

GRADO EN MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

**Biomaterial combinado con rhBMP-2: Valoración de
la regeneración ósea**

Alumno: Javier López-Andaluz Mangas

Directora: M.^a Begoña García Cenador

Salamanca Mayo 2024

Javier López-Andaluz Mangas



DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Declaro que he redactado el trabajo “Biomaterial combinado con rhBMP-2: Valoración de la regeneración ósea” para la asignatura Trabajo Fin de Grado en el curso académico 2023-2024 y asumo la originalidad de dicho trabajo, no utilizando fuentes de información sin mencionar de forma clara su origen, tanto en el texto como en la bibliografía.

En Salamanca, a 14 Mayo de 2024

Fdo: Javier López-Andaluz Mangas

Javier López-Andaluz Mangas



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....	1
1.2. REMODELACIÓN ÓSEA: FISIOLÓGÍA	2
1.2.1. CICLO DE REMODELACIÓN ÓSEA.....	3
1.2.2. HOMEOSTASIS ÓSEA	5
1.2.2.1. <i>Vía BMP</i>	5
1.3. TRATAMIENTO DE LAS ALTERACIONES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA.....	6
1.3.1. INJERTOS ÓSEOS	6
1.3.2. BIOMATERIALES	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
4. RESULTADOS	19
4.1 RESULTADOS MACROSCÓPICOS	19
4.2 RESULTADOS DE MICRO-CT.....	19
4.3. RESULTADOS HISTOLÓGICOS	22
4.4. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA	27
4.5. RESULTADOS DE BMP-2.....	30
4.6. RESULTADOS TGF-β.....	32
5. DISCUSIÓN	35
6. CONCLUSIONES	39
7. BIBLIOGRAFIA	41
ANEXO.....	47
Anexo 1: Índice de abreviaturas.....	47



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores favorecedores reabsorción	2
Figura 2. Factores desfavorables reabsorción.....	3
Figura 3. Ciclo de remodelación ósea.....	4
Figura 4. Vía canónica de señalización de BMP-2 y TGF- β	5
Figura 5. Acceso a la cresta de inserción. Imagen intraoperatoria de la Ostectomía circular con fresa trefina.	15
Figura 6. Cierre del abordaje quirúrgico por planos	15
Figura 7. Biomaterial regenerativo rellenando el defecto óseo. Aislamiento mediante membrana de colágeno.	16
Figura 8. Evaluación tomográfica de la mineralización para el GC del defecto óseo mandibular con membrana Evolution (GC).....	20
Figura 9. Evaluación tomográfica de la mineralización para el GIB del defecto óseo mandibular con armazón óseo experimental IB.	20
Figura 10. Evaluación tomográfica de la mineralización para el grupo de estudio del defecto óseo mandibular (GPG), con armazón óseo experimental PG 0,8 μ g.	21
Figura 11. Imágenes teñidas con H&E para el grupo de control de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con membrana Evolution (GC) a los tres (GC3) y seis meses (GC6)	23
Figura 12. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con IB a los tres meses (GIB3).....	24
Figura 13. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con IB a los seis meses (GIB6).....	24
Figura 14. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con PG (0,8 μ g) a los tres meses (GPG3)..	25
Figura 15. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con PG (0,8 μ g) a los seis meses (GPG6).....	26

Figura 16. Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo control de defecto óseo mandibular de rata con membrana Evolution. (GC) a los tres (GC3) y seis meses (GC6)	28
Figura 17. Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo de defecto óseo mandibular de rata con Iso-Bone® (GIB) a los tres (GIB3) y seis meses (GIB6)..	29
Figura 18. Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares en ratas con PG (0,8 µg) a los tres (GPG3) y seis meses (GPG6).	29
Figura 19. Resultados BMP-2.....	31
Figura 20. Resultados TGF-β	33



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos y características de Biomateriales: Cerámicas y cementos	8
Tabla 2. Principales tipos y características de Biomateriales: Polímeros	9
Tabla 3. Distribución de materiales en cada grupo	16
Tabla 4. Evidencias radiológicas a los 3 y 6 meses	19
Tabla 5. Evidencias histológicas a los 3 y 6 meses.....	22
Tabla 6. Evidencias inmunohistoquímica a los 3 y 6 meses.....	27
Tabla 7. Resultados de BMP-2	31
Tabla 8. Resultados de TGF- β	33



RESUMEN

Ante una población cada vez más envejecida, con estilos de vida menos saludables, la regeneración ósea espontánea es cada vez menor. Las técnicas de regeneración más utilizadas hasta el momento, basadas en injertos óseos, están siendo sustituidas por sus efectos adversos. Por ello, se está investigando cada vez más en la ingeniería de tejidos, basada en la utilización de biomateriales que tratan de imitar las propiedades naturales del hueso, evitar su rechazo y favorecer la regeneración ósea.

Es por eso que, en nuestro trabajo, nos planteamos la utilización de un biomaterial compuesto por Iso-bone, combinado con rhBMP-2, quitosano y trehalosa, para valorar la capacidad de regeneración ósea, en un plazo de 3 y 6 meses, en un defecto crítico y comparar su eficacia frente a otros grupos donde no se aplica este armazón.

Palabras clave: Biomaterial, BMP, regeneración ósea, rhBMP-2, Proteo-Graft, quitosano, trehalosa, osteogénesis, defecto crítico, injerto óseo.

ABSTRACT

Faced with an increasingly aging population, with less healthy lifestyles, spontaneous bone regeneration is becoming less and less. The regeneration techniques most used to date, based on bone grafts, are being replaced due to their adverse effects. For this reason, more and more research is being done in tissue engineering, based on the use of biomaterials that try to imitate the natural properties of bone, prevent its rejection and promote bone regeneration.

That is why, in our work, we consider the use of a biomaterial composed of Iso-bone, combined with rhBMP-2, chitosan and trehalose, to assess the bone regeneration capacity, within a period of 3 and 6 months, in a critical defect and compare its effectiveness against other groups where this framework is not applied.

Keywords: Biomaterial, BMP, bone regeneration, rhBMP-2, Proteo-Graft, chitosan, trehalose, osteogenesis, critical defect, bone graft.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

La edad más avanzada de los pacientes y la presencia de lesiones de tamaño crítico, aquellas que por sí misma no son capaces de curar, hacen que la regeneración ósea de manera espontánea sea en ocasiones difícil de conseguir.

Es recomendable una vida saludable, basada en la práctica de actividad física y alimentación adecuada, para reducir el peso, que favorecen una mayor fragilidad ósea y un incremento del riesgo de fracturas que consolidarán peor.

Esto es así porque, en ausencia de comorbilidad, el hueso es capaz de inducir su propia curación sin la formación de tejido cicatricial, sin embargo, el aumento de la esperanza de vida asociado a un estilo de vida cada vez peor, puede dar lugar a que las fracturas no consoliden, retrasando su curación y apareciendo complicaciones como la pseudoartrosis, con las importantes secuelas que ella conlleva. (1)

Esto lleva a que exista una necesidad cada vez mayor de intervenir de manera exógena en la regeneración ósea, viéndose reforzado por los últimos datos que aportó el proyecto SCOPE, en 2019, donde destacaba que en Europa las personas mayores de 50 años con osteoporosis eran casi de 32 millones, y que España era uno de los países más afectados, con casi 3 millones de personas. Esto llevó a que ese año en España hubiera aproximadamente 285.000 fracturas, suponiendo un coste de 100 millones de euros, aproximadamente el 3,8% del gasto sanitario nacional total. (2)

Los injertos óseos autólogos, obtenidos del propio paciente, siguen siendo la técnica más aceptada y utilizada en pequeñas lesiones por su osteoinducción (capacidad para estimular la osteogénesis, es decir, síntesis de nuevo hueso) y osteoconducción (capacidad para generar un ambiente adecuado para dicha osteogénesis). Sin embargo, los daños derivados de su extracción, así como la limitación en las fuentes de obtención, hace que se estén buscando nuevas alternativas en la medicina regenerativa ósea siendo la ingeniería de tejidos una de las más estudiadas. (3)

En ella, mediante la creación de “andamios”, biomateriales que proporcionan un soporte mecánico y permiten la perfusión de nutrientes y oxígeno a la zona lesionada así como liberación de fármacos y factores de crecimiento, se pretende remplazar la utilización de autoinjertos y aloinjertos, que no proporcionan una regeneración ósea completa, y de este modo favorecer la creación de un microambiente que proporcione estabilidad, asegurando una adecuada formación de tejido óseo seguida de una reabsorción del biomaterial que ha sido implantado. (4)

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos en investigación, y de una mayor disponibilidad en biomateriales y sustitutos óseos, no se ha encontrado una opción que garantice una regeneración ósea íntegra.

1.2. REMODELACIÓN ÓSEA: FISIOLÓGÍA

La remodelación ósea es un proceso dinámico, coordinado y regulado por osteocito, osteoblasto y osteoclasto, que da como resultado una reabsorción inicial osteoclástica, seguida de una reparación osteoblástica que permite la síntesis de nuevo tejido óseo. Para todo este proceso que mantiene la homeostasis ósea, es fundamental el eje RANKL-RANK-OPG. (5,6)

Los factores favorecedores de reabsorción aparecen recogidos en la **Figura 1**.

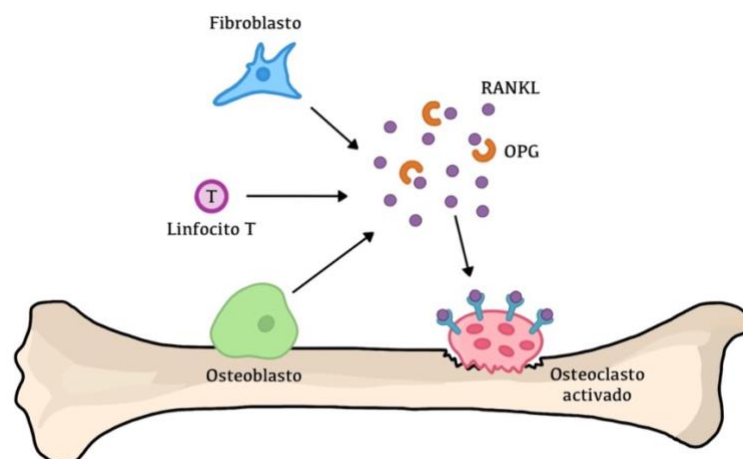


Figura 1. Factores favorecedores reabsorción. (Imagen propia). RANKL pertenece a la familia TNF, y es producido por células del estroma óseo, linfocitos T y Fibroblastos. RANKL se unirá al receptor RANK, expresado fundamentalmente en los osteoclastos, induciendo la activación del mismo y favoreciendo la reabsorción ósea. (7). Este eje RANKL-RANK será contrarrestado por la OPG, inhibiendo la diferenciación de osteoclastos. Sin embargo, en esta situación, la concentración de OPG será escasa. (8)

Los factores desfavorables de la reabsorción aparecen recogidos en la **Figura 2**.

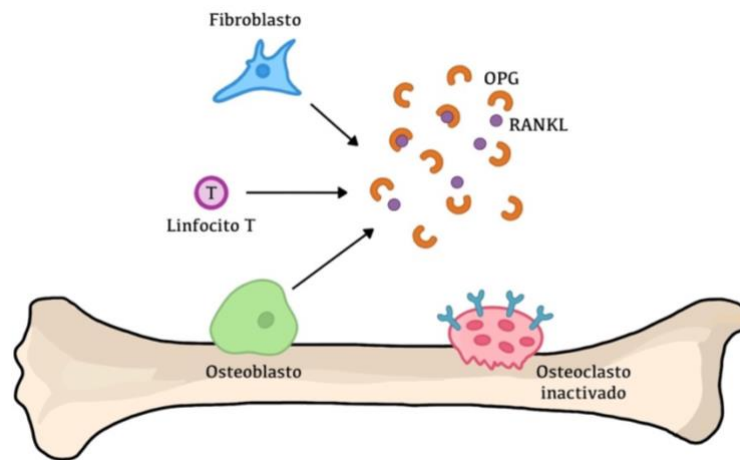


Figura 2. Factores desfavorables reabsorción. (Imagen propia). En este caso, sucede lo contrario. Se produce una mayor cantidad de OPG que impedirá la unión de RANKL a RANK, al unirse a RANKL, no permitiendo la activación del osteoclasto e inhibiendo la reabsorción ósea.

1.2.1. CICLO DE REMODELACIÓN ÓSEA

El proceso de remodelación ósea se puede definir como la secuencia en la cual se sustituye el tejido óseo antiguo por otro nuevo, mediante una serie de fases sucesivas, integradas y coordinadas de reabsorción y formación de hueso en unas zonas denominadas URO. Se distinguen 5 fases. (9–11) **Figura 3 (Página 4)**.

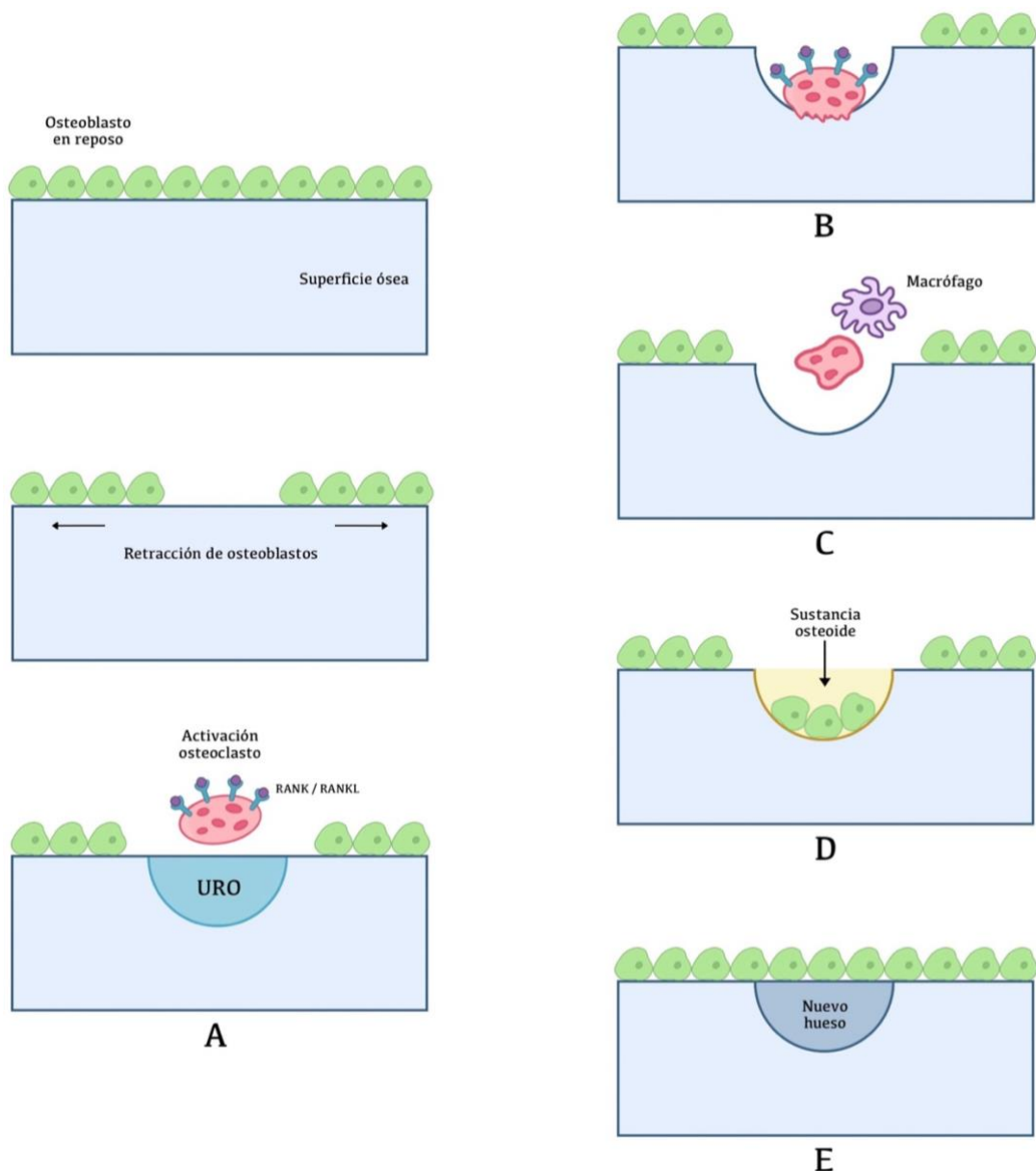


Figura 3. Ciclo de remodelación ósea. (Imagen propia)

A: Activación - **B:** Reabsorción - **C:** Reversión - **D:** Formación - **E:** Terminación.

Activación: El osteoblasto, que inicialmente se encuentra en reposo tapizando la superficie ósea, comienza a retraerse, favoreciendo la activación osteoclástica que será el primer paso para la creación de la URO. La activación se produce mediante la interacción OPG-RANKL-RANK y actuarán sobre el espacio generado por los osteoblastos comenzando la reabsorción del hueso dañado. En esta fase de activación prevalece la unión RANKL-RANK frente a la OPG. **Reabsorción:** Favorecido por la unión RANKL-RANK y la activación del osteoclasto, se produce la reabsorción ósea. **Reversión:** Finalizada la reabsorción, el osteoclasto sufre apoptosis y es eliminado por los macrófagos. **Formación:** Los osteoblastos comienzan a depositarse en la cavidad generada por los osteoclastos y comienzan a liberar sustancia osteoide. **Terminación:** La sustancia osteoide será mineralizada por el depósito de calcio y fosforo, finalizando de este modo la remodelación ósea.

1.2.2. HOMEOSTASIS ÓSEA

1.2.2.1. *Vía BMP*

BMP son factores de crecimiento, que pertenecen a la superfamilia de TGF- β , implicados en la regulación de la remodelación ósea, particularmente en la correcta regulación entre reabsorción y formación ósea, entre otras funciones. (12)

Las vías de señalización de BMP-2 y TGF- β aparecen recogidas en la **Figura 4**.

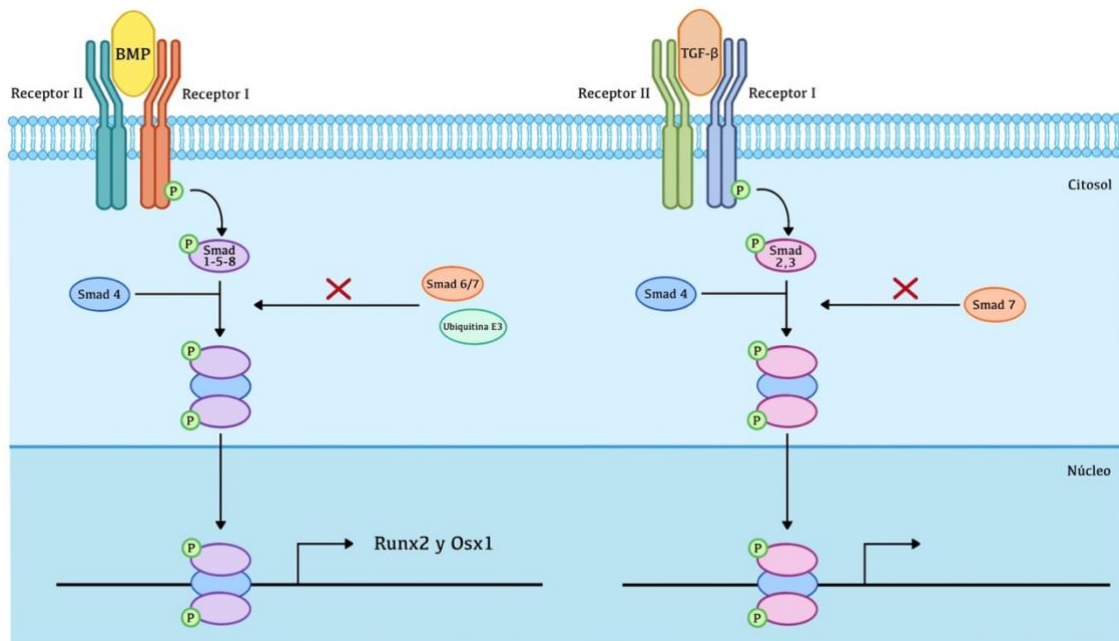


Figura 4. Vía canónica de señalización de BMP-2 y TGF- β . (Imagen propia). TGF- β , a través de su vía canónica, forma el complejo Smad 2/3/4 que se trasladará al núcleo e interviene en las células óseas, regulando su supervivencia y, por tanto, la remodelación ósea. Por su parte, Smad7 regula negativamente la señalización Smad al impedir la formación del Complejo Smad 2/3/4, llevándolo a la degradación por medio del complejo ubiquitina-proteosoma. (13). Por su parte, BMP, formará el complejo Smad 1-5-8 que tras la unión a Smad 4 se trasladará al núcleo y regulará la expresión de genes, en el caso la proteína BMP-2, inductores de la osteogénesis (Runx2 y Osx1). Todo esto puede ser inhibido por Smad 6 y 7 y la ubiquitina E3. (13–15)

BMP-2, es uno de los componentes utilizado en nuestro estudio, ya que se ha demostrado que su incorporación en biomateriales puede inducir la diferenciación osteogénica y la mejora de formación de hueso, a través del reclutamiento de osteoblastos mediante la diferenciación de MSC en osteoblastos a través de vías de señalización que finalizan con la activación de genes osteogénicos como Runx2 y Osx1. Además, mejora la integración

entre angiogénesis y osteogénesis, esencial para una adecuada remodelación ósea, al facilitar la formación de vasos tipo H, que permiten una mayor infiltración de las células osteoprogenitoras. (16–18)

La FDA aprobó el uso de rhBMP-2 en odontología para potenciar la regeneración ósea. El principal inconveniente es que las BMP son proteínas pleiotrópicas, es decir, influyen en varias vías implicadas en la regeneración ósea por lo que, a dosis elevadas, pueden difundir a tejidos cercanos generando efectos adversos, entre ellos, el más frecuente es la formación de hueso ectópico. Por esto suele usarse en combinación con biomateriales (como polímeros) que permitan una liberación sostenida de BMP-2. (19–21)

1.3. TRATAMIENTO DE LAS ALTERACIONES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA

1.3.1. INJERTOS ÓSEOS

Ante la dificultad de curación espontánea del hueso en determinadas situaciones, se están buscando alternativas, basadas fundamentalmente en injertos óseos naturales o sintéticos (biomateriales), para acelerar la regeneración ósea.

El autoinjerto es la técnica de elección. Está libre de rechazo autoinmune y favorece la remodelación ósea gracias a sus propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras. Sin embargo, la limitada disponibilidad ósea, así como las posibles comorbilidades asociadas a su extracción, hace que se reserve su utilización para casos limitados. (22–24)

Como principal alternativa está el aloinjerto, obtenido de un donante vivo o cadáver, genéticamente distintos pero pertenecientes a la misma especie. Destaca la capacidad de obtener mayores cantidades de tejido, sin embargo, no están exentos de posibles inmunorreacciones y transmisión de enfermedades. La liofilización, para atenuar estos riesgos, disminuye su potencial osteoinductivo y dificultan su osteointegración. (22,25)

Por último, están los xenoinjertos, obtenidos a partir de especies no humanas, generalmente animales. Su obtención es prácticamente ilimitada, promueve eficazmente la curación de defectos óseos, sin embargo, los procesos para disminuir el rechazo



suponen una disminución de la osteoinducción, haciendo que no haya alcanzado aún los niveles de regeneración ósea que el autoinjerto y el xenoinjerto. (26)

1.3.2. BIOMATERIALES

La ingeniería de tejidos, basada en los biomateriales, surge para aportar una alternativa biológica a la recuperación de las fracturas mediante la creación de un entorno ideal que estimule la regeneración y proliferación celular. (27)

Para su aplicación, los biomateriales deben cumplir: (22,27–29)

- **Osteoinducción, osteoconducción y osteointegración:** Esto implica ser capaz de inducir la diferenciación osteogénica, proporcionando un ambiente adecuado para permitir el crecimiento óseo, evitando la formación de tejido fibroso.
- **Biocompatible y biodegradable:** Debe ejercer su función sin generar respuesta inmune en el huésped y, además, una vez ha favorecido la formación de hueso nuevo, debe descomponerse.
- **Poroso y angiogénico:** A mayor porosidad, mayor infiltración de células osteogénicas y de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis es esencial para una buena osteoinducción, permitiendo el crecimiento de MSC que posteriormente se diferenciarán en osteoblastos, además de favorecer el transporte de nutrientes y oxígeno necesario para el crecimiento del hueso.

Sin embargo, es complicado desarrollar un biomaterial que cumpla todas estas características. La incongruencia mecánica entre el hueso y el andamio puede generar un estrés que dificulte la posterior reabsorción del biomaterial, además, la inadecuada interacción también puede estar favorecida por una mala porosidad, que dificulta la comunicación celular y el crecimiento del tejido, al dificultar la angiogénesis y la migración celular y de factores osteoinductivos. (30)

En función del origen del biomaterial podemos distinguir dos grupos: Naturales, donde destacan los derivados de origen coralino que poseen un exoesqueleto de carbonato cálcico, poroso, con gran potencial osteoconductor que favorece el depósito rápido de nuevo hueso tras su implantación, y sintéticos, siendo los más ampliamente utilizados estos últimos. (31)

Dentro de los biomateriales sintéticos, las principales características de las cerámicas y cementos aparecen recogidas en la siguiente tabla (**Tabla 1**). (25,31–36)

Tabla 1. Principales tipos y características de Biomateriales: Cerámicas y cementos

Biomaterial	Características	Tipos
Cerámicas	<p>Solas no tienen actividad osteogénica, pero al entrar en contacto con el hueso, favorecen la formación de ósea. Podemos distinguir dos tipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bioactivas: Buena osteoconductividad, pero su fragilidad y baja resistencia a la carga son sus principales limitaciones. - Bioinertes: Albumina y Zirconia. No recomendables 	<p><u>Cerámica Bioactiva:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Hidroxiapatita:</u> Buena osteoconductión y osteoinducción, sin embargo, se suele usar asociada a otros biomateriales por su reducida capacidad de degradación (reabsorción) y baja resistencia a la carga. - <u>Fosfato Tricálcico:</u> Reabsorbible y poroso, acelerando la remodelación ósea, pero es frágil, por lo que se suele asociar a otros biomateriales. - <u>Fosfato Bifásico:</u> Al ser una mezcla de los dos anteriores, combina la osteoconductividad y osteoinducción de ambos con la biodegradabilidad de Fosfato Tricálcico. - <u>Vidrio Bioactivo:</u> Hecha a base de silicio, su buena porosidad y rápida reabsorción, lo hacen un biomaterial interesante pero su pobre osteoconductión y osteoinducción limitan su utilidad. - <u>Vitrocerámica:</u> Mejora las propiedades del vidrio bioactivo y además posee más resistencia.
Cemento	<p>Se obtienen de mezclar fosfato cálcico con una solución acuosa, permitiendo ser inyectados directamente en la zona lesionada al adoptar la forma del defecto.</p>	<p><u>Cemento de Fosfato Cálcico:</u> Destaca su buena adaptación en la zona del defecto, no dejando espacios entre hueso e implante, además de poseer buenas propiedades osteogénicas y alta biocompatibilidad. Sin embargo, su fragilidad, riesgo de reacción inflamatoria y su escasa porosidad, que retrasa su adhesión celular, hace que deban ser utilizados de manera selectiva. Dos subtipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cementos de apatita - Cementos de Brushita



Los polímeros, otro grupo de biomateriales sintéticos, son muy utilizados por su facilidad para ser fabricados en forma y tamaño deseado. Sus principales características y tipos vienen recogidos en la siguiente tabla (**Tabla 2**). (34,37–45)

Tabla 2. Principales tipos y características de Biomateriales: Polímeros

Biomaterial	Origen	Características	Tipos
Polímeros	Natural/ Sintético	Baja inmunogenicidad y buena reabsorbilidad y porosidad. Sin embargo, escasa adhesión celular y osteoconductividad	<p>Naturales: Ampliamente usados por ser biodegradables y biocompatibles.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Colágeno: Muy utilizado por ser fácil de obtener y su baja inmunogenicidad, pero sus pobres propiedades mecánicas hacen que se use en combinación con otros biomateriales - Quitosano: Usado fundamentalmente para cicatrización de heridas gracias a la estimulación de citocinas y factores de crecimiento - Alginato: Se suele usar combinado con otros polímeros, pero sobre todo con cerámicas para aumentar sus propiedades osteogénicas y resistencia - Seda: Usada de forma aislada por sus bajas propiedades osteogénicas, que aumentarán al combinarla con otros biomateriales. <p>Sintéticos: Mayor longevidad y posibilidad de fabricarse en características específicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Poli Ácido Láctico: Baja toxicidad, buena biocompatibilidad y biodegradabilidad. Asociado a hidroxiapatita da buenos resultados. Su principal limitación es su baja resistencia que limita su uso en las zonas de carga. - Poli Ácido Glicólico: No suele usarse de forma aislada por su baja resistencia y riesgo de. Respuesta inflamatoria. - Poli Ácido Láctico-Glicólico: Buena biodegradabilidad, biocompatibilidad y características osteogénicas. Su baja resistencia hace que se asocie a cerámicas e Hidroxiapatita.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La utilización de un biomaterial constituido por un armazón de HA bovina recubierta de quitosano y trehalosa con rhBMP-2 añadido, favorecerá e incrementará el proceso de regeneración ósea, consiguiendo su restitución, en un modelo experimental de lesión crítica ósea en el que la capacidad de autoregeneración es incompetente.

Objetivos

- Desarrollar un modelo experimental de lesión crítica ósea, en la rata, que dejado a su libre evolución no tenga capacidad de regenerarse.
- Valorar que los tiempos de estudio, posteriores a la lesión ósea, son adecuados
- Determinar las variables a estudiar que justifiquen el éxito/fracaso de los tratamientos y los posibles mecanismos de acción.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. BIOMATERIALES EMPLEADOS

Membrana Evolution® (OsteoBiol - Tecnos, Turin, Italy)

Su porosidad y contenido en colágeno hacen de ella un biomaterial válido para el anclaje y proliferación de osteoblastos y la regeneración ósea. Es una réplica natural del hueso autólogo, que conserva la misma estructura y se caracteriza por una elevada osteoconductividad. Se reabsorbe gradualmente y asegura una acción de soporte para la formación ósea, contribuyendo a preservar la forma y el volumen del injerto original (propiedad osteoconductiva). Facilita la formación del coágulo hemático y la consiguiente invasión de las células reparadoras y regeneradoras, favoreciendo la completa "restitutio ad integrum" del déficit óseo.

Iso-bone® (Noricum S.L)

Constituido por gránulos irregulares de bordes redondeados y microestructura, macro y microporosa, compuesto por mineral óseo purificado obtenido del hueso bovino mediante la eliminación de los componentes orgánicos, preservando la cristalinidad y la estructura porosa (macro y micro) del hueso nativo. Desde el punto de vista químico se puede identificar como carbonato-apatita biológica, capaz de exhibir propiedades bioactivas y osteoconductoras, es decir, permite y estimula el crecimiento de hueso nuevo en contacto íntimo con su superficie. Las especificaciones de calidad física y química del producto determinan una composición de: calcio entre el 36-45% - fósforo 14-18% - ratio molar calcio/fósforo 2-1,5 – metales pesados 0,1% máximo – carbonato 2-10% - proteínas residuales 0,05% máximo – tamaño de los cristales 50 nm máximo.

Proteo-Graft® (Noricum S.L)

Está constituido por una base de Iso-Bone® combinado con Quitosano, Trehalosa y rhBMP-2. El Quitosano es un polisacárido natural de origen animal, que imita a la matriz extracelular y promueve la diferenciación de células madre para facilitar la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica. BMP son factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia de TGF-β, no todas las BMP son osteogénicas, BMP-2 y

BMP-7 son posiblemente los inductores más potentes de la formación de hueso y cartílago. Trehalosa, es un sacárido que actúa como estabilizador y evita la pérdida de propiedades tras la desnaturalización.

3.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Empleamos 48 ratas Wistar machos, de 350 g (CharlesRiver, Barcelona, España). Estabuladas y alimentadas, ad libitum, con agua y dieta estándar.

El proyecto contó con la autorización del Comité de Ética de la USAL y cumplió en todo momento con la normativa y legislación vigente sobre el manejo de animales de experimentación.

3.2. MÉTODOS: DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1. CONDICIONES GENERALES DEL ESTUDIO

Estudio randomizado y ciego: asignación aleatoria de los animales, desconocimiento del tratamiento administrado y del grupo al que pertenecen las muestras.

Todos los procedimientos fueron realizados bajo estrictas condiciones de asepsia.

3.2.1.1. *Técnicas anestésicas*

- Inhalatoria con gas Sevoflurano (Sevorane[®], Abbott Laboratories, IL, USA) 5%, 1l/min O₂ (inducción), 3%, 1l/min O₂.
- Intraperitoneal con Xilacina (Rompun 2% - 20 mg/ml - Bayer) + cloruro de ketamina (Ketolar[®] 50mg/mL Parke-Davis Grupo Pfizer) + solución salina, (ratio 2:3:3, 0.2 mL/100 g peso corporal)

3.2.1.2. *Técnicas quirúrgicas*

Anestesiado por vía intraperitoneal, se coloca la rata en decúbito supino y se prepara el campo quirúrgico, realizando a continuación abordaje submandibular, accediendo a la rama ascendente mandibular derecha del animal, practicando un defecto óseo circular de 5 mm de diámetro, defecto de tamaño crítico (aquel que regenerará menos del 10% de hueso, durante la vida del animal, sin tratamiento). Las ostectomías fueron realizadas con micromotor eléctrico con una fresa trefina de 5 mm, (**Figura 5, página 15**).



Figura 5. Acceso a la cresta de inserción. Imagen intraoperatoria de la Osteotomía circular con fresa trefina.

A continuación, se aplicarán los diferentes tratamientos, dependiendo del grupo experimental y finalizados los procedimientos, las heridas son suturadas por planos: plano muscular/sutura reabsorbible, y piel/no reabsorbible (**Figura 6**).



Figura 6. Cierre del abordaje quirúrgico por planos

Trascurrido el periodo de seguimiento se tomarán las muestras de sangre, hemimandíbulas y tejido perimandibular.

3.2.2. GRUPOS EXPERIMENTALES

Grupo Simulado o basal (GS)

Se realizan las técnicas de abordaje mandibular, sin practicar la lesión ósea, y se extraen muestras (N=6)

Grupo Control (GC)

Una vez realizada la lesión, el defecto generado se deja vacío y se cubre con la membrana Evolution®. Se realiza el seguimiento de los animales tomando muestras a los 3 y 6 meses, incluyéndose 6 animales por cada tiempo ensayado (N=12)

Grupo IsoBone® (GIB)

El defecto óseo generado es rellenado con el biomaterial IsoBone® y se cubre con la membrana Evolution®, a los 3 y 6 meses se toman muestras (N=12).

Grupo Proteo-Graft® (GPG)

El defecto generado es rellenado con el biomaterial Proteo-Graft® y se cubre con la membrana Evolution® (**Figura 7**). Se realiza el seguimiento tomando muestras a los 3 y 6 meses (N=12).

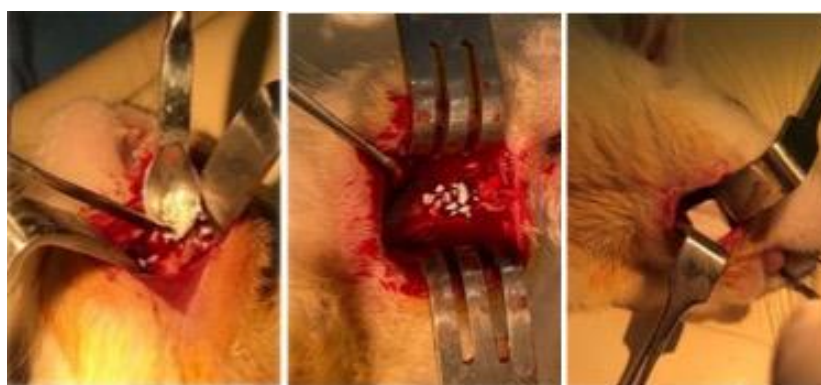


Figura 7. Biomaterial regenerativo rellenando el defecto óseo. Aislamiento mediante membrana de colágeno.

La distribución de los biomateriales por grupo aparece en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Distribución de materiales en cada grupo

Grupos	Animales	Defecto óseo	Membrana Evolution®	Biomaterial IsoBone®	Biomaterial Proteo-Graft®	Sacrificio
GS	N=6	NO	NO	NO	NO	1 semana
GC	3 (N=6)	SI	SI	NO	NO	3 meses
	6 (N=6)	SI	SI	NO	NO	6 meses
GIB	3 (N=6)	SI	SI	SI	NO	3 meses
	6 (N=6)	SI	SI	SI	NO	6 meses
GPG	3 (N=6)	SI	SI	NO	SI	3 meses
	6 (N=6)	SI	SI	NO	SI	6 meses



3.2.3. VARIABLES A ESTUDIAR

Fueron estudiadas las siguientes variables: seguimiento clínico, valoración macroscópica, estudio radiológico, histológico y marcadores bioquímicos TGF β 1 y BMP-2.

3.2.3.1. *Estudio radiológico (mCT)*

El daño y las reparaciones óseas del defecto mandibular fueron analizadas mediante un escáner multimodal SPECT/CT Albira II ARS. La obtención de las imágenes se realizó con un equipo SuperArgus micro CT, de SUINSA MEDICAL SYSTEM, con unos parámetros de adquisición de 720 proyecciones y 8 disparos por proyección. La tensión aplicada ha sido de 45 kilovoltios, con una intensidad de 400 microamperios. La resolución ha sido de 38 micras.

3.2.3.2. *Estudio histológico*

Las hemimandíbulas se introdujeron en formaldehído 3,7-4% tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol. Una vez fijada la muestra, tras permanecer en esta solución durante 24 horas, se procesará hasta obtener los cortes histológicos. Que fueron teñidos con hematoxilina/eosina (Hematoxilina Harris y Eosina 0.5% en solución alcohólica Casa Álvarez) y con tricrómico de Masson (Kit Bio Optica). Finalmente, las secciones se analizan con microscopio óptico (Leica DMLB), con cámara digital Olympus DP70.

3.2.3.3. *Marcadores bioquímicos*

Para el estudio del TGF β 1 y BMP-2 se utilizó la técnica de ELISA empleando muestras de suero. Empleando un anticuerpo monoclonal anti-TGF β 1 o BMP-2. Los diferentes kits empleados para este estudio fueron:

- Rat TGF beta 1 ELISA Kit (Biorbyt®) Catalogue No: orb391171.
- Rat BMP-2: Enzyme-linked Immunosorbent Assay kit (Quantikine®) Catalogue No.: DBP200.

3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos cuantitativos de este trabajo han sido representados como $X \pm SEM$ (Media \pm error estándar de la media).

Para el cálculo del tamaño muestral hemos utilizado el programa G.Power 3.1.9.7 empleando un análisis “a priori” considerando un efecto fuerte un error α del 5% y una potencia del 80% siendo el resultado una N de 6 por grupo.

La inferencia estadística de los resultados cuantitativos (valores numéricos procedentes de muestras aleatorias independientes obtenidas de las poblaciones estudiadas) se realizó con Análisis de la varianza de una vía (ANOVA) aplicando los siguientes test estadísticos dependiendo de la distribución y varianzas:

- Ante variables Normales con varianzas iguales aplicamos los test de Scheffe y Tukey-Kramer.
- Ante variables Normales con varianzas distintas aplicamos transformaciones estabilizadoras de la varianza y posteriormente el test de Scheffe.
- Ante variables de cualquier otra distribución con varianzas iguales o distintas, utilizamos métodos no paramétricos: la comparación múltiple de Kruskal Wallis Z-Value (Dunn`s Test) aplicando Regular Test o Bonferroni Test.

Para todos los estudios anteriormente indicados, un valor $p < 0,05$ se aceptó como resultado significativo.

El programa estadístico empleado para la realización de este estudio estadístico fue NCSS 2007 and Gess 2006 – Version: 07.1.21 – Released June 1, 2011 (Dr. Jerry L. Hintze, Utah, USA).

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS MACROSCÓPICOS

La supervivencia postquirúrgica fue del 100%, con presencia de alguna tumefacción de partes blandas en la zona donde se realizó la ostectomía, que posteriormente desapareció de manera espontánea. Los biomateriales no fueron rechazados y la membrana mostró una adecuada biorreabsorción, estabilidad y baja inmunogenicidad, protegiendo el injerto cubierto.

4.2 RESULTADOS DE MICRO-CT

Los resultados obtenidos en micro-CT se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Evidencias radiológicas a los 3 y 6 meses

	3 MESES	6 MESES
Grupo GC	Defecto óseo visible, no presentando regeneración la lesión crítica. (Figura 8 A)	Defecto óseo visible, no presentando regeneración la lesión crítica. (Figura 8 B)
Grupo GIB	No se aprecia regeneración ni integración del biomaterial. (Figura 9 C)	Lesión crítica identificable, con biomaterial aún disperso. (Figura 9 D)
Grupo GPG	A pesar de una falta de integración definitiva, se aprecia una mejor integración y comienzo de regeneración del defecto, estando cubierto en su totalidad. (Figura 10E)	El biomaterial está integrado completamente y la regeneración del defecto óseo tras la lesión crítica es completa. (Figura 10 F)

Observamos una mejor evolución y regeneración del defecto en GPG (**Figura 10**), donde se termina produciendo una integración del biomaterial y curación del defecto, respecto al GC (**Figura 8**) y GIB (**Figura 9**), donde no llega a observarse en ningún momento regeneración.

Además, dentro del mismo GPG, apreciamos que en GPG3 (**Figura 10 E**) el defecto sigue siendo identificable, relleno por biomaterial sin integración completa, mientras que en GPG6 (**Figura 10F**) el biomaterial está completamente integrado y el defecto apenas es apreciable.

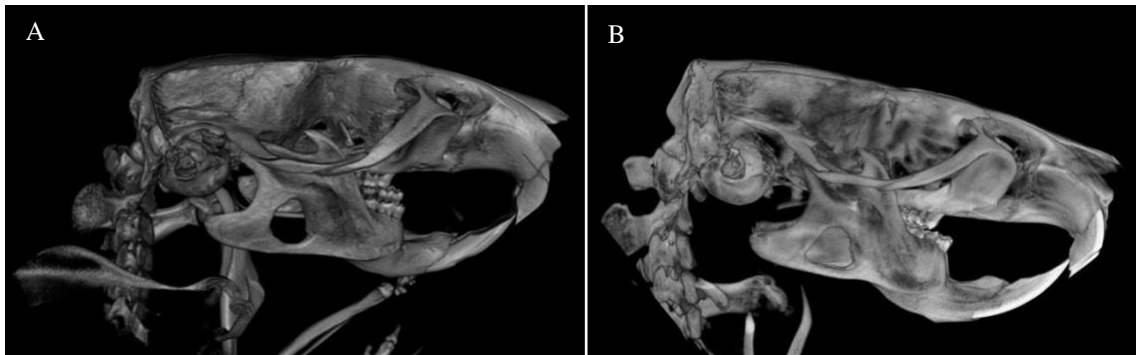


Figura 8. Evaluación tomográfica de la mineralización para el GC del defecto óseo mandibular con membrana Evolution® (GC). Las imágenes muestran la mineralización para los GC por microCT a los tres y seis meses tras la cirugía (GC3 y GC6). (A. Defecto crítico en GC3. B. Defecto crítico en GC6).

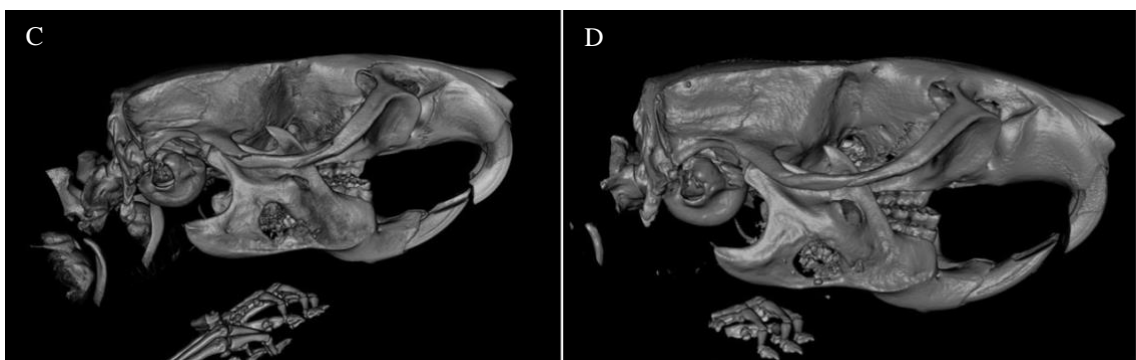


Figura 9. Evaluación tomográfica de la mineralización para el GIB del defecto óseo mandibular con armazón óseo experimental IB. Las imágenes muestran la mineralización para los GIB por microCT, a los tres y seis meses tras la cirugía (GIB3 y GIB6). (C. Defecto crítico en GIB3. D. Defecto crítico en GIB6). La imagen C y D muestran el defecto óseo sin regenerar y el biomaterial disperso en la zona lesionada sin integrarse.

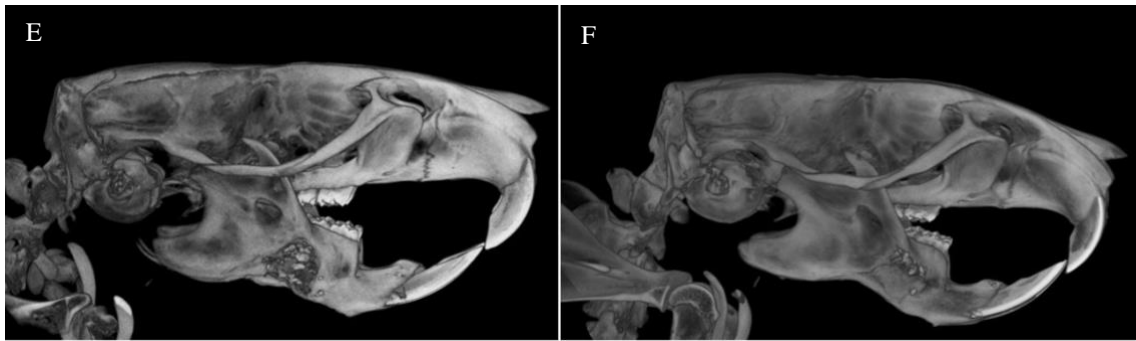


Figura 10. Evaluación tomográfica de la mineralización para el grupo de estudio del defecto óseo mandibular (GPG), con armazón óseo experimental PG 0,8 μg . Las imágenes presentan la mineralización para los grupos de estudio por microCT, a los tres y seis meses tras la cirugía (GPG3 y GPG6). (E. Defecto crítico en GPG3. F. Defecto crítico en GPG6). La imagen E muestra que el defecto óseo está cubierto en su totalidad por biomaterial, apreciándose como este aún no está completamente integrado, comenzando a regenerarse los bordes de la lesión. Por su parte, en la imagen F se observa una mejor regeneración e integración del biomaterial, siendo difícil diferenciar entre el tejido óseo próximo a la lesión y el tejido lesionado que contiene el biomaterial.

4.3. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Los resultados obtenidos en la Histología se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Evidencias histológicas a los 3 y 6 meses

	3 MESES	6 MESES
Grupo GC	Ausencia de regeneración ósea. (Figura 11 A)	Ausencia de regeneración ósea. (Figura 11 B)
Grupo GIB	Alrededor de los defectos óseos hay tejido conjuntivo con fibroblastos, escaso colágeno y neoformaciones vasculares de diversos tamaños. (Figura 12)	Los defectos críticos están delimitados por mayor cantidad de colágeno apareciendo además linfocitos entremezclados y vasos en este caso menor cantidad de vasos. (Figura 13)
Grupo GPG	Se aprecia gran cantidad de gránulos del biomaterial distribuidos en los defectos críticos, comenzando a formarse tejido óseo inmaduro en el defecto crítico y existiendo una gran cantidad de tejido conjuntivo alrededor de los mismos, formado por fibroblastos. (Figura 14)	El tejido conjuntivo está constituido por colágeno y se aprecia mayor neoformación ósea, rellenando el defecto quedando poco espacio entre los gránulos del biomaterial. (Figura 15)

Observamos como en el GC (**Figura 11**), no se aprecia regeneración ósea, corroborando los resultados obtenidos en las pruebas radiológicas. En el GIB, a los 3 meses (**Figura 12**) existe una mayor cantidad de fibroblastos, iniciadores de la regeneración, que serán sustituidos a los 6 meses (**Figura 13**) por tejido colágeno, que aportará resistencia al hueso, existiendo además en este grupo una importante reacción inflamatoria con abundantes linfocitos.

En el GPG, a los 3 meses (**Figura 14**) el defecto y el biomaterial sigue siendo claramente apreciable, aunque existen signos de comienzo de regeneración ósea, mientras que a los 6 meses (**Figura 15**) resulta difícil diferenciar el defecto, el tejido óseo previo y el tejido neoformado, existiendo así mismo una reabsorción casi total del biomaterial.

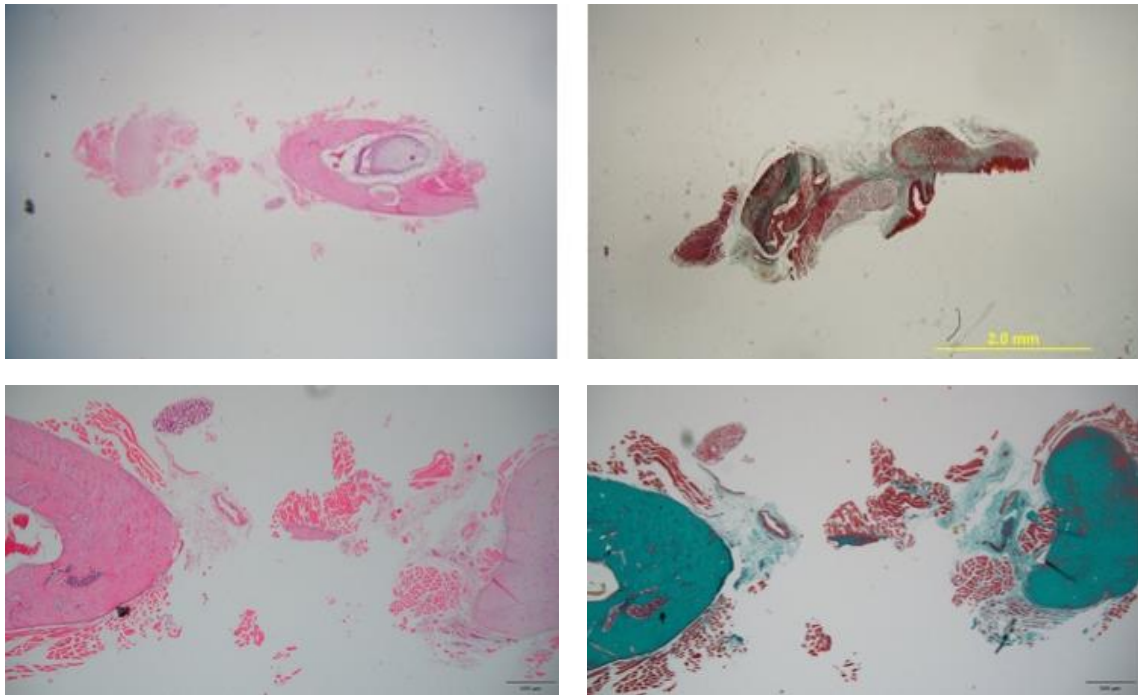


Figura 11. Imágenes teñidas con H&E para el grupo de control de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con membrana Evolution® (GC) a los tres (GC3) y seis meses (GC6). A. Hematoxilina-eosina en GC3. B. Hematoxilina-eosina en GC6. Solo se incrustó una leve formación de hueso nuevo en el tejido conectivo que se extendía por el borde del defecto, como se ve en la imagen B.

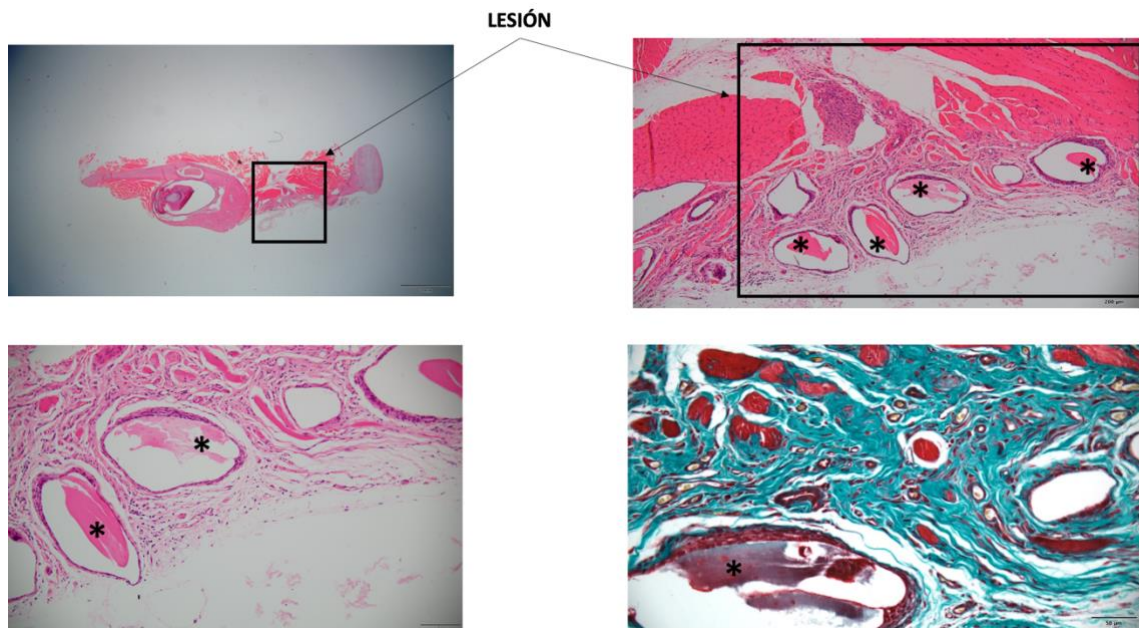


Figura 12. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con IB a los tres meses (GIB3). Biomaterial *; Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #. Tinción MT. Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #. Se observan vasos de diferentes calibres (marrón).

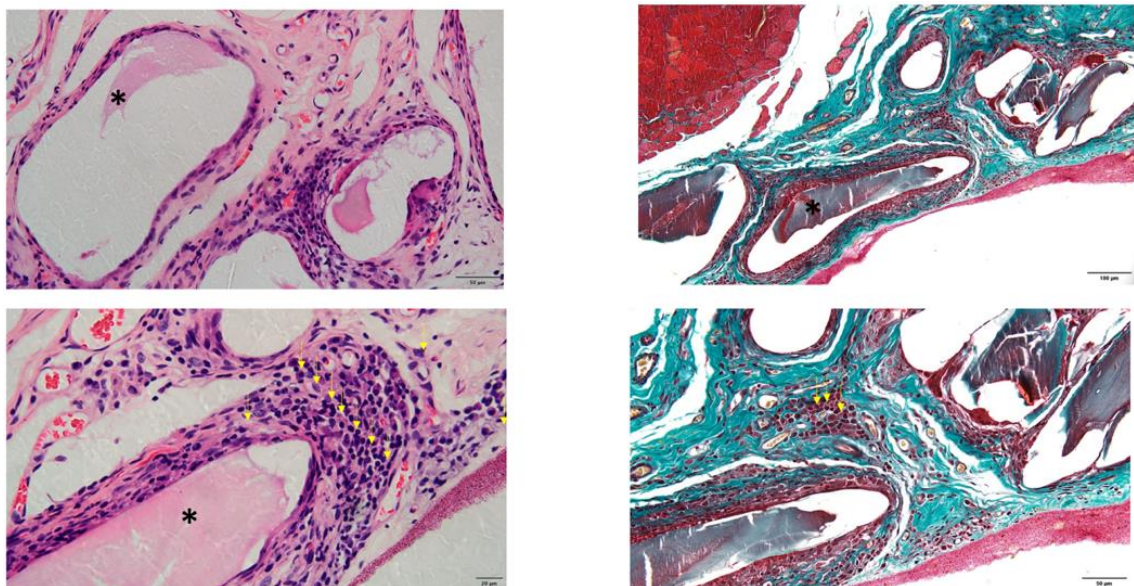


Figura 13. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con IB a los seis meses (GIB6). Biomaterial *; Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #. Linfocitos que indican una reacción inflamatoria (flechas amarillas). Tinción MT. Proliferación más evidente de tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #. También se aprecian linfocitos maduros (flechas amarillas) en el tejido conjuntivo. En la pared del defecto además de observar tejido colágeno y fibroblastos se observa la existencia de escasos vasos neoformados (que no están en GIB3)

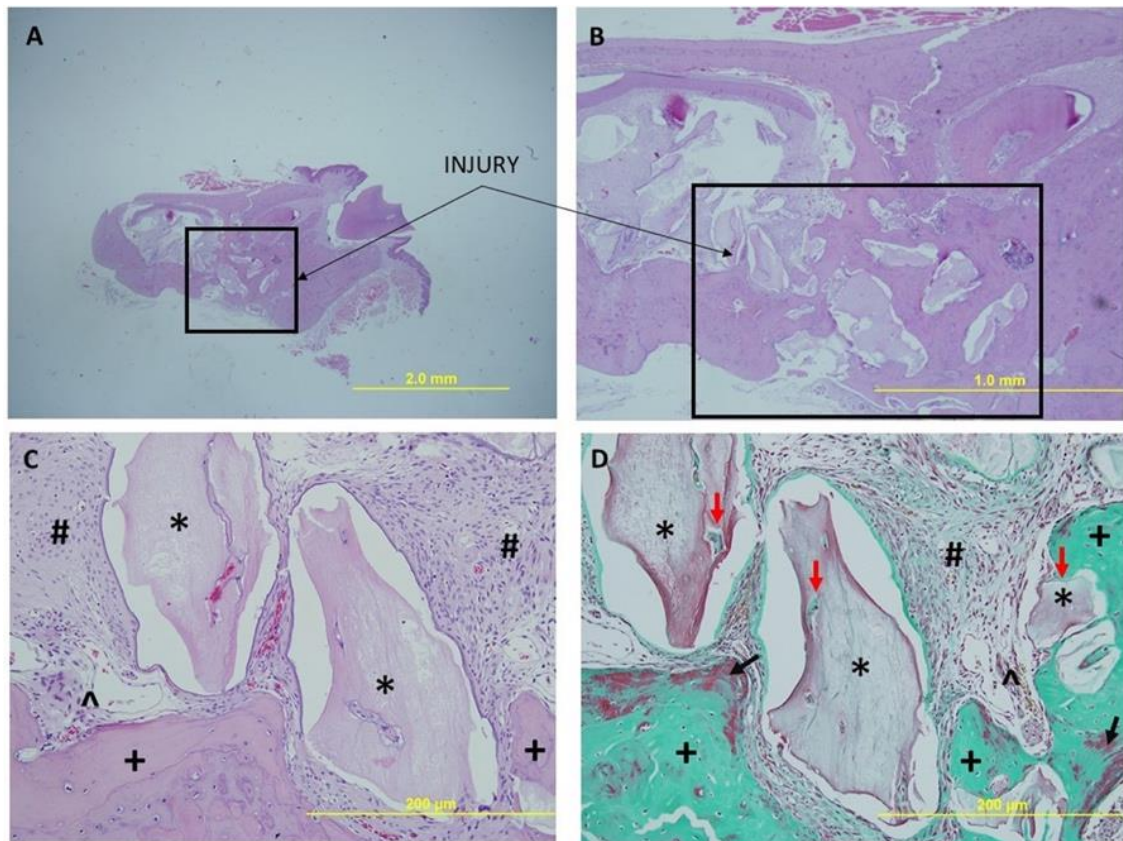


Figura 14. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con PG (0,8 μ g) a los tres meses (GPG3). Biomaterial *; Tejido óseo neoformado que rellena el defecto y los espacios entre los gránulos de biomaterial (osteocitos y vasos) +; Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #; Hueso (osteoblastos y vasos) ^; Tinción MT. Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #; Matriz ósea (osteoblastos y vasos) ^; Hueso en verde oscuro. Tejido óseo inmaduro neoformado en rojo (flecha negra); Tejido óseo neoformado en contacto con el biomaterial (flechas rojas).

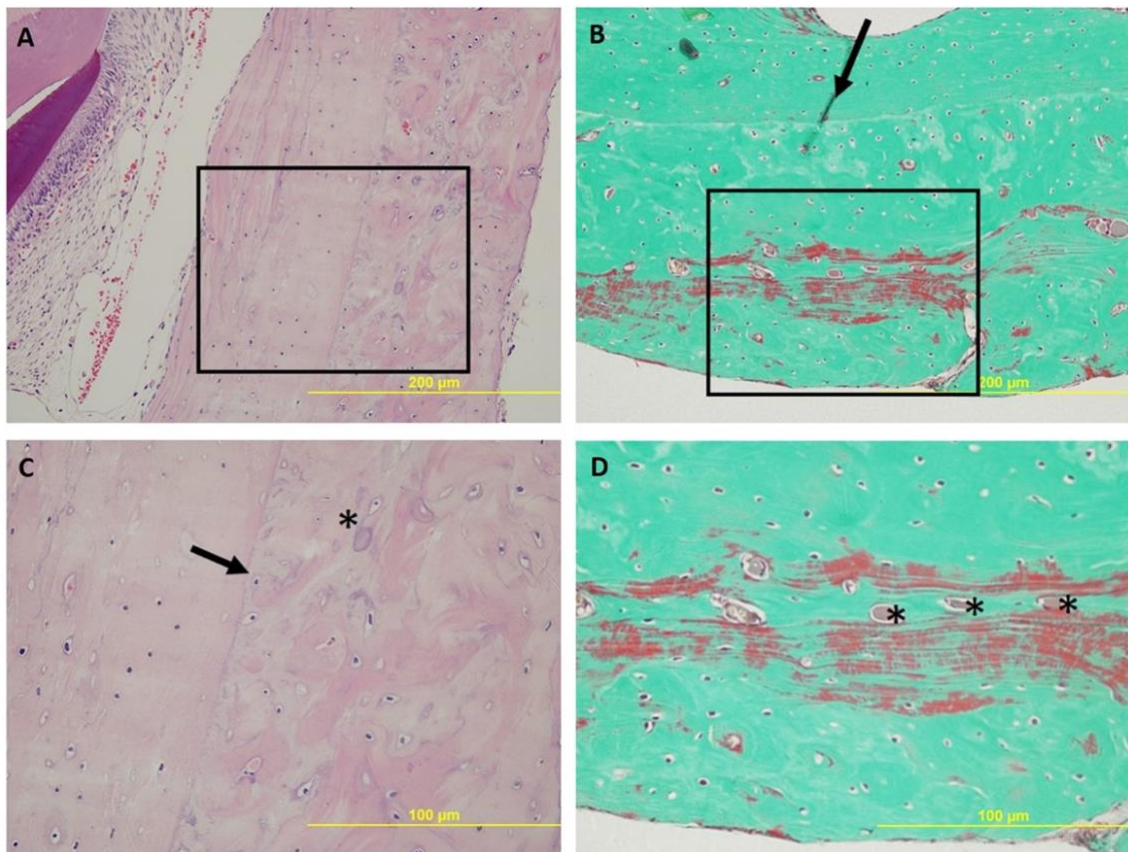


Figura 15. Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con PG (0,8 µg) a los seis meses (GPG6). Biomaterial *; Tejido óseo neoformado que rellena el defecto y los pocos espacios entre los gránulos de biomaterial; borde del defecto (flecha negra). Tinción MT. Hueso en verde oscuro. Tejido óseo neoformado inmaduro en rojo; Tejido óseo neoformado en contacto con la escasa cantidad de biomaterial

4.4. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó tinción inmunohistoquímica de mandíbulas descalcificadas para analizar los marcadores osteogénicos Runx2 y OCN y ALP. Las tinciones positivas en los cortes de tejido se tiñeron de marrón.

Los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Evidencias inmunohistoquímica a los 3 y 6 meses.

	3 MESES	6 MESES
Grupo GC	Al no existir formación ósea, ausencia de inmunorreactividad. (Figura 16 A, B, C)	Al no existir formación ósea, ausencia de inmunorreactividad (Figura 16 D, E, F)
Grupo GIB	La expresión de los marcadores osteogénicos no es destacable al no existir evidente formación ósea. (Figura 17 A, B, C)	La expresión de los marcadores osteogénicos no es destacable al no existir evidente formación ósea. (Figura 17 D, E, F)
Grupo GPG	La ALP y RUNX2 se expresan en el citoplasma de los osteoblastos, mientras que OCN aparece adherida a la HA del biomaterial. (Figura 18 A, B, C)	Al estar el defecto óseo cubierto por hueso nuevo, la inmunorreactividad de los biomarcadores será nuevamente negativa. (Figura 18 D, E, F)

En las imágenes inmunohistoquímicas del grupo GC (**Figura 16**) y el GIB (**Figura 17**), al carecer de formación de tejido óseo, no existe expresión, ni a los 3 ni a los 6 meses, de ALP, OCN, y Runx2. No obstante, los resultados de tinción para GPG3 (**Figura 18 A, B, C**) son más altos que para GPG6 (**Figura 18 D, E, F**), al existir en este último tejido óseo neoformado.

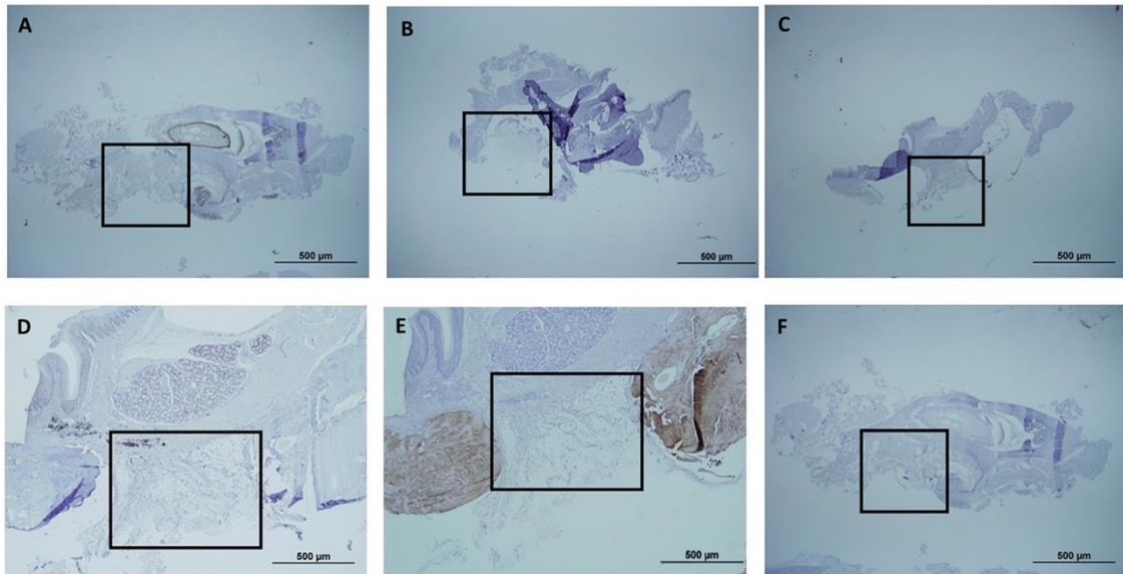


Figura 16. Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo control de defecto óseo mandibular de rata con membrana Evolution® (GC) a los tres (GC3) y seis meses (GC6). Los resultados de inmunohistoquímica para la expresión proteica de osteogénesis en hueso a los tres y seis meses, (A y D, ALP. B y E, OCN. C y F, RUNX2). No se detectó expresión de ALP a los tres meses A, ni a los seis meses D, ni de OCN y RUNX2 a los tres meses, B y C, ni a los seis meses E y F. La ausencia de inmunorreactividad para las proteínas ALP, OCN y RUNX2 fue evidente en los grupos control dada la ausencia de formación de tejido óseo.

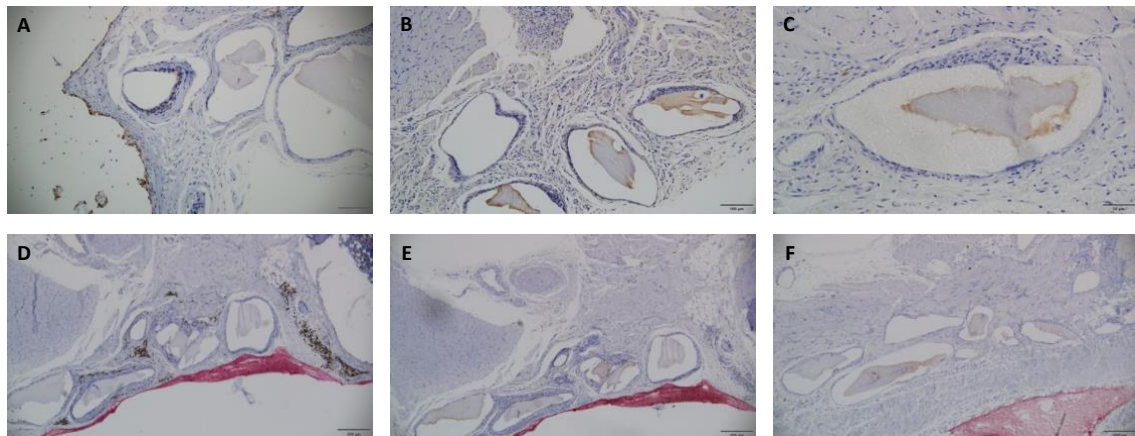


Figura 17. Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo de defecto óseo mandibular de rata con Iso-Bone® (GIB) a los tres (GIB3) y seis meses (GIB6). Los resultados de inmunohistoquímica para la expresión proteica de osteogénesis en hueso a los tres y seis meses, (A y D, ALP. B y E, OCN. C y F, RUNX2), no detectaron expresión a los tres meses (A) de OCN, siendo un poco mayor a los seis meses (D) y prácticamente nula a los tres meses, B y C, y seis meses E y F, de OCN y RUNX2, respectivamente. Esta ausencia de inmunorreactividad es debida a la ausencia de formación de tejido óseo.

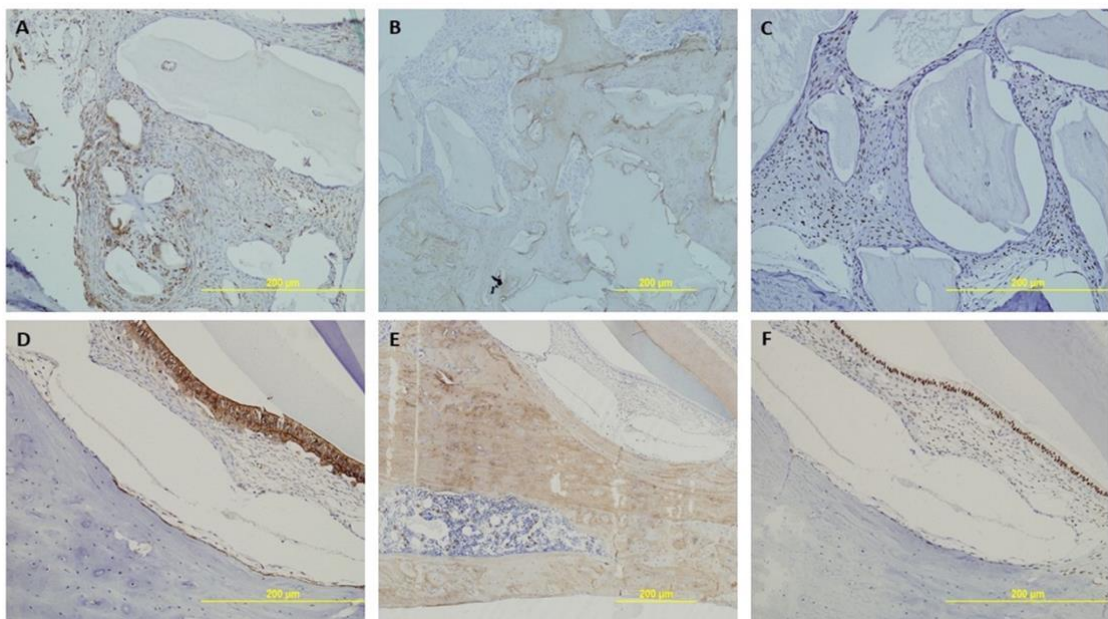


Figura 18. Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares en ratas con PG (0,8 µg) a los tres (GPG3) y seis meses (GPG6). Los resultados de inmunohistoquímica para la expresión proteica de osteogénesis en hueso a los tres meses: A, Expresión de ALP localizada en el citoplasma de los osteoblastos, B, OCN adherida a la hidroxiapatita del biomaterial y C, RUNX2 en el citoplasma de los preosteoblastos. A los seis meses: D, Sin expresión detectable de ALP, ni de OCN, E y RUNX2, F. Por el contrario, la ausencia de inmunorreactividad para las proteínas ALP, OCN y RUNX2 a los seis meses puede deberse a que los defectos estaban cubiertos por hueso nuevo.

4.5. RESULTADOS DE BMP-2

Los resultados BMP-2, obtenidos con ELISA, se recogen en la **Tabla 7** y **Figura 19**.

Encontramos un aumento significativo de BMP-2 en el grupo GPG3 (2438,008±69,80225) respecto al resto de los grupos (p=0,0000001), obteniendo también un aumento significativo en el grupo GPG6 (852,3583±36,82572) con respecto a GS, GC3, GC6 y GIB6 (p=0,0000001). Del mismo modo, dentro del propio grupo GPG, encontramos diferencias significativas entre GPG3 y GPG6, mostrando un descenso significativo de BMP-2 a los seis meses del tratamiento (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365)

Los resultados de BMP-2 en el grupo GIB, mostraron también como hubo un incremento significativo en el grupo GIB3 (892,5833 ± 37,75467) respecto a GIB6 (265,1667 ± 37,3419), (p=0,0000001), obteniendo el mismo resultado al analizar los resultados en el grupo GC, donde también hubo un incremento significativo de BMP-2 en GC3 (494,2017 ± 25,12484) respecto a GC6 (306,915 ± 13,83522) (p=0,0000001) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365).

Por tanto, la lesión ósea estimula la producción de BMP-2 (demostrado por el incremento de BMP-2 en GC3 y GIB con respecto al GS) y disminuye con el paso del tiempo (demostrado por las diferencias obtenidas entre GC3 y GC6 y GIB3 y GIB6) (**Figura 19**).

Por otra parte, apreciamos también como en los Grupos GPG está incrementada la cantidad de BMP-2 (demostrado por el incremento de BMP-2 en GPG3 y GPG6 con respecto a GS, GC3, GC6, GIB3 y GIB6) y como, al igual que sucedía antes, su concentración va disminuyendo significativamente con el paso del tiempo (demostrado por la mayor cantidad detectada en GPG3 con respecto a GPG6) (**Figura 19**).



Tabla 7. Resultados de BMP-2

	GS	GC3	GC6	GIB3	GIB6	GPG3	GPG6
BMP-2	200,4525	494,2017	306,915	892,5833	265,1667	2438,008	852,3583
(pg/mL)	± 3,392483	± 25,12484	± 13,83522	± 37,75467	± 37,3419	± 69,80225	± 36,82572

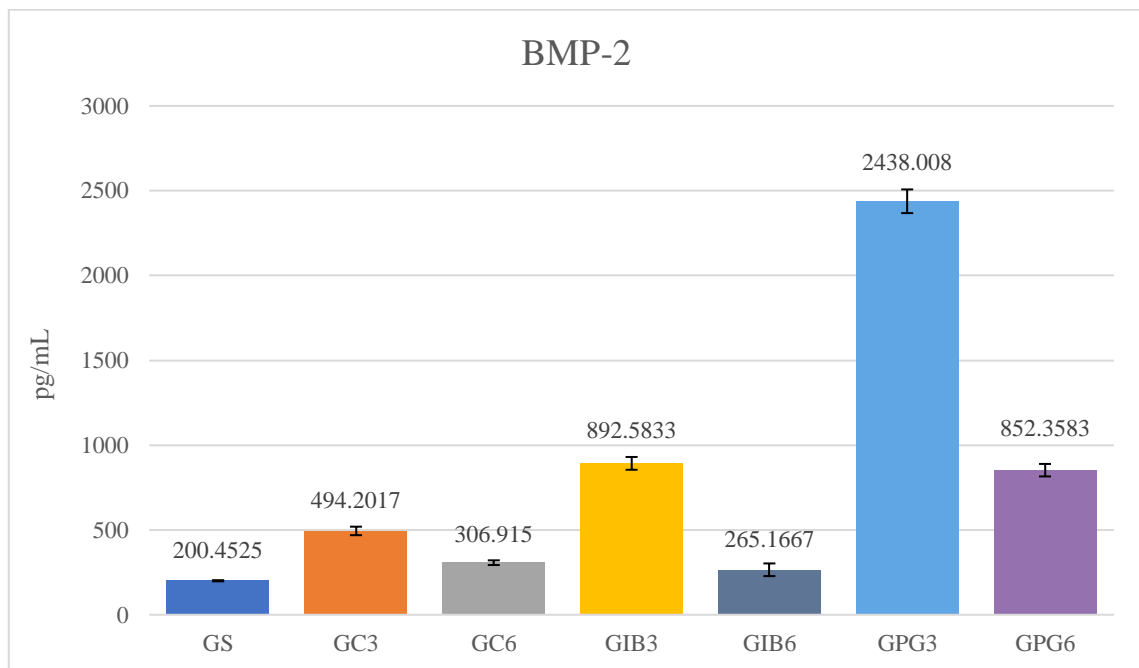


Figura 19. Resultados BMP-2

4.6. RESULTADOS TGF- β

Los resultados TGF- β , obtenidos con ELISA, se recogen en la **Tabla 8** y **Figura 20**.

Observamos diferencias significativas, en los valores de TGF- β obtenidos en el grupo GPG3 (1591,917 \pm 97,07067), obteniéndose un incremento significativo en este grupo, al compararlos con los resultados de grupos GS ($z=4,6381$), GC3 ($z=4,4448$), GC6 ($z=2,7163$), GIB3 ($z=3,3089$) y GIB6 ($z=1,9755$) ($p=0,000002$) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test z -value $> 1,9600$ Bonferroni Test z -value $> 3,0381$).

Del mismo modo, existe un incremento significativo TGF- β en el grupo GPG6 (820,2833 \pm 46,50735), al compararlo con GS ($z= 3,8430$), GC3 ($z=3,5558$) y GIB3 ($z=2,4199$) ($p=0,000002$) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test z -value $> 1,9600$ Bonferroni Test z -value $> 3,0381$).

En el grupo GIB se obtuvieron menores concentraciones de TGF- β respecto a GPG. GIB3 (281,25 \pm 19,34764) presentó diferencias significativas con el grupo GPG3 ($z= 3,3089$) y GPG6 (2,4199) mientras que GIB6 (368,6333 \pm 19,00733) las mostró con GPG3 ($z=1,9755$), ($p=0,000002$) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test z -value $> 1,9600$ Bonferroni Test z -value $> 3,0381$)

Respecto al grupo GC3 (152,6333 \pm 12,56738) mostró diferencias significativas con GPG3 ($z=4,4448$) y GPG6 ($z=3,5558$), obteniéndose mayores cantidades de TGF- β en estos últimos, mientras que el grupo GC6 (313,0333 \pm 7,617947) sólo presentó diferencias significativas con el grupo GPG3, comprobándose un significativo incremento de TGF- β en este último ($z=2,7163$) ($p=0,000002$) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test z -value $> 1,9600$ Bonferroni Test z -value $> 3,0381$).

En este caso, los resultados de TGF- β obtenidos en el grupo GPG, no demuestra un incremento significativo en el grupo GPG3 respecto a GPG6 (pNS).

Tampoco se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos de TGF- β entre GPG6 y GIB6 y GC6, ni tampoco entre GIB3 y GIB6 ni entre el grupo GC3 con GC6 (pNS).



Por tanto, el grupo GPG estimula la producción de TGF- β , pero este estímulo deja de apreciarse a los 6 meses de evolución. No obstante, sus valores siguen siendo significativamente superiores a los detectados en GS, GC3 y GIB3 y con valores cercanos a la significación con GC6 (**Figura 20**).

Tabla 8. Resultados de TGF- β

	GS	GC3	GC6	GIB3	GIB6	GPG3	GPG6
TGF-β	93,025	152,6333	313,0333	281,25	368,6333	1591,917	820,2833
(pg/mL)	$\pm 4,074591$	$\pm 12,56738$	$\pm 7,617947$	$\pm 19,34764$	$\pm 19,00733$	$\pm 97,07067$	$\pm 46,50735$

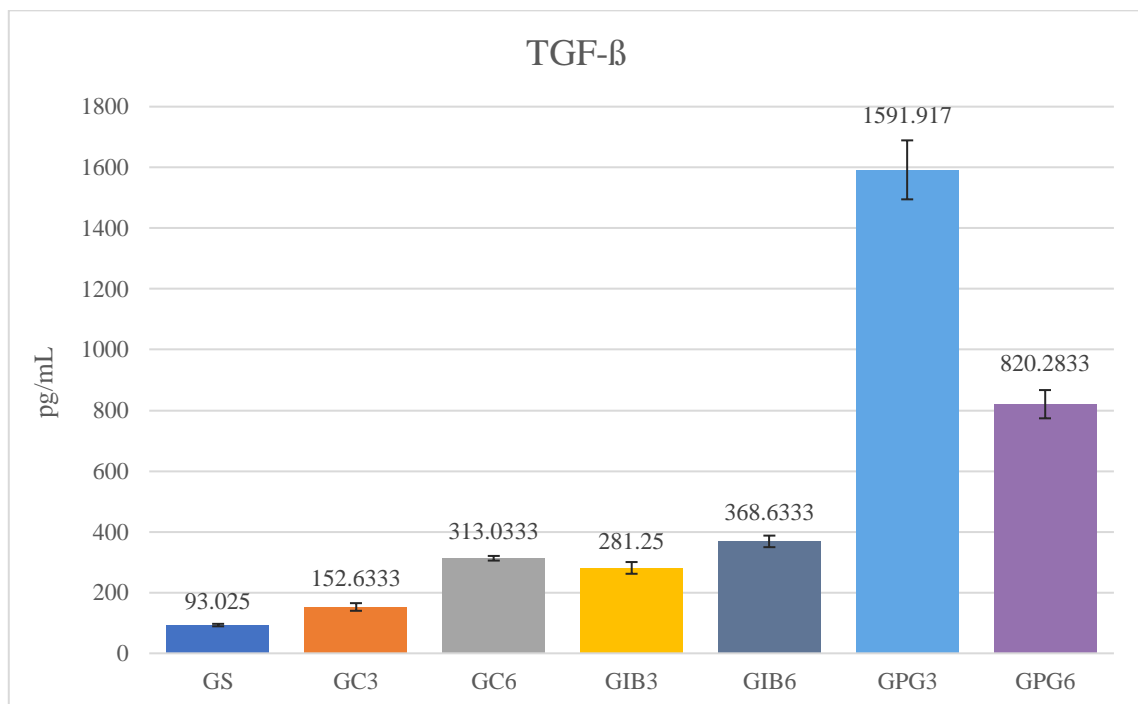


Figura 20. Resultados TGF- β



5. DISCUSIÓN

Ante una población cada vez más envejecida, con estilos de vida menos saludables, que llevan a una pérdida de la capacidad de curación espontánea del hueso, y las limitaciones existentes en los injertos óseos, la ingeniería de tejido óseo parece ser una de las opciones más importantes en el futuro terapéutico.

Hemos tratado de valorar la eficacia de un armazón experimental en un defecto mandibular crítico de rata, de 5 x 2 mm (diámetro x profundidad). Se entiende por defecto crítico aquella lesión que, sin intervención y dejada a su libre evolución, regenerará menos del 10% del hueso.

El defecto crítico en nuestro grupo estudio, GPG, ha sido cubierto con Proteo-Graft® (Noricum S.L), constituido por Iso-Bone®, Quitosano, Trehalosa y rhBMP-2.

Quitosano es un polímero de origen natural. Limei Li et al (46) lo utilizaron en su armazón por su baja inmunogenicidad, buena biodegradabilidad y facilitar la adhesión y proliferación de células osteogénicas. Joanna Klara et al (47) también lo incorporaron por acelerar la cicatrización de heridas y poseer propiedades antifúngicas y antibacterianas.

Incorporamos rhBMP-2, aprobado por la FDA y cuyos efectos en la remodelación ósea han sido demostrados por diversos autores, como Lena-Christin Ingwersen et al (48), que destacaron su papel en la homeostasis ósea en la edad adulta y cómo influye en la regeneración actuando sobre el desarrollo de los osteoblastos. No obstante, ya advertían de la importancia del control en su liberación, por posibles efectos adversos. Así Daniel Halloran et al (17) observaron algunas complicaciones como la formación de hueso ectópico, radiculitis o disminución de la eficacia de la curación ósea. Yidin Zhang et al (49), en una revisión, advierten que la FDA a nivel de la columna cervical observó complicaciones derivadas de la formación de hueso ectópico ante una liberación rápida de rhBMP-2.

Para conseguir mayor estabilidad de rhBMP-2 y evitar así los efectos adversos, los biomateriales que lo incorporan suelen ser sometidos a procedimientos de liofilización y desnaturalización, lo cual lleva a pérdidas de rhBMP-2. En nuestro biomaterial, para evitar esto, incorporamos un estabilizador que es la Trehalosa.

Además de su poder estabilizador, Xingguan Xu et al (50), informan de su capacidad antiinflamatoria, suprimiendo la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-6, al mejorar la polarización de los macrófagos a M2, que mejoraba la formación ósea.

Los resultados por micro-CT nos han permitido valorar como en el GPG (**Figura 10 E, F, página 21**) se va desintegrando de manera progresiva el biomaterial, siendo acompañado esto de la formación de nuevo tejido óseo, y como en el GC (**Figura 8 A, B página 20**) y GIB (**Figura 9, C, D página 20**) no se observa regeneración ósea.

La regeneración del defecto está íntimamente relacionada, además de por la utilización o no de biomateriales en la zona lesionada, por el tiempo que permanece este en la lesión, así, a más tiempo implantado, mejor regeneración. Esto es demostrado por Celine Stuz et al (51), que utilizaron tiempos de evolución similares a los nuestros, 90,120,150 días, valorando mediante micro-CT la regeneración ósea y observando que a más tiempo de implantación del biomaterial, mejor regeneración. Su biomaterial estaba constituido por una membrana de PCL sobre la cual añadieron BMP-2 y MSC, obteniendo mejores resultados en el grupo tratado con este armazón.

Para evaluar la degradación del biomaterial y la neoformación ósea de manera más exacta, realizamos el estudio microscópico mediante análisis histológico. Observamos en nuestro estudio como el GPG muestra evidentes signos de regeneración ósea. En GPG3 (**Figura 14, página 25**) existe una mayor cantidad de tejido conjuntivo a expensas de fibroblastos, iniciadores de la regeneración, mientras que en GPG6 (**Figura 15, página 26**) hay dos zonas diferenciadas, separadas por el defecto óseo, y gran cantidad de tejido conjuntivo con colágeno. En GC (**Figura 11, página 23**) y GIB no se aprecian signos de regeneración ósea, apreciándose en GIB6 (**Figura 13, página 24**) una importante reacción inflamatoria con abundantes linfocitos.

Tian Ding et al (52) valoraron la regeneración ósea utilizando un biomaterial que incluía en el grupo estudio BMP-2 y FGF cubiertos por dos polímeros, PLGA y PLLA, que poseen buenas propiedades osteogénicas. Sin embargo, como principal limitación en este estudio, encontramos su duración, ya que valoran los resultados en 1 y 2 semanas, lo cual en base a nuestra evidencia nos resulta difícil de justificar, puesto que nosotros a los 3 meses es cuando comenzamos a observar signos de regeneración.



Los marcadores osteoblásticos utilizados fueron Runx2, ALP y OCN. Runx2 es un factor de transcripción clave en la diferenciación de osteoblastos, al regular genes osteogénicos, ALP desempeña un papel importante en la mineralización ósea y es el marcador bioquímico, de expresión temprana, más relacionado con la actividad de los osteoblastos. OCN es una proteína fijadora de calcio que se deposita en la matriz ósea e informa sobre la mineralización ósea. (53–55)

La inmunohistoquímica será positiva, es decir, se teñirá de marrón, cuando exista formación ósea. En el GC (**Figura 16, página 28**) y en el GIB (**Figura 17, página 29**), al no existir una regeneración ósea evidente, no hay expresión de los marcadores osteoblásticos. En GPG3 (**Figura 18 A, B, C, página 29**) al estar produciéndose la formación de hueso, si hay un incremento de los marcadores osteoblásticos, mientras que en GPG6 (**Figura 18 D, E, F, página 29**) al haberse producido ya la formación de hueso, la inmunoreactividad es menor.

Hongwei Xu et al (56) elaboraron un andamio para valorar la regeneración ósea con minerales, quitosano y polietilenglicol, sobre el que añadieron BMP-2. Generaron un defecto calvarial y valoraron los resultados a las 4 y 8 semanas, obteniendo mejores resultados en el grupo que incorporaba este armazón, con una mayor expresión de los marcadores osteogénicos.

BMP-2 favorece la osteogénesis, al indicar la diferenciación de osteoblastos y activar Runx2, factor de transcripción que favorece de la diferenciación de osteoblastos. Sin embargo, al ser una proteína pleiotrópica y activar diversas vías implicadas en la regeneración ósea, es importante el control de su concentración.

Así Jim Min Seok et al (57), para conseguir una liberación sostenida de BMP-2 y evitar los efectos adversos derivados de su rápida liberación, crearon un andamio compuesto de micropartículas biactivas. Mediante análisis in vitro demostraron que BMP-2 con su armazón seguía liberándose durante >4 semanas, sin embargo, no valoraron sus resultados in vivo.

Si valoraron in vivo Rui Ma et al (58) la regeneración ósea al combinar un biomaterial de PLGA/ MBG con nanopartículas de ZIF-8 cargado todo con BMP-2. Observaron que este andamio, además de favorecer una liberación lenta y continuada de BMP-2, mejoraba la diferenciación de los osteoblastos y la formación y reparación de hueso. Obtuvieron sus

resultados a las 12 semanas, frente a nuestro estudio donde nuestros resultados los valoramos a los 3 y 6 meses.

Observamos como (**Figura 19 y Tabla 7, página 31**) la lesión ósea estimula la liberación de BMP-2, manifestado por la mayor producción de BMP-2 en GC y GIB respecto a GS, no obstante, la producción en GC y GIB respecto a GPG es menor, ya que el biomaterial lleva añadido BMP-2, excepto en GIB3 cuya liberación de BMP-2 es mayor que en GPG6.

Dentro de la superfamilia TFG- β , TGF- β 1 es la isoforma más abundante e implicada en la regeneración ósea. Al igual que sucedía con BMP-2, es fundamental el control de su concentración y liberación para evitar efectos adversos. Así, Yongxin Tan et al (59) realizaron un estudio in vitro, con un armazón de AL/ AH/ Col donde incorporaron TGF- β 1 y BMP-2, todo recubierto de una microesfera de quitosano, para valorar su toxicidad y su posible uso en estudios in vivo de regeneración ósea.

En nuestro estudio (**Figura 20 y Tabla 8, página 32**), observamos que en los GC y GIB la producción de TFG- β es menor respecto a GPG, donde en este, además, la producción es mayor en GPG3 respecto a GPG6, lo cual podría estar debido a que nuestro armazón contiene BMP-2 y a que su liberación es mayor en las fases iniciales de la remodelación ósea, en parte porque es cuando BMP-2 ejerce su mayor efecto.



6. CONCLUSIONES

1. La lesión ósea generada cumple los criterios de lesión crítica y, sin intervención, el organismo no es capaz de autoregenerarla.
2. Los tiempos de evolución y las variables que han sido estudiadas en nuestro modelo experimental, han sido adecuadas.
3. El tratamiento de la lesión, con biomaterial compuesto con carbonato-apatita, no tiene capacidad de regeneración del defecto óseo.
4. El biomaterial Proteo-Graft ® (Noricum S.L) constituido por Iso-Bone® y combinado con Quitosano, Trehalosa y rhBMP-2, ha conseguido una mejor regeneración ósea, consiguiendo la restitución del defecto óseo planteado en el modelo experimental.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells Current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018; 180:143–62.
2. Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch Osteoporos*. 2021;16(1).
3. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol*. 2020;11.
4. Echeverria-Molina MI, Malollari KG, Komvopoulos K. Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9.
5. Rowe P, Koller A, Sharma S. Physiology, Bone Remodeling. *StatPearls*. 2023.
6. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells*. 2017;40(10):706–13.
7. Sobacchi C, Menale C, Villa A. The RANKL-RANK Axis: A Bone to Thymus Round Trip. *Front Immunol*. 2019; 10:629.
8. Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, Jafarnejad S. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
9. Lerner UH, Kindstedt E, Lundberg P. The critical interplay between bone resorbing and bone forming cells. *J Clin Periodontol*. 2019;46(21):33–51.
10. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020;9(9).
11. Yang N, Liu Y. The Role of the Immune Microenvironment in Bone Regeneration. *Int J Med Sci*. 2021;18(16):3697–707.
12. Tie Y, Tang F, Peng D, Zhang Y, Shi H. TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Molecular Biomedicine*. 2022;3(1).

13. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4.
14. Zou ML, Chen ZH, Teng YY, Liu SY, Jia Y, Zhang KW, et al. The Smad Dependent TGF- β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci.* 2021;8.
15. Goumans MJ, Zwijsen A, ten Dijke P, Bailly S. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Homeostasis and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(2).
16. Fu C, Yang X, Tan S, Song L. Enhancing Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Pre-osteoblasts by BMP-2 Delivery in Graphene Oxide-Incorporated PLGA/HA Biodegradable Microcarriers. *Sci Rep.* 2017;7(1).
17. Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *J Dev Biol.* 2020;8(3).
18. Yao H, Guo J, Zhu W, Su Y, Tong W, Zheng L, et al. Controlled Release of Bone Morphogenetic Protein-2 Augments the Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Accelerating Mandibular Defect Repair. *Pharmaceutics.* 2022;14(11).
19. Park SY, Kim KH, Kim S, Lee YM, Seol YJ. BMP-2 Gene Delivery-Based Bone Regeneration in Dentistry. *Pharmaceutics.* 2019;11(8).
20. Stokovic N, Ivanjko N, Maticic D, Luyten FP, Vukicevic S. Bone Morphogenetic Proteins, Carriers, and Animal Models in the Development of Novel Bone Regenerative Therapies. *Materials.* 2021;14.
21. El Bialy I, Jiskoot W, Reza-Nejadnik M. Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharm Res.* 2017;34(6):1152–70.
22. Battafarano G, Rossi M, De Martino V, Marampon F, Borro L, Secinaro A, et al. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1–22.
23. Girón J, Kerstner E, Medeiros T, Oliveira L, Machado GM, Malfatti CF, et al. Biomaterials for bone regeneration: an orthopedic and dentistry overview. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2021;54(9).



24. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017;3(1).
25. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules.* 2021;26(10).
26. Li J, Zhao Y, Chen S, Wang S, Zhong W, Zhang Q. Research Hotspots and Trends of Bone Xenograft in Clinical Procedures: A Bibliometric and Visual Analysis of the Past Decade. *Bioengineering.* 2023;10.
27. Niu Y, Chen L, Wu T. Recent Advances in Bioengineering Bone Revascularization Based on Composite Materials Comprising Hydroxyapatite. *Int J Mol Sci.* 2023;24
28. Ruffini A, Sandri M, Dapporto M, Campodoni E, Tampieri A, Sprio S. Nature-Inspired Unconventional Approaches to Develop 3D Bioceramic Scaffolds with Enhanced Regenerative Ability. *Biomedicines.* 2021;9.
29. Cheng A, Schwartz Z, Kahn A, Li X, Shao Z, Sun M, et al. Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25(1):14–29.
30. Wu X, Walsh K, Hoff BL, Camci-Unal G. Mineralization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering.* 2020;7(4):1–24.
31. Jordana F, Le Visage C, Weiss P. Substituts osseux. *médecine/sciences.* 2017;33(1):60–5.
32. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynpas M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res.* 2017;21(1).
33. Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D’Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, et al. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).
34. Zhang Y, Wu D, Zhao X, Pakvasa M, Tucker AB, Luo H, et al. Stem Cell-Friendly Scaffold Biomaterials: Applications for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8.

35. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng.* 2018;9.
36. O'Neill R, McCarthy HO, Montufar EB, Ginebra MP, Wilson DI, Lennon A, et al. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. *Acta Biomater.* 2017; 50:1–19.
37. Thirvikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials For Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):835–56.
38. Zhao Y, Zhao S, Ma Z, Ding C, Chen J, Li J. Chitosan-Based Scaffolds for Facilitated Endogenous Bone Re-Generation. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(8).
39. Kim SH, Thambi T, Giang Phan VH, Lee DS. Modularly engineered alginate bioconjugate hydrogel as biocompatible injectable scaffold for in situ biomineralization. *Carbohydr Polym.* 2020;233.
40. Ghosh M, Halperin-Sternfeld M, Grinberg I, Adler-Abramovich L. Injectable Alginate-Peptide Composite Hydrogel as a Scaffold for Bone Tissue Regeneration. *Nanomaterials.* 2019;9(4).
41. Donnalaja F, Jacchetti E, Soncini M, Raimondi MT. Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. *Polymers (Basel).* 2020;12(4).
42. Li G, Zhao M, Xu F, Yang B, Li X, Meng X, et al. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. *Molecules.* 2020;25(21).
43. Asghari F, Samiei M, Adibkia K, Akbarzadeh A, Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(2):185–92.
44. Cojocar DG, Hondke S, Krüger JP, Bosch C, Croicu C, Florescu S, et al. Meniscus-shaped cell-free polyglycolic acid scaffold for meniscal repair in a sheep model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020;108(3):809–18.



45. Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent Trends in the Application of Widely Used Natural and Synthetic Polymer Nanocomposites in Bone Tissue Regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;110.
46. Li L, Yu M, Li Y, Li Q, Yang H, Zheng M, et al. Synergistic anti-inflammatory and osteogenic n-HA/resveratrol/chitosan composite microspheres for osteoporotic bone regeneration. *Bioact Mater*. 2021;6(5):1255–66.
47. Klara J, Onak S, Kowalczyk A, Horak W, Wójcik K, Lewandowska-Łańcucka J. Towards Controlling the Local Bone Tissue Remodeling—Multifunctional Injectable Composites for Osteoporosis Treatment. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5).
48. Ingwersen LC, Frank M, Naujokat H, Loger K, Bader R, Jonitz-Heincke A. BMP-2 Long-Term Stimulation of Human Pre-Osteoblasts Induces Osteogenic Differentiation and Promotes Transdifferentiation and Bone Remodeling Processes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6).
49. Zhang Y, Jiang Y, Zou D, Yuan B, Ke HZ, Li W. Therapeutics for enhancement of spinal fusion: A mini review. *J Orthop Translat*. 2021; 31:73–9.
50. Xu X, Wang R, Sun Z, Wu R, Yan W, Jiang Q, et al. Trehalose enhances bone fracture healing in a rat sleep deprivation model. *Ann Transl Med*. 2019;7(14).
51. Stutz C, Strub M, Clauss F, Huck O, Schulz G, Gegout H, et al. A New Polycaprolactone-Based Biomembrane Functionalized with BMP-2 and Stem Cells Improves Maxillary Bone Regeneration. *Nanomaterials*. 2020;10(9):1–13.
52. Ding T, Kang W, Li J, Yu L, Ge S. An in-situ tissue engineering scaffold with growth factors combining angiogenesis and osteoimmunomodulatory functions for advanced periodontal bone regeneration. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):1–16.
53. Kim S, Lee H, Hong J, Kim SHL, Kwon E, Park TH, et al. Bone-Targeted Delivery of Cell-Penetrating-RUNX2 Fusion Protein in Osteoporosis Model. *Advanced Science*. 2023;10(28).
54. Li F, Ye X, Yang G, Huang H, Bian A, Xing C, et al. Relationships between blood bone metabolic biomarkers and anemia in patients with chronic kidney disease. *Ren Fail*. 2023;45(1).

55. Zhao Z, Yan K, Guan Q, Guo Q, Zhao C. Mechanism and physical activities in bone-skeletal muscle crosstalk. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14.
56. Xu H, Luo H, Chen J, Chen G, Yu X, Ye Z. BMP-2 releasing mineral-coated microparticle-integrated hydrogel system for enhanced bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11.
57. Seok JM, Kim MJ, Park JH, Kim D, Lee D, Yeo SJ, et al. A bioactive microparticle-loaded osteogenically enhanced bioprinted scaffold that permits sustained release of BMP-2. *Mater Today Bio*. 2023;21.
58. Ma R, Su Y, Cao R, Wang K, Yang P. Enhanced Osteogenic Activity and Bone Repair Ability of PLGA/MBG Scaffolds Doped with ZIF-8 Nanoparticles Loaded with BMP-2. *Int J Nanomedicine*. 2023; 18:5055–72.
59. Tan Y, Zhang L, Rajoka MSR, Mai Z, Bahadur A, Mehwish HM, et al. Jawbones Scaffold Constructed by TGF- β 1 and BMP-2 Loaded Chitosan Microsphere Combining with Alg/HA/ICol for Osteogenic-Induced Differentiation. *Polymers (Basel)*. 2021;13(18).

ANEXO

Anexo 1: Índice de abreviaturas

AH: Ácido hialurónico

AL: Alginato

APL: Fosfatasa Alcalina

BMP: Proteína Morfogénica Ósea

Col: Colágeno

CT: Tomografía Computerizada

FDA: Administración de medicamentos y alimentos de EEUU

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

GC: Grupo Control

GIB: Grupo Iso-Bone

GPG: Grupo Proteo-Graft

GS: Grupo Simulado

HA: Hidroxiapatita

H&E: Hematoxilina y Eosina

IB: Iso-Bone

IL-6: Interleucina 6

MBG: Vidrio bioactivo mesoporoso

MSC: Células Mesenquimales

MT: Tricrómico de Masson

OCN: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina

Osx1: Ostérix 1

PCL: Policaprolactona

PG: Proteo-Graft

PLGA: Poli Ácido Láctico Glicólico

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B

RANKL: Ligando del Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B

rhBMP2: BMP-2 humana recombinante

TGF-B: Factor de Crecimiento Transformante Beta

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

URO: Unidad de Remodelación Ósea

ZIF-8: Imidazolato zeolítico 8