

ACTUALIZACIONES / *Reviews*

MATRICES DE TERCERA GENERACIÓN EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS

Andrés Mauricio Cícero,¹ João Paulo Mardegan Issa,² Sara Feldman.^{1,3*}

¹ LABOATEM (Laboratorio de Biología Osteoarticular, Ingeniería Tisular y Terapias Emergentes), Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina. ² Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Univ. de São Paulo, Brasil. ³ Consejo de Investigaciones de la Universidad de Rosario (CIUNR)-CONICET.

Resumen

Existen numerosas patologías que generan situaciones invalidantes debido a problemas asociados a nivel de defectos óseos. Esto genera, en muchas oportunidades, cuestiones sanitarias de alto impacto. La *ingeniería de tejidos* óseos pretende generar propuestas novedosas para reparar pérdidas o fracturas óseas, promoviendo regenerar el tejido mediante el implante de matrices biodegradables que puedan actuar como estructuras para la adhesión celular, favoreciendo el crecimiento y la diferenciación hasta formar hueso *de novo*. El incremento notable de los conocimientos en las áreas biotecnológicas, de síntesis química, así como de biomedicina, permiten el desarrollo de numerosos tipos de matrices de tercera generación, biodegradables y no tóxicas, con características que proponen sean consideradas en la regeneración tisular ósea. Este trabajo intenta resumir los tipos de matrices que mayor impacto han tenido hasta el momento en la medicina regenerativa ósea, mostrando los casos más relevantes de resultados experimentales y clínicos, y propone algunas perspectivas que se deberían considerar para poder aplicarlas a la práctica clínica. Esta es un área que invita a

los investigadores a posicionarse en un pensamiento complejo desde el punto de vista científico-filosófico.

Palabras clave: ingeniería de tejidos, matrices biodegradables, hueso, lesión ósea.

Abstract

THIRD-GENERATION SCAFFOLDS IN BONE TISSUE ENGINEERING

There are several pathologies that generate disability due to complications associated with bone defects. This often generates high impact health troubles. Bone tissue engineering aims to generate novel means to repair bone loss or bone fractures, promoting tissue regeneration through the implantation biodegradable scaffolds, which can act as structures for cell adhesion, that prompts cell growth and differentiation for the novo bone formation.

The remarkable for the novo bone formation in biotechnology, chemical synthesis, and biomedical knowledge allows the development of numerous types of third generation scaffolds, applied to promote bone tissue regeneration.

* E-mail: saryfeldman@gmail.com



This brief report aims to review the scaffolds that have had more impact in bone regenerative medicine so far, describing the most relevant experimental and clinical results. This is an area that invites research

to situate themselves in a complex thought of scientific-philosophical point of view.

Key words: Tissue engineering, biodegradable scaffolds, bone injury, bone.

Introducción

El tejido óseo puede ser considerado como un nanocompuesto de estructura tridimensional con propiedades, entre otras, mecánicas y de microporosidad. Esta microporosidad permite la migración celular y vascularización, mientras que las escalas nanométricas facilitan la adhesión celular y la nucleación mineral.^{1,2} Los cristales minerales permiten soportar situaciones de estrés, y la estructura particular del colágeno se relaciona estrechamente con la capacidad del hueso para sufrir deformaciones. Existen evidencias de que el osteocito es el principal tipo celular responsable de la transducción de estímulos mecánicos o fisiológicos, en una respuesta diferencial celular y tisular.³⁻⁵

Los cambios en los estilos de vida de la población en general, así como el corrimiento de las pirámides poblacionales hacia edades más avanzadas, se relacionan con incrementos en las tasas de fracturas produciendo problemas sociosanitarios de alto impacto.⁶⁻¹⁰

La cirugía ortopédica y odontoestomatológica, la neurocirugía, la cirugía maxilofacial y otras prácticas médicas requieren en numerosas oportunidades la aplicación de técnicas de implantes o de reparación tisular ósea o de ambas. Indudablemente, la comprensión previa de que la reparación tisular fisiológica implica remodelación progresiva y reestructuración de arquitecturas preexistentes de tejidos es indispensable para poder abarcar estos procesos en un sentido integrador.¹¹

Los injertos de hueso se han utilizado frecuentemente desde principios del siglo pasado.¹² Hasta el momento en la práctica clínica existen tratamientos convencionales para la reparación de defectos óseos, en la cual se

utilizan implantes de hueso autólogos o alogénicos, intentando promover mediante estímulos osteogénicos y osoteoconductivos la regeneración tisular y la unión.^{13,14}

El trasplante de hueso autólogo presenta limitaciones en cuanto a la cantidad disponible. La obtención de ese hueso es un procedimiento costoso y doloroso, que puede asociarse a riesgos adicionales debido que el paciente debe ser sometido a dos prácticas quirúrgicas.¹⁵⁻¹⁸

Es por ello que comenzaron a desarrollarse estrategias de trasplantes alogénicos. En la literatura existen referencias de los últimos años acerca de éxitos clínicos obtenidos a través de este tipo de trasplante frente a la necesidad de sustituir una faltante ósea.¹⁹ El trasplante de hueso alogénico, en general, debe ser considerado con mucha cautela. Si bien disminuyen los riesgos de respuestas antigénicas por el rechazo que presentan otros tipos de implantes, todas las estrategias requieren procedimientos de procuración y procesamientos muy controlados y, aun así, pueden presentarse efectos adversos, situaciones que no siempre están del todo documentadas en la literatura.^{20,21}

Entre los primeros sustitutos óseos utilizados debemos destacar los extractos de huesos alogénicos desmineralizados que pretendían preservar factores de crecimiento, colágeno y otras proteínas no colágenas.^{22,23} Sin embargo, los rigurosos procesamientos de esterilización necesarios en este tipo de implantes podrían afectar de manera variable las propiedades osteoinductivas de tales materiales.^{24,25} La osteoinducción es la capacidad de los materiales de injerto para inducir la diferenciación de las células formadoras de

hueso a través de la diferenciación de células madre mesenquimatosas estromales de los tejidos hospedantes circundantes para producir células osteoprogenitoras, seguida por el desarrollo de osteoblastos, razón por la cual es una propiedad muy importante. La alternativa de utilizar aloinjertos óseos como chips de huesos, se consideró *a posteriori* para la reparación de defectos óseos y/o relleno de zonas con pérdida de capital óseo, con muy buenos resultados. En ese aspecto hemos tenido resultados clínicos con muy buena respuesta, si bien se exigen –antes del implante– adecuados procesos de procuración, preparación y esterilización intensiva de las muestras que se van a implantar.²⁶

Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un área biotecnológica cuya denominación surgió para definir un campo de estudio multidisciplinar, que se fundamenta en conocimientos de ingeniería de materiales y ciencias biomédicas y que procura reconstituir, sustituir y/o regenerar tejidos específicos u órganos a través de la implantación de materiales eficaces y prácticos, que pretenden mantener la estructura residual existente así como viabilizar el crecimiento del tejido. Estos materiales deberían actuar como andamiajes que promuevan la proliferación de tejidos vivos.²⁷⁻³⁰ Los biomateriales, para poder ser denominados así, deben poseer características tales que estimulen unas respuestas celulares adecuadas³¹ y que paralelamente sean reemplazados de manera paulatina por el nuevo tejido; su función es, pues, temporal.³²

Ingeniería de tejidos óseos

La ingeniería de tejidos aplicada a la reparación tisular ósea debe procurar, entre otras, que los materiales utilizados como matrices sean potencialmente portadoras de las siguientes características:

a) Osteoinductores, es decir, capaces de promover la diferenciación de células progenitoras en células osteoblásticas.³³⁻³⁷

b) Osteoconductores, es decir que induzcan el crecimiento del hueso circundante.³³⁻³⁷

c) Ser capaces de osteointegrarse, es decir, de integrarse al tejido óseo adyacente, pretendiendo reparar un tejido de forma que quede intacto su estado biomecánico.³³⁻³⁷

El material desarrollado debe ser biodegradable, no debe alterarse en su estructura y propiedades al ser esterilizado mediante métodos sencillos, y, además, debe ser desarrollado considerando que luego pueda producirse en escala industrial para pensar en potenciales aplicaciones biomédicas (Fig.).

Matrices de productos naturales y de síntesis química

La propuesta general de utilizar como matrices biomoléculas naturales es que potencialmente ofrecerían la ventaja de ser reconocidas por las células lindantes al sitio de la lesión sin generar ningún tipo de rechazo; esto les permitiría, incluso, poder unirse a sus receptores de superficie y generar respuestas inmediatas de comienzo de formación del tejido mediante señales bioquímicas liberadas de la propia matriz.³⁸

Las primeras matrices provenientes de productos naturales utilizadas fueron los preparados de colágeno de vaca; se ha demostrado que –si bien no presentaban rechazo– tienen propiedades mecánicas inferiores a las del propio tejido óseo, razón por la cual solamente pueden ser aplicadas en lesiones donde no se debe soportar carga.³⁹ El uso de colágeno natural derivado de tejidos animales puede presentar algunas limitaciones como la calidad y la pureza, que influyen en el rendimiento del colágeno, y hasta la posible contaminación con sustancias patógenas. Por este motivo debe ser seleccionado y purificado adecuadamente.

El grupo de Missana y col. desarrolló una membrana compuesta de colágeno y PTH recombinante humana y obtuvo excelentes resultados de regeneración tisular en un modelo de lesión crítica en calota de ratas. O sea que

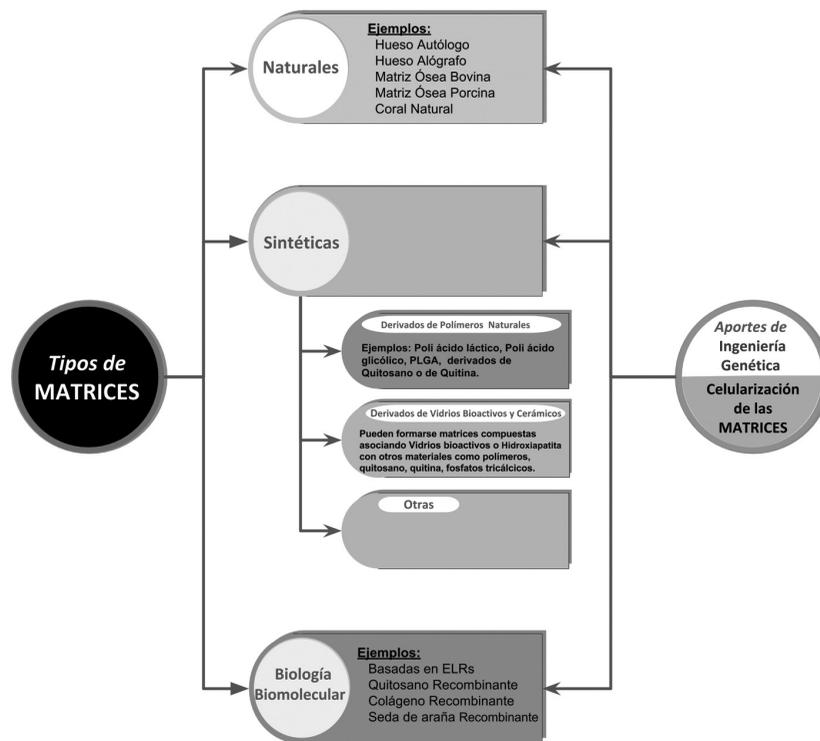


Figura. Clasificación de las matrices según su origen y los aportes de la ingeniería genética.

esta matriz podría actuar como transportador de una hormona que se liberaría en el sitio exacto de la lesión.⁴⁰ La literatura ofrece ejemplos de la utilización del esqueleto de corales y de extractos de hidroxiapatita del esqueleto de peces, como sustancias promotoras de la neogeneración ósea.^{41,42} Sin embargo, los resultados obtenidos por Vago y cols.⁴³ indicaron que este tipo de matrices no poseerían alta capacidad osteoinductiva.

Matrices sintetizadas como polímeros a partir de sustancias naturales

En las dos últimas décadas comenzaron a realizarse múltiples desarrollos de matrices derivadas del quitosano.⁴⁴ Este es un biopolímero que también ha sido considerado como una sustancia derivada de productos naturales, aplicable a la ingeniería de tejidos. Se origina de la desacetilación de la quitina, polímero natural presente en el exoesqueleto de los crustáceos. Es de bajo costo y biodegradable. La

quitina posee grupos acetilos (NHCOCH) que, al sufrir n-desacetilaciones termoquímicas en soluciones concentradas de NaOH, brinda como resultado el polímero quitosano.⁴⁴ Si bien no posee alta resistencia biomecánica, las características de ser no tóxico, presentar alta biocompatibilidad y baja antigenicidad han llevado a considerar al quitosano para el campo de la aplicación biomédica, solo⁴⁵⁻⁴⁹ o combinado, como se describe más adelante.

Existe otro tipo de matrices poliméricas, como por ejemplo las conformadas por poli-hidroxi-ésteres (poli-ácido láctico y poli-ácido glicólico, etc.).^{50,51} Estos biopolímeros son biodegradables y tienen una propiedad más que interesante para pensarlos como candidatos en ingeniería de tejidos: al degradarse luego de un tiempo, se generan sus componentes monoméricos que pueden ser removidos del organismo por vías metabólicas naturalmente existentes, sin presentar complicaciones potenciales de toxicidad.^{52,53} Se han producido

copolímeros de poliláctico (PLA) y poliglicólico (PLGA) y si bien, como ya se ha mencionado, son muy interesantes desde el punto de vista de la degradación, presentan menos grupos iónicos cargados que los polímeros naturales, como colágeno o quitosano, por lo cual no son tan buenos inductores de los procesos de mineralización.⁵³ A pesar de lo mencionado, otros autores sostienen, a partir de experimentos *in vivo*, que PLGA podría ser liberador en el espacio de la lesión de grupos ácidos que podrían causar inflamación e interferir en el proceso de reparación tisular.⁵⁴

Matrices cerámicas

Dentro de este tipo de matrices podemos considerar las derivadas de hidroxiapatita-fosfatos de calcio y los derivados de vidrio bioactivo.

Matrices derivadas de hidroxiapatita y fosfatos de calcio

La hidroxiapatita (HA; $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) es un biomaterial ampliamente considerado como andamiaje para reemplazo del tejido óseo, porque posee una muy buena biocompatibilidad.⁵⁵ Si bien puede obtenerse como extracto natural, existen en el mercado internacional muchos productos de síntesis química.⁵⁶

Se debe destacar una característica muy favorable que poseen las matrices cerámicas derivadas de hidroxiapatita: sus productos de degradación son componentes naturales de los tejidos vivos, por lo cual no generan problemas inmunogénicos. Paralelamente se debe hacer notar que los biomateriales basados en HA de diversos orígenes y procesos de fabricación presentaron diferentes características. Esto indudablemente debe influir en la variabilidad de la respuesta reparadora que se observa al utilizar implantes de este material en lesiones óseas.^{57,58} De todos modos debe considerarse que, si bien son osteoconductoras, no poseen una alta actividad osteoinductiva.⁵⁹ Por ello se han reportado trabajos que muestran que

esta propiedad podría promoverse ya sea modificando las superficies⁶⁰ o incorporando a biomoléculas, como factores de crecimiento, o drogas promotoras de la diferenciación celular hacia osteoblastos.⁶¹ En relación con lo recientemente manifestado se destaca el trabajo con resultados *in vitro* e *in vivo* del grupo de Xiong y cols.⁶² en cual encapsularon en la matriz a la proteína BMP-2. Estos investigadores sintetizaron microesferas de hidroxiapatita que poseían en su interior hidroxiapatita modificada y cargada con la proteína morfogenética. Varios estudios del implante *in vivo* en lesión radial de conejos demostró que este tipo de modificación a las matrices mejoraba su capacidad osteorregenerativa. Los autores sostienen que estas matrices deben ser consideradas para la reparación tisular ósea, a pesar de los resultados aportados por otros con anterioridad, indicando que los derivados de hidroxiapatita no siempre podrían ser de utilidad, ya que presentarían baja tasa de degradación.⁶³ A nivel clínico en relación con esta discusión, es interesante el trabajo desarrollado por Schmitt y cols., quienes elevaron el piso del seno del maxilar, procedimiento que es en muchas circunstancias necesario, antes de la realización de posteriores intervenciones odontológicas. En este trabajo se consideraron diversos tipos de matrices, como derivados de polvo de hueso bovino, cerámicos porosos obtenidos a partir de hidroxiapatita y fosfato de calcio, implante de polvo de hueso humano irradiado, o implante de hueso autólogo. Los autores consideraron que el implante de hueso autólogo era el mejor referente a nivel de resultados, sin embargo juzgaron a los otros sistemas comparables en nivel de eficacia para este tipo de cirugías, y que evitaban así someter a los pacientes a dos intervenciones.⁶⁴

Otro trabajo de reciente publicación muestra la implementación de estrategias 3D que utilizan este tipo de sustancias para la síntesis de andamiajes capaces de simular la estruc-



tura ósea. Esto permitiría examinar el comportamiento de células en cultivo, como herramienta de investigación básica para estudiar el modelado óseo con células en cultivo.⁶⁵

Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos son materiales basados en sílica amorfa. Hench y cols. descubrieron que ciertas composiciones de vidrio que contenían SiO₂, Na₂O, CaO y PO₄ poseían la capacidad de ligarse a tejido óseo circundante, induciendo la formación de un lecho de hidroxiapatita en medio fisiológico.⁶⁶ Hench demostró que la capacidad del vidrio y de la vitrocerámica depende del proceso de degradación de los biomateriales y la posterior formación de una capa de hidroxiapatita en su superficie, que imita la composición ósea mineral y que se une firmemente al tejido óseo continuo a la matriz. Esta hidroxiapatita era muy similar a la fase mineral de la matriz extracelular del tejido óseo y, según estos conceptos, dichas matrices promoverían su interacción interfacial como implante al tejido óseo circundante. El 45S5 Bioglass® de Larry Hench fue el primer material artificial que se demostró que formaba un enlace químico con el hueso, lanzando el campo de la cerámica bioactiva. A partir de entonces se generó una serie de productos derivados de los vidrios bioactivos,⁶⁷⁻⁶⁸ así como la hidroxiapatita sintética y otros fosfatos de calcio cerámicos.^{69,70} Los mecanismos de bioactividad de estos vidrios han sido extensamente estudiados; como referencia puede profundizarse en los trabajos de Rahaman y cols.⁷¹ y Gu y cols.⁷²

Estas matrices también tienen propiedades antibacterianas, lo que sumaría a su actividad osteogénica un efecto muy interesante para la aplicación biomédica.⁷³ Pueden además modificarse de manera tal de modular el rango de liberación del ion Ca⁺⁺, la osmolaridad local y el pH, influenciando las condiciones fisiológicas circundantes y logrando no solo modificar su accionar sino ejercer actividades antibacterianas *in situ*, como puede leerse en la inte-

resante revisión de M.M. Echezarreta-López y M. Landin.⁷⁴ Otros autores han descrito que la actividad antibacteriana de ciertas matrices de vidrios bioactivos podría deberse a su contenido en cationes metálicos como plata, cobre y zinc.^{75,76} Estas propiedades deben manejarse cautelosamente, ya que en ocasiones pueden asociarse a cierto nivel de citotoxicidad, todo lo cual debe ser entonces testado cuidadosamente antes de sus implantes en modelos *in vivo*.⁷⁷

Una de las primeras observaciones clínicas con implantes de vidrios bioactivos puros fueron las efectuadas con el BAG-S53P4 producido en Finlandia. Se observó el efecto reparador y bactericida de este material al aplicarlo en pacientes con osteomielitis, a través de un estudio prospectivo de cohortes en 27 afectados por esta patología. Varios estudios por imágenes demostraron la incorporación del vidrio bioactivo en el hueso del huésped, sin signos de osteólisis ni reacciones periósticas. Sin embargo, algunos restos del material se observaron dos años después de los procesos posimplante, indicando una baja tasa de degradación.⁷⁸ Recientemente se ha publicado un trabajo multinacional realizado en más de mil pacientes con esta patología, los cuales fueron tratados con este material; en un 90% de ellos se obtuvieron excelentes resultados a nivel de osteointegración y control de infecciones.⁷⁹

Matrices de vidrios bioactivos y su interacción con polímeros (matrices compuestas/híbridas)

Las matrices de vidrio bioactivos y derivados cerámicos –si bien, entre otras características, soportan actividades enzimáticas, procesos de angiogénesis y promueven la colonización por parte de osteoblastos– suelen no ser funcionales inmediatamente *a posteriori* de ser implantados, debido a sus propiedades biomecánicas, pues presentan muy baja resistencia a la fractura.⁸⁰ Una alternativa que ha surgido intentando mejorar las propie-

dades mecánicas fue asociar a estas matrices otros polímeros, formando matrices compuestas o matrices híbridas.

Una matriz compuesta está formada por dos o más sustancias con distintas composiciones, estructuras y propiedades y que están separadas por una interfase.⁸¹ Los polímeros más comúnmente utilizados son polilácticos (PLA), poliglicólidos (PGA)⁸² y colágeno.⁸³ Sin embargo, existen dudas acerca de la capacidad osteorregenerativa de estos compuestos ya que, al cubrir la superficie de los vidrios bioactivos, podrían disminuir la potencialidad de estos.⁸⁴

Una matriz híbrida, como su nombre lo indica, ya no es una mezcla de dos o más sustancias, sino un nuevo producto, que se obtiene por diversos procedimientos.⁸⁵⁻⁸⁷ Existe una alternativa novedosa para el desarrollo de estructuras híbridas de vidrio bioactivo con polímeros: el método sol-gel, que requiere una técnica compleja de síntesis, pero donde los componentes interactúan en una red a nivel nanomolecular.⁸⁵⁻⁸⁷ Hemos realizado un estudio *in vivo* de implante de matrices híbridas de vidrio bioactivo con polivinil-alcohol (PVA), con resultados muy satisfactorios. Se debe considerar que una matriz de vidrio bioactivo puede tener alta resistencia a la compresión pero baja elasticidad, y el conformar un híbrido con PVA se realiza también con vistas a mejorar la elasticidad del material.⁸⁴⁻⁸⁷ El PVA es el polímero producido en mayor volumen en el mundo a través de la polimerización de acetato de vinilo y posterior hidrólisis del polímero para obtener el alcohol de polivinilo. Se lo utiliza mucho en la preparación de matrices para la regeneración de tejido óseo debido a sus múltiples propiedades: presenta bajo nivel de toxicidad, alta disponibilidad de sitios de adhesión para moléculas bioactivas, solubilidad en solventes biológicas y, sobre todas las cosas, flexibilidad.⁸⁸

Existen desarrollos previos en los que se ha logrado incorporar a las matrices ciertos

factores de crecimiento, ya sea por uniones físicas o mediante métodos de encapsulación.^{89,-90} A partir de estos avances, decidimos inmovilizar el péptido PTHrp (péptido relacionado con la parathormona) a matrices obtenidas como híbridos de vidrio bioactivo con polivinil-alcohol (MH). Observamos que estas nuevas matrices favorecían *in vitro* procesos demineralización y que eran capaces de liberar al péptido; se decidió entonces implantarlas en nuestro modelo de lesión ósea femoral y observamos que se produjo formación de tejido óseo *de novo* en mayor medida que si implantábamos MH sin PTHrp.⁹¹ Este es un nuevo ejemplo de cómo las matrices podrían no solo actuar como andamio promotor de la neoformación tisular, sino que podrían ser transportadoras de biomoléculas que colaboren con el proceso.

Otra sustancia muy utilizada en procesos de formación de estructuras híbridas es el quitosano.⁴⁴

Hemos participado en el desarrollo de matrices híbridas de vidrio bioactivo-quitosano y polivinil alcohol. Las matrices obtenidas presentaron un 95% de porosidad, con poros interconectados (esto es esencial porque permitiría el paso de mediadores osteogénicos entre las células que podrían ir colonizando eventualmente los poros) y presentaron muy baja citotoxicidad.⁹² Hemos realizado implantes de estas matrices en nuestro modelo de lesión ósea femoral en conejos; ahora los resultados están en etapa de interpretación: si bien se han observado formaciones similares a tejido óseo, se observan células inflamatorias tipo macrófagos. Estos estudios deberían continuarse con otros, longitudinales, así como: a) considerar nuevos sistemas de eliminación de eventuales restos de glutaraldehído necesarios en el proceso de síntesis y b) profundizar en el papel de los macrófagos en los procesos de implante de matrices de síntesis química, dado que una interacción de las células inflamatorias (leucocitos poli-



morfonucleares y células del linaje monocito-macrófago-osteoclastos) y células del linaje mesenquimal (de células madre-osteoblasto) sería esencial para la formación, reparación y remodelación del hueso.⁹³

Matrices compuestas de hidroxiapatita con fosfatos tricálcicos, polímeros y metales

Se han desarrollado muchas estrategias para regenerar lesiones utilizando matrices compuestas de hidroxiapatita con fosfatos tricálcicos y, desde hace tiempo, se observó regeneración de tejido óseo.^{94,95} Son muchos los grupos que han investigado cómo las distintas proporciones de estos componentes podrían ofrecer diversas ventajas, a nivel clínico odontológico.^{96,97} Recientemente se ha publicado un interesante trabajo en el que se demuestra que un compuesto de hidroxiapatita con fosfatos tricálcicos adicionales promovería la diferenciación de células adiposas en cultivo hacia la progenie osteoblástica, abriendo nuevas perspectivas a la utilización de este tipo de matrices.⁹⁸ En el año 2008 se desarrolló un compuesto de hidroxiapatita, fosfato tricálcico y agarosa que mostró adecuada porosidad e interconectividad de los poros. Los autores sostuvieron que presentaba mucha más interconectividad que las matrices hechas con los componentes de manera individual, y eso favorecería la proliferación osteoblástica.⁹⁹

A lo largo de los últimos años se han realizado múltiples diseños de síntesis de compuestos de hidroxiapatita con diversos polímeros, ya sea formando compuestos, o híbridos en escala nanomolecular, o mediante la adhesión a superficies.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Como relevante trabajo en la síntesis de matrices compuestas de hidroxiapatita con polímeros, se destaca el de Lv y cols., quienes lograron obtener un compuesto de copolímeros de PLA y PLGA con hidroxiapatita (HA). Si bien no se realizaron estudios *in vivo*, esta matriz promovió el desarrollo de células mesenquimales de seres humanos en un bio-

reactor. Las matrices compuestas PLGA/n-HA mostraron una mayor proliferación, expresión de marcadores fenotípicos osteogénicos y deposición de minerales en comparación con las células sembradas en matrices conformadas con cada uno de los componentes por separado.¹⁰³

En el año 2016, un grupo de investigadores hicieron un estudio comparativo, en un modelo de lesión ósea en rata, y consideraron los efectos osteorregeneradores del quitosano así como del polímero PLGA o estos dos biomoléculas formando un compuesto con HA. Los autores indicaron que la matriz formada como compuesto ofrecía la mejor respuesta. Si bien se veía disminuida la actividad antibactericida respecto del quitosano cuando se lo utilizaba de manera aislada, el compuesto mostró no solo un aumento de la resistencia sino de la capacidad osteorregeneradora cuando era implantado en un modelo de lesión ósea.¹⁰⁴ Todos estos resultados dejan abiertas las puertas para sostener que las investigaciones de las matrices compuestas e híbridas pueden seguir presentando un campo promisorio para la reparación tisular ósea, ya que se obtienen mejores resultados que frente al implante de los compuestos de manera independiente.

Matrices compuestas con metales

Si bien se han desarrollado múltiples matrices compuestas de HA con metales, en las que se observó *in vitro* un aumento de la proliferación osteoblástica,¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ no son muchos los resultados de estos implantes en modelos *in vivo*. Un ejemplo de trabajo *in vivo* fue el publicado hace tiempo por C. Ning y Y. Zhou,¹⁰⁸ en el cual las matrices fueron implantadas en un modelo de lesión femoral de conejos. Aunque se logró formar una buena interface entre implante-matriz y sin rechazo, esta continúa presente aun a los siete meses posimplante. Por ello han surgido otras propuestas utilizando el magnesio, que es biocompatible, para formar matrices compuestas,¹⁰⁹ las cuales en

principio tendrían más capacidad para biodegradarse que las formadas con titanio.¹¹⁰

Los resultados publicados en el año 2015 de implantes con este tipo de matrices en un modelo de lesión ósea femoral en conejos mostraron que el implante tuvo una degradación extremadamente rápida manifestando señales de estimular un aumento en el remodelamiento óseo y abriendo nuevas perspectivas a este tipo de materiales.¹¹¹

Matrices celularizadas

Desde hace tiempo se ha intentado promover la regeneración de tejido óseo mediante la utilización de células mesenquimales estromales (MSC, de las siglas en inglés *Mesenchymal stromal cells*).^{112,113} Estas células tendrían el potencial de diferenciarse en osteoblastos o condrocitos, dependiendo de las condiciones, motivo por el cual fueron candidatas a ser consideradas en la reparación de lesiones osteoarticulares.¹¹⁴ A partir de estos avances, varios grupos de investigación comenzaron a considerar la posibilidad de celularizar matrices con MSC, intentando promover la reparación tisular ósea de una manera más eficaz, con resultados diversos.^{115,116}

La idea central es sembrar SMC en las matrices bajo estrictas condiciones de esterilidad, y estos andamios deberían ser estructuras capaces de promover la diferenciación celular, soportar la formación de tejidos permitiendo la migración celular y la proliferación: un interesante desarrollo de esta propuesta la realizaron Khaled y colaboradores.¹¹⁷

Se ha reportado un muy buen resultado de regeneración ósea en un modelo experimental de conejos, mediante la utilización de polvo de hueso bovino al que se le incorporaron células mesenquimales derivadas de tejido adiposo, observándose un incremento en la osteointegración de la matriz con respecto a implantes no celularizados.¹¹⁸

Son varios los reportes clínicos que indican buenos resultados al utilizar matrices celularizadas con SMC derivadas de médula

la ósea, tanto en aplicaciones de reparación temporomandibular¹¹⁹ y tratamientos de defectos vertebrales,¹²⁰ como en la reparación de lesiones en huesos largos, en los que se realizó un estudio longitudinal prospectivo,¹²¹ si bien todos fueron estudios piloto. Un interesante reporte clínico prospectivo fue realizado en el año 2016 en la República Checa, en el que observaron mejores efectos al tratar a pacientes con matrices celularizadas con SMC que con matrices sin celularizar.¹²²

A pesar de todo ello, este tipo de metodología aún debe ser considerada con mucha rigurosidad en lo que se refiere a su implementación, dadas las altas exigencias de obtención y cultivo de células mesenquimales sobre matrices en condiciones de esterilidad, las que luego deberían ser implantadas en el sitio de la lesión, más aún teniendo en cuenta que existen evidencias de que otros tipos de estrategias podrían promover resultados similares. Ejemplo de ello son los obtenidos por un grupo de investigadores franceses, quienes publicaron dos trabajos muy interesantes en el año 2016. En el primero realizaron un estudio comparativo de implante en un modelo de lesión ósea en ovejas; se trata de diversos tipos de cerámicos, incluidos corales, con y sin celularizar, habiendo obtenido mejor potencial osteoregenerador al utilizar corales celularizados.¹²³ Sin embargo, recientemente algunos investigadores del mismo grupo informaron resultados de reparación de una lesión metatarsiana en ovejas mediante técnicas de ingeniería de tejidos utilizando matrices derivadas de corales pero sin celularizar: aquí indicaron que, dado que las matrices derivadas de corales solas no son osteoinductivas, el pretratamiento de estas matrices con BMP-2 podrían dar resultados de mayor osteoinductividad, y que el agregado de CMS de manera dual no daba diferencias muy significativas, es decir que el agregado de BMP-2 daba resultados comparables al agregado de CMS.¹²⁴

Los avances en biología molecular han permitido realizar modificaciones en SMC



aplicadas a la regeneración ósea;^{125,126} la ingeniería de tejidos en la que se aplica SMC requiere colectar las células, en condiciones muy controladas, expansión, y eventualmente inducción hacia la progenie osteoblástica y reimplantación *in vivo*. Por esto, el tratamiento para la reparación de lesiones óseas con matrices celularizadas debe ser considerado cuidadosamente frente a cada situación y a cada tipo de matriz. La apertura de estrategias para colonizar directamente células previamente diferenciadas abriría indudablemente nuevas perspectivas a la reparación tisular ósea.

Matrices obtenidas por clonación y expresión de polímeros (proteínas recombinantes)

La clonación y expresión de polímeros de ciertas proteínas son la base que da fundamento a este tipo de estrategias, y proporcionan una oportunidad única para los diseños de biomateriales, debido a que se puede definir la cantidad de secuencias, el control de expresión de estas y las modificaciones que pudieren querer realizarse.

Como ejemplos de estos avances, podemos comentar el trabajo de un grupo de investigadores españoles,¹²⁷ quienes produjeron un recombinante de la proteína humana colágeno tipo I, enriquecida en una secuencia de reconocimiento celular RGD para moléculas de adhesión.¹²⁸ Los autores propusieron la síntesis de un material compuesto de estructura nanomolecular, promoviendo la mineralización de esta proteína recombinante en presencia de un medio enriquecido en ion Mg^{++} . Los resultados mostraron una adecuada composición de la matriz, con un adecuado crecimiento celular, pero son estudios aún preliminares.

También debemos destacar los resultados obtenidos en los últimos años con proteínas recombinantes derivadas de la seda de la araña: se sintetizó una matriz compuesta en un proceso de inducción de mineralización con fosfatos de calcio, en presencia de esta

proteína recombinante.¹²⁹ Los resultados del cultivo *in vitro* en presencia de esta matriz de células SMC mostraron un incremento en la expresión de marcadores osteoblásticos (actividad de fosfatasa alcalina), si se comparaba cuando crecían con los constituyentes por separado. Otro trabajo muy interesante recientemente publicado utilizando proteína recombinante de seda de araña, nos brinda resultados *in vitro*: realizándole ciertas modificaciones en su secuencia lograron obtener una proteína recombinante que potenciaría procesos de mineralización, si bien aún no se han realizado estudios *in vivo*.¹³⁰

Geles recombinantes del tipo elastina:

Hemos desarrollado estudios *in vivo* en donde observamos regeneración ósea utilizando geles recombinantes del tipo elastina (ELR), en un trabajo colaborativo internacional.¹³¹ Los biomateriales ELR son muy prometedores, ya que su diseño puede adaptarse mediante ingeniería genética, lo que permite una producción escalable y una consistencia de lote a lote, entre otros. Además, pueden autoensamblarse en hidrogeles físicamente reticulados por encima de una cierta temperatura de transición, en este caso la temperatura corporal, pero son inyectables por debajo de esta temperatura, reduciendo así notablemente la invasividad quirúrgica. Aquí hemos desarrollado dos ELR bioactivos formadores de hidrogeles, uno que incluye la BMP-2 osteogénica y osteoinductora y el otro, el motivo de adhesión celular RGD. La combinación de estos dos ELR nuevos da como resultado un hidrogel de matriz extracelular cargado con BMP-2. Además, los dominios sensibles a la elastasa se incluyeron en ambas moléculas de ELR, confiriendo así biodegradación como resultado de la escisión enzimática y evitando la necesidad de retirar el andamio después de la regeneración ósea. Se implantaron ambos geles en un estudio de lesión ósea femoral en conejos, promoviendo una regeneración completa en

seis de los siete casos y el otro mostrando un cierre parcial del defecto. La neoformación ósea se confirmó utilizando diferentes técnicas, como la radiografía, la tomografía computarizada y la histología. Este sistema de hidrogel presenta, por lo tanto, un potencial significativo en la reparación de defectos óseos, promoviendo la autorregeneración por el tejido circundante, favorecido esto por el efecto la liberación en forma controlada de BMP-2, escisión mediada por elastasa. Estos resultados son promisorios ya que se han logrado sin necesidad de incluir células mesenquimales en la matriz antes del implante.

Modificaciones de superficies metálicas

En muchas circunstancias se requiere, frente a una faltante ósea, la colocación de implantes que puedan soportar cargas de manera inmediata. Es por ello que el desarrollo de implantes metálicos sigue siendo de gran importancia y se consideran de segunda generación. Notablemente, frente a estas situaciones los avances tecnológicos están permitiendo desarrollar nuevos sistemas de preparación de los implantes metálicos, que indudablemente favorecerían procesos de osteointegración.^{132,133} Pueden considerarse entonces los novedosos tratamientos hechos a superficies metálicas como adelantos que solucionan y solucionarán muchos tipos de problemas de la práctica médica. Si bien en esta clase de tecnologías no se generan matrices biodegradables, se pueden considerar una estrategia relacionada estrechamente con la ingeniería de tejidos, ya que el procesamiento de las superficies de estos materiales se realiza pretendiendo favorecer la osteointegración de las matrices al sitio del implante.¹³²⁻¹³⁵

Interacción de estrategias de biología molecular, con productos naturales y/o de síntesis química

En los últimos años se han publicado novedosos resultados de avances, aplicando estrategias de última generación, que han

permitido el desarrollo de nuevos tipos de matrices que, por ejemplo, derivan de polímeros naturales, pero que se han unido a estructuras de nanotubos de carbono,¹³⁶ o matrices producto de la modificación de la hidroxiapatita con estrategias químicas de avanzada según los resultados recientemente publicados por investigadores de la Argentina.^{137,138} Se ha informado sobre el desarrollo de un nuevo tipo de matrices que encapsulan péptidos, como por ejemplo lo realizado por el grupo de Gentile y cols. en Inglaterra, quienes obtuvieron mediante el implante de esas matrices muy buenos resultados de regeneración tisular en lesiones óseas de calota de rata, luego de analizarlo a los cuatro meses posimplante.¹³⁹ La interacción de las técnicas mencionadas con los avances en ingeniería genética está permitiendo en la actualidad nuevos resultados: algunos ejemplos reciente de estos avances son los resultados publicados por Nie y cols. en 2017, quienes lograron obtener una matriz compuesta derivada de corales que se sembró con células estromales de folículo dental de rata transfectadas previamente con un adenovirus para expresar BMP-9, observándose a nivel experimental un incremento en la reparación de un defecto óseo alveolar en comparación con los respectivos grupos controles.¹⁴⁰ Si lo que se pretende es trabajar con celularización de matrices, no se deben dejar de considerar los hallazgos de Worthley y cols., publicados en la revista *Cell*,¹⁴¹ quienes demostraron que la expresión de la proteína morfogenética ósea (BMP) gremlin 1 define una población de células madre osteocondrorreticular (OCR) en la médula ósea, que se autorrenuevan y generan osteoblastos, condrocitos y células estromales medulares reticulares. Varios estudios *in vivo* de trasplante de células GREM+ formando parte de un hidrogel mostraron desarrollo de osteoblastos en la zona de la fractura, renovando nuevamente el área de las matrices celularizadas. Son notables los resultados obtenidos a nivel experimental aplicando ma-



trices muy particulares, que actuarían como un sistema de andamiaje y paralelamente serían portadoras de secuencias de ADN que podrían liberarse *in situ* en el lugar del implante, modificando la expresión génica de las células que eventualmente colonizarían la matriz.¹⁴²⁻¹⁴⁵

Hay un solo estudio clínico obtenido con este tipo de estrategias muy interesante, desarrollado en Rusia, en el que –si bien solo se reporta un paciente tratado, el que frente a otras estrategias quirúrgicas previas había presentado problemas en las uniones de su mandíbula– se logró repararlas frente al implante matriz cuyo andamiaje está formado por hidroxiapatita y colágeno al cual se le adicionó el gen para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF).¹⁴⁶

Desarrollo de tecnología tridimensional: mejoramiento de la respuesta mecánica

El desarrollo de tecnología tridimensional (3D)¹⁴⁷ aporta alternativas para la síntesis de matrices de última generación, permitiendo el diseño con mejores respuestas a la compresión, además de poder potencialmente diseñarse para el sitio exacto de la lesión que se va a implantar. Otro ejemplo de estos últimos avances notables son los resultados obtenidos por Kim y cols., quienes han desarrollado matrices compuestas modificadas en su superficie con policaprolactona, de manera tal que no solo han logrado incrementar significativamente la resistencia a la compresión sino también generar mecanismos promotores de la diferenciación celular.¹⁴⁸ Notables son los resultados obtenidos por el grupo de Riehl y cols., quienes estudiaron células en cultivo en biorreactores con matrices 3D sometidas a estiramiento que podrían incrementar su respuesta proliferativa, abriendo un campo de aplicación de la ingeniería de tejidos en relación con su comportamiento biomecánico¹⁴⁹. Se desprende de ello que el tema de ingeniería de tejidos debe integrar aspectos de resistencia y flexibilidad de los materiales, lo que favorecería, de lograrse, que se pueda consi-

derar este tipo de materiales de reemplazo en lesiones que deban soportar cargas, temática para abordar en otra revisión ad hoc.

Conclusión

Esta revisión pretende presentar a la ingeniería de tejidos no solo como el resultado de la interacción de muchas disciplinas tecnológicas, bioquímicas y médicas, etc.: es además un área en la cual el conocimiento actualizado de los mecanismos involucrados en el metabolismo óseo, las interacciones de los diversos tipos celulares del tejido óseo y sus señales^{150,151} se torna una necesidad para ofrecer respuestas correctas, y poder desarrollar y aplicar matrices adecuadas a la regeneración ósea. Se propone que se deben considerar todas estas disciplinas con un pensamiento creativo y complejo.¹⁵²⁻¹⁵⁵ El desarrollo de matrices de tercera generación aplicado a la ingeniería de tejidos óseos se halla en continuo avance, y sus primeros aportes están dando muy buenos resultados a nivel clínico, permitiendo ampliar las posibilidades de la medicina en aspectos regenerativos. Con el desarrollo de estas tecnologías podría haber distintas soluciones para distintos tipos de lesiones óseas: deberán considerarse, en cada situación, el tipo de hueso, el tipo de lesión, si ha ocurrido en un lugar que inmediatamente debe o no soportar carga, el estado metabólico del individuo que se va a implantar, y toda una suerte de cuestiones clínicas que el médico tratante deberá considerar, antes de su implementación. La ingeniería de tejidos es un área promisoría que ya no pertenece a la ciencia ficción, sino que está comenzando a dar respuestas a problemas reales promoviendo el desarrollo de nuevas matrices.

Agradecimientos

La Dra. Feldman agradece profundamente las orientaciones profesionales para iniciarse oportunamente en esta área de trabajo de los Dres.: Teresita Bellido, Lilian Plotkin y Ricardo Bataglino, Estados Unidos; Marivalda de Magalhaes Pereira, Brasil; Pedro Esbrit, España.

Referencias

- Nair AK, Gautieri A, Chang SW, Buehler MJ. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nat Commun* 2013; 4:1724.
- Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* 2004; 14:2115-23.
- Santos A, Bakker AD, Klein-Nulend J. The role of osteocytes in bone mechanotransduction. *Osteoporos Int* 2009; 20:1027-31.
- Turner CH, Warden SJ, Bellido T, et al. Mechanobiology of the skeleton. *SciSignal* 2009; 2.
- Tu X, Rhee Y, Condon KW, et al. Sost down-regulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone* 2012; 50:209-17.
- Foss NB, Kehlet H. Mortality analysis in hip fracture patients: implications for design of future outcome trials. *Br J Anaesth* 2005; 94:24-9.
- Mears SC, Kates SL. A Guide to Improving the Care of Patients with Fragility Fractures, Edition.
- Cointry GR, Capozza RF, Feldman S, Reina P, Ferretti JL. Estructura, Funciones y Calidad Óseas. En: Ardila E, Mautalen C, Jiménez C (eds). Osteoporosis en Iberoamérica. 2ª ed. Bogotá: El Manual Moderno; 2012. pp. 33-71.
- Compston J. Osteoporosis: social and economic impact. *Radiol Clin North Am* 2010; 48:477-82.
- Court-Brown CN, Caesar B. Epidemiology of adult fractures: A review Injury. *Int J Care Injured* 2006; 37:691-7.
- Romanos G, Froum S, Hery C, Cho SC, Tarnow D. Survival rate of immediately vs delayed loaded implants: analysis of the current literature. *J Oral Implantol Review* 2010; 36:315-24.
- Chase SW, Herndon CH. The fate of autogenous and homogeneous bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1955; 37-A: 809-41.
- Tyszkiewicz J, Uhrynowska-Tyszkiewicz IA, Kaminsky A, et al. Amnion allografts prepared in the Central Tissue Bank in Warsaw. *Ann Transplant* 1999; 4:85-90.
- Silberman FS. Aloinjertosóseos. *Rev Asoc Argent OrtopTraumatol* 1999; 64:69-74.
- Mehta M, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Mooney DJ. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Adv Drug Deliv* 2012; 64:1257-76.
- Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192-5.
- Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9:210-8.
- St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, et al. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting *Am J Orthop* 2003; 32:18-23.
- Melville JC, Nassari NN, Hanna IA, Shum JW, Wong ME, Young S. Immediate Transoral Allogeneic Bone Grafting for Large Mandibular Defects Less Morbidity, More Bone A Paradigm in Benign Tumor Mandibular Reconstruction?. *J Oral MaxillofacSurg* 2017; 75:828-38.
- Draenert FG, Kämmerer PW, Berthold M, Neff A. Complications with allogeneic, cancellous bone blocks in vertical alveolar ridge augmentation: prospective clinical case study and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016; 122:31-43.
- Chiapasco M, Colletti G, Coggiola A, Di Martino G, Anello T, Romeo E. Clinical outcome of the use of fresh frozen allogeneic bone grafts for the reconstruction of severely resorbed alveolar ridges: preliminary results of a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015; 30:450-60.
- Urist MR. Demineralised bone matrix (DBM) is an example of a natural biomaterial that is commonly used clinically as a bone graft substitute. *Science* 1965; 150:893-9.
- Sawkins M, Bowen W, Dhadda P, et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta Biomater* 2013; 9:7865-73.



24. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix Preparations in a spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86:2243-50.
25. Lee YP, Jo M, Luna M, Chien B, Lieberman JR, Wang JC. The efficacy of different commercially available demineralized bone matrix substances in an athymic rat model. *J Spinal Disord Tech* 2005; 18:439-44.
26. Kremenetzky A, Kremenetzky L, Feldman S. Aplicación de aloinjerto óseo como cemento biológico. *Rev Asoc Argent Ortop y Traumatol* 2006;71:61-6.
27. Bonassar L, Vacanti CA. Tissue engineering: The first decade and beyond. *J Cell Biochem* 1998; 72:297-303
28. Wintermantel E, Mayer J, Blum J, et al. Tissue engineering scaffolds using superstructures. *Biomaterials* 1994; 17: 83-91.
29. Stock UA, Cacanti JP. Tissue Engineering: Current State and Prospects. *Annu Rev Med* 2001; 52:443-51.
30. Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering - Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science* 2002; 295:1009-14.
31. Callister WD. Materials Science and Engineering. An Introduction. 6° ed. London: J. Wiley & Sons; 2002.
32. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001; 12(1):107-24.
33. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86:1541-48.
34. Zhang S, Zhang X, Cai Q, Wang B, Deng X, Yang X. Microfibrous β -TCP/collagen scaffolds mimic woven bone in structure and composition. *Biomed Mater* 2010; 5:065005.
35. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 2006; 3:589-601.
36. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012; 40:363-408.
37. Cointry G, Capozza R, Feldman S, et al. ¿Los huesos son estructuras genéticas, metabólicas, biomecánicas, o todo a la vez?. *Actual Osteol* 2009; 5:185-95.
38. Siebers MC, terBrugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 2005; 26:137-46.
39. Gibbs DM, Black CR, Dawson JI, Oreffo RO. A review of hydrogel use in fracture healing and bone Regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10: 187-98.
40. Missana LR, Jammal MV. Critical size defect regeneration by rhPTH-collagen membrane as a new tissue engineering tool. *J Biomed Materials Research* 2014; 00A:1-7.
41. Arnaud E, Morieux C, Wybier M, de Vernejoul MC. Potentiation of transforming growth factor (TGF-beta 1) by natural coral and fibrin in a rabbit cranioplasty model. *Calcif Tissue Int* 1994; 54:493-8.
42. Green D, Walsh D, Mann S, Oreffo ROC. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone* 2002; 30:810-5.
43. Vago R, Plotquin D, Bunin A, Sinelnikov I, Atar D, Itzhak D. Hard tissue remodeling using bio-fabricated coralline biomaterials. *J Biochem Biophys Methods* 2002; 50:2-259.
44. Panda NN, Pramanik K, Sukla LB. Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite from fresh water fish scales for tissue engineering scaffold. *Bioprocess Biosyst Eng* 2014; 37:433-40.
45. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra MV, Fok ML, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Rev Eletr de Mater Proc* 2007; 2:27-8.
46. Zargar V, Asghari M, Dashti A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *Chem Bio Eng* 2015; 2:204-6.
47. Liu YL, Su YH, Lai JY. In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan-silica hy-

- brid membranes with using γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent. *Polym* 2004; 45:6831-7.
48. Subramanian A, Rau AV, Kaligotla H. Surface modification of chitosan for selective surface-protein interaction. *Carbohydr Polym* 2006; 66:321-32.
 49. Venkatesan J, Kim S-K. Chitosan composites for bone tissue engineering - an overview. *Mar Drugs* 2010; 8:2252-66.
 50. Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: State of the art and recent developments. *Compos Sci Technol* 2004; 64:789-817.
 51. Lin HR, Kuo CJ, Yang CY, Shaw SY, Wu YJ. Preparation of macroporous biodegradable PLGA scaffolds for cell attachment with the use of mixed salts as porogen additives. *J Biomed Mater Res* 2002; 63:271-9.
 52. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An Overview of Poly (lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 2014; 15:3640-59.
 53. Jagur-Grodzinski J. Biomedical application of functional polymers. *React Funct Polym* 1999; 39:99-138.
 54. Tiainen J, Soini Y, Suokas E, et al. Tissue reactions to bioabsorbable ciprofloxacin-releasing polylactide-polyglycolide 80/20 screws in rabbits' cranial bone. *J Mater Sci Mater* 2006 17; 1315-22.
 55. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem Eng Res Des* 2007; 85:1051-64.
 56. Aguiar H, Serra J, González P. Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales. *An Quím* 2011; 107:237-42.
 57. Lee WH, Zavgorodniy AV, Loo CY, Rohanizadeh R. Synthesis and characterization of hydroxyapatite with different crystallinity: effects on protein adsorption and release. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100:1539-49.
 58. Marković S, Lukić MJ, Škapin SD, Stojanović B, Uskokovic D. Designing, fabrication and characterization of nanostructured functionally graded HAp/BCP ceramics. *Ceram Int* 2015; 41:2654-67.
 59. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 395:81-98.
 60. Martínez C, Olmedo D, Ozols A. Matriz para ingeniería de tejido óseo: modificación superficial con zinc Estudio preliminar. *Rev Asoc Argent Ortop y Traumatol* 2013; 3:138-43.
 61. Blom EJ, Klein-Nulend J, Wolke JGC, van Waas MAJ, Driessens FCM, Burger EH. Transforming growth factor-b1 incorporation in a calcium phosphate bone cement: material properties and release characteristics. *J Biomed Mater Res* 2002; 59:265-72.
 62. Xiong L, Zeng J, Yao A, Tu Q, Li J, Yan L, Tang Z. BMP2-loaded hollow hydroxyapatite microspheres exhibit enhanced osteoinduction and osteogenicity in large bone defects. *Int J Nanomedicine* 2015; 10:5-526.
 63. Klein CP, Driessen AA, Groot K, Van den Hooff. A Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 1983; 17:769-84.
 64. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Impl Res* 2013; 24:576-85.
 65. Montufar EB, Vojtova L, Celko L, Ginebra MP. Calcium Phosphate Foams: potential Scaffolds for Bone Tissue Modeling in Three Dimensions Methods. *Mol Biol* 2017; 1612:79-94.
 66. Hench, LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991; 74:1487-510.
 67. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17:967-78.
 68. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res Symp* 1971; 334:117-41.



69. Kokubo T. Bioactive glass-ceramics - properties and applications. *Biomaterials* 1991; 12:155-63.
70. Fernandes JS, Gentile P, Moorehead R, et al. Design and properties of novel substituted borosilicate bioactive glasses and their glass-ceramic derivatives. *Cryst Growth Des* 2016 16:3731-40.
71. Rahaman MN, Day DE, Sonny Bal B, et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater* 2011; 7:2355-73.
72. Gu Y, Wang G, Zhang X, et al. Biodegradable borosilicate bioactive glass scaffolds with a trabecular microstructure for bone repair. *Mater Sci Eng C* 2014; 36:294-300.
73. Moya JS, Cabal B, Sanz J, et al. Mechanism of calcium leaching in soda-lime glasses with a strong biocide activity. *Mater Lett* 2012 70:113-5.
74. Echezarreta-López MM, Landin M. Using machine learning for improving knowledge on antibacterial effect of bioactive glass. *Int J Pharm* 2013; 453:641-7.
75. Top A, Ülkü S. Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity. *Appl Clay Sci* 2004 27:13-9.
76. Fernandes JS, Gentile P, Pires RA, Reis RL, Hatton PV. Multifunctional Bioactive Glass and Glass-Ceramic Biomaterials with Antibacterial Properties for Repair and Regeneration of Bone Tissue. *Acta Biomater* 2017; 59:2-11.
77. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials* 2013; 34:8533-54.
78. Drago L, Romanò D, De Vecchi E, et al. Bioactive glass BAG-S53P4 for the adjunctive treatment of chronic osteomyelitis of the long bones: an in vitro and prospective clinical study. *BMC Infect Dis* 2013; 13:584.
79. Lindfors N, Geurts J, Drago L, et al. Antibacterial Bioactive Glass, S53P4, for Chronic Bone Infections - A Multinational Study. *Adv Exp Med Biol* 2017; 971:81-92.
80. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012; 40:363-408.
81. Oréfice RJ, Magalhaes Pereira M, Sander Mansur. H Biomateriais Fundamentos & Aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica;2012.
82. Lu HH, El-Amin SF, Scott KD, Laurencin CT. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *J Biomed Mater Res Part A* 2003; 64:465-74.
83. Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24:4987-97.
84. Niemela T, Niiranen H, Kellomaki M, Tormala P. Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents Part 1: Initial mechanical properties and bioactivity. *Acta Biomater* 2005; 1:235-42.
85. Novak BM. Hybrid nanocomposite materials - between inorganic glasses and organic polymers. *Adv Mater* 1993; 5:422-33.
86. Pereira MM, Jones JR, Hench LL. Bioactive Glass and Hybrid Scaffolds Prepared by the Sol-Gel Method for Bone Tissue Engineering. *Adv Appl Ceram* 2005; 104:35-42.
87. Oliveira H, Mansur S, Pereira MM. Acid Character Control of bioactive Glass/Polyvinyl Alcohol Hybrid Foams Produced by Sol-Gel. *J Sol-Gel Sci Technol* 2008; 47:335-46.
88. Goy DP, Gorosito E, Costab HS, et al. Hybrid Matrix Grafts to Favor Tissue Regeneration in Rabbit Femur Bone Lesions. *Open Biomed Eng J* 2012, 6:85-91.
89. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64:1292-309.
90. Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:234-48.

91. Coletta DJ, Lozano D, Rocha-Oliveira AA, et al. Characterization of hybrid bioactive glass-polyvinyl alcohol scaffolds containing a PTHrP-derived pentapeptide as implants for tissue engineering applications. *Open Biomed Eng J* 2014; 8:20-7.
92. Rodrigues Pereira da Silva A, Lício Macedo T, Coletta DJ, Feldman S, Magalhães Pereira M. Synthesis, characterization and cytotoxicity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Bioactive Glass hybrid scaffolds obtained by lyophilization. *Materia* 2016; 21:964-73.
93. Loi F, Cordova LA, Pajarinen J, Lin T, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 2016; 86:119-30.
94. Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, et al. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous α -TCP and β -TCP. *J Mater Sci - Mater Med* 2001; 12:7-13.
95. Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaître L, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996; 30:193-200.
96. Dorozhkin SV. Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates. *Biomater* 2001 1:3-56.
97. Mangano C, Perrotti V, Shibli JA, et al. Maxillary sinus grafting with biphasic calcium phosphate ceramics: clinical and histologic evaluation in man. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013; 28:51-6.
98. Li Q, Wang T, Zhang G, et al. A Comparative Evaluation of the Mechanical Properties of Two Calcium Phosphate/Collagen Composite Materials and Their Osteogenic Effects on Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Inter* 2016; 2016.
99. Salcedo S, Nieto A, Vallet-Reg A. Hydroxyapatite/tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. *Chem Eng J* 2008; 137:62-71.
100. Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering - a review. *J Biomed Nanotechnol* 2014; 10:3124-40.
101. Ignjatović NL, Liu CZ, Czernuszka JT, Uskoković DP. Micro -and nano-injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly (DL-lactide-co-glycolide). *Acta Biomater* 2007; 3:927-35.
102. Ignjatovic NL, Ajdukovic ZR, Savic VP, Uskokovic DP. Size effect of calcium phosphate coated with poly-DL-lactide- co-glycolide on healing processes in bone reconstruction. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2010; 94:108-17.
103. Lv Q, Deng M, Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Nano-ceramic composite scaffolds for bioreactor-based bone engineering. *ClinOrthopRelat Res* 2013; 471:2422-33.
104. Ignjatović N, Wu V, Ajduković Z, Mihajilov-Krstev T, Uskoković V, Uskoković D. Chitosan-PLGA polymer blends as coatings for hydroxyapatite nanoparticles and their effect on antimicrobial properties, osteoconductivity and regeneration of osseous tissues. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016; 60:357-64.
105. Hyzy SL, Berg ME, Schneider JM, Hotchkiss K, Schwartz Z, Boyan BD. Osteoblast lineage cells can discriminate microscale topographic features on titanium-aluminum-vanadium surfaces. *Ann Biomed* 2014; 42:2551-61.
106. Vandrovcová M, Bačáková L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res* 2011; 60:403-17.
107. Cunha C1, Sprio S, Panseri S, Dapporto M, Marcacci M, Tampieri A. High biocompatibility and improved osteogenic potential of novel Ca-P/titania composite scaffolds designed for regeneration of load-bearing segmental bone defects. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101:1612-9.
108. Ning C, Zhou Y. Correlations between the in vitro and in vivo bioactivity of the Ti/HA composites fabricated by a powder metallurgy method. *Acta Biomater* 2008; 4:1944-52.
109. Klaassen CD, Casarett LJ, Doull J. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 8th. Ed New York: McGraw-Hill Education; 2013.
110. Li Z, Gu X, Lou S, Zheng Y. The development



- of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials* 2008; 29:1329-44.
111. Charyeva O, Thormann U, Lips KS, et al. Histological Comparison of New Biodegradable Magnesium-Based Implants for Maxillofacial Applications. *Maxillofac Oral Surg* 2015; 14:637-45.
 112. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7:393-5.
 113. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2011; 344:385-6.
 114. Lebouvier A, Poignard A, Cavet M, et al. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6:68.
 115. Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Bohner M, Richter W. Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater* 2008; 4:1904-15.
 116. de Peppo GM, Sjøvall P, Lennerås M, et al. Osteogenic potential of human mesenchymal stem cells and human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors: a tissue engineering perspective. *Tissue Eng Part A* 2010; 16:3413-26.
 117. Khaled EG, Saleh M, Hindocha S, M Griffin M, Khan WS. Tissue Engineering for Bone Production- Stem Cells, Gene Therapy and Scaffolds. *Open Orthop J* 2011; 5:2-295.
 118. Pieri F, Lucarell E, Corinaldesi G, et al. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials* 2010; 31:3527-35.
 119. Grayson WL, Frohlich M, Yeager K. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107:3299-304.
 120. Vanecek V, Klima K, Kohout A, et al. The combination of mesenchymal stem cells and a bone scaffold in the treatment of vertebral body defects. *Eur Spine J* 2013; 22:2777-86.
 121. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. Stem cells associated with macroporous bio-ceramics for long bone repair: 6- To 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007; 13(5):947-55.
 122. Sponer P, Filip S, Kucera T, et al. Utilizing Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and β -Tricalcium Phosphate Scaffold in Human Bone Defects: A Prospective, Controlled Feasibility Trial. *Biomed Res Int* 2016; 2016:2076061.
 123. Viateau V, Manassero M, Sensébé E, et al. Comparative study of the osteogenic ability of four different ceramic constructs in an ectopic large animal model. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10:E177-87.
 124. Decambron A, Fournet A, Bensidhoum M. Low-dose BMP-2 and MSC dual delivery onto coral scaffold for critical-size bone defect regeneration in sheep. *J Orthop Res* 2017.
 125. Parikh SN. Gene therapy: principles and clinical applications in orthopedics. *Orthopedics* 2004; 27:294-303.
 126. Franceschi RT, Yang S, Rutherford RB, Krebsbach PH, Zhao M, Wang D. Gene therapy approaches for bone regeneration. *Cells Tissues Organs* 2004; 176:95-108.
 127. Ramírez-Rodríguez GB, Delgado-López JM, Lafisco M, et al. A Biomimetic mineralization of recombinant collagen type I derived protein to obtain hybrid matrices for bone regeneration. *J Struct Biol* 2016; 196:138-46.
 128. García AJ. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2005; 26:7525-9.
 129. Hardy JG, Torres-Rendon JG, Leal-Egaña A, et al. Biomineralization of engineered spider silk protein-based composite materials for bone tissue engineering. *Materials* 2016; 9:560.
 130. Dinjaski N, Plowright R, Zhou S, Belton DJ, Perry CC, Kaplan DL. Osteoinductive recombinant silk fusion proteins for bone regeneration. *Acta Biomater* 2017; 49:127-39.

131. Coletta DJ, Ibáñez-Fonseca A, Missana LR, et al. Bone regeneration mediated by a bioactive and biodegradable ECM-like hydrogel based on elastin-like recombinamers. *Tissue Eng Part A* 2017.
132. Gravina N, Maghni K, Welman M, Yahia L'Hocine, Mbeh DA, Messina PV. Protective role against hydrogen peroxide and fibroblast stimulation via Ce-doped TiO₂ nanostructured materials. *BBA General Subjects* 2016; 1860:452-4.
133. Guillot R, Pignot-Paintrand I, Lavaud J, et al. Assessment of a polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle. *Acta Biomater* 2016; 36:310-22.
134. Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnol* 2015; 26:062002.
135. Minagar S, Wang J, Berndt CC, Ivanova EP, Wen C. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101:2726-39.
136. Silva E, Vasconcellos LM, Rodrigues BV, et al. PDLLA honeycomb-like scaffolds with a high loading of superhydrophilic graphene/multi-walled carbon nanotubes promote osteoblast in vitro functions and guided in vivo bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 73:31-9.
137. Andrés NC, D'Elía NL, Ruso JM, Campelo AE, Massheimer VL, Messina PV. Manipulation of Mg²⁺-Ca²⁺ Switch on the Development of Bone Mimetic Hydroxyapatite. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017; 9:15698-710.
138. D'Elía NL, Mathieu C, Hoemann CD, Laiuppa JA, Santillán GE, Messina PV. Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rods superstructures. *Nanoscale* 2015; 7:18751-762.
139. Gentile P, Ferreira AM, Callaghan JT, et al. Multilayer Nanoscale Encapsulation of Bio-functional Peptides to Enhance Bone Tissue Regeneration In Vivo. *Adv Healthc Mater* 2017; 6.
140. Nie L, Yang X, Duan L, et al. The healing of alveolar bone defects with novel bio-implants composed of Ad-BMP9-transfected rDFCs and CHA scaffolds. *Sci Rep* 2017; 7:6373.
141. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* 2017; 160:269-84.
142. Keeney M, van den Beucken JJP, van der Kraan PM, Jansen JA, Pandit A. The ability of a collagen/calcium phosphate scaffold to act as its own vector for gene delivery and to promote bone formation via transfection with VEGF165. *Biomaterials* 2010; 31:2893-902.
143. Elangovan S, D'Mello SR, Hong L, et al. The enhancement of bone regeneration by gene activated matrix encoding for platelet derived growth factor. *Biomaterials* 2014 35:737-47.
144. Zhang Y, Cheng N, Miron R, Shi B, Cheng X. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials* 2012; 33:6698-708.
145. Deev R, Drobyshev A, Bozo I, Isaev A. Angiogenic non-viral gene transfer: from ischemia treatment to bone defects repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2014; 8:64-5.
146. Bozo Y, Deev RB, Drobyshe AY, Isaev AA, Eremine II. World's First Clinical Case of Gene-Activated Bone Substitute Application. *Case Rep Dent* 2016.
147. Kim BS, Yang SS, Park H, Lee SH, Cho YS, Lee J. Improvement of mechanical strength and osteogenic potential of calcium sulfate-based hydroxyapatite 3-dimensional printed scaffolds by ε-polycarbonate coating. *J Biomater Sci Polym Ed* 2017; 28:1256-70.
148. Kim BS, Yang SS, Park H, Lee SH, Cho YS, Lee J. Improvement of mechanical strength and osteogenic potential of calcium sulfate-based hydroxyapatite 3-dimensional printed scaffolds by ε-polycarbonate coating. *J Biomater Sci Polym Ed* 2017; 28:1256-70.
149. Riehl BD, Park JH, Kwon IK, Lim JY. Mechanical stretching for tissue engineering: two-dimensional and three-dimensional constructs. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18:288-300.
150. Plotkin LI, Laird DW, Amedee J. Role of connexins and pannexins during ontogeny, re-



- generation, and pathologies of bone. *BMC Cell Biol* 2016; 17:19.
151. Gortazar AR, Martin-Millan M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T. Crosstalk between Caveolin-1/ Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and β -Catenin Survival Pathways in Osteocyte Mechanotransduction. *J Biol Chem* 2013; 288:8168-75
152. Juarez JM, Comboni Salinas S. Epistemología del pensamiento complejo. *Reencuentro* 2012; 65:38-51
153. Morin E. Las complejidades de la complejidad. *Utopía y Praxis Latinoamericana* 2007; 12:107-119.
154. Mayr E. En "Así es la biología". Madrid: Debate, 1998.
155. Bunge M. En "Emergencia y Convergencia" Barcelona: Gedisa, 2003.