido óseo reemplaza al cartílago fibroso generando un callo duro alrededor del defecto. Este hueso formado es de baja calidad, débil y desordenado.
- Remodelación secundaria (Maduración del hueso).- Con el tiempo el hueso pasa a tener la resistencia mecánica de un hueso sano y reemplaza al callo duro. El hueso es el único tejido capaz de auto-repararse sin dejar huella, es decir, no deja cicatriz.

Éste es el mecanismo seguido por el organismo cuando la fractura ósea no es crítica. Sin embargo, cuando por algún motivo el organismo no es capaz de reparar el daño y mantener así su homeostasis, o, si lo es, no lo hace con la rapidez deseada, es necesario intervenir. Según Spicer et al. [2012], una fractura se considera como crítica cuando el organismo no es capaz de reparar el hueso dañado a lo largo de su vida. Por su parte, para la FDA, una fractura se ve comprometida cuando han transcurrido 9 meses desde la lesión y no han habido signos de curación durante al menos 3 [Fayaz et al., 2011].

En los últimos años, el tratamiento de elección en fracturas críticas o de difícil consolidación ha sido el autoinjerto, que consiste en el trasplante de una pieza ósea de un hueso del propio paciente, fundamentalmente de la cresta ilíaca y huesos largos como la tibia, el fémur o las costillas, a la zona fracturada a modo de puente [Laurencin et al., 2006; Conway, 2010]. El hecho de ser autotrasplante evita rechazos y problemas de histocompatibilidad [Amini et al., 2012]. Además, es un buen agente osteogénico y osteoinductor, ya que es rico en GFs y MSCs, y posee la estructura idónea (presencia de trabéculas y espacios porosos) para promover la vascularización y la angiogénesis. Sin embargo, este tipo de intervención presenta numerosas limitaciones entre las que destacan el alto coste económico, las posibles lesiones en el hueso donante, la necesidad de dos intervenciones quirúrgicas y el hecho de que, en ocasiones, el tamaño del defecto es tal que el tejido donante requerido es imposible de obtener.

La segunda opción más utilizada consiste en el trasplante de tejido óseo proveniente de un cadáver, conocida como aloinjerto. La principal ventaja de este tipo de intervención frente al autoinjerto es que se necesita una sola operación y no compromete huesos sanos. Sin embargo, presenta inconvenientes tales como rechazos y problemas de incompatibilidad tisular, transmisión de infecciones víricas y bacterianas [Zimmermann y Moghaddam, 2011], carecen de GFs y MSCs debido al tratamiento al que es sometido el injerto [Delloye et al., 2007] y, al igual que en el caso del autoinjerto, la demanda no es cubierta debido a la escasez de tejido donante. En definitiva, la única mejora reconocida es la de reducir el número de cirugías y evitar lesiones en el hueso donante.

Precisamente por las limitaciones de las técnicas clásicas en el abordaje de un traumatismo óseo, desde las últimas décadas del siglo XX se están desarrollando nuevas técnicas y metodologías que ayuden a la correcta curación de las fracturas óseas, a la disminución del tiempo de curación y a intentar comprometer lo menos posible el día a día de los pacientes afectados. Las estrategias que se proponen actualmente están basadas

en proporcionar un soporte artificial capaz de simular la matriz extracelular (ECM), y generalmente se dividen en tres categorías [Yalcinkaya et al., 2014]:

- (a) Utilización de matrices capaces de guiar, orientar y dirigir el crecimiento de hueso aprovechando la capacidad natural del tejido para regenerarse.
- (b) Utilización de matrices pre-sembrada con células.
- (c) Utilización de matrices con moléculas de señalización.

Son muchos los métodos utilizados en la elaboración de matrices porosas: estructuras fabricadas mediante espumas de poliuretano [Rodríguez-Évora et al., 2013], por moldeo con disolventes y lixiviación de partículas [Cao y Kuboyama, 2010], por separación de fases inducida por cambios térmicos [Sun et al., 2011], por mineralización *in situ* de hidroxiapatita sobre polímeros [Sun et al., 2011], por electrodeposición [Sun et al., 2011], o por espumas de vidrio de fosfato cálcico [Sanzana et al., 2014] entre otros, pero todos ellos deben proporcionar estructuras tridimensionales lo suficientemente porosas como para facilitar la invasión celular y la revascularización del tejido, sin llegar a comprometer sus propiedades estructurales. A pesar de los numerosos métodos citados anteriormente, la mayoría de ellos proporcionan estructuras de porosidad no homogénea, desordenada e irregular, con interconectividad entre poros insuficiente y escasa reproducibilidad.

En esta parte de la memoria nos centraremos tanto en las técnicas como en los biomateriales utilizados en la elaboración de las matrices empleadas en este trabajo. En concreto: matrices de fosfato β -tricálcico (β -TCP) fabricadas por moldeo robotizado (MR), sistemas tipo sándwich con láminas fabricadas por electrohilado, así como matrices tipo hidrogeles de distinta naturaleza.

Las técnicas de prototipado rápido (RP) [Hutmacher, 2000; Yeong et al 2004; Butscher et al., 2011], con las que se pueden elaborar tanto matrices poliméricas, mediante modelado por deposición de polímero fundido [Hoque et al., 2012; Serra et al., 2013], como cerámicas, por MR [Miranda et al., 2006], permiten controlar el tamaño de poro, su geometría, su permeabilidad y la interconectividad entre ellos y, por tanto, se consigue una buena replicabilidad.

El MR consiste en la fabricación de un entramado de cilindros cerámicos inyectando una suspensión de fosfatos a velocidad y dirección controlada [Martínez-Vázquez et al., 2010]. De esta forma se obtienen matrices con una estructura pre-diseñada, altamente porosa y fácilmente reproducible.

Entre los biomateriales más utilizados en la fabricación de estas estructuras cabe destacar el β -TCP, pues es el cemento cálcico que presenta mayor biocompatibilidad y bioactividad, buenas propiedades osteoinductoras y una velocidad de resorción relativamente alta en comparación con el resto de fosfatos [Nilsson et al., 2002; Martínez-Vázquez et al., 2010]. Otro aspecto a favor de los fosfatos cálcicos es el hecho de que liberan, aunque lentamente, iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} capaces de promover la reparación del tejido ayudando a la mineralización del nuevo hueso [Lacefield, 1993]. Además, las partículas de β -TCP proporcionan una superficie idónea para la adhesión de células osteoprogenitoras [Bernhardt et al., 2013].

Otra técnica similar, sencilla y relativamente barata es el electrohilado [Andrady, 2008; Ding et al., 2010], con la que podemos fabricar matrices, entrelazando micro- y nanofibras de polímero, capaces de emular a la ECM del tejido óseo [Teo et al., 2006]. Las láminas de electrohilado se caracterizan por tener una gran superficie específica y ser altamente porosas, lo que favorece la adhesión celular y la invasión de vasos [Liang et al., 2007; Newton et al., 2009; Lin et al., 2012]. Los polímeros que se han propuesto para elaborar láminas por electrohilado destinadas a regeneración ósea han sido, generalmente,

polímeros sintéticos de alto peso molecular [Kim et al., 2003; Boland et al., 2004; Katti et al., 2004; Yang et al., 2005; Zhang et al., 2005; Bashur et al., 2006; Xin et al., 2007; Lee et al., 2008].

En el electrohilado hay tres parámetros que condicionan las características de las matrices obtenidas: la porosidad, el diámetro de fibra y el espacio entre las mismas. La porosidad y el espacio interfibrilar están directamente relacionados con el diámetro de fibra, ya que fibras estrechas proporcionan baja porosidad y escasa interconectividad. La gran ventaja de ésta técnica de prototipado es que los parámetros tecnológicos son fácilmente modificables (composición, concentración de biomaterial, velocidad de flujo, voltaje aplicado, distancia del colector) para elaborar estructuras de diferentes geometrías, propiedades estructurales y aplicaciones [Dietzel et al., 2001; Matthews et al., 2002; Boudriot et al., 2006].

Como alternativa a las matrices sólidas se presentan los hidrogeles, cuya principal ventaja es su inyectabilidad y su capacidad de adaptarse a la geometría del defecto a reparar [Puppi et al., 2010]. Los hidrogeles utilizados en este trabajo tienen como base las poloxaminas (Tetronic®), que son copolímeros anfifílicos capaces de formar geles de diferente viscosidad en función del pH del medio, la temperatura y la concentración a la que se encuentren. Sus cuatro brazos de PEO-PPO conectados por un grupo etilendiamina (Figura 1) permiten la formación de micelas y son la causa de la gelificación del polímero [Gonzalez-Lopez et al., 2008]. Además, la baja tensión superficial del gel formado posibilita la incorporación de proteínas osteogénicas en el bloque acuoso, sin alterar su estructura cuaternaria, y la transición de solución a gel permite una cesión sostenida de las mismas [Ron y Bromberg, 1998]. *In vitro*, las poloxaminas han demostrado ser capaces de estimular la proliferación de MSCs y su diferenciación en osteoblastos [Rey-Rico et al., 2011] y, aunque su capacidad osteogénica *in vivo* es muy inferior, resultaron ser buenos vehículos para la administración local de proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) [Rodríguez-Évora et al., 2014a].

Sin embargo, la concentración de polímero requerida para retener a moléculas activas y proporcionar una liberación sostenida de las mismas es elevada. Con el fin de reducir esta concentración y mejorar la capacidad de gelificación *in situ*, se ha propuesto la combinación Tetronic®-Ciclodextrinas. Estas últimas son oligosacáridos cíclicos obtenidos a partir del procesado del almidón, capaces de entrecruzarse con las cadenas de PEO del Tetronic®, consiguiendo un gel de menor viscosidad bajo un esfuerzo de cizalla constante, pero capaz de recuperar su consistencia en reposo [Simões et al., 2013].

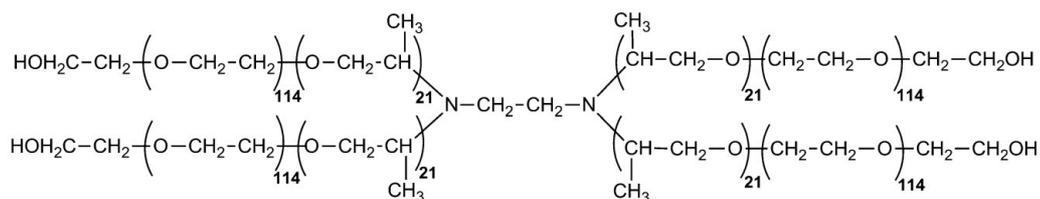


Figura 1. Estructura química del Tetronic®908. Fuente original: Simões et al., 2013.

Además de la matriz porosa, hay que tener en cuenta que, tanto las MSCs como los GFs, son elementos importantes a la hora de mejorar la capacidad osteogénica del sistema a implantar en el defecto óseo.

Las MSCs son una estirpe celular capaz de diferenciarse en células del tejido mesodérmico (osteoblastos, adipocitos, miocitos y condrocitos) y ectodérmico (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). Esta multipotencia y su fácil obtención a partir de la médula ósea [Dobson et al., 1999], del cordón umbilical [Veryasov et al., 2014] o del tejido adiposo [Zielins et al., 2015], han hecho de las MSCs una herramienta clave en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos [Miñana et al., 2003]. En lo que a hueso se refiere, las MSCs proporcionan grandes avances en la regeneración ósea, ya que pre-sembradas en matrices tridimensionales aceleran el proceso. Además, frente a los

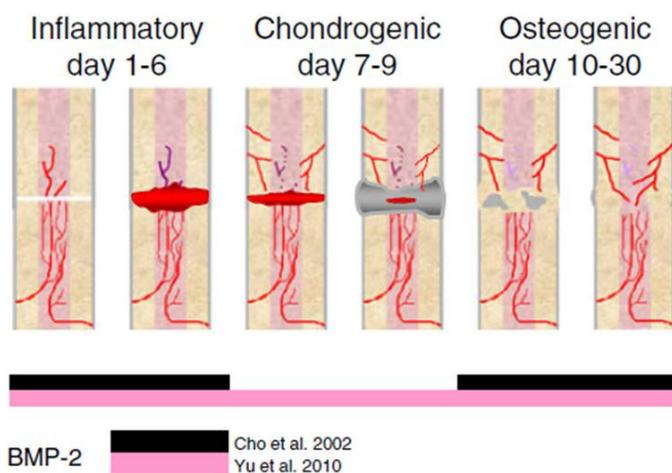
aloinjertos, las MSCs presentan la ventaja de que, al ser del propio paciente, se evita el riesgo de rechazo. Estudios recientes han puesto en evidencia la potencial utilidad y eficacia de las MSCs en la consolidación de grandes pérdidas de masa ósea tipo fracturas abiertas [Quarto et al., 2001; Brennan et al., 2014], osteogénesis imperfecta [Chan y Götherström, 2014] o necrosis de cabeza de fémur [Jones et al., 2008]. Además, el efecto de la combinación de GFs con MSCs o células manipuladas genéticamente podría ser una herramienta para aumentar el efecto de estos elementos por separado [Samee et al., 2008; Park et al., 2013; Rodríguez-Évora et al., 2014b; Yang et al., 2014].

Los GFs son polipéptidos que actúan localmente como mediadores de la actividad celular y cuya acción puede ser: autocrina, actuando sobre la célula productora del mismo o una del mismo fenotipo; paracrina, actuando sobre células cercanas con diferente fenotipo; o bien endocrina, cuando modifican células alejadas anatómicamente. Dichos polipéptidos, secretados por células óseas y cartilagosas, células endoteliales, eritrocitos, plaquetas y células de la serie blanca, se unen a las células diana y provocan una cascada de señalización intracelular que acaba en la respuesta biológica; generalmente provocan la entrada de la célula en fase de crecimiento (G1) y el abandono de la fase de reposo (G0). Los GFs más relevantes a nivel óseo son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), el fibroblástico (FGF), el derivado de plaquetas (PDGF), el vascular endotelial (VEGF) y los insulínicos (IGFs). Todos ellos, secretados por el hueso adyacente y por las células circundantes, colaboran en el proceso de regeneración y reparación ósea [Devescovi et al., 2008]. Aunque los GFs citados anteriormente intervienen en la formación de nuevo hueso, las BMPs son las proteínas que han demostrado ser más efectivas en el tratamiento de defectos óseos y fracturas críticas, habiendo sido utilizada en numerosos estudios con resultados positivos [Li et al., 2011; Mariner et al., 2013; Hussain et al., 2014]. Existen más de 15 proteínas clasificadas como BMPs pero no todas tienen propiedades osteogénicas ni la misma capacidad regenerativa [Cheng et al., 2003]. Dentro de este

grupo la más destacada es la BMP-2, tanto es así que, junto a la BMP-7, son las únicas aprobadas por la FDA y la EMA, y usada en la práctica clínica actual.

La BMP-2 es una proteína osteogénica y osteoinductiva producida por las células osteoprogenitoras, los condrocitos, los osteoblastos, las células endoteliales y las plaquetas. En cuanto a su acción sobre la regeneración y remodelación ósea, favorece la migración de células osteoprogenitoras, induce su proliferación, su diferenciación, y promueve la síntesis de ECM [Devescovi et al., 2008; Lissenberg-Thunnissen et al., 2011].

De forma general se acepta que la producción endógena de BMP-2 aumenta durante la primera semana tras la fractura [Lissenberg-Thunnissen et al., 2011] y, a partir de la segunda semana existe controversia entre autores: para Yu et al. [2010], la producción endógena de BMP-2 se mantiene durante todo el proceso regenerativo, mientras que para Cho et al. [2002] existe una disminución a partir del día 7 para, posteriormente, verse de



nuevo aumentada a partir del día 10. Para este último, el periodo de menor producción de BMP-2 coincide con la formación del cartílago blando (Figura 2) [Lissenberg-Thunnissen et al., 2011]. Dicho esto, una cinética de cesión similar sería lo más recomendable para emular la acción fisiológica de la proteína.

Figura 2. Imagen representativa de la expresión de BMP-2 durante las diferentes etapas que se suceden en la reparación de una fractura ósea. Fuente original: Lissenberg-Thunnissen et al., 2011.

Otra molécula de señalización a tener en cuenta en la regeneración ósea es el PDGF. Este GF es uno de los encargados de iniciar el proceso regenerativo; su actuación se centra en los primeros días tras del trauma. Una vez formado el hematoma, las plaquetas son las primeras encargadas de producir PDGF. Este PDGF inicial atrae células de la serie blanca tales como neutrófilos y macrófagos, que se encargan de seguir liberando PDGF. Además, el PDGF atrae y recluta MSCs, favorece la proliferación de células de tejido conectivo, y estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos [Devescovi et al., 2008; Hollinger et al., 2008].

A la hora de plantear el uso de GFs se nos presentan dos posibilidades:

- (a) La administración repetida de la proteína a lo largo del tiempo.
- (b) La encapsulación del GF en sistemas de liberación controlada.

Esta última actuación presenta numerosas ventajas con respecto a la primera, entre las que cabe destacar la disminución en el número de dosis [Jiskoot et al., 2012], el ahorro económico que esto conlleva, y la reducción de efectos adversos asociados a la administración de dosis elevadas de proteína [Shekaran et al., 2014]. En el caso de la BMP-2, los efectos secundarios más comunes son la inflamación de tejidos blandos, radiculitis y la formación ectópica de tejido óseo [Shimer et al., 2009]. Además, existen evidencias científicas de que la eficacia de los GFs es mucho mayor cuando es administrada en sistemas de liberación controlada, ya que se protege a la proteína de la degradación enzimática y se aumenta el tiempo de residencia en el defecto [Rodríguez-Évora et al., 2014a]. Estos sistemas han sido y son ampliamente utilizados para retrasar la cesión de IGF-I [Luginbuehl et al., 2013], de VEGF [Reyes et al., 2012], de BMP-2 y VEGF [Young et al., 2009; Hernandez et al., 2012], o de BMP-2 [Rodríguez-Évora et al., 2014a; Li et al., 2015], entre otros muchos.

Desde finales de la década de los 90 se ha propuesto, como alternativa a los GFs, el uso de estatinas. Tradicionalmente las estatinas han sido y son utilizadas como reguladores de los niveles de colesterol sanguíneo por su acción inhibitoria sobre la HMG-CoA reductasa, disminuyendo la biosíntesis de colesterol hepático [Corsini et al., 1999]. Sin embargo, desde que en 1999 Mundy et al. ponen en evidencia su papel como inductores de la osteogénesis, la simvastatina (SV), aunque no es la única [Monjo et al., 2010; Ibrahim al., 2014], ha suscitado gran interés. Numerosos estudios han demostrado en fémur de conejo [Papadimitriou et al., 2015], en tibia de ratón [Tai et al., 2013] y de rata [Qi et al., 2013; Nyan et al., 2014], o en cráneo de rata [Ezirganlı et al., 2014], sus propiedades osteogénicas. Sin embargo, en aquellos casos en los que la reparación es buena, los defectos practicados no son críticos [Nyan et al., 2010; Yueyi et al., 2013; Ferreira et al., 2015] o las dosis utilizadas son muy elevada [Yueyi et al., 2013]. Este es precisamente el inconveniente fundamental del uso de SV, y es que la dosis necesaria para reparar un defecto óseo es muy superior a la cantidad requerida en el abordaje de dislipemias, lo que supone un aumento en la incidencia de eventos adversos a nivel sistémico [Simões et al., 2013], así como inflamación de tejidos a nivel local [Calixto et al., 2011; Ezirganlı et al., 2014; Papadimitriou et al., 2015].

BIBLIOGRAFÍA

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012. 40: 363-408.

Andrady AL. Science and technology of polymer nanofibers. J Wiley & Sons Inc, 2008. 1-26.

Baro M, Sánchez E, Delgado A, Perera A, Evora C. In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J Control Release.* 2002. 83: 353-364.

Bashur CA, Dahlgren LA, Goldstein AS. Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes. *Biomaterials.* 2006. 27: 5681-5688.

Bernhardt A, Lode A, Peters F, Gelinsky M. Comparative evaluation of different calcium phosphate-based bone graft granules - an in vitro study with osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res.* 2013. 24: 441-449.

Boland ED, Telemeco TA, Simpson DG, Wnek GE, Bowlin GL. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004. 71: 144-152.

Boskey AL, Coleman R. Aging and Bone. *J Dent Res.* 2010. 89: 1333-1348.

Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning approaches toward scaffold engineering: a brief overview. *Artif Organs.* 2006. 30: 785-792.

Brennan MA, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, Trichet V, Layrolle P. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther.* 2014. 5: 1-15.

Butscher A, Bohner M, Hofmann S, Gauckler L, Müller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomater.* 2011. 7: 907-920.

Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011. 39: 215-220.

Cao H, Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone.* 2010. 46: 386-395.

Chan JK, Götherström C. Prenatal transplantation of mesenchymal stem cells to treat osteogenesis imperfecta. *Front Pharmacol.* 2014. 5: 1-6.

Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003. 85: 1544-1552.

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002. 17: 513-520.

Conway JD. Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *Orthop Clin North Am.* 2010. 41: 75-84.

Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.* 1999. 84: 413-428.

Cummings SR, Melton III LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *The Lancet*. 2002. 359: 1761-1767.

Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br*. 2007. 89: 574-579.

Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*. 2008. 92: 161-168.

Dietzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles *Polymer*. 2001. 42: 261-272.

Ding B, Wang M, Wang X, Yu J, Sun G. Electrospun nanomaterials for ultrasensitive sensors. *Materials Today*. 2010. 11: 16-27.

Dobson KR, Reading L, Haberey M, Marine X, Scutt A. Centrifugal isolation of bone marrow from bone: an improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells from rat tibiae and femurae. *Calcif Tissue Int*. 1999. 65: 411-413.

Ezirganlı Ş, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın MŞ, Sharifov R, Alkan A. The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Implants Res*. 2014. 25: 969-976.

Fayaz HC, Giannoudis PV, Vrahas MS, Smith RM, Moran C, Pape HC, Krettek C, Jupiter JB. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. *Int Orthop*. 2011. 35: 1587-1597.

Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded

poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl.* 2015. 29: 965-976.

Gonzalez-Lopez J, Alvarez-Lorenzo C, Taboada P, Sosnik A, Sandez-Macho I, Concheiro A. Self-associative behavior and drug-solubilizing ability of poloxamine (tetronic) block copolymers. *Langmuir.* 2008. 24: 10688-10697.

Hernández A, Reyes R, Sánchez E, Rodríguez-Évora M, Delgado A, Evora C. In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. *J Biomed Mater Res A.* 2012. 100: 2382-2391.

Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2008. 90: 48-54.

Hoque ME, Chuan YL, Pashby I. Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. *Biopolymers.* 2012. 97: 83-93.

Hussain A, Takahashi K, Sonobe J, Tabata Y, Bessho K. Bone Regeneration of Rat Calvarial Defect by Magnesium Calcium Phosphate Gelatin Scaffolds with or without Bone Morphogenetic Protein-2. *J Maxillofac Oral Surg.* 2014. 13: 29-35.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000. 21: 2529-2543.

Ibrahim N', Khamis MF, Mod Yunoh MF, Abdullah S, Mohamed N, Shuid AN. Targeted delivery of lovastatin and tocotrienol to fracture site promotes fracture healing in osteoporosis model: micro-computed tomography and biomechanical evaluation. *PLoS One.* 2014. 9: 1-18.

Jiskoot W, Randolph TW, Volkin DB, Middaugh CR, Schöneich C, Winter G, Friess W, Crommelin DJ, Carpenter JF. Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J Pharm Sci.* 2012. 101: 946-954.

Johnell O. The socioeconomic burden of fractures: today and in the 21st century. *Am J Med.* 1997. 103: 20S-26S.

Jones KB, Seshadri T, Krantz R, Keating A, Ferguson PC. Cell-based therapies for osteonecrosis of the femoral head. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008. 14: 1081-1087.

Katti DS, Robinson KW, Ko FK, Laurencin CT. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004. 70: 286-296.

Kim K, Yu M, Zong X, Chiu J, Fang D, Seo YS, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials.* 2003. 24: 4977-4985.

Lacefield WR. Hydroxylapatite coatings. In *An introduction to bioceramics.* Hench L L (World Scientific). 1993. 223-224.

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices.* 2006. 3: 49-57.

Lee SJ, Oh SH, Liu J, Soker S, Atala A, Yoo JJ. The use of thermal treatments to enhance the mechanical properties of electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials.* 2008. 29: 1422-1430.

Li J, Hong J, Zheng Q, Guo X, Lan S, Cui F, Pan H, Zou Z, Chen C. Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2-related peptide or BMP-2. *J Orthop Res.* 2011. 29: 1745-1752.

Li J, Jin L, Wang M, Zhu S, Xu S. Repair of rat cranial bone defect by using bone morphogenetic protein-2-related peptide combined with microspheres composed of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and chitosan. *Biomed Mater.* 2015. 10: 1-9.

Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007. 59: 1392-1412.

Lin HM, Lin YH, Hsu FY. Preparation and characterization of mesoporous bioactive glass/polycaprolactone nanofibrous matrix for bone tissues engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2012. 23: 2619-2630.

Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop.* 2011. 35: 1271-1280.

Luginbuehl V, Zoidis E, Meinel L, von Rechenberg B, Gander B, Merkle HP. Impact of IGF-I release kinetics on bone healing: a preliminary study in sheep. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013. 85: 99-106.

Mariner PD, Wudel JM, Miller DE, Genova EE, Streubel SO, Anseth KS. Synthetic hydrogel scaffold is an effective vehicle for delivery of INFUSE (BMP2) to critical-sized calvaria bone defects in rats. *J Orthop Res.* 2013. 31: 401-406.

Martínez-Vázquez FJ, Perera FH, Miranda P, Pajares A, Guiberteau F. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration. *Acta Biomater.* 2010. 6: 4361-4368.

Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*. 2002. 3: 232-238.

Miñana MD, Grisolia S, Bendala-Tufanisco E. Células madre mesenquimatosas: Biología y potenciales usos clínicos. 2003. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.

Miranda P, Saiz E, Gryn K, Tomsia AP. Sintering and robocasting of beta-tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications. *Acta Biomater*. 2006. 2: 457-466.

Monjo M, Rubert M, Wohlfahrt JC, Rønold HJ, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. In vivo performance of absorbable collagen sponges with rosuvastatin in critical-size cortical bone defects. *Acta Biomater*. 2010. 6: 1405-1412.

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999. 286: 1946-1949.

Newton D, Mahajan R, Ayres C, Bowman JR, Bowlin GL, Simpson DG. Regulation of material properties in electrospun scaffolds: Role of cross-linking and fiber tertiary structure. *Acta Biomater*. 2009. 5: 518-529.

Nilsson M, Fernández E, Sarda S, Lidgren L, Planell JA. Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement. *J Biomed Mater Res*. 2002. 61: 600-607.

Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, Kasugai S. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010. 93: 65-73.

Nyan M, Hao J, Miyahara T, Noritake K, Rodriguez R, Kasugai S. Accelerated and enhanced bone formation on novel simvastatin-loaded porous titanium oxide surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014. 16: 675-683.

Papadimitriou K, Karkavelas G, Vouros I, Kessopoulou E, Konstantinidis A. Effects of local application of simvastatin on bone regeneration in femoral bone defects in rabbit. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015. 43: 232-237.

Park SY, Kim KH, Shin SY, Koo KT, Lee YM, Seol YJ. Dual delivery of rhPDGF-BB and bone marrow mesenchymal stromal cells expressing the BMP2 gene enhance bone formation in a critical-sized defect model. *Tissue Eng Part A*. 2013. 19: 2495-2505.

Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*. 2010. 35: 403-440

Qi Y, Zhao T, Yan W, Xu K, Shi Z, Wang J. Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy model. *Cytotherapy*. 2013. 15: 44-56.

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001. 344: 385-386.

Rey-Rico A, Silva M, Couceiro J, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2. *Eur Cell Mater*. 2011. 21: 317-340.

Reyes R, De la Riva B, Delgado A, Hernández A, Sánchez E, Évora C. Effect of triple growth factor controlled delivery by a brushite-PLGA system on a bone defect. *Injury*. 2012. 43: 334-342.

Rodríguez-Évora M, Delgado A, Reyes R, Hernández-Daranas A, Soriano I, San Román J, Evora C. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2013. 49: 873-884.

Rodríguez-Evora M, Reyes R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Delgado A, Evora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system. *J Biomed Nanotechnol.* 2014a. 10: 959-969.

Rodríguez-Évora M, García-Pizarro E, del Rosario C, Pérez-López J, Reyes R, Delgado A, Rodríguez-Rey JC, Évora C. Smurf1 knocked-down, mesenchymal stem cells and BMP-2 in an electrospun system for bone regeneration. *Biomacromolecules.* 2014b. 15: 1311-1322.

Ron ES, Bromberg LE. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998. 31: 197-221.

Samee M, Kasugai S, Kondo H, Ohya K, Shimokawa H, Kuroda S. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci.* 2008. 108: 18-31.

Sanzana ES, Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Ojeda AC, Montecinos HA. Role of porosity and pore architecture in the in vivo bone regeneration capacity of biodegradable glass scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2014. 102: 1767-1773.

Sathyendra V, Darowish M. Basic science of bone healing. *Hand Clin.* 2013. 29: 473-481.

Serra T, Planell JA, Navarro M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomater.* 2013. 9: 5521-5530.

Shekaran A, García JR, Clark AY, Kavanaugh TE, Lin AS, Guldborg RE, García AJ. Bone regeneration using an alpha 2 beta 1 integrin-specific hydrogel as a BMP-2 delivery vehicle. *Biomaterials.* 2014. 35: 5453-5461.

Shimer AL, Oner FC, Vaccaro AR. Spinal reconstruction and bone morphogenetic proteins: open questions. *Injury.* 2009. 40: S32-S38.

Simões SM, Veiga F, Torres-Labandeira JJ, Ribeiro AC, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Poloxamine-cyclodextrin-simvastatin supramolecular systems promote osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Macromol Biosci.* 2013. 13: 723-734.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012. 7: 1918-1929.

Sun F, Zhou H, Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2011. 7: 3813-3828.

Tai IC, Fu YC, Wang CK, Chang JK, Ho ML. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine.* 2013. 8: 3895-3904.

Teo WE, He W, Ramakrishna S. Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix. *Biotechnol J.* 2006. 1: 918-929.

Veryasov VN, Savilova AM, Buyanovskaya OA, Chulkina MM, Pavlovich SV, Sukhikh GT. Isolation of mesenchymal stromal cells from extraembryonic tissues and their characteristics. *Bull Exp Biol Med.* 2014. 157: 119-124.

Xin X, Hussain M, Mao JJ. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials.* 2007. 28: 316-325.

Yalcinkaya TM, Sittadjody S, Opara EC. Scientific principles of regenerative medicine and their application in the female reproductive system. *Maturitas.* 2014. 77: 12-19.

Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials.* 2005. 26: 2603-2610.

Yang Y, Jin G, Li L, Liu X, Li C, Wu J. Enhanced osteogenic activity of mesenchymal stem cells and co-modified BMP-2 and bFGF genes. *Ann Transplant.* 2014. 19: 629-638.

Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol.* 2004. 22: 643-652.

Young S, Patel ZS, Kretlow JD, Murphy MB, Mountziaris PM, Baggett LS, Ueda H, Tabata Y, Jansen JA, Wong M, Mikos AG. Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng Part A.* 2009. 15: 2347-2362.

Yu YY, Lieu S, Lu C, Miclau T, Marcucio RS, Colnot C. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. *Bone*. 2010. 46: 841-851.

Yueyi C, Xiaoguang H, Jingying W, Quansheng S, Jie T, Xin F, Yingsheng X, Chunli S. Calvarial defect healing by recruitment of autogenous osteogenic stem cells using locally applied simvastatin. *Biomaterials*. 2013. 34: 9373-9380.

Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005. 72: 156-165.

Zielins ER, Tevlin R, Hu MS, Chung MT, McArdle A, Paik KJ, Atashroo D, Duldulao CR, Luan A, Senarath-Yapa K, Walmsley GG, Wearda T, Longaker MT, Wan DC. Isolation and enrichment of human adipose-derived stromal cells for enhanced osteogenesis. *J Vis Exp*. 2015. 12: 1-11.

Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011. 42: S16-S21.

Objetivos generales

El objetivo global de este trabajo de investigación es el de diseñar, caracterizar y evaluar *in vivo*, diferentes estructuras tridimensionales capaces de proporcionar una cesión sostenida de BMP-2, así como un ambiente que favorezca y acelere la regeneración ósea. Además, estudiamos el posible sinergismo que podría existir entre la administración conjunta de BMP-2 con otros factores de crecimiento (GFs) como el PDGF, otras moléculas activas como la simvastatina (SV), o células mesenquimales (MSCs) pre-sembradas en los sistemas. Por su parte, las estructuras elegidas como matrices para regeneración ósea, son estructuras elaboradas con diferentes materiales y distintas técnicas, con el fin de identificar la combinación que ofrezca mejores condiciones para la regeneración tisular de un defecto crítico de 8 mm de diámetro en cráneo de ratas.

Por otro lado, en la presente tesis se buscan, además, nuevas técnicas susceptibles de ser aplicadas como métodos para la determinación de la calidad y la cantidad de hueso formado, y que sirvan como alternativa a la histología e histomorfometría, o que proporcionen información complementaria a dicha técnica.

Para ello se abordan las siguientes etapas:

- Estudiar el tiempo de permanencia de la BMP-2 y del PDGF en el lugar del defecto, así como la influencia de éste sobre la capacidad osteogénica del sistema.
- Evaluar las posibles diferencias en cuanto a regeneración ósea en función del número de MSCs implantadas en el lugar del defecto.
- Valorar el efecto de la dosis administrada de BMP-2, PDGF y SV sobre la reparación del defecto óseo.
- Identificar la influencia del material y del método de elaboración de las matrices sobre la respuesta inducida.

Objetivos generales

- Caracterizar el hueso regenerado por técnicas alternativas a la histología como lo es la microscopía de fuerza atómica (AFM), para conocer la nanoestructura del hueso, y la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX), para identificar la composición elemental del tejido.

**Capítulo 1.- Sistemas de β -TCP conteniendo BMP-2, PDGF y MSCs para
regeneración ósea**

INTRODUCCIÓN

Tal y como ha sido especificado en la introducción general, la utilización de auto- y aloinjertos en el tratamiento de fracturas óseas de difícil consolidación presenta numerosos inconvenientes [Damien y Parsons, 1991; Simonds et al., 1992; Mankin et al., 1996]. Por ello, en las últimas décadas se ha propuesto una alternativa basada en la implantación de sistemas bioactivos constituidos por células, factores de crecimiento (GFs) y matrices porosas. En el presente capítulo nos centraremos en la evaluación de matrices para regeneración ósea elaboradas por técnicas de prototipado rápido (RP).

Estas técnicas de RP son capaces de producir estructuras tridimensionales altamente porosas destinadas a promover la invasión celular, la revascularización y, consecuentemente, la formación de nuevo tejido óseo [Hutmacher, 2000; Yeong et al., 2004; Butscher et al., 2011; Hoque et al., 2012; Serra et al., 2013]. Entre ellas, la técnica de moldeado robotizado (MR) aplicada en el desarrollo de matrices de fosfato β -tricálcico (β -TCP), permite obtener estructuras porosas de arquitectura bien definida, con alta reproducibilidad e interconectividad entre poros [Miranda et al., 2006; Martínez-Vázquez et al., 2010].

La estructura porosa es fundamental para la correcta regeneración ósea, siendo los poros de menos de 1 μm esenciales para la interacción proteica y, por lo tanto, para la bioactividad de la matriz; entre 1 y 20 μm favorecen la adhesión y el desarrollo celular, mientras que aquellos mayores de 100 μm proporcionan un ambiente idóneo para el crecimiento óseo y la formación de vasos sanguíneos [Sánchez-Salcedo et al., 2008; Lan Levengood et al., 2010].

Entre los GFs, la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) promueve la diferenciación de células mesenquimales (MSCs) en osteoblastos y la síntesis de nueva matriz extracelular (ECM). Por su parte, gracias a sus propiedades quimiotácticas y mitogénicas

[Hollinger et al., 2008], el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos [Mezawa et al., 2009], además de propiciar la angiogénesis mediante la sobre-expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La formación de vasos sanguíneos es un aspecto crítico en la regeneración de tejido óseo [Kanczler y Oreffo, 2008] por su papel en el suministro de nutrientes, factores proinflamatorios, GFs y MSCs. Precisamente, las MSCs son el tercer pilar en la fabricación de una matriz bioactiva por su capacidad para renovar el tejido dañado al diferenciarse en osteoblastos [Akiyama et al., 2012]. En este sentido, la implantación de MSCs del propio paciente pre-sembradas en la matriz, constituye una estrategia esperanzadora en regeneración tisular, evitándose el riesgo de rechazos.

El papel del PDGF en la regeneración tisular, favoreciendo el reclutamiento de MSCs, podría parecer, *a priori*, una alternativa al pre-sembrado de células en las matrices. El uso de MSCs conlleva una serie de inconvenientes tales como el aspirado de médula ósea para obtener las células, el cultivo de las MSCs aisladas y la implantación de las mismas en una segunda intervención quirúrgica, que suponen alto riesgo de infección. A pesar de todo ello, el papel del PDGF es algo controvertido [Marden et al., 1993; Chan et al., 2010; Park et al., 2013].

OBJETIVOS

El objetivo principal de este primer capítulo es evaluar el efecto osteogénico de una matriz macroporosa de β -TCP conteniendo BMP-2, junto con MSCs o PDGF, e identificar la mejor combinación en términos de regeneración ósea en un defecto crítico en cráneo de rata (8 mm). Para ello se elabora, por la técnica del MR, un sistema de β -TCP cilíndrico de estructura radial y porosidad definida, con un orificio central. En una primera aproximación, la BMP-2 se encapsula en microesferas de PLGA 75:25, que se comprimen e insertan en el orificio central del sistema cilíndrico de β -TCP. La dosis de BMP-2, de acuerdo a estudios previos, fue fijada en 6 μ g. Por otro lado, sobre la estructura de β -TCP se siembran MSCs y se cultivan durante 12 horas o 3 semanas antes de su implantación.

Tras este primer estudio, y alternativamente a las MSCs, se evalúan dos dosis de PDGF incorporado en una fina malla de alginato entrecruzado que envuelve a la estructura de β -TCP. El comprimido de microesferas con los 6 μ g de BMP-2 se coloca, igualmente, en el centro de la estructura, pero en este caso el polímero utilizado es PLGA 50:50.

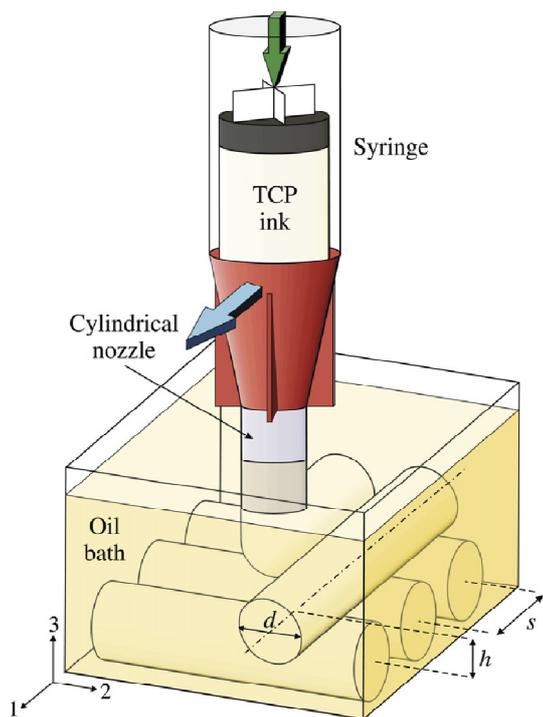
MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el material utilizado en este trabajo se procesa en condiciones asépticas; los polímeros se esterilizan con irradiación gamma (25 kGy, ^{60}Co) (Unidad de esterilización Gamma de Aragogamma, Barcelona, España), y toda la instrumentación y componentes líquidos, excepto la BMP-2 y el PDGF, se autoclavan (121°C, 30 min, Auster Selecta, España).

Fabricación y ensamblaje de los sistemas

Las microesferas de PLGA (Resomer® RG504 (PLGA 50:50) o Resomer® RG755S (PLGA 75:25), Evonik Industries, Alemania) cargadas con BMP-2 (Biomedal Life Sciences, España) se preparan mediante el método de doble emulsión (agua/aceite/agua). Para ello, 200 μL de PVA al 0,07 % conteniendo 180 μg de BMP-2 (fase interna acuosa) se añaden a la fase oleosa, formada por 2 mL de PLGA a una concentración de 50 mg mL^{-1} en DCM. La mezcla se agita durante 3 minutos en el Vortex (Genie® 2, posición 7), se vierte sobre la fase externa acuosa de PVA al 0,1 % (100 mL) y, durante 1,5 horas se deja bajo agitación magnética y en campana de extracción para favorecer la evaporación del DCM. Una vez eliminado el disolvente orgánico, las microesferas se recogen por filtración a vacío (filtro Supor®-450 de 0,45 μm , Pall Corporation, 47 mm), se liofilizan y se conservan a 4°C hasta su uso. Adicionalmente se preparan varios lotes de microesferas con ^{125}I -BMP-2 para determinar el rendimiento de encapsulación de la proteína y su perfil de cesión en cráneo de rata. Las microesferas se procesan en forma de cilindros elaborados con 15 mg de microesferas conteniendo 6 μg de BMP-2, que se comprimen (37,5 MPa, 2 min) con un punzón de 3 mm de diámetro en una prensa hidráulica (Fred S. Carver Inc., modelo 4120, EEUU).

Las matrices de fosfato fueron elaboradas por la empresa Ceramics 3D LLC (Badajoz, España) siguiendo las especificaciones estructurales dadas por nuestro grupo de



Esquema 1. Ilustración esquemática de la técnica del Moldeado Robotizado. Las matrices de β -TCP se fabrican al depositar, sobre un baño de aceite, una suspensión de fosfatos a una velocidad y dirección controlada por un programa informático. Fuente original: Martínez-Vázquez et al., 2010.

investigación, mediante la técnica del MR [Miranda et al., 2006; Miranda et al., 2008; Martínez-Vázquez et al., 2010; Abarrategi et al., 2012a; Abarrategi et al., 2012b; Martínez-Vázquez et al., 2013]. Brevemente, la técnica consiste en la deposición de una suspensión de fosfatos cálcicos (84 % β -TCP y 16 % α -CPP) a través de una jeringa de impresión sobre un baño de aceite, todo ello controlado por un programa informático (Esquema 1). Tras el sinterizado (1.200°C, 1 h), las matrices obtenidas presentan forma cilíndrica y 8 mm de diámetro externo, así como un orificio central de 3 mm de diámetro en el que se encajan los comprimidos de microesferas. El proceso de fabricación permite obtener matrices de elevada macroporosidad, interconexión entre poros, estructura regular y alta reproducibilidad.

Con el fin de aumentar la superficie específica de la estructura y proporcionar un soporte para la adsorción del PDGF, las matrices se recubren con una fina malla de alginato. Para ello se esterilizan bajo radiación ultravioleta (30 min cada cara) y a continuación se sumergen en una disolución acuosa de alginato (1,5 % p/v) durante 20 minutos. Seguidamente se incuban en una disolución de CaCl_2 (0,75 % p/v, 20 min),

consiguiendo el entrecruzamiento del polisacárido, se lavan 3 veces con agua MQ (Millipore, milli-Q gradient A10 Water Purification System) (10 min) para eliminar los restos de CaCl_2 y se liofilizan. Posteriormente se colocan los comprimidos de microesferas de PLGA 50:50 en el orificio central de las matrices. Para los grupos con PDGF (Tabla 1) se vierten 1,5 μL de una disolución del factor de crecimiento en ácido acético 20 mM y BSA al 0,1 % en ocho puntos equidistantes del sistema (total 12 μL). En función de la dosis de PDGF a incorporar (250 ng ó 500 ng), la concentración del factor de crecimiento es de 20,83 ng/ μL o de 41,66 ng/ μL .

De aquí en adelante, la nomenclatura utilizada para denominar a cada uno de los sistemas es: *P-scaffold* para aquellos sistemas combinados con el comprimido de microesferas de PLGA 75:25, y *AP-scaffold* para las matrices recubiertas con alginato conteniendo el comprimido de microesferas de PLGA 50:50 en su orificio central.

Caracterización de los sistemas P- y AP-scaffold

El tamaño de las microesferas de PLGA se determina mediante un analizador de tamaño de partículas por difracción de luz láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments), mientras que sus características morfológicas se analizan por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Jeol JSM-6300).

La superficie específica del anillo de fosfato se determina por adsorción de nitrógeno (Gemini, Micromeritics, Norcross, EEUU), y su porosidad y la de los comprimidos se calcula mediante el método gravimétrico, usando la ecuación siguiente:

$$P (\%) = \left(1 - \frac{\rho_{app}}{\rho_{true}} \right) \times 100$$

La densidad aparente (ρ_{app}) es igual a la masa total dividida por el volumen total del sistema, este último calculado a partir de la altura (micrómetro Stainless Hardened, RS 443-0449) y los diámetros externos e internos (Pie de Rey Stainless Hardened, 150 mm) de la matriz, y de la altura y el diámetro de los comprimidos (micrómetro Mitutoyo, 0-25 mm, 0,001 mm), mientras que la densidad real (ρ_{true}) se determina por picnometría de helio (AccuPyc 1330 Pycnometer, Micromeritics). En el caso de los comprimidos de PLGA, también valoramos la porosidad por porosimetría de intrusión de mercurio (Autopore IV 9510 Porosimeter, Micromeritics).

La morfología del sistema ya ensamblado se observa por estereomicroscopía (Leica M205 C, Leica LAS, v.3 software) y por SEM (Jeol JSM-6300). Además, la microscopía de fuerza atómica (AFM) (Nanoscope IIIa, Digital Instruments Veeco, EEUU) se usa para el estudio de la superficie del anillo externo de β -TCP, pues proporciona información más detallada acerca de la estructura de los gránulos de fosfato y de las distancias entre ellos.

Marcaje de la BMP-2 con ^{125}I

El marcaje de la BMP-2 se lleva a cabo utilizando el método del Iodogen, previamente descrito por Fraker y Speck en 1978. El método consiste en mezclar 25 μ L de BMP-2 (1mg/mL) y 10 μ L de ^{125}I Na (1mCi) (Perkin-Elmer, Boston, EEUU) en tubos recubiertos con 50 μ g de Iodogen (Pierce[®] Pre-Coated Iodination Tube, Thermo Scientific) y llevar hasta un volumen de 100 μ L con PB (0,5M y pH 7). La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos bajo agitación continua (120 rpm), después se añaden 50 μ L de una disolución saturada de tirosina en PBS con el fin de eliminar el ^{125}I que no haya reaccionado con la proteína y se ajusta a un volumen final de 200 μ L con PB (pH 7). Finalmente, para purificar la ^{125}I -BMP-2, se usan columnas Zeba[™] Spin Desalting (Thermo Scientific), con las que conseguimos que el ^{125}I quede retenido en la columna y la ^{125}I -BMP-2 eluya.

El rendimiento y la estabilidad del marcaje se monitorizan por cromatografía de capa fina. Para ello, alrededor de 15.000 cpm contenidas en un volumen de 5 μ L de una disolución de 125 I-BMP-2 se depositan sobre una tira de papel Whatman[®] 3MM Chr (11,5 x 0,8 cm) y la cromatografía se desarrolla en una fase móvil de metanol al 85 % en agua. El soporte se seca a temperatura ambiente, se corta a la mitad y se determina la radiactividad en cada porción utilizando un contador gamma (Cobra II, Packard[®]). Con este tipo de cromatografías, el 125 I libre va en el frente ($R_f=1$) y la 125 I-BMP-2 queda retenida en la base ($R_f=0$) [De la Riva et al., 2009]. El ensayo se realiza por duplicado.

Determinación de la dosis efectiva de PDGF y BMP-2 incorporada en los sistemas P- y AP-scaffold

La dosis efectiva de PDGF adsorbida al alginato del sistema *AP-scaffold* se determina con el contador gamma (Cobra II, Packard[®]). Para ello, 12 μ L de una disolución de 125 I-PDGF (Perkin-Elmer, Boston, EEUU) se añaden secuencialmente (1,5 μ L x 8 veces) en un tubo de ensayo y se compara su radiactividad con la de otros 12 μ L (1,5 μ L x 8 veces) de 125 I-PDGF adsorbidos en 8 puntos de la superficie del *AP-scaffold*. El ensayo se realiza por triplicado.

En cuanto a la dosis efectiva de la BMP-2, ésta se determina mediante el rendimiento de incorporación de la 125 I-BMP-2 en las microesferas de PLGA 50:50 y PLGA 75:25. Para ello, la radiactividad de 3 alícuotas de 10 mg de microesferas medidas en un contador gamma (Cobra II, Packard[®]), se compara con la radiactividad total utilizada en la fabricación de cada uno de los lotes.

Cultivos celulares

- *Aislamiento de las MSCs de médula ósea de rata*

Las MSCs de médula ósea se obtienen de tibia y fémur de ratas Sprague Dawley de entre 150 g y 200 g [Dobson et al., 1999], ajustando el procedimiento al reglamento europeo (2010/63/UE) y a la normativa del Comité de Ética de la Universidad de La Laguna.

Las ratas se sacrifican por inhalación de CO₂, se les rasura el cuarto trasero y se sumergen completamente en alcohol de 70° durante 20 minutos para conseguir asepsia. Cuidadosamente y dentro de la campana de extracción, se extraen la tibia y el fémur de los animales y se seccionan los huesos en dos, aprovechando la porción distal del fémur y la parte proximal de la tibia. Los huesos se colocan en *ependorfs* individuales con los cóndilos tibiales y femorales hacia arriba, y con la ayuda de una aguja de 18 G se les practica una incisión para favorecer la extracción medular. Seguidamente se centrifugan los huesos (400 g, 1 min, RT), se desechan, se recolectan los pellets obtenidos de cada uno con medio de cultivo primario y se hace una segunda centrifugación (300 g, 8 min, RT). Finalmente se elimina el sobrenadante, las células se resuspenden en medio fresco y se cultivan hasta confluencia. Una vez confluentes, las MSCs se despegan con tripsina (5 min, 37°C), se resuspenden en medio fresco, se centrifugan (300 g, 8 min, 4°C) y se resuspenden en el volumen necesario de FBS (4°C) para obtener una suspensión 2-8x10⁶ células/mL. Seguidamente se mezcla con el mismo volumen de medio de congelación (DMSO al 20 % en FBS a 4°C) y se conserva en alícuotas de 1-4x10⁶ células/mL.

- *Siembra y cultivo de las MSCs en las matrices de β -TCP*

Las matrices se someten a radiación ultravioleta durante 30 minutos por cada cara como método de esterilización, y con el fin de aumentar su capacidad de humectación se

sumergen durante cinco minutos en PBS estéril en campana de flujo. Las estructuras se colocan en placas de 48 pocillos, se siembran con 2×10^5 MSCs (100 μ L) y se incuban durante 2 horas (37°C, 5 % de CO₂) para permitir la adhesión celular. Seguidamente se añaden 1,5 mL de medio de cultivo y, dependiendo del grupo experimental, se cultivan durante 12 horas o 3 semanas, cambiando el medio 2 veces por semana.

- *Ensayo de adherencia y viabilidad celular sobre las matrices de β -TCP*

En los estudios de adherencia y viabilidad celular se utilizan diez *P-scaffold*: tres para cada tiempo de cultivo, y los otros cuatro (dos para cada tiempo) para observar la morfología celular. En cuanto a los *AP-scaffold*, sólo se utilizan cinco, ya que el estudio se realiza únicamente cultivando las células durante 12 horas.

Para cuantificar el número de células adheridas a las matrices se realiza un ensayo colorimétrico mediante la determinación de la reducción metabólica del XTT. Dicho ensayo se lleva a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, determinando la absorbancia a 492 nm (690 nm de referencia). Con el fin de correlacionar el metabolismo celular con el número de células adheridas a la superficie de las matrices, se hace un calibrado a partir de números conocidos de células cultivadas en placa.

Además, las MSCs se observan al microscopio invertido de fluorescencia (Zeiss Axiovert 40 CFL, Jena, Alemania) y se fotografían con una cámara digital Canon (PowerShot A620, Tokio, Japón) tras una incubación de 30 minutos (37°C) con calceína AM (1 μ g/ml), para estudiar su fenotipo y su adherencia a la matriz.

- *Caracterización de las MSCs sembradas en las matrices*

La caracterización de las células adheridas en las matrices se hace por citometría de flujo, sembrando seis *P-scaffold* y tres *AP-scaffold* tal y como ha sido detallado previamente. A los tiempos de muestreo especificados (12 horas para ambas matrices y 3

semanas para *P-scaffold*) las células se despegan con 0,5 mL de tripsina (5 min, 37°C), se resuspenden en PBS, se incuban a 4°C (30 min) en presencia de los 3 anticuerpos seleccionados: FITC Mouse Anti-Rat CD45 (BD Pharmingen™), PE Mouse anti-Rat CD90/Mouse CD90.1 (BD Pharmingen™), y V450 Hamster Anti-Rat CD29 (BD Horizon™); y se lavan 3 veces con 200 μ L de PBS por centrifugación (300 g, 8 min, 4°C). Cada sistema se analiza por triplicado en un citómetro de flujo (Miltenyi Biotec, Macsquant Analyser, Alemania) y como control se analiza una alícuota de MSCs sembradas en placa (cultivo 2D) y cultivadas durante 12 horas.

Ensayos *in vivo*

Para los ensayos *in vivo* se utilizan ratas macho Sprague Dawley de entre 250 g y 300 g. Los experimentos se realizan previa aprobación del Comité de Ética y Cuidado Animal de la Universidad de La Laguna, siguiendo el reglamento europeo vigente (2010/63/UE). Las ratas, antes y después de la intervención, se estabulan bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura de 22°C y con comida y agua *ad libitum*. Los grupos experimentales aparecen detallados en la Tabla 1.

- *Técnica quirúrgica*

Las ratas se anestesian con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) por vía intraperitoneal, y por esta misma vía se administra una dosis de buprenorfina (Buprex®) (0,05mg/kg) como analgésico.

Previo a la intervención se rasura la cabeza de la rata y se trata con povidona yodada (Betadine®). Seguidamente se realiza una incisión sagital a lo largo del cráneo, desplazando la piel y la gálea aponeurótica hacia los extremos y dejando la calota expuesta. Una vez preparada la rata y con la ayuda de una fresa, se practica un defecto crítico, circular y transóseo de 8 mm de diámetro [Spicer et al., 2012] situado entre la bregma y el lambda, a lo largo de la sutura sagital. Por último, antes de revertir la

anestesia con atipamezol (Antisedan[®]) (1 mg/kg), la matriz se coloca en el lugar del defecto y la herida se cierra con grapas quirúrgicas.

A las 12 y 36 horas de la operación, los animales reciben una nueva dosis, esta vez subcutánea, de Buprex[®].

Grupos	Especificaciones
C	Defecto vacío/grupo control
P-B ^a	Blanco
P-BMP ^{a, b}	6 μ g de BMP-2
P-MSO/O/N	2x10 ⁵ MSCs (12 h de cultivo)
P-MSO-3w	2x10 ⁵ MSCs (3 semanas de cultivo)
P-BMP-MSO-O/N	2x10 ⁵ MSCs (12 h de cultivo) y 6 μ g de BMP-2
P-BMP-MSO-3w	2x10 ⁵ MSCs (3 semanas de cultivo) y 6 μ g de BMP-2
AP-B ^a	Blanco
AP-BMP ^{a, b}	6 μ g de BMP-2
AP-MSO/O/N	2x10 ⁵ MSCs (12 h de cultivo)
AP-BMP-MSO-O/N	2x10 ⁵ MSCs (12 h de cultivo) y 6 μ g de BMP-2
AP-PDGF-250 ^b	250 ng de PDGF
AP-PDGF-500	500 ng de PDGF
AP-BMP-PDGF-250	250 ng de PDGF y 6 μ g de BMP-2
AP-BMP-PDGF-500	500 ng de PDGF y 6 μ g de BMP-2

Tabla 1. Grupos experimentales de 9 ratas cada uno. (a) Incluye 3 ratas adicionales para ensayos de degradación y (b) 5 ratas para los ensayos de cesión.

- *Ensayos de cesión in vivo de los GFs*

Los perfiles de cesión de la BMP-2 y del PDGF se monitorizan periódicamente según el método no invasivo descrito y validado previamente por el grupo de investigación [Delgado et al., 2006]. Para ello, la radiactividad remanente en el defecto se mide con un contador gamma tipo sonda (Captus[®], Nuclear Iberica) (Figura 1) acoplado a un colimador de 3,2 x 2 cm.



Figura 1. Medida de la radiactividad remanente en defecto crítico de cráneo de rata haciendo uso de un contador gamma tipo sonda (Captus®, Nuclear Iberica).

Las ratas se sedan a cada tiempo de muestreo con Ketamina (75-100 mg/Kg) y se toman 5 medidas (1 min, 27 KeV) de la radiactividad remanente en el defecto. El promedio tomado tras la implantación (tiempo cero) se considera como la dosis total administrada (100 %) y el porcentaje de GF cedido a cada tiempo se obtiene por la diferencia entre la dosis y la radiactividad remanente a cada tiempo; todo ello corregido por el decay asociado al trazador ^{125}I ($t_{1/2} = 60$ días).

Los tiempos de muestreo para la BMP-2 son 0, 1, 4, 7, 10, 14, 21 y 30 días, mientras que para el PDGF se recogen datos a los días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 11 y 14.

El factor de similitud f_2 se utiliza para comparar los perfiles de cesión de la BMP-2 [Moore and Flanner, 1996]:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R1 - R2)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

R1 y R2 son los porcentajes acumulados de BMP-2 cedidos desde cada uno de los sistemas 1 y 2 a un tiempo determinado, y n es el número total de puntos comparados. Una diferencia promedio entre ambos perfiles de cesión de más del 10 % hace que el valor de f_2 sea menor de 50. De forma general se acepta que valores entre 50 y 100 indican similitud de perfiles [FDA, CDER].

Ensayos de degradación in vivo de los sistemas P- y AP-scaffold

Para estudiar la evolución de las matrices a lo largo del ensayo *in vivo* se utilizan 12 animales: a 6 de ellos se les implantan las matrices blancas (P-B y AP-B) y a los otros 6 las combinadas con BMP-2 (P-BMP y AP-BMP). Los tiempos de estudio son diferentes en función del polímero utilizado, siendo de 4 semanas para la degradación de las microesferas de PLGA 50:50 contenidas en el *AP-scaffold*, y de 12 para las de PLGA 75:25 contenidas en el *P-scaffold*. Una vez extraídos, los sistemas se lavan con agua MQ (Millipore, milli-Q gradient A10 Water Purification System), se separa el comprimido central del anillo externo de β -TCP, y se liofilizan.

El comprimido central se analiza por cromatografía de permeación en gel (GPC) junto con los controles a tiempo cero (microesferas sin implantar) y los polímeros de partida utilizados en la elaboración de las microesferas. Las muestras se analizan disueltas en THF (Merck) con un cromatógrafo Waters®, equipado con una bomba (Modelo 510), un inyector Rheodyne, un detector del índice de refracción diferencial (Modelo 410) y tres columnas (Styragel® HR4, HR3, y HR1) a 31°C, utilizando THF (1 mL/min) como fase móvil. Como referencia se utiliza poliestireno monodisperso (Tokyo Soda), y haciendo uso del software *Waters Breeze* se determinan los pesos moleculares y la polidispersividad.

Para determinar la evolución del fosfato tras 4 y 12 semanas de implantación, los anillos externos se analizan por difracción de rayos X (XRD) (Phillips X'pert automated diffractometer), junto con los sistemas sin implantar como control a tiempo cero y el hueso nativo, usando radiación Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Los patrones de identificación de fases se recogen en etapas de escaneado de $0,05^\circ$ en 2θ , en todo el rango angular de $5 < 2\theta \leq 80^\circ$ y a una velocidad de barrido de $0,01^\circ/\text{s}$ (2 s por etapa).

Evaluación del tejido regenerado

- *Análisis macroscópico y radiológico*

Previo al procesado de la muestra se toman fotografías con el estereomicroscopio (Leica M205 C) y radiografías con un equipo de rayos X (Philips Optimus, 44 kV, 3,6 mA/s y 15,4 mSv).

- *Histología, inmunohistoquímica y evaluación histomorfométrica*

Para determinar el efecto regenerativo de la BMP-2, del PDGF, de las MSCs sembradas en las matrices y las combinaciones entre ellos, la evolución del defecto crítico en cráneo de rata se examina en 15 grupos (Tabla 1) de 9 ratas cada uno a 4, 8 y 12 semanas tras la implantación.

Las muestras se fijan con una disolución de formaldehído al 10 % (pH 7,4), se decalcifican con Histofix® decalcifier 3 DC y se deshidratan con series crecientes de alcoholes. Las piezas se incluyen en Paraplast® y se realizan numerosos cortes de 3 a 5 μ m de grosor utilizando un microtomo (Microm HM325, Thermo Scientific).

La formación de tejido óseo se identifica por tinción con Hematoxilina-eritrosina, mientras que el grado de mineralización del hueso se analiza con tinción VOF tricrómica (Verde luz, Naranja G y Fucsina), donde las zonas teñidas de rojo y marrón indican mineralización avanzada, y las regiones azules se corresponden con escasa mineralización. Los cortes histológicos se analizan por microscopía óptica (Leica DM 4000 B) y mediante un analizador de imágenes computarizado (Leica Q-win v3 Pro-image Analysis System, Barcelona, España).

La región de interés (ROI) para la evaluación cuantitativa del hueso formado se define como el área de tejido dentro del defecto y consiste en una región circular de 50 mm²,

cuyo centro coincide con el centro del propio defecto. El porcentaje de hueso formado se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reparación} = \frac{\text{área del nuevo hueso formado}}{\text{área del defecto original en el ROI}} \times 100$$

La neovascularización del tejido se cuantifica determinando la densidad de vasos sanguíneos y la superficie de los mismos dentro de la ROI. Para ello, las secciones se marcan con antisuero del factor policlonal anti-Von Willebrand (1/50) (DAKO, Barcelona, España), cuya especificidad se confirma al reemplazar el antisuero específico por suero normal. La densidad de vasos sanguíneos se expresa en valor absoluto, y la superficie de vasos en mm^2 .

- *Análisis estadístico*

En análisis estadístico se realiza con el software SPSS.19. Se comparan los diferentes tratamientos a cada punto (4, 8 y 12 semanas post-implantación) usando el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney y un nivel de significatividad de $p < 0.05$. Los resultados se dan como \pm SD.

RESULTADOS

Caracterización de los sistemas P- y AP-scaffold

La masa, el tamaño, la superficie específica (área BET) y la porosidad de la estructura externa de β -TCP y del comprimido de microesferas, se reflejan en la Tabla 2.

	Estructura <i>P-scaffold</i>	Estructura <i>AP-scaffold</i>	Comprimido <i>P-scaffold</i>	Comprimido <i>AP-scaffold</i>
Porosidad % (método gravimétrico)	77,27 \pm 0,02	76,55 \pm 0,02	28,35 \pm 0,02	20,95 \pm 0,02
Porosidad % (porosimetría de mercurio)	-	-	23,6	21,6
Superficie específica (m ² /g)	0,95 \pm 0,03	1,04 \pm 0,03	-	-
Volumen total de poro de poros <140 nm (mm ³ /g)	1,32	1,47	-	-
Peso (mg)	44,59 \pm 4,82	46,70 \pm 0,53	14,6 \pm 0,25	14,6 \pm 0,5
Diámetro (mm)	7,94 \pm 0,17	7,94 \pm 0,17	3,05 \pm 0,01	3,05 \pm 0,01
Orificio interno (mm)	3,10 \pm 0,05	3,10 \pm 0,05	-	-
Altura (mm)	1,56 \pm 0,11	1,56 \pm 0,11	2,03 \pm 0,05	1,88 \pm 0,08

Tabla 2. *Parámetros morfológicos y físicos de los sistemas P- y AP-scaffold.*

El diámetro medio de las microesferas y el rendimiento de encapsulación de la BMP-2 es de 182,7 μ m y de 78,1 \pm 9 % para las microesferas de PLGA 75:25, y de 191,1 μ m y 71,4 \pm 5,8 % para las elaboradas con PLGA 50:50 respectivamente, mientras que el rendimiento de incorporación del PDGF sobre la capa de alginato entrecruzado es del 95,4 \pm 6 %.

Las imágenes de SEM revelan la presencia de un mayor número de poros en la superficie de las microesferas de PLGA 50:50 (Figura 2b) que en aquellas elaboradas con

el PLGA 75:25 (Figura 2a), sin embargo, como se verá más adelante, este hecho no se correlaciona con una mayor velocidad de cesión *in vivo*.

Por su parte, las imágenes de SEM de las microesferas ya comprimidas, evidencian la presencia de poros y espacios entre ellas (Figura 2c, d).

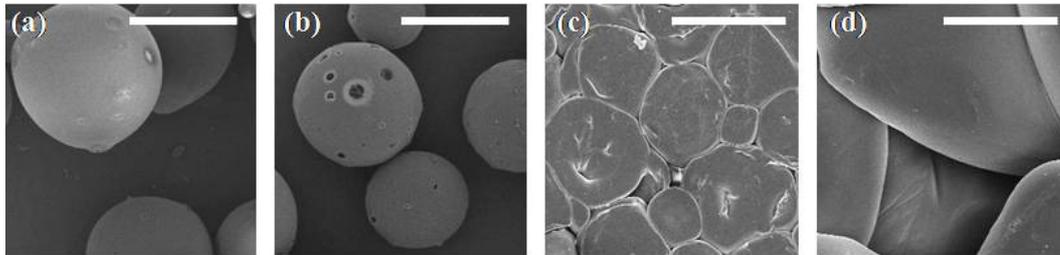


Figura 2. Imágenes al SEM de las microesferas de PLGA 75:25 (a) y de PLGA 50:50 (b). Superficie de los comprimidos de PLGA 75:25 (c) y su porosidad (d). Barras de escala: 100 μ m (a y b), 300 μ m (c) y 30 μ m (d).

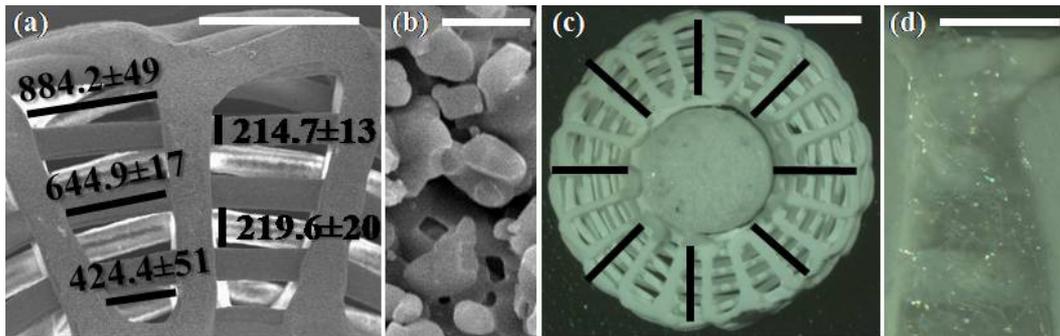


Figura 3. Imágenes al SEM de la estructura del P-scaffold con distancia entre barras y tamaño de las mismas en micras (a) y de los gránulos de β -TCP constituyentes de las barras (b). Imágenes al microscopio óptico del P-scaffold completo señalando las 8 regiones sobre las que se vierte el PDGF (c). Recubrimiento con alginato del AP-scaffold (d). Barras de escala: 1 mm (a), 5 μ m (b), 2 mm (c) y 500 μ m (d).

La macroporosidad de la estructura de fosfato se observa tanto al SEM (Figura 3a) como al estereomicroscopio (Figura 3c): la figura 3a refleja las distancias entre barras y el diámetro de las mismas, mientras que la figura 3c muestra el sistema *P-scaffold* ya listo para implantar.

Por su parte, la microporosidad de las estructuras de fosfato también se evalúa por SEM (Figura 3b) y AFM (Figura 4). Mientras que la primera técnica nos proporciona únicamente imágenes de las partículas de β -TCP, con la AFM observamos que el tamaño medio de grano es de 4,4 nm (Figura 4c) y que la distancia media entre ellos es de 27,4 nm (Figura 4d).

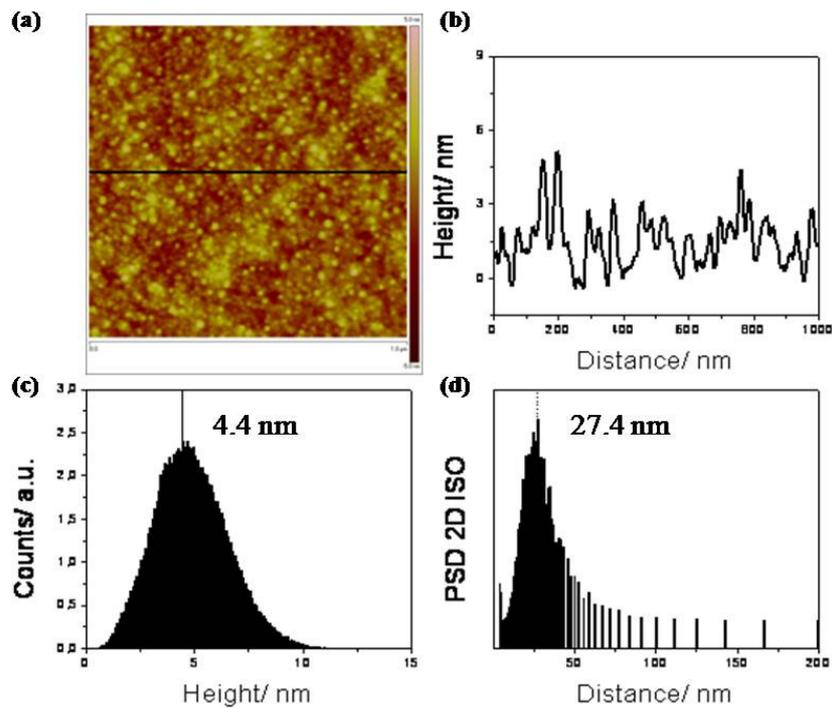


Figura 4. Parámetros e imágenes obtenidas por AFM. Imagen topográfica de una sección de $10 \mu\text{m}^2$ de la superficie de *P-scaffold* (a). Sección de la imagen anterior reflejando las variaciones de altura (b). Distribución en tamaño de las partículas de β -TCP (c). Distancia media entre las partículas de β -TCP (d).

Finalmente cabe destacar que la porosidad total del anillo externo del *P-scaffold* es ligeramente superior a la del anillo recubierto con alginato (Tabla 2) y que el volumen total de los poros de menos de 140 nm es mayor en éste último, así como su superficie específica (Tabla 2).

Por otro lado, el recubrimiento de las estructuras con una fina malla de alginato lo detectamos a simple vista (Figura 3d) y por AFM (Figura 5): mientras que en las imágenes correspondientes al *P-scaffold* se diferencian las partículas de β -TCP (Figura 5a, b), en las del *AP-scaffold*, su observación se hace imposible por la presencia del polisacárido entrecruzado (Figura 5c, d).

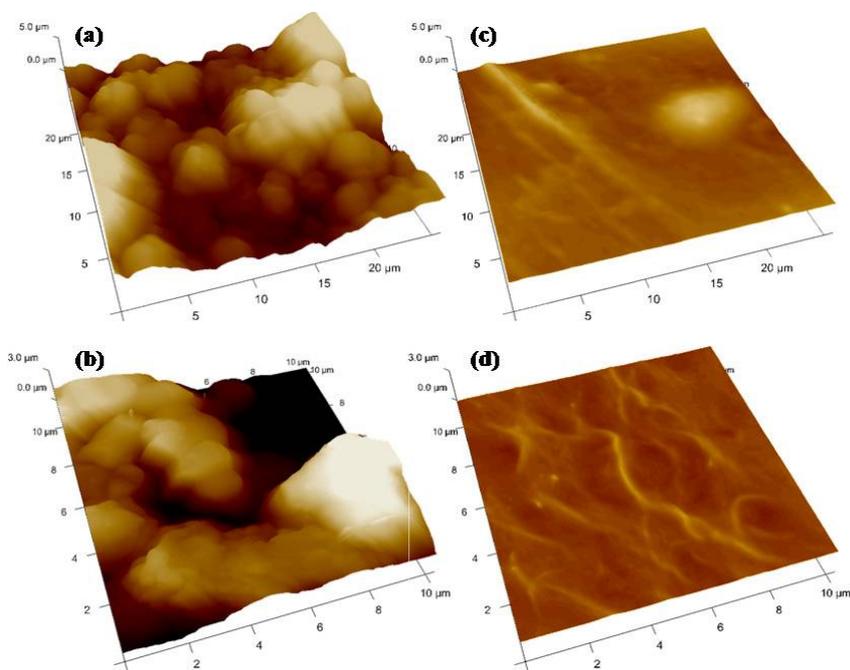


Figura 5. Imágenes de AFM de la superficie de las estructuras del *P-scaffold* de una sección de $25 \mu\text{m}^2$ (a) y otra de $10 \mu\text{m}^2$ (b), y del *AP-scaffold* de una sección de $25 \mu\text{m}^2$ (c) y otra de $10 \mu\text{m}^2$ (d).

Cultivos celulares

En comparación con las 2×10^5 MSCs sembradas inicialmente en los *P-scaffold*, el $25,1 \pm 4,9$ % consigue fijarse a la estructura tras 12 horas de incubación, mientras que tras 3 semanas de cultivo, el número de células alcanza el $140,2 \pm 8,9$ %. Por otro lado, el cultivo de las MSCs durante 12 horas sobre los *AP-scaffolds*, retiene al $34,6 \pm 3,0$ % de las células iniciales.

La tinción con calceína AM evidencia la adhesión de las células al *P-scaffold* y al *AP-scaffolds* tras 12 horas de cultivo (Figura 6a y 6c respectivamente), mientras que las imágenes obtenidas tras 3 semanas verifican la formación de puentes celulares entre las barras del *P-scaffold* y, en la mayoría de los casos, el completo relleno de sus poros (Figura 6b).

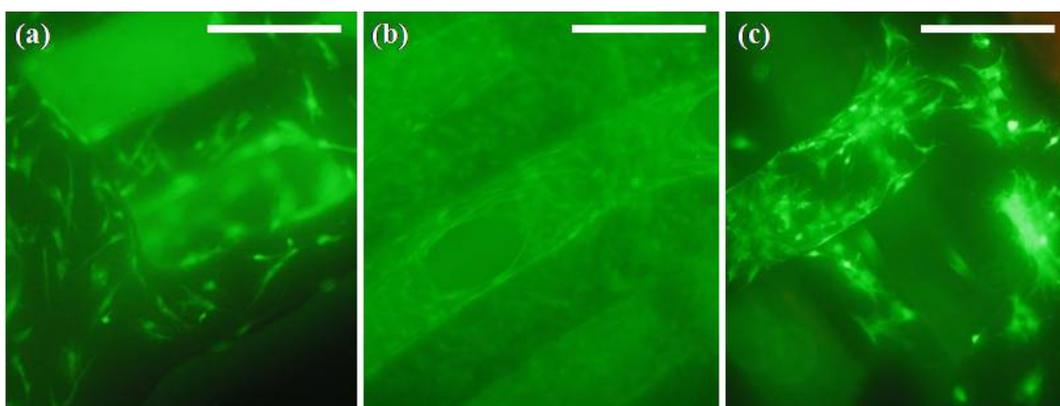


Figura 6. Imágenes al microscopio de fluorescencia invertido. (a) se corresponde con el *P-scaffold* tras 12 horas de cultivo, y (b) tras 3 semanas. (c) se corresponde con el *AP-scaffold* tras 12 horas de cultivo. Barra de escala: 200 μ m. Imágenes tomadas con cámara digital Canon (PowerShot A620, Tokio, Japón).

La citometría de flujo ratifica que las MSCs sembradas sobre las matrices no modifican su fenotipo independientemente del tipo de matriz y del tiempo de cultivo. Las células son positivas para los anticuerpos específicos de MSCs de rata (CD90 y CD29), y en mucha menor intensidad para CD45, que es un anticuerpo específico de células hematopoyéticas y leucocitos. Las MSCs cultivadas en placa como control, son positivas para CD90 (91,19 %) y CD29 (67,12 %), y menos de un 4 % de las células para CD45 (Tabla 3 y Figura 7). Las células cultivadas en las matrices presentan valores similares a las células control y concuerdan con los resultados esperados y descritos previamente por Boxall y Jones [2012].

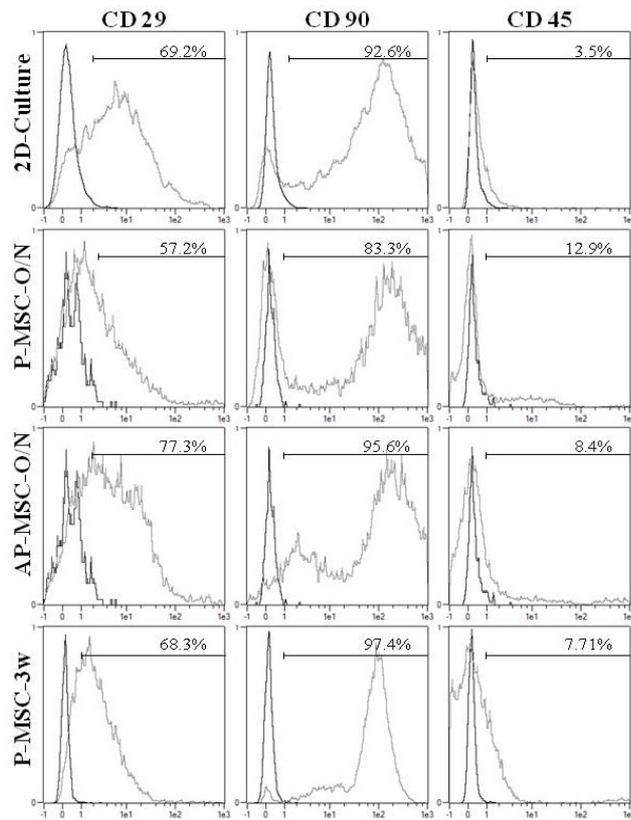


Figura 7. Análisis representativo de los marcadores de superficie elegidos para caracterizar las MSCs cultivadas en placa (Cultivo 2D) y en los sistemas AP-scaffold y P-scaffold. En este último sistema se estudiaron las diferencias entre dos tiempos de cultivo: 12 horas y 3 semanas. Los histogramas se corresponden con una de las tres muestras estudiadas para cada sistema.

	CD 29 (%)	CD 90 (%)	CD45 (%)
Cultivo 2D	67,12±2,09	91,19±1,53	3,17±0,25
P-MSC-O/N	59,70±4,95	90,60±8,36	10,47±3,98
AP-MSC-O/N	78,96±1,50	94,83±1,18	9,58±1,49
P-MSC-3w	75,60±9,53	92,32±4,46	5,60±1,83

Tabla 3. Porcentaje de células positivas para cada uno de los anticuerpos (CD90, CD29 y CD45). Los valores resultan de la media obtenida de tres experimentos independientes.

Ensayo de cesión in vivo de los GFs

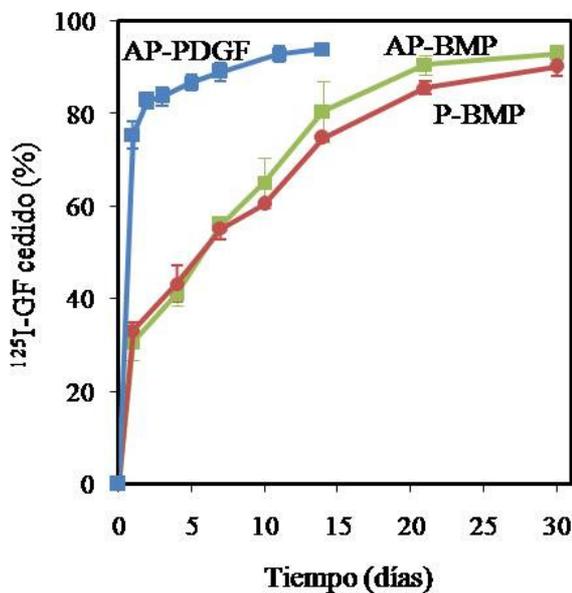


Figura 8. Perfil de cesión de la ^{125}I -BMP-2 desde el P-scaffold y desde el AP-scaffold, así como del ^{125}I -PDGF desde el AP-scaffold. $n=5$.

Los perfiles de cesión de la BMP-2 desde los dos sistemas (Figura 8) son similares ($f_2=70,51$). Durante las primeras 24 horas de ensayo, la cantidad de BMP-2 cedida desde los sistemas P- y AP-scaffold asciende al 30 % de la dosis inicialmente administrada, lo que se corresponde con 1,8 μg . Tras esta liberación inicial, el 90% de la BMP-2 se cede desde el implante a una velocidad de 200 ng/día (3 %/día).

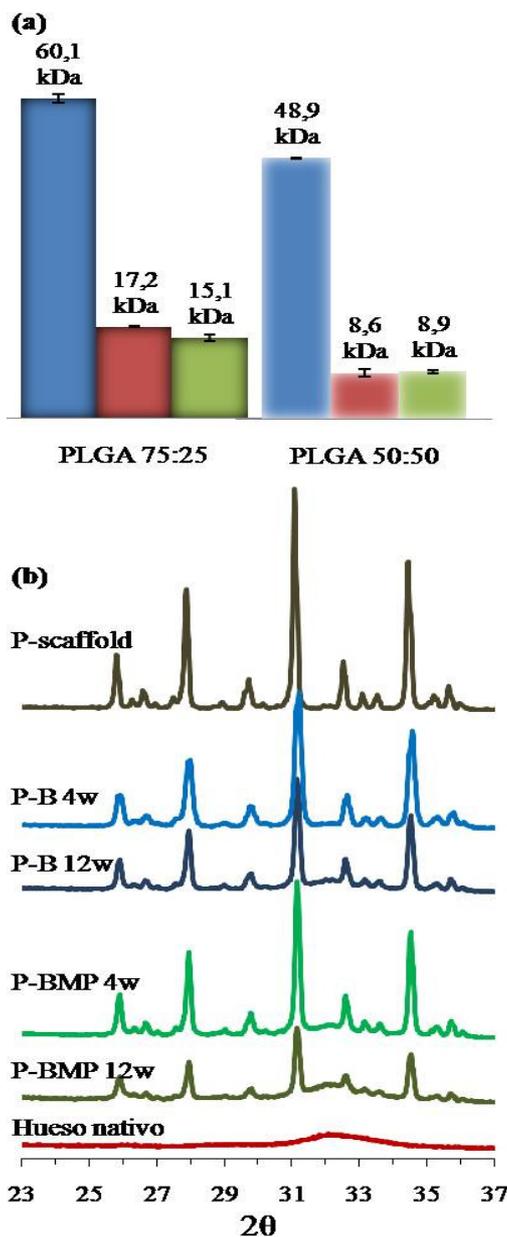
En cuanto al perfil de cesión del PDGF adsorbido a la superficie de alginato entrecruzado, más de un

80% de la proteína se cede durante los dos primeros días, y el resto se libera a una velocidad de 1%/día a lo largo de los 12 días siguientes (Figura 8).

Ensayo de degradación in vivo de los sistemas P- y AP-scaffold

El peso molecular (Mw) de las microesferas de PLGA 75:25 (60 kDa) implantadas en el cráneo de rata decrece hasta 16 kDa a lo largo de las 12 semanas de estudio (Figura 9a), mientras que las microesferas de PLGA 50:50 (50 kDa) ven disminuido su peso molecular hasta los 8,7 kDa tras 4 semanas de implantación (Figura 9a). El tiempo de estudio de estas últimas se redujo a 4 semanas, porque en los cortes histológicos de 8 y 12 semanas no se detectaron. Por su parte, entre los grupos tratados con BMP-2 (P-BMP y AP-BMP) y los no tratados (P-B y AP-B) no se encontraron diferencias a destacar.

Figura 9.- Evolución del Mw del PLGA 75:25 tras 12 semanas y del PLGA 50:50 tras 4 semanas post-implantación. Microesferas sin implantar [azul]. Grupos blancos (P-B y AP-B) [verde]. Grupos con BMP-2 (P-BMP y AP-BMP) [rojo] (a). Evolución de la estructura de β -TCP a 4 y 12 semanas de implantación (b).



En cuanto al anillo de β -TCP, en el análisis de difracción de rayos X (XRD) se confirma la existencia de picos invariables entre 27,8 y 28,2, entre 30,9 y 31,1 y entre 34,2 y 34,7, que evidencian que el anillo no se ha modificado (Figura 9b).

Por su parte, es de señalar que en los espectros pertenecientes a las muestras tratadas con BMP-2 a 4 y 12 semanas, hay una pérdida de línea de base, entre 30,85 y 35,17, que

coincide con la detectada en hueso nativo (Figura 9b) y que confirma la aparición de tejido óseo dentro del entramado del sistema.

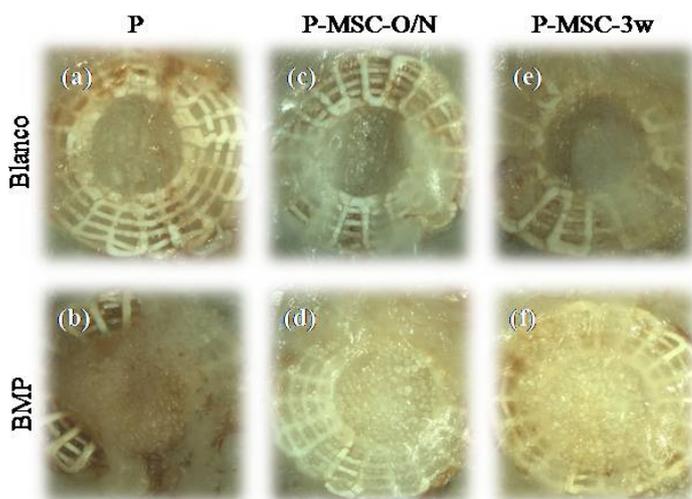


Figura 10. Vista macroscópica de la cara interna del cráneo de rata a 12 semanas de implantación del sistema P-scaffold. Imágenes tomadas con estereomicroscopio (Leica M205 C).

Además, el anillo de β -TCP conserva su estructura a lo largo de todo el estudio, lo que se evidencia a nivel macroscópico (Figuras 10 y 11), en las radiografías (Figuras 12 y 13) y en cualquiera de los cortes histológicos (Figuras 14-21).

Evaluación del tejido regenerado

- Análisis macroscópico y radiológico

En el análisis macroscópico de los grupos blancos se observa un tejido semitransparente, mientras que en las muestras tratadas con BMP-2, a las 12 semanas se

detecta una estructura densa similar al tejido adyacente (Figuras 10 y 11) que, en algunos casos, recubre totalmente a la matriz.

Por su parte, las imágenes radiológicas reflejan la evolución de los diferentes grupos y van en concordancia con los resultados histológicos e imágenes macroscópicas, pues la mayor regeneración se observa en las muestras tratadas con BMP-2. Las Figuras 12 y 13 reflejan el diferente grado de reparación entre los grupos tratados con BMP-2 y los no tratados en el *P*- y *AP-scaffold* respectivamente, así como las diferencias entre los tres tiempos de estudio (4, 8 y 12 semanas).

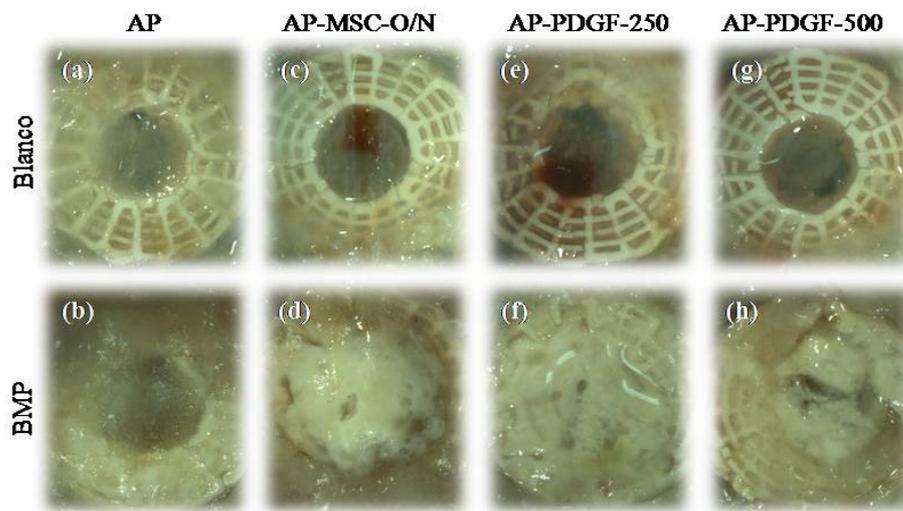


Figura 11. Vista macroscópica de la cara interna del cráneo de rata a 12 semanas de implantación del sistema *AP-scaffold*. Imágenes tomadas con estereomicroscopio (Leica M205 C).

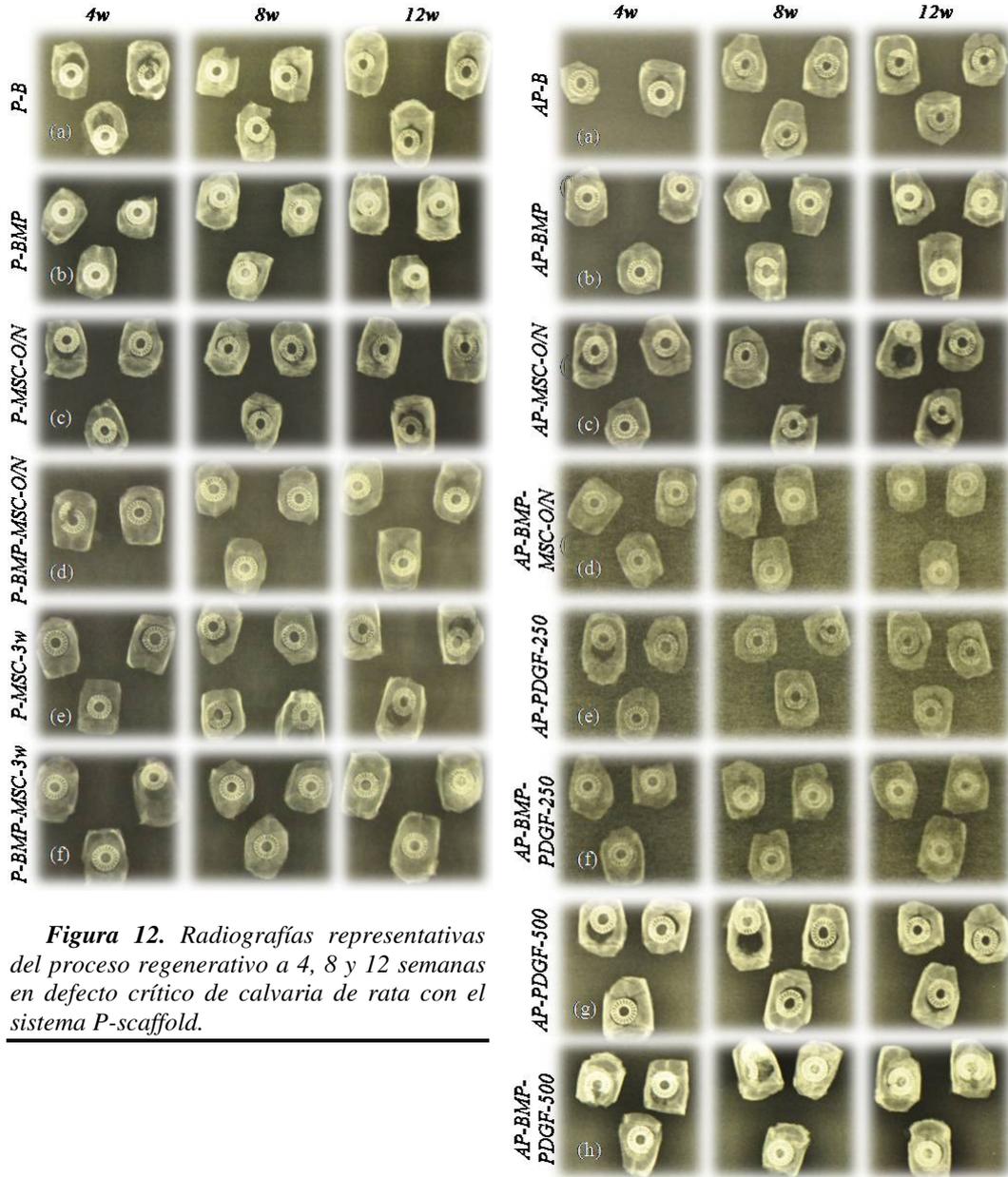


Figura 12. Radiografías representativas del proceso regenerativo a 4, 8 y 12 semanas en defecto crítico de calvaria de rata con el sistema P-scaffold.

Figura 13. Radiografías representativas del proceso regenerativo a 4, 8 y 12 semanas en defecto crítico de calvaria de rata con el sistema AP-scaffold.

- Evaluación histológica

En los grupos control (C) y blancos (P-B y AP-B) no se distingue regeneración ósea significativa a ninguno de los tiempos de muestreo (Figura 14a-f), no obstante, cabe señalar que la cantidad de hueso formado al implantar el sistema blanco es ligeramente superior a 12 que a 4 semanas.

A 4 semanas tras la implantación se observa un ligero aumento en el grado de reparación ósea en los grupos P-BMP (Figura 15a), AP-BMP (Figura 15b) y en sus combinaciones con MSCs (P-BMP-MSO/N (Figura 15c), P-BMP-MSO-3w (Figura 15e) y AP-BMP-MSO/N (Figura 15d)), detectándose la formación de hueso tanto alrededor de la estructura de fosfato como en la zona central de la misma (Figura 15a-e). Imágenes detalladas

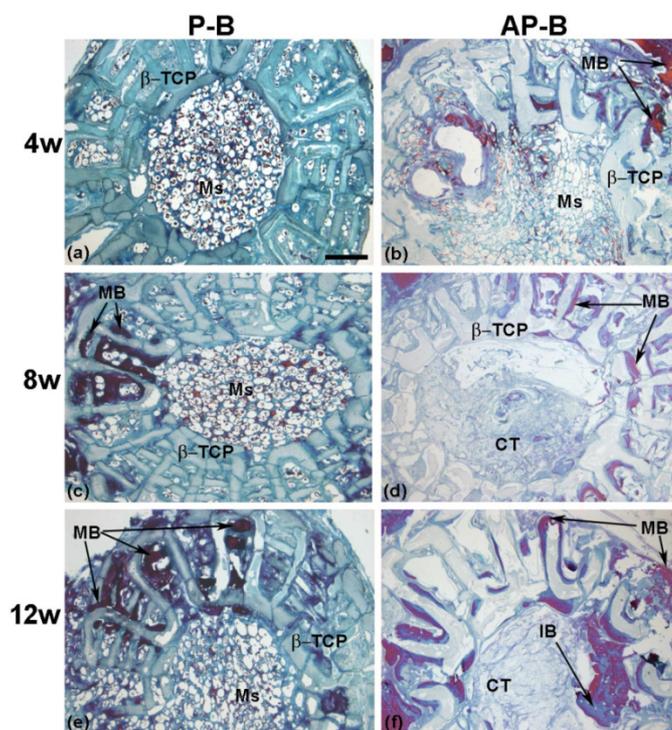


Figura 14. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo de rata pertenecientes al grupo P-B y AP-B a las 4 (a y b), 8 (c y d) y 12 semanas (e y f). La estructura de β -TCP (a-f) y las microesferas en el sistema P-scaffold (a, c y e) se detectan fácilmente a los tres tiempos experimentales. CT: tejido conectivo; β -TCP: fosfato β -tricalcico; Ms: microesferas; IB: hueso inmaduro; MB: hueso mineralizado. Barra de escala = 1 mm.

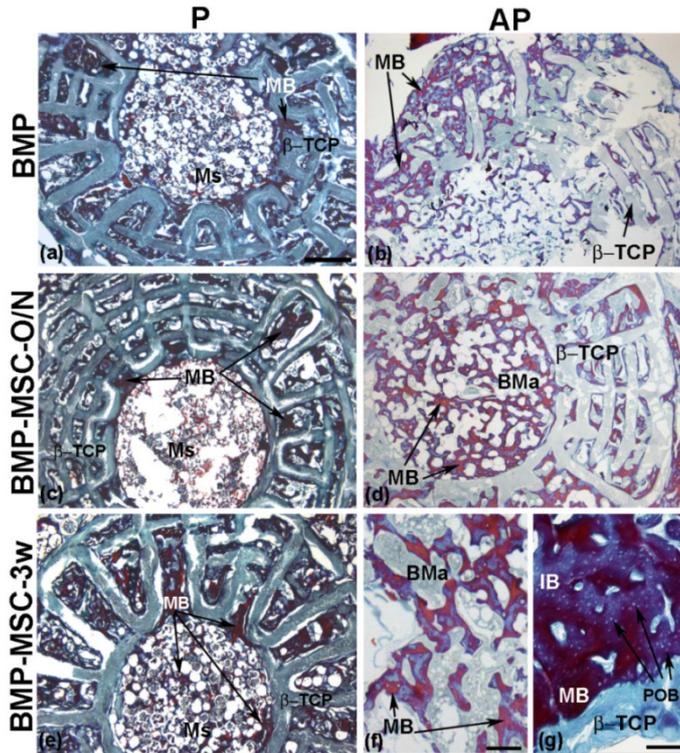


Figura 15. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo de rata pertenecientes al grupo P-BMP (a), AP-BMP (b), P-BMP-MSC-O/N (c), AP-BMP-MSC-O/N (d) y P-BMP-MSC-3w (e), revelando diferentes grados de reparación a las 4 semanas de la implantación. (f) y (g) muestran, de forma detallada, la formación de hueso y médula ósea en el orificio central del sistema (f), así como la presencia de hueso mineralizado (rojo) y áreas de hueso inmaduro (azul) con numerosas células pre-osteoblásticas (g). β -TCP: fosfato β -tricálcico; Ms: microsferas; IB: hueso inmaduro; MB: hueso mineralizado; BMa: médula ósea; POB: células pre-osteoblásticas. Barra de escala = 1 mm (a-e), 200 μ m (f), 100 μ m (g).

revelan que la mayor parte del espacio aparece ocupado por médula ósea (Figura 15f) y un gran número de células pre-osteoblásticas (Figura 15g).

En cuanto a los grupos del AP-scaffold tratados con MSCs (Figura 16a), PDGF (Figura 16b, c) y PDGF combinado con BMP-2 (Figura 16d, e), la respuesta es escasa, y el tejido formado presenta baja mineralización y se localiza fundamentalmente en la periferia del defecto (Figura 16a-e). Por su parte, los grupos P-MSC-O/N (Figura 17a) y P-MSC-3w (Figura 17b), aunque inducen mayor respuesta que el equivalente del AP-scaffold, tampoco muestran gran poder regenerativo.

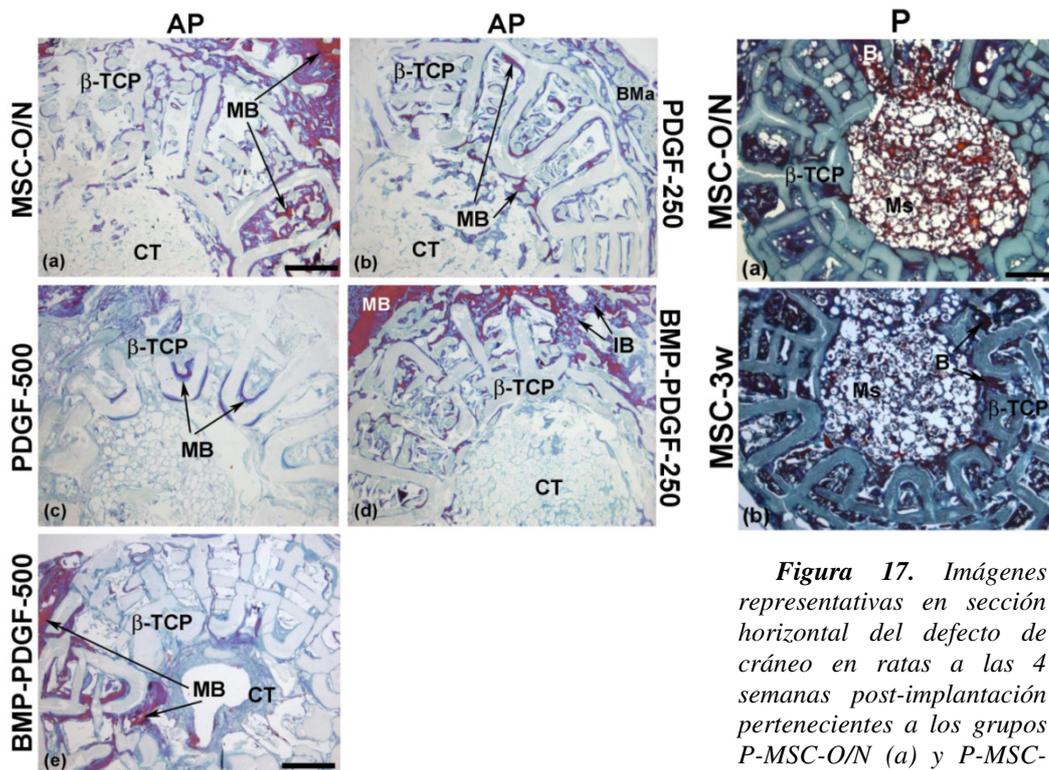


Figura 16. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo de rata pertenecientes al grupo AP-*MSC-O/N* (a), AP-*PDGF-250* (b), AP-*PDGF-500* (c), AP-*BMP-PDGF-250* (d) y AP-*BMP-PDGF-500* (e), revelando escaso grado de reparación a las 4 semanas de la implantación. CT: tejido conectivo; β -TCP: fosfato β -tricálcico; BMa: médula ósea; Ms: microesferas; IB: hueso inmaduro; MB: hueso mineralizado. Barra de escala = 1 mm.

Figura 17. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo en ratas a las 4 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos P-*MSC-O/N* (a) y P-*MSC-3w* (b) mostrando escasa formación de hueso alrededor del anillo de β -TCP. B: hueso neoformado, Ms: microesferas, β -TCP: beta-fosfato tricálcico. Barra de escala = 1 mm.

Tras 8 semanas de implantación, los grupos AP-*PDGF-250* (Figura 18a), AP-*PDGF-500* (Figura 18c), AP-*MSC-O/N* (Figura 18e), P-*MSC-O/N* (Figura 18b) y P-*MSC-3w* (Figura 18d) experimentan un aumento ligero en su respuesta con respecto a las 4 semanas, mientras que todos los grupos tratados con BMP-2 (Figura 19a, b) y sus

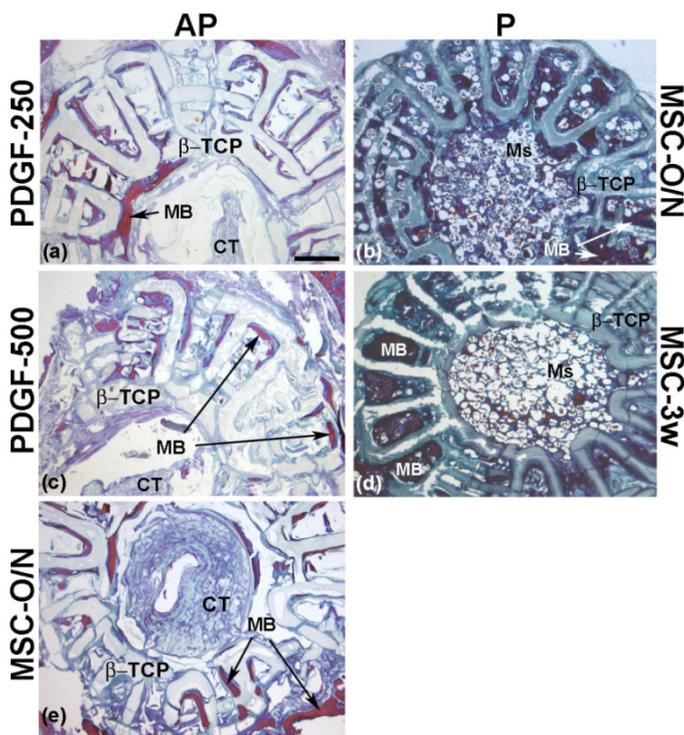


Figura 18. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo en ratas a las 8 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos AP-PDGF-250 (a), P-MSC-O/N (b), AP-PDGF-500 (c), P-MSC-3w (d) y AP-MSC-O/N (e) mostrando diferentes grados de reparación. CT: tejido conectivo; β -TCP: fosfato β -tricálcico; Ms: microesferas; MB: hueso mineralizado. Barra de escala = 1 mm

combinaciones con MSCs o PDGF (Figura 19c-g) presentan un incremento significativo en la respuesta y el hueso inmaduro va apareciendo alrededor de los límites del defecto (Figura 19a-g). Es de destacar el hecho de que sólo en los grupos del sistema *P-scaffold*, las microesferas de PLGA 75:25, permanecen en la zona central de la matriz (Figura 19a, c, e).

A las 12 semanas, mientras que en los grupos P-B (Figura 14e), AP-B (Figura 14f), AP-MSC-O/N (Figura 20b), AP-PDGF-250 (Figura 20d) y AP-PDGF-500 (Figura 20e) no

se observan diferencias con respecto a las 8 semanas (Figura 18), los grupos P-MSC-O/N (Figura 20a) y P-MSC-3w (Figura 20c) muestran un cierto aumento en la formación de hueso. Los grupos tratados con BMP-2 (P-BMP (Figura 21a) y AP-BMP (Figura 21b)) y sus combinaciones con células (P-BMP-MSC-O/N (Figura 21c), P-BMP-MSC-3w (Figura 21e) y AP-BMP-MSC-O/N (Figura 21d)) exhiben un importante aumento en la

regeneración ósea, siendo mayor en aquellos en los que se combinaron MSCs y BMP-2 que en los tratados únicamente con BMP-2.

Por otro lado, aunque tras 8 semanas los grupos de *AP-scaffold* tratados con las combinaciones de BMP-2 y PDGF (AP-BMP-PDGF-250 (Figura 19f) y AP-BMP-PDGF-500 (Figura 19g)) muestran una respuesta similar a la que se observa en los grupos AP-BMP (Figura 19b) y AP-BMP-MSC-O/N (Figura 19d), la respuesta en dichos grupos (AP-BMP-PDGF-250 (Figura 21f) y AP-BMP-PDGF-500 (Figura 21h)) a las 12 semanas es sustancialmente inferior a la que presentan los grupos AP-BMP (Figura 21b) y AP-BMP-

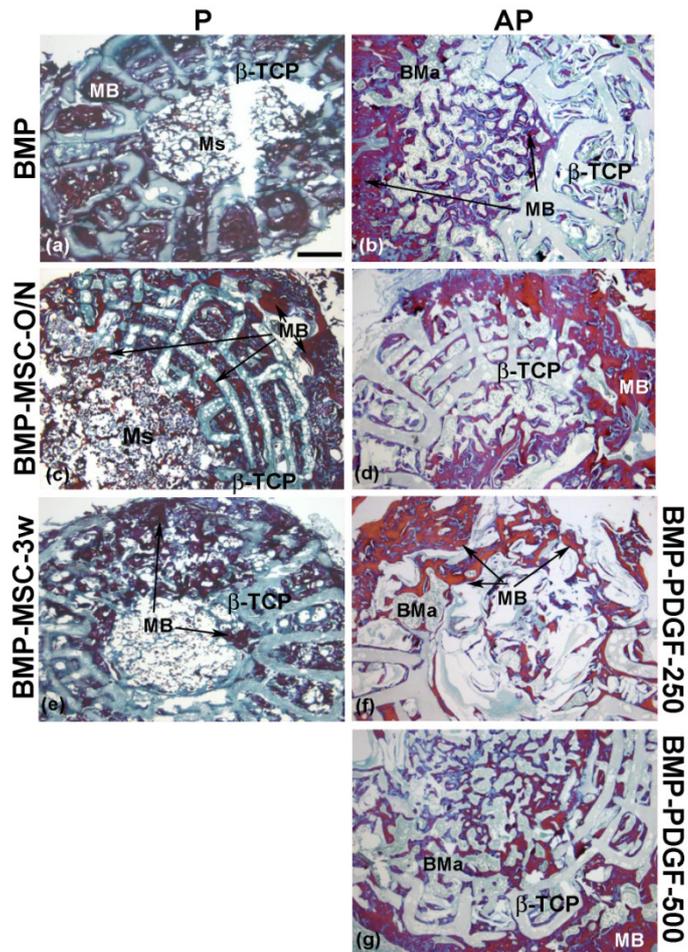


Figura 19. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo en ratas a las 8 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos P-BMP (a), AP-BMP (b), P-BMP-MSC-O/N (c), AP-BMP-MSC-O/N (d), P-BMP-MSC-3w (e), AP-BMP-PDGF-250 (f) y AP-BMP-PDGF-500 (g), evidenciando la presencia de nuevo hueso rodeando la estructura de β -TCP y rellenando el orificio central. β -TCP: beta-fosfato tricálcico; BMa: médula ósea; Ms: microesferas; MB: hueso mineralizado. Barra de escala = 1 mm.

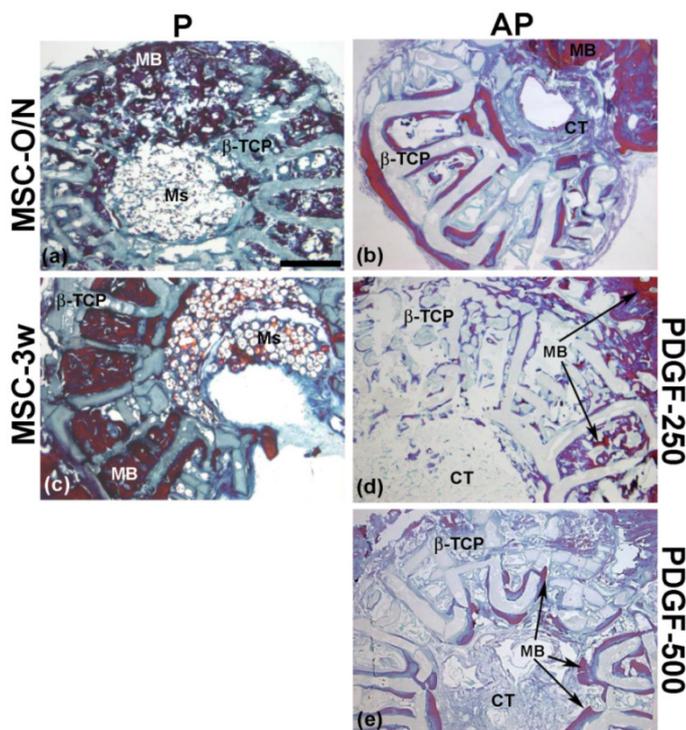


Figura 20. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo en ratas pertenecientes a los grupos P-*MSC-O/N* (a), AP-*MSC-O/N* (b), P-*MSC-3w* (c), AP-*PDGF-250* (d) y AP-*PDGF-500* (e). Tras 12 semanas, tanto alrededor del β -TCP como en el orificio central, se detecta cierta reparación del defecto con ambos sistemas. CT: tejido conectivo; β -TCP: fosfato β -tricalcico; Ms: microsferas; MB: hueso mineralizado. Barra de escala = 1 mm.

contacto íntimo con la estructura (Figura 21a-e).

Las matrices de β -TCP permanecen intactas en la zona durante todo el experimento. Sin embargo, aunque no se detectan signos de fagocitosis, en diferentes zonas de la estructura se observa erosión y fractura del sistema (Figuras 14-21) y, aunque las microsferas de PLGA 75:25 permanecen en el defecto durante las 12 semanas de estudio (Figura 21g), el hueso formado invade los espacios entre ellas y las recubre.

MSC-O/N (Figura 21d). De ahí podemos decir que la respuesta de la BMP-2 es menor cuando la combinamos con el PDGF que cuando se implanta de forma aislada.

En los grupos con menor respuesta, la formación de hueso se observa fundamentalmente en la periferia del defecto; en la zona externa de la matriz. Por el contrario, en aquellos grupos donde la respuesta es mayor, el tejido óseo invade toda la superficie del defecto y ocupa todos los espacios presentes entre las barras de β -TCP; apareciendo en

El análisis de las secciones transversales a 12 semanas muestra escasa formación de hueso en los grupos blancos y en aquellos tratados únicamente con MSCs o PDGF (Figura 22), pero en los grupos tratados con BMP-2 (Figura 23), se detecta mineralización muy similar a la del tejido adyacente. En los animales tratados con el *P-scaffold*, el grosor del hueso neoformado es ligeramente superior al observado en el hueso circundante, aunque gran parte de dicho espacio lo ocupan las microesferas de PLGA 75:25 y la estructura de β -TCP (Figura 23a, c, e). Por su parte, el grosor del hueso en aquellas ratas tratadas con el *AP-scaffold* es equivalente al del hueso adyacente (Figura 23b, d, f,

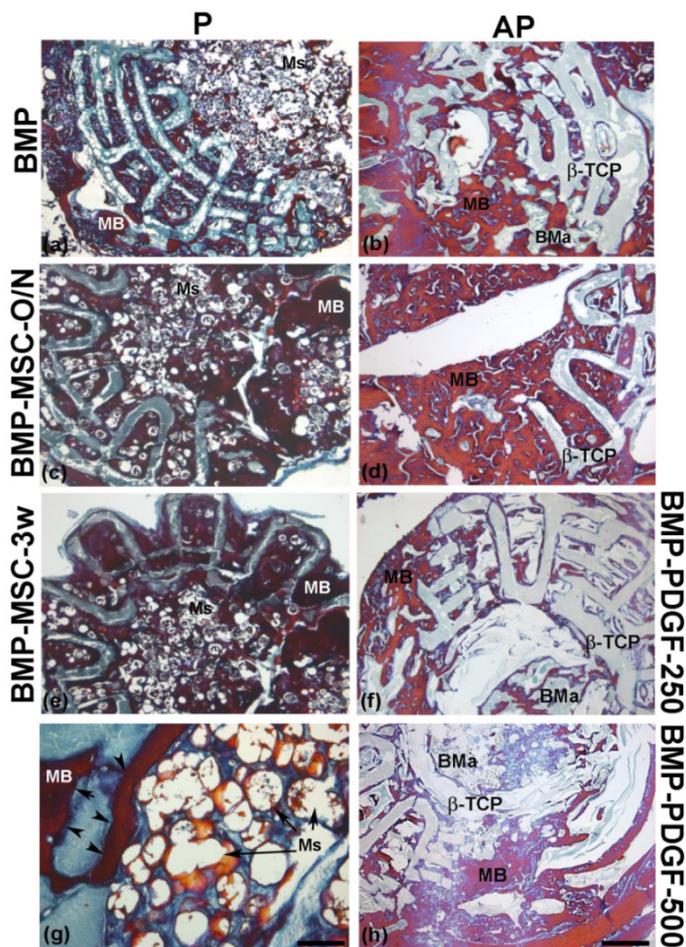


Figura 21. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo en ratas a las 12 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos *P-BMP* (a), *AP-BMP* (b), *P-BMP-MSC-O/N* (c), *AP-BMP-MSC-O/N* (d), *P-BMP-MSC-3w* (e), *AP-BMP-PDGF-250* (f) y *AP-BMP-PDGF-500* (h), evidenciando la mayor respuesta regenerativa de todo el experimento. (g) Detalle de la formación del hueso en el grupo *P-BMP* tras 12 semanas y la presencia de microesferas de PLGA 75:25. β -TCP: beta-fosfato tricálcico; BMa: médula ósea; Ms: microesferas; MB: hueso mineralizado. Barra de escala = 1 mm (a-f), 250 μ m (g), 100 μ m (h).

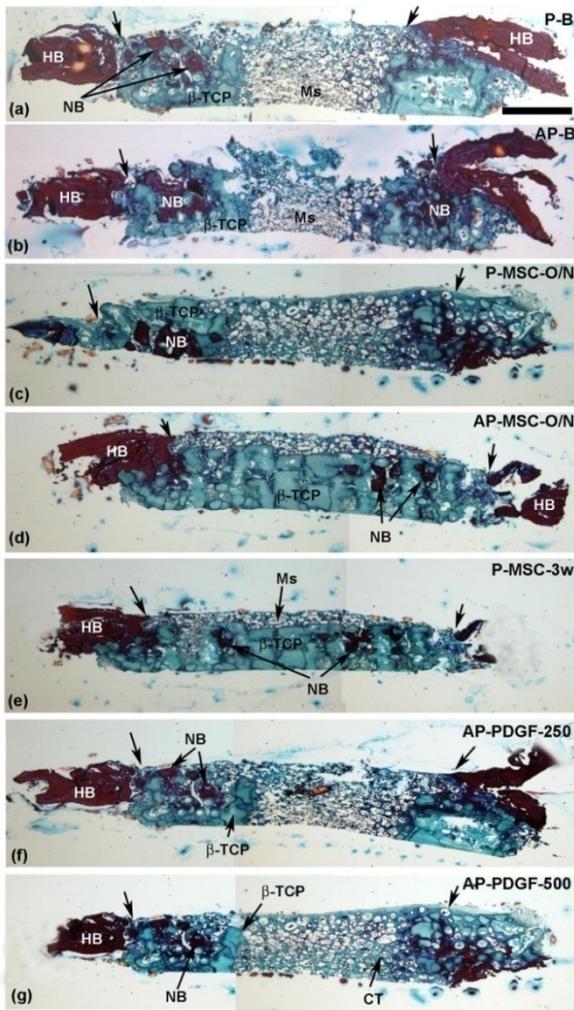


Figura 22. Imágenes representativas en sección transversal del defecto de cráneo en ratas a las 12 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos P-B (a), AP-B (b), P-MSC-O/N (c), AP-MSC-O/N (d), P-MSC-3w (e), AP-PDGF-250 (f) y AP-PDGF-500 (g) mostrando la estructura y grosor del tejido neoformado en cada uno de los grupos. Las flechas de los extremos señalan de manera aproximada los límites del defecto. HB: hueso hospedador, NB: hueso neoformado, CT: tejido conjuntivo, β -TCP: beta-fosfato tricálcico. Ms. Microesferas. Barra de escala: 1.1 mm.

g). Aun así, la estructura del hueso resultante al implantar cualquiera de los dos sistemas es muy similar a la del hueso contiguo.

Imágenes detalladas de los cortes histológicos revelan la presencia de hueso trabecular alrededor de los fragmentos de β -TCP (Figura 23h) y de médula ósea entre las trabéculas (Figura 23i). Estas mismas imágenes muestran la presencia de microesferas de PLGA 75:25 (Figura 23h) tras 12 semanas post-implantación y la completa desaparición de las fabricadas con PLGA 50:50 al finalizar el estudio (Figura 23i).

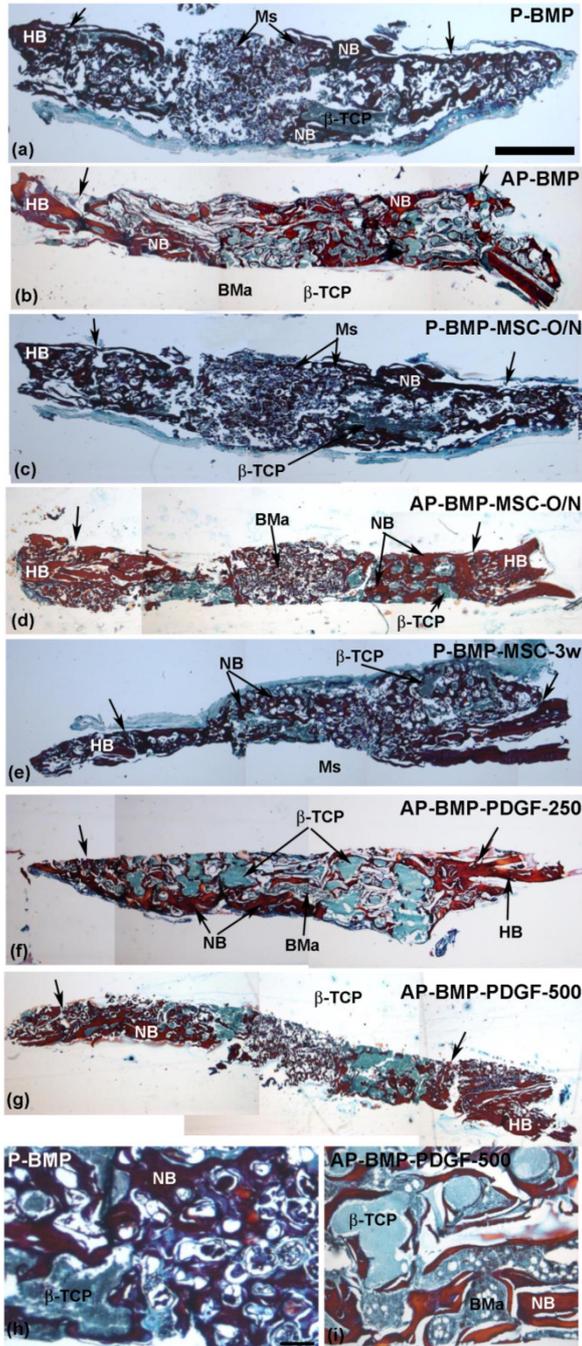


Figura 23. Imágenes representativas en sección transversal del defecto de cráneo en ratas a las 12 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos P-BMP (a), AP-BMP (b), P-BMP-*MSC-O/N* (c), AP-BMP-*MSC-O/N* (d), P-BMP-*MSC-3w* (e), AP-BMP-PDGF-250 (f) y AP-BMP-PDGF-500 (g) mostrando la estructura y grosor del hueso neoformado en cada uno de los grupos. Las flechas de los extremos señalan de manera aproximada los límites del defecto. Detalles a mayor aumento muestran el hueso neoformado totalmente integrado en la estructura del sistema (h) (i). Se observa claramente la presencia de fragmentos de β -TCP y microsferas de PLGA 75:25 inmersos en el hueso (h). La imagen (i) se corresponde con el grupo AP-BMP-PDGF-500 donde podemos observar la ausencia de microsferas de PLGA 50:50 y la presencia de médula ósea entre las trabéculas. HB: hueso hospedador, NB: hueso neoformado, β -TCP: beta-fosfato tricálcico, Ms: microsferas, BMa: médula ósea. Barra de escala: 1.1mm.

- Evaluación histomorfométrica

A las 4 semanas de la implantación, el análisis histomorfométrico confirma una reparación del 10 % al 25 % del área total del defecto, con diferencias significativas entre los grupos tratados con BMP-2 (P-BMP y AP-BMP) y sus combinaciones con MSCs (P-BMP-MSC-O/N, P-BMP-MSC-3w y AP-BMP-MSC-O/N), y el resto de grupos (Figuras 24 y 25).

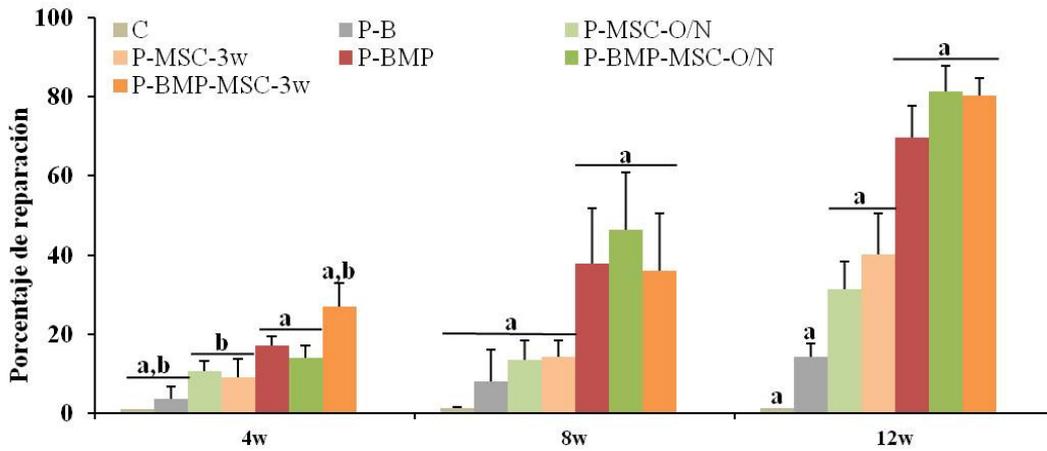


Figura 24. Análisis histomorfométrico. Gráfica comparativa de los diferentes grados de reparación (%) observados al implantar el sistema P-scaffold. La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

Tras 8 semanas, los grupos control, blancos (P-B y AP-B), los tratados con PDGF (AP-PDGF-250 y AP-PDGF-500) y los sembrados con MSCs (AP-MSC-O/N, P-MSC-O/N y P-MSC-3w), presentan una reparación de un 20 % aproximadamente, sin diferencias significativas entre ellos (Figuras 24 y 25), mientras que los grupos tratados con BMP-2 (P-BMP y AP-BMP) y sus combinaciones con PDGF (AP-BMP-PDGF-250 y AP-BMP-PDGF-500) y MSCs (P-BMP-MSC-O/N, P-BMP-MSC-3w y AP-BMP-

MSC-O/N) exhiben un 40 % de reparación, siendo este valor significativamente superior al del resto de grupos (Figuras 24 y 25).

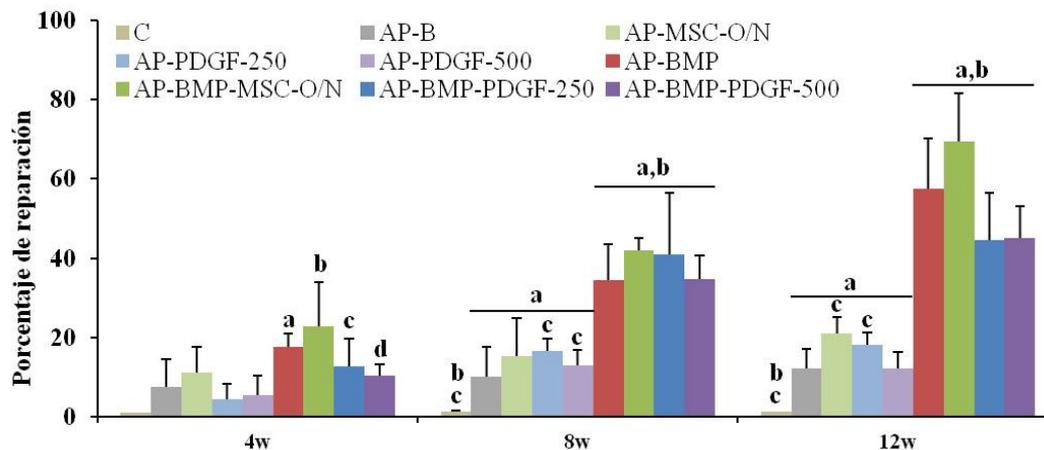


Figura 25. Análisis histomorfométrico. Gráfica comparativa de los diferentes grados de reparación (%) observados al implantar el sistema AP-scaffold. La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

Tras 12 semanas de implantación, el grado de reparación entre los grupos blancos (P-B y AP-B) y AP-MSC-O/N, AP-PDGF-250 y AP-PDGF-500 es muy similar a los valores observados tras 8 semanas (Figuras 24 y 25). Sin embargo, la reparación del defecto en los grupos sembrados con MSCs en el *P-scaffold* (P-MSC-O/N y P-MSC-3w) asciende a un 40 % presentando diferencias significativas con respecto al grupo blanco (P-B) (Figura 24). Los grupos tratados con BMP-2 (P-BMP y AP-BMP) y sus combinaciones con MSCs (P-BMP-MSC-O/N, P-BMP-MSC-3w y AP-BMP-MSC-O/N) presentan un gran aumento en el grado de reparación (Figuras 24 y 25), siendo especialmente elevado el que se observa en el *P-scaffold* (P-BMP, P-BMP-MSC-O/N y P-BMP-MSC-3w), llegando hasta una regeneración del 80 % (Figura 24). En cuanto a las combinaciones de PDGF con BMP-2 (AP-BMP-PDGF-250 y AP-BMP-PDGF-500), aunque presentan menores

valores de regeneración ósea, las diferencias no son significativas con respecto a los grupos AP-BMP-MSO/N y AP-BMP (Figura 25).

Por otro lado, el efecto sobre la vascularización del PDGF estudiado en el *AP-scaffold* demuestra un incremento moderado en la densidad de vasos sanguíneos en el grupo AP-PDGF-500 y en las combinaciones de PDGF con BMP-2 (AP-BMP-PDGF-250 y AP-BMP-PDGF-500). En particular tras 8 semanas, las diferencias entre dichos grupos con el blanco (AP-B) y el control, son estadísticamente significativas (Figura 26). En cuanto a la superficie ocupada por los vasos, no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos a ningún tiempo (Figura 27). Sin embargo, aunque sí se observa una tendencia positiva con el tratamiento con PDGF y sus combinaciones con BMP-2 entre 4 y 8 semanas, esto no se correlaciona con un aumento en la reparación ósea.

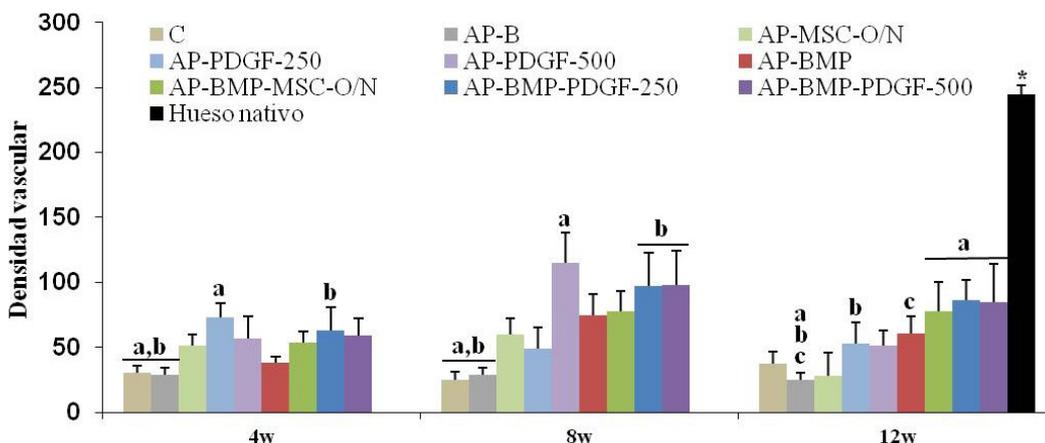


Figura 26. Representación gráfica de la densidad vascular observada a los diferentes tiempos experimentales en el sistema *AP-scaffold*. La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$. * Diferencias estadísticamente significativas con el resto de grupos.

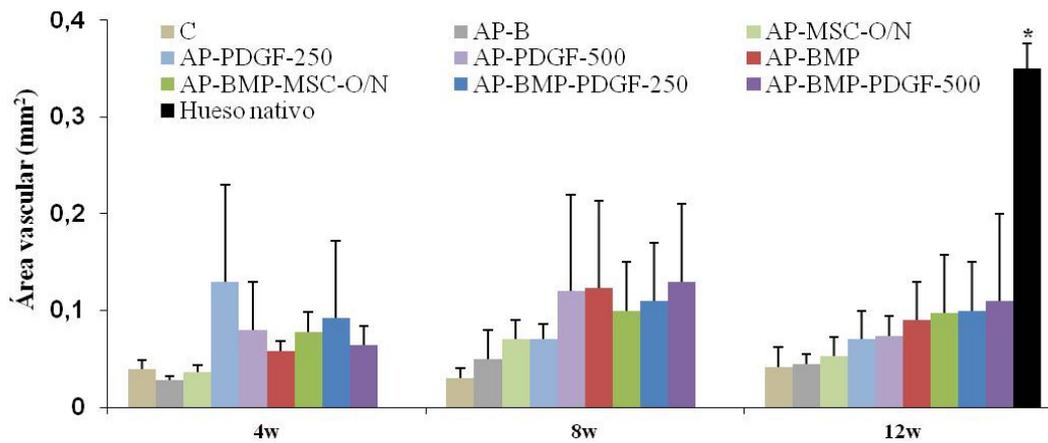


Figura 27. Representación gráfica del área vascular observada a los diferentes tiempos experimentales en el sistema AP-scaffold. * Diferencias estadísticamente significativas con el resto de grupos.

DISCUSIÓN

En este estudio utilizamos el moldeado robotizado (MR) como técnica para la elaboración de matrices altamente porosas y reproducibles destinadas a regeneración ósea. Los parámetros y dimensiones del sistema se optimizaron con el fin de ajustarlos a las especificidades del defecto realizado en cráneo de rata y, en el centro de la estructura, se diseñó un orificio destinado al sistema de cesión de la BMP-2.

La diferenciación de MSCs y la proliferación de células pre-osteoblásticas están íntimamente relacionadas y condicionadas por la geometría y el tamaño del poro [Bidan et al., 2013]. Además, la presencia de barras estrechas, la nano-porosidad y la micro-porosidad del sistema desarrollado en este estudio, contribuyen al aumento de la superficie específica, lo que se traduce en un mayor contacto entre el biomaterial y el sistema biológico. De hecho, se ha referido previamente que la nano-topografía de las matrices influye en la interacción celular [McMurray et al., 2011]. Posiblemente por este motivo, la viabilidad celular en las estructuras de β -TCP fue notablemente alta, pues las MSCs se adhirieron, se extendieron y proliferaron en la superficie de la matriz. Tras 12 horas de cultivo, las células teñidas con Calceína AM mostraron adhesión y asentamiento, la gran mayoría de ellas presentaron el fenotipo habitual de las MSCs y sólo se aprecian unas pocas células redondeadas. La supervivencia celular en los cultivos tridimensionales está íntimamente relacionada con la oxigenación del medio y el aporte de nutrientes. En estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación, se demostró que la presencia de poros altamente interconectados en un sistema de carbono vítreo reticulado (RVC) durante un cultivo de 2 semanas, favoreció la adhesión y la supervivencia celular, incluso en las zonas más inaccesibles del sistema [Pec et al., 2010]. En el presente estudio observamos, después de 3 semanas de cultivo, una elevada adhesión y proliferación celular y, consecuentemente, unas matrices de β -TCP densamente pobladas. Las MSCs

ocupan por completo la superficie del sistema, formando puentes entre las barras y llegando a cubrir prácticamente todos los macroporos del sistema.

El tamaño óptimo de poro y la estructura del mismo ha sido motivo de estudio y discusión por parte de diferentes autores. En general, la mayor parte de los estudios concluyen que un diámetro de poro de entre 100 y 1000 μm [Uchida et al., 1984; Chang et al., 2000; Chu et al., 2002], interconectividad entre ellos e interconexiones superiores a 50 μm [Lu et al., 1999], favorecen la formación de tejido óseo. En este trabajo demostramos que matrices con poros en el intervalo de 450 a 850 μm junto con una elevada interconectividad, son adecuados para cultivos *in vitro* de MSCs. Sin embargo, Bohner y Baumgart [2004], indican que el intervalo de diámetro de poro óptimo se encuentra en el rango de 200-800 μm pero depende del tamaño y del tipo de hueso a reparar. De hecho, aunque el tamaño de poro, así como la arquitectura y la composición de los sistemas de β -TCP, fueron apropiados para cultivos *in vitro*, no se detectó respuesta alguna en los grupos tratados con los sistemas blancos *in vivo*. Por su parte, la reparación inducida por las MSCs sembradas sólo fue evidente en los grupos P-MS-C-O/N y P-MS-C-3w tras 12 semanas.

Por otro lado, considerando que la acción del PDGF se limita a la primera fase del proceso regenerativo, éste se incorporó en la malla de alginato en los sistemas *AP-scaffold* con el fin de acelerar la reparación del defecto. Sin embargo, a pesar de sus propiedades quimiotácticas y mitogénicas que nos llevaron a plantear la posibilidad de sustituir las MSCs por dicho GF, el PDGF no indujo mejoría alguna en el proceso regenerativo. Aproximadamente entre un 15 % y un 20 % del defecto fue reparado por la acción del PDGF incluido en los *AP-scaffold*, resultados que son similares a los que se observaron en los grupos blancos y en los tratados únicamente con MSCs. En efecto, entre todos los grupos tratados con un único elemento (MSCs, PDGF o BMP-2), sólo los grupos P-BMP y AP-BMP experimentaron una reparación significativa del defecto. En cuanto a los grupos tratados con las combinaciones BMP-PDGF o con BMP-MS-Cs, a las

8 semanas las repuestas fueron similares y equivalentes a los grupos tratados únicamente con BMP-2. Sin embargo, los resultados en su conjunto indican una cierta potenciación de la respuesta cuando se combina la BMP-2 con MSCs. Así, a las 12 semanas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observa un aumento del porcentaje de reparación en los grupos tratados con la combinación BMP-MSCs, independientemente del tiempo de pre-cultivo (12 horas vs 3 semanas) y del sistema implantado (Figuras 24 y 25).

Además de por sus propiedades mitogénicas, el PDGF se incluyó en el estudio por su acción indirecta sobre la vascularización del tejido. Aunque de forma más evidente a tiempos cortos, la vascularización observada en los grupos con PDGF fue ligeramente superior a los grupos con BMP-2. Por otro lado, 12 semanas post-implantación, la densidad de vasos fue superior en los grupos tratados con las combinaciones BMP-MSCs y BMP-PDGF (con ambas dosis) que en los grupos tratados con cualquiera de los tres elementos por separado. El efecto inicial del PDGF da lugar a la formación y posteriormente a la maduración de una nueva red vascular en el tejido óseo formado. La vascularización inicial sólo se mantuvo en los grupos con BMP-2 mientras que en el resto descende a lo largo del periodo experimental, poniendo en evidencia que solo es posible mantener la red vascular si a su vez se induce un mayor grado de regeneración. Por tanto, la baja formación de hueso en los grupos sin BMP-2, no permite mantener una buena vascularización y el defecto es parcialmente ocupado por tejido conectivo.

Por su parte, la escasa reparación ósea observada en los grupos tratados únicamente con PDGF, corrobora resultados anteriores llevados a cabo en distintos defectos y especies animales [De la Riva et al., 2010; Delgado et al., 2012; Kaipel et al., 2012]. Sin embargo, no sólo no se observa el efecto sinérgico esperado con la combinación BMP-PDGF sino todo lo contrario, se produce un efecto antagónico. La literatura acerca de la combinación de PDGF con diferentes BMPs es controvertida, se ha trabajado con diferentes modelos animales, diferentes cinéticas de cesión de los GFs y, en muchos

casos, con dosis excesivamente altas, lo que empeora la situación. Por todo lo expuesto y de acuerdo con la bibliografía consultada, podemos afirmar que no se ha realizado ningún estudio combinando BMPs y PDGF en un sistema poroso similar al desarrollado en el presente trabajo, por lo que resulta difícil comparar nuestros resultados con los publicados por otros autores. Zhang et al. [2012] estudiaron la reparación de un defecto crítico en fémur de ratas osteoporóticas tras la implantación de un sistema mesoporoso de biovidrio conteniendo adenovirus codificantes para PDGF y BMP-7. La regeneración observada después de 2 y 4 semanas fue mayor en los grupos tratados con la combinación de ambos adenovirus frente a los tratados únicamente con adenovirus codificante para la BMP-7. Por otro lado, Park et al. [2013] observaron, 4 semanas después de la implantación de un hidrogel de colágeno en un defecto crítico de 8 mm en cráneo de rata, una mayor regeneración con la combinación de PDGF (10 μ g) y MSCs transfectadas para sobre-expresar BMP-2, que con cualquiera de ellos por separado. Únicamente Marden et al. [1993] han observado *in vivo*, el efecto inhibitorio del PDGF en la formación de hueso inducida por BMP-3 (osteogenina), estudiando la combinación de dosis de PDGF de 20 a 200 μ g con 30 o 150 μ g de BMP-3, en un defecto crítico de 8 mm en cráneo de rata. Además de las diferencias observadas por los distintos autores, los resultados *in vivo* e *in vitro* no son coincidentes, los estudios *in vitro* demuestran que el PDGF podría inhibir la diferenciación osteogénica. Precisamente Park et al. [2013] atribuyen la capacidad del PDGF para reducir la expresión de BMPs vía inhibición de sus genes codificantes. En cuanto a los estudios *in vitro*, no sólo Park et al., sino que también Chan et al. [2010], han detectado un claro antagonismo entre el PDGF y los miembros de la familia del TGF- β , dentro de la cual se incluyen las BMPs. Los autores ponen de manifiesto que el PDGF estimula la expresión de microARN-24 capaz de regular negativamente la producción de proteínas Trb3, cuya represión repercute en una disminución en la expresión de proteínas Smad y, consecuentemente, decrece la producción de BMPs y TGF- β [Chan et al., 2010]. Por el contrario, en otro estudio *in vitro* se observa que la combinación de PDGF con

BMP-2, en una matriz de titanio funcionalizada con heparina, promueve la función osteoblástica en comparación con los GFs por separado [Kim et al., 2013].

Nuestros resultados coinciden con los observados *in vitro* y con los de Marden et al. [1993] *in vivo*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que gran parte de las diferencias observadas al combinar PDGF y BMPs, podría tener su explicación en la relación de dosis/concentraciones entre ambos, o en las diferencias en el diseño de los experimentos, incluyendo modelos animales, técnicas de valoración y parámetros de cuantificación (radiografías, micro-CT, densidad mineral ósea o análisis histológico) del hueso regenerado, que podrían estar añadiendo mayor confusión al tema. Además, cabe destacar que la duración de nuestro experimento fue de 12 semanas, momento en el que el antagonismo se hace evidente, mientras que la duración de los estudios citados anteriormente fue tan sólo de 4 semanas. Tampoco el origen de los GFs fue el mismo, pues en unos casos fueron producidos *in situ* mediante la incorporación de adenovirus capaces de estimular la sobre-expresión de BMPs y PDGF en MSCs y, en otros, como en este estudio, fueron proteínas recombinantes. Por otro lado, las dosis de PDGF y BMPs que utilizamos fueron muy inferiores a las empleadas por otros autores [Marden et al., 1993; Park et al., 2013]. Cabe destacar que una dosis mayor de BMP-2 no estaría justificada, al menos en nuestro sistema, ya que con la dosis de 6 μ g podemos conseguir una buena reparación del defecto.

Finalmente, a pesar de que las matrices elaboradas por RP y conteniendo BMP-2 descritas en la literatura son diferentes en composición y arquitectura a las presentadas en este trabajo, los resultados observados en los grupos tratados únicamente con BMP-2 son comparables con los obtenidos por otros autores. Concretamente, Sawyer et al. [2009] y Liu et al. [2013] evaluaron matrices elaboradas mediante la técnica de RP en defectos no críticos de 5 mm y 4,6 mm en cráneo de rata, respectivamente. Sawyer et al. [2009] estudiaron el efecto de 5 μ g de BMP-2 incorporados en una matriz de ϵ -policaprolactona/fosfato tricálcico/colágeno preparada por deposición de polímero

fundido. En comparación con este último estudio, si consideramos el tamaño del defecto, el sistema elaborado en nuestro estudio regeneraría el volumen total a las 12 semanas, utilizando dosis similares. Sin embargo, aunque nuestros resultados son equivalente a los observados por Liu et al. [2013], estos autores utilizan una dosis inferior de BMP-2 en una matriz de vidrio elaborada por MR. Cabe destacar que los defectos practicados en ambos estudios fueron inferiores a 8 mm de diámetro, lo que facilita y acelera el proceso regenerativo en comparación con el defecto practicado en el presente trabajo. Cuanto mayor es el defecto, mayor es la dificultad, ya que es más difícil rellenar un cierto volumen de un defecto, que reparar por completo el mismo volumen en un defecto menor.

Desde un punto de vista clínico-industrial, aunque la respuesta en los grupos tratados con la combinación BMP-MSCs fue ligeramente superior a la observada con BMP-2, no es suficiente para inclinar la balanza en favor de la combinación, ya que el uso de células conlleva manipulación de las mismas, gran variabilidad y difícil manejo del sistema, sin olvidar las complicaciones para el paciente.

CONCLUSIONES

Los sistemas de β -TCP utilizados en este estudio resultaron ser estructuras capaces de promover el crecimiento celular *in vitro* y demostraron ser estructuras biocompatibles aptas para estimular la regeneración ósea *in vivo*.

La menor respuesta regenerativa observada al combinar PDGF y BMP-2 con respecto a la BMP-2 podría deberse a que la dosis utilizada y/o la cinética de cesión del PDGF no hayan sido las más apropiadas.

El aumento en la respuesta inducida al añadir MSCs a los sistemas con BMP-2 no fue suficiente como para justificar el uso de las células.

De acuerdo con el alto grado de regeneración inducido por la BMP-2, no estaría justificada su combinación con PDGF o MSCs, al menos en el sistema propuesto en este estudio y en el defecto en el que se llevó a cabo.

BIBLIOGRAFÍA

Abarrategi A, Moreno-Vicente C, Martínez-Vázquez FJ, Civantos A, Ramos V, Sanz-Casado JV, Martínez-Corriá R, Perera FH, Mulero F, Miranda P, López-Lacomba JL. Biological properties of solid free form designed ceramic scaffolds with BMP-2: in vitro and in vivo evaluation. *PLoS One*. 2012a. 7: 1-10.

Abarrategi A, Fernandez-Valle ME, Desmet T, Castejón D, Civantos A, Moreno-Vicente C, Ramos V, Sanz-Casado JV, Martínez-Vázquez FJ, Dubruel P, Miranda P, López-Lacomba JL. Label-free magnetic resonance imaging to locate live cells in three-dimensional porous scaffolds. *J R Soc Interface*. 2012b. 9: 2321-2331.

Akiyama K, You YO, Yamaza T, Chen C, Tang L, Jin Y, Chen XD, Gronthos S, Shi S. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem Cell Res Ther*. 2012. 3: 1-13.

Bidan CM, Kommareddy KP, Rumpler M, Kollmannsberger P, Fratzl P, Dunlop JW. Geometry as a factor for tissue growth: towards shape optimization of tissue engineering scaffolds. *Adv Healthc Mater*. 2013. 2: 186-194.

Bohner M, Baumgart F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials*. 2004. 25: 3569-3582.

Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int*. 2012. 2012: 1-12.

Butscher A, Bohner M, Hofmann S, Gauckler L, Müller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomater*. 2011. 7: 907-920.

CDER (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research). Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. August (2000).

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf> [consultado: 17 de agosto de 2015].

Chan MC, Hilyard AC, Wu C, Davis BN, Hill NS, Lal A, Lieberman J, Lagna G, Hata A. Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGFbeta family of signalling pathways by control of miR-24 expression. *EMBO J.* 2010. 297: 559-573.

Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials.* 2000. 21: 1291-1298.

Chu TM, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials.* 2002. 23: 1283-1293.

Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* 1991. 2: 187-208.

De la Riva B, Nowak C, Sánchez E, Hernández A, Schulz-Siegmund M, Pec MK, Delgado A, Evora C. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009. 73: 50-58.

De la Riva B, Sánchez E, Hernández A, Reyes R, Tamimi F, López-Cabarcos E, Delgado A, Evora C. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined

brushite-chitosan system enhances bone regeneration. *J Control Release*. 2010. 143: 45-52.

Delgado JJ, Evora C, Sánchez E, Baro M, Delgado A. Validation of a method for non-invasive in vivo measurement of growth factor release from a local delivery system in bone. *J Control Release*. 2006. 114: 223-229.

Delgado JJ, Sánchez E, Baro M, Reyes R, Evora C, Delgado A. A platelet derived growth factor delivery system for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2012. 23: 1903-1912.

Dobson KR, Reading L, Haberey M, Marine X, Scutt A. Centrifugal isolation of bone marrow from bone: an improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells from rat tibiae and femurae. *Calcif Tissue Int*. 1999. 65: 411-413.

Fraker PJ, Speck JC Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978. 80: 849-857.

Hollinger JO, Onikepe AO, MacKrell J, Einhorn T, Bradica G, Lynch S, Hart CE. Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *J Orthop Res*. 2008. 26: 83-90.

Hoque ME, Chuan YL, Pashby I. Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. *Biopolymers*. 2012. 97: 83-93.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000. 21: 2529-2543.

Kaipel M, Schützenberger S, Schultz A, Ferguson J, Slezak P, Morton TJ, Van Griensven M, Redl H. BMP-2 but not VEGF or PDGF in fibrin matrix supports bone healing in a delayed-union rat model. *J Orthop Res*. 2012. 30: 1563-1569.

Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008. 15: 100-114.

Kim SE, Yun YP, Lee JY, Shim JS, Park K, Huh JB. Co-delivery of platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and bone morphogenic protein (BMP-2) coated onto heparinized titanium for improving osteoblast function and osteointegration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013. Doi: 10.1002/term.1668

Lan Levengood SK, Polak SJ, Wheeler MB, Maki AJ, Clark SG, Jamison RD, Wagoner Johnson AJ. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2010. 31: 3552-3563.

Liu X, Rahaman MN, Liu Y, Bal BS, Bonewald LF. Enhanced bone regeneration in rat calvarial defects implanted with surface-modified and BMP-loaded bioactive glass (13-93) scaffolds. *Acta Biomater*. 2013. 9: 7506-7517.

Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Descamps M, Thierry B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med*. 1999. 10: 111-120.

Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res*. 1996. 324: 86-97.

Marden LJ, Fan RS, Pierce GF, Reddi AH, Hollinger JO. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J Clin Invest.* 1993. 92: 2897-2905.

Martínez-Vázquez FJ, Perera FH, Miranda P, Pajares A, Guiberteau F. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration. *Acta Biomater.* 2010. 6: 4361-4368.

Martínez-Vázquez FJ, Perera FH, van der Meulen I, Heise A, Pajares A, Miranda P. Impregnation of β -tricalcium phosphate robocast scaffolds by in situ polymerization. *J Biomed Mater Res A.* 2013. 101: 3086-3096.

McMurray RJ, Gadegaard N, Tsimbouri PM, Burgess KV, McNamara LE, Tare R, Murawski K, Kingham E, Oreffo RO, Dalby MJ. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat Mater.* 2011. 10: 637-644.

Mezawa M, Araki S, Takai H, Sasaki Y, Wang S, Li X, Kim DS, Nakayama Y, Ogata Y. Regulation of human bone sialoprotein gene transcription by platelet-derived growth factor-BB. *Gene.* 2009. 435: 80-87.

Miranda P, Saiz E, Gryn K, Tomsia AP. Sintering and robocasting of beta-tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications. *Acta Biomater.* 2006. 2: 457-466.

Miranda P, Pajares A, Saiz E, Tomsia AP, Guiberteau F. Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting. *J Biomed Mater Res A.* 2008. 85: 218-227.

Moore JD, Flanner HH. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm Technol.* 1996. 20: 64-74.

Park SY, Kim KH, Shin SY, Koo KT, Lee YM, Seol YJ. Dual delivery of rhPDGF-BB and bone marrow mesenchymal stromal cells expressing the BMP2 gene enhance bone formation in a critical-sized defect model. *Tissue Eng Part A*. 2013. 19: 2495-2505.

Pec MK, Reyes R, Sánchez E, Carballar D, Delgado A, Santamaría J, Arruebo M, Evora C. Reticulated vitreous carbon: a useful material for cell adhesion and tissue invasion. *Eur Cell Mater*. 2010. 20: 282-294.

Sánchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regí M. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. *Chem. Eng. J* 2008. 137: 62-71.

Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CX, Woodruff MA, Huttmacher DW, Cool SM. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with BMP-2. *Biomaterials*. 2009. 30: 2479-2488.

Serra T, Planell JA, Navarro M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomater*. 2013. 9: 5521-5530.

Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med*. 1992. 326: 726-732.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012. 7: 1918-1929.

Uchida A, Nade SM, McCartney ER, Ching W. The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. *J Bone Joint Surg Br.* 1984. 66: 269-275.

Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol.* 2004. 22: 643-652.

Zhang Y, Cheng N, Miron R, Shi B, Cheng X. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials.* 2012. 33: 6698-6708.

**Capítulo 2.- Geles de Poloxamina/Ciclodextrina conteniendo BMP-2 y SV como
sistemas para regeneración ósea**

INTRODUCCIÓN

En general, los geles presentan una serie de características que los hacen muy atractivos, entre las que podemos destacar su inyectabilidad y su adaptabilidad al defecto [Puppi et al., 2010]. Además, recientemente hemos comprobado que las poloxaminas resultan ser buenos vehículos para la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) [Rodríguez-Évora et al., 2014a].

La BMP-2 es un factor de crecimiento (GF) que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de fracturas óseas de difícil consolidación [Li et al., 2011; Mariner et al., 2013; Hussain et al., 2014], pero necesita de dosis relativamente elevadas para inducir osteogénesis. Por este motivo, en las últimas décadas se buscan sustancias alternativas capaces de potenciar el efecto de la BMP-2. En este sentido, las estatinas han demostrado ser capaces de incrementar la expresión de BMP-2 en los osteoblastos, aumentando la producción de RNA mensajero *in vitro* [Mundy et al., 1999]. Además, diversos estudios *in vivo* han probado la eficacia de la simvastatina (SV) en la formación de hueso [Nyan et al., 2010; Qi et al., 2013; Tai et al., 2013; Yueyi et al., 2013; Ezirganlı et al., 2014; Nyan et al., 2014; Papadimitriou et al., 2015].

Tanto la BMP-2 como la SV presentan ciertos efectos secundarios directamente ligados a la dosis administrada. Los principales problemas de la BMP-2 están asociados a hematomas, radiculitis, daño neuronal, formación ectópica de hueso, así como su potencial carcinogenicidad [Tannoury y An, 2014], mientras que los efectos adversos relacionados con la administración de SV son las miopatías [Fisher et al., 2015] e inflamación tisular, y necrosis cuando su administración es local [Calixto et al., 2011; Ezirganlı et al., 2014; Papadimitriou et al., 2015].

En este capítulo proponemos la utilización de un hidrogel compuesto por Tetronic® 908 (T908) y α -Ciclodextrina (α -CD) combinado con diferentes dosis de BMP-2 y SV,

con el fin de determinar la dosis mínima necesaria para regenerar un defecto óseo de 8 mm en cráneo de rata. En el caso de la BMP-2, y de acuerdo con resultados negativos obtenidos previamente por el grupo de investigación al implantar 1,6 μg [Rodríguez-Évora et al., 2013], y los resultados positivos al implantar 6 μg de BMP-2 [Rodríguez-Évora et al., 2014b; Del Rosario et al., 2015a; Del Rosario et al., 2015b], incorporamos una dosis intermedia de 3 μg . Por su parte, las dosis de SV fueron de 7,5 μg , 75 μg y 750 μg .

OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo es confirmar el efecto osteoinductivo, observado *in vitro*, de un hidrogel compuesto por Tetronic® 908 (T908) y α -Ciclodextrina (α -CD), en un defecto crítico de 8 mm de diámetro en cráneo de rata, tras 4 y 8 semanas de la implantación. El gel se evalúa sólo, con diferentes dosis de SV (7,5, 75 y 750 μ g) o de BMP-2 (3 y 6 μ g) y con la combinación SV-BMP-2, en términos de regeneración ósea mediante histología e histomorfometría, buscando la utilización de dosis mínimas efectivas de ambas sustancias.

Por otro lado se lleva a cabo un estudio reológico de los geles estudiados, así como la cesión de la BMP-2 y de la SV, *in vivo* e *in vitro* respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material utilizado en este trabajo se procesa en condiciones asépticas tal y como se detalla en el CAPÍTULO 1.

Preparación del sistema T

La dispersión de Tetronic® 908 (T) (BASF Corporation, Alemania) se prepara a una concentración del 30 % (p/v) en PB (pH 7,4) a temperatura ambiente (RT) y bajo agitación magnética durante 12 horas, se esteriliza por filtración (Nalgene® Syringe Filter 0,2 µm, SFCA membrane, non-pyrogenic, Thermo Scientific) y se mantiene a 4°C hasta su uso. Para los grupos con SV (AK Scientific Inc., EEUU), ésta se incorpora a la disolución anterior, se agita durante 6 horas a RT y se mantiene a 4°C durante 10-12 horas, momento en el que se incorpora la disolución de BMP-2 (Biomedal Life Sciences, España) bajo agitación suave (1 h, RT).

Finalmente, antes de su implantación en cráneo de rata, se carga el gel en una jeringa y se mantiene durante 15 minutos a 37°C.

Preparación del sistema T-CD

La disolución de α -Ciclodextrina (CD) (Wacker, Alemania) se prepara a una concentración del 14 % (p/v) en PB (pH 7,4) a 50°C y bajo agitación continua durante 15 minutos, se enfría a RT, se esteriliza por filtración (Nalgene® Syringe Filter 0,2 µm, SFCA membrane, non-pyrogenic, Thermo Scientific) y se mantiene a 4°C hasta su uso. Tanto la BMP-2 como la SV se incorporan a la dispersión de T, tal y como se detalla en el apartado anterior y, seguidamente, T y CD se mezclan en una proporción 1:1 (v:v), se agitan lentamente durante 1 hora, se carga la jeringa y se mantiene a 4°C durante 10-12 horas, momento en el que se implanta en el animal.

Caracterización de los sistemas T y T-CD

La caracterización de los sistemas fue realizada en colaboración con la Dra. Álvarez, del Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela.

- *Comportamiento viscoelástico*

El comportamiento viscoelástico de los geles se caracteriza por duplicado a 20°C y a 37°C haciendo uso de un reómetro (Rheolyst AR-1000N) equipado con una geometría cono-plato (6 cm de diámetro, 2,1 grados), un sistema de control de temperatura Peltier y un analizador de datos AR2500 (TA Instruments, Reino Unido). El módulo elástico (G') y el viscoso (G'') se registran bajo un estrés oscilatorio de 0,1 Pa en un intervalo de frecuencia angular de 0,5 a 50 rad/s. La viscosidad se evalúa a 20°C y a 37°C aumentando la velocidad de cizalla de 0,25 a 10 s⁻¹ en 10 minutos.

- *Ensayos de cesión in vitro de la SV*

El estudio de cesión *in vitro* se realiza con las dos formulaciones conteniendo SV a una concentración de 75 y 750 µg en 100 µL de gel. Para ello se incorporan 2 mL de cada formulación en tubos Pirex (13,6 mm de diámetro y 10 cm de altura), se llevan a un baño termostático a 37°C durante 12 horas, se añaden 5 mL de PBS (pH 7,4, 37°C) estéril y, cada 12 horas, se toma 1 mL que se reemplaza por medio nuevo. El ensayo se hace por triplicado, y la concentración de SV en el medio se cuantifica por espectrofotometría a 239 nm (Agilent 8453, Alemania), haciendo las diluciones necesarias en una mezcla de etanol y agua al 50 %.

Ensayos in vivo y evaluación de tejido regenerado

En los experimentos *in vivo*, incluyendo cirugía, ensayos de cesión y metodología de evaluación del tejido regenerado, se procede tal y como se ha descrito en el CAPÍTULO 1. Por su parte, los grupos experimentales correspondientes al presente trabajo, se detallan en la Tabla 1, y el volumen total de gel que se inyecta en el defecto es, en todos los casos, de 100 μ L.

Grupos	Especificaciones
C	Defecto vacío
T	Sistema T blanco
T-SV ⁷⁵	T + 75 μ g de SV
T-SV ⁷⁵⁰	T + 750 μ g de SV
T-BMP ⁶ *	T + 6 μ g de BMP-2
T-CD	Sistema T-CD blanco
T-CD-SV ^{7.5}	T-CD + 7,5 μ g de SV
T-CD-SV ⁷⁵	T-CD + 75 μ g de SV
T-CD-SV ⁷⁵⁰	T-CD + 750 μ g de SV
T-CD-BMP ⁶ *	T-CD + 6 μ g de BMP-2
T-CD-BMP ³	T-CD + 3 μ g de BMP-2
T-CD-BMP ⁶ -SV ^{7.5}	T-CD + 6 μ g de BMP-2 + 7,5 μ g de SV
T-CD-BMP ³ -SV ^{7.5}	T-CD + 3 μ g de BMP-2 + 7,5 μ g de SV

Tabla 1. Grupos experimentales. (*) Incluye 5 ratas adicionales para los ensayos de cesión. T: T908 al 30 %; T-CD: T908 al 15 % y α -CD al 7 %.

RESULTADOS

Caracterización reológica de los sistemas T y T-CD

A 20°C la dispersión T muestra baja resistencia al flujo (Figura 1) y el módulo viscoso (G'') predomina en todo el rango de frecuencia angular evaluado, mientras que los valores de módulo elástico (G') no pudieron cuantificarse (Figura 2). Por su parte, al aumentar la temperatura hasta 37°C, el sistema T adquiere mayor viscosidad (2-3 órdenes de magnitud) y mayores valores de G' y G'' en el análisis viscoelástico, independientemente de la frecuencia angular. En cuanto al gel T-CD, presenta un comportamiento totalmente opuesto al del sistema T, es más viscoso a 20°C que a 37°C, sobre todo para valores de velocidad de cizalla más bajos dentro del intervalo muestreado (Figura 1), y los valores de G' y G'' disminuyen al aumentar la temperatura (Figura 2).

Por otro lado, la presencia de SV hace que la viscosidad del sistema T-CD disminuya ligeramente, tanto a 20°C como a 37°C. Por el contrario, en el gel T, la presencia de SV no modifica su viscosidad a 20°C, o incluso, produce un aumento de la misma a 37°C (Figura 1).

Paralelamente, el comportamiento viscoelástico de los sistemas sigue un patrón similar: a 20°C, el sistema T-CD presenta valores ligeramente más bajos de G' en presencia de SV, mientras que a 37°C, el gel T experimenta un aumento de los módulos G' y G'' cuando el sistema va combinado con la estatina (Figura 2).

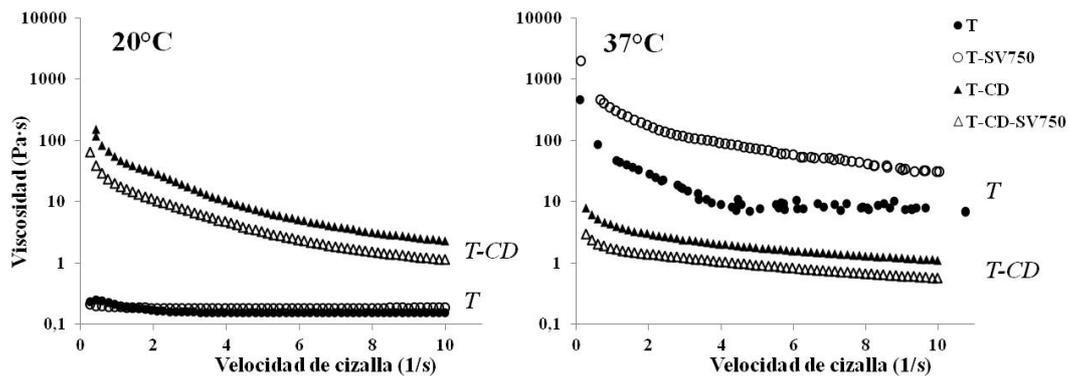


Figura 1. Viscosidad de los sistemas T y T-CD. Se representa la influencia de la temperatura y la dosis de SV sobre la viscosidad de las formulaciones.

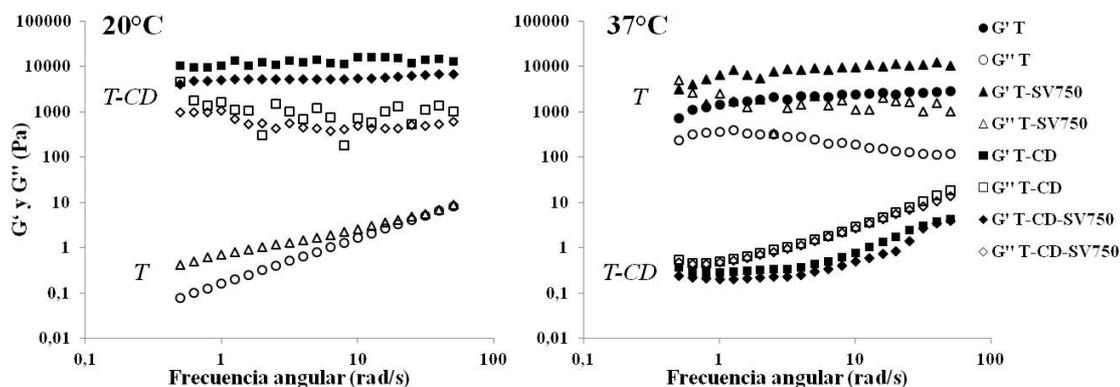


Figura 2. Comportamiento viscoelástico de los sistemas T y T-CD. Se representa la influencia de la temperatura y la dosis de SV en el comportamiento reológico de los geles.

Ensayos de cesión in vitro de la SV

La influencia de la formulación y de la dosis de SV administrada se refleja en la Figura 3a. El perfil de cesión de la dosis de 75 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ de SV incorporada en ambos sistemas es similar tras 3 semanas de cesión, y el 100 % del fármaco se libera al finalizar

el ensayo. Por el contrario, pasadas las tres semanas de ensayo, únicamente el 40% y el 20% de la estatina se cede desde el sistema T-SV⁷⁵⁰ y T-CD-SV⁷⁵⁰, respectivamente.

La Figura 3b representa la evolución *in vitro* de ambas formulaciones conteniendo la dosis alta de SV (750 µg/100 µL), donde el color blanco de las formulaciones refleja las partículas de SV dispersas en el gel. Tras 21 días de ensayo, el sistema T-CD sigue presentando color blanquecino y ocupa más de la mitad del volumen inicial, mientras que el sistema T está transparente.

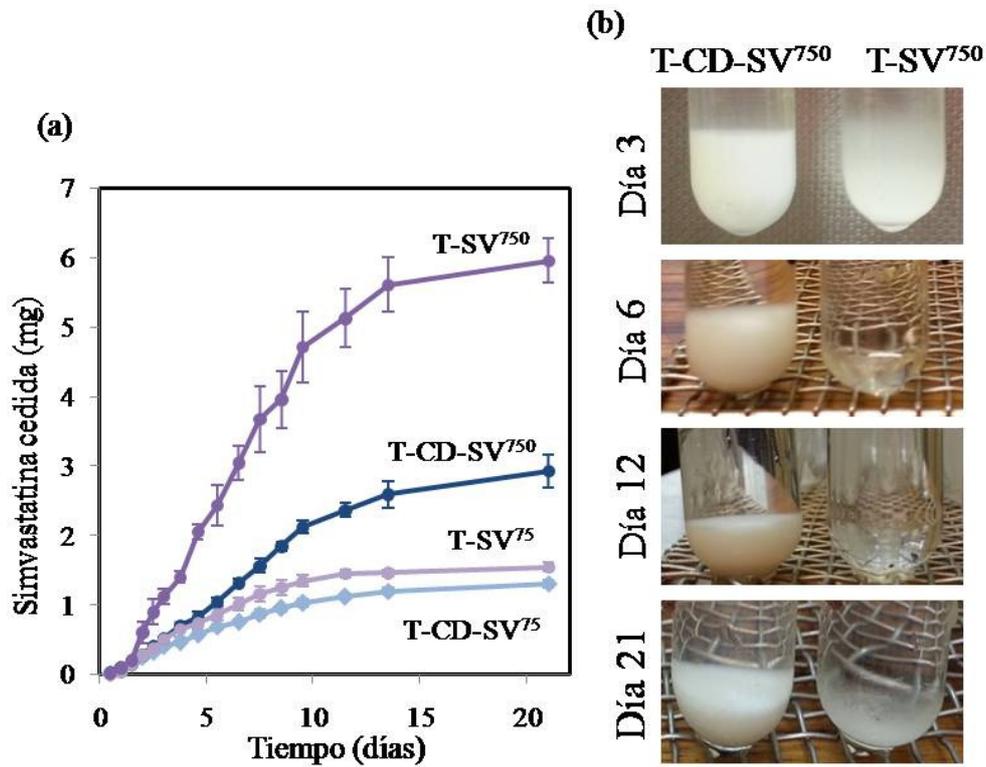


Figura 3. Perfil de cesión *in vitro* de la SV desde los sistemas T y T-CD, dependiendo de la dosis de SV (a). Figura representativa de la evolución de los sistemas a los 3, 6, 12 y 21 días de ensayo (Imágenes tomadas con cámara digital Canon (PowerShot A620, Tokio, Japón)) (b). Nota: la cantidad de SV utilizada en el ensayo de cesión *in vitro* fue de 1,5 mg para la dosis de 75 µg, y de 15 mg para la de 750 µg, pues el volumen fue de 2 mL (volumen 20 veces superior al implantado *in vivo* (100 µL)).

Ensayo de cesión in vivo de la BMP-2

Los perfiles de cesión de la BMP-2 desde los dos geles (Figura 4) son similares ($f_2=52,87$), aunque durante los 4 primeros días las diferencias parecen significativas.

Así, en el caso del sistema T, el porcentaje cedido tras 6 y 24 horas es del 44 % y del 70 %, respectivamente, lo que equivale a 2,6 μg y 4,2 μg , y durante los siguientes 6 días, la BMP-2 va cediéndose a una velocidad de 270 ng/día (4,5 % diario), llegando prácticamente al 100 % tras una semana.

Por su parte, el sistema T-CD presenta una cesión inicial del 52 % y 60 % tras 6 y 24 horas, respectivamente (3,1 μg y 3,6 μg), y durante los siguientes 6 días, la BMP-2 va liberándose a una velocidad de 350 ng/día (5,9 % diario), alcanzándose un 95 % cedido al cabo de 7 días.

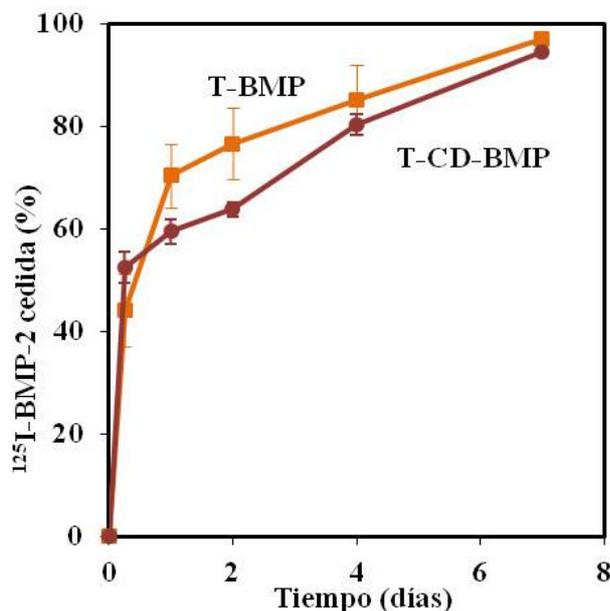


Figura 4.- Perfil de cesión in vivo de la ^{125}I -BMP-2 desde el sistema T y T-CD. $n=5$.

Evaluación del tejido regenerado

- *Análisis macroscópico*

En los grupos blancos y en aquellos tratados únicamente con SV (Figura 5) se observa un tejido semitransparente. Sin embargo, en las muestras tratadas con BMP-2 sola o en combinación con SV, se detecta una estructura más densa y similar a la del tejido adyacente (Figura 5).

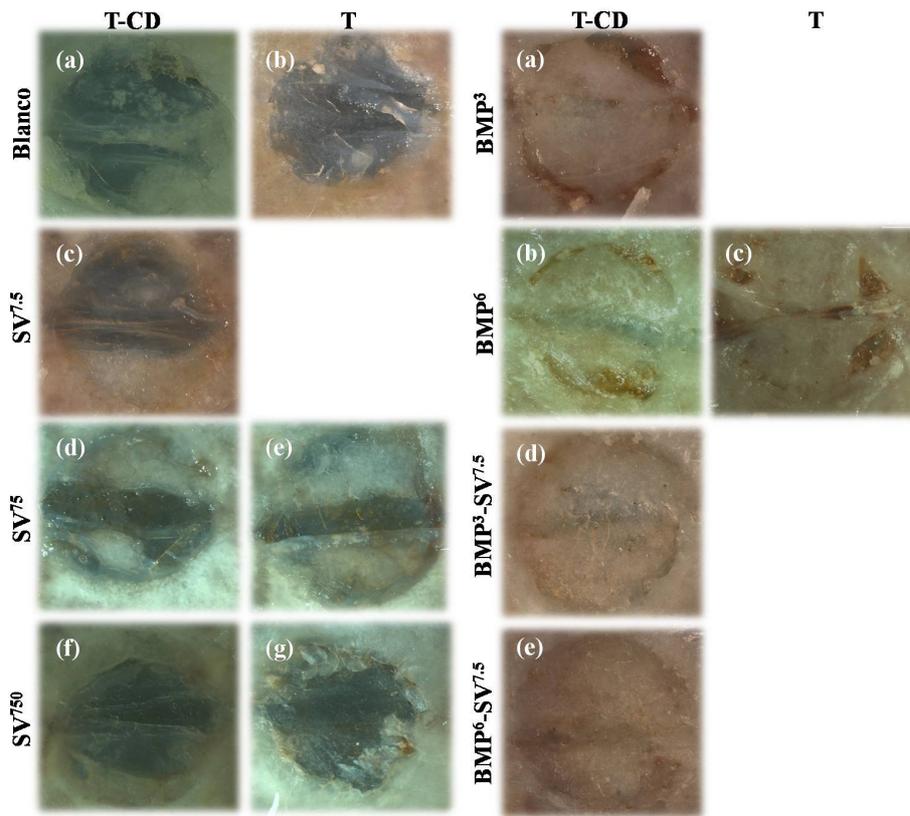


Figura 5. Vista macroscópica de la cara interna del cráneo de rata de los grupos blancos, los tratados con SV, con BMP-2 y sus combinaciones, tras 8 semanas de implantación. Imágenes tomadas con estereomicroscopio (Leica M205 C).

- Evaluación histológica e histomorfológica

Analizando los cortes histológicos no se detecta regeneración en los grupos control (C), ni en los blancos (T y T-CD), ni en los grupos tratados con SV (T-CD-SV^{7.5}, T-CD-SV⁷⁵, T-CD-SV⁷⁵⁰, T-SV⁷⁵ y T-SV⁷⁵⁰) (Figura 6). Esta escasa regeneración se mantiene a lo largo del periodo experimental (Figura 7) y en la mayoría de las muestras, el defecto se ocupa por tejido conectivo (Figuras 6 y 7). La dosis de SV de 7,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ sólo se estudia con el gel T-CD, siendo la que mejores resultados exhibe a las 8 semanas, y cuyo valor de regeneración es comparable al del grupo T-BMP⁶ (Figura 8).

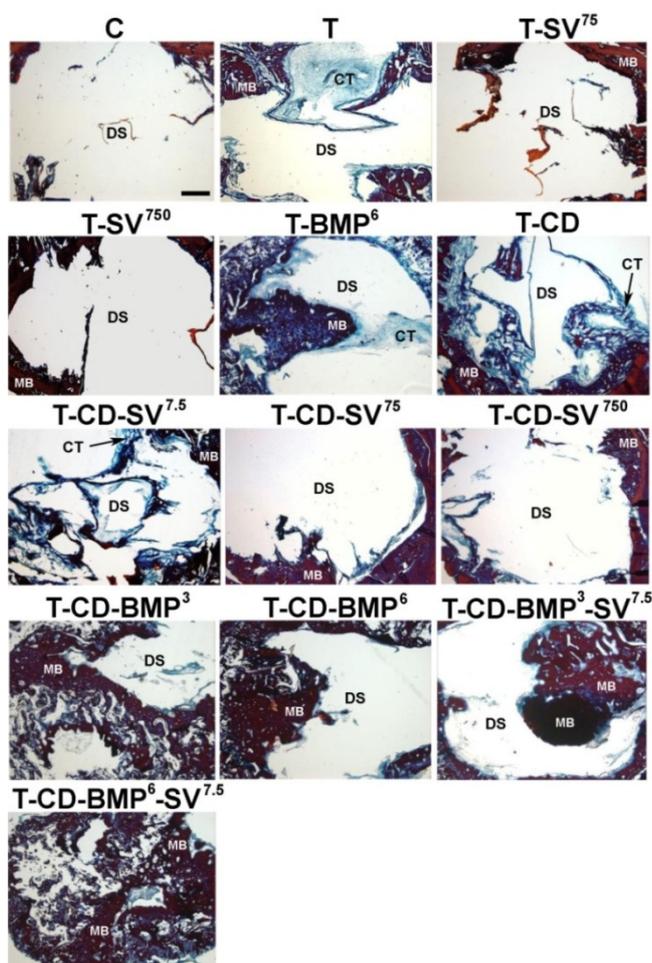


Figura 6. Imágenes representativas en sección horizontal que muestran el grado de reparación en el área del defecto en los diferentes grupos experimentales a las 4 semanas post-implantación. CT: Tejido conectivo, DS: Área del defecto MB: Hueso mineralizado. Barra de escala: 1 mm.

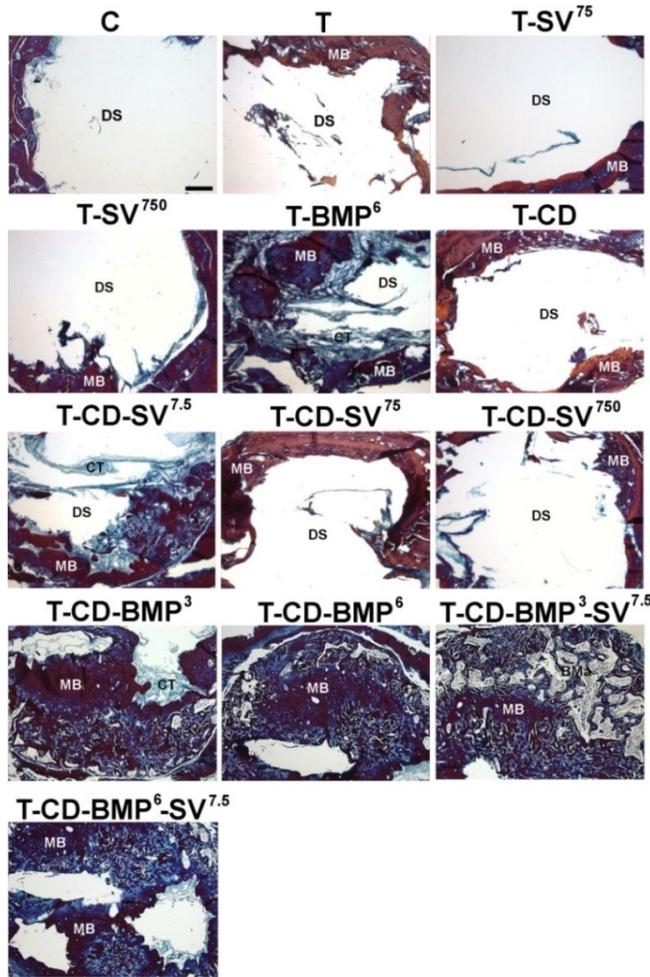


Figura 7. Imágenes representativas en sección horizontal que muestran el grado de reparación en el área del defecto en los diferentes grupos experimentales a las 8 semanas post-implantación. BMA: Médula ósea, CT: Tejido conectivo, DS: Área del defecto, MB: Hueso mineralizado. Barra de escala: 1 mm.

estadísticamente diferentes al resto de grupos (Figura 8).

Todos los grupos tratados con BMP-2 en el sistema T-CD muestran valores altos de regeneración ósea en relación con el grupo T-BMP⁶ (Figuras 6, 7 y 8). Pasadas 4 semanas de la implantación, los valores de regeneración observados en los grupos T-CD-BMP³-SV^{7.5} y T-CD-BMP⁶-SV^{7.5} son del 36 % y del 65 % (Figura 8) respectivamente, siendo los resultados para los grupos T-CD-BMP³ y T-CD-BMP⁶ del 56 % y 44 %, respectivamente. A las 8 semanas de la implantación en cráneo de rata, la respuesta es más homogénea en los grupos tratados con la combinación BMP-SV y similar a los grupos tratados únicamente con BMP-2, llegando a valores de reparación de 65-70 % (Figura 8). Estos valores son

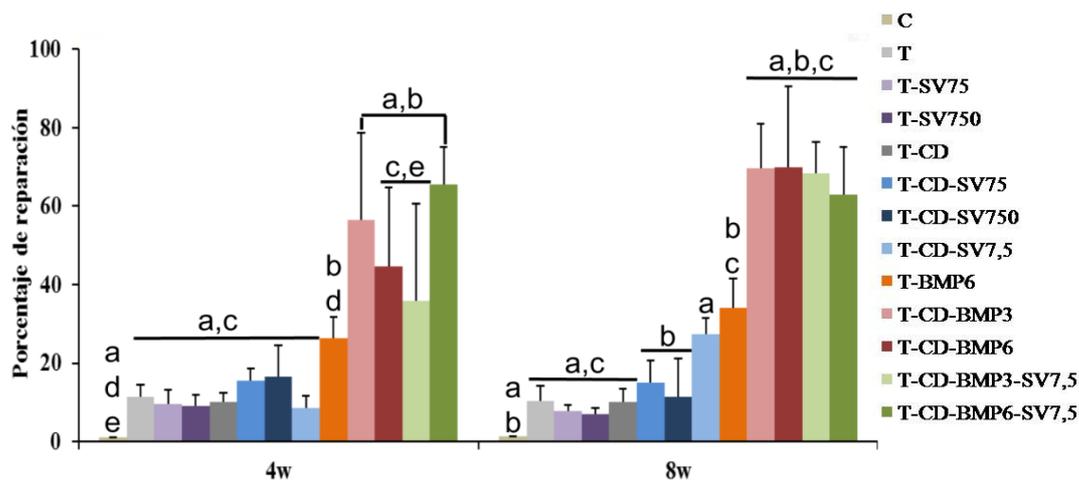


Figura 8. Análisis histomorfométrico. Gráfica comparativa de los diferentes grados de reparación (%) observados al implantar los sistemas T y T-CD. La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

Las imágenes histológicas transversales tomadas a las 8 semanas, muestran la presencia de tejido conectivo ocupando la práctica totalidad del defecto en aquellos grupos sin BMP-2 (Figura 9), mientras que en los grupos T-CD-BMP con y sin SV, se observa la formación de tejido óseo de estructura normal, pero de grosor ligeramente inferior que el hueso huésped (Figura 10).

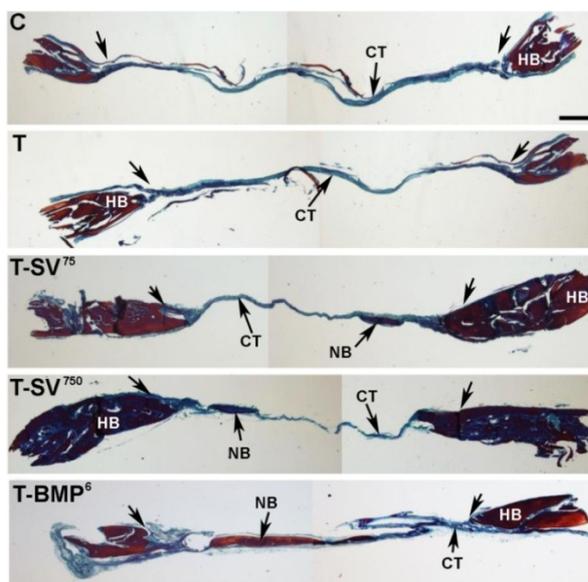


Figura 9. Imágenes representativas en sección transversal del área del defecto, mostrando la estructura y el grosor del hueso neoformado a las 8 semanas en los grupos control y de T. Las flechas de los extremos indican los límites del defecto. CT: Tejido conectivo, HB: Hueso hospedador, NB: Hueso neoformado. Barra de escala: 1 mm.

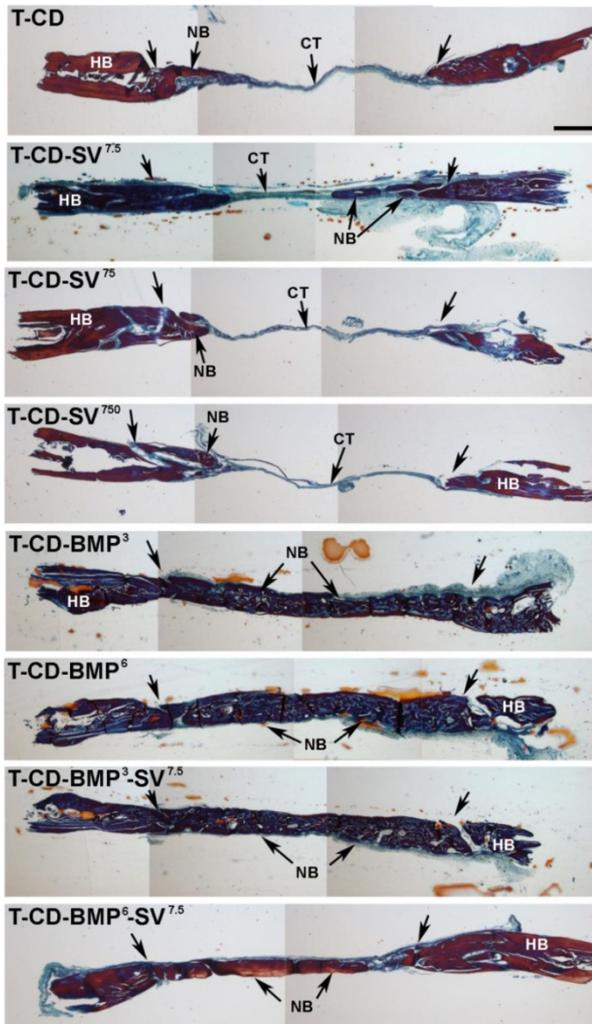


Figura 10. Imágenes representativas en sección transversal del área del defecto a nivel de la línea media, que muestran la estructura y el grosor del hueso neoformado a las 8 semanas post-implantación en los grupos de T-CD. Las flechas de los extremos indican los límites del defecto. CT: Tejido conectivo, HB: Hueso hospedador, NB: Hueso neoformado. Barra de escala: 1 mm.

Finalmente, los resultados de vascularización concuerdan con los observados en reparación: mientras que en los grupos de menor regeneración no se detecta gran formación de vasos (T, T-SV⁷⁵, T-SV⁷⁵⁰, T-BMP⁶, T-CD, T-CD-SV^{7.5}, T-CD-SV⁷⁵ y T-CD-SV⁷⁵⁰), el entramado que se observa en aquellos tratados con BMP-2 en el sistema T-CD, con y sin SV, es muy superior, presentando mayor densidad de vasos y mayor superficie vascular que en el resto. Dichas diferencias son estadísticamente significativas (Figuras 11 y 12).

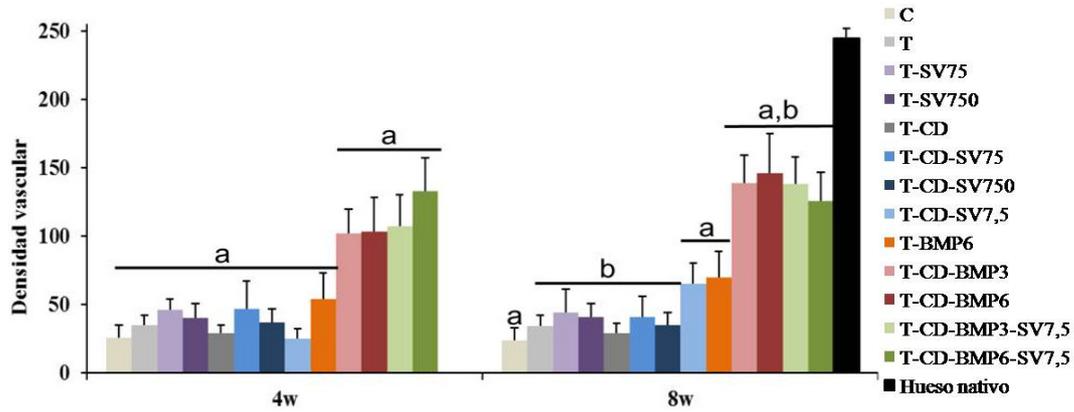


Figura 11. Representación gráfica de la densidad vascular observada a los diferentes tiempos experimentales en los sistemas T y T-CD. La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

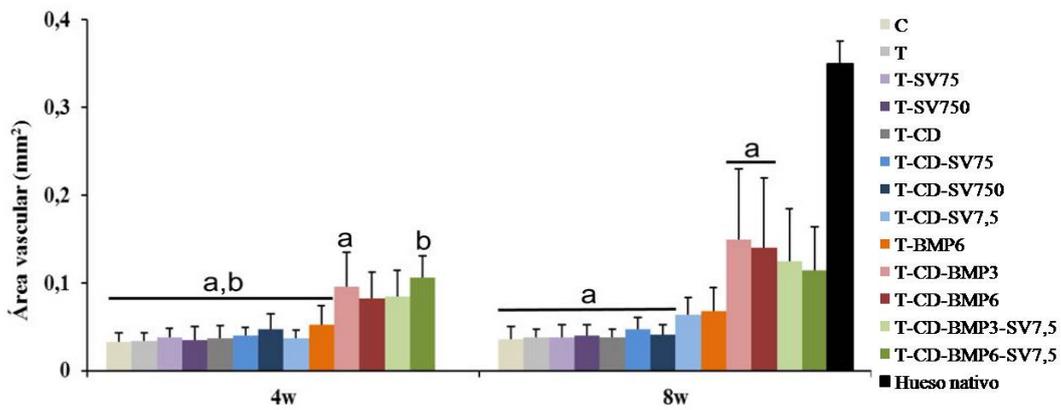


Figura 12. Representación gráfica del área vascular observada a los diferentes tiempos experimentales en los sistemas T y T-CD. La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

En los últimos años, la SV está siendo ampliamente estudiada en regeneración ósea por su efecto sobre la angiogénesis y la formación de hueso [Tai et al., 2013], pero los diferentes modelos animales, las dosis y las distintas estructura en las que va incorporada, dificulta la comparación de dichos estudios con nuestros resultados. Centrándonos en las investigaciones desarrolladas en cráneo de rata, nos encontramos con que la gran mayoría de estudios se llevan a cabo practicando defectos no críticos de aproximadamente 5 mm de diámetro y, tal y como dicen Spicer et al. [Spicer et al., 2012], un defecto crítico es aquel que no es capaz de recuperarse a lo largo de la vida del animal, y en el caso de cráneo de rata, se ha fijado en 8 mm de diámetro.

En cuanto a la dosis a administrar de SV, las publicaciones existentes no fijan un intervalo de eficacia concreto, pero sí se han reseñado efectos adversos relacionados con la dosis. Calixto et al. [2011] detectan inflamación y necrosis al implantar 0,5 y 2,2 mg de SV sin detectar reparación relevante, mientras que Ezirganlı et al. [2014] observan un ligero incremento en la formación de hueso al implantar 0,5 y 1,5 mg de SV en un defecto de 8 mm en cráneo de ratas diabéticas, pero detectan efectos adversos a nivel local. Sin embargo, los estudios más prometedores se observan con dosis de 100 µg [Nyan et al., 2010, Ferreira et al., 2015] y 5 mg [Yueyi et al., 2013], sin efectos adversos locales asociados a la SV. No obstante, en el caso de Yueyi et al., aunque no se detecta necrosis ni inflamación tisular, la dosis podría ser excesivamente alta, 20 mg/kg, con riesgo de daño sistémico a nivel muscular y miopatías [Fisher et al., 2015].

Teniendo en cuenta las dosis estudiadas por los autores anteriormente citados y que el defecto practicado por la mayoría de ellos es de menor tamaño y, por tanto, más fácil de regenerar que el practicado en el presente trabajo (8 mm), propusimos dosis de 7,5 µg, 75 µg y 750 µg, ampliando el intervalo hasta la dosis más baja que, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, es la primera vez que se estudia.

La formación de hueso y el aumento de vascularización observado en los grupos T-CD fue superior que en los grupos T, y estos resultados concuerdan con el mayor efecto osteogénico inducido por el T-CD previamente observado *in vitro* [Simões et al., 2013]. Por su parte, la respuesta tras 8 semanas de implantación de cualquiera de los geles conteniendo 75 μg y 750 μg de SV fue escasa (<20 %), pero estadísticamente superior al grupo control. La formación de vasos sanguíneos en estos grupos es similar y pobre, pues el defecto aparece ocupado por tejido conectivo de baja vascularización [Del Rosario et al., 2015b]. Sorprendentemente, el porcentaje de regeneración mayor se observa en el grupo T-CD-SV^{7.5}, próximo al detectado en el grupo T-BMP⁶.

Sin embargo, el mayor grado de regeneración de todo el experimento se localiza en los grupos tratados con 3 μg y 6 μg de BMP-2 en T-CD y en los tratados con la combinación BMP-2 y 7,5 μg de SV, aunque no se observó el sinergismo esperado en ningún caso. Además, es de reseñar el hecho de que 3 μg de BMP-2 producen el mismo efecto que 6 μg , con lo que la reducción de la dosis de BMP-2 a la mitad estaría justificada cuando utilizamos el gel T-CD como sistema para regeneración ósea.

Por otro lado, la transición de solución a gel (G' y G'') del sistema T se produce a 25,9°C [Rodríguez-Évora et al., 2014a] por lo que, con el fin de emular las condiciones a las que se enfrenta el gel antes y después de la implantación en cráneo de rata, nos centramos en estudiar el comportamiento viscoelástico de los sistemas T-CD y T a 20°C y 37°C. Sorprendentemente, el gel T-CD fue diferente al gel T, pues la viscosidad que presenta a 20°C disminuye al someterlo a una temperatura de 37°C. Por esto podemos decir que, desde un punto de vista viscoelástico, la formulación T-CD es un gel bien estructurado a 20°C, pero débil a 37°C. La influencia de las características del gel se hace patente en la mayor velocidad de cesión de la SV cuando se incorpora a la concentración de 750 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ en la formulación T con respecto a la T-CD. Lo cual indica que no sólo la viscosidad aparente del gel limita la cesión del fármaco, sino que también juega un papel relevante la hidrofobicidad del entramado; a 37°C el gel T presenta mayor

consistencia, pero su mayor hidrofilia facilita la erosión del sistema, la disolución de la SV y, por tanto, su liberación al medio. La Figura 3b refleja la evolución de los geles con 750 µg de SV y evidencia la mayor velocidad de degradación del gel T, hecho que se puede explicar por las interacciones hidrofóbicas debidas a la presencia de las cadenas PEO-PPO, y por las interacciones cristalinas que provoca la CD. Estas fuerzas de atracción evitan la rápida disolución del gel y que, pasadas 3 semanas en incubación, el gel T-CD mantenga más de la mitad de su volumen inicial (Figura 3b).

Por otra parte, aunque el efecto de la BMP-2 fue notablemente superior cuando se incorporó en el sistema T-CD que en el T, no encontramos diferencias significativas en los perfiles de cesión de la BMP-2 *in vivo* desde ambas formulaciones, aunque la liberación algo más sostenida desde el sistema T-CD durante los primeros 4 días de ensayo, podría explicar en parte las diferencias observadas. Además, recientemente se ha puesto de manifiesto que las α -CDs proporcionan cierta estabilidad al GF. De hecho, Terauchi et al. [2015] observaron que la producción de ALP y la mineralización *in vitro* de células MC3T3-E1 y C2C12, fue mayor en un complejo de BMP-2/ α -CD que al estudiar la BMP-2 libre. Otro hecho que podría explicar la mayor regeneración en los grupos T-CD-BMP³ y T-CD-BMP⁶ frente al grupo T-BMP⁶ es la mayor permanencia del T-CD en el defecto, actuando como guía y soporte para la organización del tejido y resultando en una mayor formación de hueso. De hecho, el grado de reparación observado en el grupo T-CD-BMP⁶ es el doble que en el T-BMP⁶, y es comparable al detectado previamente al incorporar 6 µg de BMP-2 encapsulada en microesferas de PLGA en el gel T [Rodríguez-Évora et al., 2014a].

Finalmente, decir que con este estudio confirmamos las ventajas del gel T-CD como sistema inyectable frente al T, la combinación del primero con BMP-2 y/o SV mejoró notablemente la regeneración ósea en un defecto crítico. Además, cabe destacar que el sistema T-CD-SV^{7.5} podría ser utilizado en la reparación de pequeños defectos óseos por su fácil manejo, eficacia y seguridad.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la ventajas que presenta la combinación T-CD con respecto a T solo.

A pesar de no encontrar sinergismo entre la BMP-2 y la SV, la dosis de BMP-2 puede reducirse a la mitad cuando se incorpora en el sistema T-CD, disminuyendo considerablemente los posibles efectos adversos asociado a la administración del GF.

El intervalo de dosis de SV podría estar cerca del límite de la dosis inferior utilizada en el presente estudio, y podría ser efectivo en el tratamiento de pequeñas fracturas óseas.

BIBLIOGRAFÍA

Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011. 39: 215-220.

Del Rosario C, Rodríguez-Evora M, Reyes R, González-Orive A, Hernández-Creus A, Shakesheff KM, White LJ, Delgado A, Évora C. Evaluation of nanostructure and microstructure of bone regenerated by BMP-2-porous scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2015a. 103: 2998-3011.

Del Rosario C, Rodríguez-Évora M, Reyes R, Delgado A and Évora C. BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous β -TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats. *Biomedical Materiales*. 2015b. 10: 1-18.

Ezirganlı Ş, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın MŞ, Sharifov R, Alkan A. The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Implants Res*. 2014. 25: 969-976.

Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl*. 2015. 29: 965-976.

Fischer S, Schatz U, Julius U. Practical recommendations for the management of hyperlipidemia. *Atheroscler Suppl*. 2015. 18: 194-198.

Hussain A, Takahashi K, Sonobe J, Tabata Y, Bessho K. Bone Regeneration of Rat Calvarial Defect by Magnesium Calcium Phosphate Gelatin Scaffolds with or without Bone Morphogenetic Protein-2. *J Maxillofac Oral Surg*. 2014. 13: 29-35.

Li J, Hong J, Zheng Q, Guo X, Lan S, Cui F, Pan H, Zou Z, Chen C. Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2-related peptide or rhBMP-2. *J Orthop Res.* 2011. 29: 1745-1752.

Mariner PD, Wudel JM, Miller DE, Genova EE, Streubel SO, Anseth KS. Synthetic hydrogel scaffold is an effective vehicle for delivery of INFUSE (rhBMP2) to critical-sized calvaria bone defects in rats. *J Orthop Res.* 2013. 31: 401-406.

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999. 286: 1946-1949.

Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, Kasugai S. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010. 93: 65-73.

Nyan M, Hao J, Miyahara T, Noritake K, Rodriguez R, Kasugai S. Accelerated and enhanced bone formation on novel simvastatin-loaded porous titanium oxide surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014. 16: 675-683.

Papadimitriou K, Karkavelas G, Vouros I, Kessopoulou E, Konstantinidis A. Effects of local application of simvastatin on bone regeneration in femoral bone defects in rabbit. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015. 43: 232-237.

Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science.* 2010. 35: 403-440

Qi Y, Zhao T, Yan W, Xu K, Shi Z, Wang J. Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy model. *Cytotherapy*. 2013. 15: 44-56.

Rodríguez-Évora M, Delgado A, Reyes R, Hernández-Daranas A, Soriano I, San Román J, Evora C. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA-βTCP concentric system in a critical size defect in rats. *Eur J Pharm Sci*. 2013. 49: 873-884.

Rodríguez-Evora M, Reyes R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Delgado A, Evora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system. *J Biomed Nanotechnol*. 2014a. 10: 959-969.

Rodríguez-Évora M, García-Pizarro E, del Rosario C, Pérez-López J, Reyes R, Delgado A, Rodríguez-Rey JC, Évora C. Smurf1 knocked-down, mesenchymal stem cells and BMP-2 in an electrospun system for bone regeneration. *Biomacromolecules*. 2014b. 15: 1311-1322.

Simões SM, Veiga F, Torres-Labandeira JJ, Ribeiro AC, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Poloxamine-cyclodextrin-simvastatin supramolecular systems promote osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Macromol Biosci*. 2013. 13: 723-734.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012. 7: 1918-1929.

Tai IC, Fu YC, Wang CK, Chang JK, Ho ML. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine*. 2013. 8: 3895-3904.

Tannoury CA, An HS. Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J.* 2014. 14: 552-559.

Terauchi M, Ikeda G, Nishida K, Tamura A, Yamaguchi S, Harada K, Yui N. Supramolecular Polyelectrolyte Complexes of Bone Morphogenetic Protein-2 with Sulfonated Polyrotaxanes to Induce Enhanced Osteogenic Differentiation. *Macromol Biosci.* 2015. 15: 953-964.

Yueyi C, Xiaoguang H, Jingying W, Quansheng S, Jie T, Xin F, Yingsheng X, Chunli S. Calvarial defect healing by recruitment of autogenous osteogenic stem cells using locally applied simvastatin. *Biomaterials.* 2013. 34: 9373-9380.

**Capítulo 3.- Técnicas de evaluación de la microestructura y nanoestructura del
hueso regenerado**

INTRODUCCIÓN

En los estudios de regeneración ósea son muchas las técnicas utilizadas como herramientas para caracterizar el tejido óseo formado, entre las que cabe destacar la histología e histomorfometría, la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la de barrido (SEM) y la tomografía computarizada (CT). Sin embargo, y aunque son técnicas de gran utilidad, ninguna de ellas nos da información conjunta acerca de la morfología y las propiedades mecánicas del hueso formado, propiedades que son esenciales a la hora de valorar la calidad del tejido formado, al estar directamente relacionadas con su capacidad estructural y de soporte.

Como alternativa o complemento a las técnicas citadas anteriormente, la microscopía de fuerza atómica (AFM) entra en escena, ya que, siendo un método de mapeo de alta resolución no destructivo, proporciona imágenes y nos da información detallada de las propiedades mecánicas de la muestra estudiada, tanto en medio líquido como en seco.

La AFM se ha utilizado tradicionalmente en la caracterización morfológica de diversos materiales [Binnig et al., 1986; Dufrêne et al., 2011], pero en las últimas décadas, la técnica está siendo desarrollada como método para determinar propiedades eléctricas [Lee et al., 2010] y magnéticas [González-Orive et al., 2009] de diferentes superficies, así como en la determinación de las propiedades mecánicas de sistemas biológicos complejos y células vivas a escala molecular [Dufrêne et al., 2013], gracias a la capacidad que tiene para proporcionar información acerca de la nano-estructura y las propiedades nano-mecánicas de la muestra [Arnal et al., 2012].

En lo que al tejido óseo se refiere, la aplicación de la AFM en la determinación de su nano-morfología y sus propiedades nano-mecánicas, ha sido recientemente revisada por Wallace [2012], quien resalta que la técnica se ha utilizado como método de evaluación morfológica del hueso a nivel de fase mineral y fibra de colágeno, sin aprovechar las

ventajas que ofrece a la hora de estudiar la dureza del tejido óseo [Sasaki et al., 2002; Fanter et al., 2006]. Autores como Hassenkam et al. [2004] o Kindt et al. [2007] han llevado a cabo la evaluación y caracterización de la nano-estructura trabecular con la AFM, mientras que Milovanovic et al. [2011, 2012, 2013, 2014], usando la misma técnica, testan las variaciones óseas dependientes de la edad.

En cuanto a las propiedades mecánicas, existen algunos estudios orientados a la caracterización nanoscópica de la resistencia ósea por AFM [Bozec y Horton, 2005; Tai et al., 2005; Tai et al., 2007; Lefèvre et al., 2013], sin embargo, estos análisis suelen limitarse a muestras expuestas al aire, es decir, no tienen en cuenta las diferencias existentes entre las propiedades mecánicas de hueso hidratado y seco [Wallace et al., 2012; Lefèvre et al., 2013].

Por último, la AFM también se ha empleado en el seguimiento de la regeneración de un defecto óseo bajo estímulos osteoinductivos, tales como fotoexcitación [Baranauskas et al., 2005] o por medio de la implantación de células mesenquimales (MSCs) modificadas genéticamente para sobreexpresar proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) [Pelled et al., 2007; Tai et al., 2008].

OJETIVOS

El objetivo de este último capítulo es evaluar el hueso regenerado en defecto crítico en cráneo de rata mediante diferentes técnicas, con el fin de buscar si alguna de ellas puede servir de alternativa a la histología. Para ello se estudian tres sistemas diferentes de cesión de BMP-2: un sistema de microesferas de PLGA 50:50, y dos sistemas de electrohilado tipo sándwich fabricados con PLGA 50:50 o PLGA 75:25, durante 12 semanas. La cinética de liberación del GF se monitoriza con ^{125}I -BMP-2 y el hueso formado se analiza por métodos histológicos e histomorfométricos, radiografías, espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

Por último, el sistema de microesferas se seleccionó para evaluar la progresión del proceso regenerativo a lo largo de 12 semanas tanto por histología e histomorfometría como por AFM en medio líquido y al aire. En este sistema se evalúa tanto la calidad del hueso neoformado como la evolución de las fibras de colágeno a lo largo del proceso regenerativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el material utilizado en este trabajo se procesa en condiciones asépticas tal y como se detalla en el CAPÍTULO 1.

Fabricación y ensamblaje de los sistemas Ms(50:50), S(50:50) y S(75:25)

Las microesferas de PLGA (Resomer® RG504 (PLGA 50:50) o Resomer® RG755S (PLGA 75:25), Evonik Industries, Alemania) cargadas con BMP-2 (Biomedal Life Sciences, España) se preparan siguiendo el método descrito en el CAPÍTULO 1. Adicionalmente se preparan varios lotes de microesferas con ¹²⁵I-BMP-2 para determinar el rendimiento de encapsulación de la proteína y su perfil de cesión *in vivo*, marcando la BMP-2 tal y como se especifica en el CAPÍTULO 1.

Para la elaboración del sistema Ms(50:50) se mezclan 25 mg de microesferas de PLGA 50:50 conteniendo 6 µg de BMP-2, con 20 µL de Pluronic® F-127 (P127) (Sigma, EEUU) al 15 % (p/v). La mezcla se realiza inmediatamente antes de la implantación utilizando como molde soportes de 8 mm de diámetro interno (jeringas BD Discardit™ II de 2 mL).

Las matrices tipo sándwich (membrana-microesferas-membrana), nombradas como S(50:50) y S(75:25) en función de la proporción láctico/glicólico del polímero utilizado, se fabrican de la misma manera que la matriz Ms(50:50) pero en este caso se incorporan dos láminas de electrohilado de 1 cm², encima y debajo de las mismas. Las microesferas usadas en cada uno de los sistemas se elaboran con el mismo polímero que las láminas de electrohilado que las contienen. Para fabricar las láminas se prepara una disolución de polímero (PLGA 50:50 o PLGA 75:25) al 16 % (p/v) en HFIP (Fluka, Suiza), se carga en una jeringa y se eyectan 700 µL a una velocidad de 1 mL/h para ser recogida en un colector, situado a 12 cm de la aguja, que rota a 200 rpm bajo una fuente de alto voltaje (12 kV) [Rodríguez-Évora et al., 2014].

Caracterización de los sistemas Ms(50:50), S(50:50) y S(75:25)

La calidad de las membranas y el diámetro de fibra se caracterizan por SEM, mientras que el espesor de las láminas se determina por estereomicroscopía (Leica M205 C, Leica LAS, v3 software). El cálculo de la porosidad de las láminas, así como el tamaño y morfología de las microesferas, se describe en el CAPÍTULO 1.

Ensayos in vivo

En los experimentos *in vivo*, incluyendo cirugía y ensayos de cesión, se procede tal y como se ha descrito en el CAPÍTULO 1.

Grupos	Histología y Radiología	AFM y EDX
Control	9	-
Ms(50:50)	9	6
Ms(50:50)-BMP ^a	9	6
S(50:50) ^b	3	2
S(50:50)-BMP ^{a,b}	3	2
S(75:25) ^b	3	2
S(75:25)-BMP ^{a,b}	3	2
Hueso nativo	3	2

Los grupos experimentales aparecen detallados en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos experimentales. (^a) Incluye 5 ratas adicionales para los ensayos de cesión, y (^b) 3 ratas para el estudio radiológico y el análisis macroscópico a 4 semanas.

Evaluación del tejido regenerado

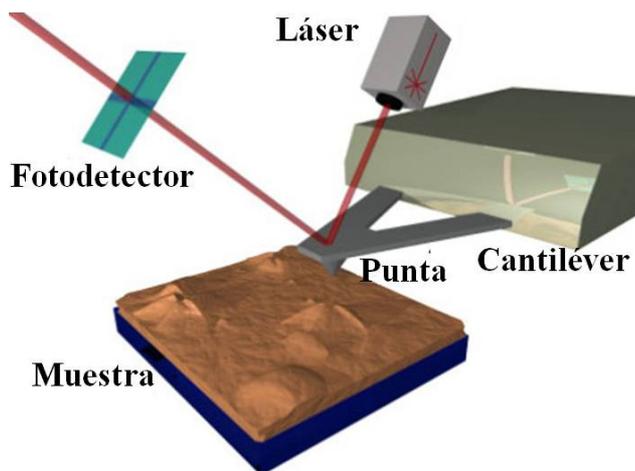
A cada tiempo de estudio las ratas se sacrifican por inhalación de CO₂ y se separan en dos grupos: un grupo de 2 animales destinado al análisis de AFM y EDX, y otro de 3 ratas destinado a la evaluación histológica e histomorfométrica del hueso (CAPÍTULO 1). En el primer grupo, las muestras se envuelven en gasas humedecidas con PBS (pH 7,4) y se congelan hasta su evaluación [Liu et al., 2013].

En cuanto al análisis macroscópico y radiológico, las muestras se procesan tal y como se ha detallado en el CAPÍTULO 1.

- AFM

La técnica de AFM (Esquema 1) se utiliza para determinar las propiedades mecánicas del hueso y extraer imágenes topográficas del mismo. Las muestras óseas se fijan a un portaobjetos circular de acero, se lavan con agua MQ (Millipore, milli-Q gradient A10 Water Purification System) y, dependiendo de si la medida es al aire o en medio líquido, se secan en atmósfera de N₂, o se les añaden 100 µL de PBS antes del análisis, respectivamente.

Las imágenes cuantitativas, tanto al aire como en medio líquido (PBS, pH 7,4), se obtienen a temperatura ambiente empleando un controlador Nanoscope V (Bruker, EEUU) en modo Peak Force Tapping™ (Peak Force-Quantitative Nanomechanics, PFT-QNM) [Sababi et al., 2012]. Para las medidas en líquido se utilizan puntas de



Esquema 1. Esquema representativo del funcionamiento de un Microscopio de Fuerza Atómica.
Fuente: <http://education.mrsec.wisc.edu/nanoquest/afm/>

nitruro de silicio (NP-C, Bruker, EEUU) con un radio nominal de entre 20 y 60 nm, mientras que para las medidas al aire, se usan puntas de Si/SiO₂ (TAP 525A, Bruker, EEUU). La constante de fuerza del cantiléver se registra utilizando el método del Thermal Tuning [Lévy y Maaloum, 2002], presentando una variación de 0,14-0,26 N/m y de 186-222 N/m, para NP-C y TAP 525A, respectivamente. Por su parte, para la calibración de la sensibilidad de deflexión del cantiléver, se utilizan muestras de sílice fundido para las medidas al aire, y de mica recién exfoliada para las determinaciones en

medio líquido. Los valores de módulo de Young se calculan mediante el ajuste a los modelos DMT [Derjaguin et al., 1975] y Sneddon [Sneddon, 1965; Butt et al., 2005].

Los resultados experimentales se obtienen de 7 zonas diferentes dentro de la misma muestra y, de cada una de ellas, se registran 5 imágenes diferentes en 3 regiones distintas. De ahí que los valores de módulo de Young se promedien a partir de 105 imágenes por muestra ($7 \times 3 \times 5 = 105$). El procesamiento de los datos se lleva a cabo con el Nanoscope Analysis (Bruker, EEUU), WS x M (Nanotec) y el software Gwyddeen (GNU) [Horcas et al., 2007].

- *EDX*

Inmediatamente después de la evaluación por AFM, las muestras se recubren con carbono y se analizan por EDX (Jeol JSM-6300) para determinar la mineralización del hueso neoformado.

RESULTADOS

Caracterización de los sistemas Ms(50:50), S(50:50) y S(75:25)

Las imágenes de las láminas de electrohilado obtenidas por SEM (Figura 1) muestran la presencia de fibras depositadas aleatoriamente con un diámetro medio de 1,71 μm y 1,21 μm , en función del polímero utilizado en la elaboración (Figura 1a, b; Tabla 2). Estas diferencias prácticamente no influyen en las características de las láminas, siendo su porosidad y espesor similares (Tabla 2).

En cuanto a las microesferas, en las figuras 1c y 1d se observan las diferencias morfológicas entre las fabricadas con el PLGA 75:25 y el PLGA 50:50. La superficie de las 75:25 (Figura 1c) es mucho más lisa que la de las 50:50 (Figura 1d), que presentan ciertas irregularidades y poros. Sin embargo, el rendimiento de incorporación de la BMP-2 y el tamaño de las microesferas no varían significativamente (Tabla 3).

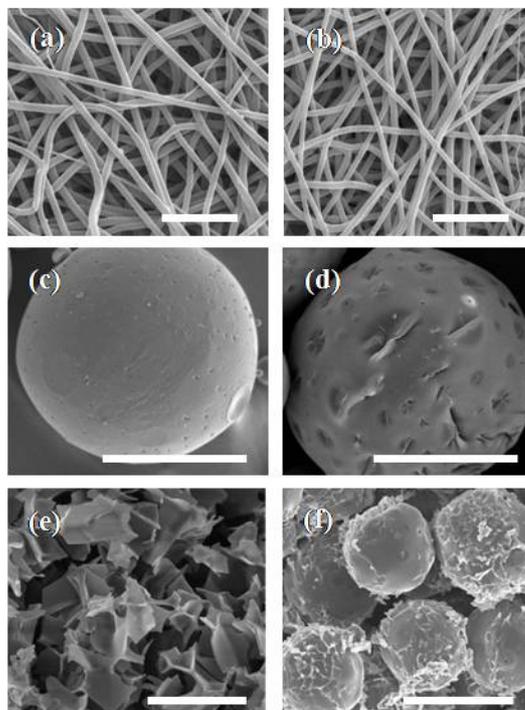


Figura 1. Imágenes de SEM de las láminas de electrohilado fabricadas con PLGA 75:25 (a) y PLGA 50:50 (b), de las microesferas de PLGA 75:25 (c) y PLGA 50:50 (d), de la microestructura del P127 al 15 % (e), y de las microesferas de PLGA 50:50 mezcladas con éste último (f). Barra de escala: (a) y (b) 15 μm , (c) y (d) 100 μm , (e) 50 μm , y (f) 200 μm .

	Membranas PLGA 75:25	Membranas PLGA 50:50
Porosidad (%)	69,3 ± 2,9	76 ± 3,7
Espesor (µm)	122 ± 20	147 ± 18
Diámetro de fibra (µm)	1,71 ± 0,43	1,21 ± 0,40

Tabla 2. *Parámetros morfológicos y físicos de las membranas de electrohilado.*

	Microesferas PLGA 75:25	Microesferas PLGA 50:50
RI de la BMP-2 (%)	78,1 ± 9	71,4 ± 5,8
Tamaño (µm)	182,7	191,1

Tabla 3. *Tamaño de las microesferas y rendimiento de incorporación (RI) de la BMP-2 en las mismas.*

Por otro lado, la estructura del gel de P127 aparece reflejada en la figura 1e, y en la figura 1f se observa cómo se recubren las microesferas con el gel.

Por último, indicar que la masa media de los sistemas sándwich ya ensamblados es de 32 ± 1,7 mg.

Ensayo de cesión in vivo

Los perfiles de cesión de la ¹²⁵I-BMP-2 desde los tres sistemas son similares y no se observan diferencias a destacar entre ellos (Figura 2).

- S(50:50)-BMP vs Ms(50:50)-BMP: $f_2 = 71,92$
- Ms(50:50)-BMP vs S(75:25)-BMP: $f_2 = 56,79$
- S(75:25)-BMP vs S(50:50)-BMP: $f_2 = 64,98$

Durante las primeras 24 horas de ensayo, la cantidad de BMP-2 cedida asciende al 30 % de la dosis inicial administrada, lo que se corresponde con 1,9 µg de BMP-2 liberada. En las siguientes 2 semanas se llega al 85 % de la dosis a una velocidad de 4-5 %/día (260-325 ng/día). Finalmente, a partir del día 14, la velocidad desciende a un 0,4 %/día, y a los 30 días se ha liberado el 90 %.

Evaluación del tejido regenerado

- *Análisis macroscópico y radiológico*

Macroscópicamente, en los grupos blancos se observa un tejido semitransparente de aspecto gelatinoso, y en las muestras con BMP-2, aparece una estructura densa similar al tejido adyacente (Figura 3), haciendo sospechar la presencia de hueso.

De acuerdo con lo observado en las imágenes radiológicas (Figura 4), los grupos tratados con BMP-2 alcanzan mayor grado de reparación, independientemente del sistema implantado. Además, la evolución radiológica de los diferentes grupos concuerda con los resultados histológicos e histomorfométricos, con los datos de AFM, y con las imágenes macroscópicas.

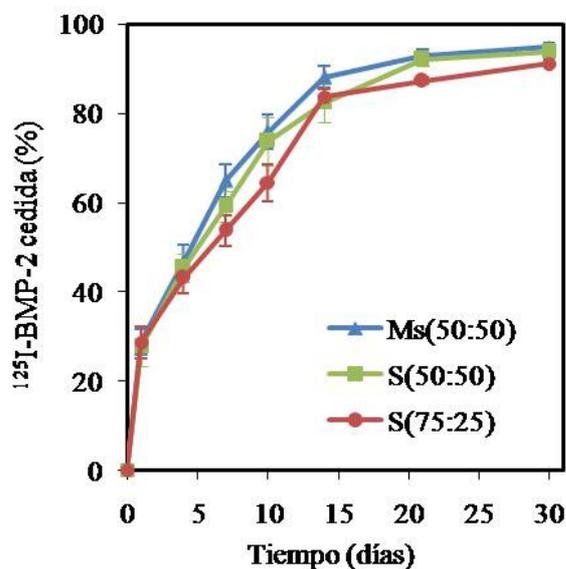


Figura 2. Perfil de cesión de la ^{125}I -BMP-2 desde los sistemas Ms(50:50), S(50:50) y S(75:25). $n=5$.

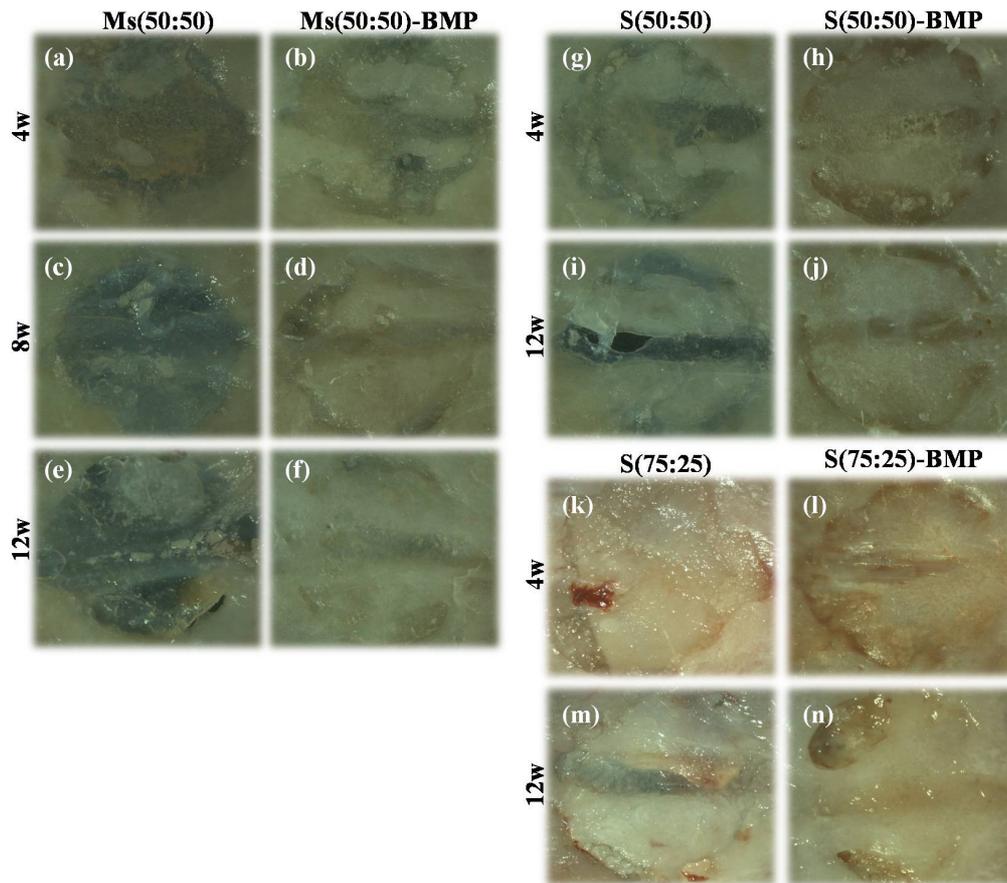


Figura 3. Vista macroscópica de la cara interna del cráneo de rata al implantar el sistema Ms(50:50) tras 4, 8 y 12 semanas (a-f), o los sistemas S(50:50) (g-j) y S(75:25) (k-n) tras 4 y 12 semanas. En (k) y (n) las láminas de electrohilado correspondientes al sistema S(75:25) se reconocen con cierta facilidad. Imágenes tomadas con estereomicroscopio (Leica M205 C).

- AFM

La medida del módulo de Young en medio seco es posible realizarla en todas las muestras del sistema Ms(50:50) (Figura 5), sin embargo, la medida en medio líquido sólo se consigue realizar sobre las muestras que presentan un mayor grado de regeneración.

En los grupos control, blanco (Ms(50:50)) y el grupo Ms(50:50)-BMP tras 4 semanas de implantación, la medida en medio líquido está limitada por la textura gelatinosa que presentan las muestras. Sin embargo, la determinación del módulo de Young en el grupo Ms(50:50)-BMP después de 8 y 12 semanas, no presenta problema alguno, y los resultados obtenidos son muy similares a los valores del hueso nativo (Figuras 6). Tanto es así, que el módulo de Young para el grupo Ms(50:50)-BMP tras 8 y 12 semanas, tanto al aire como en líquido, es estadísticamente igual al del hueso original (Figuras 5 y 6).

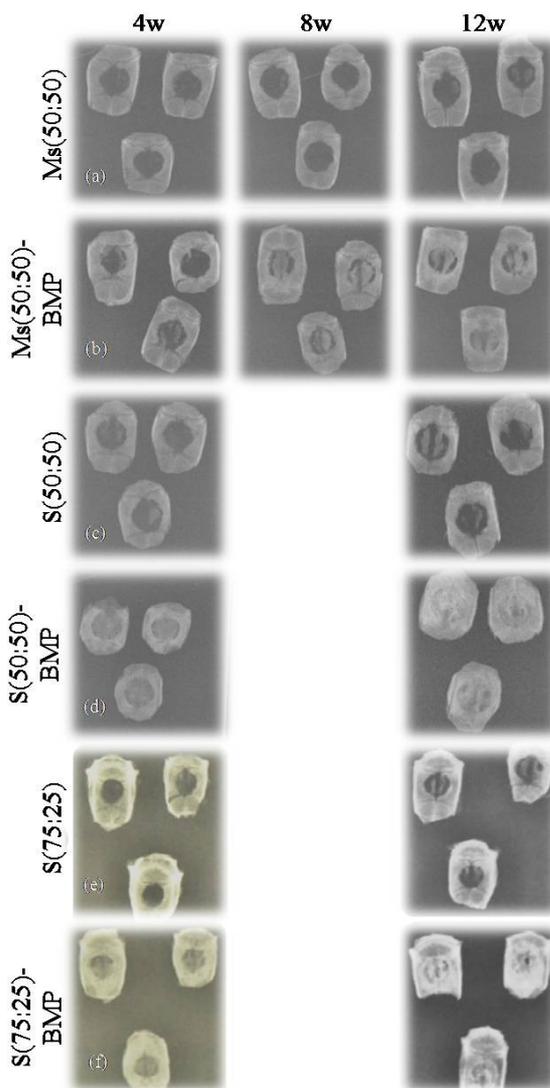


Figura 4. Radiografías representativas del proceso regenerativo tras 4, 8 y 12 semanas en defecto crítico de calvaria de rata.

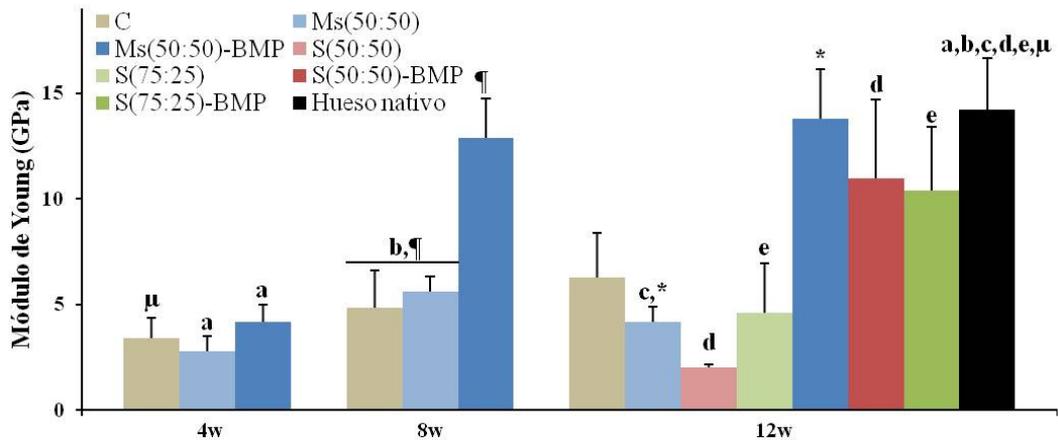


Figura 5. Gráfica comparativa de los diferentes valores de módulo de Young observados al aire en los sistemas Ms(50:50), S(50:50) y S(75:25). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

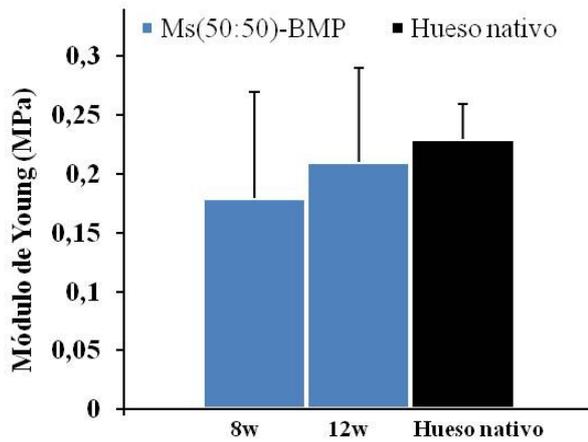


Figura 6. Gráfica comparativa de los diferentes valores de módulo de Young en condiciones fisiológicas (PBS, pH 7,4), observados en el sistema Ms(50:50) a las 8 y 12 semanas de la implantación y su comparación con el hueso nativo.

La progresión del proceso regenerativo se muestra a través de las imágenes detalladas del grupo Ms(50:50), en las que se observa la aparición de fibras de colágeno y su progresivo recubrimiento mineral.

En la primera etapa, 4 semanas después de la implantación, los defectos se encuentran invadidos por fibras de colágeno (Figura 7a), pero tras 8 y 12 semanas, esas mismas fibras se cubren

progresivamente por fase mineral (Figura 8a y 9a). Este hecho es mucho más evidente en las muestras tratadas con BMP-2.

Asimismo, los valores de módulo de Young aumentan sustancialmente a lo largo del tiempo gracias a la deposición de fase mineral. De hecho, a tiempos más largos, el número de puntos brillantes en las imágenes de módulo de Young aumenta (Figuras 7b, 8b y 9b), lo que está directamente relacionado con zonas altamente mineralizadas y de elevada dureza (Figura 7c, 8c y 9c).

Paralelamente se observan resultados similares en los grupos S(50:50)-BMP y S(75:25)-BMP que, aunque estudiados únicamente a tiempo final (12

semanas) y cuyas propiedades mecánicas se examinan exclusivamente al aire, alcanzan valores de módulo de Young que se aproximan al de hueso nativo (Figura 5).

Las imágenes topográficas de los grupos S(50:50) y S(75:25) tras 12 semanas de implantación muestran la presencia casi exclusiva de fibras de colágeno en las muestras

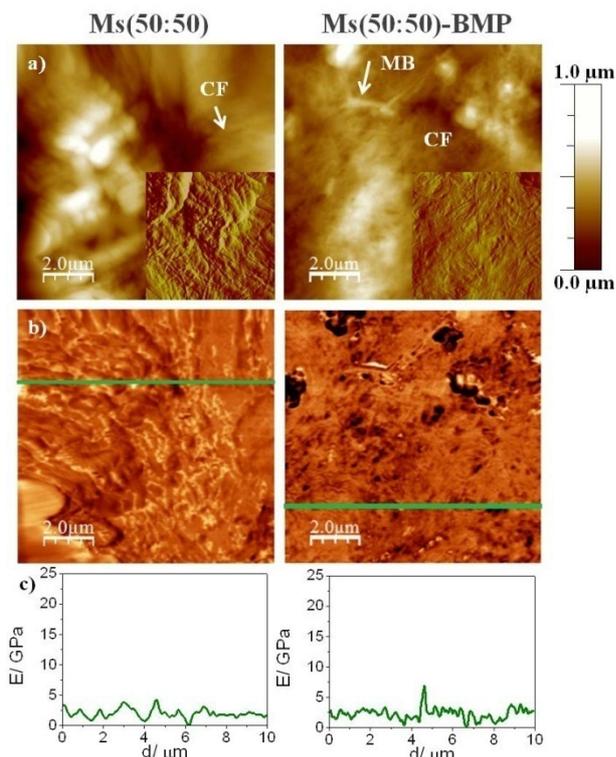


Figura 7. Imágenes en modo modo Peak Force Tapping™ (PFT) correspondientes a la topografía de una sección de $10 \mu\text{m}^2$ en las muestras Ms(50:50) y Ms(50:50)-BMP tras 4 semanas de implantación en cráneo de rata (a). (b) se corresponde con el módulo de Young de la misma sección, siendo las zonas más brillantes las de mayor rigidez. En (c) se representa una sección de la imagen anterior. CF: fibras de colágeno, MB: hueso mineralizado.

blancas (Figura 10a y 11a). Por su parte, en las muestras tratadas con BMP-2, dichas fibras se van recubriendo con fase mineral (Figura 10a y 11a), lo que está directamente relacionado con el aumento de zonas brillantes (Figura 10b y 11b) y con valores más altos de dureza (Figura 10c y 11c).

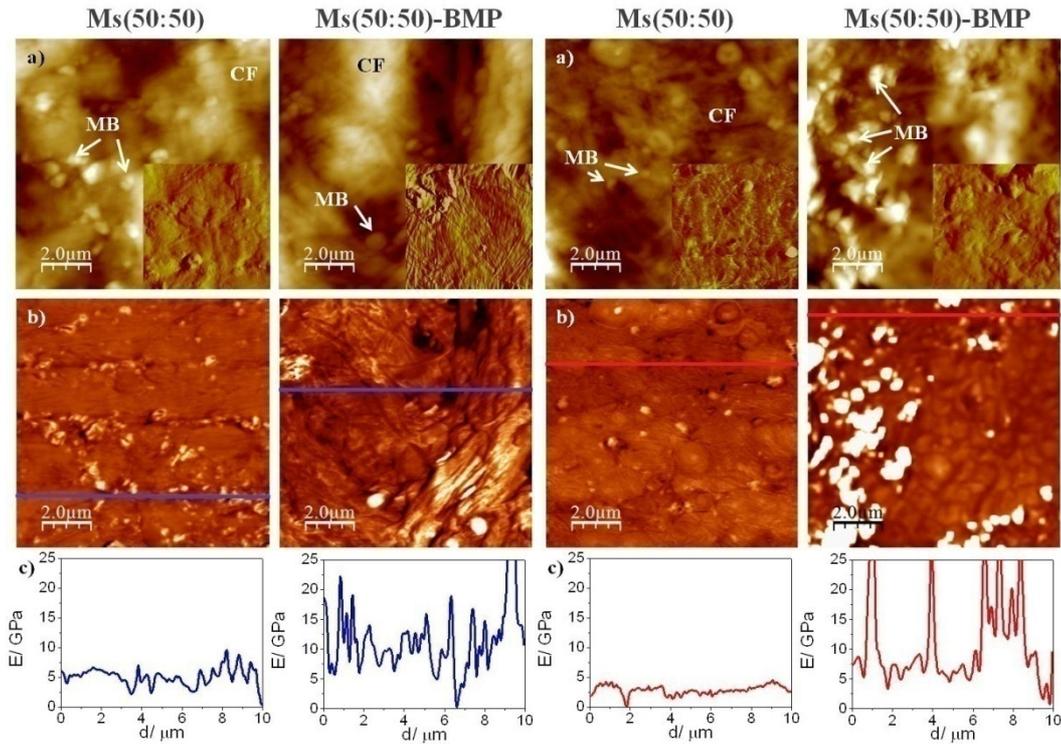


Figura 8. Imágenes en PFT correspondientes a la topografía de una sección de $10 \mu\text{m}^2$ en las muestras Ms(50:50) y Ms(50:50)-BMP tras 8 semanas de implantación en cráneo de rata (a). (b) se corresponde con el módulo de Young de la misma sección, siendo las zonas más brillantes las de mayor rigidez. En (c) se representa una sección de la imagen anterior. CF: fibras de colágeno, MB: hueso mineralizado.

Figura 9. Imágenes en PFT correspondientes a la topografía de una sección de $10 \mu\text{m}^2$ en las muestras Ms(50:50) y Ms(50:50)-BMP tras 12 semanas de implantación en cráneo de rata (a). (b) se corresponde con el módulo de Young de la misma sección, siendo las zonas más brillantes las de mayor rigidez. En (c) se representa una sección de la imagen anterior. CF: fibras de colágeno, MB: hueso mineralizado.

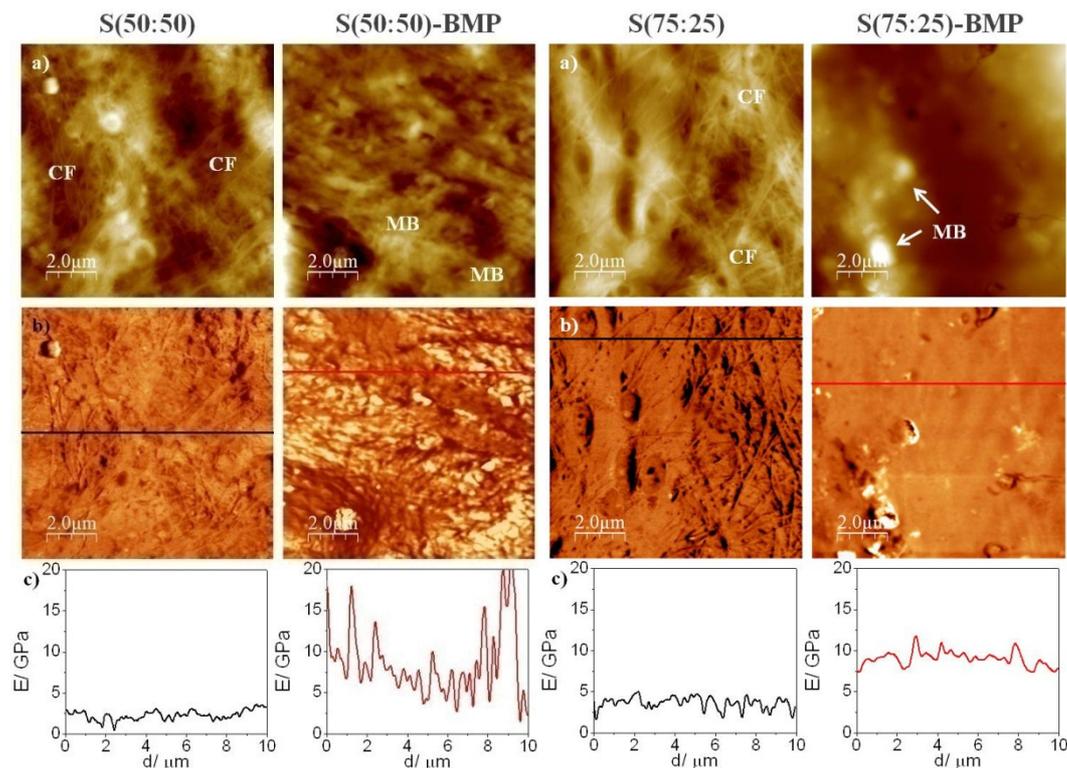


Figura 10. Imágenes en PFT correspondientes a la topografía de una sección de $10 \mu\text{m}^2$ en las muestras S(50:50) y S(50:50)-BMP tras 12 semanas de implantación en cráneo de rata (a). (b) se corresponde con el módulo de Young de la misma sección, siendo las zonas más brillantes las de mayor rigidez. En (c) se representa una sección de la imagen anterior. CF: fibras de colágeno, MB: hueso mineralizado.

Figura 11. Imágenes en PFT correspondientes a la topografía de una sección de $10 \mu\text{m}^2$ en las muestras S(75:25) y S(75:25)-BMP tras 12 semanas de implantación en cráneo de rata (a). (b) se corresponde con el módulo de Young de la misma sección, siendo las zonas más brillantes las de mayor rigidez. En (c) se representa una sección de la imagen anterior. CF: fibras de colágeno, MB: hueso mineralizado.

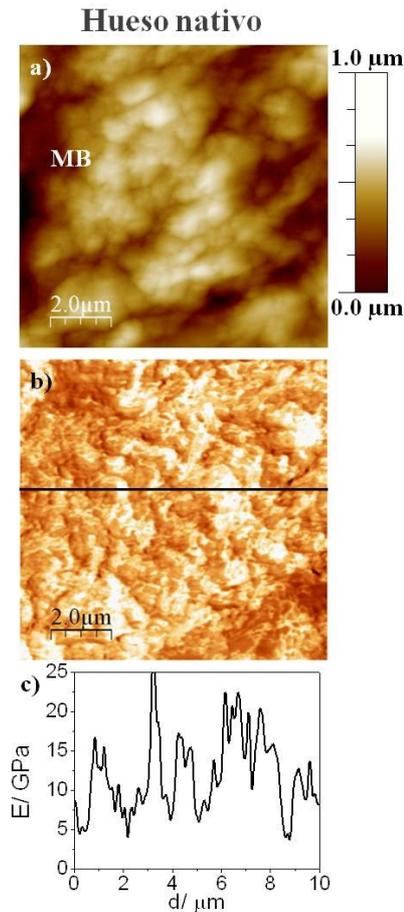


Figura 12. Imágenes en PFT correspondientes a la topografía de una sección de $10 \mu\text{m}^2$ del hueso nativo (a). (b) se corresponde con el módulo de Young de la misma sección, siendo las zonas más brillantes las de mayor rigidez. En (c) se representa una sección de la imagen anterior. MB: hueso mineralizado.

En cuanto al hueso nativo, utilizado como control positivo, las imágenes topográficas (Figura 12a) evidencian la presencia única y exclusiva de fase mineral, por lo que las fibras de colágeno fueron indetectables. Por otro lado, en la figura 12b se reflejan colores blanquecinos y brillantes que corresponden a regiones de mayor dureza (Figura 12c).

Por otro lado, las medidas de PFT-QNM llevadas a cabo en condiciones fisiológicas (PBS, pH 7,4) muestran resultados similares a los observados por AFM en medio seco: incremento en la mineralización y un módulo de Young similar entre las muestras Ms(50:50)-BMP tras 8 y 12 semanas y el hueso original (Figura 6). Desafortunadamente, las imágenes obtenidas no reflejan la estructura del tejido (Figura 13a) ni claridad en las imágenes del módulo de Young (Figura 13b), pero cabe destacar el cambio de magnitud que existe entre las medidas en seco, que alcanzan los GPa (Figura 9c), y las medidas en condiciones fisiológicas, que son del orden de MPa (Figura 13c).

Además de la determinación de la dureza y las propiedades mecánicas, se han caracterizado las fibras de colágeno presentes en el hueso regenerado. El grosor de las fibras va de 70 a 300

nm, y su periodo-D, periodicidad típica de las fibras de colágeno, es de $68,86 \pm 2,41$ nm. En las figuras 14 y 15 se detalla la presencia de fibras de colágeno en las muestras correspondientes al sistema Ms(50:50), así como su periodo-D, mientras que en la tabla 4 se refleja el periodo-D promedio de cada uno de los grupos experimentales.

Grupo experimental	Periodo-D (nm)
Ms(50:50) 4w	$67,7 \pm 3,5$
Ms(50:50) 8w	$67,5 \pm 1,5$
Ms(50:50) 12w	$70,6 \pm 1,9$
Ms(50:50)-BMP 4w	$69,0 \pm 2,4$
Ms(50:50)-BMP 8w	$68,1 \pm 3,0$
Ms(50:50)-BMP 12w	$69,8 \pm 3,5$
S(75:25) 12w	$68,8 \pm 1,5$
S(75:25)-BMP-2 12w	$68,8 \pm 2,1$
S(50:50) 12w	$69,5 \pm 1,6$
S(50:50)-BMP-2 12w	$68,9 \pm 1,8$
Hueso nativo	-

Tabla 4. Periodicidad típica de la fibra de colágeno determinada en cada uno de los grupos salvo el de hueso nativo, pues su visualización no fue posible.

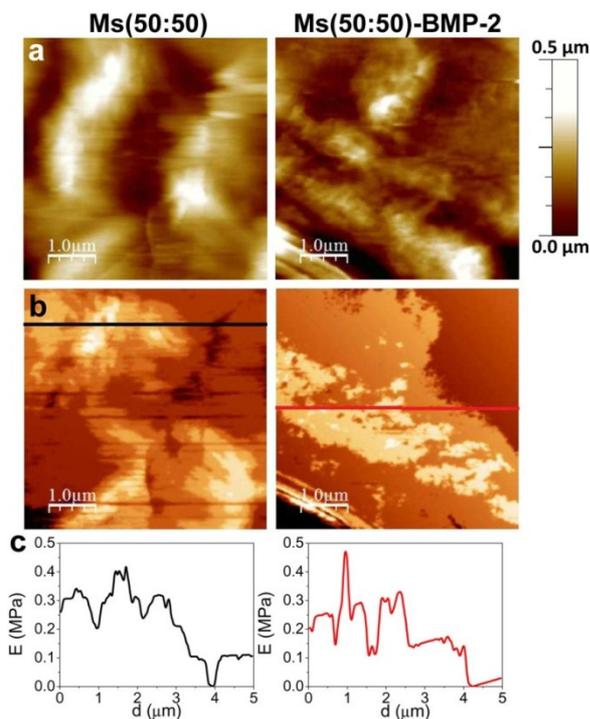


Figura 13. Imágenes topográficas en PFT tomadas en una sección de $5 \mu\text{m}^2$ en condiciones fisiológicas (PBS, pH 7,4), de las muestras Ms(50:50) y Ms(50:50)-BMP tras 12 semanas de implantación en defecto crítico en cráneo de rata (a). Imágenes de módulo de Young (b) y detalle de dichos valores en una sección determinada de la imagen (c). CF: fibras de colágeno, MB: hueso mineralizado.

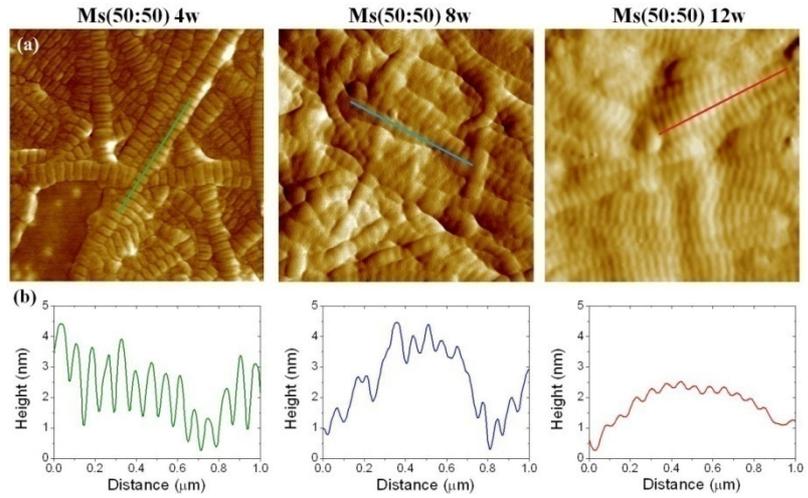


Imagen 14. Imagen topográfica en PFT tomada en una sección de $2 \mu\text{m}^2$ en las muestras Ms (50:50) (a). (b) se corresponde con valores de altura de una fibra de colágeno, indicando el periodo-D de la fibra.

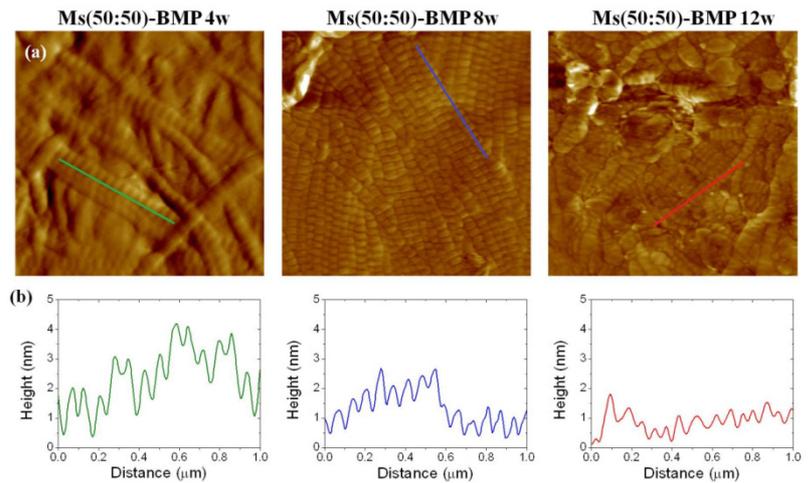


Imagen 15. Imagen topográfica en PFT tomada en una sección de $2 \mu\text{m}^2$ en las muestras Ms (50:50)-BMP (a). (b) se corresponde con valores de altura de una fibra de colágeno, indicando el periodo-D de la fibra.

- Evaluación histológica

El análisis histológico de los grupos blancos muestra escasa respuesta en cualquiera de los tres sistemas (Figura 16 y 17), y la mayor parte de la superficie del defecto aparece ocupada por tejido conectivo (Figura 16 y 17). En cuanto al grupo Ms(50:50)-BMP, a las 4 semanas muestra cierta mineralización fundamentalmente localizada en los márgenes del defecto (Figura 16), pero a 8 y 12 semanas, dicha mineralización es notablemente mayor y el hueso formado ocupa más de la mitad del defecto (Figura 16).

Los resultados obtenidos tras 12 semanas de implantación en cualquiera de los tres grupos combinados con BMP-2 (Ms(50:50)-BMP, S(50:50)-BMP y S(75:25)-BMP) es muy similar, pero el grupo S(50:50)-BMP es en el que el hueso regenerado ocupa un área mayor (Figura 17).

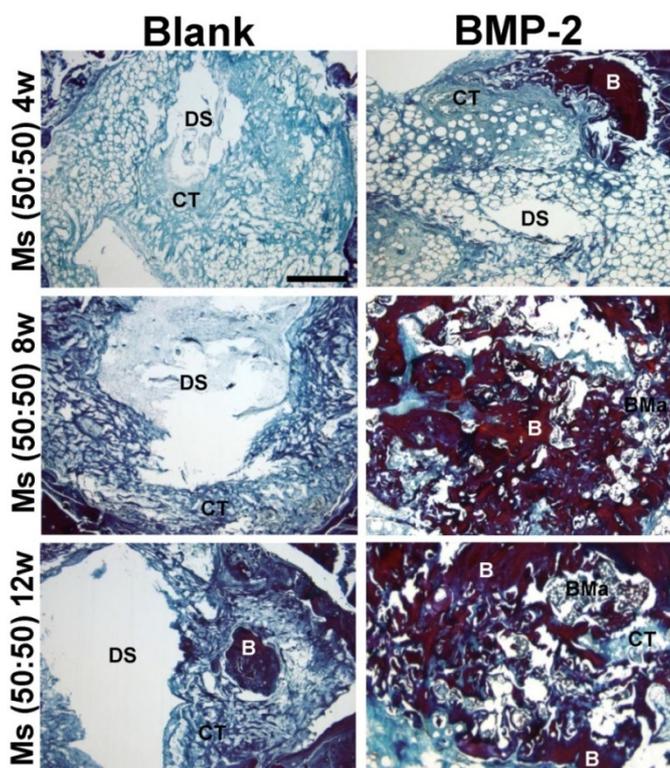


Figura 16. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo en ratas a las 4, 8 y 12 semanas post-implantación pertenecientes al grupo Ms(50:50). Las muestras blancas y las tratadas con BMP-2 presentan diferentes grados de reparación (Tinción VOF). CT: Tejido conectivo, DS: defecto, H: hueso. Barra de escala: 1,6 mm.

El análisis de las secciones transversales tras 12 semanas corrobora lo observado con las secciones horizontales: mientras que en las muestras blancas no se observa formación alguna de hueso y el tejido conectivo ocupa la mayor parte del defecto, en los animales tratados con BMP-2 se observa la formación de una estructura ósea normal (Figura 18).

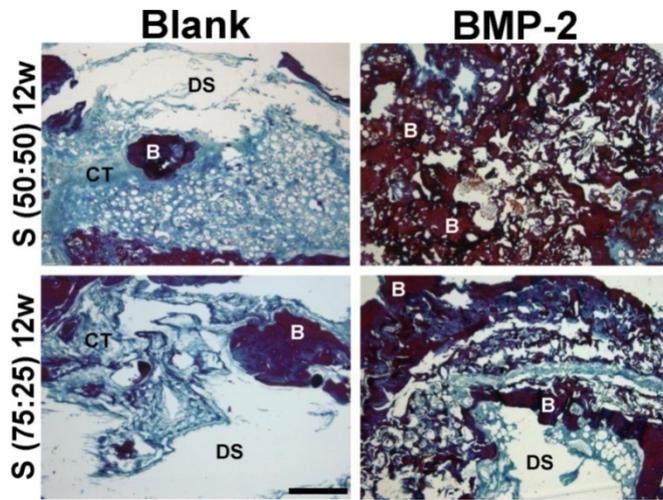


Figura 17. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto de cráneo en ratas a las 12 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos S(50:50) y S(75:25). Las muestras blancas y las tratadas con BMP-2 presentan diferentes grados de reparación (Tinción VOF). CT: Tejido conectivo, DS: defecto, H: hueso. Barra de escala: 1,6 mm.

Además, los cortes transversales nos dan información acerca del grosor del hueso formado, siendo éste mayor en aquellos animales tratados con los sistema tipo sándwich (S(50:50) y S(75:25)) que en los tratados con el sistema de microesferas (Ms(50:50)) (Figura 18).

- Evaluación histomorfométrica

Durante todo el periodo experimental, el análisis histomorfométrico confirma una reparación del 1% al 10% del área total del defecto en los grupos control y blanco (Ms(50:50)) (Figura 19).

El grupo Ms(50:50)-BMP presenta un 20 % de reparación tras 4 semanas (Figura 19), mientras que tras 8 y 12, exhibe un incremento en la respuesta regeneradora hasta llegar a valores del 50 % y del 55 % respectivamente (Figura 19).

Por su parte, el grupo S(75:25)-BMP muestra un resultado muy similar al observado en Ms(50:50)-BMP tras 12 semanas (Figura 19), pero el grupo S(50:50)-BMP

destaca entre ellos alcanzando un grado de reparación del 80 % (Figura 19). El valor de regeneración óseo es menor en el grupo Ms(75:25)-BMP que en el S(50:50)-BMP porque uno de los animales no experimentó respuesta reparadora (Figura 19).

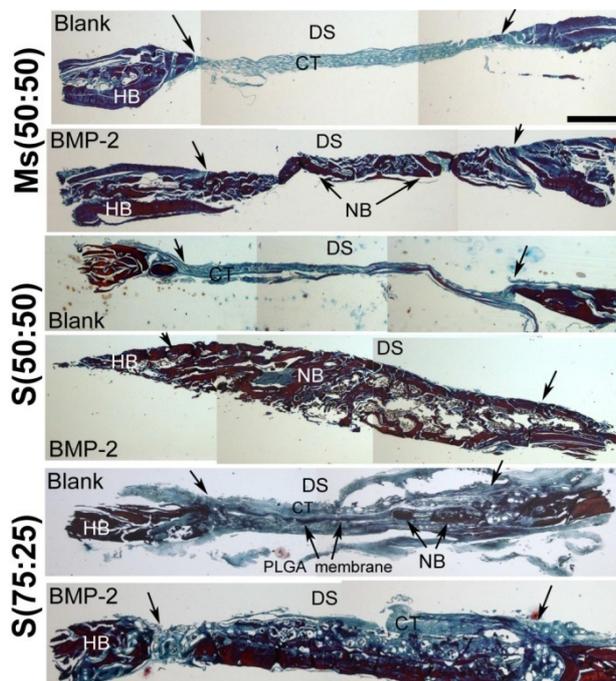


Figura 18. Imágenes representativas en sección transversal del defecto de cráneo en ratas a las 12 semanas post-implantación pertenecientes a los grupos Ms(50:50), S(50:50) y S(75:25) tanto blancos como combinados con BMP-2. El grosor del nuevo hueso confirma el diferente grado de reparación entre los grupos tratados con BMP-2 y los no tratados. Las flechas indican el límite entre el hueso huésped y el regenerado. CT: Tejido conectivo, DS: defecto, HB: hueso hospedador, NB: hueso neoformado. Barra de escala: 2 mm.

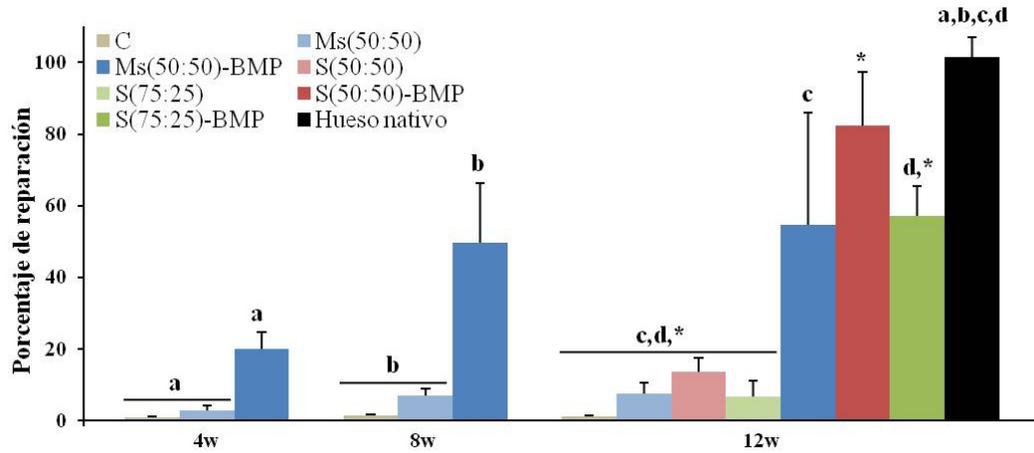


Figura 19. Análisis histomorfométrico. Gráfica comparativa de los diferentes grados de reparación (%) observados al implantar los sistemas Ms(50:50), S(50:50) y S(75:25). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

- EDX

De acuerdo con la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX), los elementos mayoritarios presentes en las muestras de hueso regenerado tras 12 semanas son el O, el Ca y el P, y las relaciones relativas entre estos elementos son muy similares a

las observadas en el hueso nativo (Tabla 5).

Sistema	Composición (%)			
	O	P	Ca	Ca/P
Ms(50:50)-BMP	69,63±2,5	14,7±2,4	14,53±0,78	0,9/1
S(75:25)-BMP	66,08±3,61	12,02±2,07	19,61±2,57	1,6/1
S(50:50)-BMP	62,14±7,37	13,99±1,97	22,45±5,51	1,6/1
Hueso nativo	67,7±5,09	15,26±1,78	17,04±3,34	1,1/1

Tabla 5. Composición química del hueso regenerado tras 12 semanas. Comparativa de los tres sistemas tratados con BMP-2 y el hueso nativo.

DISCUSIÓN

El efecto de la BMP-2 en el sistema S(75:25) había sido previamente evaluado por histología e histomorfometría [Rodríguez-Évora et al., 2014], por lo que en el presente estudio nos centramos en hacer un análisis más exhaustivo, mediante AFM y EDX, para determinar la calidad del hueso regenerado. Además, se había detectado previamente que, cuanto mayor es la velocidad de degradación de los materiales, mayor es la reparación del defecto, por lo que en este trabajo se compara el sistema S(75:25) frente a los sistemas S(50:50) y Ms(50:50).

Los resultados de regeneración ósea obtenidos por estereomicroscopía, por radiografías y por análisis histológico, revelaron que los grupos tratados con BMP-2 presentan un mayor grado de reparación a las 12 semanas post-implante. Tanto es así que, la composición mineral de dichas muestras fue muy similar a la del hueso nativo, siendo el calcio, el fósforo y el oxígeno, los elementos mayoritarios. Asimismo, aunque la velocidad de cesión de la BMP-2 desde los 3 sistemas fue similar, existen ciertas diferencias entre ellos en cuanto al grado de reparación, posiblemente atribuibles a la naturaleza y estructura del sistema implantado.

Por otro lado, los resultados de nanoindentación obtenidos por AFM, reflejan que el módulo de Young que presentan las muestras del grupo Ms(50:50)-BMP a 8 y 12 semanas, son estadísticamente iguales al del hueso nativo, tanto en las determinaciones al aire como en condiciones fisiológicas. Además, aunque su espesor a 12 semanas es ligeramente menor que el de los grupos S(75:25)-BMP y S(50:50)-BMP (Figura 18), el módulo de Young es notablemente mayor. Estas diferencias en el espesor del hueso formado, pueden explicarse por la presencia de restos de los sistemas implantados [Rodríguez-Évora et al., 2014].

Dejando a un lado los resultados de dureza y centrándonos en las imágenes obtenidas por AFM, cabe destacar que en el sistema Ms(50:50) con BMP-2, las fibras aparecen

prácticamente desnudas a las 4 semanas, mientras que con el paso del tiempo se van recubriendo de fase mineral.

La AFM se ha empleado para determinar las propiedades estructurales del hueso [Wallace, 2012], para examinar la reparación de un defecto en tibia de rata por fotoestimulación [Baranauskas et al., 2005], y para caracterizar el hueso obtenido al implantar MSCs capaces de sobreexpresar BMP-2 en ratón a nivel ectópico y ortotópico [Pelled et al., 2007; Tai et al., 2008]. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se evalúa la evolución del proceso regenerativo en un hueso fresco, con lo que podemos afirmar que este es el primer trabajo en el que se compara la progresión de un defecto crítico mediante AFM en medio líquido.

En este trabajo, el rango de módulo de Young en el grupo Ms(50:50) fue de 4,2 a 13,8 GPa en medio seco y de 0,17 y 0,21 MPa en condiciones fisiológicas. Este cambio de magnitud también se observa en el hueso nativo, siendo de $14,2 \pm 2,43$ GPa al deshidratar la muestra, y de $0,23 \pm 0,03$ MPa haciendo la medida en PBS. Estas grandes diferencias bajo unas condiciones y otras concuerdan con la bibliografía [Wallace, 2012; Lefèvre et al., 2013], y es que la deshidratación de las muestras tiene consecuencias drásticas en las propiedades nano-mecánicas del hueso. Aún así, si tomamos como referencia el hueso nativo, tanto en medio líquido como al aire, no observamos diferencias de dureza entre el hueso regenerado con 6 μ g de BMP-2 a 8 y 12 semanas y el hueso original (Figuras 5 y 6).

Cabe destacar que el proceso regenerativo se siguió, mayoritariamente, en medio seco, pues sólo en el grupo Ms(50:50)-BMP tras 8 y 12 semanas y en el hueso nativo, pudimos determinar las propiedades mecánicas del tejido en condiciones fisiológicas. Esta es una de las principales desventajas de la técnica, y es que en aquellas muestras en las que la regeneración fue menor, al estar fundamentalmente compuestas de tejido conectivo, la sonda se hunde y no es capaz de realizar ningún tipo de medida. Por su parte, detectamos

una buena correlación entre la evaluación histológica expresada como porcentaje de reparación del defecto y el análisis por AFM, expresando el módulo de Young al aire (Figura 20).

Concluyendo, a pesar de la buena regeneración observada, se requiere un periodo de consolidación para completar de rellenar el defecto, que como ya no es crítico, se espera que se auto-repare y alcance el grado de mineralización del tejido óseo normal.

Por último, aunque la evaluación histológica está muy extendida y se utiliza ampliamente como técnica

para examinar la reparación de un defecto óseo, los resultados obtenidos demuestran que la AFM es una técnica complementaria que nos proporciona parámetros nano-mecánicos y morfológicos de gran utilidad. Además, combinar esta técnica con el EDX, utilizando el hueso nativo como referencia, nos ayuda a valorar el proceso de mineralización y así, junto con el análisis histológico, disponer de una evaluación integral del tejido neoformado.

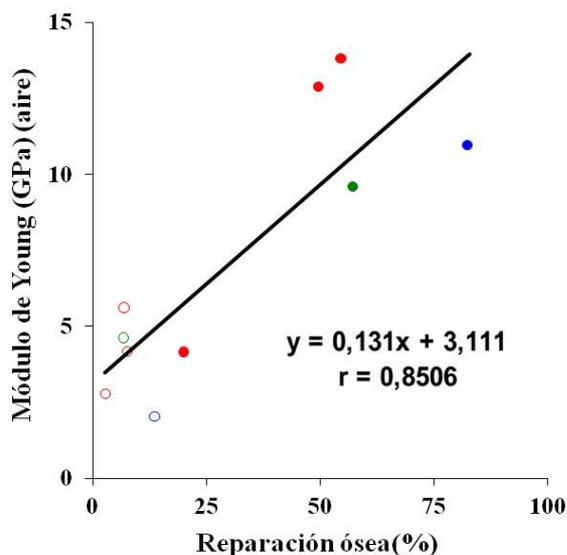


Figura 20. Correlación lineal ente los valores de módulo de Young y el porcentaje de reparación ósea. Los grupos representados se corresponden con los grupos blancos (Círculos huecos) y con los tratados con BMP-2 (círculos rellenos): Ms(50:50) y Ms(50:50)-BMP tras 4, 8 y 12 semanas de implantación (rojo), y S(50:50), S(50:50)-BMP (azul), S(75:25) y S(75:25)-BMP (verde) tras 12 semanas.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que los sistemas de menor peso molecular cargados con BMP-2 fueron los que produjeron una mayor respuesta regenerativa.

Las técnicas utilizadas en este trabajo son complementarias a la histología, y en algunos casos podrían sustituirla.

Dichas técnicas presentan un gran potencial a la hora de evaluar la formación de hueso en un defecto crítico y, consecuentemente, nos sirven para optimizar matrices capaces de promover la reparación de hueso dañado.

Los resultados obtenidos por AFM nos indican que esta técnica podría ser una buena alternativa al análisis histológico, sin embargo, el alto coste de la AFM y las restricciones dependientes de la textura de la muestra, limitan la sustitución de una técnica por otra.

BIBLIOGRAFÍA

Arnal L, Serra DO, Cattelan N, Castez MF, Vázquez L, Salvarezza RC, Yantorno OM, Vela ME. Adhesin contribution to nanomechanical properties of the virulent Bordetella pertussis envelope. *Langmuir*. 2012. 28: 7461-7469.

Baranauskas V, Garavello I, Jingguo Z, Cruz-Hoefling AM. Analyses of regenerative bone matrix of rat tibia after laser phot-excitation by SEM and AFM. *Appl Surf Sci*. 2005. 248: 492-498.

Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*. 1986. 56: 930-933.

Bozec L, Horton M. Topography and mechanical properties of single molecules of type I collagen using atomic force microscopy. *Biophys J*. 2005. 88: 4223-4231.

Butt HJ, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep*. 2005. 59: 1-152.

Derjaguin BV, Muller VM, Toropov YP. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *J Colloid Interface Sci*. 1975. 53: 314-326.

Dufrêne YF, Evans E, Engel A, Helenius J, Gaub HE, Müller DJ. Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. *Nat Methods*. 2011. 8: 123-127.

Dufrêne YF, Martínez-Martín D, Medalsy I, Alsteens D, Müller DJ. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Methods*. 2013. 10: 847-854.

Fanter GE, Rabinovych O, Schitter G, Thuerner P, Kindt JH, Finch MM, Weaver JC, Golde LS, Morse DE, Lipman EA, Rangelow IW, Hansma PK. Hierarchical interconnections in the nano-composite material bone: Fibrillar cross-links resist fracture on several length scales. *Compos Sci Technol.* 2006. 66: 1205-1211.

Gonzalez-Orive A, Hernández-Creus A, Grumelli D, Benitez GA, Andrini L, Requejo FG, Bonazzola C, Salvarezza RC. Oxygen Reduction on Iron-Melanin Granular Surfaces. *J. Phys. Chem. C.* 2009. 113: 17097-17103.

Hassenkam T, Fantner GE, Cutroni JA, Weaver JC, Morse DE, Hansma PK. High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. *Bone.* 2004. 35: 4-10.

Horcas I, Fernández R, Gómez-Rodríguez JM, Colchero J, Gómez-Herrero J, Baro AM. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum.* 2007. 78: 013705.

Kindt JH, Thurner PJ, Lauer ME, Bosma BL, Schitter G, Fantner GE, Izumi M, Weaver JC, Morse DE, Hansma PK. In situ observation of fluoride-ion-induced hydroxyapatite-collagen detachment on bone fracture surfaces by atomic force microscopy. *Nanotechnology.* 2007. 18: 135102.

Lee HJ, Lee J, Park SM. Electrochemistry of conductive polymers. 45. Nanoscale conductivity of PEDOT and PEDOT:PSS composite films studied by current-sensing AFM. *J Phys Chem B.* 2010. 114: 2660-2666.

Lefèvre E, Guivier-Curien C, Pithioux M, Charrier A. Determination of mechanical properties of cortical bone using AFM under dry and immersed conditions. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2013. 16: S337-S339.

Lévy R, Maaloum M. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: Thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*. 2002. 13: 33-37.

Liu X, Rahaman MN, Fu Q. Bone regeneration in strong porous bioactive glass (13-93) scaffolds with an oriented microstructure implanted in rat calvarial defects. *Acta Biomater*. 2013. 9: 4889-4898.

Milovanovic P, Potocnik J, Stoiljkovic M, Djonic D, Nikolic S, Neskovic O, Djuric M, Rakocevic Z. Nanostructure and mineral composition of trabecular bone in the lateral femoral neck: implications for bone fragility in elderly women. *Acta Biomater*. 2011. 7: 3446-3451.

Milovanovic P, Potocnik J, Djonic D, Nikolic S, Zivkovic V, Djuric M, Rakocevic Z. Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level: nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM. *Exp Gerontol*. 2012. 47: 154-159.

Milovanovic P, Djuric M, Neskovic O, Djonic D, Potocnik J, Nikolic S, Stoiljkovic M, Zivkovic V, Rakocevic Z. Atomic force microscopy characterization of the external cortical bone surface in young and elderly women: potential nanostructural traces of periosteal bone apposition during aging. *Microsc Microanal*. 2013. 19: 1341-1349.

Milovanovic P, Rakocevic Z, Djonic D, Zivkovic V, Hahn M, Nikolic S, Amling M, Busse B, Djuric M. Nano-structural, compositional and micro-architectural signs of cortical bone fragility at the superolateral femoral neck in elderly hip fracture patients vs. healthy aged controls. *Exp Gerontol*. 2014. 55: 19-28.

Pelled G, Tai K, Sheyn D, Zilberman Y, Kumbar S, Nair LS, Laurencin CT, Gazit D, Ortiz C. Structural and nanoindentation studies of stem cell-based tissue-engineered bone. *J Biomech*. 2007. 40: 399-411.

Rodríguez-Évora M, García-Pizarro E, del Rosario C, Pérez-López J, Reyes R, Delgado A, Rodríguez-Rey JC, Évora C. Smurf1 knocked-down, mesenchymal stem cells and BMP-2 in an electrospun system for bone regeneration. *Biomacromolecules*. 2014. 15: 1311-1322.

Sababi M, Kettle J, Rautkoski H, Claesson PM, Thormann E. Structural and nanomechanical properties of paperboard coatings studied by peak force tapping atomic force microscopy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012. 4: 5534-5541.

Sasaki N, Tagami A, Goto T, Taniguchi M, Nakata M, Hikichi K. Atomic force microscopic studies on the structure of bovine femoral cortical bone at the collagen fibril-mineral level. *J Mater Sci Mater Med*. 2002. 13: 333-337.

Sneddon IN. The relation between load and penetration in the axisymmetric bossinessq problem for a punch of arbitrary profile. *Int J Eng Sci*. 1965. 3: 47-57.

Tai K, Qi HJ, Ortiz C. Effect of mineral content on the nanoindentation properties and nanoscale deformation mechanisms of bovine tibial cortical bone. *J Mater Sci Mater Med*. 2005. 16: 947-959.

Tai K, Dao M, Suresh S, Palazoglu A, Ortiz C. Nanoscale heterogeneity promotes energy dissipation in bone. *Nat Mater*. 2007. 6: 454-462.

Tai K, Pelled G, Sheyn D, Bershteyn A, Han L, Kallai I, Zilberman Y, Ortiz C, Gazit D. Nanobiomechanics of repair bone regenerated by genetically modified mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008. 14: 1709-1720.

Wallace JM. Applications of atomic force microscopy for the assessment of nanoscale morphological and mechanical properties of bone. *Bone*. 2012. 50: 420-427.

Discusión general

La memoria presentada está estructurada en tres capítulos en los que se discuten los resultados parciales. Por ello, en esta última parte no pretendemos ser repetitivos pero sí queremos poner en conjunto y comparar todos los resultados obtenidos.

Los aspectos a destacar son, por un lado, los biomateriales y métodos empleados en la elaboración de los distintos sistemas, la estructura, la porosidad, la inyectabilidad y, en general, las características de los mismos. Por otro, las cinéticas de liberación de los factores de crecimiento (GFs) así como las combinaciones entre ellos, con células mesenquimales (MSCs) y con otro tipo de sustancias, siempre buscando un mayor rendimiento regenerativo con dosis bajas. Por último, hemos intentado buscar un método de valoración del hueso regenerado alternativo a la histología y, a su vez, que nos proporcionara información sobre las características mecánicas del mismo. En este caso, los distintos sistemas estudiados, excepto el sistema tipo microesferas (Ms(50:50)), habían sido valorados en estudios anteriores y en el presente trabajo se han vuelto a preparar para ser usados únicamente con fines comparativos.

En cuanto a los materiales, los fosfatos cálcicos son los componentes inorgánicos del hueso y el material más convencional como co-adyuvante en la reparación de tejido óseo. Además proporcionan iones que favorecen la formación ósea. Y sobre todo, es un material muy versátil y de fácil manipulación para elaborar sistemas con elevada porosidad aplicando distintas técnicas. De hecho, las estructuras fabricadas por MR tienen una porosidad y una interconexión entre los poros lo suficientemente alta para facilitar la vascularización y permitir la adhesión, proliferación y diferenciación de células, lo que desemboca en la formación de un tejido óseo normal. El principal inconveniente de este material es su fragilidad y probablemente su lenta resorción. Por ello, como alternativa a este material hemos propuesto la utilización de geles que, aunque en cuanto a propiedades mecánicas no aportan ninguna mejora, sí presentan las ventajas de su fácil manejo, adaptabilidad al tamaño y forma del defecto, inyectabilidad y rápida resorción. De acuerdo con los resultados observados en este trabajo, junto con los previamente

publicados por el grupo de investigación, la permanencia excesivamente larga del material en el defecto impide su completa sustitución por tejido óseo. En este sentido, el hidrogel T-CD, que se ha estudiado en este trabajo, mejora significativamente los resultados previos con el sistema T. De hecho, *in vitro*, el T-CD mantiene durante más tiempo su estructura que el T, por lo que *in vivo*, es probable que se reabsorba más lentamente sirviendo de guía o soporte para organizar el nuevo tejido y permitiendo así una mayor regeneración.

Además, ninguno de los materiales empleados en este estudio resultaron ser osteogénicos por sí mismos *in vivo*, la bioactividad de la matriz es consecuencia de la incorporación de los GFs formulados en sistemas de liberación controlada o del pre-embudo de células. Aunque son muchos los elementos implicados en la formación ósea, debemos destacar la secuencia orquestada en la que se deben presentar los GFs y el tiempo de actuación de los mismos a lo largo del proceso. En este sentido, teniendo en cuenta que la BMP-2 es un GF imprescindible para llevar a cabo dicho proceso con éxito, ha sido el elemento fijo en los distintos sistemas evaluados en este trabajo. La BMP-2 ha sido combinada con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), con simvastatina (SV) o con MSCs. Tanto en el sistema poroso de β -TCP como en el sistema Ms(50:50), la BMP-2 ha sido formulada en microesferas con el fin de prolongar la cesión de la misma, mientras que en el sistema T-CD fue incorporada directamente en el gel. Efectivamente, tal y como se refleja en la figura 1, los perfiles de cesión son diferentes, liberándose más rápidamente desde los geles que desde los distintos sistemas que contienen microesferas. En cuanto al PDGF, la SV y las MSCs, nuestra hipótesis fue que podrían potenciar la acción de la BMP-2 y con ello reducir su dosis. El PDGF, puesto que actúa en las primeras etapas de la reparación ósea, se incorporó en el alginato para conseguir una liberación rápida, además, como es mitogénico, quimiotáctico e indirectamente vascularizante, podría incluso evitar el uso de las MSCs, lo que reduciría la variabilidad del sistema y facilitaría su manipulación y comercialización. La SV se

incorporó disuelta o en suspensión dependiendo de la cantidad incorporada, esperando una velocidad de liberación dependiente de la solubilidad. Por último, las MSCs se sembraron sobre la estructura porosa de β -TCP durante unas horas frente a un periodo de cultivo de 3 semanas, con el fin de poner en evidencia la necesidad o no de expandirlas antes de implantar los sistemas.

De estas combinaciones, hemos de decir que en primer lugar las MSCs potenciaron ligeramente la acción de la BMP-2 independientemente del tiempo de cultivo, mientras que la SV y el PDGF no aumentaron la respuesta. Tal y como ya se comentó, incluso el PDGF produjo una disminución de la respuesta después de 12 semanas de su implantación, corroborando lo que algunos autores habían observado *in vitro* y solamente Marden et al. [1993] *in vivo*. Aunque, como ya hemos comentado, las condiciones de estudio son diferentes. Este antagonismo no creemos que sea debido a una cinética de liberación inadecuada, sino por la falta de una relación de concentraciones óptima entre los dos GFs. Incluso la acción angiogénica del PDGF no se pudo detectar, lo que podría ser debido a dosis insuficientes del mismo.

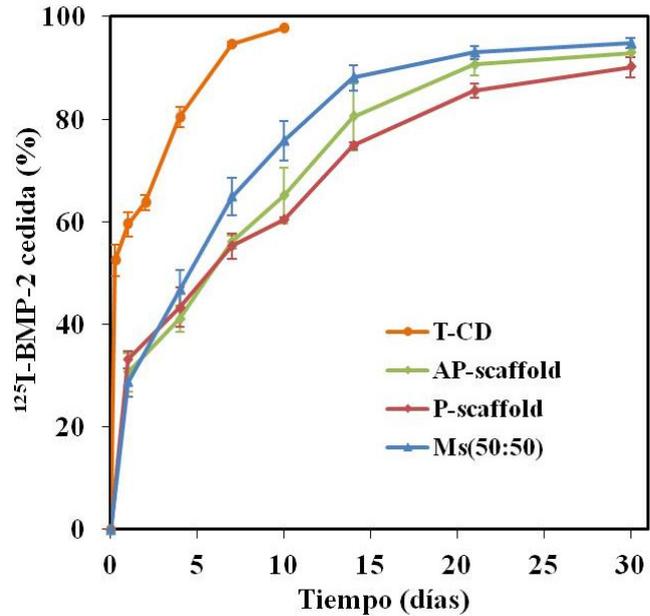


Figura 1. Perfil de cesión de la ^{125}I -BMP-2 desde los sistemas T-CD, AP-scaffold, P-scaffold y Ms(50:50). $n=5$.

Por último, cabe destacar que los resultados obtenidos con BMP-2 en T-CD a 8 semanas de la implantación, son mejores que los obtenidos con el resto de los sistemas en los que la BMP-2 se incorporó en microesferas (Figura 2). Por tanto, consideramos que, teniendo en cuenta resultados previos [Rodríguez-Évora et al., 2013, 2014], este sistema podría mejorarse considerablemente si la BMP-2 se incorpora pre-formulada para que se libere más lentamente. Las diferencias observadas previamente nos indican que la respuesta puede aumentar hasta en un 50 % cuando la BMP-2 se libera de forma sostenida durante 3-4 semanas frente a liberaciones de 7-10 días. Además la presencia de microesferas proporciona una estructura más compacta que puede permanecer más tiempo en el defecto y actuar de guía acelerando el periodo de regeneración, sin perder su inyectabilidad.

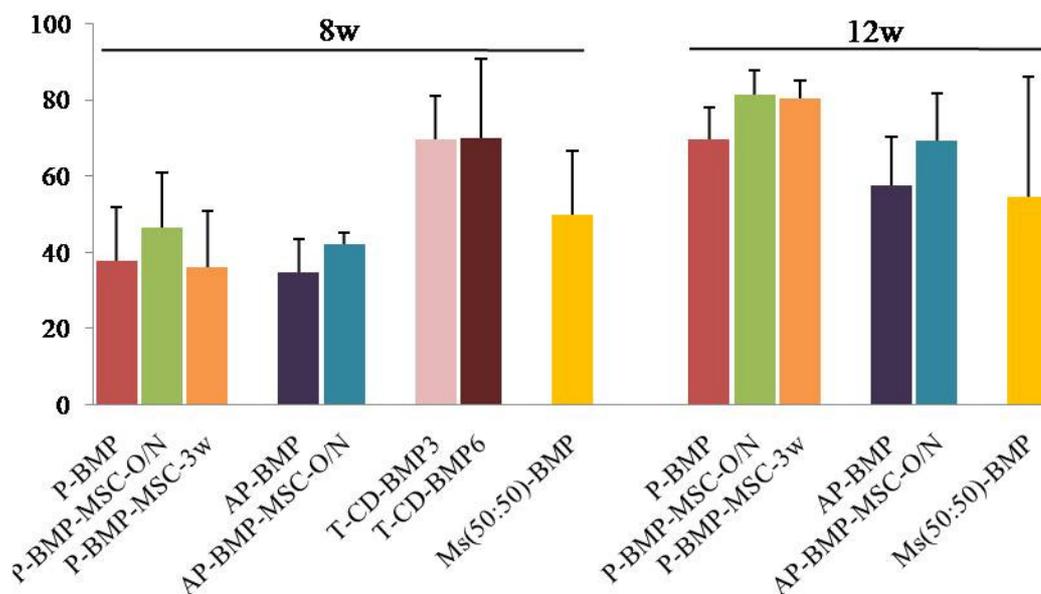


Figura 2. Análisis histomorfométrico. Gráfica comparativa de los diferentes grados de reparación (%) observados al implantar los sistemas P-scaffold, AP-scaffold, T-CD y Ms(50:50) combinados con BMP-2 y MSCs, a 8 y 12 semanas de la implantación.

Así mismo, los resultados obtenidos con SV a dosis bajas (7,5/100 μ L), similares a los observados con 6 μ g de BMP-2 en el sistema T, son realmente esperanzadores, puesto que los geles preparados de T-CD potencian el efecto osteogénico de las sustancias activas que contienen. Un reto interesante podría ser intentar mejorar esta formulación de T-CD-SV, incorporando la SV en microesferas.

Con respecto a los métodos de valoración de la respuesta osteogénica, hemos de decir que ninguno de ellos puede sustituir a la histología-inmunohistoquímica, pero sí pueden proporcionar información complementaria. La AFM puede ser una buena técnica, de hecho, hemos encontrado una buena correlación entre el módulo de Young y el porcentaje de reparación del defecto. Sin embargo, el alto precio, el equipamiento requerido y las restricciones en cuanto a la textura de las muestras, nos lleva a decantarnos más por otras técnicas como complementarias de la histología. En este sentido podemos completar el análisis de las muestras de tejido óseo regenerado con la información obtenida por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) e, incluso, por difracción de rayos X (XRD), siempre que se utilice hueso nativo como referencia.

BIBLIOGRAFÍA

Marden LJ, Fan RS, Pierce GF, Reddi AH, Hollinger JO. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J Clin Invest.* 1993. 92: 2897-2905.

Rodríguez-Évora M, Delgado A, Reyes R, Hernández-Daranas A, Soriano I, San Román J, Evora C. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2013. 49: 873-884.

Rodríguez-Evora M, Reyes R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Delgado A, Evora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system. *J Biomed Nanotechnol.* 2014. 10: 959-969.

Conclusiones

Las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos con los sistemas estudiados son:

1.- Tanto la porosidad como la estructura del sistema de β -TCP permitieron la adhesión, proliferación y diferenciación de las células pre-sembradas y la formación de tejido óseo similar a hueso nativo.

2.- La velocidad de resorción del sistema poroso de β -TCP es excesivamente lenta, ocupando parte del espacio a regenerar. Por el contrario, el gel de Tetronic® se elimina demasiado rápido, mientras que el gel supramolecular de Tetronic®- α Ciclodextrina presenta un tiempo de permanencia que facilita que el nuevo tejido vaya ocupando todo el defecto.

3.- La cinética de liberación de la BMP-2 junto con el tiempo de permanencia de los sistemas en el defecto son factores determinantes en la regeneración de defectos óseos.

4.- Los resultados obtenidos con BMP-2 en cualquiera de los sistemas elaborados en este trabajo, no justifican la utilización de ninguna de las combinaciones propuestas. La combinación con PDGF produjo un efecto antagónico que se manifiesta a partir de 8 semanas de la implantación del sistema. No se observó la sinergia esperada con simvastatina. Con células mesenquimales de médula ósea la respuesta fue ligeramente superior pero no suficientemente potente como para complicar el sistema con la presencia de las mismas.

5.- Los resultados obtenidos con BMP-2 en T-CD en cuanto a cinética de cesión de la BMP-2, tiempo de permanencia del gel T-CD y respuesta regenerativa, además de su inyectabilidad, sugieren que estos sistemas son prometedores porque aún tienen un margen de mejora.

Conclusiones

6.- Las técnicas propuestas para evaluar la regeneración ósea pueden ser complementarias a la histología-inmunohistoquímica pero no son lo suficientemente resolutivas para considerarlas como alternativas.

Anexos
