

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Regeneración ósea guiada mediante biomaterial  
cargado con rhBMP-2**

Javier López-Andaluz Mangas

Salamanca 2024



Proyecto de Investigación financiado por la Asociación para la Promoción de la Formación e Investigación en Especialidades Quirúrgicas en Castilla y León (APFIEQ-CyL).



**La Profa. Dra. Dña. María Begoña García Cenador. Profesora Contratada Doctor de Cirugía en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.**

**El Prof. Dr. D. Francisco Javier García Criado, Prof. Titular de Cirugía en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.**

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada: “Regeneración ósea guiada mediante biomaterial cargado con rhBMP-2”, que presenta D. Javier López-Andaluz Mangas, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Cirugía, y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada, ante el tribunal correspondiente, y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y, para que conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a seis de marzo de dos mil veinticuatro.

Profa. María Begoña García Cenador

Prof. Francisco Javier García Criado



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría comenzar estas palabras, que quedarán siempre para mí, dirigiéndome a las dos personas que me han permitido cumplir mi objetivo y mi sueño de realizar una Tesis Doctoral, que son mis directores D. Francisco Javier García Criado y Dña. María Begoña García Cenador. Gracias por vuestro constante apoyo científico, por vuestra flexibilidad y paciencia, por adaptaros siempre a la continua montaña rusa que han supuesto estos seis años de carrera y doctorado simultáneo, por hacerme sentir siempre tan querido y apreciado, sin sentir realmente tal merecimiento. Estaré en deuda siempre con vosotros más de lo que pueda demostrar.

A la APFIEQ-CyL por la financiación de esta Tesis Doctoral.

Al Departamento de Cirugía, por los medios prestados para poder desarrollar este proyecto.

A los Servicios de Patología Molecular del Centro del Cáncer y al de Isotopos Radiactivos y Radioprotección de Nucleus por las técnicas realizadas y apoyo científico recibido.

A todo el grupo de investigación que ha participado en este proyecto, sin ellos hubiera sido inabordable.

A todos mis amigos, tanto de Enfermería como de Medicina, y a mi familia, que me han acompañado, entendido y animado en estos años a seguir adelante.

A Yaiza, por su amor incondicional.

A Raquel, que apareció en mi vida allá por 2020 cuando empezamos a trabajar juntos en la pandemia... quien iba a decir que una situación así trajera algo tan bueno. Gracias no solo por apoyarme y entender lo que suponía para mí todo este proyecto, sino también por ser tan generosa y desinteresada, renunciado a trabajar, estudiar, descansar y a cualquier otra cosa por ayudarme. Una parte muy importante de esto es tuyo. Que sea el primero de muchos “éxitos” juntos.

Para terminar, me gustaría mencionar a mis padres, Milagros y Javier. Si miramos atrás... quien nos lo iba a decir, que duro y largo ha sido el camino, pero a la vez qué corto. Decir que sin vosotros no habría llegado hasta aquí es un hecho, pero lo que es aún más evidente es que no tendría el mismo significado. Este logro es especial por compartirlo con vosotros y disfrutarlo juntos, sino no supondría tanto. Gracias por todo lo que habéis sacrificado y renunciado por mí, por escucharme, entenderme y apoyarme, sabéis mejor que nadie todo el esfuerzo y sacrificio que hay detrás. Os quiero.

He tratado de ser simple, pero de nombrar a todo el mundo. Quienes me conocéis sabéis que, aunque no lo exprese con palabras, hay mucho esfuerzo, dedicación y quizás algún momento de duda, detrás de todo esto.

Lo que depara el futuro no lo sé, pero al menos, a día de hoy, mientras escribo estas líneas, siento que todo ha merecido la pena.

Gracias.

*A mis padres,  
a Raquel*





## ÍNDICE

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                            | <b>1</b>  |
| <b>1.1. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....</b>                                                             | <b>3</b>  |
| <b>1.2. FISIOLÓGÍA DE LA REMODELACIÓN ÓSEA .....</b>                                                    | <b>5</b>  |
| 1.2.1. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN.....                                                                       | 5         |
| 1.2.1.1. <i>Eje RANKL-RANK-OPG.....</i>                                                                 | <i>5</i>  |
| 1.2.1.2. <i>Vía de señalización Wnt .....</i>                                                           | <i>8</i>  |
| 1.2.1.3. <i>Ciclo de remodelación ósea .....</i>                                                        | <i>9</i>  |
| 1.2.2. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA REMODELACIÓN ÓSEA.....                                                  | 16        |
| 1.2.2.1. <i>Osteoblasto .....</i>                                                                       | <i>16</i> |
| 1.2.2.2. <i>Osteoclasto .....</i>                                                                       | <i>18</i> |
| 1.2.2.3. <i>Osteocito.....</i>                                                                          | <i>20</i> |
| 1.2.3. ANGIOGÉNESIS, HOMEOSTASIS ÓSEA E INFLAMACIÓN .....                                               | 21        |
| 1.2.3.1. <i>Factor de Crecimiento Endotelial Vascular .....</i>                                         | <i>23</i> |
| 1.2.3.2. <i>Endomucina.....</i>                                                                         | <i>24</i> |
| 1.2.3.3. <i>Vía BMP.....</i>                                                                            | <i>25</i> |
| 1.2.3.4. <i>Papel de la respuesta inflamatoria e inmunitaria en la homeostasis y curación ósea.....</i> | <i>29</i> |
| <b>1.3. ALTERACIONES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA .....</b>                                                  | <b>33</b> |
| 1.3.1. OSTEOPOROSIS .....                                                                               | 33        |
| 1.3.2. FRACTURAS.....                                                                                   | 38        |
| 1.3.3. ENFERMEDAD DE PAGET .....                                                                        | 39        |
| 1.3.4. OSTEOMALACIA.....                                                                                | 40        |
| 1.3.5. OSTEÓGENESIS IMPERFECTA .....                                                                    | 40        |

|                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1.4. TRATAMIENTO DE LAS ALTERACIONES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA .....</b> | <b>41</b>  |
| 1.4.1. CÉLULAS MADRE.....                                                 | 41         |
| 1.4.2. INJERTOS ÓSEOS .....                                               | 42         |
| 1.4.2.1. <i>Autoinjerto</i> .....                                         | 43         |
| 1.4.2.2. <i>Aloinjerto</i> .....                                          | 44         |
| 1.4.2.3. <i>Xenoinjerto</i> .....                                         | 45         |
| 1.4.3. BIOMATERIALES .....                                                | 46         |
| 1.4.3.1. <i>Biomaterial Natural</i> .....                                 | 48         |
| 1.4.3.2. <i>Biomaterial Cerámico</i> .....                                | 48         |
| 1.4.3.3. <i>Biomaterial en forma de Cemento</i> .....                     | 51         |
| 1.4.3.4. <i>Polímeros</i> .....                                           | 53         |
| <b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>                                      | <b>61</b>  |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>                                        | <b>65</b>  |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                | <b>87</b>  |
| 4.1. RESULTADOS MACROSCÓPICOS .....                                       | 89         |
| 4.2. RESULTADOS DE CT .....                                               | 89         |
| 4.3. RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....                                         | 92         |
| 4.4. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA.....                                   | 98         |
| 4.5. RESULTADOS DE BMP-2 .....                                            | 102        |
| 4.6. RESULTADOS TGF- $\beta$ .....                                        | 104        |
| 4.7. RESULTADOS DE RANTES/CCL5.....                                       | 106        |
| 4.8. RESULTADOS DE ENDOMUCINA .....                                       | 108        |
| <b>5. DISCUSIÓN.....</b>                                                  | <b>111</b> |
| <b>6. CONCLUSIONES .....</b>                                              | <b>135</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                              | <b>139</b> |

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Unión RANKL a RANK e inicio de señalización mediado por TRAF6 .....                                                                                         | 7  |
| <b>Figura 2.</b> Unión OPG a RANKL e inhibición de la vía RANKL y osteoclastogénesis...                                                                                      | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina .....                                                                                                            | 8  |
| <b>Figura 4.</b> Inhibición de la vía Wnt .....                                                                                                                              | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Factores favorecedores reabsorción .....                                                                                                                    | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Factores desfavorables reabsorción.....                                                                                                                     | 12 |
| <b>Figura 7.</b> Ciclo de remodelación ósea.....                                                                                                                             | 15 |
| <b>Figura 8.</b> Papel de Runx2 y Osx1 en la diferenciación a osteoblastos .....                                                                                             | 17 |
| <b>Figura 9.</b> Osteoclastogénesis estimulada por RANKL y M-CSF y vías coestimuladoras TREM2 y OSCAR.....                                                                   | 19 |
| <b>Figura 10.</b> Vía canónica de señalización de BMP-2 y TGF- $\beta$ .....                                                                                                 | 26 |
| <b>Figura 11.</b> Acceso a la cresta de inserción. Imagen intraoperatoria de la Ostectomía circular con fresa trefina. ....                                                  | 73 |
| <b>Figura 12.</b> Cierre del abordaje quirúrgico por planos.....                                                                                                             | 73 |
| <b>Figura 13.</b> Biomaterial regenerativo rellenando el defecto óseo. Aislamiento mediante membrana de colágeno. ....                                                       | 76 |
| <b>Figura 14.</b> Equipo de micro tomografía (mCT).....                                                                                                                      | 78 |
| <b>Figura 15.</b> Evaluación tomográfica de la mineralización para el GC del defecto óseo mandibular con membrana Evolution® (GC) .....                                      | 90 |
| <b>Figura 16.</b> Evaluación tomográfica de la mineralización para el GIB del defecto óseo mandibular con armazón óseo experimental IB .....                                 | 91 |
| <b>Figura 17.</b> Evaluación tomográfica de la mineralización para el grupo de estudio del defecto óseo mandibular (GPG), con armazón óseo experimental PG 0,8 $\mu$ g. .... | 91 |
| <b>Figura 18.</b> Imagen teñida con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico del GC a los 3 meses (GC3) .....                      | 92 |
| <b>Figura 19.</b> Imagen teñida con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico del GC a los 6 meses (GC6). ....                      | 92 |

|                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 20.</b> 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).....                                     | 93  |
| <b>Figura 21.</b> 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).....                                     | 94  |
| <b>Figura 22.</b> 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 tres meses (GPG3).....                            | 95  |
| <b>Figura 23.</b> 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 tres meses (GPG3).....                            | 96  |
| <b>Figura 24.</b> 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) .....                           | 97  |
| <b>Figura 25.</b> Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo control de defecto óseo mandibular de rata con membrana Evolution® .....                                      | 99  |
| <b>Figura 26.</b> 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).....             | 99  |
| <b>Figura 27.</b> 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)..... | 100 |
| <b>Figura 28.</b> Comparación en tinción inmunohistoquímica de los marcadores osteogénicos en el grupo de estudio a los 3 meses (GPG3) y el grupo Iso-Bone® a los 3 meses (GIB3).....             | 100 |
| <b>Figura 29.</b> Comparación en tinción inmunohistoquímica de los marcadores osteogénicos en el grupo de estudio a los 6 meses (GPG6) y el grupo Iso-Bone® a los 6 meses (GIB6).....             | 101 |
| <b>Figura 30.</b> Resultados BMP-2 .....                                                                                                                                                          | 103 |
| <b>Figura 31.</b> Resultados TGF-β .....                                                                                                                                                          | 105 |
| <b>Figura 32.</b> Resultados RANTES/CCL5 .....                                                                                                                                                    | 107 |
| <b>Figura 33.</b> Resultados ECM.....                                                                                                                                                             | 109 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Factores favorecedores de la reabsorción ósea .....                            | 11  |
| <b>Tabla 2.</b> Factores desfavorables reabsorción ósea .....                                  | 13  |
| <b>Tabla 3.</b> Resumen principales características osteoblasto, osteoclasto y osteocito. .... | 16  |
| <b>Tabla 4.</b> Principales efectos adversos tras administración rh-BMP-2.....                 | 28  |
| <b>Tabla 5.</b> Células implicadas en la respuesta inflamatoria.....                           | 30  |
| <b>Tabla 6a.</b> Células implicadas en la respuesta inmune .....                               | 31  |
| <b>Tabla 6b.</b> Células implicadas en la respuesta inmune .....                               | 32  |
| <b>Tabla 7.</b> Fármacos Antirresortivos .....                                                 | 37  |
| <b>Tabla 8.</b> Fármacos Anabólicos .....                                                      | 37  |
| <b>Tabla 9.</b> Principales características de los injertos óseos .....                        | 46  |
| <b>Tabla 10a.</b> Principales tipos y características de Biomateriales .....                   | 57  |
| <b>Tabla 10b.</b> Principales tipos y características de Biomateriales .....                   | 58  |
| <b>Tabla 11.</b> Distribución de materiales empleados en cada uno de los grupos.....           | 77  |
| <b>Tabla 12.</b> Resultados BMP-2.....                                                         | 103 |
| <b>Tabla 13.</b> Resultados TGF- $\beta$ .....                                                 | 105 |
| <b>Tabla 14.</b> Resultados RANTES/CCL5 .....                                                  | 107 |
| <b>Tabla 15.</b> Resultados ECM .....                                                          | 109 |





## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

**APC:** Poliposis Adenomatosa

**APL:** Fosfatasa Alcalina

**ASC:** Células Madre Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo

**bALP:** Fosfatasa Alcalina Ósea

**bCTX:** Telopéptido C reticulado en suero de colágeno tipo I

**BMMSC:** Células Madre Mesenquimales de la Médula Ósea

**BMP-2:** Proteína Morfogénica Ósea 2

**BMP:** Proteína Morfogénica Ósea

**CaP:** Fosfato Cálculo Bifásico

**CPC:** Cementos de Fosfato de Calcio

**CT:** Tomografía Computerizada

**CTSK:** Catepsina K

**DBB:** Hueso Bovino Desproteinizado

**DFPC:** Células progenitoras del folículo dental

**DMO:** Densidad Mineral Ósea

**DPSC:** Células Madre Mesenquimales de la Pulpa Dental

**Dvl:** Proteína de polaridad de segmento desordenado

**ECM:** Endomucina

**EPC:** Células progenitoras endoteliales

**FDA:** Administración de medicamentos y alimentos de EEUU

**FGF:** Factor de Crecimiento de Fibroblastos

**FZD:** Frizzled

**GC:** Grupo Control

**GH:** Hormona de Crecimiento

**GIB:** Grupo Iso-Bone

**GO:** Óxido de Grafeno

**GPG:** Grupo Proteo-Graft

**Gsh:** Grupo Simulado

**GSK-3B:** Glucógeno Sintasa Quinasa 3B

**HA:** Hidroxiapatita

**H&E:** Hematoxilina y Eosina

**HIF-1:** Factor de Transcripción 1 Inducido por Hipoxia

**hucMSC:** Exomas de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano

**IB:** Iso-Bone

**IFN:** Interferón

**IL-1:** Interleucina 1

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-6:** Interleucina 6

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-12:** Interleucina 13

**IL-13:** Interleucina 13

**LAP:** Proteína asociada a latencia

**M-CSF:** factor estimulador de colonias de macrófagos

**MAPK:** Proteínas Quinasas derivadas de Mitógenos

**MSC:** Células Mesenquimales

**MT:** Tricrómico de Masson

**NFATc1:** Factor Nuclear de Células T Activadas citoplasmáticas

**NFkB:** Factor Nuclear Kappa Beta

**NTX:** N- Telopéptidos reticulados en orina de colágeno tipo I



**OCN:** Osteocalcina

**OPG:** Osteoprotegerina

**Osx1:** Ostérix 1

**PCL:** Policaprolactona

**PG:** Proteo-Graft

**PGF:** Factor de Crecimiento de Plaquetas

**PEG2:** Prostaglandina E2

**PGA:** Poli Ácido Glicólico

**PINP:** Polipéptido tipo IN de procolágeno

**PLA:** Poli Ácido Láctico

**PLGA:** Poli Ácido Láctico Glicólico

**PMN:** Polimorfonucleares

**PTH:** Parathormona

**RANK:** Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B

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

**rhBMP2:** BMP-2 humana recombinante

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SR:** Estroncio

**T3:** Triyodotironina

**T4:** Tiroxina

**TBC:** Cerámica de hueso verdadero.

**TβRI:** Receptor TGF-β I

**TβRII:** Receptor TGF-β II

**TCP:** Fosfato Cálcico Tricálcico

**TGF-β:** Factor de Crecimiento Transformante Beta

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**TNFR:** Receptor del Fator de Necrosis Tumoral

**Tnfs11:** Superfamilia 11 del receptor del Factor de Necrosis Tumoral

**TReg:** T Reguladora

**TSH:** Hormona Estimulante Tiroides

**URO:** Unidad de Remodelación Ósea

**VEGF:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

**VHL:** Von Hippel Lindau



# 1. INTRODUCCIÓN





## **1.1. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA**

En la actualidad, las fracturas óseas asociadas a caídas y la pérdida de autonomía derivado de ello, es una de las principales causas de ingreso hospitalario e intervención quirúrgica, generando elevadas tasas de morbilidad, atención médica y por tanto de consumo de recursos tanto sanitarios como económicos. (1)

Uno de los principales objetivos es actuar de modo preventivo en futuras caídas y las comorbilidades derivadas de las mismas (fracturas especialmente), sin embargo, su tendencia es al alza en gran medida por el aumento de la esperanza de vida que lleva a la aparición de enfermedades degenerativas del hueso, como la osteoporosis, con su consiguiente fragilidad producida por una pérdida importante de densidad ósea aumentando la probabilidad de fracturas óseas. (2–4)

Los últimos datos sobre osteoporosis, aportados por el proyecto SCOPE, que surge con el objetivo de concienciar sobre la importancia de su cuidado y prevención en Europa, estima que, en 2019, el número de personas mayores de 50 años con osteoporosis era de 32 millones, siendo España uno de los países con más personas de 50 años con osteoporosis (2,945 millones). La prevalencia es claramente más marcada en las mujeres (6,5% varones frente a 22,1% las mujeres), estando en gran parte determinada por la menopausia y el cese de producción de estrógenos. (5)

Por su parte la incidencia de fracturas futuras por fragilidad en 2019 en Europa fue de 2,7 millones suponiendo un coste de 37,5 mil millones de euros. En España, hubo aproximadamente 285.000 nuevas fracturas, suponiendo un coste de 100.000 millones de euros (un 3,8% del gasto sanitario nacional total). (5)

En Estados Unidos hasta 8 millones de mujeres y 2 millones de varones tienen osteoporosis y más de 40 millones tienen cifras que pueden representar un riesgo. Se ha calculado que cada año se producen 2 millones de fracturas como consecuencia exclusivamente de la osteoporosis, siendo estas fundamentalmente de cadera, muñeca y vertebra. De hecho, la fractura de cadera es la más frecuente conforme aumenta la edad y

puede llegar a suponer cerca de 300.000 fracturas, pero los mayores casos son los de vértebras, ocasionando casi 500.000 fracturas anuales. (6)

Se cree que el 12% de la población mundial tiene más de 60 años, lo que supone aproximadamente 901 millones de personas. Europa tiene el mayor porcentaje de población de más de 60 años (24%) pero el rápido envejecimiento a nivel mundial hace creer que, en 2050, excepto África, tendrán un 25% o más de su población con más de 60 años, lo cual genera un impacto sustancial en el riesgo de sufrir osteoporosis u otras enfermedades óseas degenerativas, y con ello fracturas. Se estima que de 1,66 millones de fracturas de cadera anuales que había en 1990, se puede pasar a 6,26 millones anuales en 2050. (7)

La medicina preventiva, basada en una vida saludable realizando una correcta actividad física y una alimentación adecuada, reduciendo la pérdida de peso y masa grasa, que favorecen una mayor fragilidad ósea y por tanto el riesgo de fracturas, resulta fundamental.

En ausencia de comorbilidades, el hueso tiene capacidad de curación, sin inducir la formación de tejido cicatricial, sin embargo, el aumento de la esperanza de vida, un estilo de vida cada vez más deficiente y determinadas fracturas complejas, provocan que la capacidad regenerativa espontánea del paciente en ocasiones sea insuficiente. (8)

Para pequeñas lesiones, el trasplante óseo autólogo, extraído del propio paciente, es la técnica más aceptada y valorada por su osteoinducción (proceso por el que se estimula la osteogénesis) y osteoconducción (ambiente adecuado para la osteogénesis). Sin embargo, las fuentes disponibles de injerto y el daño secundario que genera hacen que en los últimos años se hayan buscado alternativas para la medicina regenerativa ósea, siendo la ingeniería de tejidos la más estudiada. (9)

En ella, se intenta conseguir la regeneración del tejido dañado mediante la creación de “andamios”: biomateriales que favorecen la incubación, crecimiento, proliferación de células y su posterior diferenciación en tejidos para regenerarlo. Es por ello por lo que la ingeniería de tejidos y la investigación en biomateriales está aumentando, tratando de remplazar los autoinjertos y aloinjertos, ya que no otorgan una regeneración absolutamente satisfactoria tras su utilización. (10)

## **1.2. FISIOLÓGÍA DE LA REMODELACIÓN ÓSEA**

El hueso no es una estructura inerte, está en permanente cambio en un proceso denominado remodelación ósea. Implica la reabsorción del hueso viejo o dañado seguido del depósito de nuevo material óseo. (11)

Es por tanto un proceso dinámico, estrictamente coordinado y regulado entre osteocito, osteoblasto y osteoclasto que da como resultado inicial una resorción ósea osteoclástica seguida de una reparación osteoblástica con síntesis de nuevo tejido. En este proceso de homeostasis ósea es fundamental el Eje RANKL-RANK-OPG. (12,13)

### **1.2.1. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN**

#### ***1.2.1.1. Eje RANKL-RANK-OPG***

La identificación de la señalización RANKL-RANK-OPG a mediados de la década de los 90 representa un hito en la biología ósea y ha dado lugar a un gran avance en el campo de la osteoinmunología. (14,15)

RANKL, codificado por *Tnfsf11*, es producido por células estromales del hueso: osteoblastos y osteocitos, y cumple un papel clave en la remodelación ósea al unirse y activar a RANK que es expresado por los osteoclastos. (15,16)

RANK, codificado por *Tnfsf11a*, es un receptor de membrana perteneciente a la superfamilia TNFR.

RANKL, secretado por osteoblastos y osteocitos ante determinados estímulos, como puede ser la PTH en situaciones de hipocalcemia, se unirá a RANK (**Figura 1**), localizado en la membrana de los progenitores de los osteoclastos (preosteoclastos) induciendo la activación y diferenciación final de estos a osteoclasto favoreciendo la resorción ósea y la liberación de calcio del hueso al torrente circulatorio aumentando sus concentraciones séricas. (13,17,18)

El eje RANKL-RANK, además de estar involucrado en la homeóstasis ósea, parece cumplir un papel relevante en el desarrollo de enfermedades inmunológicas y metástasis ósea. (19)

Este proceso requiere a su vez de una serie de secuencias perfectamente integradas entre sí. RANKL, molécula clave que regula la diferenciación de los osteoclastos, se une a RANK favoreciendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras como TRAF6 (**Figura 1**), proteína responsable de mediar en la activación de cascadas de señalización, estimulando la actividad de NF-kB, esencial para la osteoclastogénesis, ya que se ha demostrado en ensayos que, ratones con doble pérdida de NF-kB sufrirán osteopetrosis: huesos débiles y densos ante la falta de degradación de hueso viejo. NF-kB activará NFATc1, siendo este el factor de transcripción más importante en la síntesis de osteoclastos, pues también se ha demostrado en ensayos que ratones sin NFATc1 tienen inhibida la osteoclastogenesis. (12,15,20)

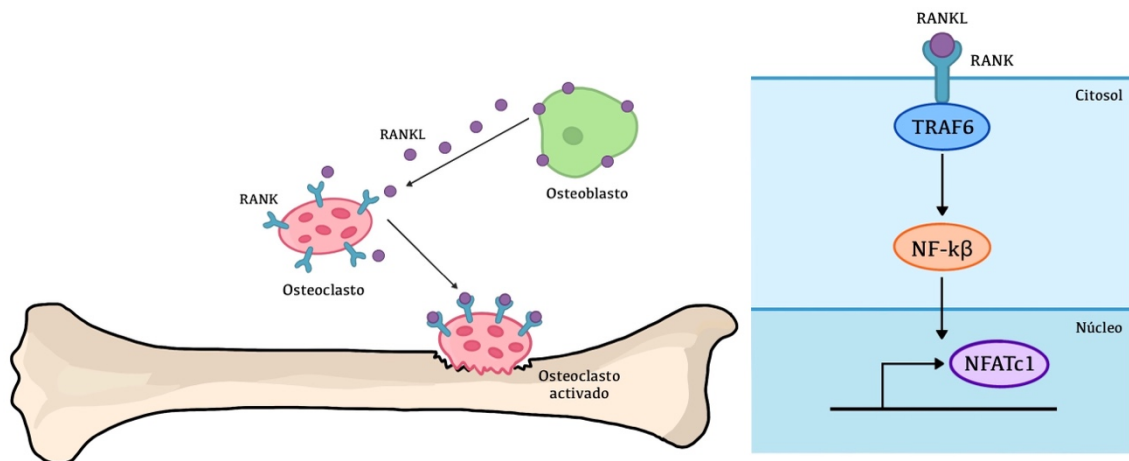


**Figura 1.** Unión RANKL a RANK e inicio de señalización mediado por TRAF6. (Imagen propia)

Por su parte la OPG, que se encuentra en el cromosoma 8 y es codificada por *Tnfrsf11b*, producida fundamentalmente por los osteoblastos, cumple un papel antagónico en la remodelación ósea (**Figura 2**): se une a RANKL y produce una inhibición de la vía RANKL-RANK, ejerciendo una función anti-clastogénesis. Se ha destacado también su papel en las enfermedades cardiovasculares, puesto que elevadas concentraciones de OPG, incrementan el riesgo de lesiones ateroscleróticas por una mayor calcificación de las arterias coronarias. (16,21,22)

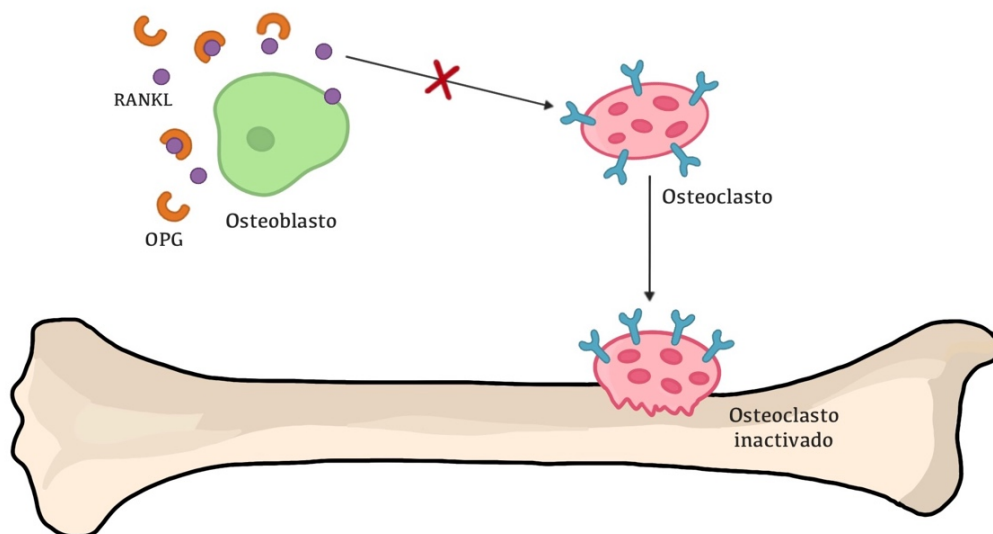


**Figura 2.** Unión OPG a RANKL e inhibición de la vía RANKL y osteoclastogénesis. (Imagen propia)

### 1.2.1.2. Vía de señalización Wnt

La proteína  $\beta$ -Catenina es el componente esencial de la vía Wnt, estando involucrada en el crecimiento y desarrollo de diversos órganos y tejidos. Durante las primeras etapas de una fractura,  $\beta$ -Catenina es fundamental para que las células mesenquimales se diferencien en osteoblastos. Es por tanto una vía en estudio: la administración de  $\beta$ -Catenina con la finalidad de acelerar la recuperación de una lesión ósea. (20)

La vía de señalización canónica de Wnt está mediada por  $\beta$ -Catenina, y será la correcta estimulación de Wnt la que determinará si la  $\beta$ -Catenina se dirige hacia su degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma o, por el contrario, activa en el núcleo los factores de transcripción necesarios para regular la expresión de genes diana.

En ausencia de Wnt (**Figura 3**), la  $\beta$ -Catenina es fosforilada por GSK-3B, APC y axina. Esta  $\beta$ -catenina fosforilada será eliminada por el sistema proteosómico para evitar su acumulación en el citoplasma. (23,24)

La interacción Wnt con su correceptor LRP5/6 y FZD (**Figura 3**) unido al reclutamiento de Dvl en el dominio FZD, suprime la actividad GSK-3B, APC y axina, favoreciendo la liberación y posterior acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, que se traslocará al núcleo induciendo la expresión de genes diana. (24–26)

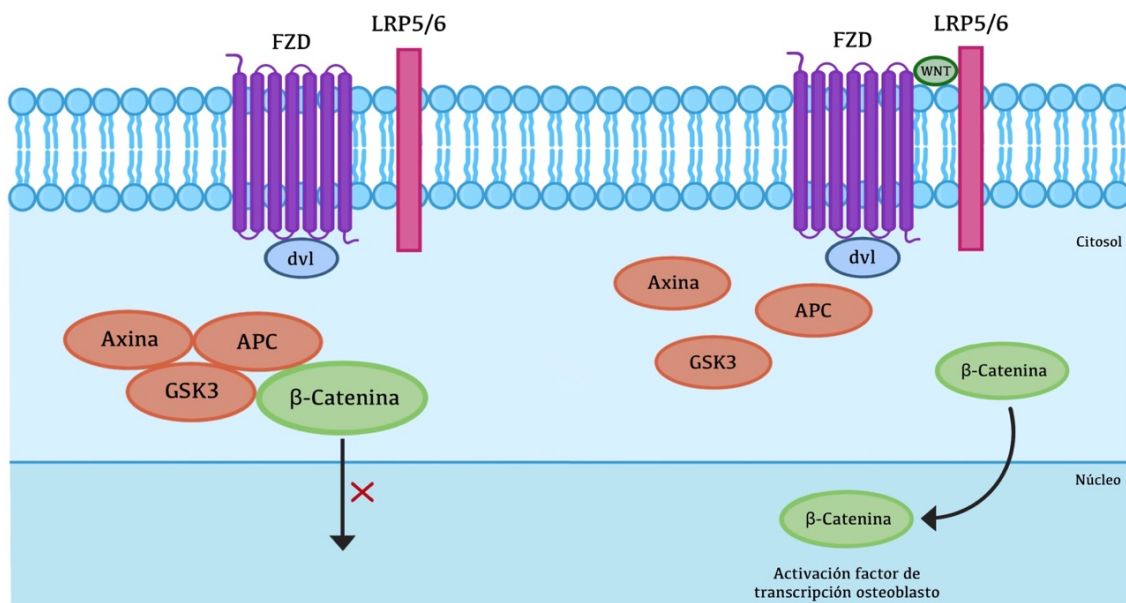


**Figura 3.** Vía de señalización Wnt/  $\beta$ -Catenina. (Imagen propia)

El principal inhibidor de esta vía es la esclerostina, codificada por el gen SOST y secretada por los osteocitos. Se une a LRP5 (Figura 4), impidiendo la unión con FZD y el reclutamiento de Dvl. La actividad GSK-3B, APC y la axina no permiten que se acumule  $\beta$ -Catenina en el citoplasma, impidiendo la expresión de genes que favorezcan la diferenciación de los osteoblastos. Al inhibir la formación de hueso, se asocia fundamentalmente a una disminución de la densidad ósea con el consiguiente riesgo de sufrir fracturas o desarrollar osteoporosis. Se están desarrollando terapias como el anticuerpo anti-esclerostina no solo para mejorar la formación ósea, sino también para revertir la pérdida ósea. (20,25)

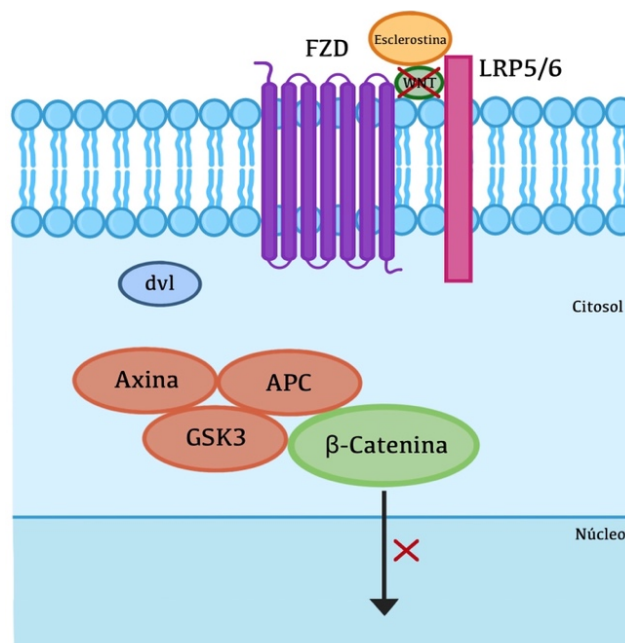


**Figura 4.** Inhibición de la vía Wnt. (Imagen propia)

### 1.2.1.3. Ciclo de remodelación ósea

El esqueleto es un órgano dinámico en continua remodelación a lo largo de la vida. La remodelación ósea fisiológica es un equilibrio resultante de diversos procesos biológicos regulados por interacciones entre los distintos tipos celulares que residen en el hueso, siendo las principales células implicadas en la remodelación los osteoblastos y los osteoclastos. Además, los osteocitos actúan como mecanosensores jugando un papel importante en la remodelación ósea. La desregulación de este proceso conduce a una remodelación anormal y un mayor riesgo de patología ósea. (27)

### **Factores favorecedores de reabsorción**

RANKL, perteneciente a la familia TNF, es producido por fibroblastos activados, linfocitos T activados y osteoblastos (**Figura 5**). Al unirse al receptor RANK, localizado en los osteoclastos, se induce su activación y su diferenciación final a osteoclasto activado favoreciendo por tanto la resorción.

La OPG, antagonista de RANKL, en este caso es producida en concentraciones escasas. Así mismo está elevada la producción de esclerostina, proteína que inhibe la vía Wnt que regula la formación y la actividad de los osteoblastos.

Queda por tanto un desbalance entre resorción-formación de hueso, favorable a la destrucción de este existiendo un exceso de RANKL y de esclerostina, y un déficit de OPG y de la vía Wnt.

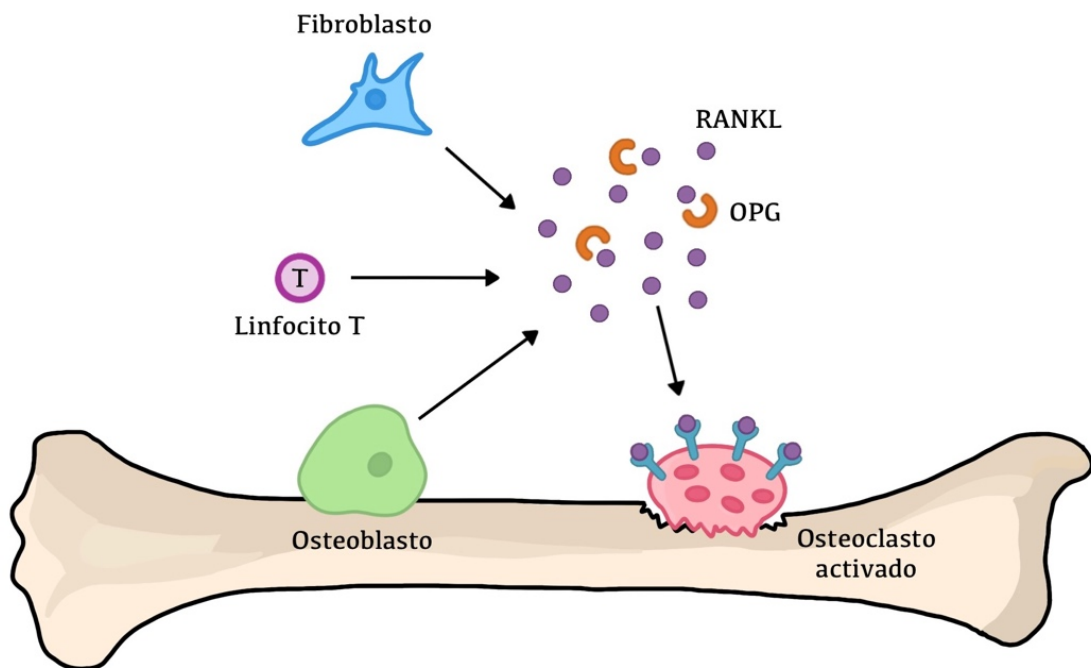


**Figura 5.** Factores favorecedores reabsorción. (Imagen propia)

En el ámbito hormonal se puede destacar (11):

- PTH: Tiene una acción indirecta sobre los osteoclastos al aumentar la actividad de RANKL. Se libera cuando las concentraciones de calcio sérico están disminuidas, pero, una vez alcanzada la concentración ideal, se inhibe la liberación de PTH.
- Estrógenos: La deficiencia de estrógenos favorece una mayor reabsorción ósea, se cree que por un aumento de la supervivencia de los osteoclastos.
- Glucocorticoides: Favorecen la acción de los osteoclastos al aumentar la acción de RANKL y disminuir la OPG, y al provocar la muerte de los osteoblastos.

Todo esto puede verse resumido en la siguiente tabla (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Factores favorecedores de la reabsorción ósea

|                  |                    |
|------------------|--------------------|
| RANKL            | ↑                  |
| Esclerostina     | ↑                  |
| Wnt              | ↓                  |
| OPG              | ↓                  |
| PTH              | ↑ RANKL            |
| Estrógenos       | ↑ Vida osteoclasto |
| Glucocorticoides | ↑ RANKL y ↓ OPG    |

### **Factores desfavorables de la reabsorción**

En este caso se produce una mayor cantidad de OPG (**Figura 6**) que neutralizará a RANKL impidiendo su adhesión al receptor RANK de los osteoclastos, produciendo su inactivación. La producción de esclerostina estará disminuida, activándose la vía Wnt y estimulándose la formación de osteoblastos.

Queda por tanto un balance favorable a la formación de hueso, existiendo un déficit de RANKL y esclerostina y una mayor producción de OPG y activación vía Wnt.

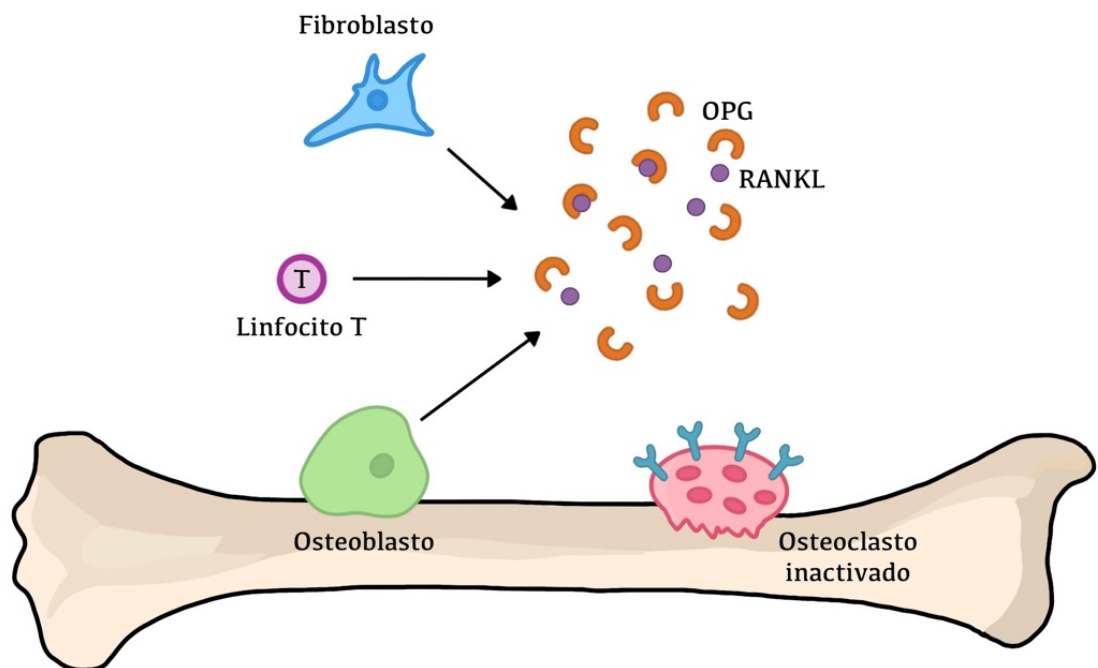


**Figura 6.** Factores desfavorables reabsorción. (Imagen propia)

En el medio hormonal se puede destacar (11):

- Calcitonina: Se libera de las células C del tiroides ante niveles elevados de calcio sérico, para inhibir la reabsorción ósea.
- GH: Tiene una doble actividad: por un lado, estimula la proliferación y actividad osteoblástica, pero por otro, la reabsorción ósea osteoclástica, pero el efecto neto de esta doble acción favorece la formación de hueso.
- Hormona Tiroidea: La TSH, T4 y la T3 estimulan la acción osteoblástica y la elongación ósea a través de la proliferación de condrocitos.

Todo esto se puede ver resumido en la siguiente tabla (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Factores desfavorables reabsorción ósea

|              |                          |
|--------------|--------------------------|
| RANKL        | ↓                        |
| Esclerostina | ↓                        |
| Wnt          | ↑                        |
| OPG          | ↑                        |
| Calcitonina  | ↓ Reabsorción            |
| GH           | ↑ Actividad osteoblastos |
| TSH, T3, T4  | ↑ Actividad osteoblastos |

La remodelación ósea es la secuencia mediante la cual se sustituye tejido óseo antiguo por otro nuevo, mediante procesos sucesivos pero integrados y coordinados de resorción y formación de hueso en unas zonas denominadas URO. Se pueden distinguir 5 fases (14,27,28). **(Figura 7)**

- Activación: El osteoblasto, inicialmente en reposo y tapizando la superficie ósea, se retrae. En este momento se produce la activación osteoclástica, que es el primer paso para la creación de la URO, y actuará en el espacio generado por la retracción de los osteoblastos reabsorbiendo el hueso dañado. Esta activación se produce por la interacción entre OPG, RANKL, y RANK. OPG ejercerá un efecto antagónico a RANKL, cuya finalidad es unirse a RANK en los osteoclastos para iniciar la resorción. En este momento de activación osteoclástica prevalecerá la unión RANKL-RANK.
- Reabsorción: Favorecido por lo mencionado en la anterior fase, se produce la reabsorción ósea por el osteoclasto.
- Reversión: Finalizada la reabsorción, los osteoclastos sufren apoptosis y serán eliminados por los macrófagos.
- Formación: Los osteoblastos se depositan en la cavidad generada por los osteoclastos y comienzan a liberar osteoide.
- Terminación: La sustancia osteoide se mineraliza por depósito de calcio y fósforo formando cristales de hidroxapatita, finalizando la renovación del hueso.

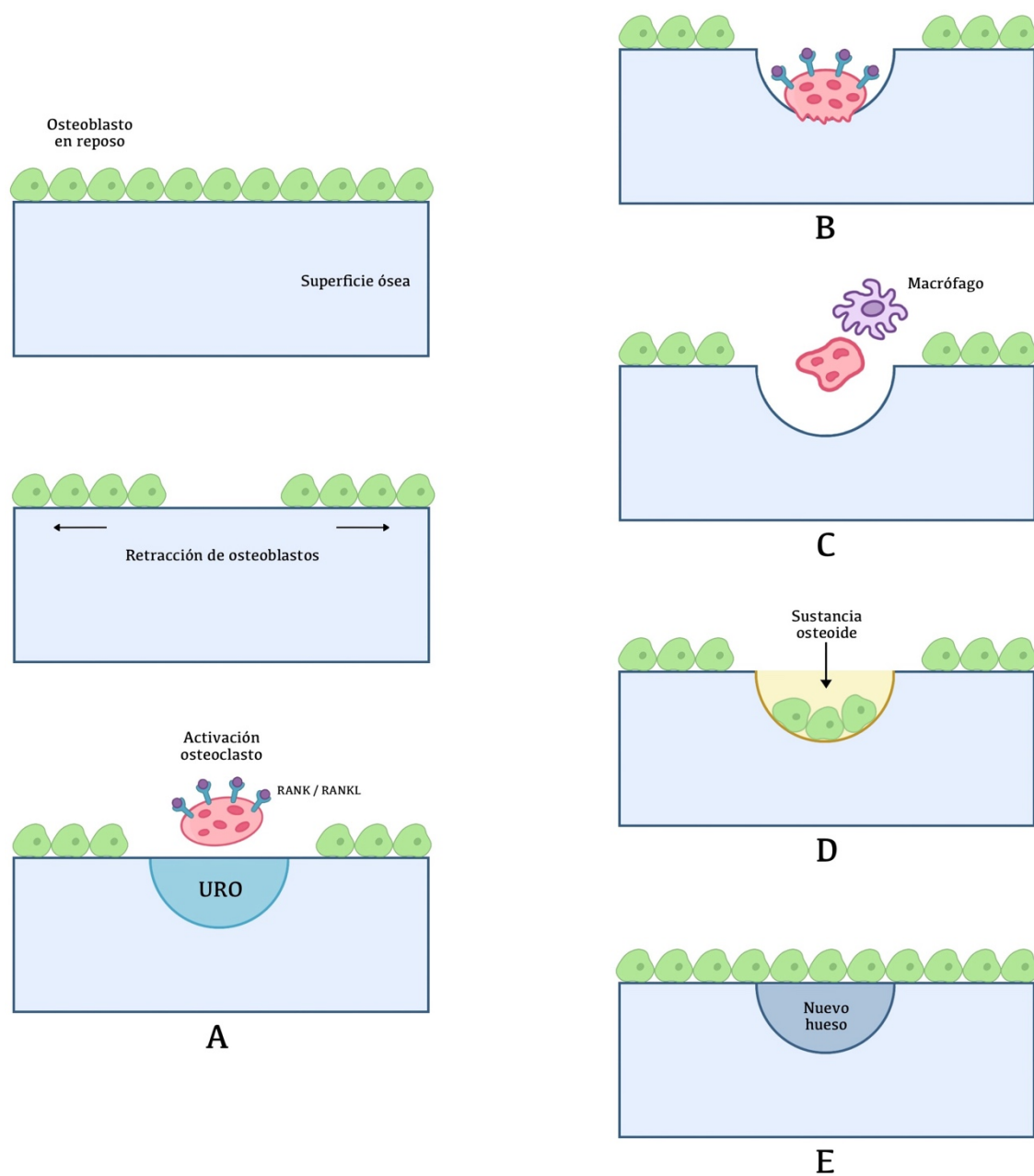


**Figura 7.** Ciclo de remodelación ósea. (Imagen propia)

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

## 1.2.2. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA REMODELACIÓN ÓSEA

La remodelación ósea es un proceso complejo, estrictamente regulado por diversas estirpes celulares, íntimamente relacionadas entre sí (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Resumen principales características osteoblasto, osteoclasto y osteocito.

|                   | Osteoblasto                                                                                                                         | Osteoclasto                                                                                                                                                                                                    | Osteocito                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Origen</b>     | Células mesenquimales                                                                                                               | Células hematopoyéticas                                                                                                                                                                                        | Osteoblastos maduros                                                                                                                                                                                          |
| <b>Función</b>    | Sintetizan:<br>- Matriz ósea<br>- Fosfatasa alcalina<br>- Osteocalcina<br>- Colágeno tipo I:<br>Constituye el 90% de la matriz ósea | Resorción ósea                                                                                                                                                                                                 | Regulación de la homeostasis ósea, favoreciendo la formación o resorción ósea                                                                                                                                 |
| <b>Regulación</b> | Runx2 favorece la síntesis de osteoblastos y activación de Osx1, a su vez necesario para la diferenciación a osteoblastos           | - <u>M-CSF</u> : Conduce a la proliferación y diferenciación del osteoclasto<br><br>- <u>RANKL</u> : Activa NF-KB y NFATC1, promoviendo la diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclasto maduro | - Si aumenta la carga mecánica se favorece la activación vía Wnt/ $\beta$ -catenina, induciendo la síntesis de hueso<br><br>- Si disminuye la carga, se libera esclerostina, induciendo la resorción de hueso |

### 1.2.2.1. Osteoblasto

Derivan de una célula de origen mesenquimatoso y sintetizan y secretan matriz ósea a través de la acción secuencial de factores de transcripción diferenciándose finalmente en osteocitos. Se han identificado diversos genes que contribuyen a su regulación, entre los que se encuentra Runx2, que se expresa en condrocitos (células del cartílago) y en los progenitores osteoblásticos, encargándose de la expresión de proteínas importantes en la síntesis del osteoblasto como Osx 1 (factor de transcripción que participa en la maduración del osteoblasto) y RANKL. (13,25,28)

Por ello el déficit de Runx2 da lugar a carencia de osteoblastos y por ende una falta completa de formación ósea, lo que demuestra la necesidad de Runx2 en la osteogénesis.

Por otra parte, la síntesis de Runx2, al favorecer la síntesis de osteoblastos, va a inhibir la diferenciación de los adipocitos. El otro factor esencial en la síntesis del osteoblasto (Osx1), suele ser activado por Runx2 y es esencial para la diferenciación del osteoblasto, pues se ha demostrado en ensayos que en ratones carentes de Osx1 no se produce la formación de hueso. (29)

La célula mesenquimal se diferencia a osteoblasto (**Figura 8**) mediante factores de transcripción como Runx2 y Osx1. Runx2 por un lado favorece la síntesis de osteoblastos de manera directa, pero por otro, activa Osx1 para que también sintetice osteoblastos. Estos a su vez expresan RANKL en su membrana para la regulación de los osteoclastos. (30)

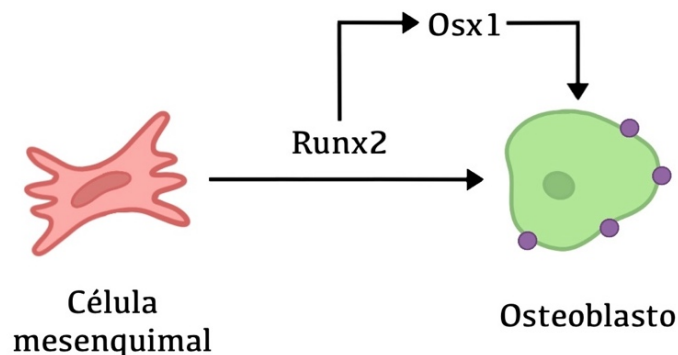


**Figura 8.** Papel de Runx2 y Osx1 en la diferenciación a osteoblastos. (Imagen propia)

Sintetizan, entre otras sustancias, APL, OCN (determinará el cambio hacia osteocito terminal) y, sobre todo, colágeno tipo I, que constituye el 90% de la matriz ósea la cual se secreta en un primer instante como osteoide no mineralizado para posteriormente mineralizarse en forma de HA por la acumulación de fosfato cálcico. (25,28)

La APL tiene un papel clave para la mineralización y como marcador osteogénico, por lo que niveles bajos suelen asociar una mineralización ósea defectuosa con las consiguientes patologías asociadas, mientras que niveles elevados se esperarían encontrar en la fase inicial de la remodelación ósea tras una lesión. La OCN está regulada por Runx2, factor de transcripción de los osteoblastos, y posee una alta afinidad por HA, estructura mineral de la matriz extracelular ósea. (31–33)

Los osteoblastos, además, ejercen una función reguladora de los osteoclastos, ya que expresan en su membrana RANKL, el cual interacciona con RANK activando TRAF6 que activará una serie de proteínas quinasas que a su vez están implicadas en la activación de factores de transcripción (como C-Fos) que llevarán a la activación y diferenciación de los osteoclastos. (34)

Continuando con su función reguladora sobre los osteoclastos, sintetizan también OPG, regulada a su vez su liberación por la vía Wnt/ B-Catenina, que inhibirá el complejo de unión RANK/RANKL evitando la activación de RANK y la consecuente activación de los osteoclastos.

#### ***1.2.2.2. Osteoclasto***

Se encargan de la resorción ósea, es decir, de la destrucción del hueso para la obtención de calcio.

Se trata de células de origen hematopoyético frente a los osteoblastos que tenían un origen mesenquimatoso. Existen varios factores importantes en la evolución de precursor osteoclástico a osteoclasto activo; uno de ellos es M-CSF que contribuye fundamentalmente a la fusión de las células progenitoras del osteoclasto. (13)

Degradan el hueso mediante la secreción de enzimas proteolíticas y ácidas como CTSK, que disuelve el colágeno y el hueso. (28)

Los macrófagos pueden polarizarse y cambiar su fenotipo según el ambiente externo, así en presencia de citocinas, como IFN, ROS, IL-12 y el TNF, se polarizan al tipo M1, que secretará citocinas que tienen el efecto de activar el osteoclasto y promover la reabsorción ósea: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 etc. Por otra parte, en presencia de IL-4, IL-10, IL-13, los macrófagos se polarizan al tipo M2 y pueden secretar IL-10 o BMP-2, factores de crecimiento osteogénico que ejercen más influencia sobre los osteoblastos. (35)

La osteoclastogénesis está estimulada fundamentalmente por RANKL y M-CSF. Durante la etapa inicial la señalización M-CSF induce la activación de Akt (una proteína quinasa B señalizadora) y ERK (proteína perteneciente a la ruta MAPK que comunica una señal desde el receptor hasta el ADN del núcleo) que conduce a la proliferación y diferenciación de osteoclastos (14) **(Figura 9)**.

RANKL activa NF- $\kappa$ B y NFATc 1, un factor de transcripción de ADN, a través de TRAF6, promoviendo la diferenciación de los precursores de osteoclastos en osteoclastos maduros. Esta vía de señalización RANKL se ve apoyada por dos vías coestimuladoras (TREM2 y OSCAR) que activan al calcio y este a su vez la inducción de NFATc1 (12) **(Figura 9)**.

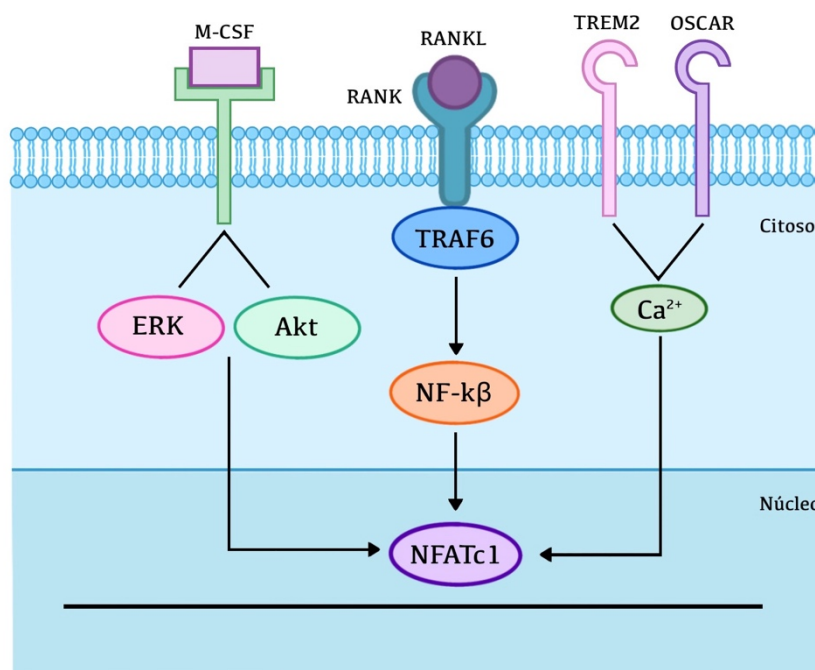


**Figura 9.** Osteoclastogénesis estimulada por RANKL y M-CSF y vías coestimuladoras TREM2 y OSCAR. (Imagen propia)

### ***1.2.2.3. Osteocito***

Derivan de osteoblastos maduros que, durante el proceso de formación ósea, adquieren una morfología más diferenciada y quedan atrapados en la matriz por mecanismos aún desconocidos. Una vez incrustado en la matriz mantiene contactos con células adyacentes mediante uniones gap, permitiendo el paso de citocinas, interleucinas y prostaglandinas. (36,37)

Se cree que actúan como mecanosensores, es decir, en función de la fuerza mecánica aplicada sobre los tejidos cambian su actuación hacia la formación de hueso o la resorción de este, con la finalidad de mantener la homeostasis. Por ejemplo, durante el aumento de carga, activan los osteoblastos mediante la liberación de PGE2 que provoca una rápida activación de la vía de señalización Wnt/ B-catenina y suprimen la actividad de los osteoclastos mientras que, en situaciones de carga reducida, sucede lo contrario. Esto demuestra el papel clave que cumple la señalización Wnt y como una alteración en esta vía de la señalización, por ejemplo, en la mutación WNT1, ocasiona la osteogénesis imperfecta, una displasia esquelética que sucede en la infancia y se caracteriza porque los huesos se fracturan con facilidad. (38)

En esta homeóstasis ósea, también es importante la esclerostina, derivada del gen SOST, proteína específica de los osteocitos que actúa inhibiendo la vía Wnt. En situaciones de ausencia de carga, se produce una mayor expresión de esclerostina y de pérdida ósea. Actualmente, está siendo una diana terapéutica, mediante la aplicación de un anticuerpo anti-esclerostina, para el tratamiento de la osteoporosis y osteopenia. (36,39)

### 1.2.3. ANGIOGÉNESIS, HOMEOSTASIS ÓSEA E INFLAMACIÓN

El hueso es un tejido dinámico y muy vascularizado gracias al periostio, una fina membrana adherida al hueso que permite su adecuada nutrición. Debido a esta vascularización elevada, tiene gran capacidad para curar, suministrar células osteoprogenitoras y movilizar minerales, especialmente calcio. La curación ósea implica un conjunto amplio de eventos que pueden desglosarse del siguiente modo: (40–42)

- La curación comienza con la formación de un coágulo y una fase inflamatoria para eliminar posibles antígenos o material extraño que se encuentren en la herida. La alteración en esta fase inicial puede provocar una mala cicatrización.
- Tras esto, el coágulo es sustituido gradualmente por tejido de granulación gracias a mediadores como VEGF. Este tejido de granulación está muy vascularizado y se reemplaza posteriormente por hueso que madurará gradualmente.
- Para favorecer esta maduración y reparación e inducir la formación de callo dentro del tejido de granulación, actúan ciertos factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  y FGF.
- La formación de hueso definitivo puede suceder por dos mecanismos: La osificación endocondral (típica de huesos largos) y la osificación intermembranosa. En ambas formas de osteogénesis, la angiogénesis asociada a VEGF constituye una etapa fundamental:
  - Osificación Endocondral: las células endoteliales proliferan y los condroblastos se diferencian en la zona del coágulo dando lugar a la formación de cartílago hialino en cuya matriz se produce VEGF y FGF que favorecerá la formación de nuevos vasos sanguíneos con el consiguiente transporte de células osteoprogenitoras y hematopoyéticas, reemplazando el cartílago por hueso y médula ósea.

- Osificación Intermembranosa: Los preosteoblastos se diferencian en osteoblastos.
- Finalmente, el hueso será reabsorbido mediante la estimulación de osteoclastos (mediante la vía RANKL-RANK), finalizando la formación de hueso remodelado.

Esto demuestra que la vascularización juega un papel crucial en la construcción, remodelación y homeostasis ósea. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es esencial durante el desarrollo óseo primario y en la reparación. Una vascularización inadecuada está relacionada con una menor formación de hueso y un mayor riesgo de fracturas o mala consolidación de estas. (42)

En la práctica clínica se están buscando posibles soluciones mediante diversos sustitutos óseos. Estos deben cumplir tres propiedades biológicas importantes: (43)

- Osteoconducción: Capacidad de apoyar la unión de los osteoblastos y células osteoprogenitorias.
- Osteoinducción: Capacidad de inducir a las células primitivas para desarrollar el linaje de células responsables de la formación de hueso.
- Osteogénesis: Osteodiferenciación y posterior formación de hueso nuevo.

El problema de la mayoría de estos sustitutos radica en que no poseen capacidad osteoinductora, es decir, no son capaces de estimular a las células primitivas para desarrollar a los precursores de la formación del hueso (osteoblastos-osteoclastos). Se ha comenzado a investigar la utilización directa en la zona lesionada de factores de crecimiento para mejorar la osteoconducción, es decir, la migración de células precursoras, así como su unión, favoreciendo a su vez una curación natural de la lesión ósea. (43,44)

### ***1.2.3.1. Factor de Crecimiento Endotelial Vascular***

Es uno de los factores de crecimiento más importantes y resulta indispensable para la angiogénesis dentro del tejido óseo, cumpliendo un papel decisivo en la osificación intermembranosa y endocondral.

La familia VEGF, incluye al menos 6 miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placentario. VEGF-A, generalmente denominado VEGF, fue el primero en descubrirse y desempeña un papel fundamental en la angiogénesis y la permeabilidad de los vasos. (45)

VEGF posee 3 tipos de receptores: El tipo 1 y 2 están involucrados en la angiogénesis mientras que el tipo 3 lo está en la formación de vasos linfáticos. El tipo 1 tiene una mayor afinidad por VEGF, pero su actividad tirosina quinasa es menor que la del receptor 2, por lo que los efectos de VEGF se suelen implementar a través de este receptor 2 ya que al tener una mayor actividad tirosina quinasa se previene una actividad excesiva. (46)

VEGF está regulado por otros factores de crecimiento y transcripción, así como hormonas y estímulos mecánicos. Sin embargo, será la hipoxia uno de los más importantes a la hora de inducir la expresión de VEGF. HIF-1 promueve la transcripción de VEGF en situaciones de baja concentración de oxígeno mientras que, en condiciones aeróbicas normales, el supresor VHL degrada a HIF-1. Por tanto, resulta que si se incrementa la degradación de HIF-1 en los osteoblastos, hay una reducción de la expresión de VEGF, interrumpiéndose la angiogénesis y osteogénesis. Por el contrario, la delección de VHL en los osteoblastos aumenta la expresión de HIF-1 y, por ende, de VEGF, aumentando la formación ósea y la angiogénesis. (47)

Sin embargo, la proteína VEGF parece tener una ventana terapéutica estrecha, es decir, que, si la dosis de VEGF es demasiado alta, esto puede provocar vasos malformados y no funcionales y tener un efecto potencialmente tóxico. Además, su vida media es corta (de 4 a 24 h) lo cual hace difícil de usar en el entorno quirúrgico. A pesar de lo mencionado hasta ahora y su teórica capacidad para mejorar la regeneración ósea, especialmente a

través de la osificación endocondral, no se han publicado ensayos clínicos definitivos que apoyen el uso de este factor de crecimiento en este campo. (48)

#### ***1.2.3.2. Endomucina***

Es una glicoproteína de membrana que se expresa en las células endoteliales venosas y capilares, desempeñando un papel importante en procesos biológicos como la interacción y migración celular y la angiogénesis, estando también involucrada en algunas situaciones patológicas. (49)

Tiene un papel importante en la angiogénesis, al modular la vía VEGF a través de su principal receptor de señalización, VEGFR2, cuya fosforilación es importante para el desarrollo de la angiogénesis. Se ha observado que una disminución de ECM reduce la fosforilación de VEGFR2 y, por tanto, la angiogénesis (50).

La angiogénesis está íntimamente relacionada con la osteogénesis, crucial para mantener la integridad y función ósea, ya que ambas se acoplan de manera bidireccional, de tal manera que las células osteogénicas promueven la liberación de factores angiogénicos para favorecer el crecimiento de vasos, mientras que las células endoteliales no solo proporcionan nutrientes y oxígeno al hueso, sino que además son importantes para la remodelación ósea (51,52)

Recientemente se ha demostrado un subtipo capilar asociado a la osteogénesis, denominado vasos H, que se caracterizan por su alta expresión de CD31 y ECM. Estos vasos H están rodeados por osteoprogenitores que expresan, entre otros factores Osx1, promotor de formación ósea al activar la síntesis de osteoblastos. (51)

La ECM además inhibe la adhesión de los leucocitos a los vasos. Niveles bajos de ECM, producidos por un aumento de TNF- $\alpha$ , promueven por el contrario la infiltración de leucocitos en los tejidos favoreciendo la inflamación. (49)

### 1.2.3.3. *Vía BMP*

BMP son factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia de TGF- $\beta$ , una citocina constituida por tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) que comprende diversas proteínas y factores de crecimiento, y que está implicada en trastornos generalizados como la fibrosis, enfermedades cardiovasculares, cánceres hereditarios, alteración en la respuesta inmune y hematopoyética y en la remodelación ósea, particularmente en la correcta regulación entre reabsorción y formación ósea. (53,54)

TGF- $\beta$  es un potente supresor de tumores, deteniendo el ciclo celular en fase G1 e induciendo la apoptosis celular en la fase temprana del tumor. Su implicación en el correcto acoplamiento de la remodelación ósea hace que esté implicada en enfermedades óseas como la osteoporosis, osteogénesis imperfecta o tumores malignos óseos como metástasis o mieloma múltiple. (54,55)

La transducción de señales de TGF- $\beta$  se realiza fundamentalmente a través de la vía canónica (**Figura 10**). En ella, TGF- $\beta$  se une inicialmente a su T $\beta$ RII, que favorecerá la activación de T $\beta$ RI, formando un complejo tetramérico constituido por dos T $\beta$ RI y dos T $\beta$ RII. (55)

T $\beta$ RI activado propaga la señal dentro de la célula fosforilando Smad2 y/o Smad3, que se unirán a Smad4 formando un complejo que se traslocará al núcleo e interactuará con el ADN para regular la expresión de genes. (56)

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. (57)

El complejo Smad 2/3/4 interviene en las células óseas, regulando su supervivencia y, por tanto, la remodelación ósea, al influir en la expresión de la conexina 43, estrechamente relacionada en las uniones gap establecidas en las comunicaciones intercelulares de osteoblastos y osteoclastos. (58)

La vía BMP-2 fue descubierta por Marshall Urist en 1965, y se han identificado ya más de 20 BMP teniendo funciones cruciales en el desarrollo musculoesquelético, cardiogénesis, neurogénesis y formación de los ojos, entre otras. (59,60)

Por su parte, BMP para su transducción de señales interacciona con 2 receptores específicos (tipo I y tipo II) para formar un complejo tetramérico (**Figura 10**). Tras la formación del complejo, se inicia la señalización Smad mediante la activación de Smad 1-5-8 que propagarán su señal mediante la unión a Smad 4 que se traslocará al núcleo y regulará la expresión de genes. En el caso la proteína BMP-2 actuará sobre los factores de transcripción inductores de la osteogénesis (Runx2 y Osx1). Esto constituye la vía canónica de BMP que puede ser inhibida por Smad 6 y 7 y la ubiquitina E3. Existe otra vía no canónica de activación de BMP regulada por MAPK. (61)

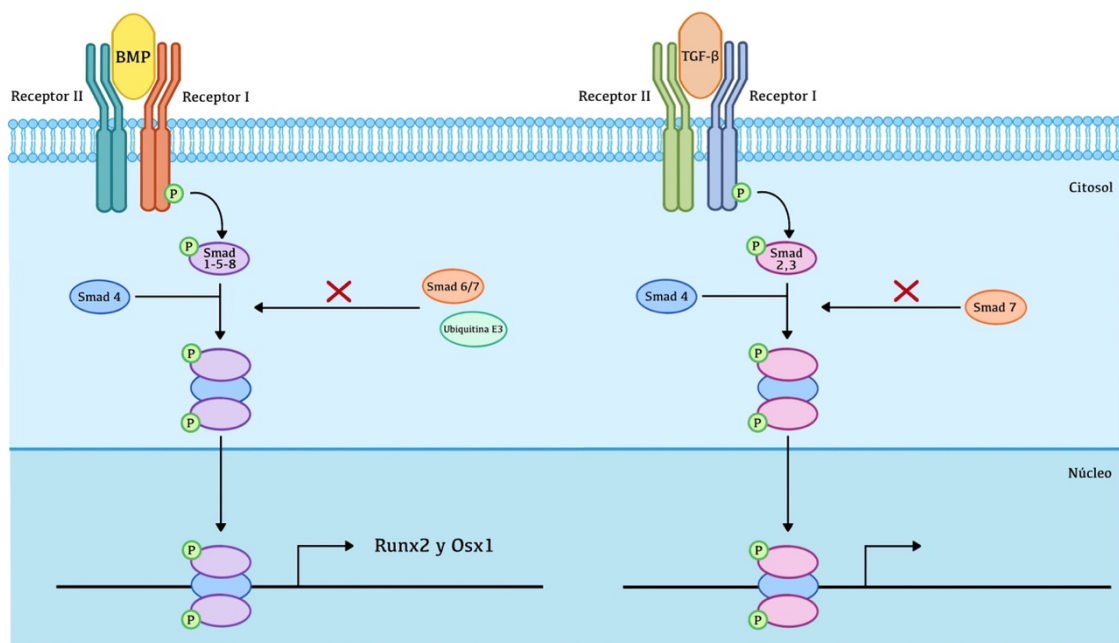


**Figura 10.** Vía canónica de señalización de BMP-2 y TGF-β. (Imagen propia)

Las BMP están implicadas durante el desarrollo esquelético embrionario puesto que son potentes quimioatrayentes y actúan a través de un gradiente de concentración. Inicialmente reclutan células mesenquimales y promueven la morfogénesis esquelética.

Las señales de BMP están estrechamente controladas y las células también expresan antagonista BMP con el fin de establecer un equilibrio en la concentración. (62)

Sin embargo, no todas las BMP son osteogénicas: BMP-2 y BMP-7 son posiblemente los inductores más potentes de la formación de hueso y cartílago mientras que BMP-3 y BMP-13 actúan como inhibidores de BMP. (63)

Requieren un sistema de transporte que mantenga la concentración de BMP y permita una liberación prolongada además de ser biocompatible, permitir la infiltración vascular y resistir a la compresión. Es por ello que los portadores de BMP que se suelen utilizar son polímeros, naturales o sintéticos, materiales inorgánicos (como cerámicas o cementos) o bien una combinación entre ellos. (64)

Las BMP son proteínas pleiotrópicas, es decir, que influyen en al menos una o más vías implicadas en la regeneración ósea, por lo que su difusión a tejidos cercanos puede dar lugar a la formación de hueso ectópico no deseado, resorción ósea e inflamación. Por ello, resulta clave administrar BMP en la cantidad adecuada para conseguir de este modo el efecto deseado en la región donde se encuentra el defecto óseo. (63)

La primera BMP fue identificada en el hueso y se denominó BMP-2, siendo la más estudiada y además uno de los componentes del biomaterial utilizado en este estudio, ya que se ha demostrado que materiales incorporados con BMP-2 pueden inducir la diferenciación osteogénica y la mejora de formación de hueso, a través del reclutamiento de osteoblastos y la angiogénesis. (65)

Es liberada en la matriz ósea y mejora la expansión y diferenciación de MSC en osteoblastos mediante su unión a receptores de serina/treonina activando vías de señalización que finalizan con la activación de genes osteogénicos como Runx2 y Osx1. (59,66)

En 2007, la FDA, aprobó el uso de rhBMP-2 en odontología para procedimientos de injerto en seno maxilar y de injerto óseo. La rhBMP-2 se administra con materiales de injerto óseo sintético o esponjas de colágeno para potenciar la regeneración ósea. Su principal inconveniente radica en la dosis, ya que tiene una vida media corta y alta tasa de eliminación, por lo que se aplica una dosis inicial alta en la zona de la lesión para mantener una concentración eficaz durante el periodo de curación. (67)

Inicialmente rhBMP-2 fue la primera y única alternativa que se introdujo como sustituto del injerto óseo y se creía que era “casi perfecto” para lograr la inducción ósea sin efectos adversos. Sin embargo, el aumento exponencial de su uso se ha asociado con un riesgo de efectos secundarios cada vez mayor, entre los cuales destacan los siguientes (**Tabla 4**) (59,68–70)

**Tabla 4.** Principales efectos adversos tras administración rh-BMP-2

| Efecto adverso                    | Característica                                                                  |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Formación hueso ectópico          | Complicación más frecuente                                                      |
| Activación de osteoclasto         | Fundamentalmente tras cirugías                                                  |
| Complicaciones post-inflamatorias | Formación de seromas                                                            |
| Neuritis periférica               | Complicación postoperatoria común producida por inflamación de la raíz nerviosa |

- Formación de hueso ectópico: Es el efecto adverso más conocido y está asociado a la migración de BMP-2 fuera del implante. Además de por sus propiedades pleiotrópicas, este riesgo se cree que podría ocurrir por una fuga de BMP-2 durante la manipulación manual de la esponja de colágeno.
- Activación de osteoclastos y osteólisis: Se aprecia fundamentalmente en cirugías de columna, siendo uno de los efectos adversos más graves.

- Complicaciones inflamatorias: Estudios in vitro e in vivo han demostrado que BMP-2 induce la inflamación tal y como demuestra un aumento de los niveles de citocinas inflamatorias como IL-1b, IL-6, IL-10 y TNF. Las manifestaciones más comunes incluyen formación de seromas, que aparecen en la primera semana post-operatoria, siendo generalmente asintomático hasta que comprime órganos cercanos y produce dolor o disestesia.
- Neuritis periférica: La radiculitis es un efecto post-operatorio común en las intervenciones a nivel lumbar debido a la inflamación inducida por BMP-2 a nivel de la raíz nerviosa que da como resultado una compresión del nervio radicular.

#### ***1.2.3.4. Papel de la respuesta inflamatoria e inmunitaria en la homeostasis y curación ósea***

Después de una fractura ósea, lo primero que se produce es una respuesta inflamatoria. Tras el trauma, se rompe el vaso sanguíneo, apareciendo un hematoma, generando una red de fibrina que marca el comienzo de la fase inflamatoria al favorecer la migración de PMN proinflamatorios. Estos PMN secretan citocinas proinflamatorias como quimiocina 2 e IL-6, que atraerán a los macrófagos y monocitos los cuales a su vez secretarán más citocinas proinflamatorias: TNF- $\alpha$  e IL-1, entre otras. Posteriormente, será necesaria una respuesta antiinflamatoria para resolver la inflamación; aquí serán liberadas citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ . (71)

Por tanto, la respuesta inflamatoria inicial o aguda favorece la producción de citocinas que aceleran la formación ósea y la curación temprana de la fractura, pero es necesaria una posterior respuesta antiinflamatoria para estimular la proliferación osteoblástica. Por su parte, la respuesta inflamatoria crónica suprime los factores estimulantes osteoblásticos, impidiendo el acoplamiento óseo. (72,73)

### **Células implicadas en la respuesta inflamatoria**

Se detalla de manera resumida el tipo de célula, su origen o fuente celular y su papel en la biología ósea (**Tabla 5**) (27,72–74)

**Tabla 5.** Células implicadas en la respuesta inflamatoria

| <b>Tipo de célula</b> | <b>Fuente celular</b>                               | <b>Papel biología ósea</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-1                  | Monocitos-macrófagos activados.                     | <p>Dos formas: alfa y beta. La forma alfa puede inducir la diferenciación de osteoclastos al estimular la secreción de PGE2. Esto es gracias a la capacidad de IL-1 de regular la expresión de ciclooxigenasas (Cox-1, Cox-2), que son las que sintetizan las prostaglandinas. Por ello, administrar antiinflamatorios no esteroideos, que inhibirán la actividad ciclooxigenasa, trae consigo retrasos en la curación de la fractura.</p> <p>La forma beta, aumenta la reabsorción ósea al favorecer la adherencia de osteoclastos.</p> <p>Hay un pico inicial en las primeras horas para favorecer la liberación de factores proinflamatorios y otro al cabo de semanas para degradar el tejido lesionado.</p> |
| IL-6                  | Osteoblastos, osteoclastos, monocitos y macrófagos. | <p>Por un lado, favorece la activación de osteoclastos mediada por RANKL, pero por otro, estimula la liberación de VEGF para promover la vascularización y además, promueve la expresión de proteínas osteogénicas que estimulan la diferenciación de los osteoblastos como son Runx2 y OCN.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| IL-17                 | Células Th17                                        | <p>Papel controvertido y que necesita más investigación ya que algunos estudios consideran que aumenta la actividad de los osteoclastos, pero se cree que por el efecto indirecto de IL-1, TNF-<math>\alpha</math> y RANKL, mientras que otros estudios creen que actúa de manera sinérgica con BMP-2 y activa los osteoblastos.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| TNF- $\alpha$         | Osteoblasto, monocito y macrófago.                  | <p>Inhibe la osteogénesis y promueve la reabsorción ósea. Por un lado, aumenta la expresión de RANKL por parte de los osteoblastos, activando los osteoclastos y la reabsorción ósea por la vía RANKL-RANK.</p> <p>Por otra parte, disminuye la formación ósea al activar NFkB ya que disminuye la expresión de FGF, TGF-<math>\beta</math>, BMP-2 e inhibe la vía Wnt clásica.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| IFN- $\gamma$         | Monocitos, macrófagos, Células T y Células NK       | <p>Inhibe la señalización RANKL al favorecer la degradación de TRAF-6, impidiendo la activación de NFATC1 y la diferenciación de los osteoclastos.</p> <p>Por otra parte, tiene un efecto regulador sobre los osteoblastos y sus células progenitoras ya que, las MSC, liberan gran cantidad de IFN-Gamma favoreciendo la diferenciación osteogénica.</p> <p>Sin embargo, ante un efecto sinérgico entre IFN-Gamma y TNF-<math>\alpha</math>, NFkB inhibe la diferenciación osteogénica.</p>                                                                                                                                                                                                                     |

### **Células implicadas en la respuesta inmune**

Se detalla de manera resumida el tipo de célula, su papel fisiológico y su función en la biológica ósea (**Tabla 6a y 6b**) (27,74–77)

**Tabla 6a.** Células implicadas en la respuesta inmune

| <b>Tipo de célula</b> | <b>Papel Fisiológico</b>                              | <b>Papel Biología Ósea</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Macrófagos            | Inflamación, fagocitosis y reparación de tejidos.     | <p>Podemos distinguir dos fenotipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Macrófagos activados clásicamente o fenotipo M1</u>: Tras la lesión ósea, los macrófagos se polarizan al fenotipo M1 para secretar factores proinflamatorios como TNF-<math>\alpha</math>, IL-1B e IL-6, ROS. Ayuda a resistir la invasión bacteriana, favorece la presentación de antígenos e inicia la regeneración de tejidos.</li> <li>- <u>Macrófagos activados alternativamente o fenotipo M2</u>: A los 7 días post-lesión, se comienzan a liberar factores antiinflamatorios como IL-4, IL-10 e IL-13 que polarizan los macrófagos hacia el fenotipo M2. Estos son esenciales para la osteogénesis al liberar citocinas como TGF-<math>\beta</math> o BMP-2, mejorando significativamente la regeneración ósea.</li> </ul> |
| Neutrófilos           | Inflamación y fagocitosis.                            | <p>Tras la lesión suelen ser los primeros en migrar al sitio afectado. Desempeñan un papel importante en las primeras etapas de la reparación ósea favoreciendo la expresión de RANKL, aumentando la actividad de los osteoclastos y, por ende, la reabsorción ósea.</p> <p>Además, secretan mediadores inflamatorios y quimiotácticos como IL-6.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Células dendríticas   | Inflamación, fagocitosis y presentación de antígenos. | <p>Su contribución a nivel de la osteoinmunología es doble:</p> <p>Por un lado, pueden diferenciarse a osteoclastos y mejorar su actividad a través de la vía RANKL-RANK al interactuar con células T.</p> <p>Por otra parte, pueden liberar citocinas pro o antiinflamatorias como IL17 o IL4</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Eosinófilos           | Inflamación y respuesta alérgica.                     | <p>Son la principal diana de la IL-31, una citocina proinflamatoria que activa la vía de señalización MAPK, que participaba en el eje RANKL-RANK, favoreciendo la síntesis de factores de transcripción para activar los osteoclastos.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

**Tabla 6b.** Células implicadas en la respuesta inmune

| Tipo de célula | Papel Fisiológico                                              | Papel Biología Ósea                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mastocito      | Inflamación y respuesta alérgica.                              | Activa la osteoclastogénesis mediante la producción de TNF- $\alpha$ e IL-6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Células T      | Componente de la inmunidad adaptativa.                         | <p>Producen diversas citocinas y factores de crecimiento, jugando un papel clave en la remodelación y regeneración ósea en función del subgrupo en el que se dividan.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Célula Th1/Th2</u>: Th1 activa la función de los osteoclastos y la reabsorción ósea mediante la secreción de TNF-<math>\alpha</math> y activación de RANKL, mientras que Th2 libera IL-4, IL-10 e inhibe TRAF-6, inhibiendo la diferenciación de los osteoclastos.</li> <li>- <u>Célula Th17</u>: Apoya la osteoclastogénesis mediante la liberación de IL-17 que induce la expresión de RANKL, así como el aumento de TNF-<math>\alpha</math> e IL-1.</li> <li>- <u>Célula Treg</u>: Secretan citocinas como IL-4 y TGF-<math>\beta</math> que contribuyen a una mejor cicatrización, capacidad osteogénica y regeneración ósea, disminuyendo la reabsorción.</li> </ul> |
| Células B      | Secretan anticuerpos y presentan antígenos a los linfocitos T. | A pesar de que en la remodelación ósea su papel parece mínimo, son esenciales para mantener un microambiente óptimo ya que son la principal fuente de OPG en el tejido óseo, para de ese modo bloquear el sistema RANKL-RANK y evitar la activación de los osteoclastos.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

La fase inflamatoria se resuelve en gran parte por el cambio de fenotipo que sufren los macrófagos, ya que inicialmente el fenotipo M1 favorece la debridación de la herida mediante la liberación de proteasas, pero posteriormente, el fenotipo M2 promueve el depósito de colágeno, factores de crecimiento angiogénicos o BMP-2. (72)

Una quimiocina importante, por su implicación en la respuesta inflamatoria e inmunitaria, es RANTES/CCL5.

En condiciones normales, la cantidad/concentración de RANTES/CCL5 es baja o prácticamente inexistente, sin embargo, si existe un proceso inflamatorio, aumenta significativamente dependiendo de la intensidad de la respuesta inflamatoria. En consecuencia, ante un estímulo inflamatorio que persiste en el tiempo e induce respuesta inflamatoria, se produce un aumento en la liberación de RANTES/CCL5 (78).

Posee receptores como CCR1, CCR3 y CCR5, pudiendo reclutar células al foco inflamatorio. Está elevada en diversas enfermedades que implican pérdida ósea como la artritis reumatoide, osteoporosis y metástasis óseas (79).

### **1.3. ALTERACIONES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA**

#### **1.3.1. OSTEOPOROSIS**

La osteoporosis es una enfermedad esquelética caracterizada por una disminución de la masa y tejido óseo lo cual se asocia a una mayor fragilidad y riesgo de fractura de los huesos. Es una de las principales amenazas del envejecimiento, aumentando su prevalencia en personas mayores de 50 años: 30% en mujeres frente a 15% en hombres. (80)

Su complicación más frecuente son las fracturas, aumentando la mortalidad, morbilidad y los costes médicos tanto directos como indirectos. En Estados Unidos y Europa, las fracturas vinculadas con la osteoporosis son más frecuentes en las mujeres probablemente debido a la pérdida de masa ósea derivada de la menopausia. Un estudio sugirió que se espera que en 2025 el número de fracturas anuales a causa de la osteoporosis suponga 4,5 millones de casos suponiendo esto un gasto estimado de 21.000 millones de euros. (13,80)

Los fallos en el proceso de la remodelación ósea llevan a una pérdida de hueso y a osteoporosis. Esta remodelación tiene dos funciones principales: reparar una lesión dentro del esqueleto conservando así su fuerza, y obtener calcio del hueso para mantener las concentraciones séricas.

Requiere, por tanto, de una integración y coordinación de osteocitos, osteoblastos y osteoclastos ya que una reabsorción excesiva por parte de los osteoclastos ante una demanda crónica de calcio puede evolucionar a una situación de osteopenia.

La IL-6 juega un papel esencial en la fisiopatología de la osteoporosis por ser un inductor de la reabsorción ósea mediante la producción de RANKL, que al interactuar con RANK localizado en los osteoclastos favorece la activación de estos con la consiguiente destrucción ósea. Además, no solo favorece la erosión y degeneración ósea, sino que produce una inflamación y engrosamiento sinovial causando un daño irreversible en la articulación. Por tanto, la inhibición de IL-6 parece minimizar el daño articular y óseo. (81)

No solo el aumento de actividad de los osteoclastos favorecerá la aparición de osteoporosis: una disminución de la formación ósea por inhibición de la actividad de los osteoblastos también induce osteoporosis. Esto sucede de forma iatrogénica ante una administración excesiva de glucocorticoides que, además de inhibir a los osteoblastos, generan una síntesis de osteoclastos excesiva. (81)

El objetivo fundamental es la prevención de las fracturas. Se pueden utilizar dos tipos de terapias: dirigidas a evitar la resorción ósea mediada por los osteoclastos, o bien orientadas a fomentar la actividad osteoblástica.

Los medicamentos más utilizados son los antirresortivos, que reducen la tasa de remodelación ósea al inhibir la actividad de los osteoclastos y, por tanto, la resorción ósea. Entre ellos se pueden distinguir (**Tabla 7, página 37**):

- **Bifosfonatos: Alendronato y Risedronato.** Inhiben la resorción ósea inactivando los osteoclastos. Son los fármacos más utilizados para prevención y tratamiento y se asocia con reducción del 40-70% de fracturas vertebrales y el 40-50% de fracturas de cadera. Como principal efecto adverso destaca el riesgo de fractura atípica de fémur y de mandíbula. (6,7,82)

- **Estrógenos: Acetato de Medroxiprogesterona.** Diversos estudios sobre el efecto de la terapia hormonal con estrógenos en mujeres postmenopáusicas han mostrado una evidencia convincente sobre su acción beneficiosa para preservar el volumen y la estructura ósea y así disminuir el recambio óseo. Sin embargo, en el estudio WHI se documentó efectos adversos cardiovasculares y aumento de riesgo de cáncer de mama, por lo que actualmente se utiliza para prevención de sofocos menopáusicos. (82,83)
- **Moduladores selectivos del receptor de Estrógeno (SERM): Raloxifeno.** Posee los efectos antirresortivos de los estrógenos, pero como ventaja no actúa a nivel de la mama, de hecho, se ha asociado con disminución del cáncer de mama, sin embargo, se asocia con un aumento de la incidencia de sofocos y tromboembolismos venosos. Reduce el riesgo de fracturas vertebrales, pero no de las no vertebrales. (7,82,84)
- **Calcitonina:** Hormona que se encuentra en la superficie de los osteoclastos y evita que los precursores de estos maduren. Por tanto, reduce la resorción ósea y, además, se ha asociado con efectos analgésicos. Debido a su limitada eficacia para prevención de fracturas frente otros fármacos y su mayor riesgo de cáncer tras un uso prolongado, raramente es utilizada en la actualidad. (82,84)
- **Denosumab:** Es un anticuerpo humano contra RANKL que inhibe la formación y función de los osteoclastos. Es considerado el antirresortivo más potente. En un estudio aleatorizado se observó que tras la administración a casi 8000 mujeres post-menopausicas con osteoporosis de Denosumab Subcutáneo (Prolia®), se aumentó la densidad ósea en un 9,2 % en columna y 6% en cadera frente al uso de placebo. Se debe administrar cada 6 meses pudiendo completarse con calcio y vitamina D vía oral. En el estudio FREEDOM, las biopsias realizadas tras el tratamiento mostraron una reducción significativa de la superficie erosionada y el número de osteoclastos. Sus efectos secundarios son poco frecuentes, pudiendo aparecer afectaciones cutáneas como celulitis. (6,7,82–84)

Además de estas técnicas antirresortivas, cabe mencionar las terapias anabólicas (**Tabla 8, página 37**), que tienen un funcionamiento diferente. En lugar de reducir la actividad de la remodelación ósea, lo que hacen es aumentar la cantidad de hueso formado, es decir, que en cada remodelación la cantidad de hueso formado supere la cantidad de hueso eliminado. (83)

En este grupo de terapias anabólicas podemos destacar:

- **Teriparatida:** primer tratamiento anabólico aprobado para la osteoporosis y que se trata de un análogo de la hormona paratiroidea (PTH) cuya administración o producción continuada produce un efecto catabólico y de destrucción de hueso, pero si se administra de manera intermitente y a pequeñas dosis favorece el efecto anabólico. (6,82,84)

Los efectos secundarios de la Teriparatida son poco frecuentes, pudiendo incluir náuseas, dolor de cabeza y mareos y, en ocasiones, hipercalcemia e hipercalciuria transitoria. (7)

- **Romsozumab:** Se trata de un anticuerpo monoclonal formador de hueso que se une a la esclerostina (proteína que inhibe la vía de señalización Wnt asociado esto a una menor formación de hueso) y la inhibe. En un ensayo controlado aleatorizado tras 1 año de tratamiento con Romsozumab, se observaron menos fracturas vertebrales frente a pacientes con placebo o con uso de alendronato (bifosfonato). (7,85)

Sin embargo, a pesar del creciente número de medicamentos eficaces para tratar la osteoporosis, la evidencia sugiere que muchos pacientes que deberían recibir el tratamiento no se les ofrece, mientras que a otros que se les prescribe no lo toman bien, ya sea por el miedo a los efectos secundarios o por dudas en referencia a la eficacia a largo plazo. Si está establecido que, en pacientes en tratamiento, el riesgo de fracturas atípicas, sobre todo de fémur, aumenta tras un uso de la medicación de forma continuada, por lo que se recomienda la reevaluación al cabo de 3-5 años. (6,7,82)

Los principales fármacos antirresortivos y anabólicos y sus funciones y limitaciones se resumen en la **Tabla 7 y 8**.

**Tabla 7. Fármacos Antirresortivos**

| Fármaco Antirresortivo                            | Función                                                                       | Limitaciones                                          |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Bifosfonatos                                      | Inhibición de la reabsorción ósea inactivando al osteoclasto. Es el más usado | Riesgo de fractura atípica de fémur y mandíbula       |
| Estrógenos                                        | Preserva volumen óseo                                                         | Aumenta el riesgo cardiovascular y cáncer de mama     |
| Moduladores selectivos del receptor de estrógenos | Preserva volumen óseo sin aumentar riesgo de cáncer de mama                   | Aumento de sofocos y riesgo de tromboembolismo venoso |
| Calcitonina                                       | Evita la maduración de precursores de osteoclastos                            | Menor prevención de fracturas frente otros fármacos   |
| Denosumab                                         | Ac frente RANKL, inhibiendo la formación de osteoclasto.<br>Es el más potente | Escasas limitaciones                                  |

**Tabla 8. Fármacos Anabólicos**

| Fármaco Anabólico | Función                                                                              | Limitaciones                                                           |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Teriparatida      | Análogo de la PTH que administrado de manera intermitente favorece la formación ósea | Ocasionalmente náuseas, dolor de cabeza, hipercalcemia e hipercalcemia |
| Romosozumab       | Ac monoclonal que se une a la esclerostina y la inhibe                               | Escasas limitaciones                                                   |

### 1.3.2. FRACTURAS

Las fracturas son la forma más común de trauma hospitalario, suponiendo elevados costes tanto por la atención médica como por la pérdida de productividad tras la lesión. El tratamiento es complejo y los riesgos de consolidación defectuosa son altos, disminuyendo la calidad de vida del paciente e incrementando costes en los posteriores tratamientos. (86)

Dentro de las fracturas, las fracturas por fragilidad son las más frecuentes, afectando fundamentalmente a la población anciana, concretamente a las mujeres. Surgen tras traumatismos de baja energía en las actividades diarias y tienen como principal factor de riesgo la osteoporosis, afectando generalmente a la cadera, causando una mortalidad muy elevada. (87)

Si la reparación de la fractura ósea se extiende por más de 9 meses, sin signos de reparación durante 3 meses consecutivos, se hablaría de pseudoartrosis, una de las complicaciones más frecuentes que pueden aparecer, y que incluye como factores de riesgo fracturas abiertas, mala estabilización, infección quirúrgica o factores propios del paciente (tabaquismo, alteraciones metabólicas, medicación etc.). (88,89)

Por tanto, al ser un problema de salud pública debido a la morbilidad y los costes, lo ideal sería tener la capacidad para predecir y prevenir las fracturas, sin embargo, esto es limitado. Los enfoques actuales se basan en la medición de la DMO y calculadoras de riesgo como FRAX, QFRACTURE y calculadora Garvan, todos ellos con valores pronósticos escasos. (90)

Por ello, se ha comenzado a investigar en biomarcadores de recambio óseo que reflejan la formación y reabsorción ósea y, por tanto, informan sobre el estado de la remodelación ósea. La bALP y el péptido tipo IN de procolágeno PINP se utilizan para valorar la osificación ósea, mientras que los bCTx y los NTx se usan para la reabsorción ósea. La ventaja es su fácil recolección (mediante muestras de sangre), pero su inconveniente es que, a pesar de sus resultados prometedores, aún son necesarios más estudios para poder utilizarlos de manera estandarizada. (87,90)

Respecto a la modulación de la reparación de las fracturas se puede comenzar mencionando la vía de señalización Wnt canónica o dependiente de la B-Catenina, cuya activación y acumulo de B-Catenina favorecía la osteogénesis. Se están investigando anticuerpos dirigidos específicamente frente a la esclerostina, que inhibe esta vía para aumentar la señalización Wnt canónica y promover la formación de callo de fractura y la reparación ósea. Otro punto importante son las BMP, pero en este caso los esfuerzos en la investigación no van dirigidos a actuar frente a los antagonistas, como si sucede en la Wnt, sino en ser capaces de llevar estas BMP al punto exacto de la lesión para evitar así la formación de hueso ectópico, que es su principal limitación. Por último, está siendo investigado también el PGF, por ser un potente angiogénico y la capacidad de quimiotaxis que permite el reclutamiento de células mesenquimales. (88)

### 1.3.3. ENFERMEDAD DE PAGET

Es una enfermedad caracterizada por un aumento de la reabsorción ósea, por activación anormal de los osteoclastos, seguido de una fuerte y excesiva formación compensatoria de hueso, por lo que, a pesar de estar presente el recambio óseo, este se produce de manera anómala dando lugar a una arquitectura ósea desfavorable con un aumento de la vascularización mediada fundamentalmente por VEGF y PGF. (11)

Se ha observado que los pacientes con Enfermedad de Paget tienen niveles más altos de RANKL y más bajos de OPG, favoreciendo la activación de los osteoclastos. El ácido zoledrómico es un bifosfonato en estudio que se administra por vía intravenosa y disminuye RANKL y aumenta OPG, dando como resultado una inhibición de la reabsorción ósea. (91)

Los bifosfonatos, además, son el tratamiento de elección para actuar sobre el dolor óseo, principal síntoma y más limitante de esta enfermedad, destacando en una revisión que, el ácido zoledrómico parece ser el de elección también en esta situación. (92)

#### 1.3.4. OSTEOMALACIA

Se trata de una enfermedad ósea metabólica, que representa el déficit nutricional más común entre niños y adultos, y cursa con una mineralización osteoide anormal por déficit de Vitamina D con un aumento de la fragilidad ósea. Para mantener los niveles séricos de calcio, éste debe obtenerse de los huesos, por lo que una hormona fundamental será la PTH, que favorecerá la reabsorción ósea y así aumentar sus niveles en sangre. Esto puede contribuir a una disminución generalizada de la densidad mineral ósea y a un aumento de la APL por un hiperparatiroidismo secundario a la osteomalacia. (93,94)

Respecto al tratamiento, es fundamental establecer la etiología lo primero (en ocasiones puede estar asociado un tumor). Una vez identificada, el tratamiento irá dirigido a corregir las deficiencias de vitamina D mediante la administración de Ergocalciferol (vitamina D2) o Colecalciferol (vitamina D3). (93)

#### 1.3.5. OSTEOGENESIS IMPERFECTA

La osteogénesis imperfecta es una displasia esquelética rara caracterizada por fragilidad y deformidad ósea, con alta prevalencia de fracturas, alteración del crecimiento y otra clínica como esclerótica azul y alteración de la función respiratoria y auditiva. (95)

La mayoría de los pacientes que la sufren tienen mutaciones autosómicas dominantes en los genes COL1A1 y COL1A2 que codifican las cadenas  $\alpha 1$  y 2 respectivamente de colágeno. Esta alteración en la producción del colágeno es la causa fundamental de la fragilidad y deformidad ósea. (96)

Una mutación importante, y relacionada con la remodelación ósea, es la que sucede de forma homocigota en Wnt1, que promueve en condiciones normales la osteoblastogénesis. Estudios en ratones con delección específica de Wnt1, tienen una menor expresión de osteoblastos, una menor masa ósea y con ello mayor fragilidad ósea y riesgo de fractura, por lo que la actuación frente a esta vía está siendo muy utilizada ya no solo para la osteoporosis, sino para otras muchas patologías óseas, actuando frente al inhibidor de esta vía, que es la esclerostina, mediante el uso de Romosozumab. (97,98)

## **1.4. TRATAMIENTO DE LAS ALTERACIONES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA**

### **1.4.1. CÉLULAS MADRE**

Las terapias basadas en células madre son cada vez más importantes en el tratamiento de enfermedades crónicas y de larga duración, y podrían permitir una medicina regenerativa curativa y personalizada. (84)

Las MSC derivan del mesodermo embrionario y existen en diversos tejidos como médula ósea, sangre del cordón umbilical, placenta, tejido adiposo etc. Cumplen un papel vital en la homeostasis esquelética y reparación ósea, ya que las MSC que se encuentran en la médula ósea guían la diferenciación de los preosteoblastos mediante factores de transcripción Runx2 y Osx1 hacia osteoblastos que posteriormente maduraran en osteocitos contribuyendo a la formación de hueso. (99–101)

Las MSC además de reponer los osteoblastos, regulan los adipocitos. Una proporción desequilibrada entre ambos puede desembocar en osteoporosis y proporción aumentada de grasa en la médula ósea. El deterioro en la remodelación del tejido adiposo puede desembocar en una resistencia a la insulina asociada con obesidad y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. (102)

Se ha investigado fundamentalmente en la regeneración y reparación ósea las BMMSC, que poseen una gran capacidad osteogénica y que parece que favorecen el fortalecimiento de los huesos osteoporóticos, aumentando la densidad ósea y el volumen trabecular del hueso, además de liberar factores antiinflamatorios y tener efectos inmunomoduladores. (101)

Sin embargo, se están investigando otras vías que parecen ser igual o más eficaces que las BMMSC como son las ASC, que poseen capacidad antiinflamatoria y protegen la formación ósea inhibiendo la adipogénesis y, además, son mucho más fáciles de obtener por la gran cantidad de tejido adiposo disponible en el cuerpo y la facilidad para aislarlo y extraerlo. En una dirección similar se encuentran las DPSC, que poseen una mayor capacidad osteogénica que las BMMSC. Las DPSC han mostrado una mayor afinidad a la hora de regenerar tejidos craneofaciales por su mismo origen embriológico y patrones de expresión génica similar. (101,103)

Inicialmente la terapia celular se centró en utilizar MSC en el sitio dañado para que se diferenciara en osteoblastos y reparara el tejido degenerado. Sin embargo, el mecanismo de acción más utilizado se basa en su capacidad de secretar factores que modifican el entorno y reclutan células para reparar el tejido dañado. (104)

Por tanto, las terapias celulares basadas en MSC se centran en la mejora de la osteoinducción, dependiendo el éxito de la regeneración de la viabilidad celular y del injerto en el tejido lesionado. (100)

#### 1.4.2. INJERTOS ÓSEOS

La capacidad de curación del hueso puede encontrarse disminuida o ser insuficiente cuando el defecto óseo es grande. Por ello, han surgido alternativas como es el caso de los injertos óseos naturales o sintéticos (biomateriales) con la finalidad de acelerar la regeneración ósea y disminuir en lo posible las comorbilidades derivadas de la lesión.

El injerto óseo natural es uno de los métodos quirúrgicos más utilizados para aumentar la regeneración ósea, realizándose casi 2 millones de injertos anuales, siendo el segundo trasplante más frecuente tras la transfusión de sangre. (43)

Como se ha mencionado anteriormente, los sustitos óseos deben cumplir tres propiedades biológicas importantes: osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. (43)

Dentro de los injertos naturales podemos distinguir 3 tipos en función del origen del tejido: autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto (**Tabla 9, página 46**).

#### ***1.4.2.1. Autoinjerto***

Es el método preferido, sobre todo en defectos óseos muy grandes. Se considera el mejor por estar libre de riesgo de transmisión de enfermedades y rechazo autoinmune, además de por sus propiedades osteogénicas, osteoconductivas y osteoinductivas, así como por conservar las mismas características de regeneración y remodelación del hueso. Su fuente de obtención fundamental es la cresta iliaca por su cantidad relativamente alta de hueso disponible, sin embargo, su utilidad está limitada por la morbilidad generada en el sitio de recolección: infección, hematoma, lesión nerviosa y vascular. (40,105–107)

Se distinguen dos tipos de autoinjertos: (43,108)

- *Autoinjerto de Esponjosa:* Es la forma más utilizada de injerto autólogo. Se caracteriza por poseer pocos osteoblastos y osteocitos, pero abundantes MSC, lo cual permite mantener el potencial osteogénico y la capacidad de generar hueso nuevo. Inicialmente tras el trasplante se forma un hematoma que, junto con un estado inflamatorio, favorece el reclutamiento de MSC para depositar tejido de granulación fibroso. Posteriormente, los macrófagos eliminarán el tejido necrótico, comenzando la neovascularización y producción osteoblástica, mineralizándose en los siguientes 6-12 meses para formar el nuevo hueso.
- *Autoinjerto cortical:* En este caso la sustitución progresiva de hueso está mediada por osteoclastos. El crecimiento óseo por aposición sobre un núcleo necrótico seguido de la resorción mediada por osteoclastos es la forma de incorporación del autoinjerto. Este proceso puede llevar años.

A pesar de ser la técnica de elección y sus beneficiosas propiedades para la regeneración ósea, su limitada disponibilidad ósea, así como las desventajas que lleva asociadas, tales como el dolor, lesiones vasculares-nerviosas y la morbilidad en los puntos quirúrgicos, hace que esta estrategia se reserve para número limitado de casos. (40,106)

#### ***1.4.2.2. Aloinjerto***

La principal alternativa a un autoinjerto, en pacientes con escaso potencial de cicatrización, superficie extensa de fracturas y artrosis establecida es el aloinjerto: tejido óseo que se extrae de un donante vivo compatible o de fuentes cadavéricas de la misma especie, pero genéticamente diferente. (43,107,109)

En este caso se puede obtener mayor cantidad de tejido en comparación con un autoinjerto y, debido a los protocolos de recolección y almacenamiento, el riesgo de transmisión y enfermedades no es muy elevado. No obstante, presenta una menor osteoinducción y un riesgo mayor de inmunorreacciones, transmisión de infecciones y de rechazo del injerto, frente al trasplante autólogo. (105,106)

La mayor tasa de fracaso de este tipo de injerto viene determinada por su capacidad inmunógena que activa los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad.

El procesamiento del material es mediante liofización, un proceso de deshidratación que permite aumentar la vida útil del material y disminuir su inmunogenicidad pero que por otra parte disminuye el potencial osteoinductivo, la resistencia estructural y la osteointegración. (43,108,109)



#### ***1.4.2.3. Xenoinjerto***

Un Xenoinjerto o injerto heterólogo consiste en la utilización de tejidos procedentes de especies no humanas, generalmente tejidos animales no viables. (110,111)

El Xenoinjerto más utilizado es mineral óseo bovino desproteinizado, conocido comercialmente como Bio-Oss. El hueso esponjoso bovino se usa ampliamente debido a su similitud en composición y porosidad con el humano. Este material es sometido a una serie de procedimientos químicos escalonados que tienen como finalidad la producción de HA, que contiene solo componentes inorgánicos del hueso bovino y conserva la arquitectura porosa, proporcionando un buen soporte mecánico y estimulando la curación y crecimiento del hueso a través de la osteoconducción y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos gracias a la angiogénesis. Durante este proceso no se elimina por completo el riesgo de transmisión de enfermedades bovinas (por ejemplo, la encefalopatía espongiiforme) ni el rechazo del injerto, pero se reduce de forma significativa su riesgo. (109–111)

La disponibilidad de estos xenoinjertos es teóricamente ilimitada cuando se procesan correctamente. No obstante, existe riesgo de transmisión de zoonosis, siendo esta una de sus principales restricciones junto con su limitada capacidad de incorporarse al hueso nativo debido al riesgo de rechazo por parte del huésped. (105,106)

**Tabla 9.** Principales características de los injertos óseos

| <b>Tipo</b> | <b>Ventaja</b>                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Limitación</b>                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Autoinjerto | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No hay rechazo autoinmune</li> <li>- Favorece remodelación y regeneración ósea por tener buena propiedad osteogénica, osteoconductiva y osteoinductiva</li> <li>- 2 posibles autoinjertos: esponjosa o cortical</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- La disponibilidad ósea, ya que la principal fuente de obtención es la cresta ilíaca, pudiendo aparecer lesiones nerviosas, vasculares o infección en el punto de extracción</li> </ul>                                 |
| Alloinjerto | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Posibilidad de obtener una mayor cantidad de tejido</li> </ul>                                                                                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Riesgo de rechazo del injerto, inmunoreacción y transmisión de enfermedad o infección</li> <li>- Menor osteoinducción por ser sometido a procedimientos de deshidratación para disminuir la inmunogenicidad</li> </ul> |
| Xenoinjerto | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disponibilidad de tejido prácticamente ilimitada</li> <li>- Buen soporte para el crecimiento de nuevo hueso y vasos</li> </ul>                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Riesgo de transmisión de enfermedades de origen animal</li> <li>- Riesgo de rechazo del injerto</li> </ul>                                                                                                             |

### 1.4.3. BIOMATERIALES

Los biomateriales se desarrollaron para superar las desventajas de los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, surgiendo como una rama de la ingeniería debido a las crecientes necesidades de materiales de injerto y con la finalidad de proporcionar una forma prometedora de reparar y regenerar los tejidos dañados al imitar el perfil estructural y funcional de la matriz extracelular natural. (112–114)

Para su aplicación, todos los materiales deben tener unas características específicas:  
(105,113,115)

- **Biocompatibilidad:** Capacidad del material para funcionar sin una respuesta inmune del huésped, es decir, debe ejercer su función sin causar efectos nocivos a nivel local o sistémico.
- **Biodegradabilidad o Reabsorbilidad:** Capacidad del biomaterial para descomponerse cuando se forma el hueso nuevo.
- **Características estructurales específicas:** La configuración tridimensional unido a una adecuada porosidad (debe ser abundante para favorecer la penetración celular), tamaño y forma de los poros resultan clave para mantener la viscoelasticidad del hueso.
- **Osteoinducción y Osteoconducción:** El mantenimiento de las propiedades osteoinductoras y osteoconductoras debe ser adecuado para estimular la proliferación celular.
- **Favorecer Angiogénesis:** Fundamental ya que se necesitan vasos para transportar nutrientes y oxígeno y eliminar los productos de desecho del hueso en desarrollo.

Las principales limitaciones que se encuentran en su uso vienen marcadas por la dificultad de desarrollar un biomaterial que tenga todas las características anteriormente expuestas. A menudo la conexión entre el biomaterial y el hueso puede generar un estrés que dificulta la reabsorción ósea a largo plazo. También puede haber interacciones inadecuadas por la porosidad y las propiedades de la superficie dificultando la comunicación celular y el crecimiento del tejido. (115)

En función del origen del biomaterial empleado se distinguen dos grupos: Naturales y Sintéticos.

#### ***1.4.3.1. Biomaterial Natural***

##### **Derivado coralino**

Los sustitutos óseos se obtienen del exoesqueleto de determinados corales marinos que poseen una estructura porosa, constituida de carbonato cálcico en forma de aragonito, similar a la del hueso esponjoso humano con un gran potencial osteoconductor que favorece el depósito de hueso nuevo rápidamente tras la implantación. Ese esqueleto de carbonato cálcico posee la capacidad de convertirse en hidroxiapatita. (111)

Para obtener biomateriales, el coral debe ser sometido a altas temperaturas, conservando una porosidad organizada, permeable e interconectada al mismo tiempo que se obtiene la hidroxiapatita cálcica. (110)

#### ***1.4.3.2. Biomaterial Cerámico***

Las cerámicas son compuestos inorgánicos no metálicos que poseen una gran rigidez y que son muy utilizados como biomateriales de reemplazo óseo. Por sí solos no poseen actividad osteogénica, pero al entrar en contacto con el hueso sano, se forma tejido osteoide que posteriormente mineraliza favoreciendo la adquisición gradual de una resistencia similar a la del hueso. Se pueden dividir en cerámicas bioinertes y bioactivas. (111,113)

Las cerámicas bioinertes, como la albúmina y la zirconia, inducen inmunoreacción y pueden formar una capa fibrosa en el hueso, por lo que no se consideran un material recomendable. (113)

Las cerámicas bioactivas, por su parte, poseen la ventaja de tener una buena osteoconductividad (capacidad de unirse al hueso) y de ser biocompatibles con el cuerpo humano, así como resistentes a la compresión y corrosión. Sin embargo, su fragilidad y baja resistencia son algunas de sus limitaciones. Los biomateriales cerámicos activos más comunes se componen HA, CaP y TCP. (112,113)

### **Hidroxiapatita**

Biomaterial de fosfato cálcico muy utilizado para aplicaciones de regeneración ósea ya que posee una composición y estructura similar a la matriz inorgánica del hueso y es la forma más estable de fosfato de calcio. (109,110,113)

Puede disolverse en fluidos corporales y no provoca reacción inflamatoria, además es osteoconductora y osteoinductora gracias a la liberación de iones de calcio y fosfato lo cual favorece la diferenciación de osteoblastos promoviendo la formación de hueso. (113)

Sin embargo, a pesar de estas características favorables de la HA como biomaterial óseo, posee algunas deficiencias como su baja capacidad de degradación, ya que es una de las formas más estables de fosfato cálcico, llegando incluso a considerarse no degradable. Además de esta dificultad en la degradación, sus propiedades mecánicas son débiles, lo cual incluye una baja resistencia a la tracción dificultando su uso para aplicaciones de alta carga. Por ello, no se utiliza por si sola para formar armazones, sino que va asociada a otros productos (polímeros, fosfato tricálcico etc.). La HA sola se utiliza como recubrimiento de implantes ya que aumenta el área ósea y favorece la actividad osteoblástica. (43,109,111,113)

Estos inconvenientes pueden ser superados gracias al desarrollo de HA nanocrystalina que proporciona una mayor superficie la cual no solo redujo la temperatura de sintetización de la cerámica, sino que aumentó la reabsorción gracias a las mejoras en las propiedades osteoregenerativas y a su mayor parecido a la matriz extracelular ósea. (43)

### **Fosfato Tricálcico**

En los últimos años se ha investigado ampliamente su utilidad como sustituto óseo. Posee dos formas, una alfa y una beta ( $\beta$ -TCP), mostrando esta última una buena compatibilidad y osteoconductividad. Se usa normalmente como relleno permitiendo el reemplazo con hueso recién formado. (110)

Frente a la HA, considerada prácticamente como no reabsorbible,  $\beta$ -TCP se reabsorbe gradualmente y de forma lenta (aproximadamente 13 a 20 semanas tras su implantación) pero será reemplazada por completo por hueso remodelado. Además, posee poros interconectados que pueden acelerar la remodelación ósea al permitir la presencia de células osteogénicas y nutrientes. (116)

Como principal inconveniente cabe destacar que es frágil y tiene una resistencia a la tracción baja, por lo que suele mezclarse con otros biomateriales para asemejarlo lo máximo posible al tejido óseo natural.

### **Fosfato de calcio Bifásico**

Se trata de una mezcla de HA y  $\beta$ -TCP que combina la biodegradabilidad de  $\beta$ -TCP con la biocompatibilidad, osteoconductividad y osteoinductividad de ambos. Además, posee una mayor estabilidad a largo plazo para el establecimiento y mantenimiento del nuevo tejido óseo gracias a la no reabsorción de HA. (111,113)

La reabsorción y osteoconductividad de estas cerámicas bifásicas se pueden ir controlando mediante la relación HA/  $\beta$ -TCP, de tal modo que una proporción más elevada de HA dará lugar a una reabsorción más lenta pero mejores propiedades mecánicas, mientras que una proporción más elevada de  $\beta$ -TCP favorecerá una reabsorción más rápida, pero ofrecerá una menor resistencia.

### **Vidrio Bioactivo**

El vidrio bioactivo o biovidrio describe un grupo de cerámicas sintéticas a base de silicato. Se ha ido mejorando para lograr una mayor estabilidad y unión mediante la incorporación de agentes de óxido que acumula iones de silicio y desarrolla una capa de HA en la superficie tras entrar en contacto con fluidos corporales y sufrir una disolución iónica, para atraer células osteoprogenitoras, siendo sustituido progresivamente por hueso nuevo. (44,109)

Entre sus ventajas destaca su porosidad y rápida tasa de reabsorción en las dos primeras semanas, siendo completa a los 6 meses. Entre sus limitaciones se encuentran sus propiedades mecánicas débiles y tiende a ser frágil, por lo que cuando se utiliza suele ir asociado a factores de crecimiento para reconstrucción de defectos faciales. (43,44)

### **Vitrocerámicas**

Otra familia de biomateriales, pero con mejores propiedades son las vitrocerámicas. Se trata de cerámicas policristalinas, compuestas por apatita, cristales de silicatos (como la wollastonita) y una fase vítrea residual. Surgen con motivo de mejorar las propiedades térmicas y mecánicas de los vidrios bioactivos. Presentan una superficie irregular lo que favorece la formación de enlaces químicos fuertes con el hueso aledaño. (117)

#### ***1.4.3.3. Biomaterial en forma de Cemento***

Este tipo de biomaterial se encuentra en forma de pasta y es implantado directamente en la zona donde se encuentra la lesión a corregir, adoptando de forma inmediata la morfología del defecto a regenerar mediante la cristalización de sus componentes.

Esta pasta inyectable se obtiene de mezclar polvo de fosfato cálcico (puede ser HA, B-TCP o fosfato dicálcico dihidratado, denominado brushita) con una solución acuosa. (111)

### **Cementos de Fosfato de Calcio**

Fueron desarrollados en 1986 por Brown y Chow y aprobados posteriormente por la FDA para el tratamiento de defectos óseos que no soportan carga, pudiendo permanecer en el organismo hasta 2 años sin reabsorción. (116)

La principal ventaja que posee es su capacidad para adaptarse a la cavidad ósea, al poder dar forma a la pasta en el sitio defectuoso, evitando espacios entre el hueso y el implante. Otros beneficios son su alta biocompatibilidad y sus propiedades osteoconductoras. Sin

embargo, su fragilidad, el hecho de carecer de una estructura porosa, lo cual limita la velocidad de adhesión celular y el riesgo de una reacción inflamatoria, ocasiona que los CPC sean utilizados de forma selectiva. (109,116)

Los CPC se pueden dividir en dos grupos principales: Apatitas (Hidroxiapatita fundamentalmente) y Brushita.

- Cementos de Apatitas (Hidroxiapatita):

Son más viscosas, lo cual indica que la capacidad de inyección será más baja pero sus propiedades mecánicas (más fuertes que las de brushita) el pH al que ocurre la reacción de regeneración (es más fisiológico) y el hecho de ser una apatita (la forma de fosfato cálcico del hueso) hace que se tienda a usar este material. (43,117)

Sin embargo, sus prolongados tiempos de reabsorción que dificultan la regeneración ósea, hace que se tienda al estudio de otros biomateriales que puedan subsanar esta dificultad.

- Cementos de Brushita:

La brushita se reabsorbe a un ritmo más rápido debido a su metaestabilidad en condiciones fisiológicas ya que se reabsorbe no solo por el proceso de remodelación natural sino también por un proceso físico-químico de disolución. (118)

A pesar de solucionar el problema de las apatitas en relación con su reabsorción, sus propiedades mecánicas son inferiores y la resistencia a la compresión suele ser el criterio más común y a menudo único para evaluar el rendimiento de un cemento. Además, la cantidad de agua consumida durante el fraguado es más alta que la apatita, por lo que teniendo en cuenta la relación líquido-polvo, los compuestos de brushita serán menos porosos. Sin embargo, la biocompatibilidad y osteoconducción de los injertos de brushita ha sido demostrada en estudios in vivo evidenciando que los defectos óseos que habían sido rellenados con brushita fueron sustituidos por nuevo tejido óseo. (117,118)



Gracias al desarrollo de la brushita, para solventar algunas de sus limitaciones anteriormente mencionadas, se ha desarrollado un sustituto que es la moneita, que no es más que la forma anhidra de la brushita obtenida tras deshidratación de esta o modificación de sus condiciones de precipitación. (110)

La brushita había demostrado ventajas en la regeneración respecto a la HA, sin embargo, experimenta finalmente una conversión a fase insoluble de HA que limita su reabsorción final. La moneita, por su parte, no se convierte en HA tras su implantación y se reabsorbe a tasas más rápidas que los injertos con cemento de brushita además de poseer unas excelentes características osteoconductoras y osteoinductoras. (110,117)

#### ***1.4.3.4. Polímeros***

Los materiales poliméricos son fáciles de fabricar y moldear en forma y tamaño deseado. Los polímeros naturales son biocompatibles y biodegradables, por lo que son ampliamente utilizados como biomateriales: quitosano, colágeno, gelatina, seda, alginato y ácido hialurónico son algunos de ellos. Por su parte los polímeros sintéticos tienen una mayor longevidad y pueden fabricarse para cumplir unas características específicas. (113)

Entre sus principales ventajas destacan la baja inmunogenicidad, reabsorbilidad controlable y su porosidad. Sin embargo, la liberación de productos ácidos que alteran el pH local, la osteoconductividad y su escasa capacidad de adhesión celular, son algunas de sus limitaciones. (109)

#### **Polímeros Naturales**

##### **Colágeno**

Es el biomaterial más utilizado no solo para aplicaciones médicas, sino también con fines de investigación ya que es un material no tóxico, fácil de obtener y con una baja inmunogenicidad además de ser el componente principal de la matriz extracelular. (105)

Su principal inconveniente sigue siendo sus propiedades mecánicas que no están muy próximas a las del tejido óseo natural por lo que generalmente se asocia con biomateriales cerámicos para potenciar la regeneración ósea. (112,119)

### Quitano

Es un polisacárido natural de origen animal producido a partir del exoesqueleto principalmente de crustáceos, con una excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo cual unido a su baja toxicidad, hace que sea ampliamente utilizado en el campo de la regeneración ósea. Es fácil de modificar químicamente, aumentando la adhesión y crecimiento celular en el andamio gracias a su elevada porosidad, facilitando la liberación de moléculas osteoinductivas. Generalmente se utiliza combinado con otros biomateriales, como la HA, para potenciar su función (120).

Además, ha demostrado propiedades en la coagulación y cicatrización gracias a la estimulación de citocinas y factores de crecimiento. (105)

### Alginato

Biopolímero marino obtenido a partir de las algas, fácil de manipular y usar, biodegradable, y que se utiliza fundamentalmente por su capacidad de formar geles que pueden combinarse con otros polímeros como colágeno o bien con cerámicas y biovidrios. (105)

Células madre encapsuladas en hidrogel de alginato mostraron una mayor diferenciación y osteogénesis, HA mezclado con alginato aumentó su resistencia mecánica, Colágeno combinado con alginato y biovidrio aumentó su resistencia mecánica, adhesión celular y capacidad de diferenciación osteogénica. (113,121)

En solución fisiológica, tienen propiedades mecánicas débiles, por lo que, para superar este problema, se modifican químicamente mediante acetilación, fosforilación y sulfatación. La mejor forma de aumentar las propiedades mecánicas es combinándolo con cerámicas que sostienen y refuerzan el alginato. (122)



### Seda

La seda está constituida por dos tipos de proteínas: fibroína (fibrosa) y sericina (globular). Estas proteínas de la seda constituyen un biomaterial prometedor por su facilidad de ser moldeada. Su potencial osteogénico aislado es bajo, pero al combinarse con otros biomateriales puede potenciar su actividad y la regeneración ósea, como se ha demostrado al combinarla con HA. (113)

### **Polímeros Sintéticos**

#### Poli ácido láctico

Poliéster biodegradable y bioabsorbible, que posee dos isómeros (L y D- Ácido láctico), derivado de recursos naturales y cuyas características fundamentales como la no toxicidad, la biocompatibilidad, biodegradabilidad y estabilidad térmica, resultan fundamentales para la regeneración ósea. (113,123,124)

Al igual que otros polímeros, PLA se ha utilizado en combinación con hidroxiapatita con la finalidad de mejorar las propiedades mecánicas. Un estudio demostró que la combinación PLA/HA generaba un canal microvascular con buenos comportamientos elásticos. (123)

Sin embargo, a pesar de sus prometedoras características, no es perfecto. Es muy hidrófobo, lo cual lo hace inadecuado para administrar fármacos. Además, su baja resistencia al impacto hace que no pueda ser utilizado el implante para zonas con una gran carga mecánica. (125)

#### Poli ácido glicólico

Utilizado desde la década de los 70 como material de sutura reabsorbible, presenta una excelente biocompatibilidad además de una buena biodegradabilidad. Además, su alta porosidad permite la difusión de nutrientes y su posterior neovascularización.

Sin embargo, su rápida absorción, baja resistencia mecánica y riesgo de respuesta inflamatoria por interacciones entre los productos de degradación, hacen que PGA no pueda utilizarse de forma aislada sino combinada en forma de PLGA. (113,126)

#### *Poli ácido láctico-glicólico*

Es el material sintético más extendido y combina PLA y PGA. Su fácil procesamiento, buena biocompatibilidad y sobre todo la biodegradabilidad controlada, hacen que sea un material muy interesante y utilizado. Sin embargo, su escasa resistencia mecánica por si sola para la regeneración ósea, hace necesario de PLGA, al igual que en la mayoría de los compuestos anteriormente mencionados, que deba ir asociado a otros biomateriales como cerámicas, biovidrio, HA y polímeros naturales. (113,123,127)

En función del origen del biomaterial empleado se distinguen dos grupos: Naturales y Sintéticos.

Como se ha explicado, en función del origen del biomaterial empleado se distinguen dos grupos principales, naturales y sintéticos, cuyas principales características, origen y tipos se recogen a modo resumen a continuación en las siguientes tablas. **(Tablas 10a y 10b páginas 57 y 58).**

**Tabla 10a.** Principales tipos y características de Biomateriales

| Biomaterial       | Origen    | Características                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Tipos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Derivado coralino | Natural   | Constituido por carbonato cálcico similar al hueso esponjoso humano, con gran capacidad osteoconductora y capacidad de convertirse en hidroxiapatita                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Cerámicas         | Sintético | <p>Por si solas no poseen actividad osteogénica, pero en contacto con el hueso, se favorece la formación de tejido óseo. Podemos distinguir:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Bioinertes</u>: Albumina y Zirconia. No recomendables</li> <li>- <u>Bioactivas</u>: Buena osteoconductividad, pero la fragilidad y la baja resistencia a la carga son sus principales limitaciones.</li> </ul> | <p><b><u>Cerámica Bioactiva:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Hidroxiapatita</u>: Buena Osteoconducción y osteoinducción, pero reducida capacidad de degradación (reabsorción) y baja resistencia a la carga, por lo que no se suele utilizar por si sola sino asociada a otros biomateriales.</li> <li>- <u>Fosfato Tricálcico</u>: Sí es reabsorbible y posee poros que aceleran la remodelación ósea. Sin embargo, es frágil y tiene baja resistencia a la carga, por lo que se suele asociar a otros biomateriales.</li> <li>- <u>Fosfato Bifásico</u>: Mezcla de Hidroxiapatita y Fosfato Tricálcico, combinando la osteoconductividad y osteoinducción de ambos con la biodegradabilidad de Fosfato Tricálcico.</li> <li>- <u>Vidrio Bioactivo</u>: Cerámica a base de silicio. Buena porosidad y rápida reabsorción, pero pobre osteoconducción y osteoinducción</li> <li>- <u>Vitrocerámica</u>: Mejores propiedades que vidrio bioactivo y más resistencia</li> </ul> |
| Cemento           | Sintético | Mezcla de Fosfato cálcico con una solución acuosa. Se inyecta directamente en la zona lesionada adoptando la morfología del defecto                                                                                                                                                                                                                                                                         | <p><u>Cemento de Fosfato Cálcico</u>: Buena adaptación en la zona lesionada, sin dejar espacios entre hueso e implante, además de buenas propiedades osteoconductoras y alta biocompatibilidad. Sin embargo, deben ser usados de manera selectiva por su fragilidad, riesgo de reacción inflamatoria y falta de porosidad, que retrasa su adhesión celular. Dos subtipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cementos de apatita</li> <li>- Cementos de Brushita</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

**Tabla 10b.** Principales tipos y características de Biomateriales

| Biomaterial | Origen                | Características                                                                                                    | Tipos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Polímeros   | Natural/<br>Sintético | Baja inmunogenicidad y buena reabsorbilidad y porosidad. Sin embargo, escasa adhesión celular y osteoconductividad | <p><b>Naturales:</b> Ampliamente usados por ser biodegradables y biocompatibles.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Colágeno:</b> 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</li> <li>- <b>Quitano:</b> Usado fundamentalmente para cicatrización de heridas gracias a la estimulación de citocinas y factores de crecimiento</li> <li>- <b>Alginato:</b> Se suele usar combinado con otros polímeros, pero sobre todo con cerámicas para aumentar sus propiedades osteogénicas y resistencia</li> <li>- <b>Seda:</b> Usada de forma aislada por sus bajas propiedades osteogénicas, que aumentarán al combinarla con otros biomateriales.</li> </ul> <p><b>Sintéticos:</b> Mayor longevidad y posibilidad de fabricarse en características específicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Poli Ácido Láctico:</b> 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.</li> <li>- <b>Poli Ácido Glicólico:</b> No suele usarse de forma aislada por su baja resistencia y riesgo de. Respuesta inflamatoria.</li> <li>- <b>Poli Ácido Láctico-Glicólico:</b> Buena biodegradabilidad, biocompatibilidad y características osteogénicas. Su baja resistencia hace que se asocie a cerámicas e Hidroxiapatita.</li> </ul> |

Como conclusión, los materiales hasta ahora mencionados tienen una serie de ventajas e inconvenientes: (105)

- **Ventajas:**

- Los mejores materiales osteoinductores son los injertos y en algunos casos los materiales cerámicos, como la hidroxiapatita. Además, poseen buenas propiedades mecánicas, biocompatibilidad y gran osteointegración.
- El injerto sintético permite la personalización del producto y su adaptación.
- Las cerámicas presentan buenas propiedades mecánicas y no están relacionadas con riesgo de toxicidad además una gran resistencia a la corrosión.
- Los polímeros son la mejor opción para conseguir un implante personalizado pero sus propiedades mecánicas dependen de la fórmula utilizada. Ofrecen además la posibilidad de modificar sus características, su forma y la porosidad además de poder controlar la reabsorción.

- **Inconvenientes:**

- Los injertos poseen una limitada disponibilidad y hay que considerar un eventual rechazo, riesgo de transmisión de enfermedades y la posibilidad de perder parte de sus propiedades osteoinductivas debido al procesamiento necesario para contrarrestar sus características antigénicas.
- A pesar de esta limitación de los injertos naturales y que los injertos sintéticos superan este problema, su principal inconveniente se encuentra en la inadecuada vascularización, que trae consigo un escaso transporte de nutrientes en el implante.

- La mayor rigidez del implante puede dar lugar a tensión y pérdida de hueso lo cual aumenta el riesgo de que el implante se afloje.
- Las cerámicas son frágiles y a menudo poseen una degradabilidad inconveniente.

Existe una necesidad cada vez mayor de intervenir en la regeneración ósea de manera exógena. La edad cada vez más avanzada de los pacientes o la presencia de una lesión de tamaño crítico, hace que la capacidad de regeneración espontánea sea en ocasiones insuficiente o imposible.

Es por ello que se está investigando cada vez más en la medicina regenerativa, basada en la ingeniería de tejidos, en la cual se crea un andamio o biomaterial con unas propiedades específicas para favorecer un microambiente adecuado, permitiendo las interacciones celulares, la formación de matriz extracelular y el transporte de factores de crecimiento y células osteogénicas, proporcionando estabilidad y asegurando una adecuada formación de hueso seguida de reabsorción o biointegración del biomaterial implantado.

A pesar de que existe una amplia gama de biomateriales y sustitutos óseos, aún no se ha encontrado una solución definitiva que nos permita obtener una regeneración ósea completa.

En la revisión del estado actual de este problema hemos valorado la utilización de diferentes tratamientos que aún están en fase experimental y según las propiedades observadas, con la finalidad de dar un paso más en la investigación de la regeneración ósea, proponemos la realización de un estudio experimental utilizando un armazón óseo experimental Proteo-Graft® (Noricum S.L), constituido por HA bovina recubierta de quitosano y trehalosa que contiene rhBMP-2, donde esperamos que actúe como un andamio óseo osteoconductor, que favorezca la diferenciación de células osteoprogenitoras y acelere el proceso de regeneración ósea.

## 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 los tiempos adecuados de estudio posteriores a la lesión ósea.
- Determinar las variables a estudiar que justifiquen el éxito/fracaso de los tratamientos y los posibles mecanismos de acción.
- Justificar la utilización del tratamiento empleado en un ensayo clínico.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS







## 3.1. MATERIALES

### 3.1.1. INSTALACIONES

- Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (PAE SA-001, Salamanca, España), que recibirá los animales de Charles River España y los mantendrá estabulados en condiciones estándar desde su recepción hasta el sacrificio.
- Servicios externos de apoyo a la investigación del Centro de Investigación del Cáncer donde se realizarán los estudios histológicos e inmunohistoquímicos.
- Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca:
- Laboratorio 1 para trabajo con animales de experimentación, dotado de instalación fija de control de la temperatura y humedad y renovación del aire, mobiliario y de los elementos necesarios para la realización de modelos experimentales quirúrgicos con animales pequeños y medianos.
- Laboratorio 2 para el desarrollo de las técnicas de determinación, en todo tipo de muestras, dotado de instalación fija de control de temperatura y humedad, gases (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), vacío, mobiliario y de todos los instrumentos necesarios para el desarrollo de las técnicas de determinación que se exponen en este proyecto.
- Laboratorio 3, sala tipo C, dotado de la instalación fija de todos los elementos para una sala limpia, mobiliario y de los elementos precisos para el desarrollo de los estudios que así lo requieran.
- Seminario para mantener reuniones de trabajo, dotado de sistema informático y proyección y mobiliario adecuado para tales fines.
- Almacén para el material fungible

Todas las instalaciones anteriormente mencionadas cumplen con la normativa y legislación vigente para los cometidos que se han desarrollado en cada una de ellas.

### ***3.1.1.1. Equipos empleados***

- **Limpieza y esterilización**: Sellador de bolsas de autoclave: Selecta Sealcom 600. Esterilizador por gases Amprolene AN74i. Autoclave Raypa Steam Sterilizer. Estufa Heraeus E42. Estufa p-selecta. Baño de ultrasonidos Branson 2510.
- **Anestesia**: Sistema de anestesia por gases Matrx. 2 respiradores volumétricos de aire. 2 respiradores volumétricos de oxígeno y gases. 2 ventiladores para pequeños animales SRI. 4 bombas de infusión Braun.
- **Cirugía**: Microscopios quirúrgicos LEICA con sistema de vídeo incorporado y fuentes de luz fría. Bomba multicanal Cole-Parmer 74900. Bomba Masterflex + baño termostatzado Medingen. Fuentes de luz fría individuales.
- **Almacenamiento de muestras y reactivos**: 2 Congeladores -80°C. 3 Congeladores -20°C. 3 Refrigeradores 4°C.
- **Estabulación de animales**: Aislador, con sistema HEPA, para animales TDI.
- **Equipamiento general**: Campana de gases "Cruma". Termodesinfectador Miele. Máquina de hielo automática 85 AS-E. Armario de seguridad para productos inflamables y corrosivos. Balanza de precisión: Precisa 205<sup>a</sup>. Balanza Sartorius T2101. Balanza Sartorius T6101. Sistema de purificación de agua Millipore Elix 3. 2 Agitadores orbitales: Cole Parmer Rocker Platform. Agitador magnético: Raypa AG-2. 2 agitadores calefactados: Eppendorf Mixmate. pHmetro: Oakton ph 510 series. Baño de agua: Lauda Ecoline Re 120 de -30 a 150°C. Campana de flujo laminar TELSTAR CV-30/70. Campana de flujo laminar TELSTAR. Contenedor de nitrógeno líquido con sistema de administración THERMO. Contenedor de nitrógeno líquido THERMO 110 1 para congelación de muestras.

Centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R (volumen 1,5-2 ml). Centrífuga refrigerada Eppendorf 5810 (volumen 15-50 ml). Centrífuga Eppendorf miniSpin. Sonificador Sanies Vibra Cell Tm. Homogeneizador: Glas Col GKH. Material informático al uso para todos los sistemas especificados. Equipo automatizado de pipeteo Eppendorf opMotion 5057.

- **Equipamiento específico:** Espectrofotómetro Unicam HeAios a. Lector de placas Thermo Electro Corporation Multiskan ascent (medida fotométrica). Lector de placas Thermo Electro Corporation Varioskan-flashl (lector de escaneado multimodo, incluyendo la intensidad de fluorescencia, con resolución temporal de fluorescencia (TRF), fotométrico, y luminométrico. Equipo de Western Blot: BIO-RAD Miniprotean. Equipo de Western Blot: BIO-RAD Protean-xi cell. Trans-Blot Semi-Dry transfer cell BIO-RAD. 2 Alimentadores Power-Pac HC BIO-RAD/ Thermo-electron corporation. Nanodrop, Nanophotometer, Equipo de PCR Eppendorf. Equipo de revelado y análisis de imagen ImageQuant RT ECL de GeneralElectrics.
- **Equipamiento informático:** Ordenadores, impresoras, periféricos y programas informáticos adaptados a las necesidades propuestas.

### 3.1.2. BIOMATERIALES EMPLEADOS EN LOS TRATAMIENTOS

#### **Membrana Evolution® (OsteoBiol - TecnoSS, 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 íntima (matriz y forma porosa) 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). Además, gracias a su contenido rico en colágeno, el producto 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)**

Este biomaterial está constituido por gránulos irregulares de bordes redondeados y microestructura, macro y microporosa, similar a otros sustitutos óseos comerciales derivados del hueso bovino, 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, producido a partir del exoesqueleto principalmente de crustáceos, que imita a la matriz extracelular y promueve la diferenciación de células madre para facilitar la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica. rhBMP-2 BMP son factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia de TGF- $\beta$ , 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.



### 3.1.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Empleamos ratas Wistar machos, de 350 g de peso (8 meses de edad), suministrados por CharlesRiver (Barcelona, España). Fueron estabuladas en condiciones adecuadas, según la legislación vigente, y alimentadas, ad libitum, con agua y dieta estándar (A04, Panlab, Madrid, España), con la siguiente composición: Proteína bruta (17,62% del total), materias grasas brutas (2,50%), celulosa bruta (4,05%), cenizas brutas (4,38%), almidón (43,30%), calcio (0,66%), fósforo (0,49%), sodio (0,14%), humedad (10,54%), lisina (0,85%), metionina (0,29%), vitamina A (7500 UI), vitamina D (1500 UI) y vitamina E (tocoferol) (15 mg).

Los animales fueron sometidos a dieta absoluta, con agua ad libitum, 12 horas antes del experimento correspondiente.

El proyecto 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

El planteamiento del trabajo se realizó siguiendo la metodología de un estudio randomizado ciego: después de una asignación aleatoria, tanto en el momento de la administración de los fármacos, como en la determinación y valoración estadística de los resultados, no sabíamos qué producto se estaba administrando, a qué grupo pertenecía la muestra que estábamos estudiando, o la identidad de los grupos que se analizaban estadísticamente.

Todas las técnicas anestésicas y quirúrgicas, de obtención de muestras y las determinaciones de las diferentes variables estudiadas fueron realizadas bajo estrictas condiciones de asepsia utilizando todos los medios descritos en los apartados anteriores.

### ***3.2.1.1. Técnicas anestésicas empleadas***

- Inhalatoria con gas Sevoflurano (Sevorane<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, IL, USA) 5%, 1l/min O<sub>2</sub> (inducción), 3%, 1l/min O<sub>2</sub>.
- Intraperitoneal con Xilacina (Rompun 2% - 20 mg/ml - Bayer) + cloruro de ketamina (Ketolar<sup>®</sup> 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 empleadas***

Durante los procedimientos, se colocó al animal de experimentación sobre una tabla de microcirugía calefactada, para minimizar la pérdida de calor del animal, en decúbito supino con sujeción de las cuatro extremidades, ofreciendo así una completa exposición del campo quirúrgico. Como ya hemos comentado, todas las técnicas quirúrgicas se realizan bajo estrictas condiciones de asepsia, utilizando material estéril y en campana de flujo laminar. Previa preparación del campo quirúrgico: rasurado de la piel y administrando solución antiséptica de povidona yodada (Betadine, Asta medica) se desarrollan los procedimientos quirúrgicos.

Anestesia intraperitoneal, tal y como se describe anteriormente, realizando a continuación abordaje submandibular, accediendo al ángulo y rama ascendente mandibular derecha del animal, donde se practica 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, mediante una fresa trefina de 5 mm, bajo irrigación continua con suero fisiológico (**Figura 11**).

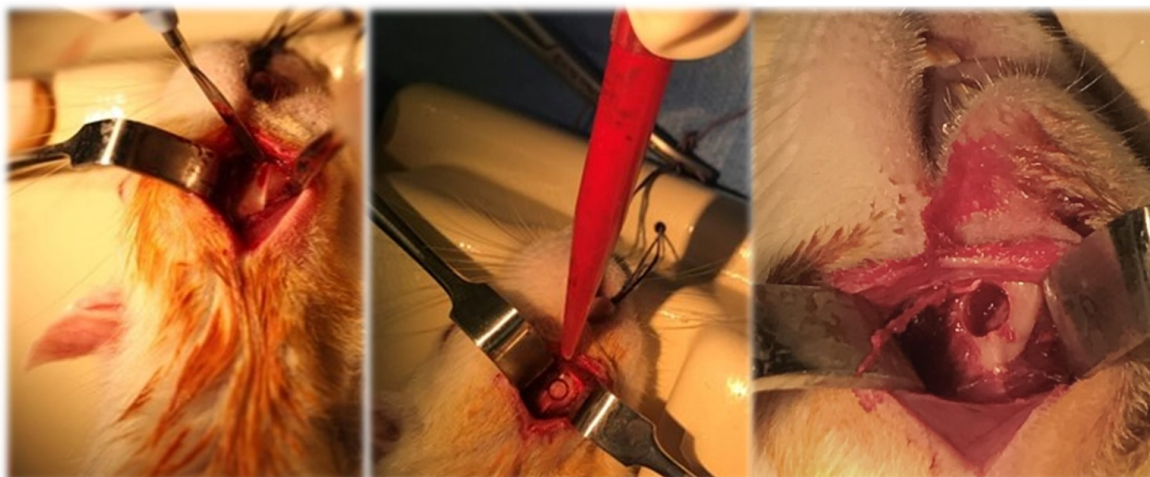


**Figura 11.** Acceso a la cresta de inserción. Imagen intraoperatoria de la Ostectomía circular con fresa trefina.

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 12**).



**Figura 12.** Cierre del abordaje quirúrgico por planos

Se realizará un seguimiento clínico postquirúrgico, valoración de: estado general de los animales, aspecto de la herida y de la zona intervenida, sangrado o exudado en la herida quirúrgica, rechazo de los biomateriales o membranas y cambios degenerativos por lesión mandibular, etc. Trascurridos los diferentes periodos de seguimiento se tomarán las muestras extrayendo sangre total por punción aórtica, extirpación en bloque de cada una de las hemimandíbulas y recogida de tejido perimandibular, sacrificando a continuación, por sobredosis anestésica, al animal de experimentación.

### 3.2.2. GRUPOS EXPERIMENTALES

Se establecen 4 grupos experimentales, que se detallan a continuación, empleando un total de 42 ratas Wistar.

#### **Grupo Simulado o basal (GS)**

Después de anestesiar el animal de experimentación, se realizan las técnicas de abordaje mandibular, sin practicar la lesión ósea, y se extraen muestras de sangre y tejido. Procediendo finalmente al sacrificio del animal de experimentación. (N=6). El objetivo de este grupo es conocer los valores basales fisiológicos de las variables estudiadas.

#### **Grupo Control (GC)**

Una vez finalizada la cirugía de lesión crítica, 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 postcirugía, se incluyen 6 animales por cada tiempo ensayado (N=12). Los objetivos que persigue este grupo son, en primer lugar, demostrar que la lesión ósea inducida no regenera sin tratamiento, constituyendo un modelo experimental de lesión crítica, tal y como hemos comentado anteriormente. Y en segundo lugar conocer la influencia de esta lesión en las variables estudiadas, sirviendo estos resultados para valorar la efectividad de los diferentes tratamientos ensayados.

Finalizado el periodo experimental (3 y 6 meses), se procede a la obtención de las muestras y sacrificio del animal: extrayendo sangre total por punción aórtica, extirpación en bloque de cada una de las hemimandíbulas y recogida de tejido perimandibular.

La mitad de los animales de cada subgrupo, en los tiempos determinados, se someten a una valoración radiológica mediante microCT bajo anestesia inhalatoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Una vez obtenido el tejido, se introduce en nitrógeno líquido, conservándolo en tubos de criocongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las hemimandíbulas son sumergidas en formaldehído 3,7-4,0% p/v tamponado a  $\text{pH}=7$ .

Las muestras sanguíneas, obtenidas por punción aórtica, son inmediatamente centrifugadas durante 20 minutos a 4500 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , extrayendo el suero y después de dividir las en alícuotas, fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tubos de criocongelación.

### **Grupo IsoBone® (GIB)**

Una vez finalizada la cirugía de lesión crítica, el defecto generado es rellenado con el biomaterial IsoBone® y se cubre con la membrana Evolution® (**Figura 13**). Se realiza el seguimiento de los animales tomando muestras a los 3 y 6 meses postcirugía, se incluyen 6 animales por cada tiempo ensayado ( $N=12$ ). El objetivo que persigue este grupo es disponer de la eficacia terapéutica de un biomaterial que constituye la base del que queremos investigar, sirviendo estos resultados para intentar valorar que el posible beneficio del tratamiento del grupo estudio depende de los elementos terapéuticos añadidos y no de la base que los sustenta.

Los tiempos de evolución, procedimiento de recogida de muestras y procesamiento de las mismas y el sacrificio del animal de experimentación son los mismos que los descritos en el Grupo Control.

### **Grupo Proteo-Graft® (GPG)**

Una vez finalizada la cirugía de lesión crítica, el defecto generado es rellenado con el biomaterial Proteo-Graft® y se cubre con la membrana Evolution® (**Figura 13**). Se realiza el seguimiento de los animales tomando muestras a los 3 y 6 meses postcirugía, se incluyen 6 animales por cada tiempo ensayado ( $N=12$ ). Este es nuestro grupo estudio, cuyos resultados serán comparados con los anteriores para valorar la posible eficacia y beneficio del mismo.

Los tiempos de evolución, procedimiento de recogida de muestras y procesamiento de las mismas y el sacrificio del animal de experimentación son los mismos que los descritos en el Grupo Control.



**Figura 13.** Biomaterial regenerativo rellenando el defecto óseo. Aislamiento mediante membrana de colágeno.

**Tabla 11.** Distribución de materiales empleados en cada uno de los grupos.

| <b>Grupos</b> | <b>Animales</b> | <b>Defecto<br/>óseo</b> | <b>Membrana<br/>Evolution®</b> | <b>Biomaterial<br/>IsoBone®</b> | <b>Biomaterial<br/>Proteo-<br/>Graft®</b> | <b>Sacrificio</b> |
|---------------|-----------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|-------------------|
| 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 del animal de experimentación, valoración macroscópica, estudio radiológico por microCT, daño histológico valorado con tinciones de hematoxilina-eosina y de Madson, metabolismo óseo por inmunohistoquímica de marcadores tempranos y finales de diferenciación osteoblástica (Runx2, bALP y OCN), marcadores bioquímicos de estimulación de formación ósea por ELISA (TGFβ1, BMP-2, RANTES y ECM).

### **3.2.3.1. Estudio radiológico (mCT)**

En cuanto a la valoración radiológica (mCT): se realizará un estudio densitométrico del daño y de la reparación ósea del defecto mandibular.

Se dispuso al animal anestesiado, por vía inhalatoria, en posición decúbito prono y a continuación se les realizó el mismo estudio protocolizado de técnica radiológica para mCT. El daño y las reparaciones óseas del defecto mandibular fueron analizadas mediante un escáner multimodal SPECT/CT Albira II ARS (**Figura 14**).

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.



**Figura 14.** Equipo de micro tomografía (mCT)



### 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.

#### **Procesado de la muestra**

Preparación de la soluciones: Solución de Ácido Nítrico al 5 %. Se toman 5 ml de ácido nítrico y se diluyen en 95 ml agua destilada. Soluciones de etanol al 50%, 70%, 80% y 95%. Se toman 50, 70, 80 y 95 ml de etanol absoluto y se mezclan con 50, 30, 20 y 5 ml, respectivamente, de agua destilada.

#### **Procedimiento**

- **Decalcificación del hueso:** Se introduce la muestra en solución de ácido nítrico al 5%, en una relación volumétrica de 1/20 como mínimo, a 25°C durante 24 horas. Tras la decalcificación se aclara el ácido mediante lavado con agua destilada.
- **Deshidratación de la muestra:** Se elimina toda el agua de la muestra mediante su inmersión en soluciones de etanol de concentraciones crecientes, 50%, 70%, 80%, 95% y absoluto. La muestra se tendrá una hora en cada solución a fin de que la deshidratación se produzca de lentamente, evitando así la deformación de la misma.
- **Aclaramiento:** Una vez deshidratada la muestra se procede a la sustitución del etanol mediante inmersión en una sustancia miscible, tanto en el etanol como en la parafina, se emplea el xilol o xileno. Se mantendrá el baño una hora a temperatura ambiente.

- **Inclusión y formación de bloques en parafina:** Se introduce la muestra en un vaso y se le añade la parafina fundida a 60°C, introduciéndola a continuación en la estufa a 60°C hasta un máximo de 6 horas, dependiendo del grosor de la misma. Luego se coloca la muestra, orientándola, en un molde con parafina fundida y se deja solidificar a temperatura ambiente para formar el bloque.
- **Obtención de los cortes:** Mediante un micrótopo de rotación, se obtienen cortes de entre 4 y 6 micrones, estos se dejan flotando en un baño termostatzado con agua tibia, los cortes se extienden con cuidado, para evitar que se formen arrugas y se recogen con un portaobjetos desengrasado cubierto por una capa de adhesivo de Mayer.

### **Tinción de los cortes**

La hematoxilina (Hematoxilina Harris para histología Casa Alvarez - Eosina 0.5% en solución alcohólica Casa Alvarez) tiñe de violeta azulado intenso los ribosomas, la cromatina (material genético) dentro del núcleo y otras estructuras. La eosina tiñe de rosa anaranjado o rosado el citoplasma, el colágeno, el tejido conjuntivo y otras estructuras que rodean y sostienen la célula.

De manera previa se desparafinan los cortes, mediante un baño en xilol a 58°C durante 15 minutos. Después se rehidratan en solución alcohólica de concentración decreciente, comenzando por etanol absoluto seguido del de 95%, 80%, 70% y 50%, la muestra se sumergirá 30 segundos en cada uno de ellos, seguidamente se aclarará 30 segundos en agua destilada y se procederá a la tinción con hematoxilina durante 10 minutos, se vira en agua de grifo 20 minutos y se añade la eosina durante 30 segundos. A continuación, se lava en agua destilada, se deshidrata en pases rápidos con alcoholes 80%, 90% y 100% y para finalizar con 20 pases rápidos por xileno. Se pega un cubreobjetos con una gota de adhesivo bálsamo de Canadá, el cual tiene un índice de refracción similar al del vidrio. Se deja secar unas horas y ya se puede proceder a la observación en el microscopio óptico.



El tricrómico de Masson (Kit Bio Optica) se utiliza para teñir las fibras de colágeno en rojo y las fibras elásticas en verde, mientras que las células musculares se tiñen en tonos de rosa o violeta. La técnica también tiñe el núcleo celular en negro o azul oscuro, lo que permite una fácil identificación de las células.

El procedimiento es similar al indicado anteriormente. Desparafinada e hidratada la preparación se añaden 6 gotas de **A** + 6 gotas de **B** – manteniéndolas 10 minutos, se eliminan los reactivos volcando el porta y a continuación se añaden 10 gotas de **C** – manteniéndolas 4 minutos. Se lava con agua destilada y se añaden 10 gotas de **D** – durante otros 4 minutos. Se vuelve a lavar con agua destilada. Se añaden 10 gotas de **E** – permaneciendo 10 minutos y se vuelca el porta para eliminarlo. Finalmente se lava con agua destilada y deshidrata rápidamente en alcohol de 100%. Xileno y montar

Finalmente, las secciones se analizan con microscopio óptico (Leica DMLB), con cámara digital Olympus DP70.

### ***3.2.3.3. Técnica de inmunohistoquímica***

Esta técnica se basa en la localización específica de proteínas en muestras de tejidos. Consiste en la conjugación de un anticuerpo primario con la proteína que se quiere identificar y su posterior detección mediante anticuerpos secundarios ligados a moléculas sustrato que permitan la visualización microscópica tras la adición de un cromógeno.

#### **Preparación de las muestras**

Se recogen las muestras fijadas en formol al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente.

Se realiza el protocolo de descalcificado de las mandíbulas con Osteosoft, ya descrito anteriormente.

En un procesador (Thermo Scientific Excelsior AS) se preparan los tejidos tratándolos con formol, xilol y alcoholes degradados hasta dejarlos en parafina líquida. Se lleva a efecto la inclusión de las muestras en parafina, formando bloques, ya descrito anteriormente.

Utilizando el micrótopo se realizan cortes de 3µm y se introducen en la estufa a 60°C, mínimo 2 horas. Desparafrinamos las muestras de manera manual para evitar dañalas cuando se hace automáticamente y se introducen húmedas en el ULTRA para empezar el desenmascaramiento del epítipo.

### **Anticuerpos**

Los anticuerpos primarios se detectaron con el equipo automatizado Discovery ULTRA de ROCHE, seguidamente se realizan las distintas condiciones para cada anticuerpo:

- **RUNX2**: con las muestras ya desparafrinadas, se realiza un desenmascaramiento del epítipo o recuperación antigénica durante 32 minutos en un buffer TRIS EDTA pH8 a una temperatura de 100°C, la dilución de anticuerpo primario Anti-Runx2 (ab192256, Abcam) es a 1/100 y se incuba durante 40 minutos a 37°C, se realizan lavados con buffer, se incuba el anticuerpo secundario prediluido OmniMap Rabbit HRP de Roche y se revela con DAB, se realiza la contratinción con Hematoxilina y se monta con DPX.
- **FOSFATASA ALCALINA**: con las muestras ya desparafrinadas, se realiza un desenmascaramiento del epítipo o recuperación antigénica durante 32 minutos en un buffer TRIS EDTA pH8 a una temperatura de 100°C, la dilución de anticuerpo primario Anti-ALP (ab108337, Abcam) es a 1/100 y se incuba durante 40 minutos a 37°C, se realizan lavados con buffer, se incuba el anticuerpo secundario prediluido OmniMap Rabbit HRP de Roche y se revela con DAB, se realiza la contratinción con Hematoxilina y se monta con DPX.

- **OSTEOCALCINA**: no hay recuperación antigénica, directamente se realiza la dilución de anticuerpo primario Anti-Osteocalcina (M65178420, Mybiosource) a 1/100 y se incuba durante 40 minutos a 37°C, se realizan lavados con buffer, se incuba el anticuerpo secundario prediluido OmniMap Rabbit HRP de Roche y se revela con DAB, se realiza la contratinción con Hematoxilina y se monta con DPX.

El kit utilizado de revelado para el anticuerpo secundarios HRP es el Chromomap DAB kit de Roche

#### ***3.2.3.4. Técnica de Elisa***

Para el estudio de los marcadores bioquímicos de formación ósea: TGFβ1, BMP-2, RANTES y ENDOMUCINA se utilizó la Técnica de Elisa.

#### **Obtención de las muestras**

Utilizamos muestras sanguíneas (N=6 por grupo) no hemolizadas. Inmediatamente después de su extracción, fueron centrifugadas extraído el suero, dividido en alícuotas y congeladas a -80°C.

#### **Principios del ensayo**

Es un kit ELISA que emplea múltiples anticuerpos con el principio de “sándwich”. En primer lugar se utilizó un plato con 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal, dependiendo de la variable, anti- (TGFβ1, BMP-2, RANTES y endomucina), adherido en cada uno de ellos para capturar el presente en las muestras y estándares que se añadieron por duplicado en cada uno de los pocillos junto con los blancos correspondientes. Después de lavar el plato para eliminar el material no adherido se añadió una peroxidasa conjugada policlonal anti-citocina. A continuación, el plato fue lavado de nuevo para eliminar el material no adherido y se agregó la solución sustrato que inició la catalización de la peroxidasa. El cambio de color se detuvo por acidificación.

### **Preparación de la placa y procedimiento del ensayo**

Diluimos el Capture Antibody en PBS en la concentración necesaria para trabajar. Inmediatamente cubrimos una placa de 96 pocillos con 100 µl por pocillo de Capture Antibody diluido. Tapamos la placa e incubamos toda la noche a temperatura ambiente. Aspiramos cada pocillo y lavamos con Wash Buffer, repitiendo el proceso 2 veces con un total de tres lavados. Lavamos bien el pocillo con 400 µl de Wash Buffer con un dispensador múltiple. Eliminar bien el líquido en cada paso es esencial para un buen resultado. Después del último lavado eliminamos bien los restos de Wash Buffer, mediante aspiración o volcando la placa en papel secante. Añadimos 300 µl de Reagent Diluent a cada pocillo. Incubamos a temperatura ambiente durante un mínimo de una hora. Repetimos el paso aspiración/lavado como en el paso 2, y las placas están listas para añadir la muestra. Añadimos 100 µl de muestra o Standards en Reagent Diluent o en un diluyente apropiado por pocillo. Cubrimos con una tira adhesiva e incubamos 2 horas a temperatura ambiente. Repetimos la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 µl de la Detection Antibody, diluido en Reagent Diluent, por pocillo. Cubrimos con una nueva tira adhesiva e incubamos 2 horas más a temperatura ambiente. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 µl de la dilución para trabajar de Streptavidin-HRP a cada pocillo. Cubrir la placa e incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se protege la placa de la luz directa. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 µl de Substrate Solution a cada pocillo. Incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se protege la placa de la luz directa. Se añaden 50 µl de Stop Solution a cada pocillo, mover la placa suavemente, con mucho cuidado, para que se mezcle bien. Determinar la densidad óptica. La absorbancia fue medida a 450 nm de  $\gamma$  siendo los resultados obtenidos proporcionales a las cantidades de la variable estudiada de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.



Los diferentes kit empleados para este estudio fueron:

- Rat TGF beta 1 ELISA Kit (Biorbyt®) Catalogue No: orb391171.
- Rat Endomucin (EMC) ELISA Kit (ABBEXA®) Catalogue No.: abx391276
- Rat BMP-2: Enzyme-linked Immunosorbent Assay kit (Quantikine®) Catalogue No.: DBP200.
- Rat CCL5/RANTES Immunoassay ELISA (Quantikine®) Catalogue No.: MMR00.

### 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  $\alpha$  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 usamos el test de Scheffe y el de 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

Con una supervivencia postquirúrgica del 100%, el estado general de los animales en el postoperatorio fue favorable, con ausencia de fracturas, se observó alguna tumefacción de partes blandas por la ostectomía, que desapareció espontáneamente. En cuanto a los biomateriales utilizados no hubo rechazo ni cambios degenerativos por la lesión dentaria. La membrana mostró una adecuada biorreabsorción, baja inmunogenicidad, estabilidad y protección prolongada del eventual injerto cubierto.

## 4.2 RESULTADOS DE CT

El defecto óseo es claramente visible en el GC, tanto a los 3 meses (GC3), (**Figura 15 A**), como a los 6 (GC6) (**Figura 15 B**), no presentando ningún tipo de regeneración ósea en la lesión crítica inducida.

En el grupo GIB, a los 3 meses (GIB3) (**Figura 16 C**), no se aprecia integración del biomaterial. El defecto óseo es identificable y no se aprecia regeneración ósea.

A los 6 meses (GIB6) (**Figura 16D**), el biomaterial se sigue apreciando como una masa, que rellena el defecto crítico sin que se termine de integrar de manera definitiva ni haya una regeneración ósea evidente.

En el GPG, a los 3 meses (GPG3) (**Figura 17 E**), los animales evaluados, no presentaban signos de integración del biomaterial. El defecto óseo era claramente identificable y el biomaterial aparecía como una masa amorfa que rellenaba el defecto sin integración aparente.

En el GPG a los 6 meses (GPG6) (**Figura 17 F**), macroscópicamente el material experimental estaba mejor osteointegrado que en el GPG3, siendo difícil diferenciar el tejido óseo inmediato al defecto con el biomaterial, evaluándose de manera clara la regeneración ósea en la lesión.

Observamos por tanto una evolución y regeneración del defecto en el GPG respecto GIB y GC. Mientras que en GPG, acaba produciéndose una integración del biomaterial y una clara regeneración ósea, en GC y GIB no llega a observarse en ningún momento regeneración ósea.

En GPG3 el defecto siguió siendo identificable, así como el biomaterial, igual que sucedía en GIB y GC a los 3 y 6 meses. Sin embargo, a diferencia de GC3, donde no había hueso formado y del GIB3, donde el defecto tan solo estaba cubierto por el biomaterial sin comienzo de regeneración ósea, en GPG3, a pesar de la falta de integración definitiva del biomaterial y comienzo de regeneración ósea, se aprecia una mejor osteointegración, cubriéndose la totalidad del defecto.

En GPG6, a diferencia de GPG3 y los GIB y GC, se aprecia que el biomaterial está integrado con el hueso y el defecto crítico apenas es valorable, observando una clara regeneración ósea.

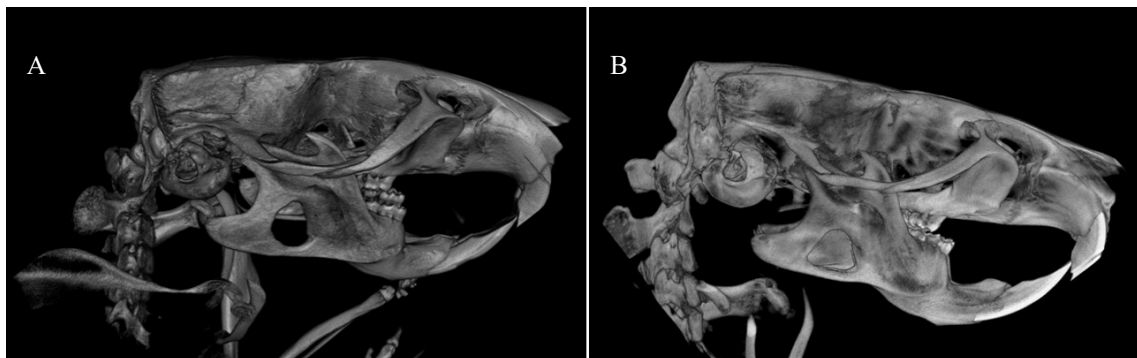


**Figura 15.** Evaluación tomográfica de la mineralización para el GC del defecto óseo mandibular con membrana Evolution® (GC). Las imágenes presentan la mineralización para los GC por microCT en los intervalos de observación de tres y seis meses después de la cirugía (GC3 y GC6). (A. Aspecto del defecto crítico en CG3. B. Aspecto del defecto crítico en GC6). La imagen B muestra que hay hueso recién formado seis meses después de la cirugía solo a lo largo de los bordes del defecto, en comparación con la imagen A tres meses después de la cirugía.

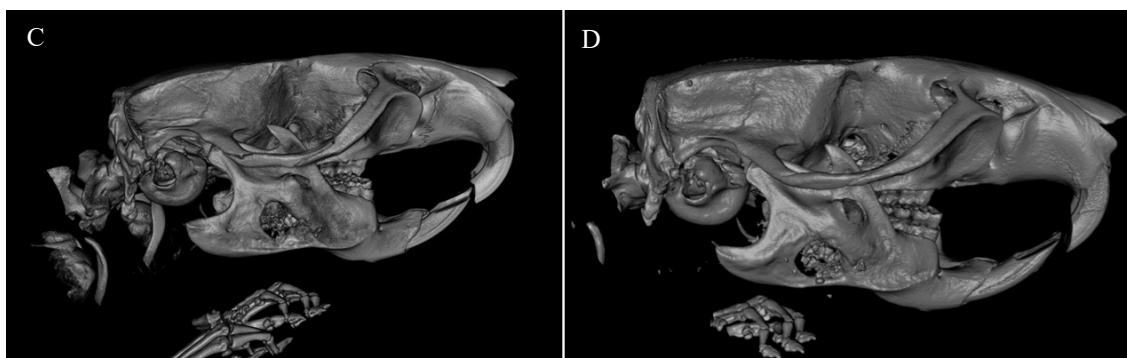


**Figura 16.** Evaluación tomográfica de la mineralización para el GIB del defecto óseo mandibular con armazón óseo experimental IB. Las imágenes presentan la mineralización para los GIB por microCT, en los intervalos de observación de tres y seis meses después de la cirugía (GIB3 y GIB6). (C. Aspecto del defecto crítico en GIB3. D. Aspecto el 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. En la imagen D es más evidente la regeneración ósea respecto a la B.



**Figura 17.** 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, en los intervalos de observación de tres y seis meses después de la cirugía (GPG3 y GPG6). (E. Aspecto del defecto crítico en GPG3. F. Aspecto del defecto crítico en GPG6). La imagen E muestra que el defecto óseo está cubierto en su totalidad por biomaterial, apreciándose aún el mismo sin estar completamente integrado, pero observándose ya un comienzo de regeneración por los bordes de la lesión. Por su parte, la imagen F muestra evidentes signos de regeneración e integración del biomaterial, siendo difícil establecer diferencia entre el tejido óseo próximo a la lesión y el tejido lesionado que contiene el biomaterial.

### 4.3. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

En el GC3 (**Figura 18**), no se observa ningún signo de regeneración ósea en la zona del defecto crítico.

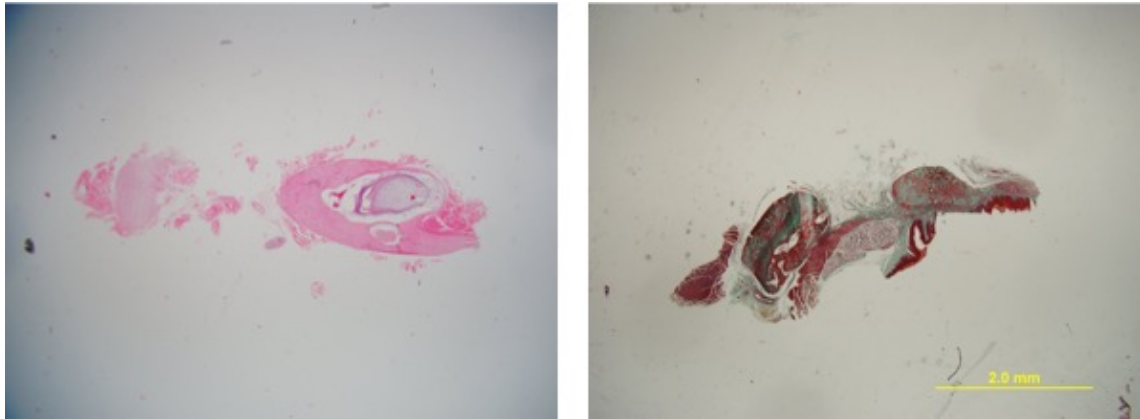


**Figura 18.** Imagen teñida con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico del GC a los 3 meses (GC3)

En el GC6 (**Figura 19**) se aprecia la zona del defecto crítico sin regeneración ósea, si siendo apreciable el músculo estriado, tejido conjuntivo y vasos.

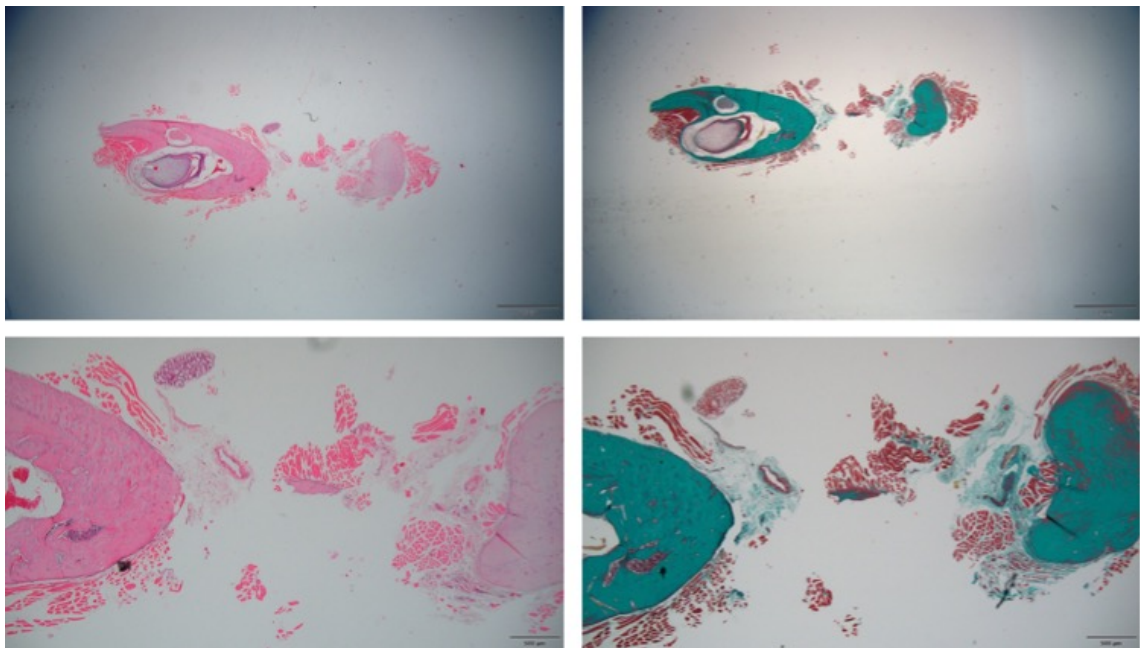


**Figura 19.** Imagen teñida con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico del GC a los 6 meses (GC6).

En las imágenes del GIB3 (**Figura 20**) se aprecia como el defecto crítico está delimitado por una pared constituida por fibroblastos y escaso tejido colágeno, sin otro tipo de celularidad. Alrededor de cada defecto crítico, se observa tejido conjuntivo con fibroblastos y moderada cantidad de colágena, así como numerosa neoformación vascular de diferentes tamaños (angiogénesis). El tamaño de los vasos se va incrementando a medida que se aleja del defecto y no se observa reacción inflamatoria.

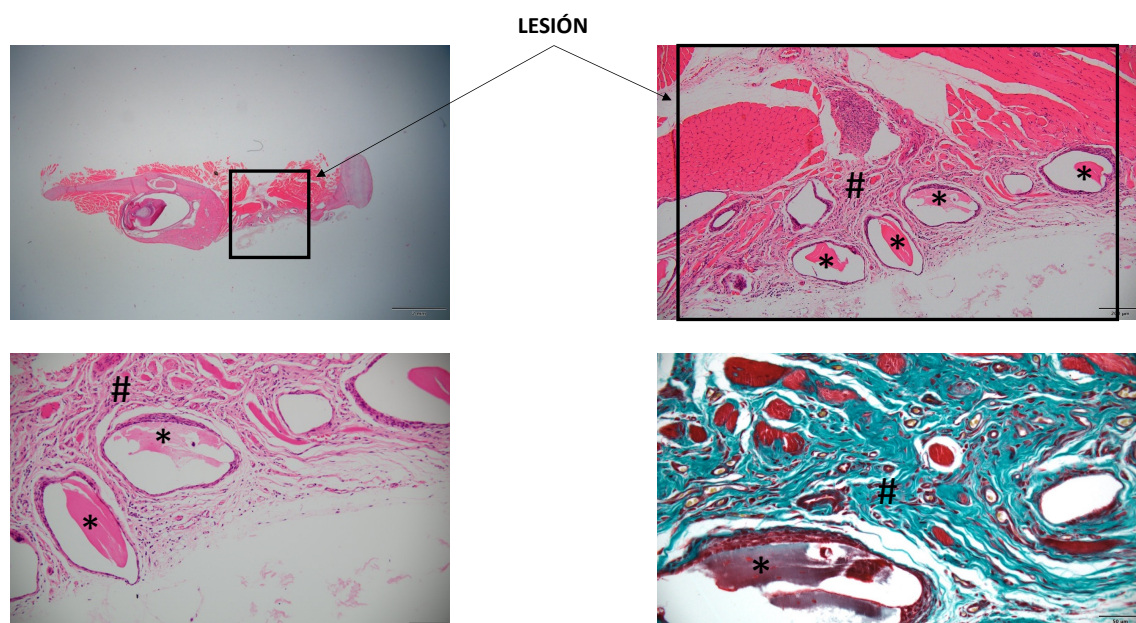


**Figura 20.** Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con IB a los tres meses (GIB3). Biomaterial \*; Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #. Tinción MT D. Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #. Se observan vasos de diferentes calibres (marrón).

En las imágenes histológicas de GIB6 (**Figura 21**) se observan los defectos críticos con el biomaterial, delimitado por una pared en la cual los fibroblastos y la cantidad de colágena son abundantes. Junto a los fibroblastos y colágena se aprecian linfocitos maduros entremezclados, indicativo de que se está produciendo una reacción inflamatoria. Alrededor de cada defecto crítico, se observa proliferación de tejido conjuntivo con fibroblastos y abundante cantidad de colágeno, entre el que se observan vasos de diferentes tamaños.

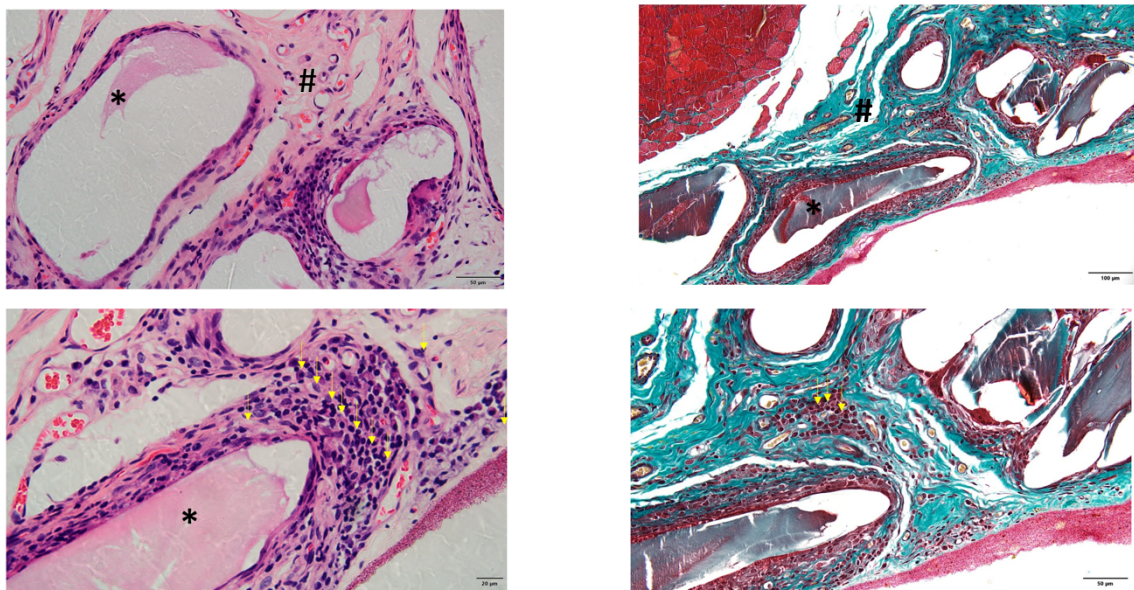


**Figura 21.** Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con IB a los seis meses (GIB6). Biomaterial \*; Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #. Linfocitos que indican una reacción inflamatoria (flechas amarillas). Tinción MT D. 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)

Por tanto, en GIB3 hay más fibroblastos por estar en estadios iniciales de la remodelación ósea y menos colágena, mientras que en GIB6 hay menos fibroblastos y una mayor cantidad de colágena. Por otra parte, en GIB6 hay una mayor neovascularización y además una reacción inflamatoria crónica, manifestada por la presencia de linfocitos, que son fundamentales para la cicatrización.

Las imágenes histológicas del GPG3 (**Figura 22 y 23**), revelaron gran cantidad de gránulos de biomaterial distribuidos por toda el área de la muestra, ligeramente teñidos por la hematoxilina, con una tonalidad rojiza en el MT. Se aprecia una mayor formación de tejido óseo inmaduro que rellenó tanto el defecto crítico como los espacios entre los gránulos del biomaterial en comparación con GC y GIB. Tampoco se encontró tejido inflamado y apenas había tejido fibroso. El biomaterial aparece como una masa amorfa y no se detectó actividad osteoclástica. Hay una gran cantidad de tejido conectivo reactivo formado por fibroblastos y fibras de colágeno, con algunas trabéculas jóvenes, cortas y aisladas cerca de la superficie externa e interior de la cortical, así como entre los gránulos de biomaterial. A diferencia de GC y GIB se aprecian osteoclastos, que nos confirman que se está produciendo la remodelación y formación ósea. El tejido colágeno y el hueso inmaduro se tiñeron de rojo con MT, mientras que el tejido muscular y el hueso lamelar maduro se tiñeron de verde.

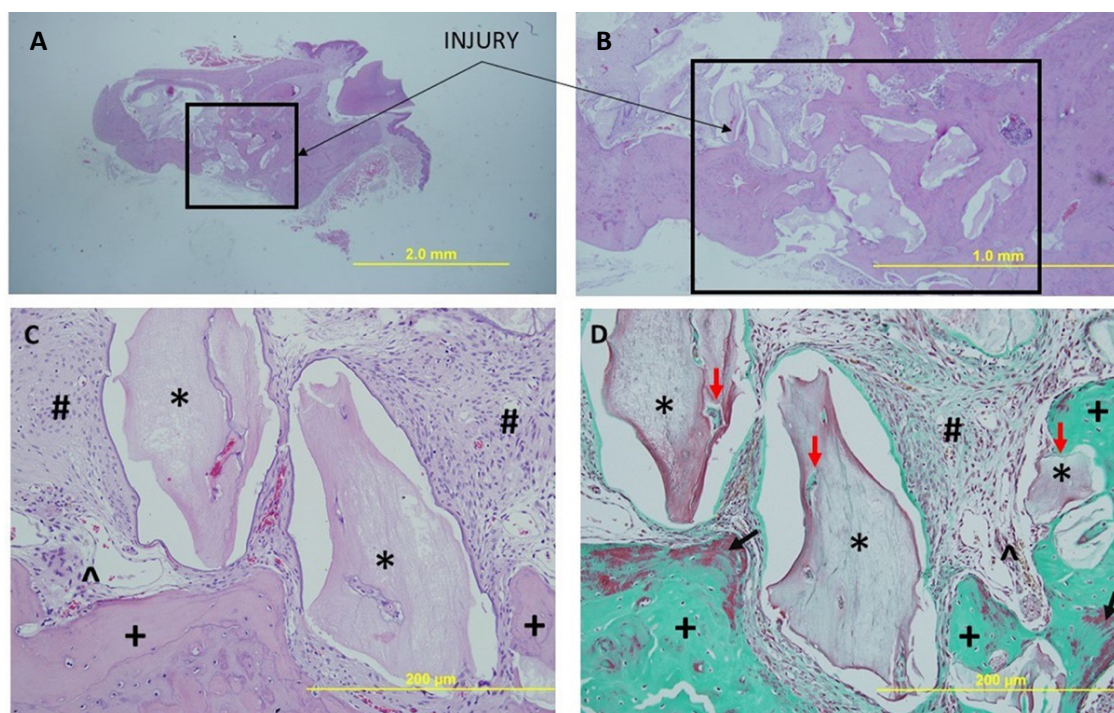


**Figura 22.** Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con PG (0,8 µg) a los tres meses (GPG3). Biomaterial \*; Tejido óseo neoformado que rellena el defecto y los espacios entre los gránulos de biomaterial (osteocitos y vasos) +; Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #; Hueso (osteoblastos y vasos) ^; Tinción MT D. 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).

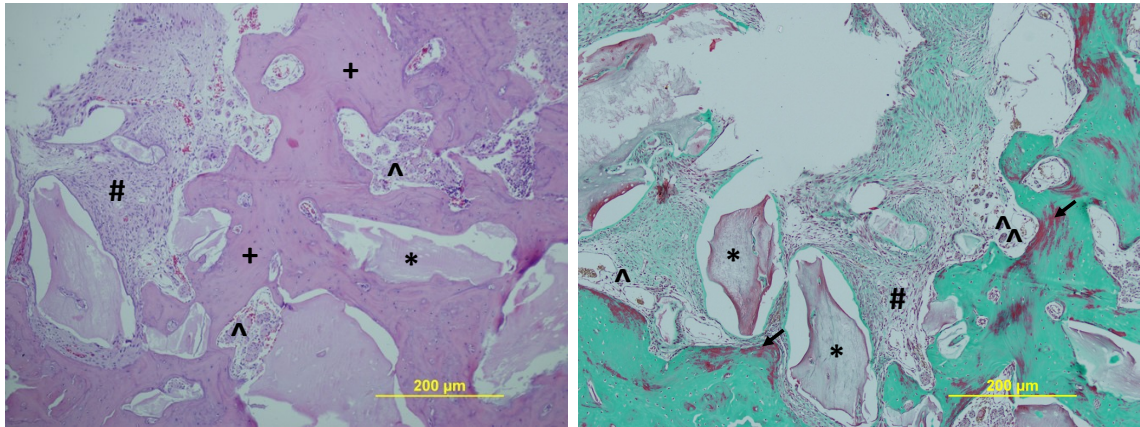


**Figura 23.** Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con PG (0,8 µg) a los tres meses (GPG3). Biomaterial \*; Tejido óseo neoformado que rellena el defecto y los espacios entre los gránulos de biomaterial (osteocitos y vasos) +; Tejido conjuntivo reactivo (colágeno y fibroblastos) #; Hueso (osteoblastos y vasos) ^; Tinción MT D. 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)

En el grupo GPG6 (**Figura 24**), se observó mayor grado de neoformación ósea como tejido óseo inmaduro, en comparación con las secciones histológicas para GC3, GC6, GIB3, GIB6 y el GPG3. Se destacó la mayor formación de tejido óseo en el defecto y dentro del canal medular en comparación con las secciones para GC3, GC6, GIB3, GIB6 y GPG3. No se detectó tejido osteoclástico o inflamado.

El porcentaje de biomaterial difirió entre GPG3 y GPG6, reabsorbiéndose casi todo el biomaterial a los seis meses. (**Figura 24D**).

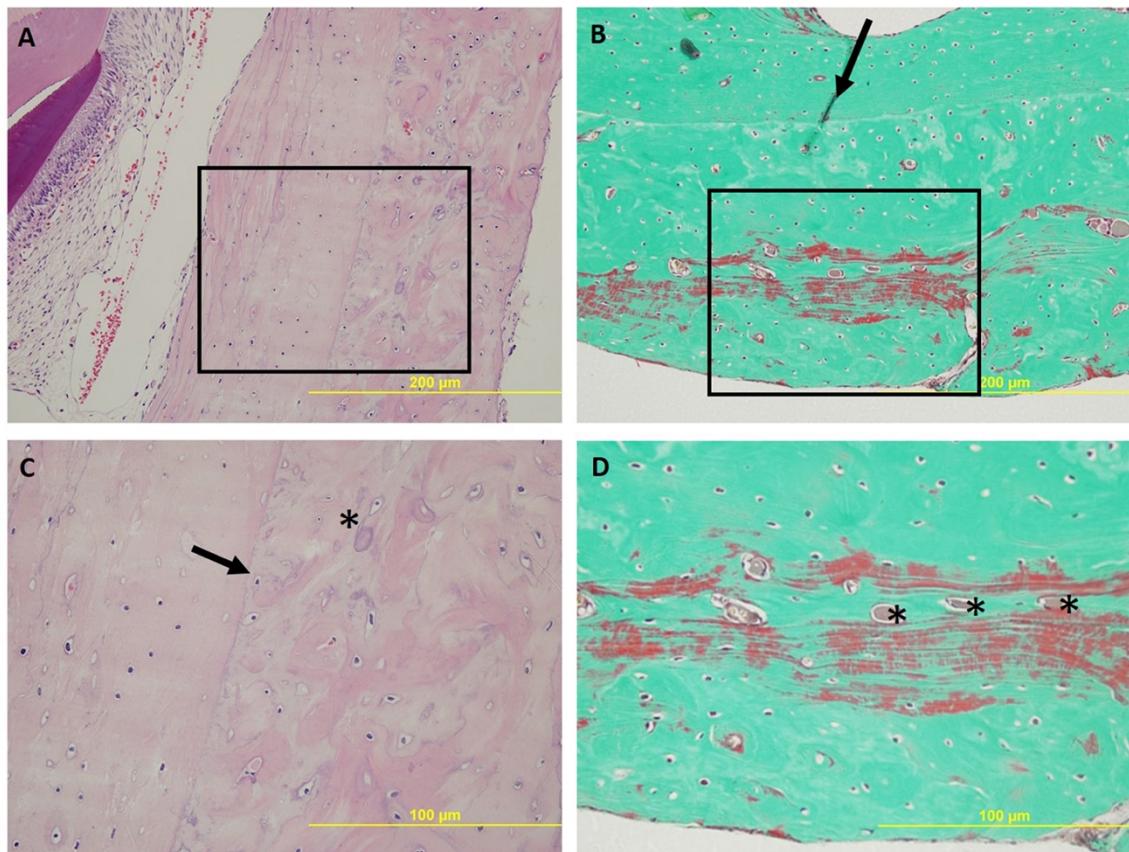


**Figura 24.** Imágenes teñidas con H&E y MT para el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico con PG (0,8 µg) a los seis meses (GPG6). Biomaterial \*; Tejido óseo neoformado que rellena el defecto y los pocos espacios entre los gránulos de biomaterial; borde del defecto (flecha 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.

ALP es un marcador de mineralización ósea, OCN de formación ósea y Runx2 de osteogénesis.

En las imágenes inmunohistoquímicas del grupo GC (**Figura 25**) 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 GIB3 y GIB6 (**Figura 26**) tampoco mostraron expresión significativa, mientras que GPG3 y GPG6, revelan áreas positivas más claras que reflejan la expresión de marcadores osteogénicos (**Figura 27**).

La expresión de ALP es mayor en el citoplasma de los osteoblastos en GPG3 (**Figura 27A**), y no hay expresión detectable en GPG6 (**Figura 27D**). Por su parte la expresión de ALP en GIB3 y GIB6 (**Figura 26 A y D**), no es destacable, igual que sucede con OCN de GIB3 y GIB6 (**Figura 26 B y E**) y Runx2 (**Figura 26 C y F**). Por su parte, los niveles de OCN a los tres meses en GPG3 (**Figura 27B**), son más altos que en GPG6 (**Figura 27E**). La tinción positiva de Runx2 (**Figura 27C**) y OCN (**Figura 27B**) se acumularon claramente en el colágeno recién formado y en el tejido óseo. El nivel más bajo de estos marcadores osteoblásticos y osteogénicos a los seis meses (**Figura 27 D,E,F**) puede deberse a que a los tres meses los defectos estaban cubiertos principalmente por hueso nuevo.

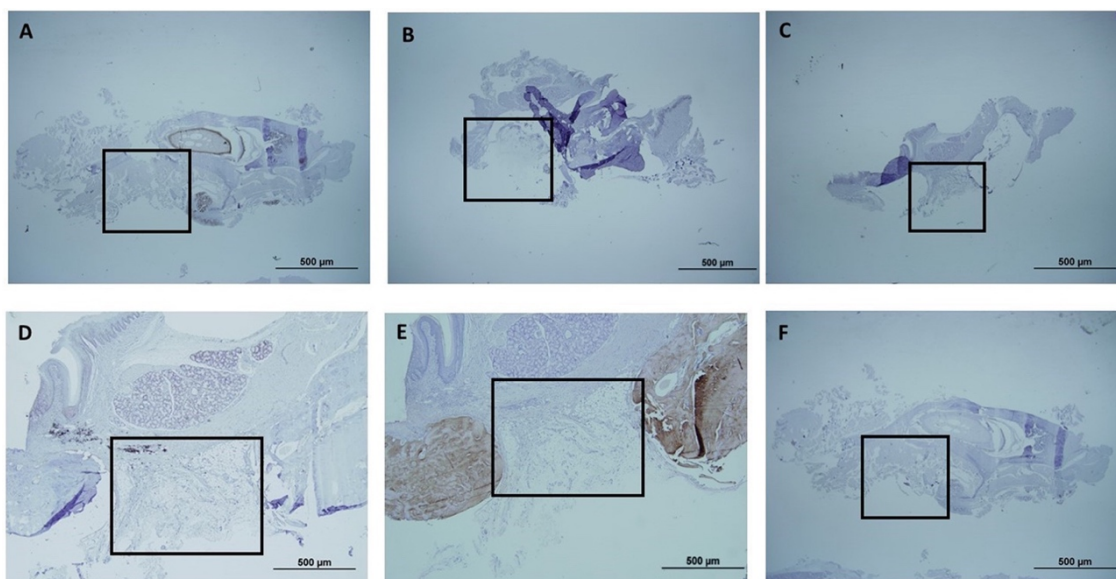


**Figura 25.** Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo control de defecto óseo mandibular de rata con membrana Evolution®. (GC) a los tres (GC3) y seis meses (GC6). Los resultados de inmunohistoquímica para la expresión proteica de osteogénesis en hueso a los tres y seis meses, (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.

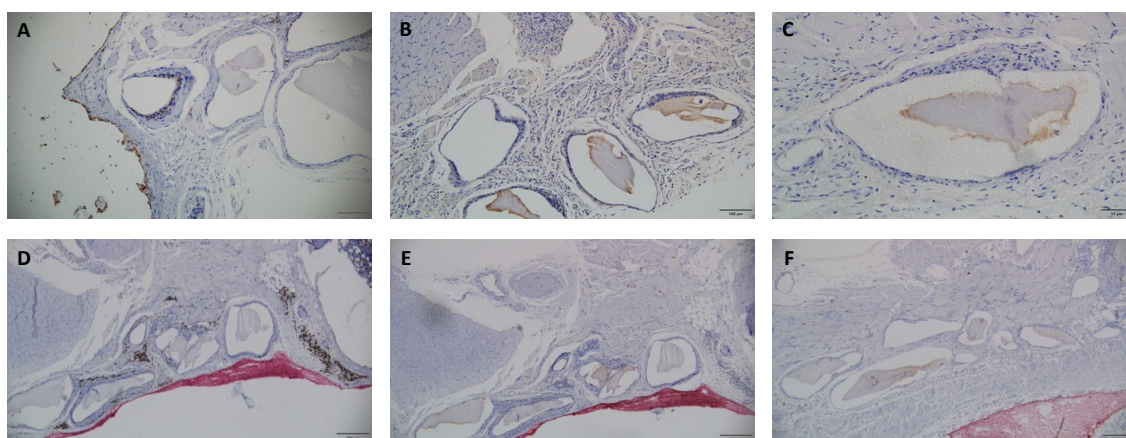


**Figura 26.** Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo de defecto óseo mandibular de rata con Iso-Bone® (GIB) a los tres (GIB3) y seis meses (GIB6). Los resultados de inmunohistoquímica para la expresión proteica de osteogénesis en hueso a los tres y seis meses, (A y D, ALP. 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.

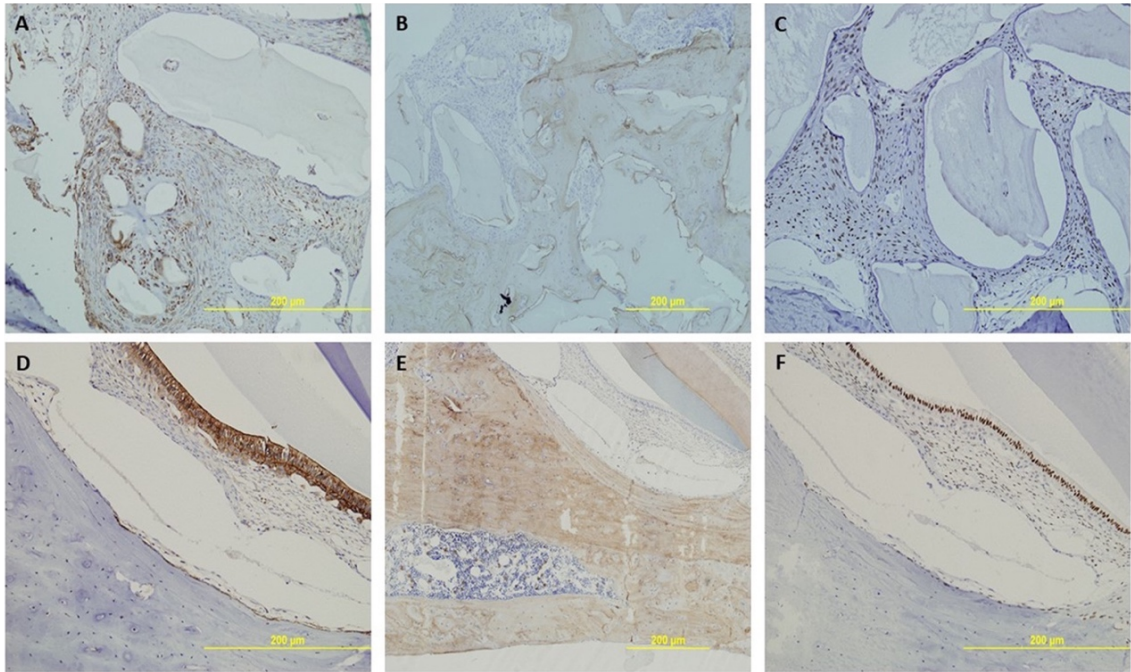


**Figura 27.** Tinción inmunohistoquímica de marcadores osteogénicos en el grupo de estudio de defectos óseos mandibulares en ratas con PG (0,8 µg) a los tres (GPG3) y seis meses (GPG6). Los resultados de inmunohistoquímica para la expresión proteica de osteogénesis en hueso a los tres meses: A, Expresión 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.

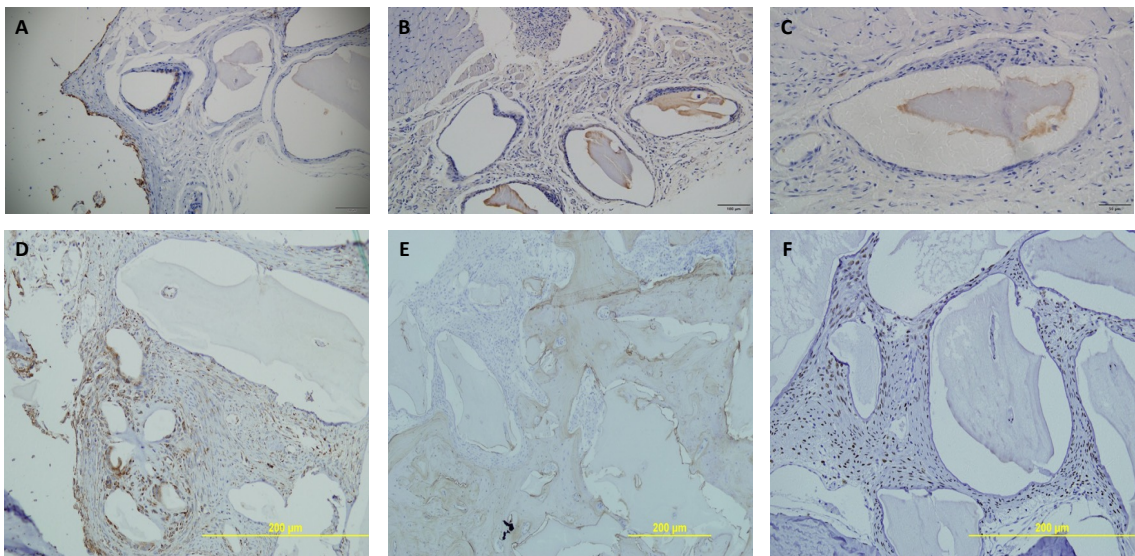


**Figura 28.** Comparación en tinción inmunohistoquímica de los marcadores osteogénicos en el grupo de estudio a los 3 meses (GPG3) y el grupo Iso-Bone® a los 3 meses (GIB3). Se aprecia una mayor expresión de ALP, OCN y RUNX2 en el GPG3 (D,E,F).

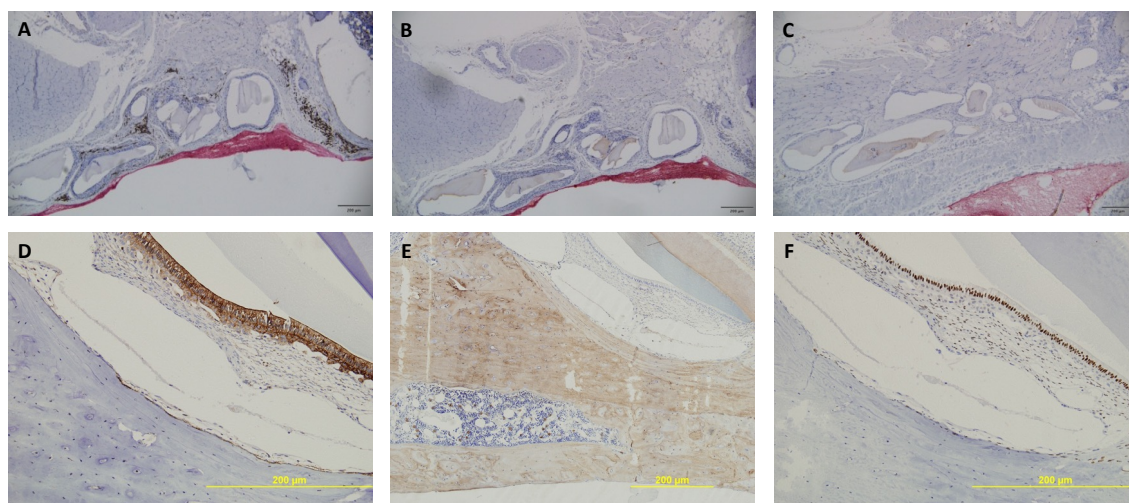


**Figura 29.** Comparación en tinción inmunohistoquímica de los marcadores osteogénicos en el grupo de estudio a los 6 meses (GPG6) y el grupo Iso-Bone® a los 6 meses (GIB6). A pesar de verse una ligera mayor inmunoreacción de ALP, OCN y RUNX en GPG6, D, E y F, respecto a GIB6, A, B, C, la inmunoreactividad es mínima en gran parte debido a la formación ósea que se ha producido ya.

## 4.5. RESULTADOS DE BMP-2

Los resultados BMP-2, obtenidos con ELISA, se recogen en la **Tabla 12** y **Figura 30**.

Observamos diferencias significativas en los valores de BMP-2 obtenidos en el grupo GPG3 ( $2438,008 \pm 69,80225$ ) con el resto de los grupos ( $p=0,0000001$ ), demostrándose un incremento de BMP-2 en este grupo (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365).

También existen diferencias significativas en los resultados de BMP-2 obtenidos en el grupo GPG6 ( $852,3583 \pm 36,82572$ ) respecto a GS, GC3, GC6 y GIB6 ( $p=0,0000001$ ) demostrando un aumento significativo de BMP-2 en este grupo (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365)

Por su parte, los resultados de BMP-2 obtenidos en los grupos GPG3 ( $2438,008 \pm 69,80225$ ) y GPG6 ( $852,3583 \pm 36,82572$ ) demostraron una significativa disminución de BMP-2 a los 6 meses de evolución postratamiento ( $p=0,0000001$ ) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365)

Los resultados de BMP-2 en el grupo GIB3 ( $892,5833 \pm 37,75467$ ) y GIB6 ( $265,1667 \pm 37,3419$ ), demostraron un incremento significativo de BMP-2 a los 3 meses de evolución postratamiento ( $p=0,0000001$ ) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365)

En el grupo GC, los resultados de BMP-2 obtenidos en GC3 ( $494,2017 \pm 25,12484$ ) y GC6 ( $306,915 \pm 13,83522$ ) mostraron un aumento significativo de BMP-2 a los 3 meses de evolución respecto a los 6 postratamiento ( $p=0,0000001$ ) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365).

Sin embargo, no se observan diferencias en los resultados obtenidos de BMP-2 en el GS con GC6 ni GIB6 (pNS) ni entre GPG6 y GIB3 (pNS).

Por tanto, la lesión ósea estimula la producción de BMP-2 y esta disminuye con el paso del tiempo (demostrado por el incremento de BMP-2 en GC3 y GIB3 con respecto al GS y por la ausencia de diferencias entre GS, GC6 y GIB6, así como por las diferencias obtenidas entre GC3 y GC6 y GIB3 y GIB6) (**Figura 30**).

La administración del tratamiento en los Grupos GPG incrementa 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 su concentración va disminuyendo significativamente con el paso del tiempo (demostrado por la mayor cantidad detectada en GPG3 con respecto a GPG6) (**Figura 30**).

**Tabla 12.** Resultados BMP-2

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

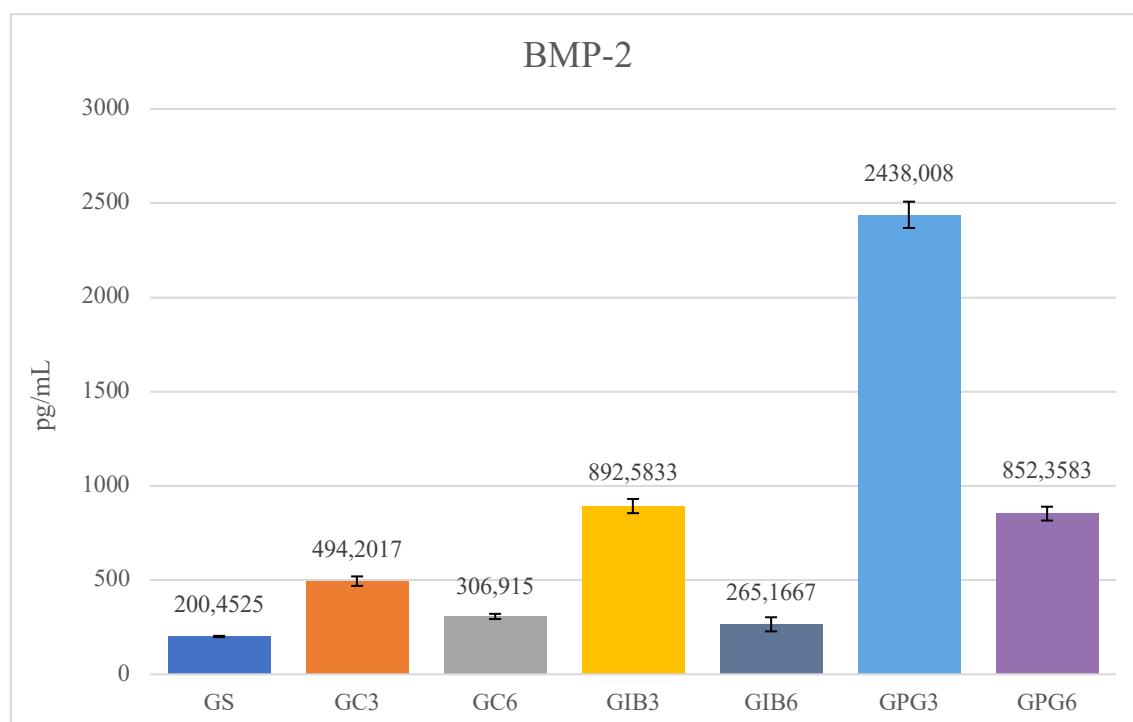


**Figura 30.** Resultados BMP-2

## 4.6. RESULTADOS TGF- $\beta$

Los resultados TGF- $\beta$ , obtenidos con ELISA, se recogen en la **Tabla 13** y **Figura 31**.

Observamos diferencias significativas, en los valores de TGF- $\beta$  obtenidos en el grupo GPG3 ( $1591,917 \pm 97,07067$ ) 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 ( $z=1,9755$ ) demostrándose un incremento de TGF- $\beta$  en este grupo ( $p=0,000002$ ) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ).

También existen diferencias significativas en los resultados de TGF- $\beta$  obtenidos en el grupo GPG6 ( $820,2833 \pm 46,50735$ ), observándose un incremento significativo 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  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ).

En el grupo GIB3 ( $281,25 \pm 19,34764$ ) los resultados de TGF- $\beta$  presentaron diferencias significativas con el grupo GPG3 ( $z= 3,3089$ ) y GPG6 ( $z=2,4199$ ) mientras que GIB6 ( $368,6333 \pm 19,00733$ ) tan solo mostró diferencias significativas con GPG3 ( $z=1,9755$ ), ( $p=0,000002$ ) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ) obteniéndose menores concentraciones de TGF- $\beta$  en los GIB respecto GPG.

En los resultados de TGF- $\beta$ , el grupo GC3 ( $152,6333 \pm 12,56738$ ) presentó diferencias significativas con GPG3 ( $z=4,4448$ ) y GPG6 ( $z=3,5558$ ), obteniéndose mayores cantidades de TGF- $\beta$  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- $\beta$  en este último ( $z=2,7163$ ) ( $p=0,000002$ ) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ).

Por su parte, los resultados de TGF- $\beta$  obtenidos en los grupos GPG3 y GPG6, no demostraron un significativo aumento de TGF- $\beta$  a los 3 meses de evolución postratamiento respecto a los 6 (pNS).

Del mismo modo, no se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos de TGF- $\beta$  entre GPG6 y GIB6 y GC6, ni tampoco entre GIB3 y GIB6 ni entre el grupo GC3 con GC6 (pNS).

Por tanto, Proteo-Graft® (Noricum S.L) estimula la producción de TGF- $\beta$  y este estímulo deja de apreciarse a los 6 meses de evolución, aunque sigue presentando valores significativamente superiores a los detectados en GS, GC3 y GIB3 y con valores cercanos a la significación con GC6.

**Tabla 13.** Resultados TGF- $\beta$

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

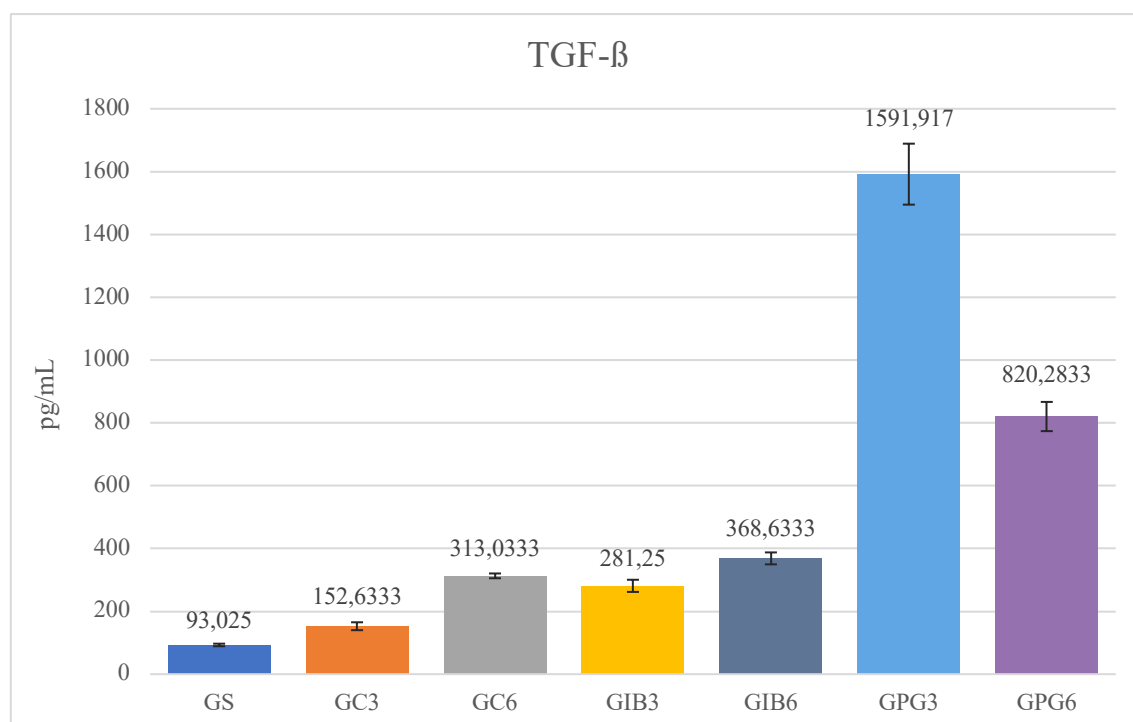


**Figura 31.** Resultados TGF- $\beta$

## 4.7. RESULTADOS DE RANTES/CCL5

Los resultados RANTES/CCL5, obtenidos con ELISA, se recogen en la **Tabla 14** y **Figura 32**.

Observamos un incremento significativo de RANTES/CCL5 en el grupo GPG3 ( $3232,863 \pm 48,73147$ ) en comparación con el resto de los grupos ( $p=0,0000001$ ), (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365).

En el grupo GPG6 ( $464,545 \pm 2089386$ ), los resultados de RANTES/CCL5 siguen siendo significativamente superiores a los detectados en el resto de los grupos a los 6 meses, pero sus valores han disminuido significativamente al compararlos con los grupos a los 3 meses ( $p=0,0000001$ ) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365).

Los resultados de RANTES/CCL5 en el grupo GIB3 ( $2028,342 \pm 50,07379$ ) y GIB6 ( $266,245 \pm 4,723577$ ), demostraron un incremento significativo de RANTES/CCL5 a los 3 meses de evolución postratamiento y una significativa disminución de los mismos a los 6 meses ( $p=0,0000001$ ) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365).

Lo mismo observamos en el grupo GC, los resultados de RANTES/CCL5 obtenidos en GC3 ( $1011,395 \pm 26,83012$ ) y GC6 ( $231,8717 \pm 3,528278$ ) mostraron un aumento significativo de RANTES/CCL5 a los 3 meses de evolución respecto a los 6 postratamiento ( $p=0,0000001$ ) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365).

En GC3 ( $1011,395 \pm 26,83012$ ) se observan diferencias significativas respecto GS ( $212,75 \pm 34,63564$ ) (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test - Critical Value = 4,4365), sin embargo, no se observan diferencias en los resultados obtenidos de RANTES/CCL5 en el GS con GC6 ni GIB6 (pNS) ni entre GPG6 y GIB3 (pNS).

Por tanto, la lesión ósea estimula la producción de RANTES/CCL5 y esta disminuye con el paso del tiempo (demostrado por el incremento de RANTES/CCL5 en GC3 y GIB3 con respecto al GS y por la ausencia de diferencias entre GS, GC6 y GIB6, así como por las diferencias obtenidas entre GC3 y GC6 y GIB3 y GIB6) (**Figura 27**).

La administración del tratamiento en los Grupos GPG incrementa la cantidad de RANTES/CCL5 (demostrado por el incremento de RANTES/CCL5 en GPG3 y GPG6 con respecto a GS, GC3, GC6, GIB3 y GIB6) y su concentración va disminuyendo significativamente con el paso del tiempo (demostrado por la mayor cantidad detectada en GPG3 con respecto a GPG6) (**Figura 27**).

**Tabla 14.** Resultados RANTES/CCL5

|                           | GS                   | GC3                    | GC6                    | GIB3                   | GIB6                  | GPG3                   | GPG6                  |
|---------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>RANTES<br/>(pg/mL)</b> | 212,75<br>± 34,63564 | 1011,395<br>± 26,83012 | 231,8717<br>± 3,528278 | 2028,342<br>± 50,07379 | 266,245<br>± 4,723577 | 3232,863<br>± 48,73147 | 464,545<br>± 20,89386 |

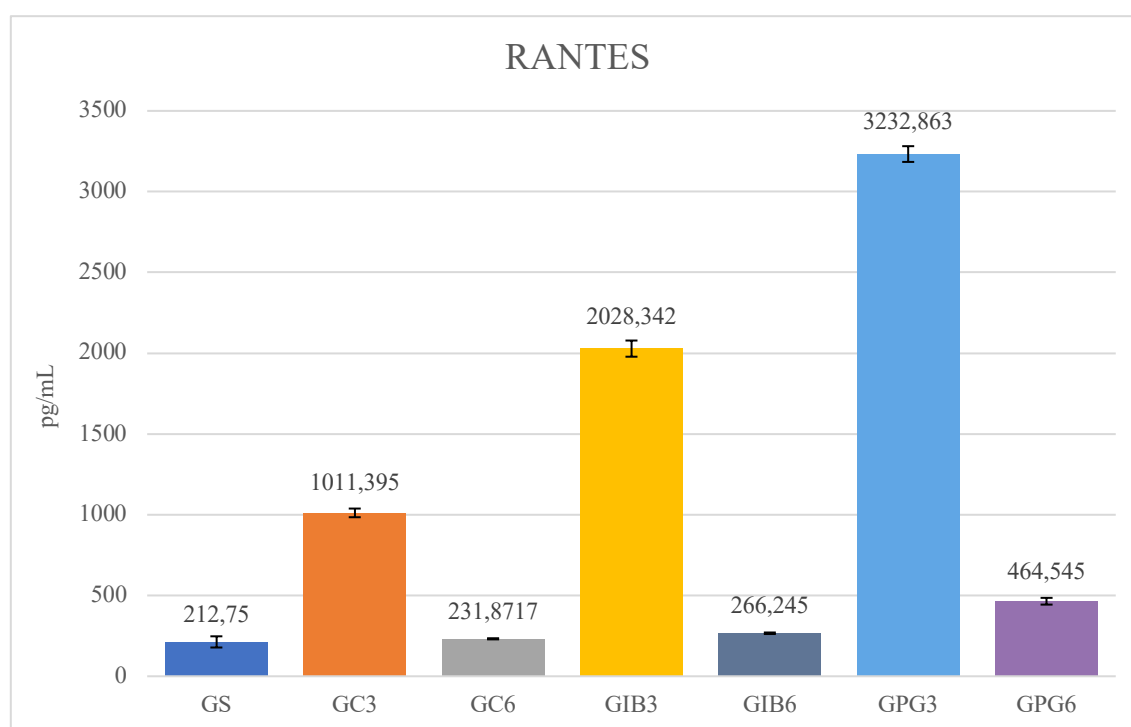


**Figura 32.** Resultados RANTES/CCL5

## 4.8. RESULTADOS DE ENDOMUCINA

Los resultados ECM, obtenidos con ELISA, se recogen en la **Tabla 15** y **Figura 33**.

Se observan diferencias significativas, en los valores de ECM obtenidos en el grupo GPG3 ( $71,47334 \pm 4,817714$ ) al compararlos con los resultados de grupos GS ( $z=3,9755$ ), GC3 ( $z=2,7409$ ), GC6 ( $z=4,6917$ ), GIB3 ( $z=2,0248$ ) y GIB6 ( $z=3,2842$ ) demostrándose un incremento de ECM en este grupo ( $p=0,000011$ ) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ).

Es importante destacar que no existen diferencias significativas entre los grupos GPG3 y GPG6 ( $p\text{NS}$ ), y que los valores detectados en este último son significativamente superiores a los observados en los grupos GS ( $z= 3,00376$ ), GC6 ( $z=3,6052$ ) y GIB6 ( $z=2,1977$ ) ( $p=0,000011$ ) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ).

En el grupo GIB3 ( $27,54333 \pm 3,389076$ ) los resultados de ECM presentaron diferencias significativas con el grupo GPG3 ( $z=2,0248$ ) mientras que GIB6 ( $16,83333 \pm 0,7419195$ ) mostró diferencias significativas con GPG3 ( $z=3,2842$ ) y GPG6 ( $z=2,1977$ ), ( $p=0,000011$ ) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ) obteniéndose menores concentraciones de ECM en los GIB respecto GPG.

El grupo GC3 ( $22,25 \pm 4,106123$ ) presentó diferencias significativas con GPG3 ( $z=2,7409$ ), mientras que el grupo GC6 ( $6,176667 \pm 0,6316522$ ) presentó diferencias significativas con el grupo GIB3 ( $z=2,66699$ ) y GPG6 ( $z=3,6052$ ) ( $p=0,000011$ ) (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) - Regular Test  $z\text{-value} > 1,9600$  Bonferroni Test  $z\text{-value} > 3,0381$ ).

Se podría concluir que la lesión ósea, por sí misma, no estimula producción de ECM, como demuestra la ausencia de diferencia significativa entre CG3 y GC6 entre sí y con el Grupo Simulado. Sin embargo, la administración de tratamiento en Grupos GPG,

incrementa significativamente la ECM, la cual disminuye a los 6 meses, aunque sigue siendo significativamente superior respecto GS, GC6 y GIB6.

Además, a pesar de que en el Grupo GIB3 hay un incremento de ECM respecto a GS y GC6, solo los grupos tratados con BMP-2 incrementan ECM de forma generalizada.

**Tabla 15.** Resultados ECM

|                               | GS                   | GC3                 | GC6                     | GIB3                   | GIB6                    | GPG3                   | GPG6                   |
|-------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>ENDOMUCINA<br/>(pg/mL)</b> | 7,2125<br>± 0,413952 | 22,25<br>± 4,106123 | 6,176667<br>± 0,6316522 | 27,54333<br>± 3,389076 | 16,83333<br>± 0,7419195 | 71,47334<br>± 4,817714 | 36,84833<br>± 2,250125 |

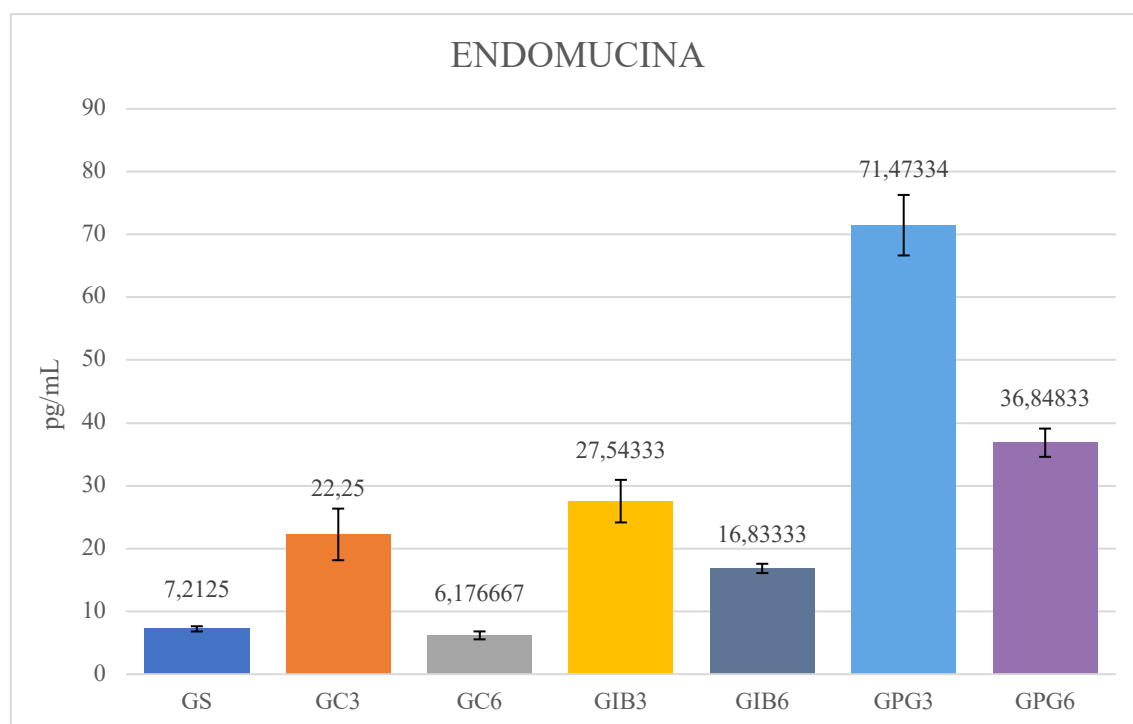


**Figura 33.** Resultados ECM





## 5. DISCUSIÓN





Las lesiones y trastornos relacionados con el hueso, pérdida de masa ósea y fracturas por fragilidad, suponen un motivo de preocupación cada vez mayor, en gran parte motivado por una población de mayor edad que implica, por una parte, una peor evolución y curación de la fractura, así como un aumento de riesgo de sufrirla (128). Además, un porcentaje importante de ellas, entre el 5 y el 50%, no evoluciona de manera favorable espontáneamente y requieren tratamiento quirúrgico (129).

Esta opción es costosa, y la creciente demanda supone un problema financiero importante. Hasta hace pocos años, los injertos óseos eran la mejor opción, siendo el autoinjerto la técnica ideal, pero su baja disponibilidad y la morbilidad quirúrgica hizo necesaria la búsqueda de alternativas como eran el autoinjerto y el xenoinjerto, cuyos principales riesgos eran la transmisión de enfermedades y el rechazo del injerto (130).

Para superar estas desventajas, el futuro terapéutico pasaría por la ingeniería de tejido óseo basada en el desarrollo de biomateriales (131). La biocompatibilidad, factores osteoinductivos, células osteoprogenitoras, una matriz que de soporte y un adecuado aporte sanguíneo, son requisitos fundamentales en los biomateriales involucrados para conseguir una adecuada regeneración ósea (132).

En nuestro estudio hemos querido evaluar la efectividad de una matriz tridimensional experimental, en la regeneración de un defecto mandibular crítico en rata. Los modelos animales, basados en lesiones de tamaño crítico, son válidos para estudiar defectos óseos en diferentes localizaciones, como el cráneo o la mandíbula.

Un defecto o daño óseo crítico se define como aquel que regenerará menos del 10% de hueso durante la vida del animal, y en la mandíbula de la rata será el correspondiente a un área de más de 4 mm de diámetro. (133)

Se han descrito diferentes modelos experimentales, basados en mandíbula de rata, para la regeneración ósea, porque los defectos ocasionados no mostraron regeneración espontánea y, por tanto, son válidos para estudiar materiales de neoformación ósea y sustitutos del hueso. (134)

El modelo experimental utilizado en nuestro estudio, un defecto de 5×2 mm (diámetro × profundidad) en la mandíbula de rata próximo a la zona alveolar, es óptimo para investigar la eficacia del biomaterial experimental en la osteogénesis, además, es fácilmente reproducible, tiene un alto rendimiento y es económico.

El biomaterial debe ser poroso, reabsorbiéndose progresivamente y siendo sustituido por tejido óseo neoformado. Este proceso sigue una evolución concéntrica, desde la periferia hasta el centro del material implantado. Los resultados del presente trabajo están en concordancia con este proceso. Tras la implantación, el material se degrada progresivamente, transcurridos los tres y seis meses posteriores a la cirugía, comenzando en la periferia del material implantado hasta su núcleo.

En el GC cubrimos la lesión con la membrana Evolution® (OsteoBiol® - Tecnooss, Turin, Italy), cuya porosidad y contenido en colágeno, hacen de ella un biomaterial válido para el anclaje y proliferación de osteoblastos y la regeneración ósea. El colágeno forma parte de gran cantidad de biomateriales porque la resistencia que aporta al hueso neoformado, proporciona un entorno ideal para la formación de hueso, de acuerdo a Wang et al.(135). Evolution® posee una composición similar al hueso autógeno y será gradualmente sustituido por hueso nuevo en su interior y alrededor. Este GC nos permitirá valorar el poder de regeneración ósea en una lesión crítica de la membrana Evolution® por sí sola, ya que posteriormente irá incorporada en los andamios utilizados en GIB y GPG.

En el GIB, en el defecto crítico utilizamos Iso-bone® y éste posteriormente será recubierto con la membrana Evolution®. Este biomaterial, está constituido por gránulos irregulares de bordes redondeados y microestructura, macro y microporosa, similar a otros sustitutos óseos comerciales derivados del hueso bovino, 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.

Ha sido elegido para valorar su bioactividad y capacidad osteoconductora y osteoinductora, estimulando el crecimiento de hueso al entrar en contacto con la superficie. Su micro y macroporosidad, similar al hueso esponjoso humano, favorece un entorno fisiológico para que la remodelación ósea sea indistinguible al hueso natural vecino. Queremos valorar, respecto al GPG, qué capacidad tiene este biomaterial por sí solo, ya que este andamio forma parte del GPG, en la regeneración ósea del defecto crítico, valorar sus propiedades osteogénicas y su capacidad de degradación (reabsorción).

En el GPG, cubrimos el defecto crítico con Proteo-Graft® (Noricum S.L), que corresponde al biomaterial utilizado en nuestro modelo experimental, y éste posteriormente será recubierto con la membrana Evolution®. Está constituido por Iso-Bone® combinado con Quitosano, Trehalosa y rhBMP-2.

Quitosano es un polímero natural que debido a su baja resistencia hace que suele ser utilizado en combinación con otros biomateriales. El motivo de la utilización en nuestro andamio es, porque además de tener buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, Cheng et al. (136) informaron que andamios en los cuales se añade quitosano, parecían imitar la matriz extracelular y promover la diferenciación de células madre para facilitar la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica.

Nuestro propósito con la utilización de rhBMP-2 en el biomaterial, aprobada por la FDA, es valorar si contribuye a la osteoregeneración de manera eficaz y si ofrece una mejor formación de tejido óseo, integración y reabsorción, en el defecto crítico en comparación con los GC y GIB. No obstante, sabemos que la dosis de rhBMP-2 es difícil de ajustar, y que dosis elevadas o una rápida liberación de rhBMP-2, puede llevar a efectos indeseados y complicaciones. Daisuke Tateiwa et al. (137) elaboraron un biomaterial compuesto por HA/  $\beta$ TCP sobre el que añadieron BMP-2 para evaluar la cinética de liberación sostenida y evitar la inflamación, edema y formación de hueso ectópico derivados de una abrupta liberación de BMP-2.

Es por esto que se están investigando diversos biomateriales que se puedan añadir para asegurar una liberación sostenida de rhBMP-2. Sihan Lin et al. (138) para abordar la limitación de una escasa eficacia a dosis bajas de BMP-2 y las complicaciones a dosis altas, fabricaron un hidrogel cargado con BMP-2 + Mg donde observaron que el Mg actuaba como impulsor de energía y mejoraba la osteoconductividad de BMP-2 a dosis bajas.

Para conseguir una mayor estabilidad de rhBMP-2, los biomateriales suelen ser sometidos a liofilización, sin embargo, esto puede llevar a la pérdida de las propiedades de rhBMP-2. Diversos sacáridos, entre ellos la Trehalosa, motivo por el que forma parte de nuestro andamio, se han propuesto como alternativa para actuar como estabilizadores y evitar la pérdida de propiedades tras la desnaturalización.

Así, Jun Zhao et al. (139), observaron que la adición de Trehalosa en un andamio constituido por HA/BMP-2, preservaba la bioactividad de BMP-2 durante la liofilización y lograba además una liberación más sostenida.

El análisis descriptivo mediante la microCT nos permite observar cómo se va produciendo una desintegración progresiva del biomaterial, acompañado de la neoformación de tejido óseo. En GPG3 (**Figura 17 E, página 91**) aún sigue observándose el defecto crítico y como el biomaterial ocupa la zona lesionada sin aparente integración.

En GPG6 (**Figura 17 F, página 91**) es más visible la osteointegración siendo prácticamente indistinguible el biomaterial del hueso neoformado.

En el GC, a los 3 y 6 meses (**Figura 15 A, B, página 90**) observamos que no se ha producido ningún tipo de regeneración ósea, cumpliéndose así las condiciones de lo que es una lesión ósea crítica, evidenciándose la propia lesión. En el GIB, a los 3 y 6 meses (**Figura 16 C, D, página 91**) el biomaterial no se ha integrado de manera definitiva en el hueso, pudiendo apreciarse como una masa que rellena el defecto crítico, pero sin que haya una regeneración ósea completa, aunque se vislumbra un proceso regenerativo incipiente.

Observamos por tanto como, el biomaterial se degrada gradualmente durante un periodo de 3 a 6 meses posteriores a la cirugía. Sin embargo, Pengfei Li et al. (140), en su estudio observaron regeneración ósea a partir de la semana 6, obteniendo una degradación casi total del biomaterial a las 12 semanas siendo sustituido por hueso nuevo. Para ello realizaron un defecto mandibular en ratas y utilizaron una matriz ósea bovina acelular tras ser tratada con NaOH. En el Grupo Control, al igual que sucede en nuestra investigación, a las 6 y 12 semanas no observaron mediante microCT modificación en la densidad ósea ni en volumen de hueso nuevo. Sin embargo, en el Grupo Experimental a las 6 semanas se comienza a generar una pequeña cantidad de hueso nuevo desde el borde del defecto y a las 12 semanas el biomaterial se había degradado casi en su totalidad obteniendo una importante regeneración ósea.

Según nuestra experiencia, así como en la revisión bibliográfica que hemos realizado a lo largo de todo nuestro estudio, no encontramos justificación para estos resultados tan buenos sobre un defecto crítico en un periodo de evolución tan corto.

Del mismo modo Yidi Zhang et al. (141) valoraron la regeneración ósea por micro-CT a las 4 y 12 semanas. En su estudio utilizaron un biomaterial basado en PLGA y  $\beta$ -TCP en el que cargaron por una parte GO y BMP-2 de manera combinada, y por otra GO de manera aislada. En micro-CT a las 4 semanas en el Grupo Control no observaron apenas hueso, sin embargo, lo más destacable, es que en el Grupo Estudio, tanto el cargado con

BMP-2 como el aislado con GO, no obtuvieron diferencias significativas. Hubo que esperar hasta las 12 semanas para comenzar a ver una mayor formación de hueso en los grupos con biomaterial, apreciándose mayor regeneración, sin ser completa, en el grupo que incorporaba BMP-2.

La regeneración ósea en un defecto crítico está por tanto estrechamente relacionada, por una parte, con la intervención o no sobre el defecto crítico mediante biomateriales y el tipo de biomaterial utilizado, y por otra por el tiempo que permanece este en la lesión, puesto que se aprecia que a mayor tiempo en la lesión, mayor será la regeneración ósea, como hemos demostrado en nuestro estudio. Céline Stuz et al. (142), evaluaron durante 90,120 y 150 días mediante micro-CT, la regeneración ósea tras la utilización de un biomaterial con membrana de PCL sobre el cual añadieron BMP-2 y MSC en un grupo de ratones a los que se le realizó una incisión gingival. A otro grupo no se les implantó biomaterial y a otro solo PCL y MSC. Observaron que la lesión mejoró significativamente conforme evolucionó el tiempo de implantación y más concretamente en el grupo tratado con BMP-2.

Sin embargo, la remodelación ósea no fue completa en ninguno de los casos. Esta técnica permitió por tanto valorar el relleno de la lesión, pero no aportaba información sobre la calidad del tejido óseo (si el tejido nuevo es tan duro y resistente como el original). Esto mismo sucedía en el trabajo realizado por Yidi Zhang et al. (141) donde tuvieron que recurrir a técnicas cuantitativas para confirmar esta regeneración ósea.

Por tanto, observamos que la microCT no permite detectar la evolución de la matriz conectiva, ni la evolución temporal de la degradación del biomaterial, así como la dispersión/neoformación ósea. Para solucionar estos problemas, recurrimos al análisis histológico, y los datos obtenidos han mostrado importantes diferencias histológicas entre el grupo GC, GIB y el grupo GPG.

A pesar de los avances en métodos no invasivos, la histología sigue siendo el mejor método para analizar y cuantificar el hueso a nivel de tejido y células. En el campo de la regeneración ósea es esencial para valorar la seguridad y el mecanismo de acción de las

nuevas técnicas, especialmente de los biomateriales, para valorar así su idoneidad en base a la relación entre su reabsorción y formación de hueso en el proceso de remodelación ósea (143).

En nuestro estudio, histológicamente, en el GC3 y GC6 (**Figura 18 y 19, página 92**), no se aprecian signos de regeneración ósea, corroborado por las pruebas radiológicas, y los osteocitos que rodeaban la lesión se necrosaban y morían por la hipoxia continuada y la ausencia de capilares.

En el GIB observamos que en el GIB6 (**Figura 21, página 94**) respecto al GIB3 (**Figura 20, página 93**) que alrededor del defecto crítico hay un engrosamiento de la pared con más cantidad de colágeno y menos fibroblastos, con linfocitos y vasos. En el tejido conjuntivo que encontramos entre los defectos críticos, también hay más cantidad de colágeno que fibroblastos, menor cantidad de vasos (ya que no es necesario a los 6 meses una angiogénesis tan intensa como al comienzo de la lesión), pero de mayor calibre y gran cantidad de linfocitos que evidencian una reacción inflamatoria.

A diferencia de esto, los resultados observados en los grupos estudio, evidenciaron un aumento de densidad del área de lesión, no encontrándose signos de inflamación, ni de reacción alérgica.

En GPG3 (**Figura 22 y 23, páginas 95 y 96**) se detecta actividad osteogénica, hay alta celularidad, y se aprecian gránulos de biomaterial rodeados por trabéculas de matriz osteoide donde se incluyen algunos osteoblastos (que la empiezan a calcificar), con detección también de células precursoras de osteoblastos y osteocitos maduros en las líneas de osificación.

El GPG6 (**Figura 24, página 97**) revela una estructura ósea organizada, con regeneración completa y una estructura haversiana bien vascularizada. Hay hueso adulto, que mantiene las dimensiones originales, y dos zonas diferenciadas, tejido óseo maduro caracterizado por su estructura ósea (sustancia intersticial mineralizada) que se organiza formando laminillas óseas. Hay osteocitos en los espacios de las lagunas, dispuestos, como las

laminillas de manera concéntrica y paralela. Hay tejido óseo neoformado que contiene una proporción relativamente mayor de osteocitos, con lagunas de tamaño más grandes que las que aparecen en el hueso maduro, y las fibras de colágeno siguiendo varias direcciones.

En GPG6 se aprecia una evolución de la regeneración de los defectos más resolutive que en GIB6, donde se sigue observando el proceso de regeneración tanto en la pared del defecto como en el tejido conjuntivo circundante: persiste reacción inflamatoria con linfocitos, proliferación vascular y colágena.

Confirmamos, por tanto, por una parte, que la ausencia de tratamiento sobre la lesión crítica no produce regeneración ósea de manera espontánea, y, por otro lado, que la utilización del biomaterial aumenta su eficacia conforme pasa el tiempo, obteniendo una mayor osteointegración y reabsorción del biomaterial a la par que se forma nuevo tejido óseo.

Tian Ding et al. (144), valoraron la regeneración ósea tras generar un defecto periodontal en ratones, utilizando un biomaterial que incluía BMP-2 y FGF en una estructura cubierta por PLGA y PLLA. Como principal limitación de este artículo cabría destacar la duración de este, ya que se valoran los resultados al cabo de 1 semana y 2 semanas. No obstante, en el grupo tratado con BMP-2 y FGF a las 2 semanas, se observa a nivel histológico como comienza a rellenarse el defecto óseo con osteoblastos de manera significativa, respecto a la semana 1 y al Grupo Control.

Del mismo modo que es importante detectar la presencia de osteoblastos para la regeneración del defecto, también debe haber osteoclastos que favorezcan la remodelación ósea mediante la reabsorción del biomaterial. Así, Hongzhou Shen et al. (145), compararon la remodelación y regeneración ósea en cirugía reconstructiva en ortodoncia, tras utilizar un xenoinjerto de DBB y un andamio fabricado a partir de CPC sobre el que se añadió BMP-2. Los resultados histológicos en su estudio demostraron que CPC-BMP-2 favoreció una regeneración ósea mayor, más ordenada y de mayor calidad, en gran parte por el mayor número de osteoclastos, que favorecieron una mejor

remodelación ósea reabsorbiendo el CPC, frente al xenoinjerto de DBB, que indujo menores cantidades de hueso y además era inmaduro.

Las MSC han demostrado ser vitales en la homeostasis esquelética y reparación ósea, guiando la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos mediante factores de transcripción. Li Wang et al. (146) utilizaron un andamio constituido por un hidrogel, a su vez formado por diversos biomateriales (HA, Seda, Quitosano y Polietilglicol), sobre el cual añadieron hucMSC. Crearon un defecto sobre el condilo femoral de una rata y en un grupo añadieron solo el hidrogel, en otro hidrogel/huMSC y otro fue el Grupo Control. En la histología, al cabo de 30,60,90 días, en el Grupo Control, no se observó regeneración ósea, tan solo una fina capa de tejido fibroso. En los grupos que se utilizó el hidrogel, no se observó infección, necrosis o inflamación, por lo que tenía buena biocompatibilidad y no generaba rechazo inmunológico y, además, favorecía la cicatrización ósea. Lo destacable, es que si se combina con huMSC, mejora esta curación ósea al favorecer el depósito de BMP-2, maduración del colágeno y mejora de la angiogénesis.

Las investigaciones en remodelación ósea a partir de biomateriales combinados fundamentalmente con MSC, BMP-2 y factores favorecedores de la angiogénesis (VEGF), entre otros, suponen los principales pilares en la investigación de la regeneración ósea y una gran apuesta de futuro. Sin embargo, cada vez se está investigando otras posibles alternativas. Así, por ejemplo, Ibrahim FM et al. (147), plantearon que el uso de PSO promueve la activación de osteoblastos y la remodelación ósea. Para ello añadieron PSO a una GS. Crearon 3 defectos óseos en la tibia de conejos, rellenando uno con GS/PSO, otro solo GS y otro Grupo Control en el que no se añadió nada. A la valoración histológica, al cabo de 2 y 4 semanas, en el grupo GS/PSO se formaron trabéculas óseas más gruesas y el número de osteoblastos fue mayor, respecto a los grupos GS y Grupo Control, favoreciendo así la remodelación ósea y la creación de hueso más compacto.

El biomaterial utilizado en nuestro estudio, Proteo-Graft® (Noricum S.L), contiene rhBMP-2, perteneciente a la superfamilia TGF- $\beta$ , e investigamos su concentración en los diferentes grupos.

La superfamilia TGF- $\beta$  engloba más de 40 miembros y está dividido en varias subfamilias entre las cuales se encuentra BMP y TGF- $\beta$  que contiene 3 isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3). La isoforma TGF- $\beta$ 1 es la más abundante en la matriz ósea y durante la remodelación ósea puede activarse mediante la escisión de LAP. Una vez activa puede enviar señales para reclutar MSC en la superficie ósea para la diferenciación de osteoblastos y formación de hueso nuevo (148).

Ambos tienen como intermediario común la proteína Smad, con importante función en la biología ósea. Ming-Li Zou et al. (58), explicaron que además de la vía BMP, Smad promueve la formación de osteoblastos a partir de TGF- $\beta$  mediante la fosforilación de Smad 2/3 y su unión con Smad 4 para posteriormente trasladarse al núcleo, pero que además, el complejo Smad 2/3, a través de la activación de TRAF6, regulaba la diferenciación de osteoclastos.

BMP por su parte activará Smad 1/5/8, que se unirán a Smad 4 para trasladarse al núcleo y actuar frente a los factores de transcripción inductores de osteogénesis Runx2 y Osx1.

Se ha demostrado que la administración de BMP-2 favorece la angiogénesis y la osteogénesis contribuyendo a la regeneración ósea. Hao Yao et al. (66) en su estudio probaron que BMP-2 incrementaba la formación de hueso nuevo tras un defecto mandibular a través de osificación intramembranosa por la formación de vasos tipo H, un tipo de vasos que expresan CD31 y ECM, claves para la regeneración ósea.

In vivo se cree que este aumento de vasos se realiza mediante determinadas vías paracrinas induciendo la formación de factores de crecimiento angiogénicos, que derivan en una mayor producción de osteoblastos y BMP-2, mediante un acoplamiento bidireccional. Esto resulta en una angiogénesis inicial crucial en la osteogénesis (149)

BMP-2 es una molécula de señalización extracelular, factor autocrino/paracrino in vivo que promueve la osteoregeneración, induciendo la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea al regular y activar la vía BMP-2/Smad/Runx2, aumentando la expresión

de Runx2, un factor de transcripción importante implicado en la diferenciación de osteoblastos (150) .

Sin embargo, la utilización clínica de BMP-2 es compleja, ya que concentraciones elevadas inducen una estimulación de la resorción ósea osteoclástica en lugar de formación de hueso. Una posible explicación parece la liberación excesiva de BMP-2 durante la intervención quirúrgica en presencia de un incremento de IL-1 $\beta$  (151).

Szu-Yu-Chien et. al (152), en un modelo experimental de rata con artrosis, administraron proteína Noggin (un inhibidor de BMP con alta afinidad por BMP-2) de manera intraarticular. Observaron una disminución de la expresión de IL-1 $\beta$  y BMP-2 y una menor degeneración del cartílago al atenuar la remodelación de hueso subcondral.

BMP-2, además favorece la regeneración ósea al aumentar la inducción de MSC, que guían la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos a través de los factores de transcripción Runx2 y Osx1. Arbi Arghali et al. (153) , obtuvieron en su estudio sobre regeneración ósea craneofacial, que la utilización de BMP-2 no solo mejora la diferenciación de BMSC y sus capacidades osteogénicas, sino que además mejoraba su viabilidad. Por su parte, Sandra Stamtiz et al. (154), investigaron la creación de un andamio de PCL / HA /  $\beta$ TCP, recubierto con BMMSC, complementadas a su vez con FGF-2 y BMP-2. El objetivo era demostrar que las MSC, con gran potencial osteogénico, en presencia de FGF-2 y especialmente, de BMP-2, tenían un mayor potencial de diferenciación osteogénica y permitían la reparación de defectos óseos de gran tamaño.

En nuestro modelo experimental (**Figura 30 y Tabla 12, página 103**), observamos que la lesión ósea estimula la producción de BMP-2 y como su liberación va disminuyendo de manera progresiva conforme pasa el tiempo. Esto podría explicarse, en parte, como exponen Howa Begam et al. (155) porque tras la lesión de tamaño crítico se libera BMP-2 para favorecer la migración de MCM hacia el defecto, para que de ese modo se diferencien en osteoblastos y favorecer así la osificación endocondral. No obstante, en los GC3 y GC6 así como GIB3 y GIB6, la producción de BMP-2 es menor que en GPG3 y GPG6 donde el biomaterial lleva añadido BMP-2, excepto en el caso de GIB3 donde la

liberación de BMP-2 es mayor que en GPG6. Del mismo modo, en este GPG, hay una mayor expresión en GPG3, por lo que dicha molécula sería eficaz después de ser implantada, promoviendo la regeneración ósea en el defecto mandibular de tamaño crítico. Estos niveles de BMP-2 siguen siendo elevados en GPG6, pero en menor cantidad que GPG3.

Por otra parte, observamos **(Figura 31 y Tabla 13, página 105)**, que la lesión ósea estimula la producción de TGF- $\beta$  en GC y GIB respecto al GS, sin que estas diferencias sean significativas salvo con GIB6 que si lo son. Cabe resaltar que disminuyendo los valores de BMP-2 a los 6 meses, con respecto a los 3, en los grupos GC y GIB el TGF- $\beta$  sigue aumentando, a pesar de no de ser significativa la diferencia, para lo cual no hemos encontrado evidencia para justificarlo si consideramos a BMP-2 como un inductor de la producción de TGF- $\beta$ . Esto no ocurre en GPG, donde en GPG6 disminuye BMP-2 y esto concuerda con una menor concentración de TGF- $\beta$ .

En los GC y GIB, la producción de TGF- $\beta$  es menor que en GPG3 y GPG6 donde, además, la producción en este caso de TGF- $\beta$  es mayor en GPG3 respecto a GPG6. Esto podría ser debido a que el biomaterial lleva añadido BMP-2 y favorece una mayor liberación de TGF- $\beta$  sobre todo en las fases más tempranas que es cuando el BMP-2 ejerce su mayor efecto.

Conseguir una liberación sostenida y, sobre todo, duradera en el tiempo de BMP-2 sigue siendo uno de los principales objetivos en la investigación. Por esto, tanto en nuestro estudio con Proteo-Graft® (Noricum S.L), como en la mayoría, se utiliza de manera combinada con otros biomateriales. Bin Wang et al. (156) y Qingging Yao et al. (157), utilizaron un andamio modificado con nanopartículas para así obtener una liberación sostenida de BMP-2.

El efecto positivo del biomaterial experimental Proteo-Graft® (Noricum S.L) sobre la regeneración ósea, observado en nuestros resultados histológicos, esta probablemente basado en que el BMP-2 favorece la angiogénesis, la circulación de las células madre, la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno tipo I.

La creación de andamios mediante ingeniería de tejidos para favorecer la regeneración ósea está suponiendo una fuente de investigación constante, y más concretamente la utilización de BMP-2 tras la demostración de su potencial osteogénico. Así, en la actualidad se están probando diversos biomateriales con los que combinar BMP-2 para, además de conseguir una mejor liberación, valorar cual posee una mayor biocompatibilidad, osteoinducción y osteoconducción. Fenghui Yu et al. (158), probaron en un estudio la creación de un biomaterial donde el vidrio bioactivo combinaba PCL con BMP-2. El objetivo era valorar su actividad osteogénica y capacidad de regeneración del canal auditivo externo tras una mastoidectomía, ampliamente utilizada para tratamiento de enfermedades del oído medio como el colesteatoma o la otitis media crónica, en un modelo animal. Los resultados que obtuvieron fueron satisfactorios siempre que el vidrio bioactivo iba cargado con BMP-2.

Además de la utilización de BMP-2 aislada en diversos biomateriales, su combinación con otras sustancias con potencial regenerador está siendo utilizado cada vez más para por un lado potenciar sus efectos, y por otro, atenuar las complicaciones ya mencionadas de BMP-2. Así, Chunli Zhang et al. (159), utilizaron una TBC obtenido a partir de hueso esponjoso bovino. Para probar el potencial osteogénico de BMP-2 y su capacidad en la regeneración ósea, generaron un defecto en el cóndilo femoral de conejos y crearon 4 grupos de estudio. Un grupo con tan solo TBC, otro con TBC/ Sr, otro con TBC/BMP-2 y otro con TBC/BMP-2/Sr. Los resultados obtenidos siempre fueron mejores en los grupos que poseían BMP-2, obteniendo el mayor resultado de reparación ósea en TBC/BMP-2/Sr por ser este último un metal con propiedades formadoras de hueso e inhibidoras de la reabsorción ósea.

Aunque la técnica ideal de injerto óseo es el autoinjerto, las comorbilidades asociadas a este, y los riesgos asociados a aloinjerto y xenoinjerto, han favorecido la búsqueda de alternativas en el campo de la regeneración ósea y el avance de la investigación en biomateriales. Hongzhou Shen et al. (160), para solventar los inconvenientes del uso de autoinjerto óseo alveolar, desarrollaron un biomaterial compuesto de BMP-2/ CPC y compararon su eficacia de reparación ósea con el autoinjerto, que es la técnica que mejores resultados de regeneración ósea proporciona. Los resultados que obtuvieron

fueron satisfactorios, obteniendo una buena reparación ósea y una reabsorción adecuada del biomaterial, demostrando que el injerto BMP-2/CPC es una alternativa al autoinjerto.

Stefan P. Bienz et al. (161), también realizaron un estudio experimental para valorar si el uso de un biomaterial con BMP-2 es igual de eficaz o no que el uso de hueso autógeno en pacientes a los que se les colocó un implante dental. En este caso combinaron BMP-2 con DBB. Los resultados que obtuvieron, en un seguimiento de 3 años, fue que la supervivencia del implante y los niveles y estabilidad de tejido duro y blando fue la misma en el grupo tratado con BMP-2/DBB y el grupo de autoinjerto.

La angiogénesis cumple un papel fundamental en el proceso de remodelación ósea. Se sabe del papel del VEGF en la homeostasis ósea, por lo que algunos autores han comenzado a probar su utilidad en biomateriales, y algunos en combinación con BMP-2 para así potenciar su efecto.

Así, Zheng Liu et al. (162), combinaron VEGF y BMP-2 en una microesfera de liberación sostenida recubierta de titanio. Obtuvieron resultados satisfactorios in vitro, elevación de Runx2, ALP y OCN, que fue corroborado con los estudios in vivo, donde en los grupos con VEGF/BMP-2 se apreció una masa ósea nueva en mayor contacto con el biomaterial, demostrando que podría promover la diferenciación osteogénica y la osteointegración.

En la misma línea, Tingting Guo et al. (163), valoraron la regeneración ósea tras realizar un defecto calvarial crítico sobre ratones, utilizando BMP-2 y VEGF de manera conjunta, que en este caso se añadieron sobre una lámina de BMSC. Los resultados que obtuvieron fueron satisfactorios, observando en el grupo sobre el que se añadía BMP-2 y VEGF una considerable aceleración en la curación de los defectos, mayor formación de hueso nuevo, así como un aumento de la expresión de marcadores in vitro de formación ósea.

Sinan Egri et al. (164), ya informaron años atrás de la posible combinación de VEGF y BMP-2 y sus buenos resultados en la ingeniería ósea. Destacaron que la liberación de VEGF se produce de manera más rápida, liberándose casi el 60% en los primeros días, mientras que BMP-2 tuvo una liberación secuencial y sostenida durante los siguientes

meses, de ahí que los estudios actuales se centren en obtener biomateriales que realicen una liberación sostenida de ambos.

A pesar de los evidentes beneficios de la combinación de BMP-2 con diversos biomateriales y factores de crecimiento favorecedores de la regeneración ósea, existen composiciones que pueden generar un impacto negativo. Sanja Novak et al. (165), aportan un novedoso artículo en el que informan que la utilización conjunta de BMP-2 con PDGF retrasa la cicatrización ósea, puesto que PDGF inhibe BMP-2. Usados solos, ambos son osteoanabólicos y favorecen la regeneración ósea, pues PDGF aumenta la proliferación de fibroblastos y osteoblastos.

Esto también sucede con TGF- $\beta$ , donde altas concentraciones pueden ser perjudiciales y causar anomalías en la remodelación ósea. Xio Wang et al. (166) mostraron que un exceso de TGF- $\beta$  inducía una osificación heterotópica y como la administración de un anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$  atenuaba la formación de hueso ectópico. James R. Edwards et al. (167) también usaron un anticuerpo para inhibir TFG- $\beta$  y observaron un aumento el volumen de huesos largos, de la densidad mineral ósea y del espesor trabecular. Janet L. Crane et. al (148) observaron que la desregulación de TGF- $\beta$  alteraba el destino de las MSC, desacoplando la remodelación ósea, al generar un gradiente excesivo de activación de TGF- $\beta$ 1 que impide el reclutamiento de osteoclastos que protejan de una excesiva formación de hueso.

Por tanto, el control de la concentración de TGF- $\beta$  es esencial por ser un mediador clave en el acoplamiento dinámico de la resorción y formación ósea y poseer efectos bifásicos en la remodelación ósea. Jeroen T. Buijs et al. (168) destacaron como ante una activación osteoclástica se liberaba TGF- $\beta$  reclutando precursores de osteoblastos así como factores como BMP para promover la diferenciación de precursor de osteoblasto en osteoblasto, pero también, en ratones modificados genéticamente, demostraron que un aumento de los niveles de TGF- $\beta$  favorecía la osteoclastogénesis, la resorción ósea e inhibía la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea.

Los marcadores osteogénicos ALP, Runx2, y OCN fueron seleccionados para el estudio por ser expresados en las diferentes etapas de la osteogénesis.

Runx2 es un importante factor de transcripción de diferenciación de osteoblastos. Está involucrado en la regulación de la expresión génica de la proteína de la matriz extracelular durante la diferenciación de los osteoblastos, y controla la formación ósea mediante la regulación de la diferenciación de cartílago y osteoblastos.

BMP-2 aumenta la expresión de Runx2 al provocar la fosforilación y traslocación de las proteínas Smad al núcleo. BMP-2 también aumentará Runx2 al activar la vía canónica Wnt/  $\beta$ -Catenina, provocando un acumulo de  $\beta$ -Catenina en el citosol, que se traslocará al núcleo y estimulará Runx2 (169).

Runx2 alcanza su punto máximo de concentración en preosteoblastos y osteoblastos inmaduros, disminuyendo en osteoblastos maduros, lo cual indica que es esencial en la diferenciación temprana. No obstante, una sobreexpresión de Runx2 en osteoblastos genera una matriz deteriorada, por lo que en exceso puede tener un efecto negativo sobre los osteoblastos. (170)

ALP se considera un marcador osteogénico temprano, que se expresa de forma ubicua en las células óseas, durante la proliferación, diferenciación y maduración de la matriz extracelular; por lo tanto, la actividad de la ALP se estudia para indicar el grado temprano de diferenciación de los osteoblastos. La ALP está también implicada en la hidrólisis de múltiples tipos de fosfatos, potenciando así la maduración celular y la calcificación. (171,172)

La producción de ALP está regulada por Runx2 (que hace de intermediaria de BMP-2), y la  $\beta$ -Catenina (que media los efectos de la vía Wnt). (173)

La OCN es producida solo por osteoblastos maduros y desempeña un importante papel en la mineralización ósea, depositándose principalmente en la matriz extracelular ósea.

En nuestros resultados inmunohistoquímicos observamos que en el GC3 y GC6 (**Figura 25, página 99**) y en el GIB3 y GIB6 (**Figura 26, página 99**), no se produce expresión de los marcadores osteoblásticos Runx2, OCN y APL. Esto podría explicarse, en parte, por la ausencia de BMP-2, que aumenta la expresión de estos marcadores, especialmente de Runx2, y la ausencia de formación de tejido óseo nuevo.

En los GPG3 y GPG6 (**Figura 27, página 100**), si hay un incremento en la expresión de los marcadores osteoblásticos Runx2, OCN y APL, favoreciendo la osteogénesis mediada por BMP-2 y contribuyendo a la regeneración de la lesión mandibular, viendo además esto reforzado al comparar GPG3 y GIB3 (**Figura 28, página 100**) y GPG6 con GIB6 y (**Figura 29, página 101**), donde se ponía de manifiesto una mayor inmunoreactividad en el GPG respecto a GIB, siendo más marcada a los 3 meses respecto a los 6 . Leticia Ferreira et al.(174), observaron un aumento de Runx2 y OCN en la inmunohistoquímica de los grupos que fueron tratados con rhBMP-2. Liu Zhonxgxing et al. (175), elaboraron un andamio poroso de HA al cual añadieron BMP-2 para valorar capacidad osteogénica. Los niveles de los marcadores ALP, Runx2 y OCN aumentaron nuevamente en el grupo tratado con BMP-2 frente a los demás.

Qi Gan et al. (176), fabricaron un andamio de esponja de gelatina con BMP-2 y dexametasona. Observaron que cuando el andamio estaba solo cargado con dexametasona, los niveles de APL no mostraron aumento estadísticamente significativo, mientras que cuando estaba formado por BMP-2 si se producía aumento de APL. No obstante, destacaron que los niveles fueron mayores cuando se utilizaron de manera combinada. Los resultados fueron similares para Runx2, aumentando de forma considerable al añadir BMP-2 y más en combinación con dexametasona, lo que lleva a plantear a estos autores la posible eficacia en regeneración ósea la combinación de dexametasona en niveles bajos con BMP-2.

En el GPG3 se observa un aumento de todos estos marcadores osteoblásticos, ya que se está produciendo la formación de hueso nuevo, sin embargo, en GPG6, los niveles disminuyen, ya que el defecto óseo ha sido cubierto casi en su mayoría por hueso nuevo.

Jia He et al. (177), valoraron la eficacia de añadir BMP-2 sobre un andamio formado por BMSC y EPC en la regeneración ósea. Obtuvieron que los niveles de expresión de los genes asociados a osteogénesis (ALP, Runx2 y OCN) fueron más altos utilizando en conjunto BMSC/EPC/BMP-2 que utilizando tan solo BMSC/EPC, corroborando el potencial osteogénico de BMP-2. En otro estudio, Yu Chieh Lee et al. (178), compararon la regeneración ósea utilizando BMSC y DPSC, obteniendo una mayor expresión de marcadores osteogénicos (ALP, Runx2 y OCN) en el grupo tratado con BMSC.

Li Zeng et. al (2022)., (179), resaltan el papel de Runx2 en la erupción dental, al afectar a DFPC, que son células madre necesarias en la formación y erupción de dientes. Así, la ausencia de Runx2, al afectar a la osteogénesis, resulta en dificultad para la erupción dental.

RANTES/CCL5, es una quimiocina que desempeña un papel relevante en la osteoinmunología, un campo emergente en el que se estudia la relación e interacción entre el sistema inmunitario y el esquelético, favoreciendo la quimiotaxis de linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos y mastocitos y afectando directamente a las MSC, alterando la hematopoyesis, pudiendo estar también involucrado en el desarrollo y progresión de procesos oncológicos. (180)

CCL5 puede unirse a CCR1, CCR3 y CCR5, si bien su mayor afinidad es por CCR5, un receptor acoplado a una proteína G. Cuando se produce la unión CCL5/CCR5, se activa una vía descendente de reacciones, entre ellas la fosforilación de GSK-3B, que lleva así mismo a la fosforilación y degradación de la B-Catenina, que favorecía la diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastos. (181)

En nuestro modelo (**Figura 32 y Tabla 14, página 107**), observamos que tras la lesión ósea, RANTES/CCL5 se eleva en todos los grupos 3 meses de forma significativa con respecto al grupo GS y que sus valores se normalizan a los 6 meses en todos los grupos menos en GPG6, lo que podría deberse al efecto directo de BMP-2 y a que el proceso de regeneración ósea, al ser claramente superior en los grupos GPG, unido a los factores que en él intervienen, favorecen ese aumento de RANTES/CCL5 y su mantenimiento en el tiempo.

Deducimos que la lesión ósea y los mecanismos de regeneración y respuesta inflamatoria que el organismo pone en marcha, estimulan la producción de RANTES/CCL5 durante los primeros meses, lo cual Kristofer Wintges et al. (182) ya observaron en su modelo experimental donde definieron su relevancia fisiológica al ver que ante la lesión ósea inducía quimiotaxis de osteoclastos y osteoblastos, siendo fundamental en su equilibrio para una adecuada la remodelación ósea. Para valorarlo, generaron ratones carentes de RANTES/CCL5, observando que en la zona lesionada había una menor formación ósea y un aumento de la osteoclastogénesis, derivando en una alteración de la remodelación ósea.

Johann Lechner et al. (78), en su investigación sobre osteonecrosis mandibular degenerativa, se plantearon como objetivo examinar las funciones de RANTES/CCL5 en la resorción ósea. En el estudio inmunohistoquímico, observaron que, a diferencia de los adultos sanos, que o no tienen células positivas RANTES/CCL5 (o si las poseen son muy escasas), éstas estaban aumentadas en estos pacientes debido a su situación clínica y respuesta inflamatoria. Observaron que RANTES/CCL5 afectaba a MSC, provocando un desequilibrio entre la serie mieloide y linfoide además de un envejecimiento a nivel de las MSC, lo cual puede ser determinante en la remodelación ósea ya que son las células precursoras de osteoblastos. Por último, apreciaron a nivel microscópico que las muestras de tejido normal, la expresión RANTES/CCL5 estaba disminuida. Esto fue observado también por Yu-Chuan Liu et al. (183) que concluyeron en su estudio que RANTES/CCL5 era una importante citocina proinflamatoria capaz de inducir la diferenciación osteogénica de las MSC y como su ausencia bloqueaba la osteogénesis, demostrado por una disminución de los niveles de ALP.

Shi-Yang Feng et al. (79) realizaron un estudio para probar si el aumento de la carga articular a nivel de la articulación temporomandibular conducía a una mayor pérdida de hueso. Su objetivo era valorar si RANTES/CCL5, mediante la activación de Akt2 y CCR, implicados en la osteoclastogénesis, podía ser considerado un biomarcador adecuado de pérdida de masa ósea. Sus resultados fueron satisfactorios ya que por una parte observaron que ante carga articular, RANTES/CCL5 reclutaba macrófagos, activaban la vía Akt2 y sintetizaban osteoclastos, mientras que cuando inhibían el eje RANTES/Akt2, se atenuaba la pérdida ósea y mejoraba la estructura del hueso. Haruhisa Watanabe et al.

(184), también trataron de investigar si RANTES/CCL5 podría ser un adecuado biomarcador en enfermedades óseas. Observaron que, en un grupo de mujeres con enfermedad degenerativa mandibular, CCL5 mostró una correlación positiva con los marcadores de resorción ósea de orina y TNF- $\alpha$ , frente al GC, sugiriendo que CCL5 estaba asociado con un mayor recambio óseo y respuesta inflamatoria.

Previamente hemos destacado que la angiogénesis es esencial para la osteogénesis y desarrollo óseo ya que, para la formación de hueso nuevo, y la consolidación de fracturas, se requiere de una adecuada vascularización. Kusumbe et. al (185) observaron que había unas células endoteliales en los capilares de las metáfisis, que denominaron vasos H, que expresaban CD31 y ECM, y eran ricos en factores de crecimiento que aumentaba la proliferación de osteoprogenitores.

No obstante, la remodelación ósea y angiogénesis es un proceso complejo que requiere una secuencia perfectamente coordinada: un defecto producirá huesos débiles y frágiles con el consiguiente riesgo de fractura, mientras que una excesiva remodelación y proliferación de vasos puede llevar a una hiperplasia ósea patológica.

Esto sucede en la osteoartritis, donde los cambios degenerativos del cartílago articular, asociados generalmente al envejecimiento, conllevan a una hiperplasia ósea secundaria alrededor de la articulación, generalmente articulaciones de carga. Guangyi Xiong et al. (186), estudiaron el efecto de Resveratrol, un polifenol natural presente en plantas, en la remodelación ósea y angiogénesis. Observaron que, a ratones sobre los que se practicaba una lesión del ligamento cruzado anterior y no se les administraba Resveratrol, aumentaban los niveles de ECM y se producía una vascularización anómala y formación ectópica de hueso, mientras que en el Grupo Experimental que recibía Resveratrol, los valores de ECM estaban disminuidos.

El avance en el campo de la regeneración ósea, y en especial de los biomateriales, está llevando a investigar la creación de determinados andamios que no solo favorezcan la osteogénesis, sino que, además, incrementen la angiogénesis.

En nuestro modelo experimental (**Figura 33 y Tabla 15, página 109**), observamos que la lesión ósea no estimula la producción de ECM, manifestado por la ausencia de diferencia significativa entre el Grupo GC3 y GC6 con el Grupo Simulado. Sin embargo, en los Grupos GPG3 y GPG6, cuyo andamio está cargado con BMP-2, observamos un aumento significativo de producción de ECM respecto al resto de grupos, destacando así mismo que la liberación de ECM ha sido significativamente superior en GPG3 respecto a GPG6.

Nuestros resultados demuestran el papel de la BMP-2 en el aumento de expresión de la ECM, lo cual ha sido puesto de manifiesto en otros estudios, como el de Hao Yao et al. (187), un modelo experimental en ratas sometidas a un defecto mandibular crítico, donde valoraron el efecto de un biomaterial cargado con BMP-2 en estructura ósea y vascular, observando que no solo se favoreció la formación de nuevo hueso en el defecto mandibular, sino que además, se formaron abundantes vasos de tipo H, con elevada expresión de ECM. Identificaron además células osteoprogenitoras como *Osx1* adyacente a los vasos que expresaban ECM, lo cual indica que el biomaterial cargado con BMP-2 mejora el acoplamiento entre angiogénesis y osteogénesis.

Las BMP dirigen el desarrollo óseo mediante la activación de la vía SMAD 1/5 que activará *Runx2* y *Osx1* para la síntesis de osteoblastos. Annemarie Lang et al. (188) observaron que la interrupción de la vía SMAD 1/5 en huesos largos alteró la estructura de los vasos H, la expresión de ECM y perjudicó la regeneración ósea al detener el reclutamiento de osteoprogenitores, especialmente *Osx1*.

Laurine Marger et al. (189), emplearon un modelo animal basado en generar un defecto calvarial sobre un conejo, añadiendo un andamio óseo relleno de Bio-Oss. Su objetivo era valorar la formación de vasos H, la expresión de ECM que se producía en ellos y si esto se acompañaba de aumento de *Osx1*. Observaron que los vasos H, expresando niveles elevados de ECM, estaba en las zonas de remodelación ósea, y que además estos vasos H estaban rodeados de precursores osteogénicos (*Osx1*), confirmando su hipótesis inicial de que los vasos tipo H que expresan ECM, están implicados en el desarrollo óseo y participan en el control de la osteogénesis.

Yuankun Zhai et al. (190), fabricaron una malla compuesta por PCL/Colágeno/HA, sobre la cual se añadió BMSC, que fue utilizada sobre ratones sometidos a un defecto en la bóveda craneal. El grupo tratado con PLC/Colágeno/HA + BMSC expresó una mejor dinámica angiogénica con niveles superiores de ECM, acompañado de una mayor migración de células osteoprogrenitoras, que llevó a una mejor reparación del defecto craneal frente al grupo tratado tan solo con PLC/Colágeno/HA y al GC.



## 6. CONCLUSIONES





1. La lesión ósea inducida cumple los criterios de “lesión crítica”, dejada a su libre evolución, el organismo no tiene capacidad de autoregenerarla.
2. Los tiempos de evolución y variables estudiadas en nuestro modelo experimental han resultado adecuados para los objetivos e hipótesis planteados.
3. En nuestro modelo experimental, el tratamiento de la lesión ósea inducida, con un biomaterial compuesto por carbonato-apatita, con potencial osteoconductor, no tiene capacidad de regeneración completa.
4. La utilización del biomaterial Proteo-Graft® (Noricum S.L) constituido por una base de Iso-Bone® (Noricum S.L) combinado con Quitosano, Trehalosa y rhBMP-2, ha incrementado la regeneración ósea consiguiendo la restitución del defecto óseo generado en el modelo experimental.
5. Con los resultados obtenidos y los estudios previos realizados por Noricum SL y la comunidad científica, consideramos que se podría abordar la realización de un ensayo clínico.





## 7. BIBLIOGRAFÍA





1. Greco EA, Pietschmann P, Migliaccio S. Osteoporosis and Sarcopenia Increase Frailty Syndrome in the Elderly. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:255.
2. Beaudart C, Rolland Y, Cruz-Jentoft AJ, Bauer JM, Sieber C, Cooper C, et al. Assessment of Muscle Function and Physical Performance in Daily Clinical Practice. *Calcif Tissue Int*. 2019;105(1):1–14.
3. Curtis DEM, Moon DRJ, Harvey PNC, Cooper PC. The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. *Bone*. 2017;104:29–38.
4. Franco-Trepát E, Guillán-Fresco M, Alonso-Pérez A, Jorge-Mora A, Francisco V, Gualillo O, et al. Visfatin Connection: Present and Future in Osteoarthritis and Osteoporosis. *J Clin Med*. 2019;8(8).
5. 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).
6. Lorentzon M. Treating osteoporosis to prevent fractures: current concepts and future developments. *J Intern Med*. 2019;285(4):381–94.
7. Liu J, Curtis EM, Cooper C, Harvey NC. State of the art in osteoporosis risk assessment and treatment. *J Endocrinol Invest*. 2019;42(10):1149–64.
8. 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.
9. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol*. 2020;11.

10. Echeverria-Molina MI, Malollari KG, Komvopoulos K. Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9.
11. Rowe P, Koller A, Sharma S. Physiology, Bone Remodeling. *StatPearls.* 2023.
12. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells.* 2017;40(10):706–13.
13. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. Harrison. *Principios de Medicina Interna.* 20th ed. Mc Graw Hill Education; 2018. 2909–10 p.
14. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.* 2018;18(1).
15. Sobacchi C, Menale C, Villa A. The RANKL-RANK axis: A bone to thymus round trip. *Front Immunol.* 2019;10:629.
16. 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.
17. Ming J, Cronin SJF, Penninger JM. Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2020;10.
18. Wawrzyniak A, Balawender K. Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals.* 2022;12(15).
19. Li B, Wang P, Jiao J, Wei H, Xu W, Zhou P. Roles of the RANKL–RANK Axis in Immunity—Implications for Pathogenesis and Treatment of Bone Metastasis. *Front Immunol.* 2022;13.

20. Duan P, Bonewald L. The Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway in Formation and Maintenance of Bone and Teeth. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;77:23–9.
21. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: Bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen.* 2020;40(1).
22. Dutka M, Bobiński R, Wojakowski W, Francuz T, Pająk C, Zimmer K. Osteoprotegerin and RANKL-RANK-OPG-TRAIL signalling axis in heart failure and other cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev.* 2022;27(4):1395–411.
23. Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, et al. The regulation of bone metabolism and disorders by wnt signaling. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22).
24. Ruan Y, Kim HN, Ogana H, Kim YM. Wnt signaling in leukemia and its bone marrow microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):1–20.
25. Maruotti N, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. *J Cell Physiol.* 2017;232(11):2957–63.
26. Huybrechts Y, Mortier G, Boudin E, Van Hul W. WNT Signaling and Bone: Lessons From Skeletal Dysplasias and Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:165.
27. Yang N, Liu Y. The Role of the Immune Microenvironment in Bone Regeneration. *Int J Med Sci.* 2021;18(16):3697–707.
28. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells.* 2020;9(9).

29. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
30. Pierce J, Begun D, Westendorf J, McGee-Lawrence M. Defining Osteoblast and Adipocyte Lineages in the Bone Marrow. *Bone.* 2019;118:2–7.
31. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):1–15.
32. Berger JM, Karsenty G. Osteocalcin and the physiology of danger. *FEBS Lett.* 2022;596(5):665–80.
33. Haarhaus M, Cianciolo G, Barbuto S, La Manna G, Gasperoni L, Tripepi G, et al. Alkaline Phosphatase: An Old Friend as Treatment Target for Cardiovascular and Mineral Bone Disorders in Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2022;14(10).
34. Corrado A, Maruotti N, Cantatore FP. Osteoblast Role in Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
35. Sun Y, Li J, Xie X, Gu F, Sui Z, Zhang K, et al. Macrophage-Osteoclast Associations: Origin, Polarization, and Subgroups. *Front Immunol.* 2021;12.
36. Uda Y, Azab E, Sun N, Shi C, Pajevic PD. Osteocyte Mechanobiology. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(4):318–25.
37. Pajevic PD, Krause DS. Osteocyte Regulation of bone and blood. *Bone.* 2019;119:13–8.
38. Pathak JL, Bravenboer N, Klein-Nulend J. The Osteocyte as the New Discovery of Therapeutic Options in Rare Bone Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:405.

39. Kitaura H, Marahleh A, Otori F, Noguchi T, Shen W-R, Qi J, et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14).
40. D’Mello S, Atluri K, Geary SM, Hong L, Elangovan S, Salem AK. Bone regeneration using gene-activated matrices. *AAPS J.* 2017;19(1):43–53.
41. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis.* 2017;20(3):291–302.
42. Diomede F, Marconi GD, Fonticoli L, Pizzicanella J, Merciaro I, Bramanti P, et al. Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9).
43. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017;2(4):224–47.
44. Raghuram A, Singh A, Chang DK, Nunez M, Reece EM. Biologics in Plastic Surgery: Bone Grafts, Bone Substitutes, and Orthobiologics: Applications in Plastic Surgery. *Semin Plast Surg.* 2019;33(3):190–9.
45. Hu K, Olsen BR. Vascular Endothelial Growth Factor Control Mechanisms in Skeletal Growth and Repair. *Dev Dyn.* 2017;246(4):227–34.
46. Deev R V., Drobyshev AY, Bozo IY, Isaev AA. Ordinary and Activated Bone Grafts: Applied Classification and the Main Features. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
47. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone.* 2016;91:30–8.
48. Dreyer CH, Kjaergaard K, Ding M, Qin L. Vascular endothelial growth factor for in vivo bone formation: A systematic review. *J Orthop Transl.* 2020;24:46–57.

49. Zhang G, Yang X, Gao R. Research progress on the structure and function of endomucin. *Anim Model Exp Med*. 2020;3(4):325–9.
50. Park-Windhol C, Ng YS, Yang J, Primo V, Saint-Geniez M, D'amore PA. Endomucin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration, growth, and morphogenesis by modulating VEGFR2 signaling. *Sci Rep*. 2017;7(1).
51. Peng Y, Wu S, Li Y, Crane JL. Type H blood vessels in bone modeling and remodeling. *Theranostics*. 2020;10(1):426–36.
52. Di Maggio N, Banfi A. The osteo-angiogenic signaling crosstalk for bone regeneration: harmony out of complexity. *Curr Opin Biotechnol*. 2022;76.
53. Tie Y, Tang F, Peng D, Zhang Y, Shi H. TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Mol Biomed*. 2022;3(1).
54. Jann J, Gascon S, Roux S, Fauchaux N. Influence of the TGF- $\beta$  Superfamily on Osteoclasts/Osteoblasts Balance in Physiological and Pathological Bone Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
55. Hao Y, Baker D, ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11).
56. Sader F, Roy S. Tgf- $\beta$  superfamily and limb regeneration: Tgf- $\beta$  to start and Bmp to end. *Dev Dyn*. 2022;251(6):973–87.
57. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*. 2016;4.
58. Zou ML, Chen ZH, Teng YY, Liu SY, Jia Y, Zhang KW, et al. The Smad Dependent TGF- $\beta$  and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci*. 2021;8.

59. Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *J Dev Biol.* 2020;8(3).
60. Lowery JW, Rosen V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2431–52.
61. 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).
62. Sampath TK, Vukicevic S. Biology of bone morphogenetic protein in bone repair and regeneration: A role for autologous blood coagulum as carrier. *Bone.* 2020;141.
63. El Bialy I, Jiskoot W, Nejadnik MR. Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharm Res.* 2017;34(6):1152–70.
64. 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 (Basel).* 2021;14(13):3513.
65. Fu C, Yang X, Tan S, Song L. Author Correction: 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.* 2020;10(1).
66. 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):2397.
67. Park SY, Kim KH, Kim S, Lee YM, Seol YJ. BMP-2 Gene Delivery-Based Bone Regeneration in Dentistry. *Pharmaceutics.* 2019;11(8).

68. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22(4):284–97.
69. Nguyen V, Meyers CA, Yan N, Agarwal S, Levi B, James AW. BMP-2-induced bone formation and neural inflammation. *J Orthop.* 2017;14(2):252–6.
70. Zhang Y, Jiang Y, Zou D, Yuan B, Ke HZ, Li W. Therapeutics for enhancement of spinal fusion: A mini review. *J Orthop Transl.* 2021;31:73.
71. Knecht RS, Bucher CH, Van Linthout S, Tschöpe C, Schmidt-Bleek K, Duda GN. Mechanobiological Principles Influence the Immune Response in Regeneration: Implications for Bone Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9.
72. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular Biology of Fracture Healing. *J Orthop Res.* 2019;37(1):35–50.
73. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11.
74. Saxena Y, Routh S, Mukhopadhyaya A. Immunoporosis: Role of Innate Immune Cells in Osteoporosis. *Front Immunol.* 2021;12.
75. Zheng J, Yao Z, Xue L, Wang D, Tan Z. The role of immune cells in modulating chronic inflammation and osteonecrosis. *Front Immunol.* 2022;13.
76. Chen K, Jiao Y, Liu L, Huang M, He C, He W, et al. Communications Between Bone Marrow Macrophages and Bone Cells in Bone Remodeling. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8.
77. Sirufo MM, Suppa M, Ginaldi L, De Martinis M. Does Allergy Break Bones? Osteoporosis and Its Connection to Allergy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).

78. Lechner J, Schulz T, von Baehr V. Immunohistological staining of unknown chemokine RANTES/CCL5 expression in jawbone marrow defects—osteimmunology and disruption of bone remodeling in clinical case studies targeting on predictive preventive personalized medicine. *EPMA J.* 2019;10(4):351–64.
79. Feng SY, Lei J, Li YX, Shi WG, Wang RR, Yap AU, et al. Increased joint loading induces subchondral bone loss of the temporomandibular joint via the RANTES-CCRs-Akt2 axis. *JCI Insight.* 2022;7(21).
80. Kemmak AR, Rezapour A, Jahangiri R, Nikjoo S, Farabi H, Soleimanpour S. Economic burden of osteoporosis in the world: A systematic review. *Med J Islam Repub Iran.* 2020;34:154.
81. Castañeda S, Garcés-Puentes MV, Bernad-Pineda M. Pathophysiology of osteoporosis in chronic inflammatory joint diseases. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2021;13(1):32–8.
82. Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(11):898–907.
83. Moreira CA, Dempster DW. Histomorphometric changes following treatment for osteoporosis. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(9):895–7.
84. Noh JY, Yang Y, Jung H. Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutics for Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):1–22.
85. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, et al. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2017;377(15):1417–27.

86. Ekegren CL, Edwards ER, de Steiger R, Gabbe BJ. Incidence, Costs and Predictors of Non-Union, Delayed Union and Mal-Union Following Long Bone Fracture. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(12).
87. Migliorini F, Giorgino R, Hildebrand F, Spiezia F, Peretti GM, Alessandri-Bonetti M, et al. Fragility Fractures: Risk Factors and Management in the Elderly. *Medicina (B Aires)*. 2021;57(10).
88. Roberts SJ, Ke HZ. Anabolic Strategies to Augment Bone Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(3):289–98.
89. Nicholson JA, Makaram N, Simpson AHRW, Keating JF. Fracture nonunion in long bones: A literature review of risk factors and surgical management. *Injury*. 2021;52:3–11.
90. Tian A, Ma J, Feng K, Liu Z, Chen L, Jia H, et al. Reference markers of bone turnover for prediction of fracture: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1).
91. Ralston SH, Corral-Gudino L, Cooper C, Francis RM, Fraser WD, Gennari L, et al. Diagnosis and Management of Paget's Disease of Bone in Adults: A Clinical Guideline. *J Bone Miner Res*. 2019;34(4):579–604.
92. Fuentes-Calvo I, Usategui-Martín R, Calero-Paniagua I, Moledo-Pouso C, García-Ortiz L, Del Pino-Montes J, et al. Influence Of Angiogenic Mediators And Bone Remodelling In Paget's Disease Of Bone. *Int J Med Sci*. 2018;15(11):1210–6.
93. Quesada-Moreno A, Sánchez-González MD, Hidalgo-Calleja C, Montilla-Morales C, Del Pino-Montes J. Osteomalacia. *Med*. 2016;12(16):909–14.
94. Emini-Sadiku M, Morina-Kuqi N. Concealing Clothing Leading to Severe Vitamin D Deficiency, Osteomalacia and Muscle Weakness. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(13):2146–9.

95. Subramanian S, Viswanathan VK. Osteogenesis Imperfecta. StatPearls Publishing; 2022.
96. Deguchi M, Tsuji S, Katsura D, Kasahara K, Kimura F, Murakami T. Current Overview of Osteogenesis Imperfecta. Medicina (B Aires). 2021 May 1;57(5).
97. Wang F, Tarkkonen K, Nieminen-Pihala V, Nagano K, Majidi R Al, Puolakkainen T, et al. Mesenchymal Cell-Derived Juxtacrine Wnt1 Signaling Regulates Osteoblast Activity and Osteoclast Differentiation. J Bone Miner Res. 2019;34(6):1129–42.
98. Vollersen N, Zhao W, Rolvien T, Lange F, Schmidt FN, Sonntag S, et al. The WNT1G177C mutation specifically affects skeletal integrity in a mouse model of osteogenesis imperfecta type XV. Bone Res. 2021;9(1).
99. Wang R, Wang Y, Zhu L, Liu Y, Li W. Epigenetic Regulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Differentiation and Osteoporosis. Stem Cells Int. 2020;2020.
100. Hutchings G, Moncrieff L, Dompe C, Janowicz K, Sibiak R, Bryja A, et al. Bone Regeneration, Reconstruction and Use of Osteogenic Cells; from Basic Knowledge, Animal Models to Clinical Trials. J Clin Med. 2020;9(1):139.
101. Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. Cell Prolif. 2021;54(1).
102. Cheng YH, Dong JC, Bian Q. Small molecules for mesenchymal stem cell fate determination. World J Stem Cells. 2019;11(12):1084–103.
103. Zhao Y, Xie L. An Update on Mesenchymal Stem Cell-Centered Therapies in Temporomandibular Joint Osteoarthritis. Stem Cells Int. 2021;2021.
104. Macías I, Alcorta-Sevillano N, Rodríguez CI, Infante A. Osteoporosis and the Potential of Cell-Based Therapeutic Strategies. Int J Mol Sci. 2020;21(5).

105. 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.
106. Girón J, Kerstner E, Medeiros T, Oliveira L, Machado GM, Malfatti CF, et al. Biomaterials for bone regeneration: an orthopedic and dentistry overview. *Brazilian J Med Biol Res.* 2021;54(9).
107. 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).
108. Raghuram A, Singh A, Chang DK, Nunez M, Reece EM. Bone Grafts, Bone Substitutes, and Orthobiologics: Applications in Plastic Surgery. *Semin Plast Surg.* 2019;33(3):190–9.
109. 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).
110. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Gryn timer 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).
111. Jordana F, Le Visage C, Weiss P. Substituts osseux. *Med Sci(Paris).* 2017;33(1):60–5.
112. Iaquina 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).
113. 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.

114. 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.
115. Wu X, Walsh K, Hoff BL, Camci-Unal G. Mineralization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering.* 2020;7(4):1–24.
116. Fernández-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.
117. Flores-Fraile J. Seguridad y eficacia del nuevo biomaterial Sil-Oss en la regeneración de alveólos post-extracción. Ensayo Clínico randomizado comparativo [Tesis Doctoral]. Salamanca: Universidad de Salamanca. 2016.
118. 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.
119. Thirivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials For Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):835–56.
120. Zhao Y, Zhao S, Ma Z, Ding C, Chen J, Li J. Chitosan-Based Scaffolds for Facilitated Endogenous Bone Re-Generation. *Pharmaceuticals.* 2022;15(8).
121. 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.
122. 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).

123. Donnalaja F, Jacchetti E, Soncini M, Raimondi MT. Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. *Polymers (Basel)*. 2020;12(4).
124. Asghari F, Samiei M, Adibkia K, Akbarzadeh A, Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016;45(2):185–92.
125. 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).
126. Cojocaru 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 Part B Appl Biomater*. 2020;108(3):809–18.
127. 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.
128. Dixon DT, Gomillion CT. Conductive Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Current State and Future Outlook. *J Funct Biomater*. 2022;13(1).
129. Condorhuamán-Alvarado PY, Pareja-Sierra T, Muñoz-Pascual A, Sáez-López P, Díez-Sebastián J, Ojeda-Thies C, et al. Improving hip fracture care in Spain: evolution of quality indicators in the Spanish National Hip Fracture Registry. *Arch Osteoporos*. 2022;17(1):1–10.
130. Huang J, Ratnayake J, Ramesh N, Dias GJ. Development and Characterization of a Biocomposite Material from Chitosan and New Zealand-Sourced Bovine-Derived Hydroxyapatite for Bone Regeneration. *ACS Omega*. 2020;5(27).

131. Bahraminasab M, Doostmohammadi N, Talebi A, Arab S, Alizadeh A, Ghanbari A, et al. 3D printed polylactic acid/gelatin-nano-hydroxyapatite/platelet-rich plasma scaffold for critical-sized skull defect regeneration. *Biomed Eng Online*. 2022;21(86).
132. Shaheen MY. Nanocrystalline hydroxyapatite in periodontal bone regeneration: A systematic review. *Saudi Dent J*. 2022;34(8):647–60.
133. Kim JH, Kim HW. Rat defect models for bone grafts and tissue engineered bone constructs. *Tissue Eng Regen Med*. 2013;10(6):310–6.
134. Sargolzaei-Aval F, Saberi EA, Arab MR, Sargolzaei N, Sanchooli T, Tavakolinezhad S. Octacalcium phosphate/gelatin composite facilitates bone regeneration of critical-sized mandibular defects in rats: A quantitative study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2019;13(4):258–66.
135. Wang Y, Van Manh N, Wang H, Zhong X, Zhang X, Li C. Synergistic intrafibrillar/extrafibrillar mineralization of collagen scaffolds based on a biomimetic strategy to promote the regeneration of bone defects. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2053.
136. Cheng Y, Ramos D, Lee P, Liang D, Yu X, Kumbar SG. Collagen functionalized bioactive nanofiber matrices for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(2):287–98.
137. Tateiwa D, Nakagawa S, Tsukazaki H, Okada R, Kodama J, Kushioka J, et al. A novel BMP-2-loaded hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate microsphere/hydrogel composite for bone regeneration. *Sci Rep*. 2021;11(1).
138. Lin S, Yin S, Shi J, Yang G, Wen X, Zhang W, et al. Orchestration of energy metabolism and osteogenesis by Mg<sup>2+</sup> facilitates low-dose BMP-2-driven regeneration. *Bioact Mater*. 2022;18:116–27.

139. Zhao J, Wang S, Bao J, Sun X, Zhang X, Zhang X, et al. Trehalose Maintains Bioactivity and Promotes Sustained Release of BMP-2 from Lyophilized CDHA Scaffolds for Enhanced Osteogenesis In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. 2013;8(1).
140. Li P, Feng M, Hu X, Zhang C, Zhu J, Xu G, et al. Biological evaluation of acellular bovine bone matrix treated with NaOH. *J Mater Sci Mater Med*. 2022;33(7).
141. Zhang Y, Wang C, Fu L, Ye S, Wang M, Zhou Y. Fabrication and Application of Novel Porous Scaffold in Situ-Loaded Graphene Oxide and Osteogenic Peptide by Cryogenic 3D Printing for Repairing Critical-Sized Bone Defect. *Molecules*. 2019;24(9).
142. 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.
143. Chavassieux P, Chapurlat R. Interest of Bone Histomorphometry in Bone Pathophysiology Investigation: Foundation, Present, and Future. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13.
144. 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).
145. Shen H, Zhuang Y, Zhang C, Zhang C, Yuan Y, Yu H, et al. Osteoclast-Driven Osteogenesis, Bone Remodeling and Biomaterial Resorption: A New Profile of BMP2-CPC-Induced Alveolar Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20).
146. Wang L, Wang J, Zhou X, Sun J, Zhu B, Duan C, et al. A New Self-Healing Hydrogel Containing hucMSC-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8.

147. Mohamed IF, Ghani BA, Fatalla AA. Histological Evaluation of the Effect of Local Application of Punica granatum Seed Oil on Bone Healing. *Int J Biomater*. 2022;2022.
148. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling. *J Clin Invest*. 2014;124(2):466–72.
149. Silva AS, Santos LF, Mendes MC, Mano JF. Multi-layer pre-vascularized magnetic cell sheets for bone regeneration. *Biomaterials*. 2020;231.
150. Ren S, Jiao G, Zhang L, You Y, Chen Y. Bionic Tiger-Bone Powder Improves Bone Microstructure and Bone Biomechanical Strength of Ovariectomized Rats. *Orthop Surg*. 2021;13(3):1111–8.
151. Bordukalo-Nikšić T, Kufner V, Vukičević S. The Role Of BMPs in the Regulation of Osteoclasts Resorption and Bone Remodeling: From Experimental Models to Clinical Applications. *Front Immunol*. 2022;13.
152. Chien SY, Tsai CH, Liu SC, Huang CC, Lin TH, Yang YZ, et al. Noggin Inhibits IL-1 $\beta$  and BMP-2 Expression, and Attenuates Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Destruction in Experimental Osteoarthritis. *Cells*. 2020;9(4).
153. Aghali A. Craniofacial Bone Tissue Engineering: Current Approaches and Potential Therapy. *Cells*. 2021;10(11).
154. Stammnitz S, Krawczenko A, Szałaj U, Górecka Ż, Antończyk A, Kielbowicz Z, et al. Osteogenic Potential of Sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on an nHAP-Coated PCL/HAP/ $\beta$ -TCP Scaffold. *Cells*. 2022;11(21).
155. Begam H, Nandi SK, Kundu B, Chanda A. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Mater Sci Eng C*. 2017;70:856–69.

156. Wang B, Guo Y, Chen X, Zeng C, Hu Q, Yin W, et al. Nanoparticle-modified chitosan-agarose-gelatin scaffold for sustained release of SDF-1 and BMP-2. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:7395–408.
157. Yao Q, Liu Y, Selvaratnam B, Koodali RT, Sun H. Mesoporous Silicate Nanoparticles/3D Nanofibrous Scaffold-mediated Dual-drug Delivery for Bone Tissue Engineering. *J Control Release*. 2018;279:69.
158. Yu F, Fan X, Wu H, Ou Y, Zhao X, Chen T, et al. Mastoid obliteration and external auditory canal reconstruction using 3D printed bioactive glass S53P4 /polycaprolactone scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2: A simulation clinical study in rabbits. *Regen Ther*. 2022;21:469.
159. Zhang C, Xu G, Han L, Hu X, Zhao Y, Li Z. Bone induction and defect repair by true bone ceramics incorporated with rhBMP-2 and Sr. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(9).
160. Shen H, Li L, Zhang C, Chen Y, Yu H, Si J, et al. The strategy of composite grafting with BMP2-Loaded calcium phosphate cements and autogenous bone for alveolar cleft reconstruction. *Front Physiol*. 2022;13.
161. Bienz SP, Payer M, Hjerppe J, Hüsler J, Jakse N, Schmidlin PR, et al. Primary bone augmentation leads to equally stable marginal tissue conditions comparing the use of xenograft blocks infused with BMP-2 and autogenous bone blocks: A 3D analysis after 3 years. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32(12):1433–43.
162. Liu Z, Xu Z, Wang X, Zhang Y, Wu Y, Jiang D, et al. Construction and osteogenic effects of 3D-printed porous titanium alloy loaded with VEGF/BMP-2 shell-core microspheres in a sustained-release system. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10.
163. Guo T, Yuan X, Li X, Liu Y, Zhou J. Bone regeneration of mouse critical-sized calvarial defects with human mesenchymal stem cell sheets co-expressing BMP2 and VEGF. *J Dent Sci*. 2023;18(1):135–44.

164. Eğri S, Eczacıoğlu N. Sequential VEGF and BMP-2 releasing PLA-PEG-PLA scaffolds for bone tissue engineering: I. Design and in vitro tests. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;45(2):321–9.
165. Novak S, Madunic J, Shum L, Vucetic M, Wang X, Tanigawa H, et al. PDGF inhibits BMP2-induced bone healing. *NPJ Regen Med.* 2023;8(1).
166. Wang X, Li F, Xie L, Crane J, Zhen G, Mishina Y, et al. Inhibition of overactive TGF- $\beta$  attenuates progression of heterotopic ossification in mice. *Nat Commun.* 2018;9(1).
167. Edwards JR, Nyman JS, Lwin ST, Moore MM, Esparza J, O’Quinn EC, et al. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling by 1D11 antibody treatment increases bone mass and quality in vivo. *J Bone Miner Res.* 2010;25(11):2419–26.
168. Buijs JT, Stayrook KR, Guise TA. The role of TGF- $\beta$  in bone metastasis: novel therapeutic perspectives. *Bonekey Rep.* 2012;1(6).
169. Okagu IU, Ezeorba TPC, Aguchem RN, Ohanenye IC, Aham EC, Okafor SN, et al. A Review on the Molecular Mechanisms of Action of Natural Products in Preventing Bone Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15).
170. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
171. Zhou P, Shi JM, Song JE, Han Y, Li HJ, Song YM, et al. Establishing a deeper understanding of the osteogenic differentiation of monolayer cultured human pluripotent stem cells using novel and detailed analyses. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1).

172. Gonzalez-Pujana A, Carranza T, Santos-Vizcaino E, Igartua M, Guerrero P, Hernandez RM, et al. Hybrid 3D Printed and Electrospun Multi-Scale Hierarchical Polycaprolactone Scaffolds to Induce Bone Differentiation. *Pharmaceutics*. 2022;14(12).
173. Schini M, Vilaca T, Gossiel F, Salam S, Eastell R. Bone Turnover Markers: Basic Biology to Clinical Applications. *Endocr Rev*. 2023;44(3):417–73.
174. Montarele LF, Pitol DL, Pereira BF, Feldman S, Fazan VPS, Issa JPM. Histological and Immunohistochemical Analysis of the Effects of Topical Melatonin Treatment Associated with Collagen Sponge and rhBMP-2 Protein on Bone Remodeling. *Biomolecules*. 2022;12(12).
175. Zhongxing L, Shaohong W, Jinlong L, Limin Z, Yuanzheng W, Haipeng G, et al. Three-dimensional printed hydroxyapatite bone tissue engineering scaffold with antibacterial and osteogenic ability. *J Biol Eng*. 2021;15(1).
176. Gan Q, Pan H, Zhang W, Yuan Y, Qian J, Liu C. Fabrication and evaluation of a BMP-2/dexamethasone co-loaded gelatin sponge scaffold for rapid bone regeneration. *Regen Biomater*. 2022;9.
177. He J, Han X, Wang S, Zhang Y, Dai X, Liu B, et al. Cell sheets of co-cultured BMP-2-modified bone marrow stromal cells and endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration in vitro. *Exp Ther Med*. 2019;18(5):3333–40.
178. Lee YC, Chan YH, Hsieh SC, Lew WZ, Feng SW. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
179. Zeng L, He H, Sun M, Gong X, Zhou M, Hong Y, et al. Runx2 and Nell-1 in dental follicle progenitor cells regulate bone remodeling and tooth eruption. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1).

180. Lechner J, Schulz T, Lejeune B, von Baehr V. Jawbone Cavitation Expressed RANTES/CCL5: Case Studies Linking Silent Inflammation in the Jawbone with Epistemology of Breast Cancer. *Breast Cancer (London)*. 2021;13:225–40.
181. Zeng Z, Lan T, Wei Y, Wei X. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments. *Genes Dis*. 2022;9(1):12.
182. Wintges K, Beil FT, Albers J, Jeschke A, Schweizer M, Claass B, et al. Impaired bone formation and increased osteoclastogenesis in mice lacking chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5). *J Bone Miner Res*. 2013;28(10):2070–80.
183. Liu YC, Kao YT, Huang WK, Lin KY, Wu SC, Hsu SC, et al. CCL5/RANTES is important for inducing osteogenesis of human mesenchymal stem cells and is regulated by dexamethasone. *Biosci Trends*. 2014;8(3):138–43.
184. Watanabe H, Iori T, Lee JW, Kajii TS, Takakura A, Takao-Kawabata R, et al. Association between an Increased Serum CCL5 Level and Pathophysiology of Degenerative Joint Disease in the Temporomandibular Joint in Females. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
185. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323–8.
186. Xiong G, Yang Y, Guo M. Effect of resveratrol on abnormal bone remodeling and angiogenesis of subchondral bone in osteoarthritis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2021;14(4):417.
187. 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).

188. Lang A, Benn A, Wolter A, Balcaen T, Collins J, Kerckhofs G, et al. Endothelial SMAD1/5 signaling couples angiogenesis to osteogenesis during long bone growth. *bioRxiv*. 2023.
189. Marger L, Liaudet N, Scherrer SS, Brembilla NC, Preynat-Seauve O, Manoil D, et al. Identification of Type-H-like Blood Vessels in a Dynamic and Controlled Model of Osteogenesis in Rabbit Calvarium. *Materials (Basel)*. 2022;15(13).
190. Zhai Y, Schilling K, Wang T, El Khatib M, Vinogradov S, Brown EB, et al. Spatiotemporal Blood Vessel Specification at the Osteogenesis and Angiogenesis Interface of Biomimetic Nanofiber-Enabled Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. 2021;276.