



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis Doctoral

Estudio preclínico sobre la revitalización de aloinjertos óseos mediante el uso de un biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico. Modelo animal en rata.

Matías Vicente Gomà-Camps

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona

Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado de Cirugía y Ciencias Morfológicas

Barcelona, 2020





Estudio preclínico sobre la revitalización de aloinjertos óseos mediante el uso de un biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico. Modelo animal en rata.

Memoria presentada por
Matías Vicente Gomà-Camps

Para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Tutor:

Joan Minguell Monyart

Directores:

Màrius Aguirre Canyadell

Joan Minguell Monyart

Roberto Vélez Villa

El **Dr. Màrius Aguirre Canyadell**, Profesor del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, el **Dr. Joan Minguell Monyart**, Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología y el **Dr. Roberto Vélez Villa**, Adjunto del servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Certifican:

Que el licenciado Matías Vicente Gomà-Camps ha realizado, bajo nuestra dirección, la tesis doctoral titulada *Estudio preclínico sobre la revitalización de aloinjertos óseos mediante el uso de un biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico. Modelo animal en rata*. Presentando esta memoria para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se presenta en la Escuela de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona dicha tesis.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), marzo de 2020

“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.”

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

“Your work is going to fill a large part of your life, and the only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work. And the only way to do great work is to love what you do. If you haven't found it yet, keep looking. Don't settle. As with all matters of the heart, you'll know when you find it.”

Steve Jobs (1955-2011)

AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH), al Instituto de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), al Instituto de Bioingeniería de Catalunya (IBEC) y a la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), por su colaboración en el proyecto y su apoyo en la investigación en el mundo de la medicina.

A la *Societat Catalana de Cirurgia Ortopèdica y Traumatologia (SCCOT)*, por su ayuda con la beca para Tesis Doctorales.

Al Instituto de Recerca Vall d'Hebron por concederme la beca post-FSE, y poder centrar mis esfuerzos en la realización de la tesis doctoral.

Al Dr. Màrius Aguirre, por su cariño y su liderazgo de nuestro grupo de investigación, donde tantos años de su vida profesional ha dedicado.

Al Dr. Roberto Vélez, por ser la persona que me inició en el mundo de la investigación, por su confianza a ciegas y por ayudarme de manera permanente en este trabajo.

Al Dr. Joan Minguell, por sus consejos y ayuda en mi Tesis Doctoral. Por su cercanía, confianza y trato como mi Jefe de Servicio.

A todos mis compañeros que forman el Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular Musculoesquelética y a todos aquellos que trabajan en el estabulario del VHIR.

A mis compañeros de Cirugía Ortopédica y Traumatología, que compartimos tantos momentos durante la residencia, y ahora durante mi trabajo como especialista.

Al Dr. Alberto Blanco, Dra. Irene Gallardo y Dra. Andrea Sallent, por su ayuda en el proceso experimental, por sus consejos y amistad. Por todos los momentos compartidos durante nuestra residencia y tardes en el estabulario.

A la Dra. Alba López, por estar siempre disponible y por sus conocimientos del mundo científico.

Al Dr. Matías de Albert, por su colaboración en la evaluación de las imágenes radiológicas.

A la Dra. Cristina Manzanares, por su ayuda en la evaluación de los resultados histológicos y su infinita paciencia. A Javier García Veigas y Manel Bosch Marimon, por su colaboración en la microscopía.

A la Dra. Elisabeth Engel y Oscar Castaño del Instituto de Bioingeniería de Catalunya (IBEC), por sus conocimientos en el mundo de los biomateriales y su experiencia investigadora.

Al Dr. Lluís Carrera, por su cariño desde que empecé en este hospital, sus consejos tanto profesionales como personales, por su ayuda permanente en todo lo que he necesitado.

Al Dr. Pablo Corona, por enseñarme el amor por publicar e investigar, por transmitirme su gran pasión por el mundo de la cirugía reconstructiva osteoarticular.

Al Dr. Carles Amat, por sus consejos a diario, su profesionalidad, su cercanía y por transmitirme su experiencia.

A Anna, por su comprensión y cariño inagotable, por contagiarme su capacidad de esfuerzo y hacerme mejor a diario.

Y muy en especial a mis padres y hermana, por su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado y confiar en mi en todo momento. Sin ellos nunca hubiese llegado hasta aquí. Sobran los motivos.

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	13
INTRODUCCIÓN	17
Tejido óseo	18
Matriz orgánica	18
Matriz inorgánica	19
Componentes celulares.....	20
Formación del tejido óseo	24
Remodelación ósea	27
Factores mecánicos.....	27
Factores hormonales	27
Sistema OPG/RANK/RANKL.....	32
Regeneración ósea.....	35
Técnica de osteogénesis a distracción	37
Técnica de Masquelet o membrana inducida	39
Injertos óseos.....	40
Ingeniería tisular	46
Biomateriales	50
Modelo animal: Defecto óseo en rata	58
HIPÓTESIS DEL TRABAJO	62
Hipótesis principal	62
Hipótesis secundaria	62
OBJETIVOS.....	64
MATERIAL Y MÉTODOS.....	66
Material	66
Animal	66
Material quirúrgico	67
Suturas	68
Material complementario	68
Producto de estudio.....	71

Métodos	72
Preparación preoperatoria del animal	72
Muestra.....	72
Producto analizado	72
Grupos de estudio.....	73
Técnica anestésica y control postoperatorio	74
Preparación del aloinjerto estructural óseo	75
Cirugía	75
Eutanasia y obtención de muestras	79
Estudio estadístico	80
Evaluación clínica de variables descriptivas.....	81
Evaluación mediante microtomografía computarizada.....	81
Marcaje mediante marcadores fluorescentes	82
Microscopía de fluorescencia	83
Microscopía electrónica de barrido	85
Análisis histológico.....	87
 RESULTADOS	 91
Evaluación clínica.....	91
Grupo A: Control	91
Grupo B PLA7038: Control negativo	91
Grupo C 20G5: 44.5% CaO - 44.5% P2O5 - 6% Na2O - 5% TiO2.....	92
Grupo D 20P30: 70% CaO - 30% P2O5	92
Peso.....	92
Supervivencia	94
Evaluación clínica del aloinjerto	94
Grupo A: Control	95
Grupo B PLA7038: Control negativo	95
Grupo C 20G5: 44.5% CaO - 44.5% P2O5 - 6% Na2O - 5% TiO2.....	95
Grupo D 20P30: 70% CaO - 30% P2O5	95
Evaluación radiológica mediante microtomografía computarizada.....	98
Consolidación proximal.....	102
Consolidación distal	106
Fractura aloinjerto	106
Osteolisis periimplante	108

Evaluación mediante microscopía de fluorescencia	110
Evaluación mediante microscopía electrónica de barrido	114
Evaluación histológica	118
DISCUSIÓN	125
Limitaciones del estudio.....	143
Implicaciones en la práctica clínica.....	145
CONCLUSIONES	148
ANEXO	150
Comité de ética de experimentación animal (CEEA)	150
BIBLIOGRAFÍA	153

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El tratamiento óptimo para los tumores óseos malignos incluye la realización de una cirugía con márgenes oncológicamente seguros, siendo este el principal factor local para controlar la enfermedad. Durante décadas, la amputación fue la única opción para resear el tumor con márgenes seguros y ofrecer al paciente una menor posibilidad de recaída (1).

La mejoría en las técnicas de imagen, una quimioterapia más efectiva, una mejor comprensión de la anatomía y un refinamiento de las técnicas quirúrgicas, junto al avance en el diseño de las prótesis y de los materiales, han contribuido a aumentar la supervivencia de los paciente en la última mitad del siglo XX, y a disminuir la morbilidad del tratamiento (2).

Hoy en día, en aquellos pacientes en los que se debe realizar la resección de un tumor óseo maligno, la amputación ya no forma parte del tratamiento de primera elección, siendo la cirugía de salvamiento de la extremidad la opción más deseada, exigiendo al equipo médico técnicas reconstructivas de gran calidad. La amputación se reserva para casos donde el salvamiento de la extremidad compromete de manera significativa la vida del paciente (3,4).

El concepto de Kawaguchi de "efectos de barrera" ha ayudado a los cirujanos a comprender mejor la evaluación de los márgenes de resección (5). Si bien nuestro esfuerzo es ofrecer el rescate de extremidades a la mayoría de nuestros pacientes, ciertos factores adversos hacen que estas cirugías sean más complejas. Los abordajes erróneos para realizar la biopsia, la afectación vascular o de un nervio motor, la infección preoperatoria y la poca funcionalidad tras la resección son obstáculos que pueden alterar los resultados y la supervivencia de nuestros pacientes, pese a que las técnicas en microcirugía han cambiado el paradigma de los principios de salvamiento de la extremidad (6). Por lo tanto, la recuperación de una extremidad requiere un enfoque multidisciplinario, bien coordinado, que incluya diversas especialidades. Los objetivos

de la reconstrucción de la extremidad después de la resección oncológica incluyen proporcionar una correcta estabilidad esquelética, una cobertura adecuada y permitir la terapia adyuvante.

La técnica de resección tumoral más común para un osteosarcoma metafisario del fémur distal o la tibia proximal es la resección intraarticular de la parte distal del fémur, la parte proximal de la tibia o ambas. Sin embargo, la resección tumoral intercalar, con preservación de la epífisis, y por lo tanto, de la rodilla, es una alternativa en pacientes sin afectación tumoral intraarticular (7,8). Una de las principales indicaciones para este método es la respuesta clínica, anatomopatológica y de imagen del paciente a la quimioterapia neoadyuvante. Los aloinjertos intercalares de las extremidades inferiores pueden usarse para restaurar la continuidad ósea después de una resección tumoral o pérdida ósea. Estos aloinjertos intercalares son un método usado con frecuencia como reporta la literatura ya que nos permite restaurar el *stock* óseo sin necesidad de causar mayor morbilidad al paciente (9,10), preservando así la articulación nativa.

Los injertos autólogos, pese a ser considerados como una de las mejores opciones a la hora de aportar tejido óseo, tienen numerosas desventajas, como son la morbilidad de la zona dadora, la cantidad limitada de tejido óseo y la necesidad de sacrificar estructuras sanas (11). Dicho injerto realiza la función de espaciador biológico que pretende ser integrado al huésped mediante la osteoconducción (12).

Con los aloinjertos tenemos la ventaja de la disponibilidad del banco de tejidos y la ausencia de morbilidad de la zona dadora, ya que no requiere extraer tejido sano en el paciente, en contraposición al injerto autólogo. Sin embargo, el tiempo de integración es más prolongado y la capacidad osteoinductiva es menor a causa del procesado de los aloinjertos, donde se eliminan las células y se destruyen las proteínas para reducir la reacción inmunológica que produce sobre el huésped (12).

Es por ese motivo que las complicaciones asociadas a esta técnica reconstructiva no son desdeñables, con una tasa de fracaso a largo plazo del 25% (13), y hasta un 60% de los pacientes puede llegar a tener alguna complicación (14). Si se analizan por separado, la

infección es una de las complicaciones más frecuentes y graves, que se ve favorecida por la poca penetración de los antibióticos como consecuencia de la escasa vascularización, donde las series reportan tasas de alrededor del 10% (15). Por lo que refiere a la tasa de pseudoartrosis varía según la publicación desde el 2% en los pacientes sin quimioterapia y zonas metafisarias, hasta el 30% en aquellos casos que se asocia a tratamiento adyuvante (16,17). Por último, hay que mencionar que la prevalencia de la fractura del aloinjerto según la serie varía entre el 7% y el 30% (16,18,19).

Es por este motivo que la comunidad científica encuentra la necesidad de poder ofrecer a los pacientes una opción reconstructiva con mejores resultados, en especial a aquellos pacientes con una larga esperanza de vida. En las últimas décadas ha habido un interés creciente en los injertos vascularizados, describiendo técnicas novedosas. Fueron Capanna y cols. en la década de los 90, quienes describieron la combinación de un peroné vascularizado asociado a un aloinjerto convencional para aportar la actividad biológica de la cual carece este (20). Posteriormente se han ido describiendo nuevas opciones de reconstrucción biológica, como es el uso de un colgajo de periostio vascularizado (21–25). Nuestro propio grupo de investigación, ingeniería tisular y musculoesquelética, describió la revitalización del aloinjerto femoral asociado a un colgajo de periostio del cóndilo medial en un modelo animal en rata (26). Pero todas estas técnicas biológicas reconstructivas no están exentas de complicaciones y limitaciones, como son la morbilidad de la zona dadora y la propia restricción anatómica del individuo.

Encontrados en este punto, decidimos colaborar con el IBEC (Institut de Biotecnologia de Catalunya) en un proyecto para poder encontrar un material no biológico que promoviera la integración del aloinjerto. Conociendo la amplia experiencia del grupo de Elisabeth Engel en este campo (27–29), se decidió usar nuestro modelo en rata por su facilidad de estabulación, coste económico, experiencia del personal investigador y traslación de los resultados a especímenes superiores. Finalmente, se optó por un producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico con tal inducir la osteointegración del aloinjerto femoral en el modelo animal en rata.

INTRODUCCIÓN

El hueso es uno de los pocos tejidos del ser humano que tiene la propiedad de regenerar, es decir, que es capaz de devolver las propiedades y funciones que tenía previas a una lesión, sin dejar tejido cicatricial como secuela. Pese a esto, en el mundo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología los grandes defectos óseos siguen siendo un reto para el cirujano. Es en este punto donde los aloinjertos óseos aparecen en nuestra especialidad, jugando un papel fundamental en ciertos tratamientos reconstructivos, sobretodo en el ámbito de la cirugía tumoral osteoarticular (30).

La rápida incorporación del injerto óseo es esencial para lograr la rigidez estructural necesaria para poder soportar las cargas a las que va a estar sometido. Además, una temprana incorporación a la deambulaci3n y al ejercicio son esenciales para el proceso de recuperaci3n (31).

Aunque los aloinjertos son capaces de proporcionar un soporte estructural que sustituye al hueso reseca3do, dar longitud y volumen, restaurar la apariencia e incluso la funci3n, este ha perdido las propiedades intrínsecas de un hueso vivo, siendo la osteointegraci3n de dicho injerto intercalar mucho más dificultosa. Hoy en día, la literatura reporta tasas de complicaciones de hasta el 60% de los pacientes en alg3n momento durante los 10 primeros años (14). El desarrollo de nuevos conocimientos sobre la regeneraci3n ósea y nuevas terapias basadas en la ingeniería de los biomateriales pueden ayudar a acelerar la capacidad de integraci3n de este aloinjerto al hueso sano adyacente, creando un enfoque nuevo en el mundo de la cirugía reconstructiva, con el objetivo principal de intentar disminuir la tasa de complicaciones, dando unos mejores resultados a nuestros pacientes (32–34).

Todavía hay un universo por descubrir, y un amplio espectro de situaciones donde la estimulaci3n de los sistemas de regenerado óseo tendrán un papel clave en la resoluci3n del defecto óseo al que nos enfrentamos (35).

Tejido óseo

El tejido óseo es uno de los elementos principales del sistema musculoesquelético, siendo sus principales funciones dar soporte al individuo y protección de órganos vitales. Además, actúa como un depósito de calcio, fosfato y otros iones, almacenándolos o liberándolos para mantener una concentración constante. Este es un subtipo especializado de tejido conjuntivo formado por células y material intercelular calcificado llamado matriz ósea. El sistema musculoesquelético es significativamente más complejo de lo que uno puede llegar a pensar tras el estudio de sus componentes por separado, mientras que el hueso y el músculo esquelético son los dos tejidos más abundantes dentro de este sistema, también incluye tendones, ligamentos, cartílagos, articulaciones y otros tejidos conectivos junto con tejidos vasculares y nerviosos. Debido a que la función principal de este sistema es la movilidad del individuo, la interacción mecánica entre los diferentes componentes es esencial. La comprensión de la interacción molecular y bioquímica entre los diversos tejidos del sistema musculoesquelético sigue siendo una fuente de investigación dentro de nuestra especialidad. Comprender los mecanismos celulares y moleculares responsables de la comunicación bioquímica del hueso es importante no solo desde una perspectiva de investigación básica, sino también como un medio para identificar nuevas terapias para el tratamiento de la patología de dicho tejido (36).

Matriz orgánica

La matriz orgánica representa un tercio del peso total del hueso de un individuo adulto, aportando alrededor del 30% del hueso deshidratado. A pesar de su resistencia a las presiones y de su dureza, es un tejido plástico que es capaz de remodelar y adaptar su estructura en función de las fuerzas a las que es sometido.

La matriz ósea orgánica está formada por tejido conectivo compuesto por colágeno tipo I (90%) rodeado por una estructura de glucosaminoglucanos que contiene glucoproteínas específicas que fijan el calcio. El colágeno es sintetizado por los osteoblastos en forma de procolágeno, que una vez es secretado al espacio extracelular a través de las peptidasas se convierte en colágeno maduro. El colágeno no tiene

afinidad por el calcio por lo que son las otras proteínas no colágeno las que están implicadas en el depósito mineral. Sus valores de excreción urinaria están en relación directa con la tasa de reabsorción ósea.

Las otras proteínas no colágeno representan el 10% de las proteínas totales del hueso. Hoy en día no se conocen todas las funciones de dichas proteínas, pero se sabe que juegan un papel en la regulación, mineralización y formación ósea. Esta composición proteica puede variar en función del hueso y características del individuo. La cantidad de agua presente en los huesos es un factor importante para determinar su comportamiento mecánico. Los lípidos también son necesarios para las funciones celulares y suponen un 2 % del hueso, además juegan un papel importante en la biomineralización (37–39).

Matriz inorgánica

La matriz inorgánica representa entre un 50-70% de la composición del hueso, donde encontramos minerales como calcio, magnesio y fosfato. Este subtipo de tejido conectivo contiene sales minerales y cristales de hidroxapatita que confieren al hueso su rigidez característica y su resistencia funcional. Esta matriz contiene el 99% del calcio, 80% del fósforo y el 50% del sodio del organismo. La hidroxapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es la fórmula principal de las sales minerales del hueso y representa el 99% del calcio corporal y el 80% del fósforo. A diferencia de la encontrada en su forma natural, contiene unos cristales de tamaño mucho menor, pobremente cristalizados, que son más solubles y facilitan el metabolismo. Esta hidroxapatita es la fórmula cristalina que se deposita en la matriz orgánica para aportar la estructura al hueso. Cada cristal tiene forma de placa delgada y alargada, de 400 Å de grosor y 100 Å de ancho (Fig. 1). La relación relativa de calcio (Ca) y fósforo (P) puede variar mucho en distintas condiciones de alimentación; dicha relación Ca/P, en términos de masa, oscila entre 1.3 y 2.0 (40,41).

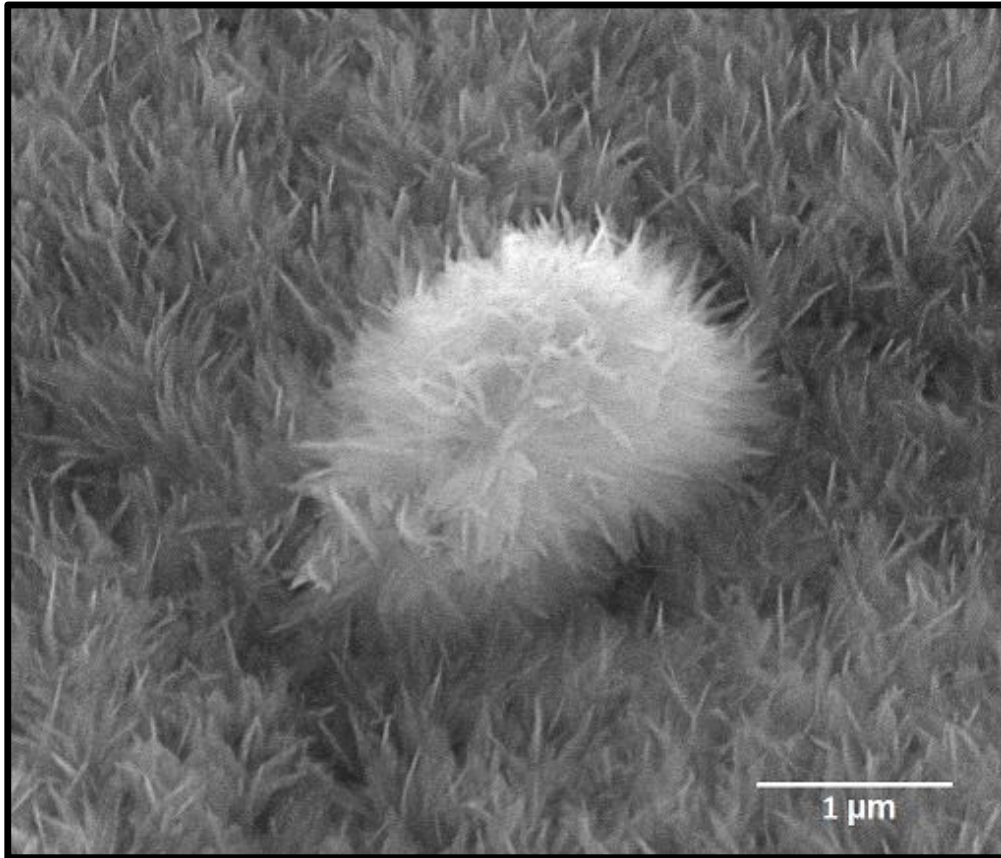


Figura 1: Cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (42).

Componentes celulares

Las células osteoprogenitoras se encuentran localizadas en la cara interna del periostio, revistiendo los conductos de Havers y en el endostio. Estas derivan del mesénquima embrionario, teniendo la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos. La célula madre mesenquimal se diferencia en función de múltiples factores del entorno que activan a los diversos genes específicos de cada linaje (43) (Fig. 2).

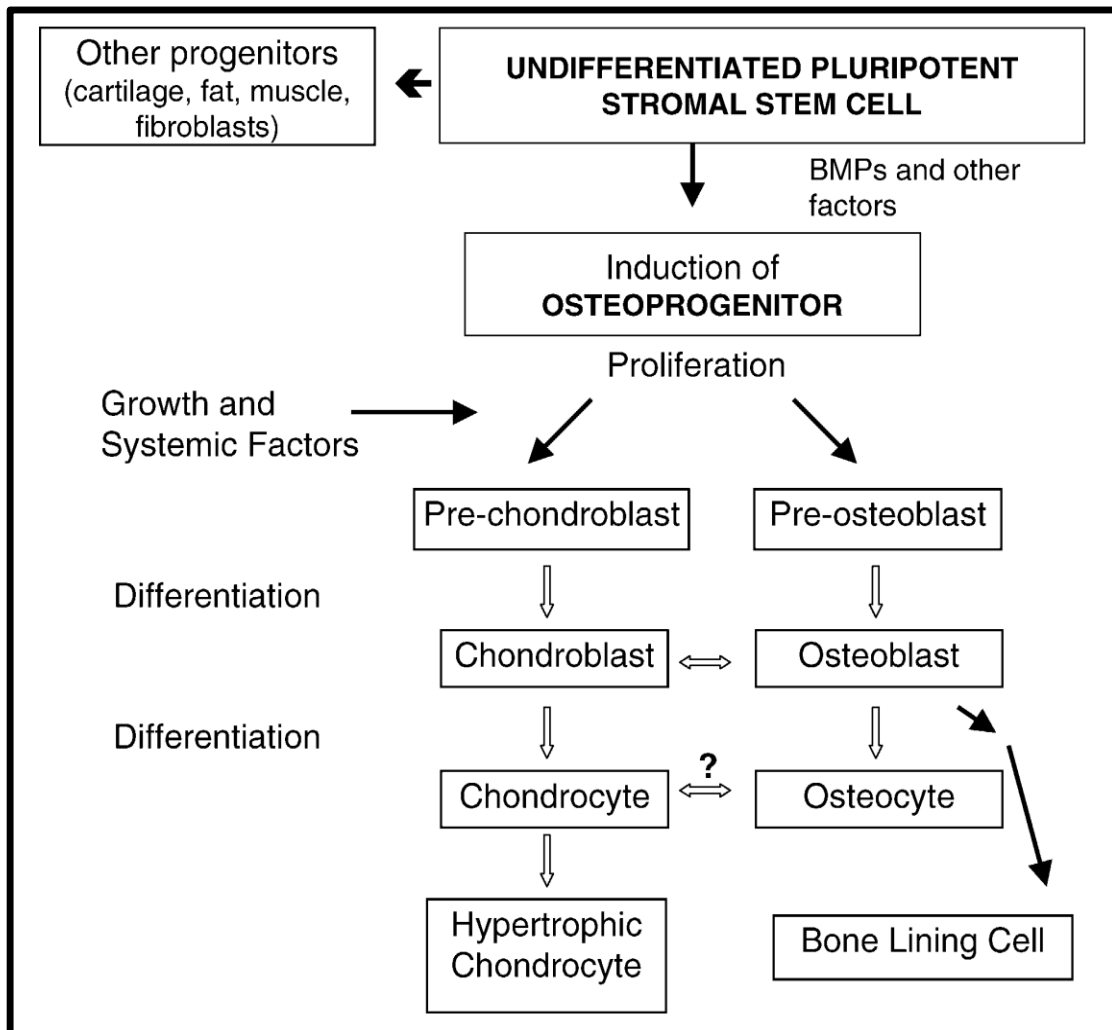


Figura 2. Línea de diferenciación de la célula osteoprogenitora. Se observa que de la misma célula pluripotencial derivan tanto los condrocitos como los osteocitos (43).

Los osteoblastos son células cuboides que provienen de los pre-osteoblastos, que constituyen un paso intermedio tras diferenciarse de la célula mesenquimal. Estos sintetizan la parte orgánica de la matriz ósea y se originan a partir de precursores mesenquimales. Dichas células secretan colágeno de tipo I y otras proteínas no colágeno que forman parte de la matriz ósea y regulan el proceso de mineralización concentrando fosfato cálcico. Se encuentran en la superficie ósea, en una disposición en fila, similar a un epitelio simple. Cuando la matriz sintetizada se deposita alrededor de su cuerpo celular y de sus prolongaciones, los osteoblastos quedan aprisionados formándose así las lagunas y los canaliculos, pasando a llamarse osteocitos (Fig. 3).

Los osteocitos se encuentran en cavidades o lagunas en el interior de la matriz, y estos están conectados entre ellos mediante los canaliculos, a través de los cuales sus prolongaciones establecen contactos mediante uniones comunicantes que permiten el flujo de iones y moléculas, y la transducción de señales (Fig. 3).

Por otro lado, nos encontramos a los osteoclastos, que son células gigantes, móviles y plurinucleadas que reabsorben el tejido óseo participando en los procesos de remodelación de los huesos. Las depresiones de matriz excavadas por los osteoclastos por acción enzimática se denominan Lagunas de Howship. Los osteoclastos tienen un origen hematopoyético y se originan a partir de precursores mononucleares de la médula ósea que, una vez unidos al tejido óseo, pasan a formar los osteoclastos plurinucleados (44,45) (Fig. 3).

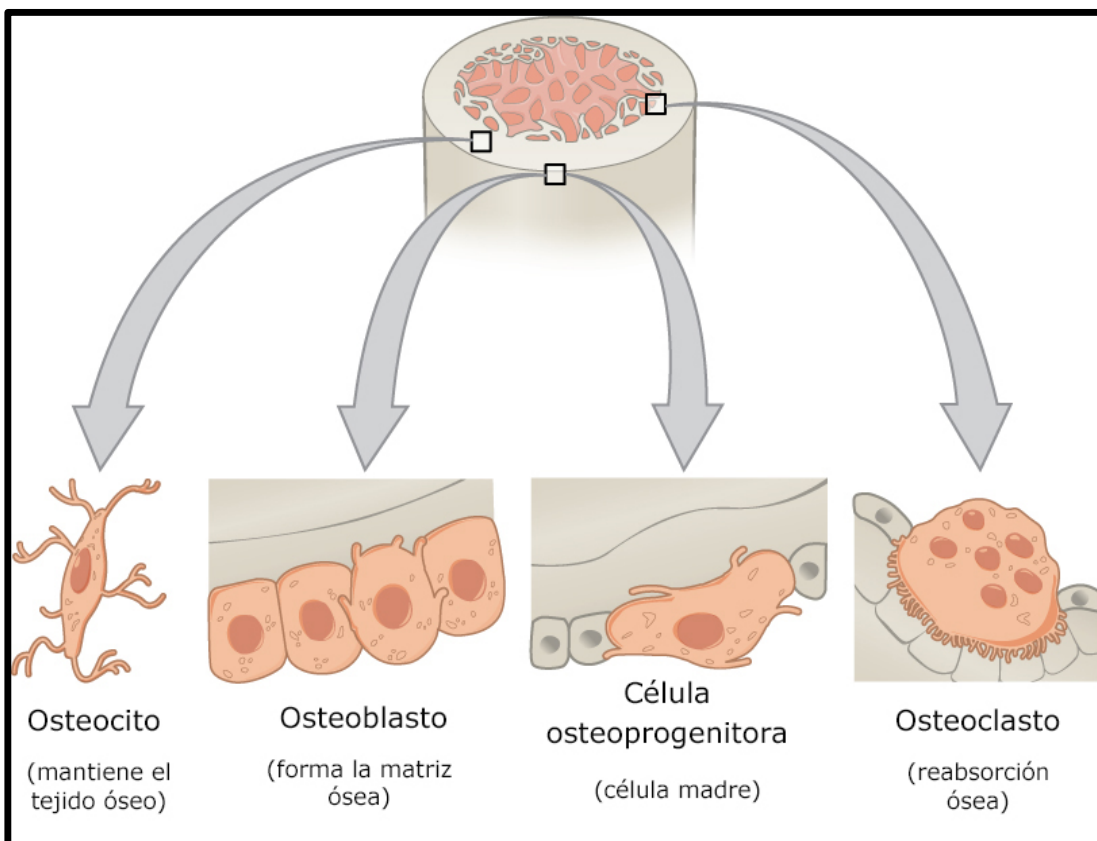


Figura 3. Células principales que se encuentran en el tejido óseo, su morfología y acción más relevante (46).

Los huesos están revestidos por membranas tanto en su superficie externa como en la interna, conociéndose con el nombre de periostio y endostio respectivamente. El periostio contiene principalmente fibras de colágeno, fibroblastos y células osteoprogenitoras. El endostio está formado por una capa de células osteogénicas aplanadas, que recubren la cavidad de los huesos esponjosos, el conducto medular y los conductos de Havers y Volkmann. Estas células progenitoras pueden diferenciarse hacia un fenotipo osteoblástico en respuesta a estímulos mecánicos que den lugar a señales osteoinductivas, formando parte de la red celular que regula la remodelación ósea (47) (Fig. 4).

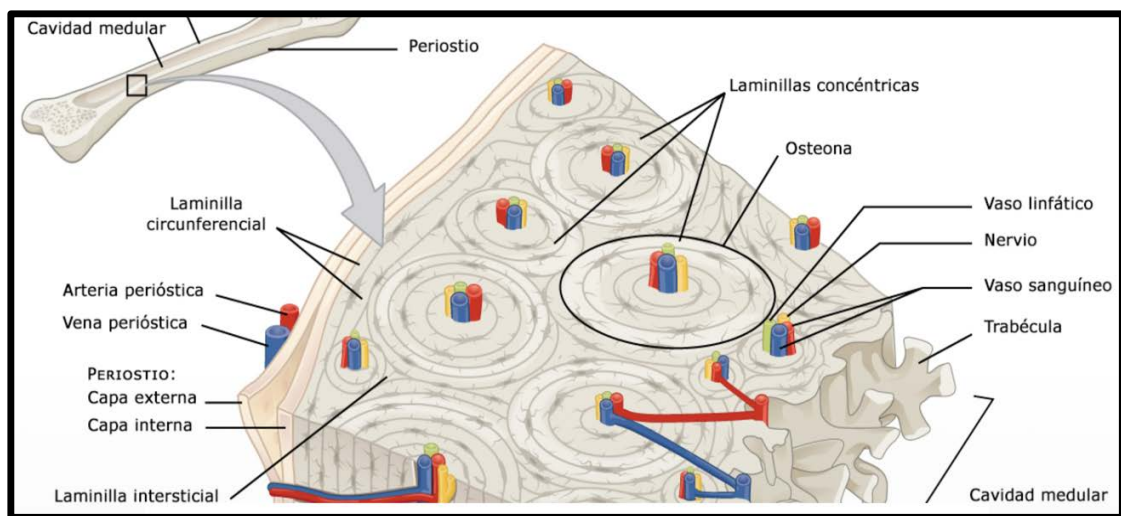


Figura 4. Organización de la estructura ósea. Se puede observar la osteona con su sistema circulatorio en el interior. Por la parte externa el hueso está recubierto de la capa llamada periostio (37).

Formación del tejido óseo

Se diferencian dos tipos de tejido óseo dependiendo de la organización de las fibras de que lo componen. El hueso reticular se produce en primer lugar por los osteoblastos, como por ejemplo en el proceso de osteoformación tras una fractura, y se caracteriza por contener colágeno desorganizado, aportando poca estabilidad mecánica. A medida que las fibras de colágeno se organizan de manera paralela, encontramos el hueso laminar, que aporta las características mecánicas necesarias para la función principal del tejido óseo.

La formación ósea tiene lugar por dos tipos de procesos diferentes, la osificación intramembranosa y la osificación endocondral. La formación ósea de tipo intramembranosa comienza en el periodo fetal sobre un tejido conjuntivo fetal condensado rico en células, y continúa a lo largo de la vida en el desarrollo de los huesos planos del cráneo, gran parte de los huesos de la cara y maxilar, partes de la mandíbula y la clavícula. Se desarrolla en una membrana de mesénquima muy vascularizada en donde las células mesenquimales se diferencian a osteoblastos (a través de las células osteoprogenitoras), que comienzan a sintetizar matriz ósea. El tejido condroide es remodelado por la acción sucesiva de los osteoclastos y los osteoblastos que formarán el tejido óseo definitivo. La región de la membrana mesenquimal que no participa en el proceso de osificación permanecerá como el componente de tejido blando del hueso (periostio y endostio) (37,47).

Sin embargo, la mayoría de los huesos presentan una formación ósea de tipo endocondral. Este tipo de osificación es más compleja y se realiza sobre un molde de cartílago hialino, el cual va siendo paulatinamente eliminado y sustituido por tejido óseo. En un primer momento aparece una cubierta de tejido óseo alrededor del modelo cartilaginoso y las células del pericondrio en la región media del modelo cartilaginoso dejan de producir condrocitos. En su lugar, se originan células formadoras de tejido óseo (osteoblastos) alrededor del modelo cartilaginoso en la porción de la diáfisis del hueso en desarrollo y se forma una cubierta distintiva de tejido óseo subperióstico, llamado collar óseo. Con el establecimiento del collar óseo subperióstico, los condrocitos en la

región media del modelo cartilaginoso se hipertrofian. A medida que los condrocitos aumentan de tamaño, la matriz cartilaginosa circundante se reabsorbe. Estas células comienzan a sintetizar fosfatasa alcalina; al mismo tiempo, la matriz cartilaginosa circundante se calcifica. Se va produciendo de manera paulatina la muerte de los condrocitos y gran parte de la matriz se degrada, formando así lagunas que van confluyendo para formar una cavidad cada vez más grande. Las células mesenquimales migran hacia la cavidad junto con los vasos sanguíneos proliferantes, y estas se diferencian en células osteoprogenitoras (Fig. 5).

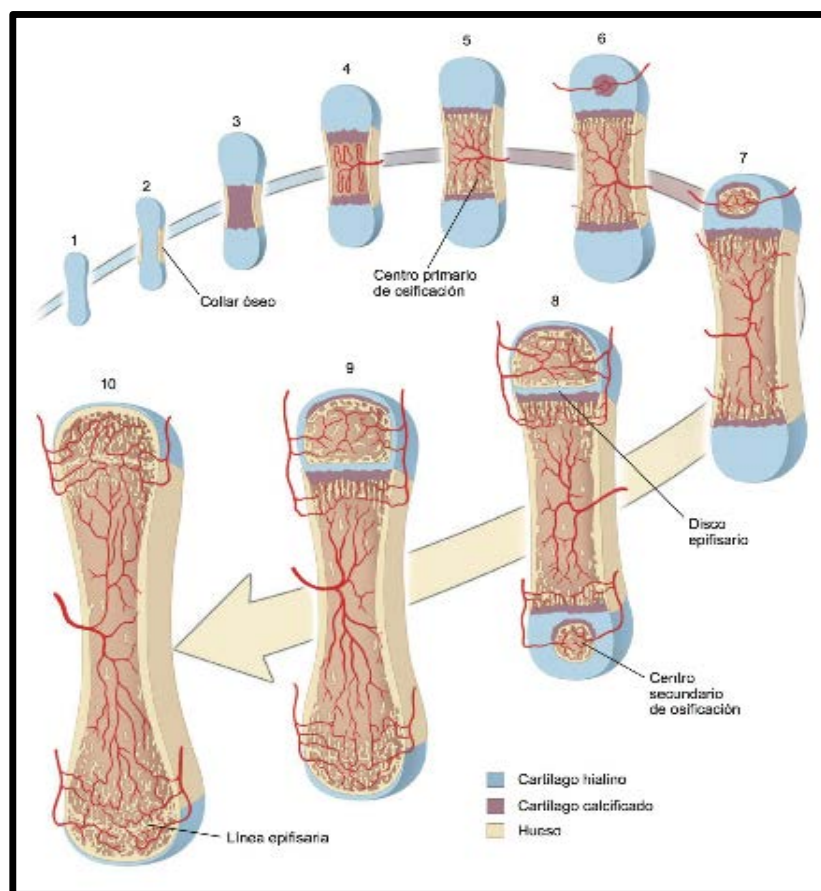


Figura 5. Modelo de formación ósea encondral, característica de los huesos largos del cuerpo, a través de un molde de cartílago se produce el proceso de sustitución por tejido óseo (49).

Al mismo tiempo, las células madre hematopoyéticas también llegan a la cavidad a través del nuevo sistema vascular y abandonan la circulación para dar origen a la médula ósea que incluye todos los linajes de células sanguíneas. A medida que el cartílago

calcificado se degrada y se elimina parcialmente, quedan restos con el aspecto de espículas irregulares. Cuando las células osteoprogenitoras se adhieren en forma aposicional a las espículas residuales de cartílago calcificado, se convierten en osteoblastos y comienzan a sintetizar tejido óseo (osteóide) que se deposita sobre el armazón (37,48).

Remodelación ósea

El tejido óseo está sometido a cambios durante toda la vida del individuo, el hueso está expuesto a procesos de remodelado que cambian dicho tejido como consecuencia de influencias mecánicas, hormonales, nutricionales o patológicas entre otras. La remodelación ósea involucra dos procesos que se dan de manera simultánea, la reabsorción de hueso por parte de los osteoclastos y la formación de hueso nuevo por parte de los osteoblastos (50).

Factores mecánicos

El mecanismo por el cual el hueso detecta y traduce los estímulos físicos, y cómo estas señales se traducen en señales biológicas y de expresión génica, no se conoce en su totalidad, aunque recientemente se ha avanzado en la investigación de dicho campo. El hueso es sensible a las señales mecánicas, por lo tanto, la masa esquelética y la morfología de los huesos se determinan en gran parte por su capacidad de adaptarse a los desafíos funcionales a los que se enfrenta. Hoy en día se conoce que las células que forman el tejido óseo poseen mecanorreceptores que detectan el entorno mecánico, dando una respuesta biológica a las necesidades que son sometidas. Se conoce que, a través de mecanismos de apoptosis de los osteocitos inducidos por las fuerzas mecánicas, seguido de un proceso de reabsorción ósea, comporta una remodelación ósea acorde con los requerimientos físicos. También se ha demostrado que la carga mecánica estimula la transformación de las células del endostio en osteoblastos además de estimular factores de transcripción (51–54).

Factores hormonales

Calcitonina: La calcitonina es una hormona peptídica secretada por las células parafoliculares de la glándula tiroides, la cual interviene en la regulación de la concentración de calcio en sangre. A nivel local reduce la actividad osteoclástica y aumenta la excreción de calcio en orina con el fin de disminuir su concentración (55).

Paratohormona: Hoy en día quedan por resolver diversos aspectos del funcionamiento de la paratohormona (PTH), pero su principal rol es el de aumentar los valores plasmáticos de calcio. Este efecto lo realiza activando a los osteoblastos, los cuales liberan un factor RANKL que produce un aumento de la diferenciación osteoclástica. A nivel renal estimula la reabsorción de calcio en el túbulo distal e inhibe la de fósforo en el túbulo proximal. A parte, esta hormona juega un papel importante en el estímulo de la síntesis de calcitriol, derivado de la vitamina D con una acción biológica más potente (56,57).

Calcitriol: Es la forma más activa de la vitamina D₃ en la estimulación del transporte del Ca intestinal. En hueso, junto con la hormona paratiroidea, estimula la resorción del calcio, y en riñón incrementa la reabsorción tubular (Fig. 6) (58).

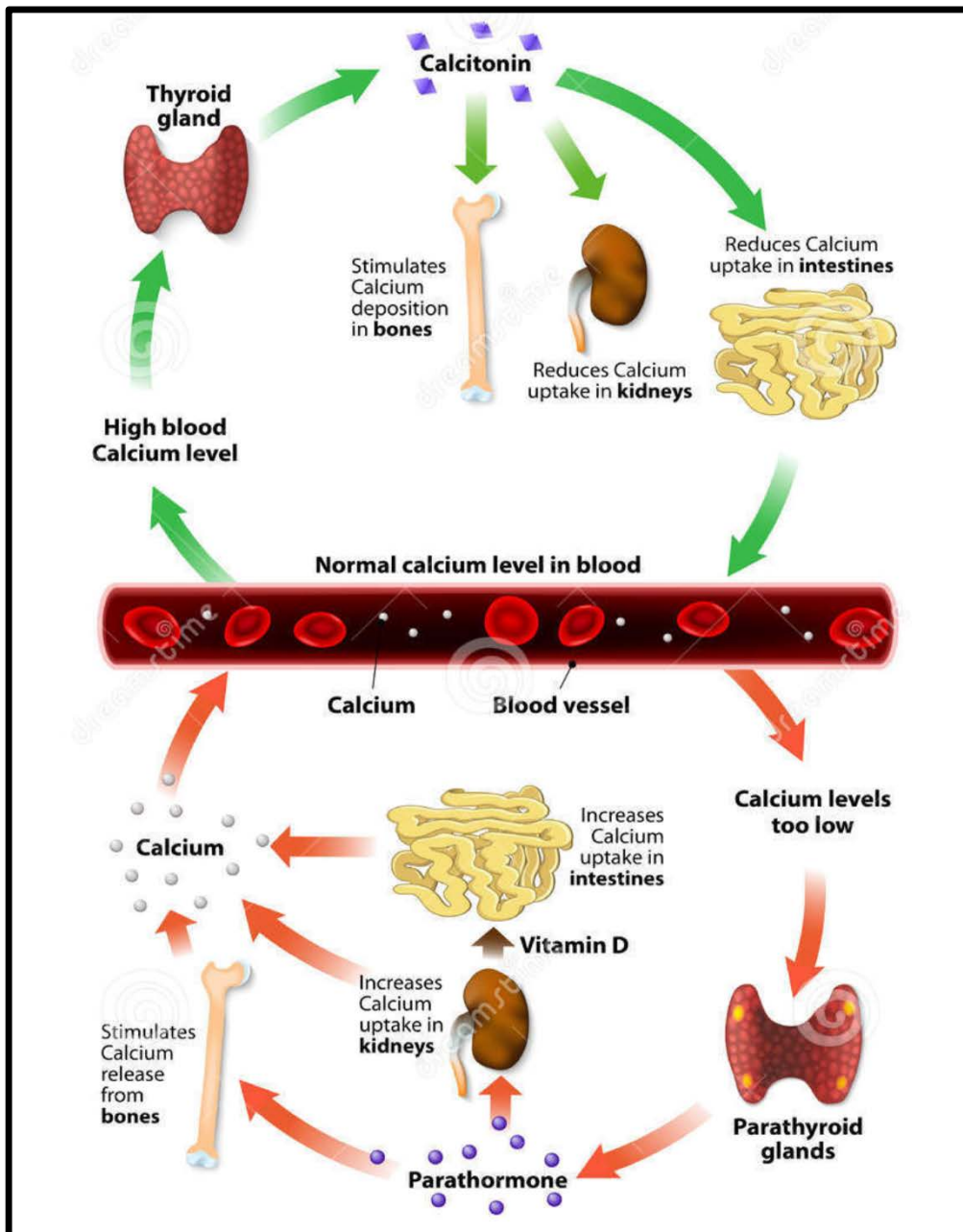


Figura 6. Metabolismo de la calcitonina, PTH y calcitriol, y sus interacciones con los órganos diana (59).

Estrógenos: Es bien conocido el efecto que produce la caída de los niveles de estrógenos en la menopausia, este déficit incrementa la apoptosis de los osteocitos y osteoblastos, alterando la reparación de microfracturas. Sus efectos sobre las células óseas están mediados por dos clases de receptores estrogénicos expresados en citoplasma y núcleo: el receptor alfa, presente en osteoblastos y osteoclastos, y el receptor beta, expresado solo por los osteoblastos. El papel de los estrógenos es la inhibición del desarrollo de los

osteoclastos, favoreciendo su apoptosis por estímulo de la producción del factor de crecimiento tumoral beta (*TGF-beta*) por los osteoblastos, además de inhibir la producción de IL-6, el principal estímulo para la resorción (60–62).

Los estrógenos tienen un efecto antirresortivo más potente que los andrógenos, tanto en hombres como en mujeres, y esto es debido a los diferentes efectos ejercidos sobre la producción de osteoprotegerina (OPG). Tanto *in vivo* como *in vitro*, los estrógenos estimulan la producción de OPG y suprimen la de RANKL, mientras que la testosterona inhibe ambas moléculas (63).

Andrógenos: El efecto de los andrógenos (la testosterona, la androsterona y la androstenediona) consiste en estimular la proliferación osteoblástica, teniendo poco efecto sobre la inhibición de la resorción ósea. Estimulan la producción de factor de crecimiento transformador beta (*TGF-beta*) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*IGF-1*), además de inhibir la interleucina 6 (IL-6) (64).

Factor de crecimiento insulínico tipo 1: El *IGF-1* es una hormona con una estructura similar a la insulina, se asemejan en un 50%, la cual es liberada por diversos tejidos. El hígado es el principal productor de dicha hormona (hasta el 90%) y esta es estimulada por la hormona del crecimiento (GH). El *IGF-1* tiene un efecto anabolizante o de factor de crecimiento y juega un papel fundamental en el desarrollo fetal y puberal, actuando en múltiples células. A nivel óseo estimula la replicación de precursores osteoblásticos, su activación y la síntesis de la matriz y el colágeno, y ha demostrado inhibir su apoptosis *in vitro* (65,66).

Interleucinas: Es conocido el efecto de diversas interleucinas a nivel de la remodelación ósea. La IL-1 es un factor activador de los osteoclastos maduros y la IL-3 estimula la diferenciación de los precursores de los osteoclastos. Por otro lado, las interleucinas 4, 10, 12 y 13 inhiben la formación y maduración osteoclástica. Es quizá la IL-6 la que juega un papel más determinante, estimulando a los precursores hematopoyéticos a diferenciarse en la línea osteoclástica. La IL-11 estimula la producción del RANKL por parte de los osteoblastos (67–70).

Factor de crecimiento transformador beta: El *TGF-Beta* es una citosina multifuncional implicada en procesos celulares como hematopoyesis, proliferación, angiogénesis, diferenciación, migración y apoptosis celular. Este es sintetizado por diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas. El *TGF-Beta* es una de las principales moléculas que intervienen en el proceso de remodelado, ya que inhibe la apoptosis osteoblástica e induce la apoptosis de los osteoclastos, además estimula la síntesis de OPG, por lo que se considera una señal crucial entre las células que mantienen el remodelado óseo (71–73).

Proteína morfogenética ósea: La familia de las *bone morphogenetic protein (BMP)* juega un papel importante en multitud de procesos durante el desarrollo embrionario y la homeostasis del adulto al regular la diferenciación del linaje celular, la morfogénesis, la proliferación y la apoptosis de varios tipos de células en todo el cuerpo. Son péptidos de la familia del *TGF-Beta* cuya acción sobre receptores específicos estimula la diferenciación osteoblástica e induce la formación ósea durante el desarrollo esquelético. En el tejido adulto su función es mantener un aporte continuo de osteoblastos, y también se ha demostrado que pueden estimular la resorción ósea. También induce la diferenciación de células del tejido conectivo a células osteoprogenitoras (74).

Leptina: La leptina es una hormona que se libera por parte del tejido adiposo, aunque no de manera exclusiva, y que juega un papel fundamental en la regulación del apetito, como efecto saciante a nivel del sistema nervioso central (Fig. 7). Últimamente se ha demostrado su efecto sobre el hueso, donde encontramos receptores para esta hormona en las células mesenquimales preosteoblásticas y osteoblastos maduros. Su efecto es anabólico ya que promueve la diferenciación osteoblástica, aumenta la síntesis de proteínas de la matriz y reduce su apoptosis. Disminuye también la función osteoclástica por aumento de OPG y descenso de RANKL (75,76).

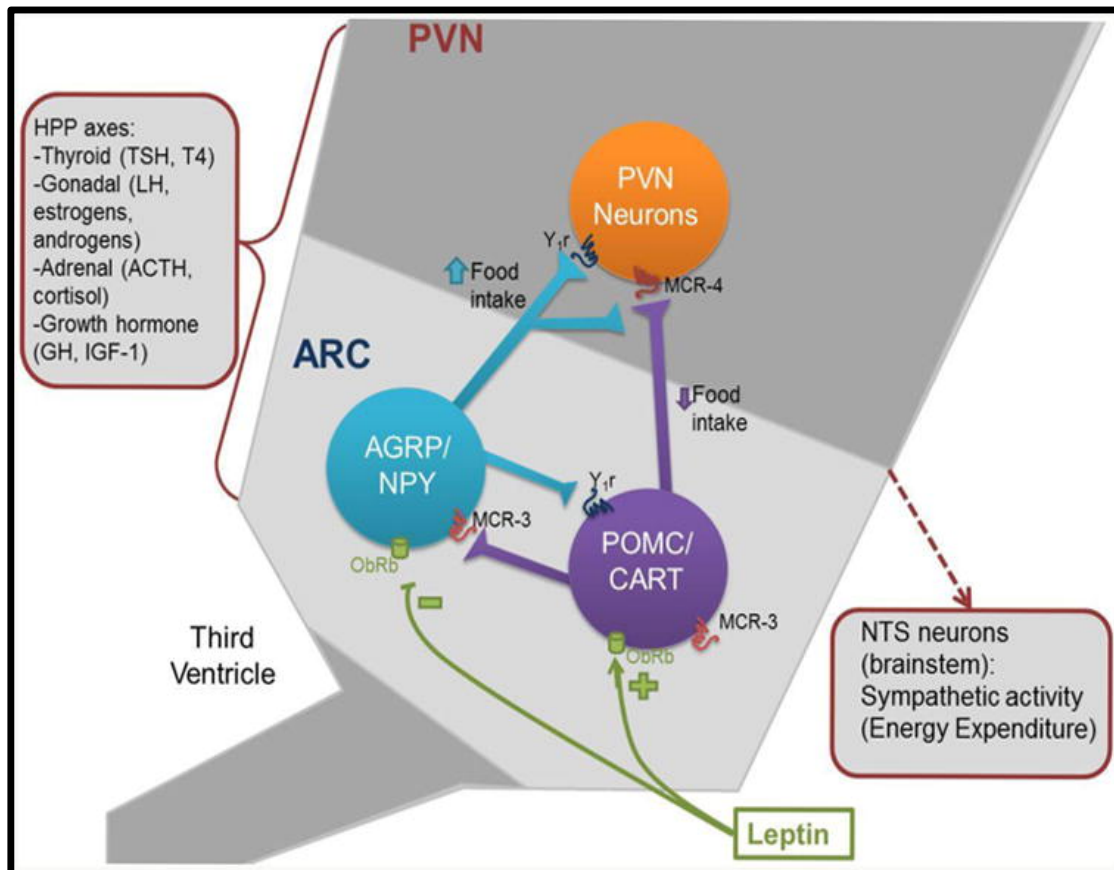


Figura 7. Acciones de la leptina para regular la ingesta de alimentos y el gasto energético. La leptina inhibe AGRP / NPY, proteínas que estimulan el apetito, y activa las neuronas POMC / CART en el núcleo arqueado del hipotálamo. Estas neuronas a su vez actúan sobre las neuronas paraventriculares para aumentar o disminuir la ingesta de alimentos, así como para modular la actividad simpática y el gasto de energía a través del núcleo del tracto solitario. La señalización de leptina en el hipotálamo también activa otros ejes hipotalámicos-hipofisarios-periféricos, que también tienen consecuencias en el metabolismo óseo (76).

Sistema OPG/RANK/RANKL

La función del sistema OPG/RANK/RANKL es la interacción entre diferentes miembros de la unidad básica multicelular, que consiste en el conjunto de osteoclastos y osteoblastos que interactúan sobre la misma superficie ósea. Este induce la diferenciación y activación celular, y regula el equilibrio del ciclo del remodelado óseo (77). El receptor activador de factor nuclear κ B (RANK) es una proteína transmembrana que forma parte de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y

se expresa en la membrana de los osteoclastos; pero también está presente en la superficie de linfocitos B y T, fibroblastos y células dendríticas. El ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) es una proteína transmembrana expresada por osteoblastos y células mesenquimales y al igual que el receptor, pertenece a la superfamilia del TNF. La osteoprotegerina, conocida como factor inhibidor de la diferenciación de osteoclastos, es una proteína secretada por los osteoblastos y células estromales de la médula ósea. La unión del RANKL a su receptor (RANK) promueve la activación de la vía de señalización intracelular NF- κ B y, como resultado, genera la diferenciación de los preosteoclastos en osteoclastos maduros, facilitando la resorción de hueso.

El RANKL es el factor crítico para la diferenciación osteoclástica, y en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) se une a RANK y promueve la diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos, así como su adherencia a la superficie ósea. La OPG presenta una alta actividad protectora de tejido óseo debido a su función de “bloquear” el RANKL, evitando la unión RANK/RANKL e inhibiendo la diferenciación de preosteoclastos a osteoclastos maduros. La OPG se une al ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B neutralizando su acción, y de esta manera inhibe la osteoclastogénesis. En resumen, los preosteoblastos y osteoblastos maduros expresan RANKL, que se une a RANK expresado en la superficie de los precursores de osteoclastos, y favorece la diferenciación de precursores hacia la formación de osteoclastos maduros. Por contrapartida, la OPG se une a RANKL, al que neutraliza, y como resultado inhibe la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica, a la vez que induce la apoptosis de los osteoclastos (Fig. 8) (77–79).

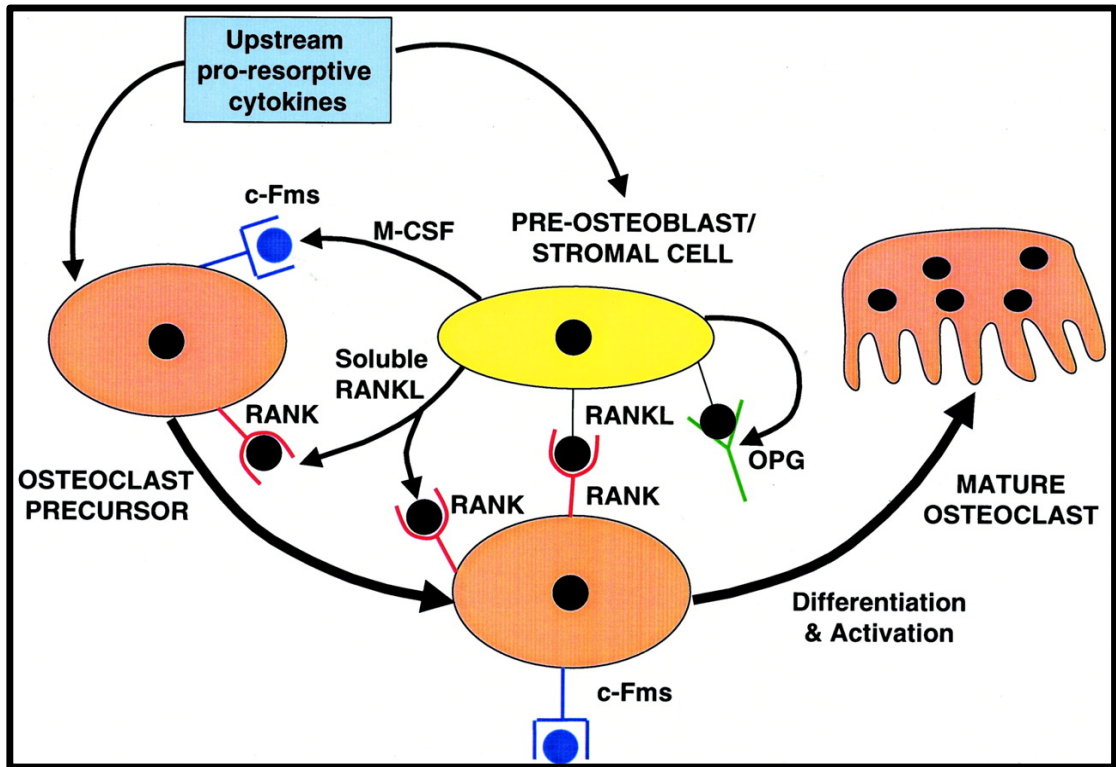


Figura 8. Esquema gráfico del funcionamiento del sistema OPG/RANK/RANKL (79).

Regeneración ósea

A nivel óseo cuando se produce un daño tisular la capacidad de regeneración es limitada pese a que es un tejido con capacidad de regenerar, es decir, es capaz de volver a su estado natural sin dejar un tejido cicatricial. Es por ello que se deben diferenciar dos términos, por un lado, encontramos la regeneración, que devuelve al tejido sus propiedades iniciales. Y, por otro lado, la reparación donde el tejido no conserva su arquitectura original ni su función, por lo que sus propiedades físicas y mecánicas son inferiores a las del tejido original, lo que se conoce como cicatrización.

En el mundo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología es frecuente encontrar situaciones donde el paciente presenta una pérdida del *stock* óseo, ya sea debido a un traumatismo, tumor o proceso infeccioso, donde el cirujano, con el fin de devolver la funcionalidad y el soporte estructural recurre a múltiples técnicas para regenerar o sustituir el tejido óseo carente (80,81).

Como hemos comentado, el hueso posee la capacidad intrínseca de regenerarse mediante diversos mecanismos que se pueden observar durante el proceso de curación de una fractura, así como durante el desarrollo esquelético o la remodelación a lo largo de la vida adulta. La regeneración ósea se compone de una serie de eventos biológicos, que involucran varios tipos de células y vías de señalización molecular intracelular y extracelular, con una secuencia temporal y espacial, en un esfuerzo por recuperar la función esquelética (82).

A diferencia de otros tejidos, la mayoría de las lesiones óseas (fracturas) se curan sin la formación de tejido cicatricial, y el hueso se regenera con sus propiedades preexistentes, siendo indistinguible del hueso adyacente no lesionado. Cuando esto no es posible, se intenta solventar el defecto existente mediante un sustitutivo óseo, ya sea biológico o no.

El sustituto óseo ideal debería cumplir estas características:

Osteointegración: es la capacidad de unirse al hueso sin formar una capa intermedia de tejido fibroso, es decir, de consolidar.

Osteoconducción: es la capacidad de proporcionar la estructura o matriz física apropiada para favorecer el crecimiento del tejido óseo, actuando a modo de guía para las células.

Osteoinducción: es la capacidad de inducir la diferenciación de células pluripotenciales hacia osteoblastos, mediante factores estimulantes locales que facilitan la diferenciación celular.

Osteogénesis: es la capacidad que poseen las células osteogénicas vivas de establecer centros de osificación.

La mayoría de las estrategias actuales para la regeneración ósea tienen unos resultados relativamente satisfactorios. Sin embargo, existen inconvenientes y limitaciones asociados a su uso y disponibilidad. Además, en la actualidad no hay sustitutos óseos sintéticos disponibles que tengan propiedades biológicas o mecánicas superiores o similares al hueso.

Durante las dos últimas décadas se han realizado avances en biología celular y molecular que han permitido analizar de manera detallada diversos aspectos histológicos, identificar perfiles transcripcionales de los genes y proteínas involucradas en el proceso de regeneración ósea y reparación de fracturas, y el desarrollo de animales transgénicos para explorar el papel de una serie de genes expresados durante la reparación ósea, y sus patrones de expresión (83). Sin embargo, el concepto básico para manejar todas las situaciones clínicas que requieren un proceso de regenerado óseo, particularmente los casos complejos, sigue siendo el mismo. Las estrategias de tratamiento deben abordar conceptos clásicos que no deben ser olvidados como la osteoconducción, los factores osteoinductores, las células osteogénicas y la estabilidad mecánica (84).

Con el fin de esclarecer como está el tema de la regeneración ósea hoy en día, y cuales son los métodos que más comúnmente se utilizan, dividiremos en grupos según las diferentes técnicas de reconstrucción.

Técnica de osteogénesis a distracción

La osteogénesis a distracción es un término utilizado para describir la producción de hueso entre las dos superficies de una corticotomía, experimentando una distracción gradual, es decir, hace referencia a aquella técnica de regeneración ósea que se basa en una distracción progresiva del callo óseo de fractura. Dentro del amplio grupo de la osteogénesis a distracción, el transporte óseo es una de las técnicas más utilizadas. Esta se lleva a cabo a través de la movilización de un fragmento óseo a lo largo del defecto remanente, creando hueso regenerado en la zona de la corticotomía previa. Normalmente se realiza mediante un fijador externo, ya sea monolateral o circular, pese a que en los últimos años está en boga el uso de un clavo endomedular guiado (Fig. 9).

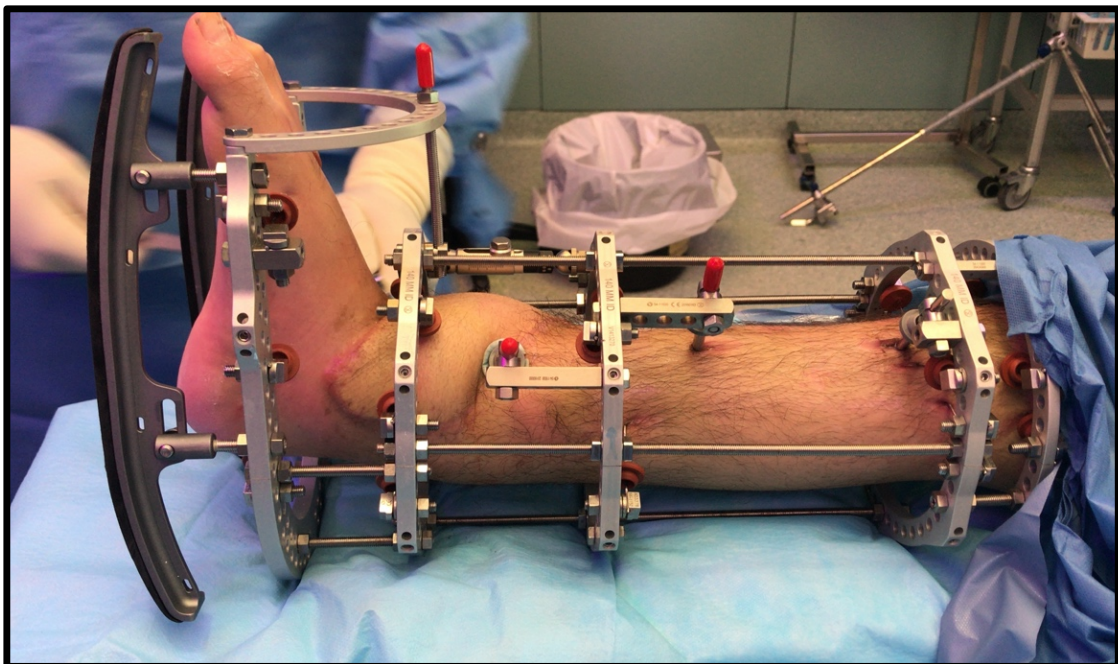


Figura 9. Técnica de osteogénesis a distracción mediante transporte óseo guiado por un fijador externo circular (Imagen cedida por el Dr. Corona, Hospital Universitario Vall d'Hebron).

En términos generales, la técnica consiste en un periodo de latencia de la corticotomía que va desde los 7-15 días aproximadamente, donde se organiza un callo de fractura (Fig. 10). Posteriormente se inicia la distracción de dicho callo a una velocidad de 1mm al día, dependiendo del paciente puede variar en función de su capacidad biológica. Y, por último, una fase de consolidación de lo que se conoce como punto de atraque y del regenerado óseo. La zona de crecimiento central se va osificando gradualmente, células similares a los fibroblastos se vuelven metabólicamente activas y secretan colágeno. El colágeno forma fibras que se alinean paralelamente a la fuerza de distracción. La actividad de osteoblastos da como resultado la formación de hueso osteoide. Los tiempos de curación varían en función de muchos factores, como son la edad y biología del propio paciente, comorbilidades y defecto óseo a regenerar (85–89).

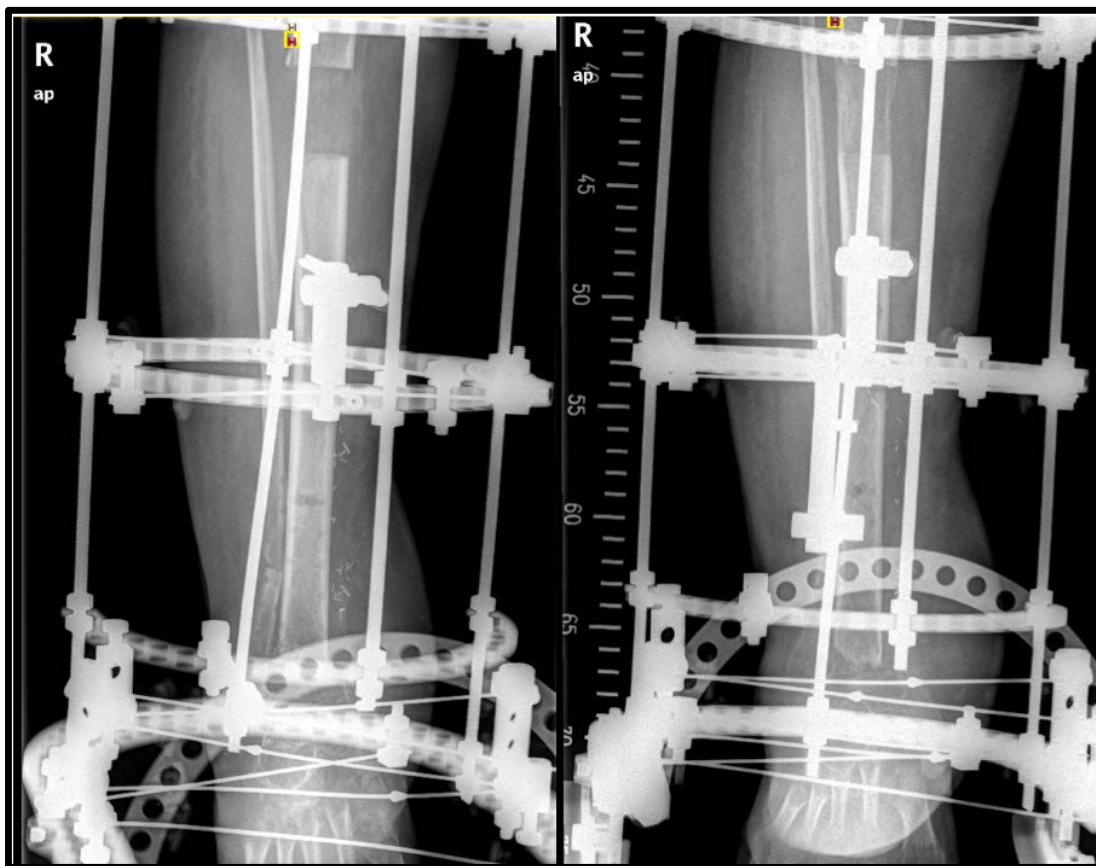


Figura 10. Transporte óseo tibial en un defecto masivo tras resección de una osteomielitis de tibia distal, donde se aprecia el regenerado que se va formando, llegando a producir un hueso con las mismas características que el nativo del paciente. (Imagen cedida por el Dr. Corona, Hospital Universitario Vall d’Hebron).

Técnica de Masquelet o membrana inducida

Esta técnica es una combinación de dos procesos quirúrgicos separados en el tiempo, donde en una primera fase se procede a la formación de una pseudomembrana a través de la inserción de un espaciador de cemento de polimetilmetacrilato para ocupar el espacio del defecto óseo remanente, dar estabilidad mecánica y evitar la invasión del espacio por tejido fibroso (Fig. 11).

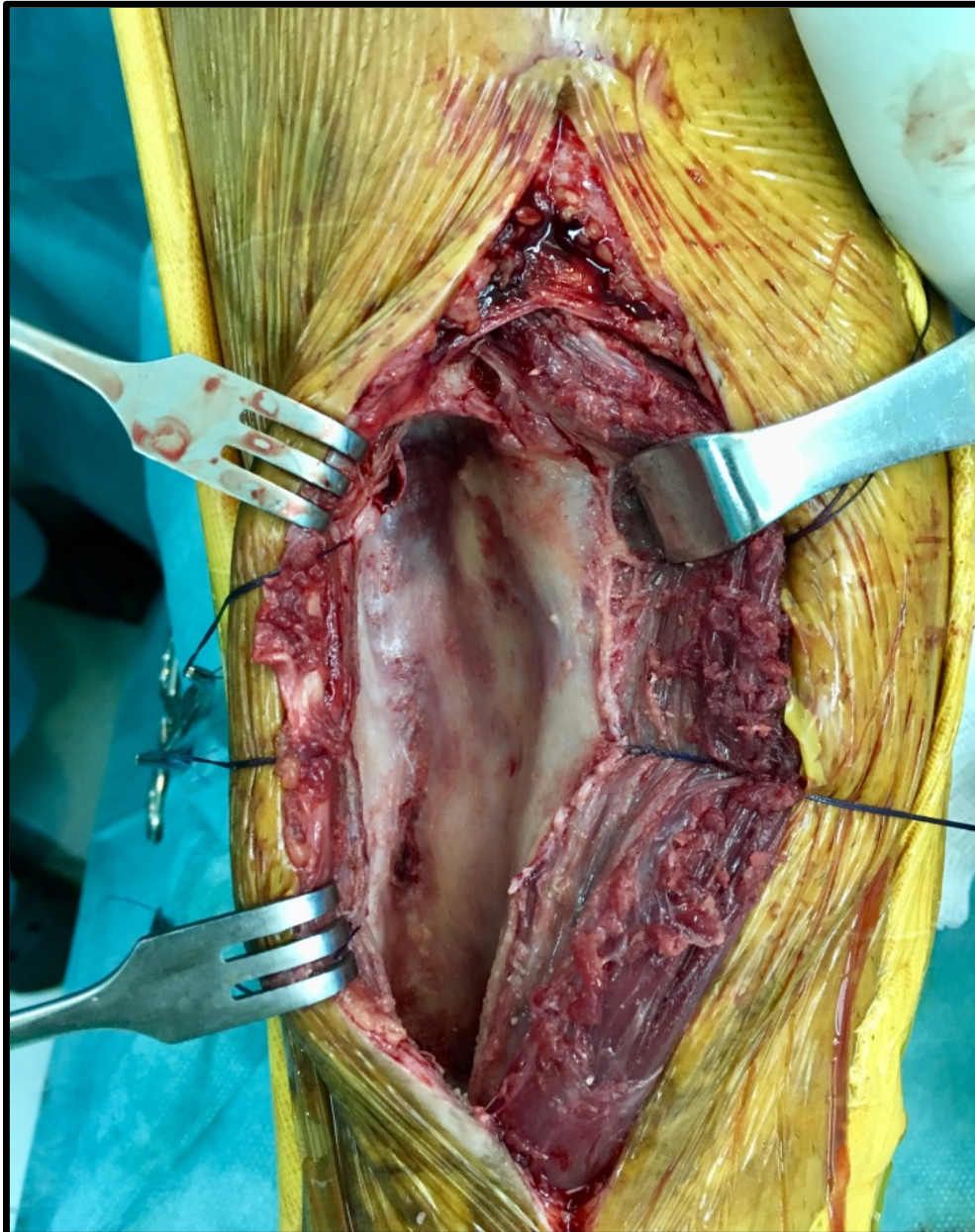


Figura 11. Membrana inducida formada a través de la técnica de Masquelet mediante un espaciador de cemento de polimetilmetacrilato (95).

Tras unas semanas, en las que se espera a que la biología forme dicha pseudomembrana, se lleva a cabo la segunda fase, donde se retira el espaciador con el objetivo de preservar la membrana formada y rellenar el defecto con autoinjerto esponjoso (90). El principio biológico en el que se sustenta esta técnica es la vascularización de la membrana formada que favorece la corticalización del injerto a la vez que lo protege de la reabsorción. La pseudomembrana también aporta grandes concentraciones de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y de *TGF-Beta* (91). Las ventajas con las que cuenta esta técnica quirúrgica son un menor tiempo de intervención, no ser una técnica particularmente demandante y que el periodo de curación es independiente al defecto óseo. Como desventaja, está limitada por el volumen de autoinjerto que se pueda extraer, pese a que técnicas como el sistema *RIA* (sistema de fresado-irrigación-aspiración) han aportado cantidades superiores a la técnica clásica de cresta ilíaca (92–94).

Injertos óseos

Autoinjerto: Considerado como el *gold standard*, combina todas las propiedades que un injerto óseo pueda tener: osteointegración (es capaz de integrarse en el propio hueso), osteoinducción (posee proteínas morfogenéticas óseas y otros factores de crecimiento), osteogénesis (células osteoprogenitoras) y osteoconducción (guía estructural).

Dentro del grupo de los autoinjertos o injertos autólogos encontramos una gran variedad de tipos o procedimientos por los cuales se pueden obtener, siendo las crestas ilíacas de la pelvis el sitio donante más utilizado, pero cabe recordar que se puede obtener autoinjerto de múltiples huesos. Recientemente, con la introducción al mercado del sistema *RIA* (fresado-irrigación-aspiración), se obtiene del canal endomedular un gran volumen de injerto óseo autólogo (Fig. 12).

Otro grupo de autoinjertos que se pueden englobar dentro de este apartado serían las técnicas microquirúrgicas, donde cirujanos expertos en este campo son capaces de injertar segmentos óseos vascularizados con el fin de cubrir el defecto óseo remanente, como es el caso del peroné vascularizado (Fig. 13), cresta ilíaca, costilla o escápula. Su principal indicación es la reconstrucción de defectos intercalares en la extremidad

superior o bien en la inferior en niños. Otra opción que aportan este tipo de autoinjertos son los colgajos quiméricos, que aportan piel o músculo a parte del asociado óseo, con lo cual se pueden cubrir defectos de partes blandas que se asocian en defectos óseos. El principal inconveniente de estas técnicas es la morbilidad que se le causa al paciente, ya que se le realiza una cirugía en la zona donante con sus posibles complicaciones y secuelas asociadas (96–100).

El autoinjerto, al ser el propio tejido del paciente, es histocompatible y no inmunogénico, lo que reduce al mínimo la probabilidad de inmunoreacciones y la transmisión de infecciones. Sin embargo, requiere un procedimiento quirúrgico adicional, con sus posibles complicaciones y molestias para el paciente, y tiene como desventajas que el volumen que podemos extraer es limitado, así como unos costos sustanciales (22,92,101–103).

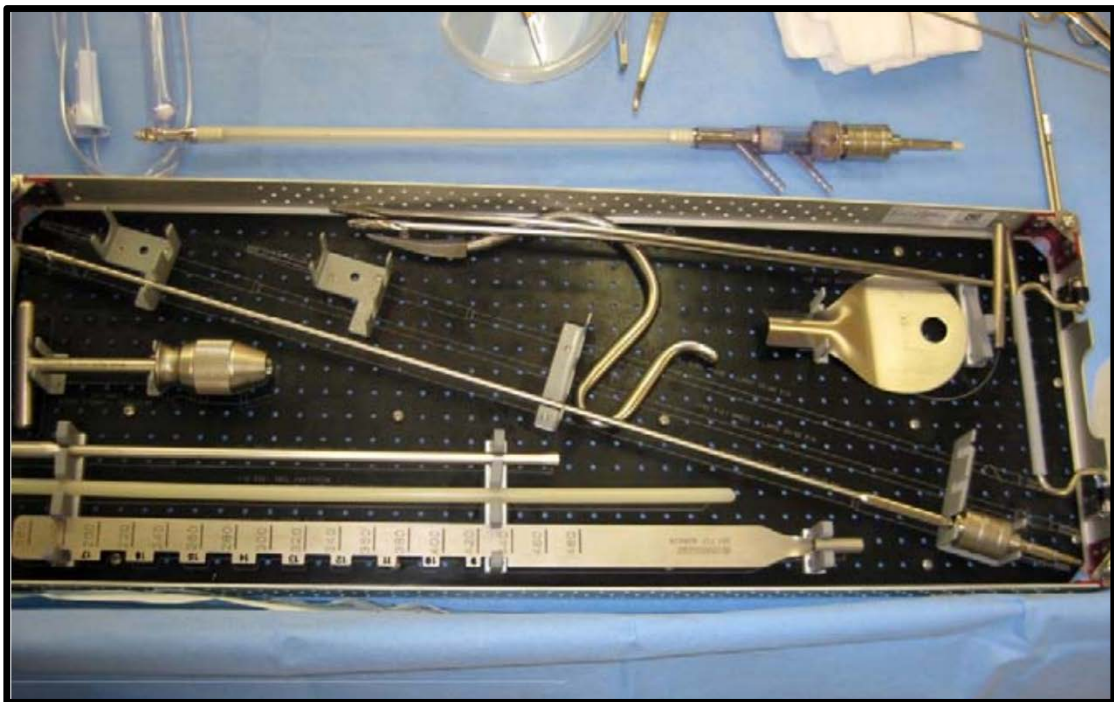


Figura 12. Sistema RIA (fresado-irrigación-aspiración) (92).



Figura 13. Imagen clínica de un paciente que se sometió a la reconstrucción de un defecto óseo femoral tras un accidente de tráfico mediante un peroné vascularizado. En las imágenes superiores se observa el defecto masivo femoral estabilizado mediante un

espaciador temporal de cemento con antibiótico. En las dos imágenes inferiores podemos observar la resolución del caso en sus primeras semanas postoperatorias, se decidió realizar un peroné vascularizado dada la edad del paciente. (Imagen cedida por el Dr. Corona, Hospital Universitario Vall d'Hebron).

Aloinjerto: Es una alternativa al autoinjerto, muy utilizada en el campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología. Este se obtiene de cadáveres humanos o donantes vivos, es decir, de un donante de la misma especie con diferente genotipo, que evita los problemas asociados con la obtención y la cantidad de material que podemos disponer. El hueso alogénico está disponible en muchas preparaciones, donde encontramos desde la matriz ósea desmineralizada (*DBM*), las virutas de esponjosa, los injertos corticoesponjosos y corticales, y de huesos enteros (Fig. 14), según los requisitos del sitio receptor.

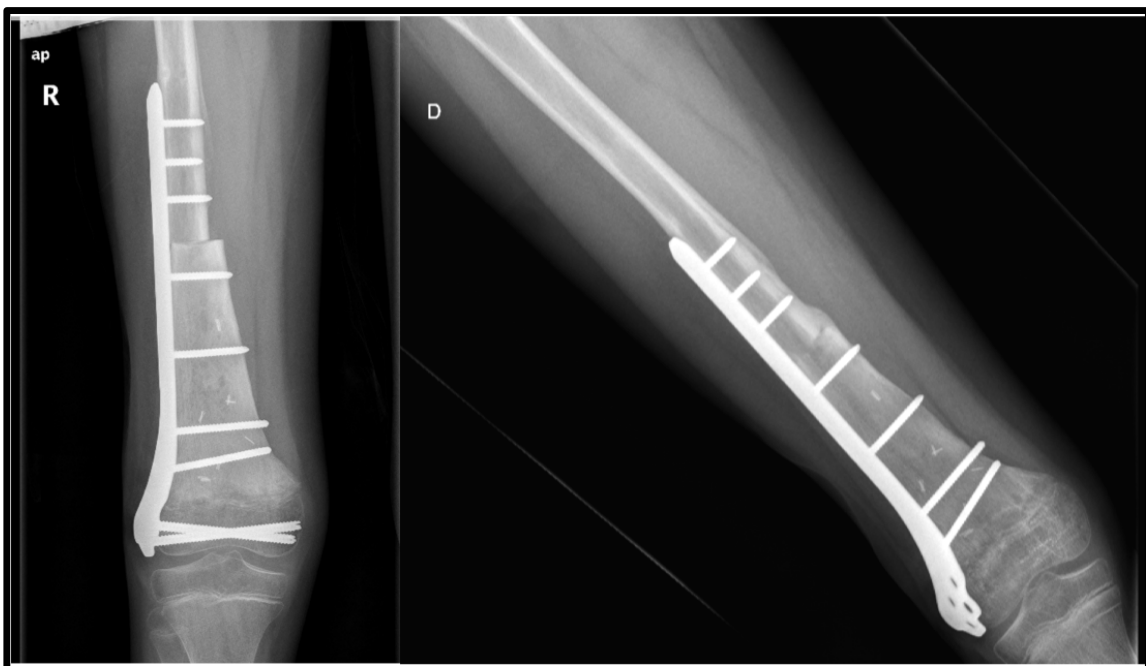


Figura 14. Aloinjerto intercalar para solventar un defecto femoral masivo tras la resección de un osteosarcoma de fémur distal en un paciente de 9 años de edad. En la imagen de la izquierda se observa al paciente en el postoperatorio, donde todavía presenta un injerto intercalar no integrado. En la siguiente imagen (derecha) se puede observar la integración de dicho injerto. (Imagen cedida por el Dr. Vélez, Hospital Universitario Vall d'Hebron).

Sus propiedades biológicas varían, pero en general poseen pocas propiedades osteoinductoras y no deberían contener ningún componente celular, porque los injertos de donantes se desvitalizan mediante irradiación o liofilización. Conservan las propiedades osteoconductoras y pesar de que las muestras son tratadas, pueden presentar problemas de inmunogenicidad, posibilidad de transmisión de infección y no están ausentes de costos (35,104). Dentro de este apartado, se podría hablar de una técnica quirúrgica que combina las propiedades de los autoinjertos con los aloinjertos, descrita por Capanna y sus colaboradores, pese a que no es un aloinjerto exclusivo (Fig. 15) (20).

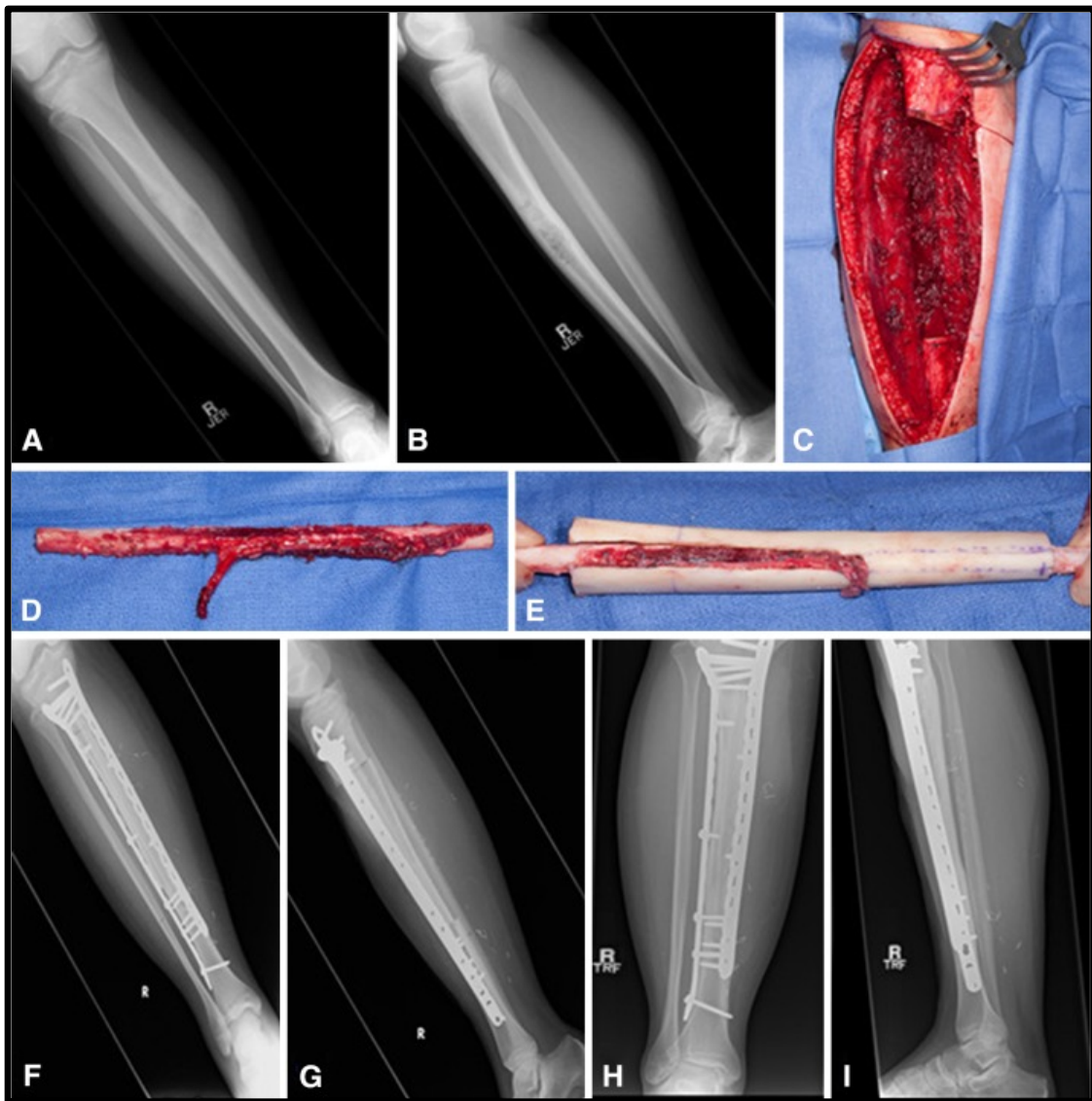


Figura 15. Radiografías preoperatorias de un paciente diagnosticado de un adamantinoma tibial (A, B). Imagen intraoperatoria de la resección del tumor para la

posterior reconstrucción mediante la técnica de Capanna (C). El defecto óseo se trató combinando un peroné vascularizado libre (D) y un aloinjerto óseo masivo (E). Radiografías postoperatorias inmediatas (F, G) y del seguimiento a los 2 años, donde podemos observar una consolidación del peroné autólogo y del aloinjerto (H, I) (105).

Esta técnica se basa en el uso de un aloinjerto óseo intercalar combinado con la técnica del peroné vascularizado, donde se coloca en el canal endomedular del aloinjerto, con el fin de disminuir las complicaciones de los injertos intercalares, como son la falta de integración o reabsorción.

Xenoinjerto: Es el injerto que proviene de una especie distinta al receptor. Por lo tanto, este tipo de injerto presenta mayores problemas de antigenicidad. Naturalmente, requiere un mayor procesamiento con tal de evitar dichos problemas, lo que nos da un menor número de propiedades. Los xenoinjertos generalmente sólo se distribuyen como una matriz calcificada, procedentes de múltiples especies que van desde el origen bovino al coral. La función principal de este material es la de ocupar el espacio del defecto, ya que solo poseen capacidad osteoconductora.

El xenoinjerto óseo más utilizado en Cirugía Ortopédica es el de base bovina. El más común de todos es el bovino (Bio-Oss®), que durante el proceso de fabricación es sometido a una desproteínización y esterilización. Este proceso elimina la matriz orgánica sin alterar los microtúneles existentes entre los cristales de apatita. Está compuesto por una apatita carbonatada deficiente en calcio que presenta propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales parecidas al hueso humano, por lo que obtenemos una matriz mineral remanente.

Los xenoinjertos a base de coral son principalmente carbonato de calcio. El material de coral se transforma industrialmente en hidroxapatita a través de un proceso hidrotérmico, dando lugar a un xenoinjerto no reabsorbible. O simplemente se omite el proceso, y el material coralino permanece en su estado de carbonato de calcio para una mejor reabsorción del injerto por el hueso natural. El xenoinjerto de coral se satura con geles y soluciones que mejoran el crecimiento óseo.

Algunos de los productos a base de coral disponibles son *Interpore®* y *Pro-osteon®* (*Interpore International, Inc., Irvine, CA*), así como los productos bovinos como el *Bio-Oss®* (*Geistlich Biomaterials, Geistlich, Suiza*) (Fig. 16), *Osteograf-N®* (*CeraMed Co., Denver, CO*) y *Endobon®* (*Merck Co., Darmstadt, Alemania*).

Las ventajas son la fácil disponibilidad, la osteoconductividad, las buenas propiedades mecánicas y los bajos costos. Este tipo de injerto ha tenido un mayor uso en el campo de la odontología (101,106,107).

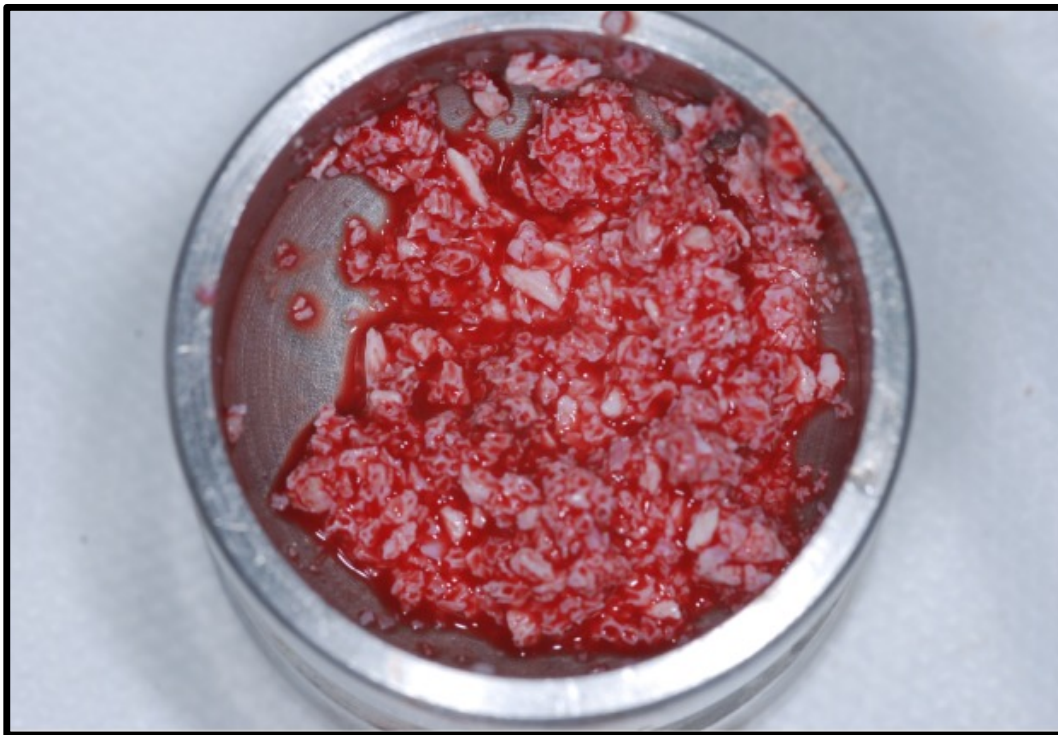


Figura 16. Aumentación de autoinjerto con xenoinjerto comercial *Bio-Oss®* (*Geistlich Biomaterials, Geistlich, Suiza*) (108).

Ingeniería tisular

La ingeniería tisular es una estrategia que nace con el objetivo de generar nuevos tejidos funcionales impulsados por células, en lugar de sólo implantar estructuras acelulares. Combinando los principios de la cirugía ortopédica con el conocimiento de la biología, la física, la ciencia de los materiales y la ingeniería, su aplicación clínica ofrece un gran potencial. En esencia, la ingeniería tisular combina células progenitoras, como las

mesenchymal stem cell (MSC) o las células maduras (para osteogénesis) sembradas en injertos o estructuras biocompatibles, idealmente en estructuras tridimensionales similares a tejidos. En la actualidad, los injertos compuestos disponibles incluyen andamios sintéticos óseos combinados con aspirados de médula ósea o factores de crecimiento (*BMP*), que proporcionan una alternativa competitiva al injerto óseo autólogo (109–111).

Se han logrado avances técnicos en el campo de la ingeniería tisular durante la última década, especialmente con la mayor comprensión de la curación ósea a nivel molecular y celular. Esto es fruto de los numerosos estudios que se han producido en este campo, sobretudo en el estudio del defecto óseo como tema principal. Pese a que son estudios heterogéneos, presentan unos resultados prometedores (110,112,113). Estamos en el inicio de una nueva forma de entender la medicina, y aún se deben resolver múltiples preguntas que desconocemos.

Factores de crecimiento: Se han identificado varias moléculas clave que regulan el proceso de regeneración ósea, las cuales están siendo investigadas o utilizadas a nivel clínico para mejorar la reparación ósea.

De estas moléculas, las proteínas morfogenéticas óseas han sido las más estudiadas, ya que son potentes factores osteoinductores. Estas inducen la mitogénesis de las células madre mesenquimales y su diferenciación hacia los osteoblastos. Las BMP es el nombre genérico para las proteínas específicas extraídas de la matriz ósea. Estas proteínas forman parte del factor de crecimiento transformante beta y las más estudiadas son BMP-2, BMP-3, BMP-4 y BMP-7. Como mecanismo de función, la BMP-2 se une al receptor BMP (BMP_r) y participa en la regulación de la expresión del gen Runx2 que resulta fundamental en la actividad de osteoblastogénesis. Estas moléculas se han utilizado en una variedad de patologías que incluyen fracturas abiertas, pseudoartrosis, necrosis ósea y defectos óseos críticos (74,114–116).

También se están investigando otros factores de crecimiento, además de las *BMP*, que están implicados en la regeneración ósea. Entre ellos destacan el factor de crecimiento

derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante- β , el factor de crecimiento insulínico-1, el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento de los fibroblastos. Un enfoque actual para mejorar la regeneración ósea es la aplicación local de factores de crecimiento mediante el uso de plasma rico en plaquetas, que consiste en aplicar un volumen de la fracción plasmática de sangre autóloga con concentraciones elevadas de plaquetas y factores de crecimiento.

Sin embargo, existen varios problemas sobre su uso, incluida la seguridad (debido a las concentraciones suprafisiológicas de los factores de crecimiento necesarios para obtener los efectos osteoinductores deseados), el alto costo del tratamiento y el potencial de formación de hueso ectópico. Es necesario investigar más a fondo varias cuestiones, como la dosis óptima y la concentración sostenida y biológicamente adecuada en el sitio de regeneración ósea, así como la combinación con otros factores de crecimiento que han mostrado resultados prometedores en la investigación clínica (117,118).

Células madre mesenquimales: Un suministro adecuado de células mesenquimales es fundamental para la regeneración ósea (Fig. 17). En la actualidad se pueden administrar células osteogénicas directamente en el sitio de regeneración, previo aspirado de médula ósea de la cresta ilíaca, que también contiene factores de crecimiento. Sin embargo, la concentración y la calidad de las MSC pueden variar significativamente, dependiendo del individuo, los sitios de aspiración y las técnicas utilizadas (Fig. 18). Hoy en día se intenta avanzar en este campo a través de la recolección de células, expansión *in vitro* y posterior implantación, porque la expansión *in vitro* puede generar una gran cantidad de células progenitoras, controlando de manera más efectiva el producto que se administra al paciente. Las fuentes alternativas de células, que son menos invasivas, como la sangre periférica y las células progenitoras mesenquimales de la grasa o el músculo también se están investigando. Sin embargo, la utilidad de las MSC derivadas de grasa para aplicaciones de regeneración ósea es discutible, ya que algunos estudios demuestran que son inferiores a las MSC derivadas de médula ósea en modelos animales. Todavía falta mucho por descubrir en el mundo de las MSC y su implicación

en la reparación ósea, en gran parte debido a la falta de estudios sobre la biología de las *MSC in vivo* en el entorno de fracturas (35,119–122).

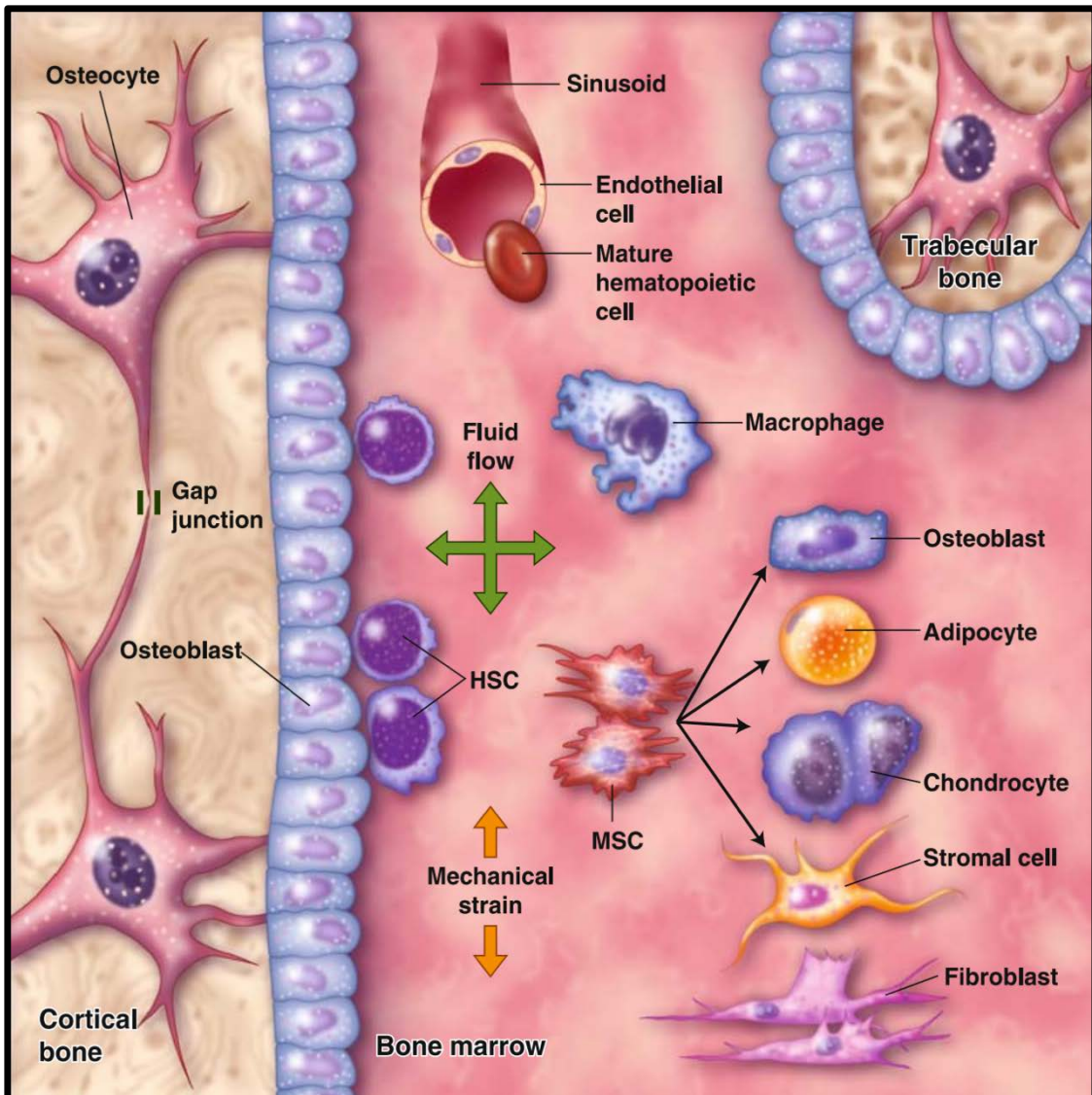


Figura 17. Las células madre mesenquimales de médula ósea son células pluripotenciales. Las *MSC* pueden diferenciarse o especializarse en células cartilaginosas (condrocitos), células óseas (osteoblastos) y células grasas (adipocitos). Cada uno de estos tipos de células especializadas tienen su forma, estructura y función características, y pertenecen a un tejido en particular (123).



Figura 18. Técnica estéril de aspirado de células mesenquimales en cresta ilíaca (124).

Plasma rico en plaquetas (PRP): Las plaquetas sanguíneas se recogen fácilmente de la sangre y representan una fuente valiosa de factores de crecimiento, como son el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento insulínico y el factor de crecimiento transformante. El plasma rico en plaquetas se obtiene mediante la concentración de plaquetas sanguíneas autólogas a través de un proceso de centrifugación. El PRP demostró tener propiedades quimiotácticas y mitogénicas para los osteoblastos y fibroblastos *in vitro*, para estimular la síntesis de los fibroblastos mejorando así la formación ósea. En contrapartida, ciertos estudios publicados ponen en duda el efecto sobre la consolidación y la regeneración ósea, explicando un efecto inhibitor paradójico sobre BMP-2 a altas concentraciones. De hecho, actualmente el PRP no está validado como un sustituto óseo independiente (117,125–128).

Biomateriales

Los biomateriales, pese a que carecen de propiedades osteogénicas, ya se usan ampliamente en la práctica clínica para la osteoconducción. Actualmente hay disponible una gran cantidad de sustitutos óseos sintéticos, como la hidroxiapatita, el fosfato cálcico, el sulfato cálcico, etc. (Fig. 19). Estos se están utilizando como complementos o alternativas a los injertos óseos autólogos, ya que promueven la regeneración ósea.

Especialmente en los grandes defectos óseos, donde hay una gran demanda de injerto, estos productos sintéticos se pueden usar en combinación con injerto óseo autólogo, factores de crecimiento o células. Además, también hay sustratos osteoconductores no biológicos, como los metales biocompatibles, que carecen de inmunogenicidad (129). Se están realizando investigaciones para mejorar las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de los diferentes sustitutos óseos, para promover la adhesión, el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos, y para permitir el crecimiento vascular y la formación de tejido óseo. Durante la última década se han creado estructuras porosas tridimensionales biodegradables y bioactivas, así como sustitutos porosos biohíbridos magnéticos que actúan como un agente de reticulación del colágeno guiado por un campo magnético externo o inyectables para una aplicación más fácil (130,131).

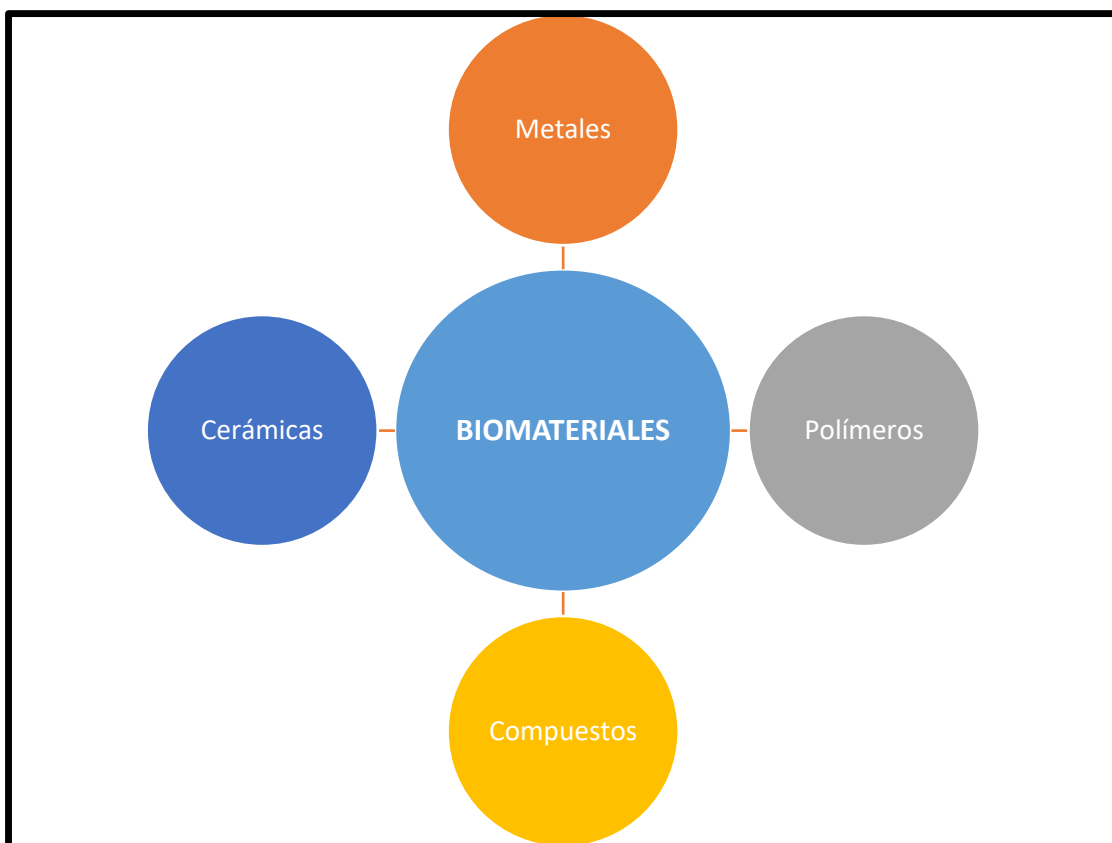


Figura 19. Esquema de los principales tipos de biomateriales utilizados en la práctica clínica.

Cerámicas: En general, los sustitutos óseos de cerámica están formados a base de calcio, una mezcla de hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (FTC), la fase amorfa de la HA. La HA es una sustancia relativamente inerte que se retiene "*in vivo*" durante períodos prolongados de tiempo, mientras que el FTC, más poroso, sufre una biodegradación en 6 semanas desde su introducción en el área de formación ósea. La HA tiene una resistencia mecánica muy alta, mientras que el FTC tiene malas cualidades mecánicas. En el mercado se suelen encontrar bases de un fosfato de calcio bifásico, que combina un 40-60% de FTC con un 60-40% de HA, que tienen un mejor equilibrio fisiológico entre el soporte mecánico y la resorción ósea. Las cerámicas son ampliamente conocidas y se ha demostrado su seguridad y efectividad en el mundo de la sustitución ósea. La forma de presentación es múltiple, encontramos bloques, gránulos y kits inyectables. La macroporosidad de aproximadamente 100–400 μ y la porosidad interconectada son necesarias para el crecimiento óseo. La resistencia será variable en función de la concentración de HA y FTC, siendo inferior a la resistencia a la compresión del hueso cortical, y este es uno de los principales límites de los biomateriales a base de cerámica (106,132).

- Hidroxiapatita y fosfato tricálcico: La hidroxiapatita es la forma cristalina (Fig. 20) del fosfato tricálcico, siendo el principal componente mineral de los dientes y los huesos. Durante las últimas décadas se ha popularizado su uso en la cirugía maxilofacial y ortopédica, con la función de sustituto óseo. La cerámica de HA viene en forma natural y sintética. Pese a que la cantidad de hidroxiapatita que compone los huesos es elevada, aproximadamente un 70%, la que nos encontramos de forma natural puede reemplazar su grupo hidroxilo o fosfato por carbonato, silicio y magnesio, entre otros iones. Las últimas investigaciones están encaminadas a producir materiales con dichos iones para que se asemeje más al contenido mineral del hueso nativo, mejorando la bioactividad y la osteoconducción. En el mundo de la traumatología, los sustitutos óseos de HA-FTC se usan de manera habitual en los defectos óseos humeral y de tibia proximal (131,133,134).

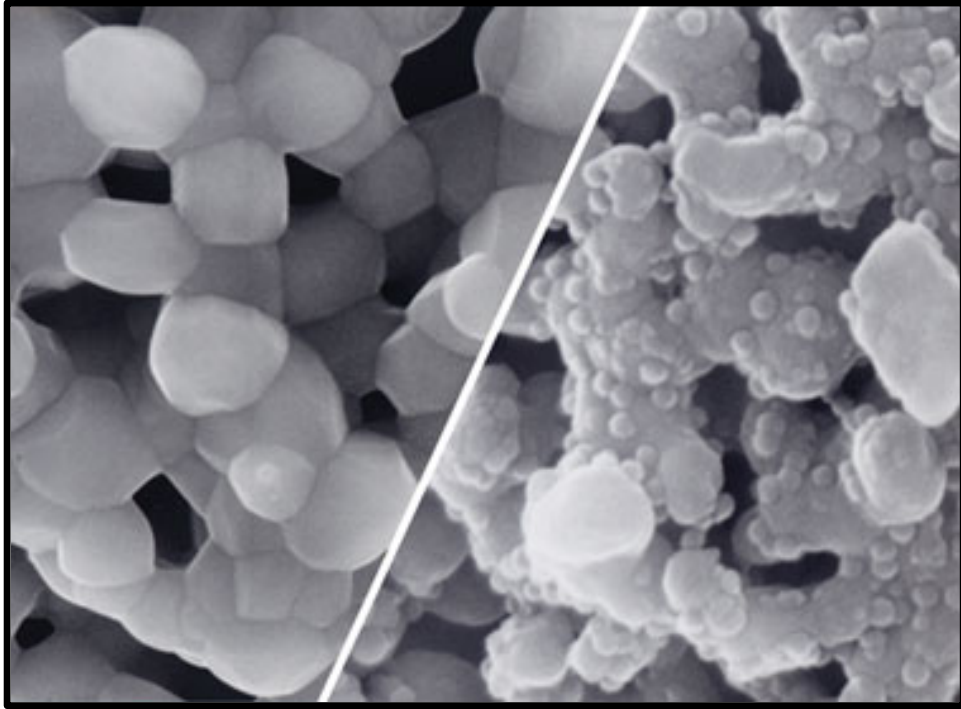


Figura 20. Cristal de cerámica de hidroxiapatita (135).

- Cementos de fosfato de calcio: Los cementos de fosfato de calcio son sustitutos óseos sintéticos que fueron inventados en la década de los 80 con la intención de solventar problemas en el mundo de la cirugía oral. Normalmente se presentan como un polvo blanco, compuesto por fosfato de calcio, que cuando se mezcla con un líquido forma una pasta que puede moldearse durante la cirugía para adaptarse a los contornos de la pérdida ósea. Los cementos se endurecen en un tiempo determinado, aproximadamente de 20 minutos, según la composición del producto. La reacción de endurecimiento es isotérmica y ocurre a pH fisiológico, por lo que no se produce daño tisular durante la reacción de fraguado. Con el tiempo, los cementos de fosfato de calcio se reabsorben gradualmente y se reemplazan con hueso nuevo. Debido a que son frágiles, se usan para aplicaciones que no deban soportar grandes cargas. Este tipo de sustituto óseo tiene dos ventajas significativas sobre la cerámica preformada. Primero, la pasta se puede adaptar durante la cirugía para rellenar las cavidades. Y, en segundo lugar, la estructura de hidroxiapatita nanocristalina del cemento es osteoconductor, lo que hace que se reabsorba gradualmente y se reemplace por hueso nuevo (136,137).

- Sulfato de calcio: El sulfato de calcio (SC) fue implantado por primera vez en humanos como un relleno de una osteomielitis tuberculosa en los años 90. El SC usado como sustituto óseo es absorbido por disolución en ocho semanas, dependiendo del volumen y del sitio de implantación. A pesar de que no se han descrito en detalle los posibles mecanismos por los que el SC promueve la regeneración y reparación ósea, existen diferentes explicaciones y observaciones plausibles. Se ha observado un aumento de las concentraciones de las proteínas BMP, el factor transformante Beta, y el factor de crecimiento derivado de plaquetas. A parte, se cree que juega un papel como sustituto de iones esenciales en el proceso de curación ósea, añadiendo propiedades angiogénicas al sustrato. Otro evento importante del SC es que sufre una degradación en el defecto y una disminución local en el pH. Esta caída del pH produce una desmineralización de las paredes del defecto con liberación de factores de crecimiento óseo. Estudios recientes indican que hay una mayor expresión de BMP-2, BMP-7, el TGF-Beta y PDGF-BB en los defectos óseos cuando el SC se utiliza como un injerto de hueso. Originalmente, el sulfato de calcio fue percibido sólo como un sustituto para rellenar defectos, pero estudios recientes han demostrado que es biocompatible, biodegradable, osteoconductor, seguro y no es tóxico. Los defensores del sulfato de calcio afirman que los gránulos proporcionan un relleno eficaz de los defectos, permiten el crecimiento vascular y se reabsorben rápidamente, favoreciendo un proceso fisiológico de regeneración del hueso (138,139).

Polímeros: Los polímeros tienen propiedades físicas, mecánicas y químicas diferentes de los otros sustitutos óseos. Se pueden dividir en polímeros naturales y polímeros sintéticos. Estos, a su vez, se pueden dividir aún más en tipos degradables y no degradables. Uno de los polímeros naturales más importantes en los huesos es el colágeno. Los polímeros sintéticos degradables (es decir, los polímeros naturales) son reabsorbidos por el cuerpo. Los polímeros degradables como el ácido poliláctico se han utilizado como sustitutos independientes y como extensores de autoinjertos y aloinjertos. La mayoría de las investigaciones se han dirigido al ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y los copolímeros de poliláctico-co-glicólido (PLGA). El éxito de

estos polímeros ha llevado a estudiar los poliésteres alifáticos como la policaprolactona (PCL). Se trata de un poliéster semicristalino altamente procesable, ya que es soluble en una amplia gama de solventes orgánicos. Lo poco común de la PCL es su alta estabilidad térmica, con una temperatura de descomposición de 350° C, mientras que otros poliésteres alifáticos están entre 235 y 255° C. En ingeniería ósea, la PCL parece ser un prometedor polímero biocompatible y biodegradable, que puede tener un papel importante en el crecimiento y la regeneración ósea para el tratamiento de defectos óseos (140–142).

Metales: En este grupo destacan el titanio y sus aleaciones, el acero inoxidable y el cromo-cobalto, que son utilizados para la fabricación de implantes debido a su buena tolerancia por parte del organismo y su resistencia a la corrosión, especialmente cuando se encuentran en un medio como el cuerpo humano a una temperatura aproximada de 37° C (Fig. 21).

El titanio es capaz de dar respuesta a la corrosión mediante la formación de una capa de dióxido en su superficie, protegiendo el interior del metal y evitando así la corrosión. Sin embargo, aunque las propiedades mecánicas de los metales sean superiores al resto de biomateriales, éstos ofrecen una peor integración en el hueso (143,144).

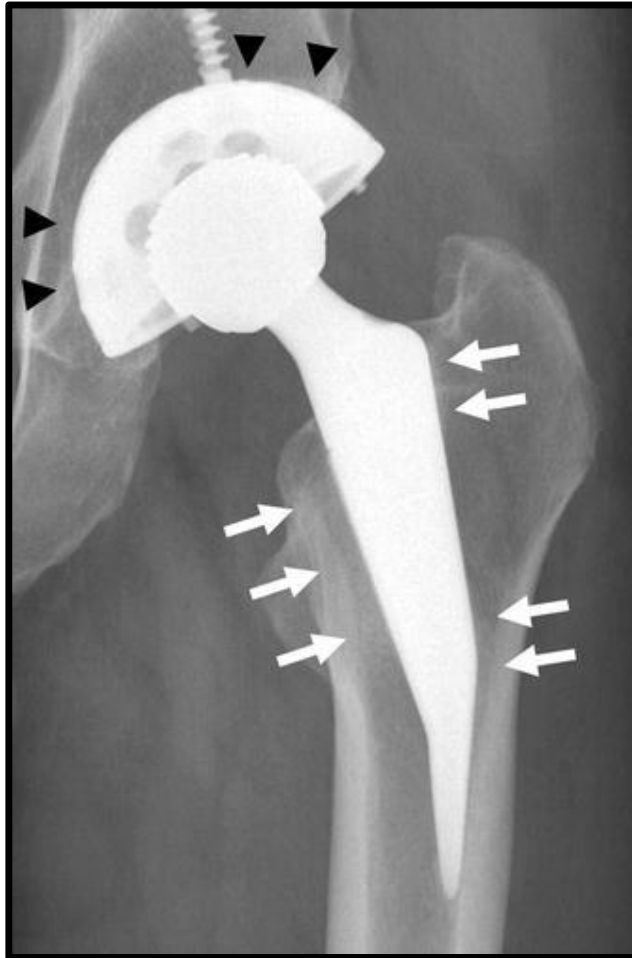


Figura 21. Prótesis total de cadera donde se aprecia una correcta integración del acetábulo (triángulos) y vástago femoral (flechas) (145).

Materiales compuestos: El hueso está hecho principalmente de colágeno e hidroxiapatita. Al ser posible obtener colágeno-hidroxiapatita mediante un proceso de autoensamblaje a escala nanométrica, es lógico pensar que un implante fabricado a partir de dichos componentes se comporte mejor que otros sustitutos óseos. De hecho, se descubrió que tanto el colágeno tipo I como la hidroxiapatita aumentan la diferenciación de los osteoblastos, y que combinados aceleran la osteogénesis. Una matriz compuesta tiene mejores propiedades osteoconductoras en comparación con la hidroxiapatita por sí sola. Además, los compuestos colágeno-hidroxiapatita demostraron ser biocompatibles tanto en humanos como en animales. Por otro lado, estos compuestos tienen algunas ventajas mecánicas. Las propiedades dúctiles del colágeno ayudan a aumentar la pobre resistencia a la fractura de la hidroxiapatita. La adición de un compuesto de calcio/fosfato al colágeno le da una mayor estabilidad,

aumenta la resistencia y mejora las propiedades mecánicas. El hecho de aumentar las propiedades biomiméticas de un implante puede reducir los problemas de infecciones bacterianas asociadas con la inserción de un cuerpo extraño. La adición de colágeno a una estructura cerámica puede proporcionar otras ventajas adicionales como son el control de la forma, adaptación espacial, mayor adhesión de partículas y la capacidad de favorecer la formación y estabilización de coágulos. En resumen, la combinación de colágeno e hidroxiapatita debería proporcionar una ventaja sobre otros materiales para su uso en la reparación del tejido óseo, pese a que se requieren más estudios para validar su grado de efectividad (146–151).

Modelo animal: Defecto óseo en rata

Tanto las fracturas como la pérdida de *stock* óseo causan un importante coste económico en todas las sociedades a nivel mundial. Por este motivo, encontramos en la literatura numerosos trabajos orientados hacia la regeneración y/o tratamiento de la patología ósea. Hoy en día hay un creciente interés en determinar los factores que influyen en la reparación ósea, así como el desarrollo de nuevos productos sustitutivos que puedan ofrecer al paciente una mejora en el tratamiento de su patología (152,153). Para llevar a cabo nuevos estudios es deseable contar con modelos animales que sean de fácil manejo, de bajo coste, reproducibles y con una posible traslación al ser humano, para así poder experimentar con nuevos materiales capaces de sustituir al hueso en el tratamiento de defectos óseos de diferente etiología.

Existen diversos modelos animales de reparación ósea y defectos óseos críticos, tanto en animales grandes como en pequeños. En algunos de estos modelos se realiza una fractura o defecto óseo que se estabiliza mediante materiales de osteosíntesis como clavos intramedulares, tornillos y fijadores externos, con el fin de evaluar el regenerado óseo que produce el producto o técnica del estudio (154). Cada modelo animal establecido tiene sus ventajas e inconvenientes, así que debe ser el investigador el que sea capaz de encontrar el que mejor se adapte a las necesidades de su estudio. Hoy en día, la rata es el animal de experimentación más utilizado en regeneración ósea (155). Es un animal fácil de manejar y estabular, sin un elevado coste de mantenimiento y con una elevada tasa de supervivencia tras procedimientos quirúrgicos, lo que lo convierte en un animal idóneo para este tipo de investigaciones. El modelo de defecto crítico en rata fue descrito por Poser y cols. en el 2014, a través de un defecto de 5 mm en el tercio medio femoral (156), y es este modelo el que fue seleccionado por nuestro grupo de experimentación para llevar a cabo una serie de estudios sobre regeneración ósea (26).

Los modelos animales de defectos óseos se dividen en defectos óseos no críticos, que son aquellos que son capaces de repararse de manera espontánea, y los defectos óseos críticos, que son los que no llegan a repararse por si solos. Existen diferentes tipos de

ensayos (tracción, compresión, torsión y flexión) que el investigador puede llevar a cabo para valorar las propiedades biomecánicas del hueso (157).

Como ya se ha comentado con anterioridad en la introducción, se conocen las diferencias entre el aporte de un autoinjerto respecto a un aloinjerto, dado su limitado *stock*, pese a que posee unas mejores propiedades. Nuevas líneas de investigación están enfocadas en el intento de mejorar la integración de los aloinjertos, resolviendo así uno de sus principales problemas. En estudios sobre aloinjertos intercalares en rata se objetivó una falta de integración ósea a las 6, 8 y 12 semanas (26,158–160). De manera opuesta, hay autores como Amorosa y cols. que sí que encuentran formación de callo óseo a los 4 meses de seguimiento. Seo y cols. observaron una consolidación de la osteotomía distal metafisaria pero no de la proximal a las 12 semanas de evolución (161,162). Uno de los factores más importantes a la hora de evaluar los resultados de los estudios es el sistema de fijación del defecto crítico femoral en rata. El sistema ideal debería ser reproducible y que permita una carga inmediata al animal sin alterar la movilidad de la extremidad. Hoy en día hay numerosas empresas que se dedican a sistemas de fijación en animales para estudios experimentales, con multitud de opciones para el tratamiento de los defectos críticos (Fig. 22). Para cualquier tipo de implante utilizado se recomienda el abordaje lateral del muslo del animal, tanto para crear el defecto crítico como para su posterior reconstrucción, ya que nos permite una buena visualización de la diáfisis femoral a través de planos intermusculares.

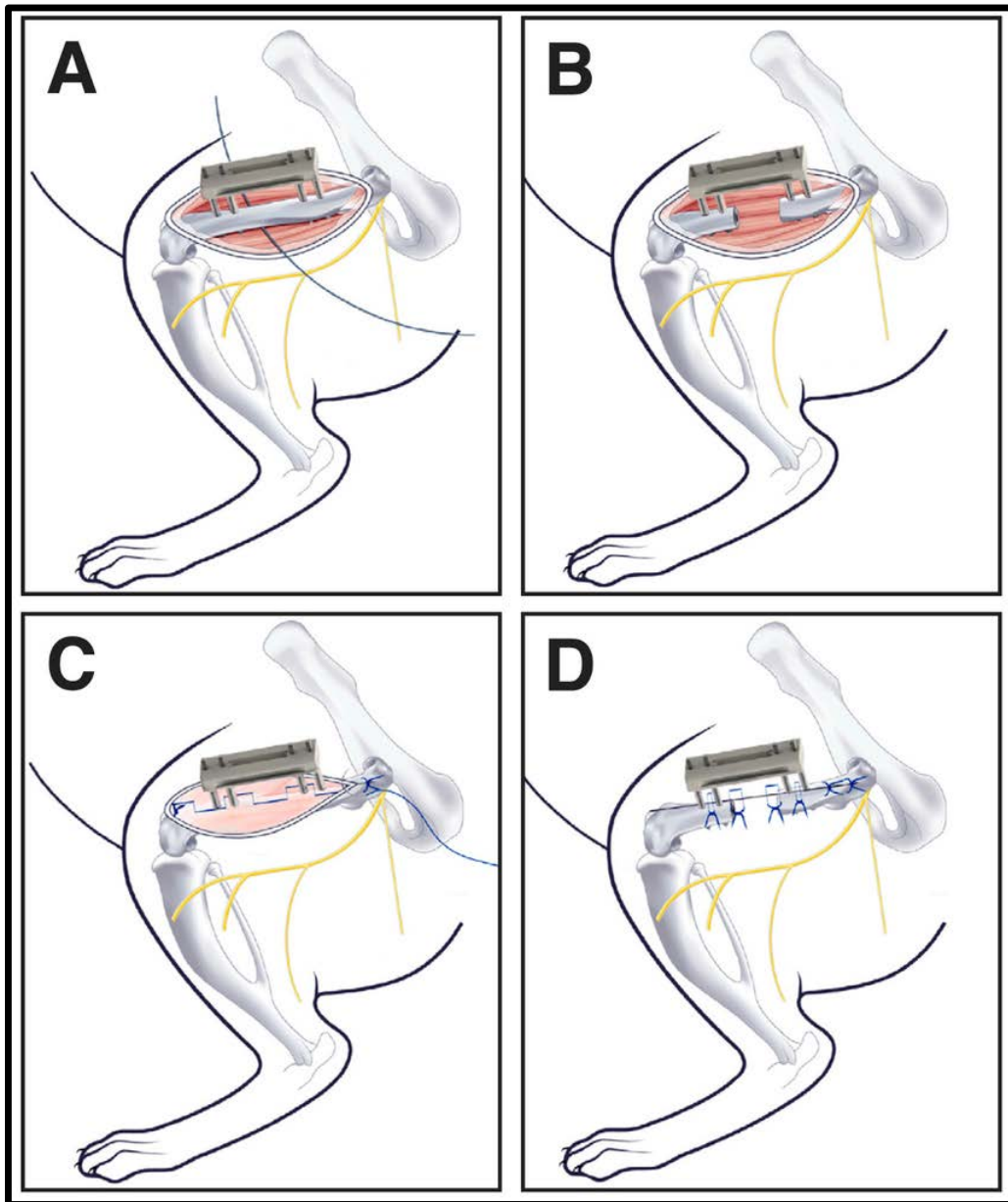


Figura 22. Ejemplo de fijador externo diseñado para la estabilización del defecto crítico en rata: (A) Implantación del fijador externo. (B) Defecto segmentario creado de 5 mm. (C) Sutura del plano muscular con la barra de estabilidad del fijador externo. (D) Sutura de la piel (163).

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Hipótesis principal

La implantación de un biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico estimula la angiogénesis y la osteointegración del aloinjerto estructural en la reconstrucción de un defecto óseo segmentario en un modelo animal en rata.

Hipótesis secundaria

La implantación de un biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico es un producto seguro en cirugía de experimentación animal.

OBJETIVOS

1. Verificar la capacidad de promover la osteointegración de un producto constituido de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico sobre un aloinjerto estructural óseo.
2. Valorar la capacidad de angiogénesis de un producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico sobre un aloinjerto estructural óseo.
3. Evaluar la seguridad de la asociación del biovidrio sobre un aloinjerto estructural óseo para su aplicación clínica en la reconstrucción de grandes defectos óseos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Animal

Como modelo animal experimental se escogió la rata Sprague-Dawley® (*Janvier, Labs Roubaix, France*). Todos los especímenes eran machos con un peso alrededor de 250g. Se utilizaron un total de 48 ratas, divididas en 4 grupos de 12 animales (Fig. 23).



Figura 23: Rata Sprague-Dawley® (*Janvier, Labs Roubaix, France*) usada para el estudio como modelo animal.

Ninguno de los animales fue usado en estudios previos, todos pasaron el periodo de cuarentena después del traslado por parte del distribuidor y fueron alimentados con pienso estándar y agua *ad libitum*. Se estabularon en jaulas para roedores en grupos de 3 ratas para una mayor comodidad de los animales. Se mantuvieron a temperatura constante de 22º C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas marcado por el VHIR.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo las estrictas recomendaciones de las leyes locales, nacionales y europeas (Decreto 214 de 1997, Real

Decreto 223 de 1988 y Directiva Europea 86/609/CEE de 1986), y siguiendo las recomendaciones de atención establecidas por el *National Institutes of Health* en su *Guide for Care and Use for Laboratory Animals* (publicación N.80-23, 1985).

Del mismo modo, nuestro proyecto recibió la aprobación del Comité de Ética de Experimentación animal del VHIR (Número de registro: 65/16 CEEA).

Material quirúrgico

Caja básica de cirugía (Fig. 24):

- Tijera Mayo
- Tijera Metzenbaum
- Porta agujas
- Pinza Adson dentada y sin dentar
- Pinza mosquito dentada
- Mango de bisturí
- Gasas estériles



Figura 24. Material quirúrgico estéril utilizado para realizar el procedimiento.

Suturas

- Sutura Braun® Surgical Dafilon-Poliamida Monofilamento 4.0 18"-45cm (Fig. 25).
- Sutura Braun® Surgical Novosyn-Poly(glycolide-co-L-lactide) Trenzada 4.0 18"-45cm (Fig. 25).



Figura 25. Suturas utilizadas en el proceso de cierre de la herida quirúrgica.

Material complementario

- Sierra de osteotomía Dremel® 200-5 (Fig. 26)



Figura 26. Sierra de osteotomía Dremel® 200-5 que se utiliza para realizar la osteotomía femoral del animal.

- Lupas quirúrgicas de 3.5x aumentos de Lugotn® (Fig. 27):



Figura 27. Lupas quirúrgicas Lugotn® 3.5x aumentos usadas durante los procedimientos en el estabulario del VHIR.

- Manta térmica postoperatoria
- Lámpara portátil quirófano Martin® (Chromophare C-450)
- Cortafrío
- Chuck
- Tallas y guantes estériles de 7.5
- Suero fisiológico y jeringuillas de 10 mL
- Balanza Kern® ABS 220-4N (Fig. 28)



Figura 28. Balanza Kern® ABS 220-4N de alta precisión utilizada en el VHIR para el peso del animal y producto utilizado.

- Agujas roscadas totales de 1.6mm de Strayker® (Ref. 45-80100) (Fig. 29)

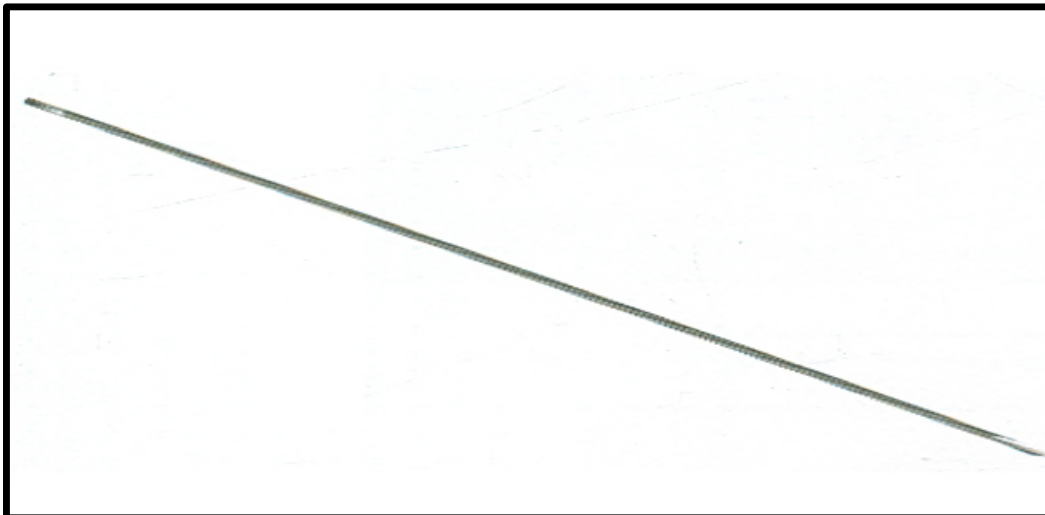


Figura 29. Aguja de Kirschner usada a modo de clavo endomedular femoral en rata.

Producto de estudio

- Producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico a diferentes concentraciones (Fig. 30).

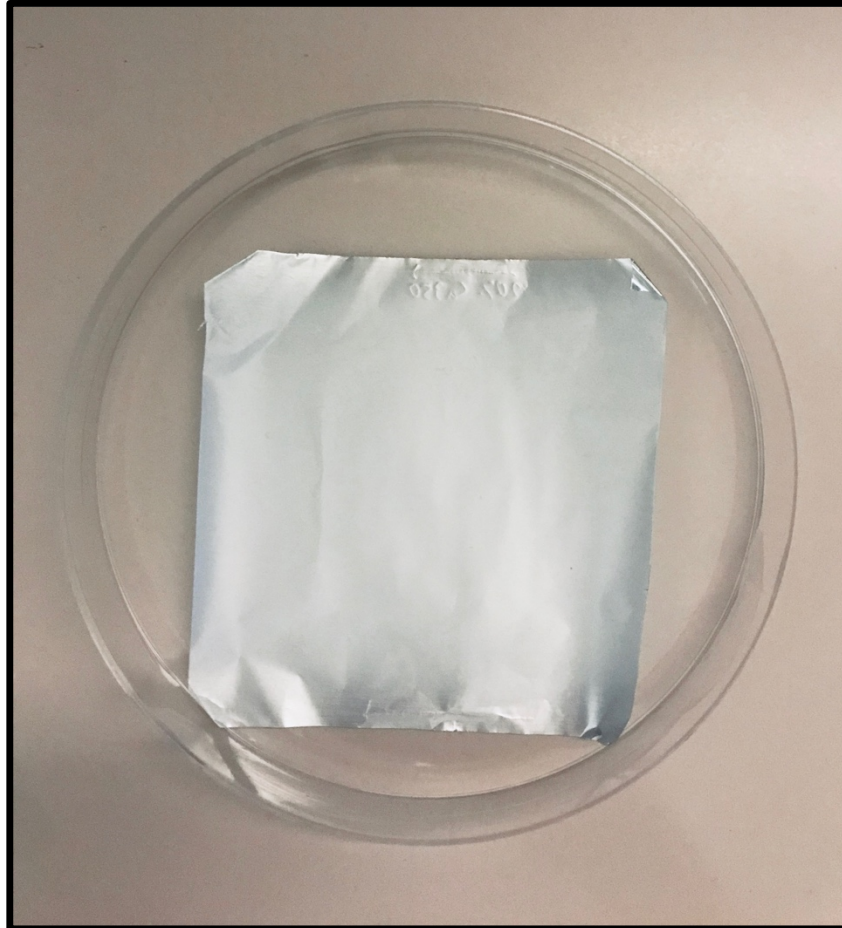


Figura 30. Producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico.

Métodos

Preparación preoperatoria del animal

Tras el transporte del animal al estabulario del centro de investigación VHIR (número de registro del Departamento de Medio Ambiente y Vivienda: B9900062), el animal debe permanecer una semana para la aclimatación al recinto, tras pasar el periodo de cuarentena de 48 horas. Durante este periodo, el equipo técnico veterinario del centro verifica el correcto estado de salud del animal, se registra el peso preoperatorio y la correcta adaptación al nuevo medio.

Muestra

Se utilizó una muestra de 48 ratas divididas en 4 grupos de tratamiento de 12 animales cada uno, dividiendo los 4 grupos en función del producto utilizado o si bien formaban parte del grupo control.

Producto analizado

Producto PLA7038: Fibras de ácido poliláctico puro con un 70% de copolímero LL, un 30% de copolímero LD y una densidad inherente de 3.8 dL/g. Producto utilizado en el Grupo B: control negativo.

Producto 20G5: Fibras del mismo ácido poliláctico mencionado en el Grupo B, mezclado con un 20% de nanopartículas con una composición 44.5% CaO - 44.5% P2O5 - 6% Na2O - 5% TiO2.

Producto 20P30: Fibras del mismo ácido poliláctico que el Grupo B, mezclado con un 20% de nanopartículas con una composición 70% CaO - 30% P2O5.

Estas nanopartículas se fabrican por el método sol-gel, que consiste en mezclar una solución de sales orgánicas con metales precursores de los óxidos y hacerlo precipitar en forma de partículas con un catalizador básico. Se purifican y se mezclan con el ácido poliláctico para fabricar fibras mediante el método de electrohilado (*electrospinning*),

que consiste en aplicar un alto voltaje a una solución o mezcla polimérica que se encuentra en una jeringa acoplada a una bomba de infusión. Cuando este voltaje supera la tensión superficial de la solución polimérica genera un chorro de solución cargada que busca neutralizarse, por lo que colocaremos cerca un colector conectado a tierra para recogerlas. En el camino hacia el colector este chorro va perdiendo solvente por evaporación y va perdiendo volumen, precipitando en una fibra de tamaño submicrónico.

Grupos de estudio

GRUPO A: Grupo control: 12 ratas con reconstrucción con aloinjerto estructural sin ningún componente asociado de fibras de ácido poliláctico (PLA).

GRUPO B PLA7038: Grupo control negativo: 12 ratas con reconstrucción con aloinjerto estructural asociando la fibra de ácido poliláctico sin biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico.

GRUPO C 20G5: Grupo aloinjerto y tratamiento con biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico a una concentración de un 20% de nanopartículas con una composición 44.5% CaO - 44.5% P₂O₅ - 6% Na₂O - 5% TiO₂: 12 ratas con reconstrucción con aloinjerto estructural.

GRUPO D 20P30: Grupo aloinjerto y tratamiento con biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico con una concentración de un 20% de nanopartículas con una composición 70% CaO - 30% P₂O₅: 12 ratas con reconstrucción con aloinjerto estructural (Fig. 31).

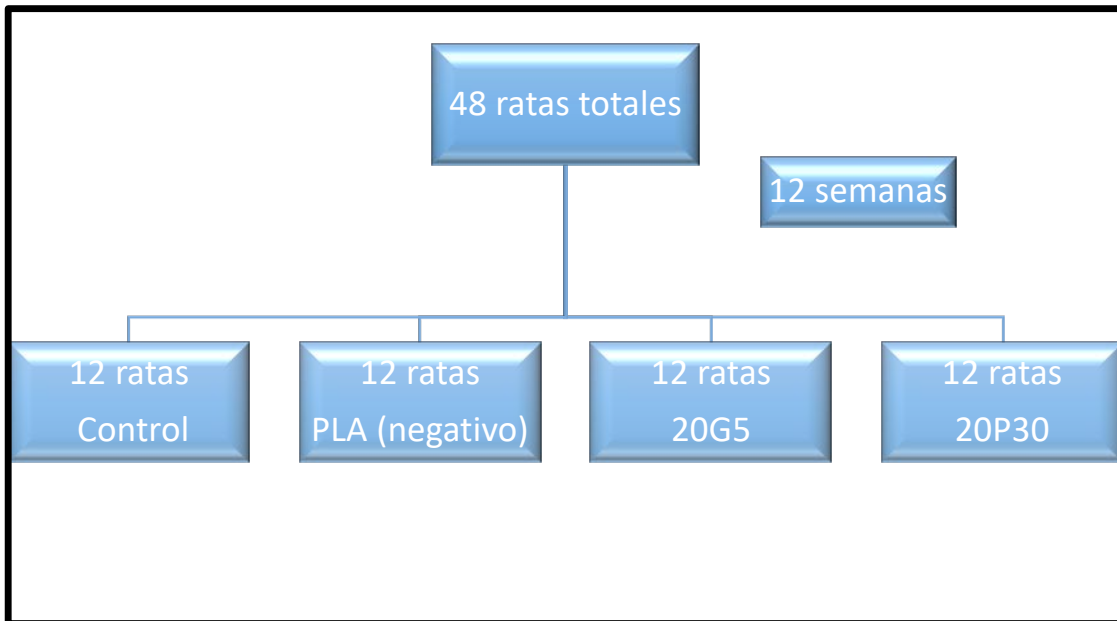


Figura 31. Distribución de los diferentes grupos de estudio. En el modelo que diseñamos encontramos dos grupos control (sin producto y control negativo), y dos grupos experimentales (20G5 y 20P30).

Técnica anestésica y control postoperatorio

En todos nuestros animales se realiza un protocolo de anestesia antes de la intervención quirúrgica a base de la combinación de Ketamina + Medetomidina. Para preparar la mezcla de ambos fármacos se utilizan en un vial 3 mL de Ketamina 50 mg/mL por 1 mL de Medetomidina 1mg/mL. Dicha mezcla se inyecta intraperitonealmente a 0.2 mL/100g de peso del animal, y se repite cada 30 minutos si la intervención lo requiere. Se comprueba el reflejo corneal y de retirada al dolor para asegurar una correcta anestesia. También se valora la respiración del animal para evitar la apnea.

Durante el acto quirúrgico se administran 5 mL de solución de Ringer lactato por vía subcutánea para evitar la deshidratación del animal.

Para revertir la anestesia, si fuese necesario, se administra Antisedan 50 µL/100g por vía subcutánea.

Durante el postoperatorio inmediato el animal es colocado en una manta térmica para evitar la hipotermia hasta su recuperación y control radioscópico para objetivar la correcta posición del aloinjerto y enclavado endomedular.

En todos los animales se administra una dosis subcutánea de Meloxicam (0.25 mg/kg) para asegurar una correcta analgesia postoperatoria, que se va repitiendo de manera diaria durante los primeros 5 días de la intervención o hasta que el animal no muestre signos de dolor.

Al día siguiente se evalúa el aspecto general, movilidad, respiración, estado del pelaje, conducta, herida quirúrgica y presencia de automutilación con tal de detectar malestar del animal.

Preparación del aloinjerto estructural óseo

Todos los aloinjertos estructurales óseos fueron obtenidos de las propias ratas del estudio, sirviéndose entre ellas de donantes y receptoras con el fin de evitar un número mayor de animales más allá del necesario.

Tras el procedimiento de resección de segmento óseo diafisario femoral de 5 mm mediante la sierra de osteotomía, éste se deposita en un contenedor estéril con suero fisiológico. Se realiza un lavado endomedular y resección de las partes blandas adheridas al hueso. Posteriormente, se introduce en un baño de etanol al 70% durante 3 horas. A continuación se realiza un nuevo lavado en condiciones estériles con suero fisiológico y se almacena a -80° C durante al menos una semana antes de su uso (157,161).

Cirugía

Los animales son trasladados desde la sala de estabulación a los quirófanos en el mismo estabulario del VHIR. Todos los procedimientos fueron realizados por el mismo cirujano (MVGC).

Una vez el animal es anestesiado mediante el protocolo descrito con anterioridad, se realiza un rasurado de la extremidad inferior izquierda. Antes de iniciar la cirugía se administra una dosis de penicilina G 20.000 UI/kg intramuscularmente (Fig. 32). Una vez el animal es colocado en decúbito supino se procede a realizar la asepsia y antisepsia de dicha extremidad, entallado estéril del campo quirúrgico y apertura del material necesario para realizar la intervención.



Figura 32. Animal rasurado, con el antibiótico administrado y colocación de campos estériles con el objetivo de disminuir el riesgo de infección perioperatoria.

Se realiza una incisión longitudinal en la cara lateral del fémur izquierdo de aproximadamente 4 centímetros, identificando el septo intermuscular entre el vasto lateral y el bíceps femoral. Mediante disección roma se separan ambos compartimentos, dejando el vasto lateral hacia anterior y la musculatura isquiotibial hacia posterior, evitando la lesión de las estructuras neurovasculares cercanas. Una vez se expone la diáfisis femoral, se realiza una desperiostización del tercio medio del fémur y se miden los 5 milímetros que van a ser resecados para crear un defecto óseo y extraer un aloinjerto para otro animal. La osteotomía se realiza a mano alzada mediante el protocolo de obtención del aloinjerto.

Una vez se ha creado el defecto crítico en la diáfisis femoral, se amplía la incisión hacia proximal, con tal de exponer el trocánter mayor. Se introduce la aguja de Kirschner roscada de 1.6 mm de manera retrógrada a modo de clavo endomedular a través del fragmento proximal hasta conseguir pasarla unos 2-3 centímetros. Una vez pasada, colocamos el chuck en el extremo proximal de la aguja para poder pasarla de manera

anterógrada a través del aloinjerto y el fragmento de fémur distal hasta el polo superior de la rótula (Fig. 33).

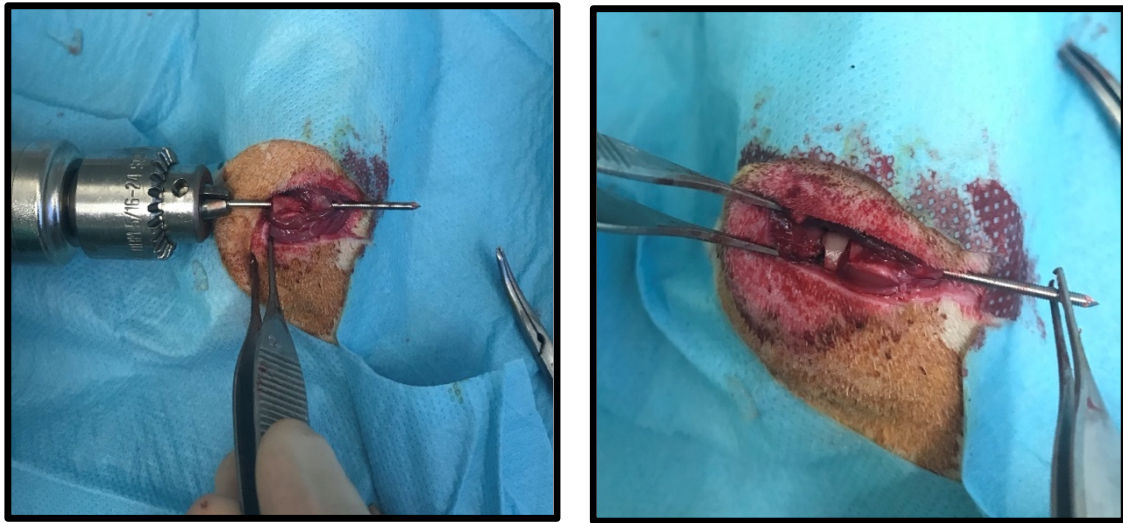


Figura 33. Abordaje femoral izquierdo, donde se aprecia la técnica de reconstrucción del defecto femoral con un aloinjerto intercalar y enclavado endomedular mediante aguja roscada de Kirschner.

Una vez tenemos el montaje realizado, se comprueba la estabilidad de la extremidad y su correcto balance articular. Tras esto, se realiza un lavado con suero fisiológico estéril. Tras dichos pasos, se procede a colocar el producto de biovidrio nanoparticulado, aproximadamente 8 mm^2 , a diferentes concentraciones de fosfato cálcico en función del grupo de estudio del animal, y a cortar la aguja que protruía a nivel proximal mediante un cortafrío (Fig. 34).

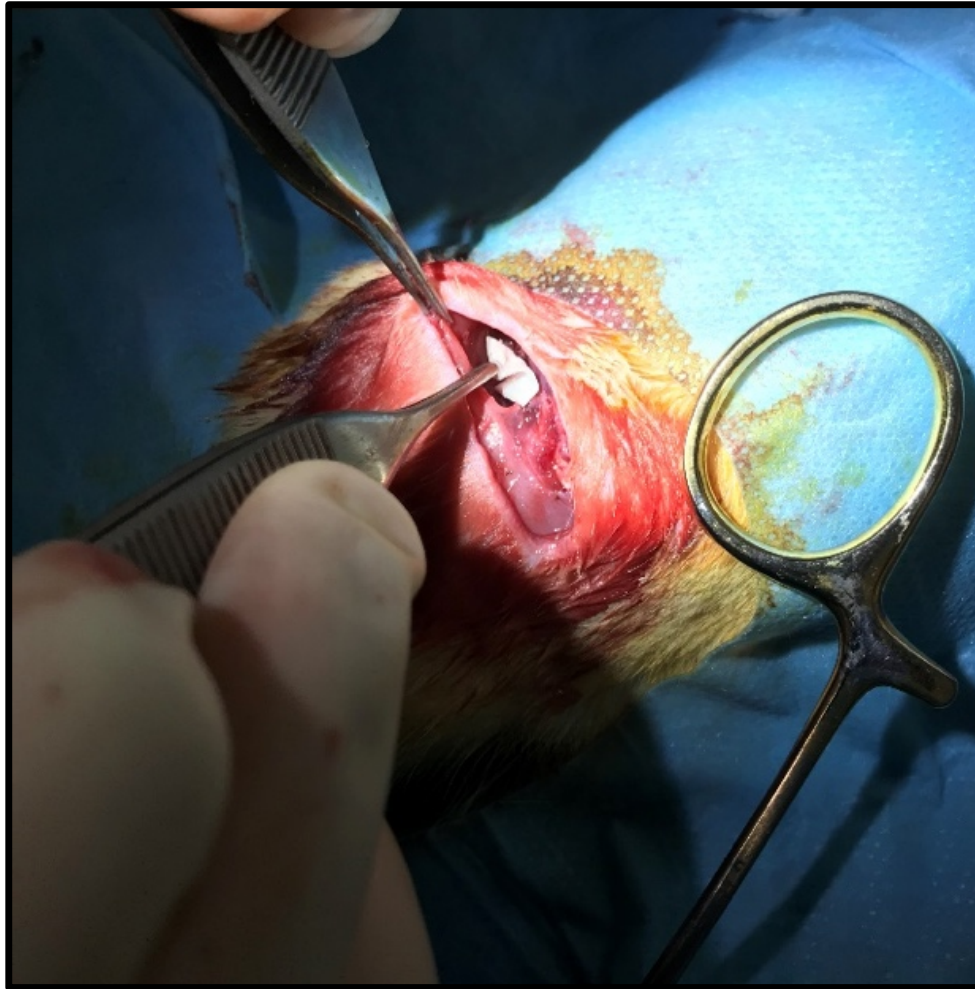


Figura 34. Colocación del producto de biovidrio nanoparticulado sobre el aloinjerto femoral y posterior resección de la aguja que protruye.

Para realizar el cierre, se procede a suturar la fascia muscular y el tejido subcutáneo mediante una sutura reabsorbible de Novosyn® 3.0 (Braun Surgical) y la piel mediante una sutura continua irreabsorbible de Dafilon® 4.0 (Braun Surgical) con cura de povidona yodada (Fig. 35).



Figura 35. Cierre cutáneo de la incisión quirúrgica mediante una sutura continua y su posterior cura.

Eutanasia y obtención de muestras

Las ratas se dividían en cuatro grupos de seguimiento en función del biovidrio introducido encima del aloinjerto (grupo control, grupo control negativo: PLA7038, grupo 20G5 y grupo 20P30). Una vez completadas las 12 semanas tras la cirugía se procedía a sacrificar al animal en los quirófanos experimentales del VHIR. Siguiendo un riguroso protocolo para evitar el sufrimiento de los animales, se realizaba una anestesia general. Una vez se comprobaba que el animal ya estaba completamente anestesiado, se realizaba un rasurado de la zona anterior cervical para poder incidir sobre la piel a través del eje transversal de las clavículas. A continuación, se abordaban el platisma y la musculatura esterno-tiroidea y esterno-mastoidea con el objetivo de localizar el paquete vascular de la arteria carótida común junto al nervio vago. Tras la localización de dicha arteria se procedía a la sección y eutanasia del animal.

Una vez el animal había sido sacrificado, se realizaba una incisión perpendicular al pliegue inguinal según la técnica de Fanaa-Wilgis, para posteriormente levantar el vasto

lateral del fémur a través de una disección del plano submuscular. Una vez identificado todo el fémur, se realizaba un primer análisis visual del estado del aloinjerto y si durante el abordaje se observaban signos de infección. Tras esto, se procedía a la desarticulación de la rodilla para poder ir disecando todo el fémur hasta la cadera y desarticularlo a nivel proximal. Una vez obtenida la muestra se lavaba con una solución salina y se fijaba en formaldehído/formalina tamponada (Fig. 36).



Figura 36. Muestra de fémur de la rata tras 12 semanas postoperatorias, en ella se aprecia el callo óseo formado alrededor del aloinjerto. Se tiene la precaución de eliminar la mayor parte de tejido muscular.

Estudio estadístico

El estudio estadístico fue llevado a cabo por un diplomado postgrado en Estadística de Ciencias de la Salud por la Universidad Autónoma de Barcelona (MVGC). Con el fin de conocer si había diferencias o no estadísticamente significativas entre los diferentes grupos se realizó un estudio estadístico con el programa *Stata®* versión 14.0. En un primer lugar se hizo un análisis estadístico descriptivo de los diferentes grupos, para posteriormente realizar en el caso de las variables cuantitativas para grupos independientes un test de varianzas ANOVA o Krustal-Wallis en función de si cumplían

o no la normalidad. Si se deseaba analizar la relación de los diferentes grupos en función de variables binarias se optó por la prueba de Fisher o Chi-cuadrado. Se determinó un intervalo de confianza del 95%, con un nivel de significación estadística de <0.05 .

Evaluación clínica de variables descriptivas

Todos los animales intervenidos eran registrados según el grupo al que pertenecían y el número de caso correspondiente. Se realizaba un examen físico del animal el día de la cirugía, anotando la fecha y el peso en el mismo momento. De la misma manera, el día de la eutanasia del animal se registraban las mismas variables para poder llevar un control del tiempo y el aumento del peso.

Una vez obtenida la muestra del animal, se realizaba un test clínico de la consolidación del aloinjerto, dando una valoración descriptiva de su estado de consolidación. Se valoraba la presencia de una consolidación aparente y, en el caso de que no se diera dicha consolidación, se valoraba si la pseudoartrosis tenía un origen séptico o aséptico. Además, se analizaba el estado del clavo endomedular, quedando registrado un fallo en la osteosíntesis femoral.

En la misma sección, quedaban anotadas las posibles incidencias que se hubiesen producido durante las 12 semanas de evolución postoperatoria, es decir, si el animal presentaba algún tipo de lesión o reacción, o bien si fallecía sin motivo aparente.

Evaluación mediante microtomografía computarizada

Todas las muestras femorales fueron analizadas mediante microtomografía computarizada en la Plataforma de Imagen Molecular del VHIR. Dicho centro tiene el modelo de microCT Quantum[®] Fx (Perkin Elmer) que está especialmente diseñado para animal de laboratorio (ratón y rata), y que aporta información anatómica y funcional. El equipo permite obtener imágenes de alta resolución (máximo 10 micrómetros) en un tiempo de captura muy corto (estudio estándar de 17 segundos), lo que incrementa el rendimiento del equipo. Este tipo de microCT es muy útil para valorar biomateriales y su posible integración en los tejidos biológicos. Además, se obtienen imágenes de tejidos óseos de gran calidad que permiten al investigador detectar pequeños cambios en las muestras (Fig. 37).



Figura 37. Recreación tridimensional de la cabeza y cuello femorales en una oveja, en un modelo de daño óseo y regeneración tisular realizada en el VHIR con el microCT.

Una vez obtenidas las imágenes radiológicas en formato DICOM, el radiólogo de patología osteoarticular de nuestro centro (MDA) analizó las muestras mediante el programa Syngo.via Siemens® para obtener una puntuación en una escala ordinal de las variables consolidación proximal y distal (0 = ausencia de consolidación, 1 = mínimos puentes óseos, 2 = moderados puentes óseos y 3 = consolidación completa). También se registró en forma de variables dicotómicas la fractura del aloinjerto y la osteolisis periimplante (0 = presencia y 1 = ausencia).

Marcaje mediante marcadores fluorescentes

Con el objetivo de poder realizar un seguimiento del proceso de mineralización de nuestras muestras, se fueron realizando diferentes marcajes en el tiempo (12 semanas). En nuestro caso se realizó un marcaje mediante tinciones fluorescentes que se unen al calcio mediante un proceso de quelación: *Oxytetraciline* 25 mg/kg (Engemicina, MSD Animal Health®) y *Calcein Green* 20 mg/kg (Calcein, C0875 Sigma-Aldrich®).

Todos los animales recibieron una dosis de *Oxytetraciline* intramuscular el día de la cirugía. Posteriormente, los animales fueron marcados a las 4 y 8 semanas con *Calcein Green* (Fig. 38).



Figura 38. Secuencia de marcate de los animales con flourocromos.

Microscopía de fluorescencia

El estudio de microscopía de fluorescencia se realizó en los servicios científico técnicos de la Universidad de Barcelona (MBM). Este estudio se llevó a cabo con el fin de poder observar si los diferentes nanovidrios asociados a las fibras de ácido poliláctico ejercían un papel en la integración ósea del aloinjerto femoral. Aprovechando los diferentes marcajes fluorescentes, que a través del proceso de quelación se unen al calcio, se puede objetivar la formación de hueso en el tiempo y su patrón de formación. Para poder realizar la microscopía de fluorescencia las muestras son cortadas en el plano sagital del fémur mediante una sierra *Exakt 300®* (EXAKT Vertriebs, Alemania) (Fig. 39), obteniendo así dos mitades.



Figura 39. Sierra de diamante de alta precisión *Exakt 300®* (EXAKT Vertriebs, Alemania).

Tras el corte, se realiza un proceso de deshidratación de los fémures extraídos mediante etanol cuya duración aproximada es de 20 días. Una vez realizado el proceso de deshidratación se debe pasar a la fase de inclusión mediante resina *Tecnovit 7200VLC* (*Leica Biosystems®*). Tras la obtención de los bloques de resina, estos deben ser pulidos hasta conseguir una superficie lisa. Una vez ya disponemos de las muestras para ser analizadas a través del microscopio de fluorescencia, deben aplicarse diferentes filtros de longitud de onda en función del marcaje que queramos observar: 365-490 nm para la *Oxytetraciline* y 436-495 nm para el *Calcein Green*. Se seleccionaron varias muestras para poder realizar un *stitching*, que consiste en obtener imágenes de alta resolución y unir las para conseguir una imagen panorámica del objeto de estudio.

Microscopía electrónica de barrido

Para realizar el estudio de microscopía electrónica de barrido contamos con la colaboración del equipo de microscopía electrónica de barrido de los servicios científico técnicos de la Universidad de Barcelona (JGV). Tras el estudio mediante microscopía de fluorescencia, las muestras incluidas en resina fueron recubiertas con carbono grafito mediante *sputtering*, que es un proceso que consiste en la pulverización catódica, es decir, se produce la vaporización de los átomos de un material sólido denominado "blanco" mediante el bombardeo de este por iones energéticos, creando así una fina película sobre el lecho que nos interesa (Fig. 40). En el departamento de la Universidad de Barcelona se dispone de un microscopio electrónico de barrido FIB/SEM (*Focused Ion Beam – Secondary Electron Microscope*) modelo *JSM-6510 Series Scanning Electron Microscope* (JEOL®, Tokio, Japón) (Fig. 41). A través de la emisión de electrones, el microscopio es capaz de obtener imágenes mediante electrones secundarios, que reflejan la superficie del material o retrodispersados, que penetran en el bloque y son captados por un detector en ángulo, que es capaz de obtener imágenes de elementos pesados (por ejemplo: el cálcico, como en el hueso o los dientes; o bien, materiales metálicos). En nuestro caso, las muestras se analizaron con un potencial de 20 KV y a una distancia de trabajo de 20 mm, con magnificaciones múltiples de 25 aumentos para poder observar la mayor área posible.

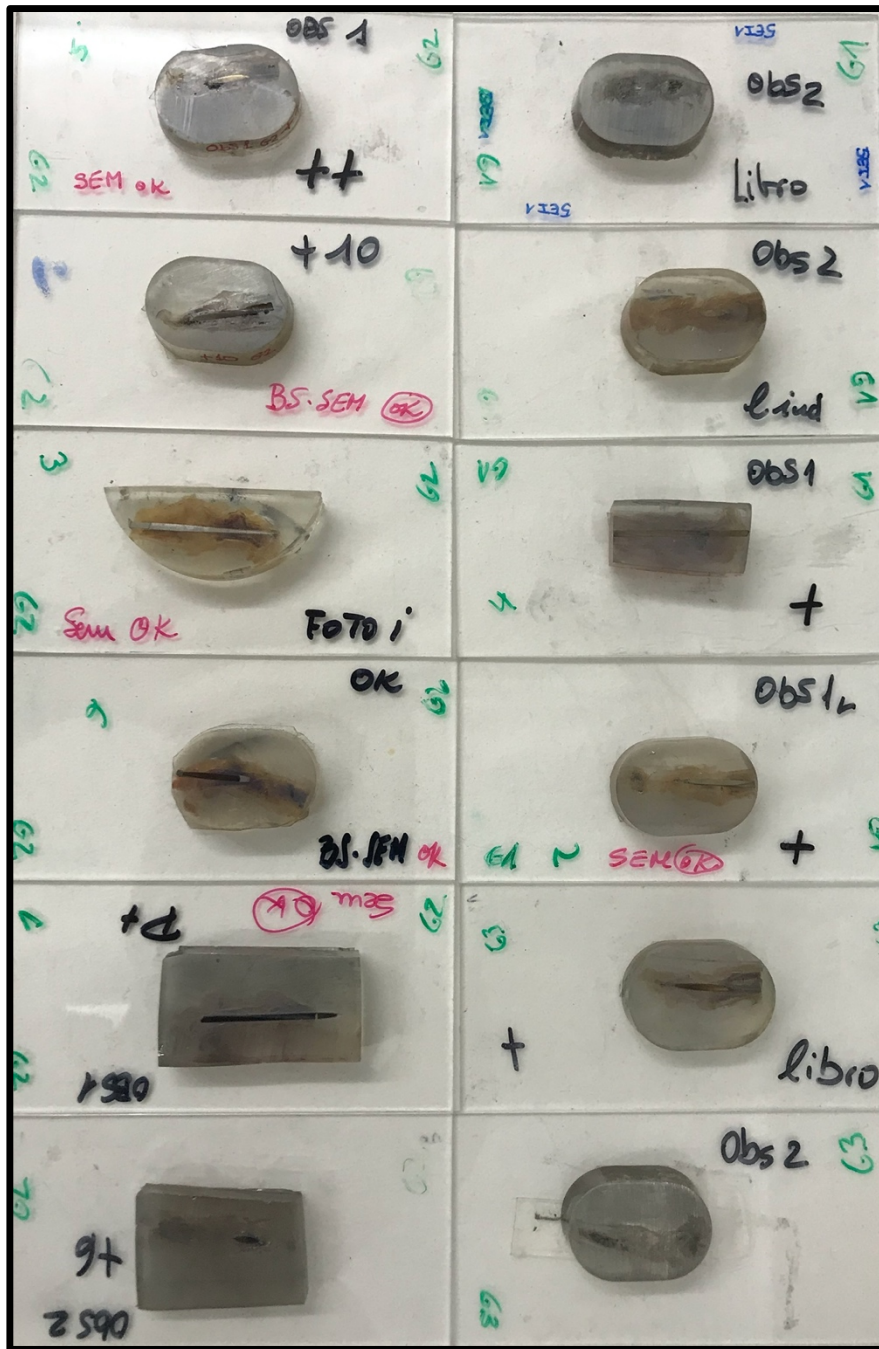


Figura 40. Muestras tratadas para ser observadas bajo microscopía electrónica de barrido. Estas son incluidas en resina y recubiertas con carbono grafito mediante sputtering.

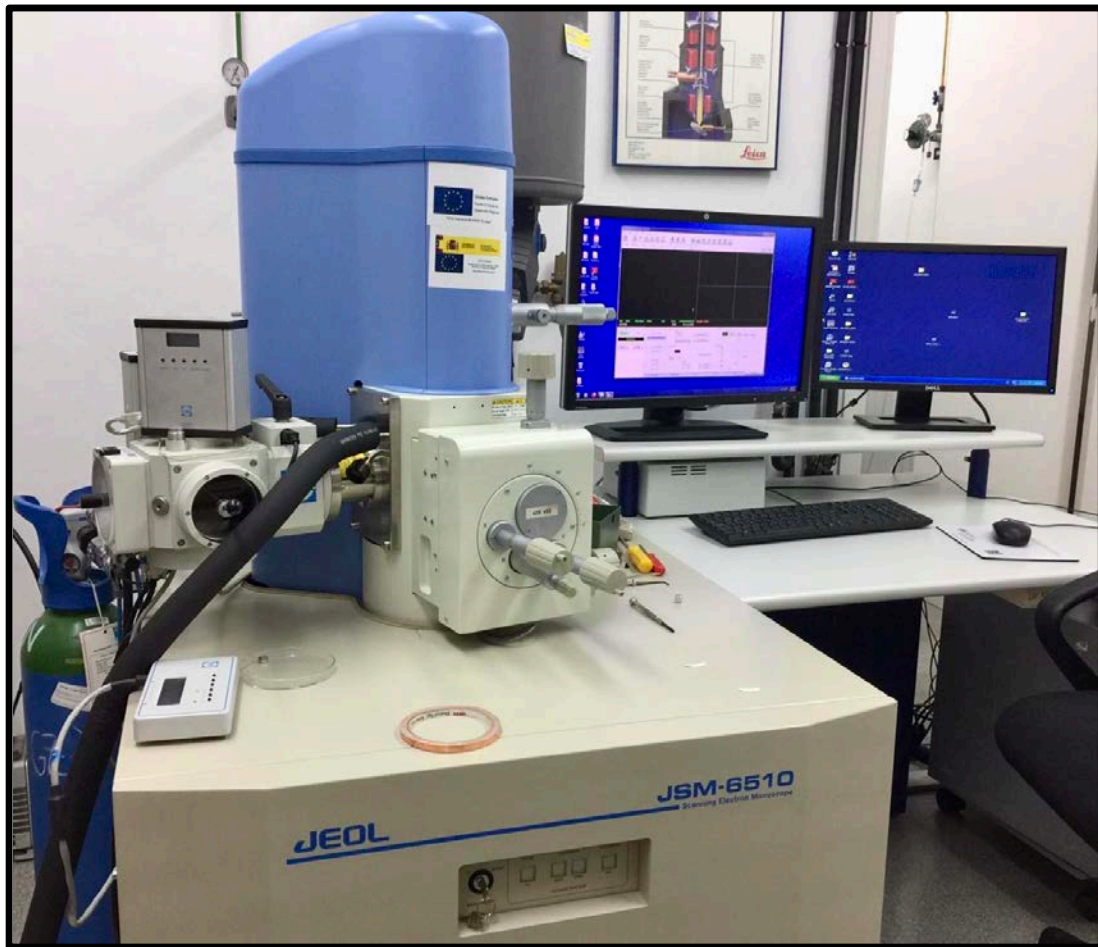


Figura 41. Microscopio electrónico de barrido FIB/SEM (*Focussed Ion Beam – Secondary Electron Microscope*) modelo *JSM-6510 Series Scanning Electron Microscope* (JEOL®, Tokio, Japón).

Análisis histológico

Las muestras de fémur obtenidas del proceso experimental se analizaron en la Unidad de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona. Se realizó un estudio independiente de la histología de las muestras en comparación con los resultados de microscopía de fluorescencia y de barrido (CMC).

Se seleccionaron 5 muestras de cada grupo con tal de tener una representación suficiente de los fémures extraídos a las 12 semanas. En una primera fase, se realizó un pulido mediante papel SiC de granulometría P4000, ya que las muestras estaban recubiertas por carbono para poder realizar la microscopía electrónica. Para realizar este pulido se usó una pulidora *Exakt 400CS®* (EXAKT Vertriebs, Alemania) (Fig. 42).



Figura 42. Pulidora Exakt 400CS® disponible en el departamento de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona (H. U. de Bellvitge).

Cuando las muestras ya estaban pulidas debían ser adheridas a una placa de histología de polimetilmetacrilato (PMMA) mediante un proceso de fotopolimerización a través de luz ultravioleta. Tras dicho proceso se procedió a realizar cortes <1 mm de grosor con la ayuda de una sierra *Exakt 300®* (EXAKT Vertriebs, Alemania) con banda refrigerada. Una vez obtenidas las laminas de 1 mm de grosor aproximadamente, éstas fueron pulidas de nuevo para llegar a espesores de unos 50 μm , ya que debían ser tratadas mediante una tinción de Tricrómico de Masson Goldner. Al igual que otras tinciones tricrómicas, es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I, donde se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras. Las coloraciones tricromas nos dan la oportunidad de poder visualizar de forma selectiva fibras musculares, fibras colágenas, fibrina y eritrocitos por el empleo combinado de tres soluciones colorantes diferentes. La selección de los colorantes empleados, que se diferencian por su tamaño molecular, produce una coloración diferente en cada uno de los distintos componentes

tisulares. La tinción de Masson-Goldner ofrece la ventaja de que el método puede realizarse con material fijado en formol.

Previa tinción nuclear con hematoxilina férrica de Weigert, se tiñen los componentes tales como musculatura, citoplasma y eritrocitos con azofloxina y solución de anaranjado G. Seguidamente, se tiñe el tejido conectivo con solución de verde luz SF. Una vez las muestras estaban teñidas se montaban en un montaje *DPX Surgipath®* (Leica, Suiza) para poder ser observadas bajo un microscopio óptico *Olympus® BX41* (Fig. 43).



Figura 43. Microscopio óptico *Olympus® BX41* usado para observar las muestras histológicas de los fémures de rata.

En cada muestra se analizó histológicamente la presencia de inflamación y si había neoformación ósea tanto en el extremo proximal como en el distal entre el aloinjerto y el extremo femoral del animal. También se analizó la angiogénesis del tejido extraído, especialmente en las zonas de interés (osteotomías).

RESULTADOS

Evaluación clínica

Grupo A: Control

- Ningún animal presentó una complicación intraoperatoria, ni reacción adversa a la anestesia.
- Ningún animal presentó complicaciones graves durante el postoperatorio, ni durante las 12 semanas de seguimiento.
- Dos ratas presentaron una dehiscencia de la herida quirúrgica que requirió un desbridamiento, ambas dentro de la primera semana postoperatoria, sin presentar nuevas incidencias.
- Todas las ratas presentaron un pelaje suave, sin alteraciones cutáneas o signos de sufrimiento/estrés del animal.
- Ningún animal presentó alteraciones de la conducta o automutilaciones.
- No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radiológico.

Grupo B PLA7038: Control negativo

- Ningún animal presentó una complicación intraoperatoria, ni reacción adversa a la anestesia.
- Ningún animal presentó complicaciones graves durante el postoperatorio, ni durante las 12 semanas de seguimiento.
- Ninguna rata presentó una dehiscencia de la herida quirúrgica.
- Un animal presentó signos de estrés o sufrimiento.
- El mismo animal sufrió un episodio de automutilación.
- Se objetivó la movilización de un clavo endomedular en el control radiológico, coincidiendo con el animal de la automutilación.

Grupo C 20G5: 44.5% CaO - 44.5% P2O5 - 6% Na2O - 5% TiO2

- Ningún animal presentó una complicación intraoperatoria, ni reacción adversa a la anestesia.
- Una rata fue exitus a las dos semanas postoperatorias, sin objetivarse una causa aparente.
- Ninguna rata presentó una dehiscencia de la herida quirúrgica.
- Todas las ratas presentaron un pelaje suave, sin alteraciones cutáneas o signos de sufrimiento/estrés del animal.
- Ningún animal presentó alteraciones de la conducta o automutilaciones.
- No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radiológico.

Grupo D 20P30: 70% CaO - 30% P2O5

- Ningún animal presentó una complicación intraoperatoria, ni reacción adversa a la anestesia.
- Se objetivaron dos exitus sin motivo aparente, uno a los dos días postoperatorios y el otro a la semana.
- Ninguna rata presentó una dehiscencia de la herida quirúrgica.
- Todas las ratas presentaron un pelaje suave, sin alteraciones cutáneas o signos de sufrimiento/estrés del animal.
- Ningún animal presentó alteraciones de la conducta o automutilaciones.
- No se objetivó ningún caso de movilización del implante en el control radiológico.

Peso

Todos los animales fueron pesados en dos momentos del estudio: antes de la cirugía, una vez se había realizado la técnica anestésica, y justo antes de ser sacrificados para la obtención de las muestras de anatomía patológica.

Todos los animales presentaron un incremento progresivo del peso, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (Tabla 1) (Gráfico 1).

	Inicial	Final
Grupo A	374	629
Grupo B	387	627
Grupo C	428	624
Grupo D	399	613

Tabla 1. Distribución de los pesos inicial y final de los diferentes grupos de experimentación (gramos).

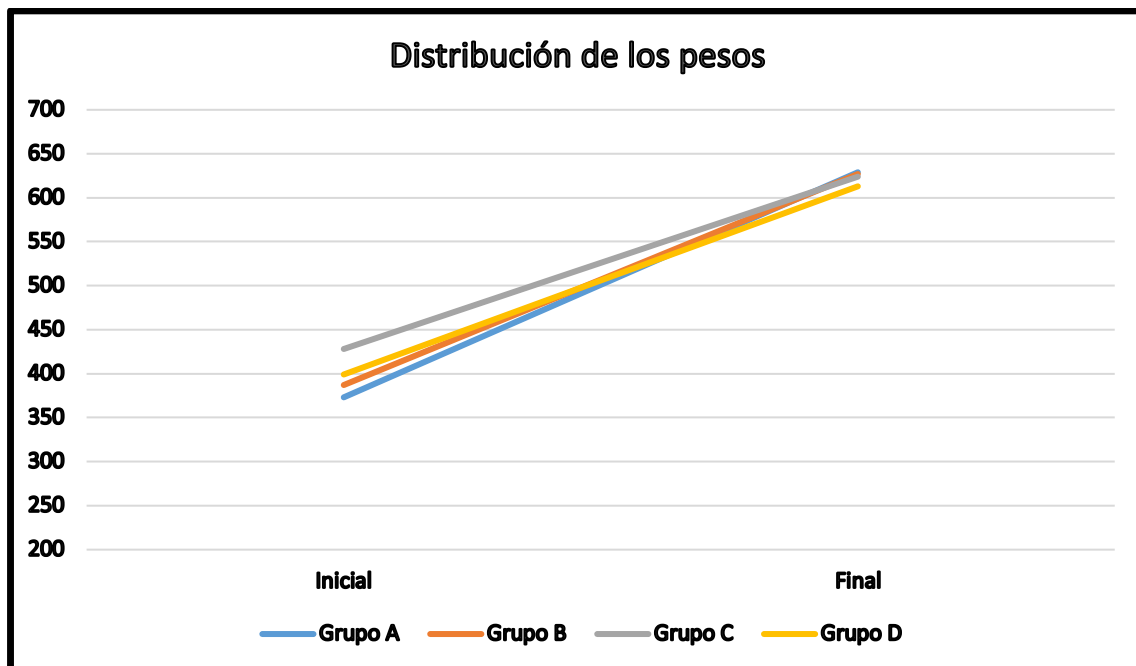


Gráfico 1. Evolución temporal de los pesos medios por grupo. En todos ellos se puede observar el aumento progresivo y homogéneo del peso.

Supervivencia

Por lo que refiere al análisis de supervivencia de los diferentes grupos de experimentación, encontramos tres animales que fallecieron antes de llegar al final del estudio (12 semanas). De estos tres animales, uno pertenece al grupo C (20G5), y los otro dos al grupo D (20P30). El animal del grupo C falleció a las dos semanas de la cirugía, mientras que los dos exitus del grupo D fueron a los 2 días y una semana respectivamente (Gráfico 2).

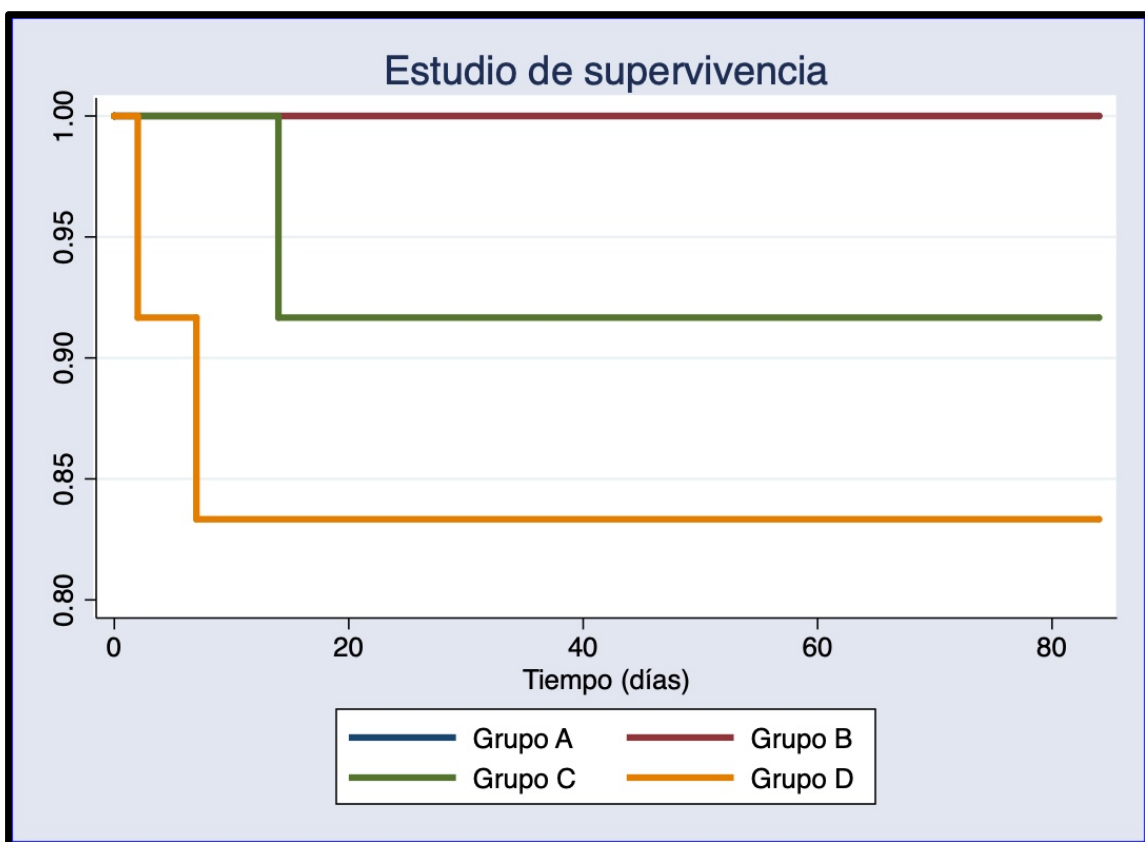


Gráfico 2. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los diferentes grupos de estudio, en el que se observan los 3 eventos (exitus). Tanto el grupo A como B presentaron una supervivencia del 100%.

Evaluación clínica del aloinjerto

En todos los animales se realizó un análisis clínico de aloinjerto en el momento de la extracción del fémur. Este análisis consistía en valorar por parte del doctorando la

sospecha de pseudoartrosis aséptica y séptica, la movilización del implante y el posible grado de consolidación.

Grupo A: Control

- En tres de los sujetos se apreció la movilización del implante tras el abordaje lateral de fémur.
- En todos los casos, excepto en uno, se evidenció una pseudoartrosis del aloinjerto, donde 6 eran sépticas y 5 asépticas.
- Uno de los doce casos presentó una aparente consolidación proximal.

Grupo B PLA7038: Control negativo

- Uno de los sujetos presentó una movilización del implante tras el abordaje lateral de fémur.
- En 11 de 12 casos se evidenció una pseudoartrosis del aloinjerto, donde 8 eran sépticas y 4 asépticas.
- Uno de los doce casos presentó una aparente consolidación proximal.

Grupo C 20G5: 44.5% CaO - 44.5% P2O5 - 6% Na2O - 5% TiO2

- Dos de los sujetos presentaron una movilización del implante tras el abordaje lateral de fémur.
- Dos casos presentaron una pseudoartrosis, una aséptica y otra séptica.
- Siete de los casos presentaron algún signo de consolidación, ya fuera proximal, o bien, distal. En este grupo hubo un exitus.

Grupo D 20P30: 70% CaO - 30% P2O5

- Ninguno de los sujetos presentó una movilización del implante tras el abordaje lateral de fémur.
- Dos casos presentaron una pseudoartrosis, una aséptica y otra séptica.

- En todos los casos, excepto en dos, se apreció algún signo de consolidación. Hay que recordar que en este grupo hubo dos exitos.

	Movilización implante	Pseudoartrosis	Consolidación
Grupo A	3/12	11/12	1/12
Grupo B	1/12	11/12	1/12
Grupo C	2/11	2/11	7/11
Grupo D	0/10	2/10	8/10

Tabla 2. Análisis clínico de las muestras de fémur extraídas de los diferentes grupos. Se valoraron tres parámetros principales: la movilización del implante, la pseudoartrosis y la consolidación.

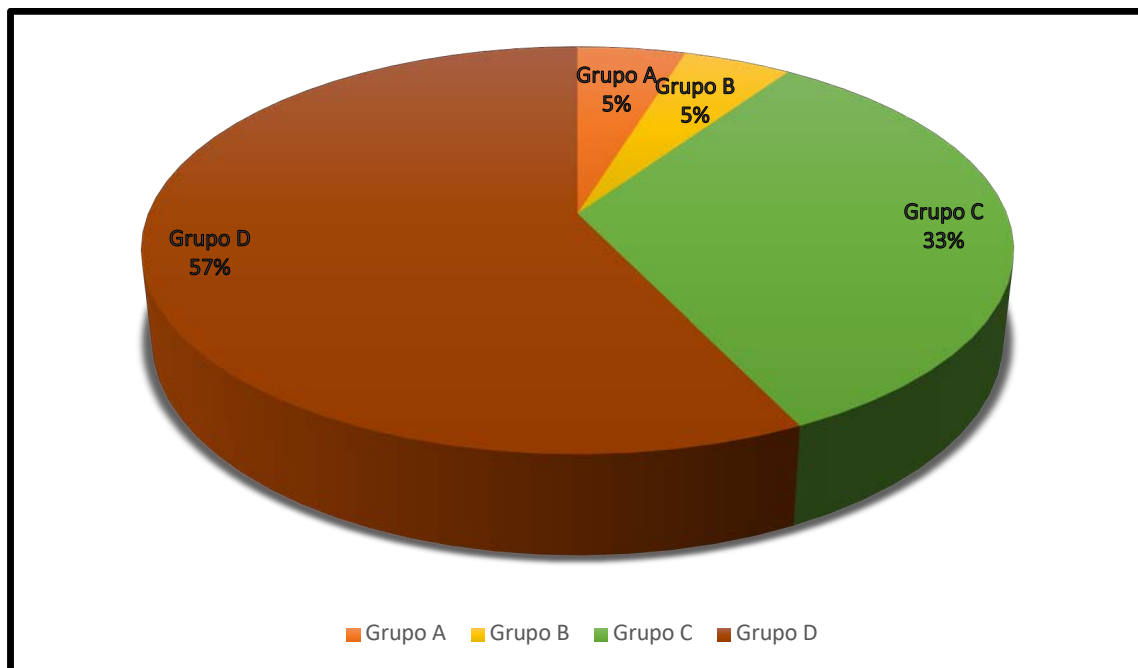


Gráfico 3. Se representa en valores absolutos el número de muestras que presentaron algún signo de consolidación clínica. Véase como destacan los grupos C y D, que corresponden a los animales a los cuales se les administró el producto del estudio.

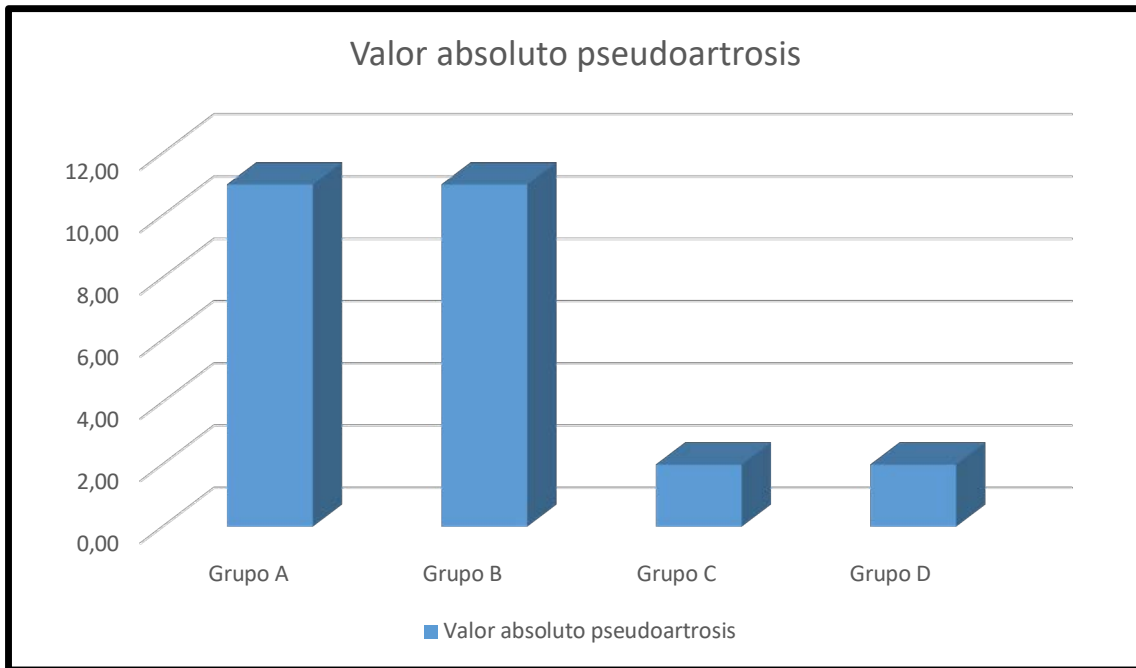


Gráfico 4. Valores absolutos del número de muestras que presentaron una pseudoartrosis. Pese a un menor número de sujetos en el grupo C y D, debido al exitus de 1 y 2 casos respectivamente, se observa una amplia diferencia entre los grupos.

Evaluación radiológica mediante microtomografía computarizada

El estudio de microCT evaluó: consolidación proximal, consolidación distal, fractura del aloinjerto y osteolisis periimplante. En la figura 44 se muestra una imagen representativa del estudio de microCT, el cual se realizó en todos los casos que se estudiaron. Véanse los diferentes cortes realizados por el microCT, con su posterior reconstrucción en los 3 planos del espacio para poder estudiar los parámetros seleccionados (Fig. 44).

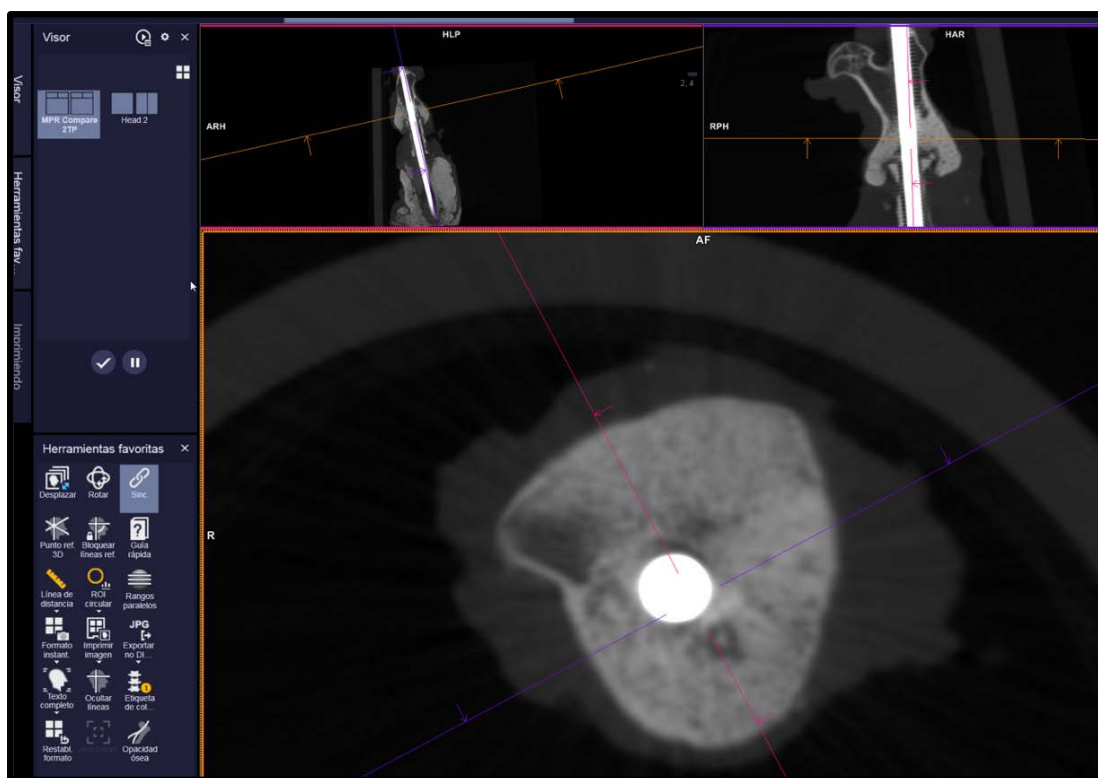


Figura 44. Imagen del programa *Syngo.via Imaging Advanced® Siemens* (Erlangen, Alemania) para el estudio de la tomografía axial computarizada de los fémures de las ratas de estudio.

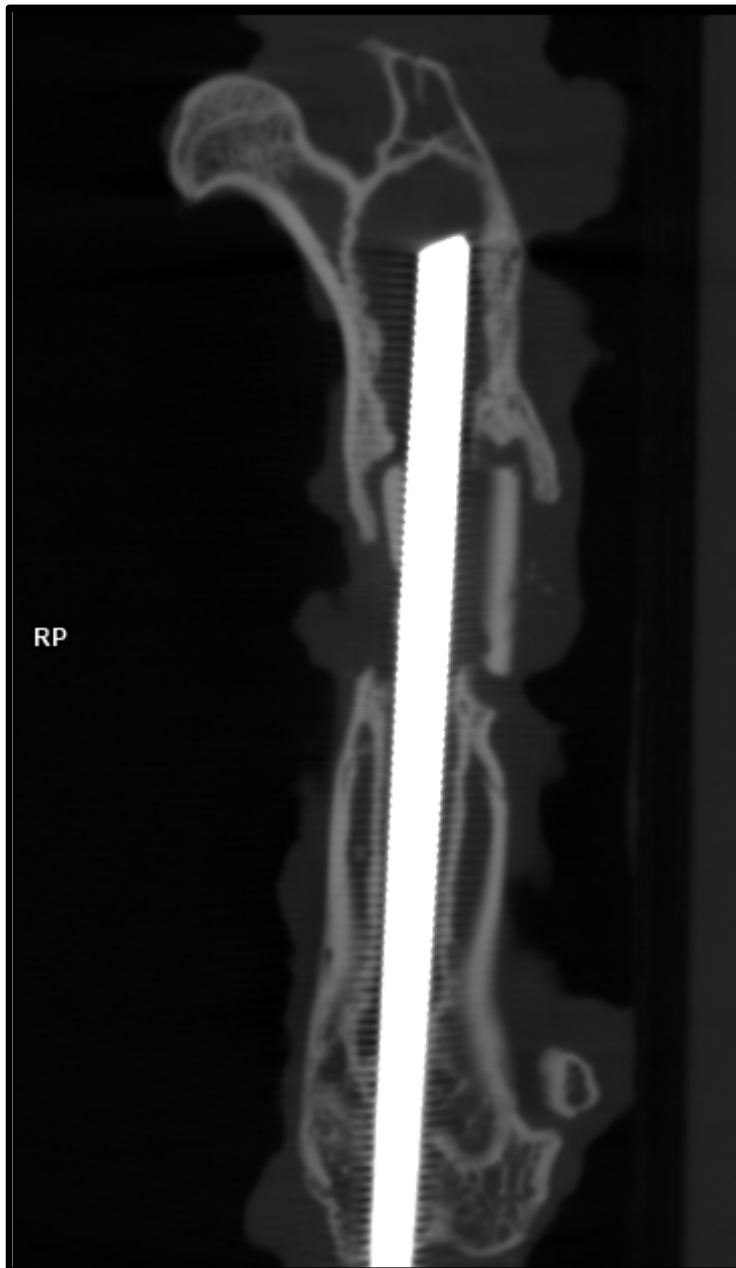


Figura 45. MicroCT del grupo B (control negativo), se aprecia una correcta posición del implante endomedular, con una síntesis estable del aloinjerto. Podemos observar la falta de consolidación, sin poder apreciar puentes óseos entre ambas osteotomías. En dicho caso se observa una leve osteolisis periimplante.

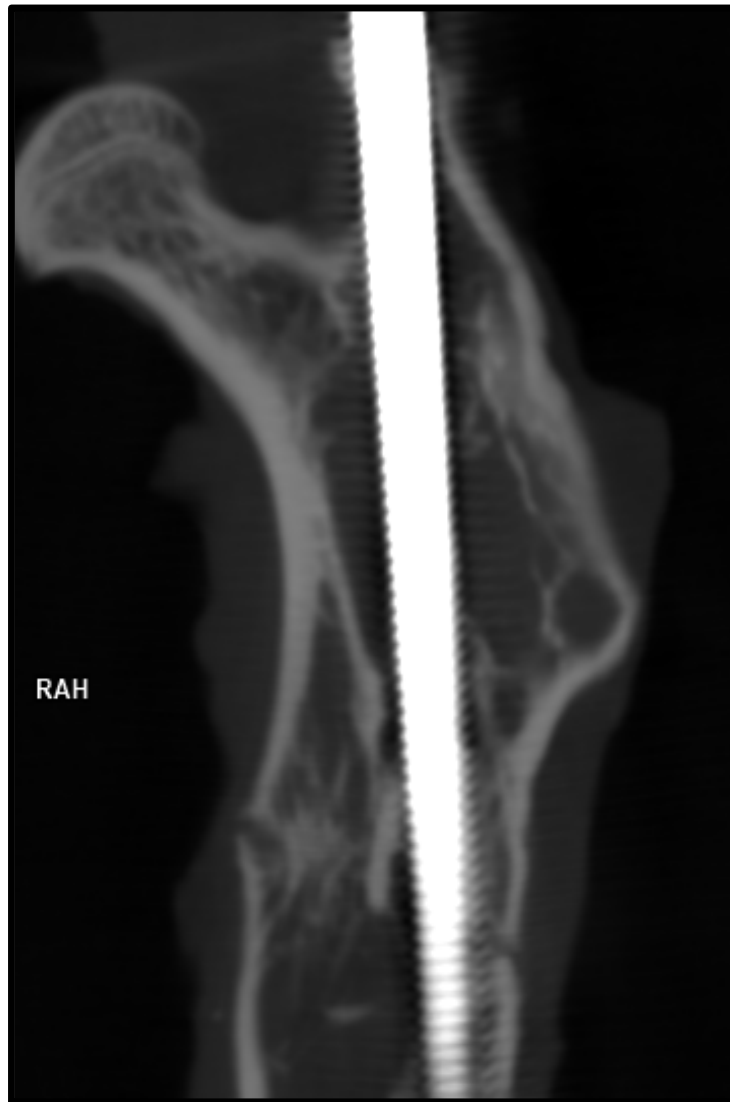


Figura 46. MicroCT grupo C (20G5), se pueden apreciar los signos de consolidación de la osteotomía proximal, con una integración del aloinjerto. En el centro de la imagen resalta el clavo endomedular en su correcta posición, con una leve osteolisis periimplante proximal.



Figura 47. MicroCT grupo D (20P30), en esta imagen se aprecia la consolidación de las dos osteotomías con su integración del aloinjerto. No se aprecia osteolisis periimplante, con su correcta posición.

La consolidación se evaluó mediante una puntuación que se acordó previamente:

Pseudoartrosis 0, Mínimos puentes óseos 1, Moderados puentes óseos 2, Consolidación 3.

Por lo que refiere a la fractura del aloinjerto y la osteolisis periimplante se evaluó mediante una respuesta dicotómica:

Fractura 0, Sin Fractura 1

Osteolisis 0, Sin osteolisis 1

En la Tabla 3 se analizan las medias e intervalos de confianza (IC) de las puntuaciones obtenidas en los diferentes grupos de estudio.

	Consolidación proximal	Consolidación distal	Fractura aloinjerto	Osteolisis periimplante
Grupo A	0.16 (-0.16 / 0.50)	0.08 (-0.08 / 0.25)	0.5 (0.19 / 0.8)	0.08 (-0.08 / 0.25)
Grupo B	0.25 (-0.11 / 0.61)	0.08 (-0.08 / 0.25)	0.16 (0.19 / 0.80)	0.66 (0.38 / 0.95)
Grupo C	1.27 (0.6 / 1.9)	0.45 (-0.04 / 0.95)	0.45 (0.13 / 0.77)	0.81 (0.57 / 1.0)
Grupo D	1.2 (0.47 / 1.9)	0.9 (0.26 / 1.5)	0.5 (0.16 / 0.83)	0.9 (0.69 / 1.1)

Tabla 3. Medias e IC de los diferentes parámetros evaluados mediante microCT. Las puntuaciones de la consolidación van desde los 0 puntos hasta los 3 puntos. Por lo que refiere a la fractura del aloinjerto y la osteolisis periimplante su rango va desde 0 a 1 punto.

Consolidación proximal

Se realizó el estudio estadístico mediante un test no paramétrico de *Kruskal-Wallis* con tal de evaluar las diferencias estadísticas entre los diferentes grupos. Primero realizamos un análisis conjunto de todos los grupos, para más tarde poder analizar si encontramos diferencias entre las diferentes poblaciones de estudio. En el análisis conjunto se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias, $p = 0.0038$ (Fig. 48), pero debemos analizar entre qué grupos se encuentran las diferencias.


```
. kwallis Consolidaciónosteotomíaproxima, by(GRUPO)

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

GRUPO	Obs	Rank Sum
A	12	198.00
B	12	215.00
C	11	326.00
D	10	296.00

```

chi-squared = 10.070 with 3 d.f.
probability = 0.0180

chi-squared with ties = 13.406 with 3 d.f.
probability = 0.0038

```

Figura 48. Estudio de Kruskal-Wallis entre todos los grupos, se observa que hay diferencias estadísticamente significativas por lo que refiere a las tasas de consolidación de la osteotomía proximal.

Si analizamos las posibles diferencias entre el grupo A y el grupo B, ambos grupos control, es decir, en el grupo A no se administró ningún tipo de producto y en el grupo B se introdujo la fibra de ácido poliláctico sin biovidrio (control negativo), observamos que no hay diferencias entre ambos, $p = 0.58$ (Fig. 49).

```
. kwallis Consolidaciónosteotomíaproxima if GRUPO==1 | GRUPO==2, by(GRUPO)

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

GRUPO	Obs	Rank Sum
A	12	144.50
B	12	155.50

```

chi-squared = 0.101 with 1 d.f.
probability = 0.7508

chi-squared with ties = 0.306 with 1 d.f.
probability = 0.5804

```

Figura 49. Estudio de diferencias entre los dos grupos control, los grupos A y B. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Cuando analizamos si existen diferencias entre el grupo B (control negativo) y el grupo C (20G5), encontramos que sí que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos, con un valor de $p = 0.016$ (Fig. 50). Esto nos lleva a pensar que el producto del grupo C, el 20G5, compuesto por 44.5% CaO - 44.5% P2O5 - 6% Na2O - 5% TiO2, tiene una influencia positiva a nivel de la consolidación proximal del aloinjerto.

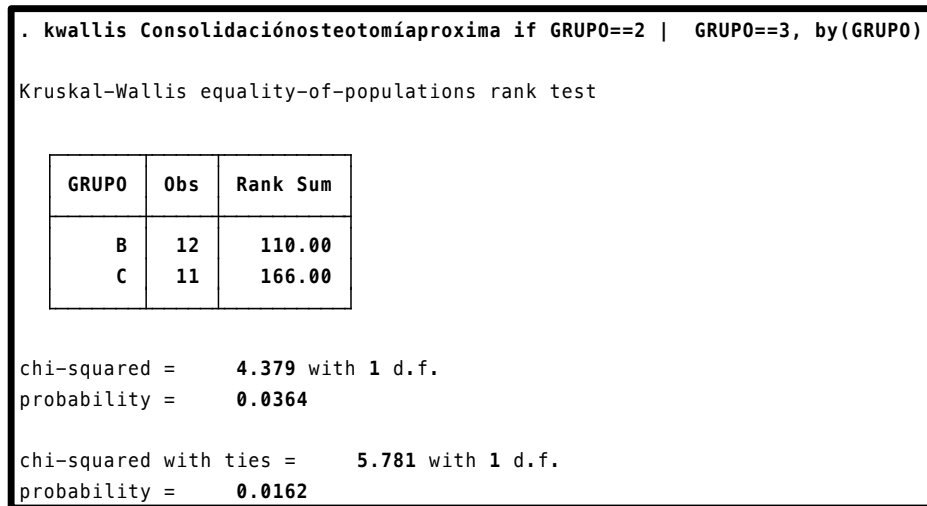


Figura 50. Estudio entre el grupo B (control negativo) y el grupo C (20G5), encontrando diferencias estadísticamente significativas.

Cuando analizamos si existen diferencias a nivel del grupo B y el grupo D (20P30), encontramos, a través de la prueba de Kruskal-Wallis, que sí que existen diferencias estadísticamente significativas, $p = 0.0154$. Por lo tanto, también podemos deducir el efecto positivo del producto que contiene 70% CaO - 30% P2O5 (Fig. 51).

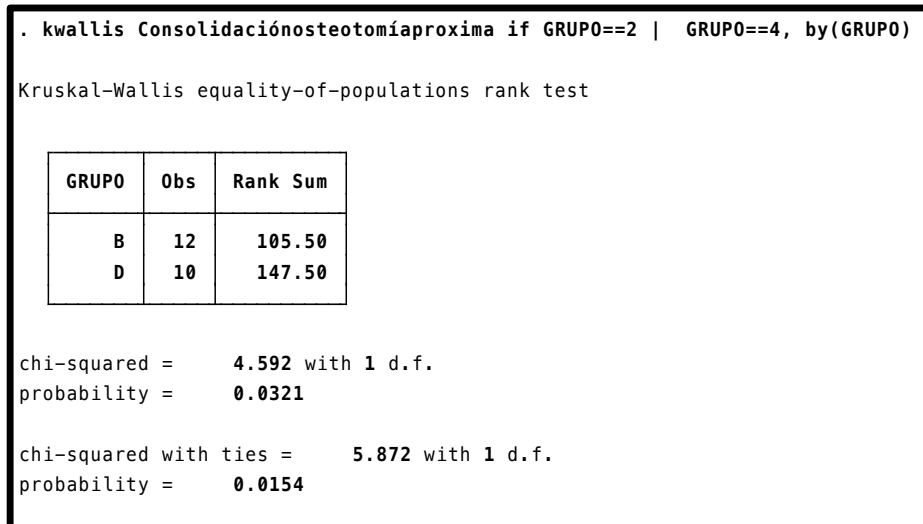


Figura 51. Estudio entre los grupos B y D, observándose que hay diferencias entre ambas medias.

Por último, se realizó un estudio entre los grupos C y D, los dos grupos que contenían producto a estudiar, para poder discernir si existían diferencias entre ellos en la tasa de consolidación proximal. En la figura siguiente se puede apreciar que no se encontraron diferencias entre ellos (Fig. 52).

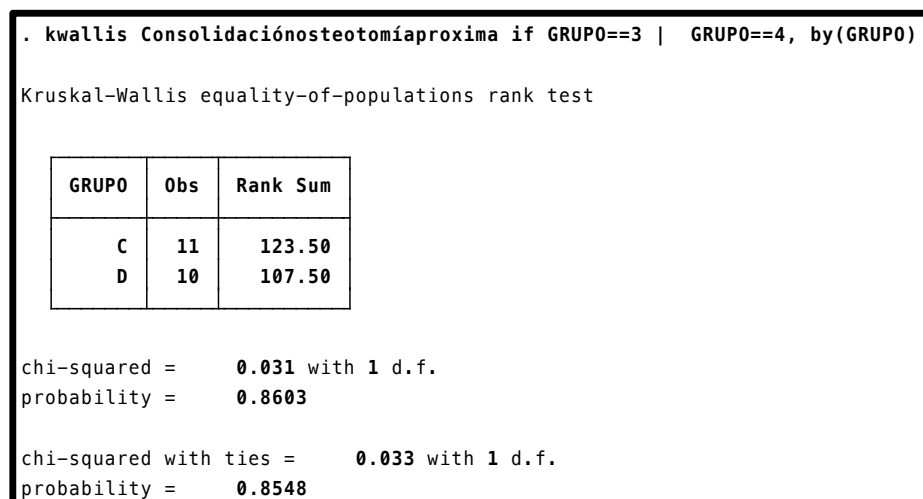


Figura 52. Estudio entre los grupos C y D, no encontrando diferencias estadísticamente significativas.

Consolidación distal

Se llevó a cabo el mismo tipo de estudio que el realizado para la consolidación proximal, donde en la tabla 4 se expone a modo de resumen el estudio de Kruskal-Wallis realizado a través de la puntuación obtenida en el microCT. A diferencia de la consolidación proximal, en este caso sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos A y B con el D.

	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Grupo A	No DES p = 1	No DES p = 0.2	DES p = 0.01
Grupo B		No DES p = 0.2	DES p = 0.01
Grupo C			No DES p = 0.21

Tabla 4. Estudio de Kruskal-Wallis de las medias de la consolidación distal entre los diferentes grupos. Sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas (DES) cuando se compararon los grupos control (A y B) con el grupo D (20P30).

Fractura aloinjerto

Cuando nos ponemos a analizar las posibles diferencias respecto a la fractura del aloinjerto entre los grupos que estudiamos, inicialmente se realiza una tabla de contingencia (Fig. 53).

. tab GRUPO Fracturadelaloinjerto			
Grupo	Fractura del aloinjerto		Total
	0.00	1.00	
A	6	6	12
B	10	2	12
C	6	5	11
D	5	5	10
Total	27	18	45

Figura 53. Tabla de contingencia Grupo / Fractura aloinjerto

Tras realizar la tabla de contingencia debemos analizar si se cumple el supuesto de que menos del 20% de las celdas tengan frecuencias esperadas menores a 5 para poder realizar una prueba de Chi cuadrado, por lo que se realiza el siguiente estudio (Fig. 54).

. tab GRUPO Fracturadelaloinjerto, exp

Key			
	<i>frequency</i>		
	<i>expected frequency</i>		
Grupo	Fractura del aloinjerto		Total
	0.00	1.00	
A	6 7.2	6 4.8	12 12.0
B	10 7.2	2 4.8	12 12.0
C	6 6.6	5 4.4	11 11.0
D	5 6.0	5 4.0	10 10.0
Total	27 27.0	18 18.0	45 45.0

Figura 54. Estudio de las frecuencias esperadas para ver si se cumple el supuesto necesario para realizar la prueba de Chi cuadrado. En él se observa que no se cumple dicho supuesto, por lo que se decide realizar una prueba exacta de Fisher.

Dado que no se cumple el supuesto necesario para poder realizar una prueba de Chi cuadrado, decidimos realizar una prueba exacta de Fisher (Fig. 55). En dicha prueba no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, $p = 0.282$.

```

. tab GRUPO Fracturadelaloinjerto, exact
Enumerating sample-space combinations:
stage 4: enumerations = 1
stage 3: enumerations = 5
stage 2: enumerations = 23
stage 1: enumerations = 0

```

Grupo	Fractura del aloinjerto		Total
	0.00	1.00	
A	6	6	12
B	10	2	12
C	6	5	11
D	5	5	10
Total	27	18	45

Fisher's exact = 0.282

Figura 55. Prueba exacta de Fisher para detectar diferencias entre los grupos a nivel de fractura del aloinjerto. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Osteolisis periimplante

Cuando analizamos la posible implicación del producto en la osteolisis periimplante, realizamos un estudio similar al que se llevó a cabo en la fractura del aloinjerto. En un primer momento se realiza una tabla de contingencia para posteriormente poder realizar un estudio de las frecuencias esperadas. En este caso, al igual que en la fractura del aloinjerto, tampoco se cumple el supuesto para realizar una prueba de Chi cuadrado, por lo que se decidió hacer un test exacto de Fisher (Fig. 56). En este caso encontramos que sí que existen diferencias estadísticamente significativas, pero en un primer momento no sabemos entre qué grupos, por lo que se decide realizar el mismo test comparando cada uno de los grupos con el resto. Una vez discernimos dónde se encuentran las diferencias, podemos decir que el grupo A presenta una diferencia de medias estadísticamente significativa ($p = 0.01-0.04$) con respecto a los grupos B, C y D.

```

. tab GRUPO Osteolisisperiimplante, exact

Enumerating sample-space combinations:
stage 4: enumerations = 1
stage 3: enumerations = 10
stage 2: enumerations = 57
stage 1: enumerations = 0

```

Grupo	Osteolisis periimplante		Total
	0.00	1.00	
A	11	1	12
B	4	8	12
C	2	9	11
D	1	9	10
Total	18	27	45

Fisher's exact = 0.000

Figura 56. Prueba exacta de Fisher para el estudio de la osteolisis periimplante. Se detectan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Evaluación mediante microscopía de fluorescencia

En el estudio mediante microscopía de fluorescencia se pueden observar áreas de color azul correspondientes a la *Oxytetraciclina* 25 mg/kg (Engemicina, MSD Animal Health) que se administró en el postoperatorio inmediato, y áreas de color verde que corresponden a la administración de *Calcein Green* 20 mg/kg (Calcein, C0875 Sigma-Aldrich) a las 4 y 8 semanas (Fig. 57).

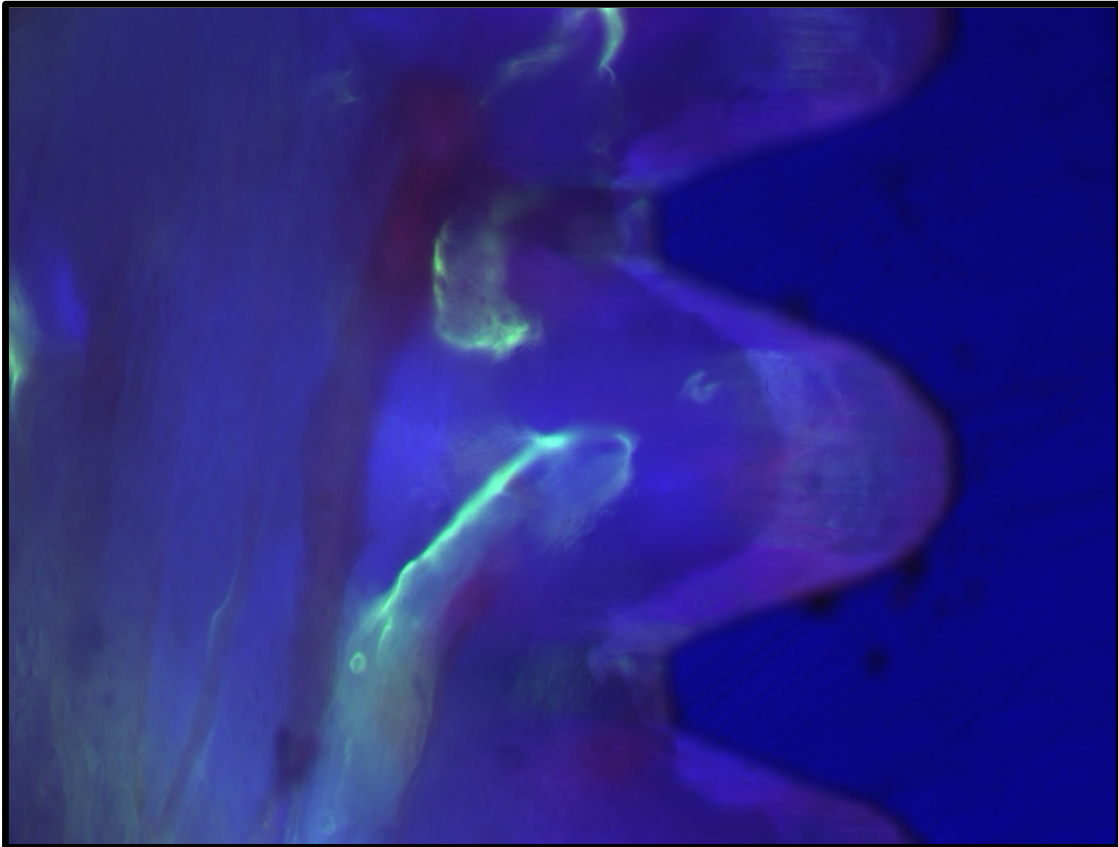


Figura 57. Imagen de microscopía de fluorescencia (x100 aumentos) que se obtuvo de una muestra del grupo C (20G5), donde se pueden apreciar de manera evidente las bandas de *Calcein Green*, informando del patrón y velocidad de crecimiento. La aposición ósea es mucho más estructurada que en los grupos control A y B.

Se evaluaron 16 muestras en total, 4 por cada uno de los grupos de estudio. En los grupos control nos encontramos ante un patrón de crecimiento/maraje desestructurado (Fig. 58), sin ser lineal, que contrasta con los grupos experimentales, donde se observa un patrón mucho más lineal y estructurado.

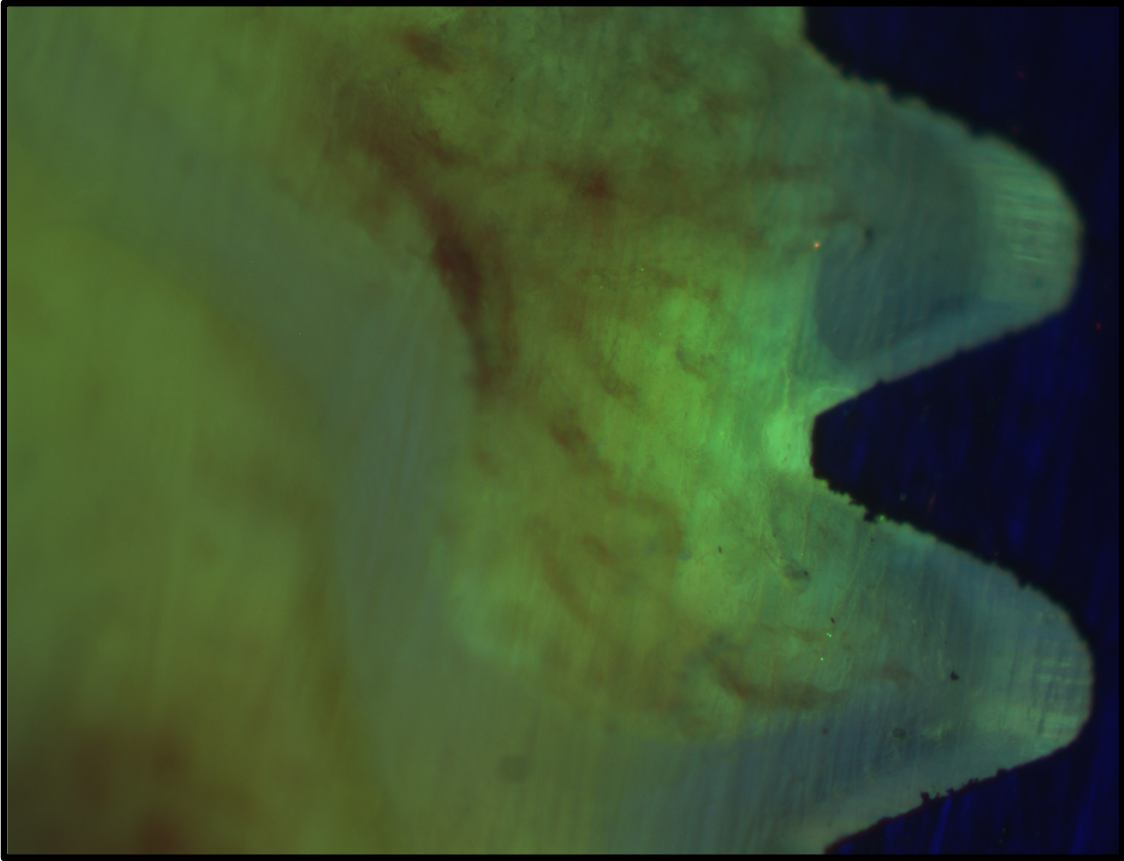


Figura 58. Imagen de microscopía de fluorescencia (x100 aumentos) que se obtuvo de una muestra del grupo B (Control negativo). En ella se puede observar un patrón abigarrado, sin clara neoformación ósea, siendo difícil la observación de las bandas de fluorescencia, lo cual nos sugiere la falta de aposición de nuevo calcio.

En el grupo experimental se observó una aposición más sincrónica, un tejido mucho más organizado, que nos lleva a pensar que se está produciendo un crecimiento óseo efectivo (Fig. 59). El uso de fluorocromos nos permite evaluar el proceso de formación ósea *in vivo*, pudiendo analizar la velocidad de crecimiento (Fig. 60).

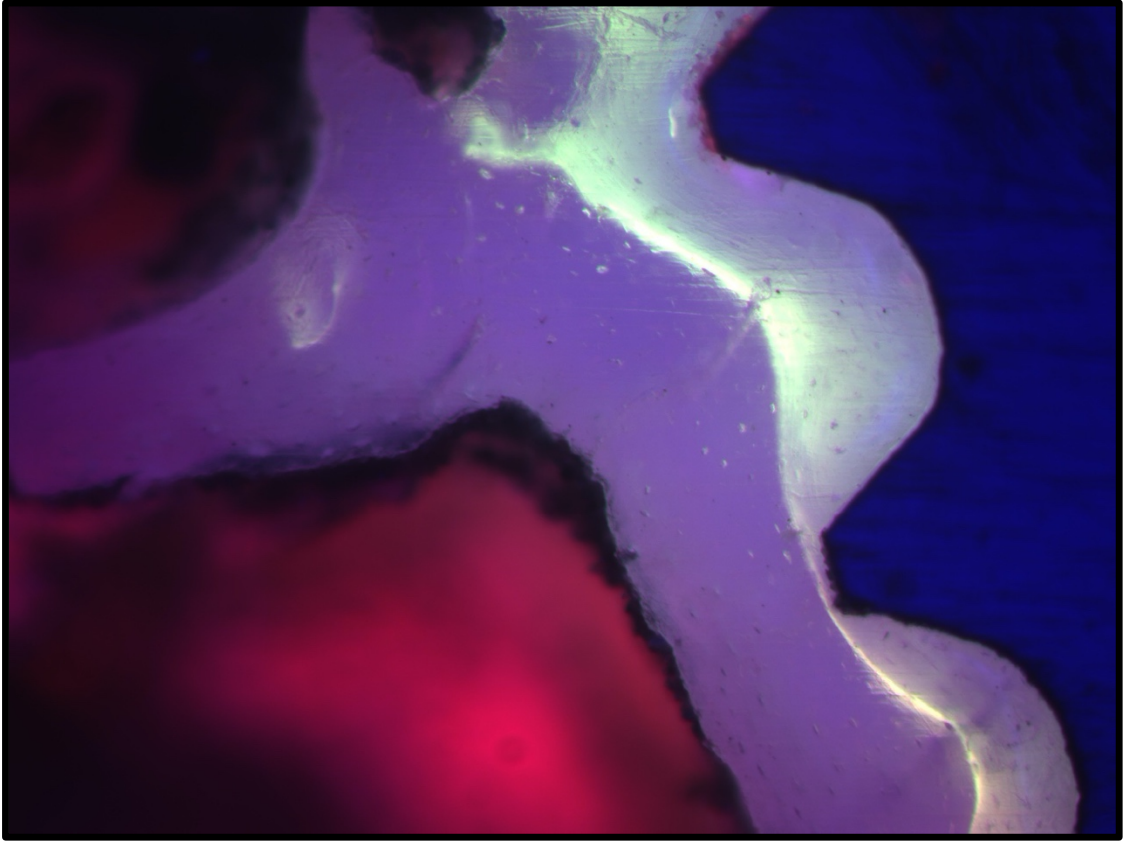


Figura 59. Imagen de microscopía de fluorescencia (x100 aumentos) que se obtuvo de una muestra del grupo D (20P30). En ella resaltan las bandas lineares del marcaje fluorescente, indicativas de un crecimiento organizado propio de una neoformación ósea estructurada si éste es comparado con la imagen anterior del grupo control. La estructura del tejido óseo muestra la linealidad característica del hueso laminar, con lagunas celulares alargadas y estrechas colocadas en bandas, en las que el marcador fluorescente permite reconocer un patrón continuado y coherente de crecimiento de hueso maduro. La imagen en el ángulo superior izquierdo sugiere además una remodelación con osteonas de tipo haversiano del tejido más cercano a la cortical preexistente.

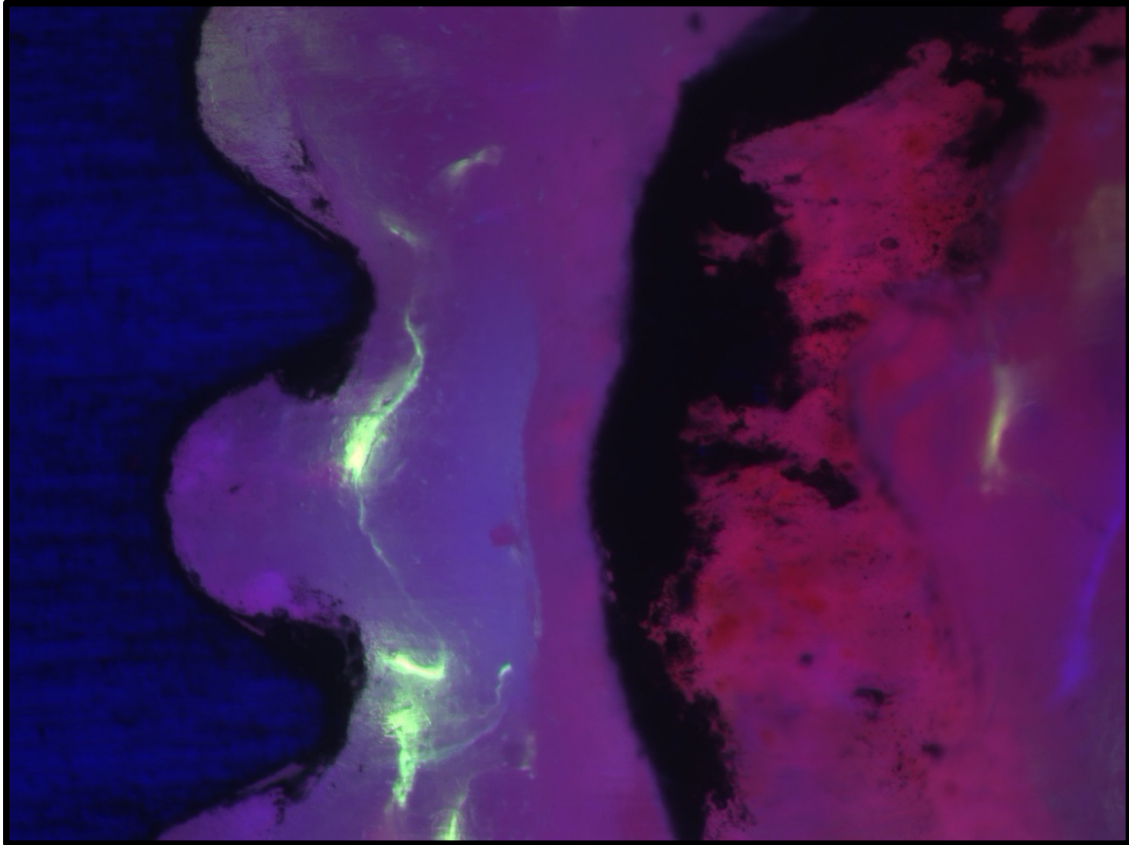


Figura 60. Imagen del grupo D (20P30) (x100 aumentos) en la que podemos observar la disposición de diversas bandas de marcaje. Esto nos permite evaluar otro punto del estudio, como se comentó con anterioridad, la posibilidad de poder calcular la tasa de aposición ósea, conociendo el tiempo en el que se administraron los marcajes y midiendo la cantidad de tejido entre ambos marcajes.

Evaluación mediante microscopía electrónica de barrido

El estudio mediante microscopía electrónica de barrido se realizó a las 16 muestras que ya se habían analizado previamente en la microscopía de fluorescencia. Como hemos comentado anteriormente, se seleccionaron 4 muestras por grupo de estudio.

En este tipo de microscopía, las imágenes se muestran en una escala de grises, por lo que se puede deducir que los colores más cercanos al blanco presentan una mayor densidad, lo que también corresponde a una mayor calcificación cuando se trata del hueso. Por lo contrario, los tejidos con tonos más cercanos al negro son tejidos menos densos, es decir, menos mineralizados e inmaduros (Fig. 61).

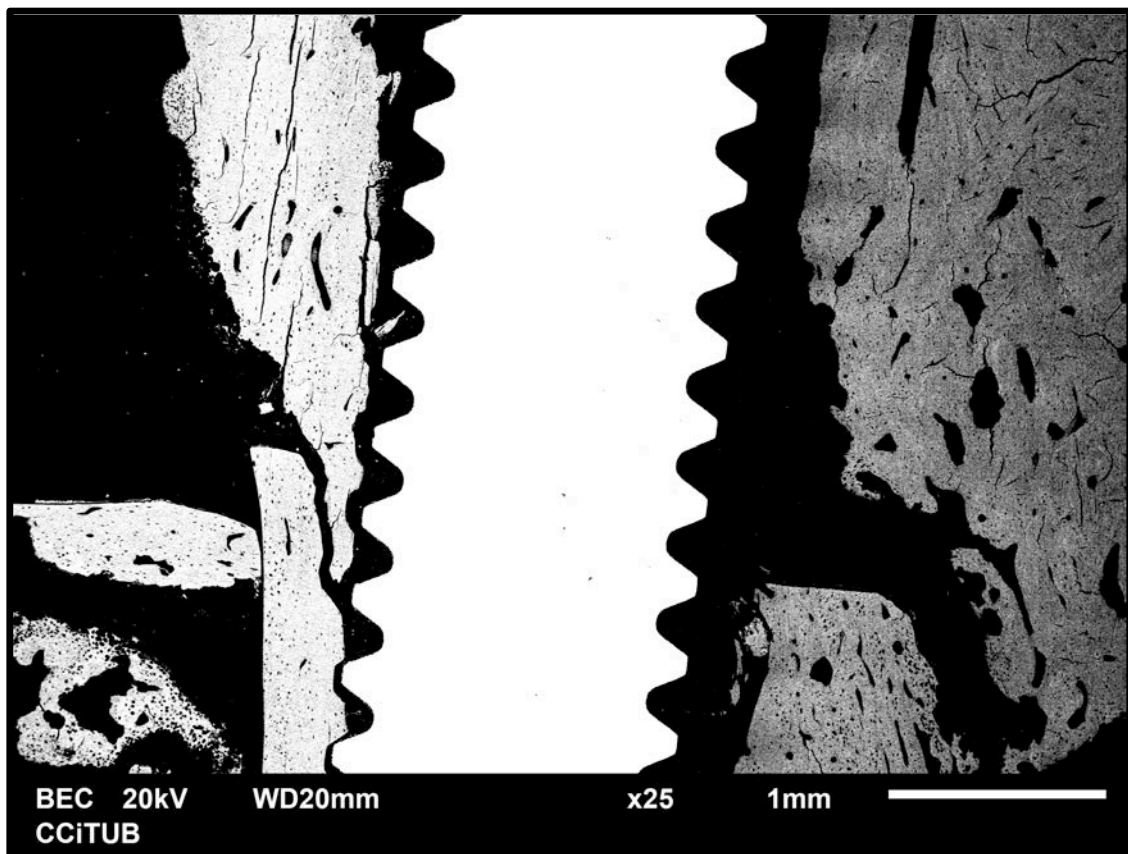


Figura 61. Imagen del estudio donde se aprecia una visión general de todos los componentes de la zona de interés a x25 aumentos. En el centro de la imagen (blanco) se aprecia el clavo roscado, a sus lados podemos observar la zona de osteotomía proximal donde en la parte superior encontramos el hueso del huésped y en la parte inferior podemos ver el aloinjerto. Según su densidad presentan diferentes tonos en la escala de grises.

En las imágenes de los grupos control se observa un tejido óseo desorganizado por parte del huésped en la zona de las osteotomías, sin ningún indicio de intentar vascularizar el aloinjerto, que se presenta como un tejido óseo maduro desvitalizado. En esta imagen se aprecia poca actividad si lo comparamos con los grupos experimentales (Fig. 62).

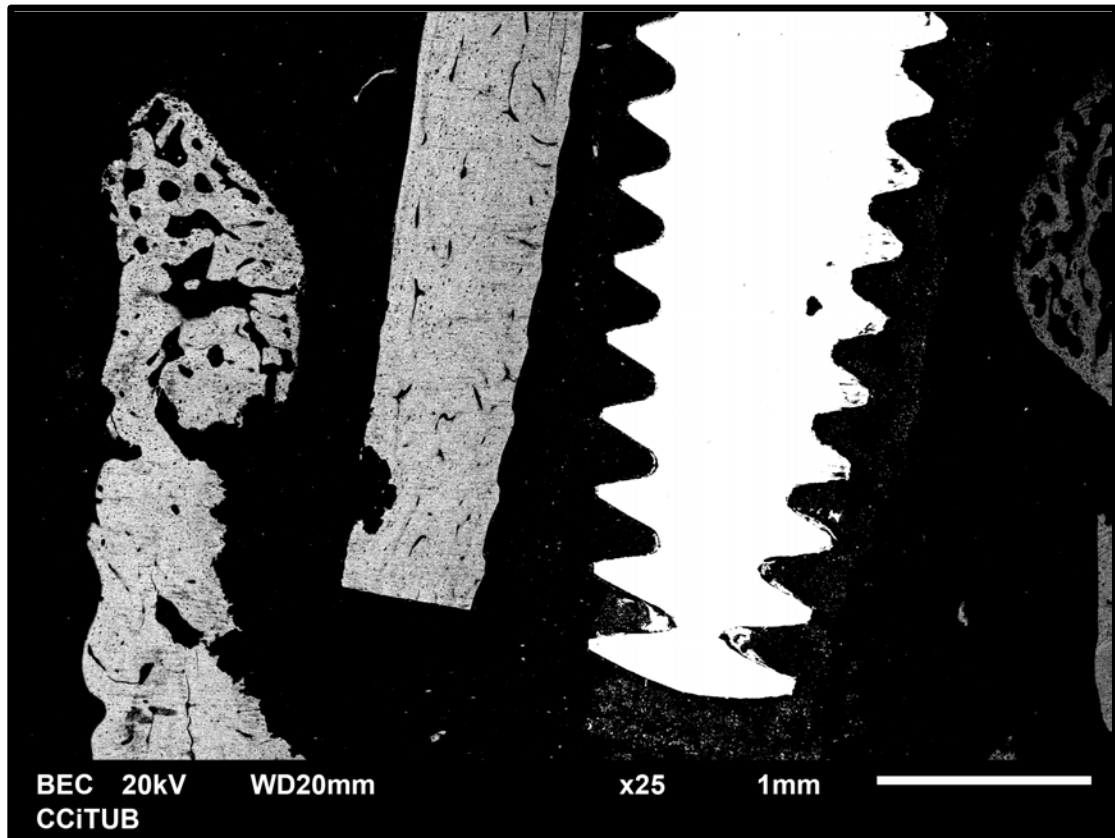


Figura 62. Imagen del grupo B (control negativo) a x25 aumentos. En esta imagen se observa en la zona central el clavillo endomedular; a la izquierda de éste se encuentra el aloinjerto completamente desvitalizado con aspecto de hueso maduro, donde podemos ver un ataque osteoclástico en su zona más distal. En la parte más lateral de la imagen podemos ver la zona de fémur nativo, con cierta actividad neoforrmativa, pese a ello es evidente la falta de unión o de intento de integración por parte del huésped sobre el aloinjerto.

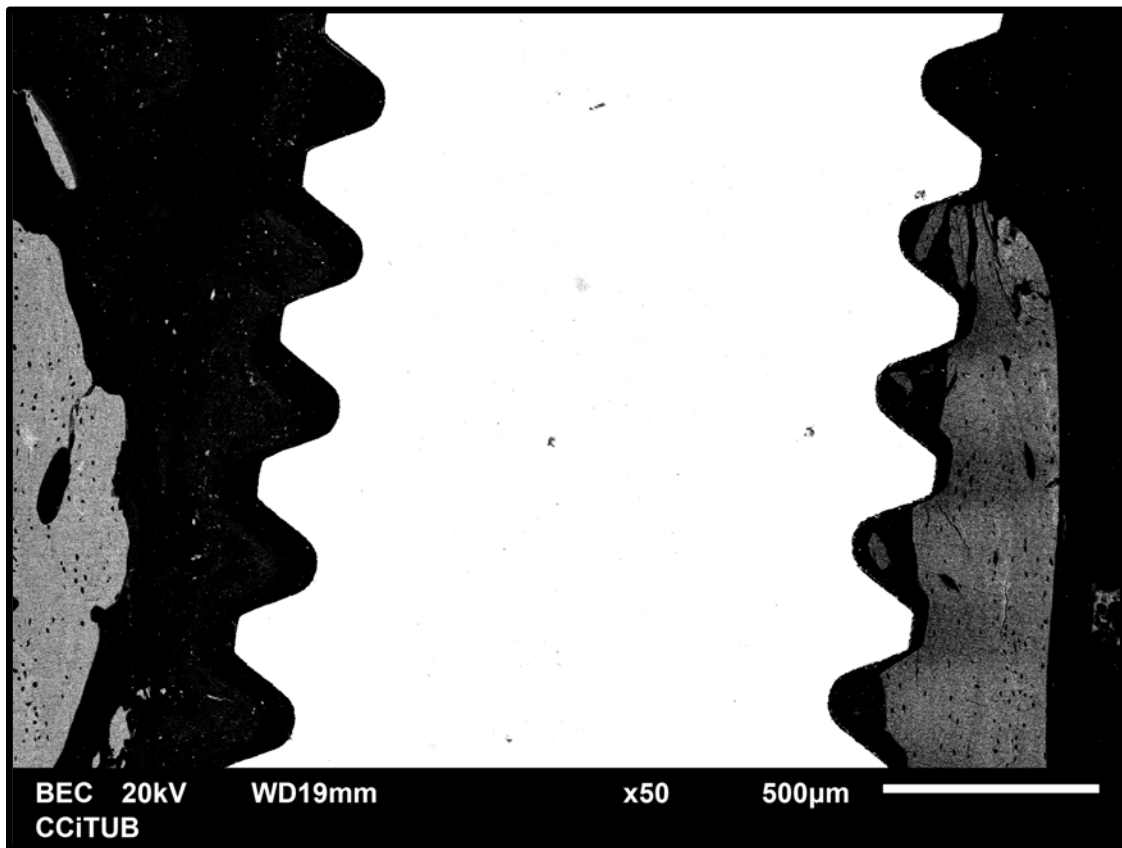


Figura 63. Imagen a x50 aumentos del grupo B (control negativo), donde podemos observar que, pese a una aceptable estabilidad del aloinjerto (derecha de la imagen), éste no presenta ningún signo de vitalidad.

Cuando observamos las muestras de los grupos C y D (grupos experimentales), se pueden observar indicios y signos de una actividad angiogénica y osteoformadora en la interfase fémur-aloinjerto, es decir, signos de intentar integrar dicho aloinjerto. Es cierto que el tiempo de evolución (12 semanas) es insuficiente para poder apreciar una integración completa del aloinjerto, pero en las muestras del grupo experimental se aprecia una mayor actividad proliferativa si éstas se comparan con las imágenes del grupo experimental (Fig. 64).

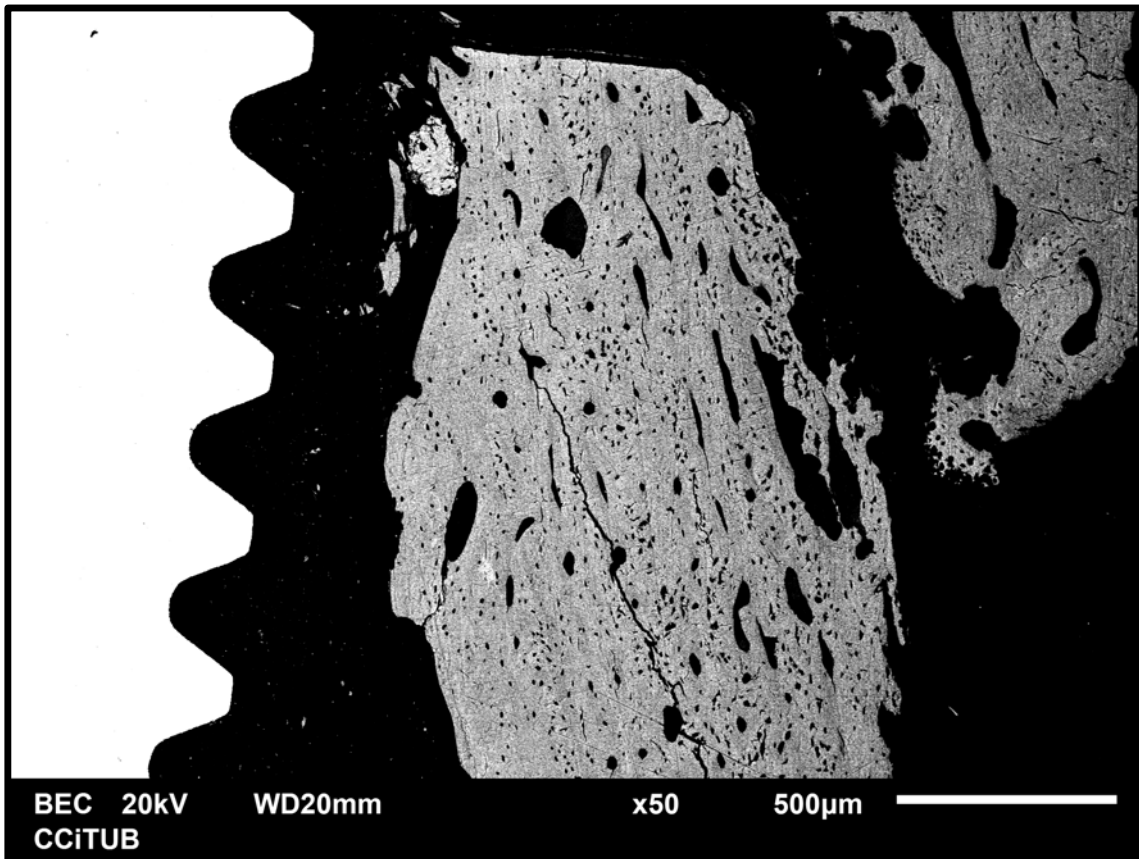


Figura 64. Imagen de microscopía de barrido del grupo experimental C a x50 aumentos. En ella podemos observar un aloinjerto con cierta vitalidad, una zona de interfase huésped-aloinjerto con restos de una trabécula osteocartilaginosa característica de un proceso de consolidación endocranal. Además, el aloinjerto presenta actividad proliferativa de tipo membranoso en el borde opuesto al implante. Se observan trabéculas formadas por hueso condroide recubiertas por un depósito linear de hueso laminar (ligeramente más oscuro que el de la cortical preexistente) rodeando lo que en imágenes posteriores (y en el trabajo de Gallardo-Calero y cols. de 2018) se reconocen como espacios vasculares, que son además mayores y más numerosos, a diferencia del aloinjerto maduro y desvitalizado que se presenta en los grupos control. Algunos de estos espacios vasculares están rodeados de al menos dos líneas concéntricas de lamelas óseas que constituyen osteonas de tipo haversiano.

Evaluación histológica

En el análisis histológico independiente se puede observar la zona correspondiente al tejido óseo (color verde/azulado), que es el tejido mineralizado. El color anaranjado/marrón nos indica el tejido no mineralizado en muestras no descalcificadas mediante la tinción de Tricrómico de Masson Goldner. A través del estudio histológico podemos observar el proceso de angiogénesis que se produce en las muestras. En nuestro estudio, se comprueba que las muestras tratadas mediante el producto (Grupo C y D) presentan una mayor neoformación ósea y vascular, tanto es así que la organización del tejido óseo es superior a la que se observa en las muestras del grupo B (control negativo). En el estudio podemos comprobar la formación de nuevos vasos que promueven la osificación membranosa, sin observar estos signos en el grupo control.

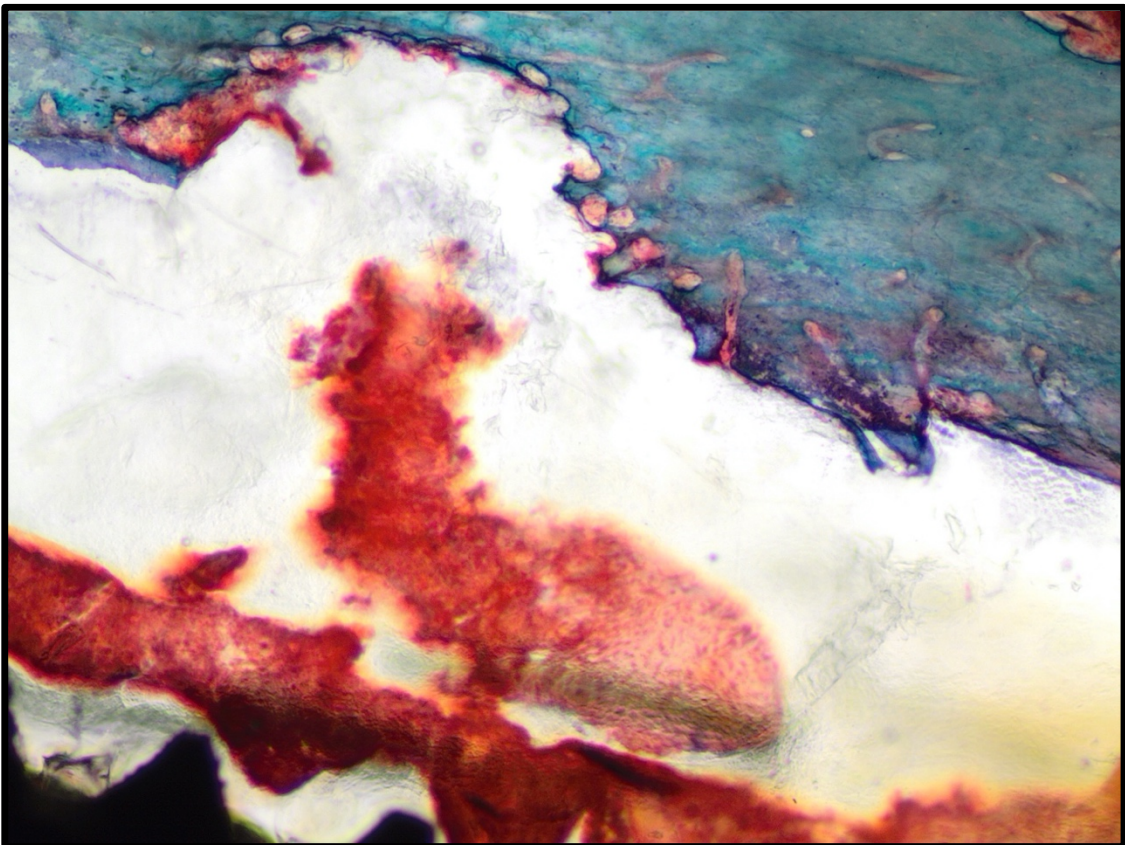


Figura 65. Muestra del estudio histológico del grupo B (control negativo). En la parte superior de la imagen se observa el aloinjerto femoral, completamente desvitalizado, sin signos de vascularización. En la misma imagen puede observarse el ataque osteoclástico en el aloinjerto, intentando ser reabsorbido por el organismo. En la parte inferior de la imagen se observa el clavo roscado endomedular.

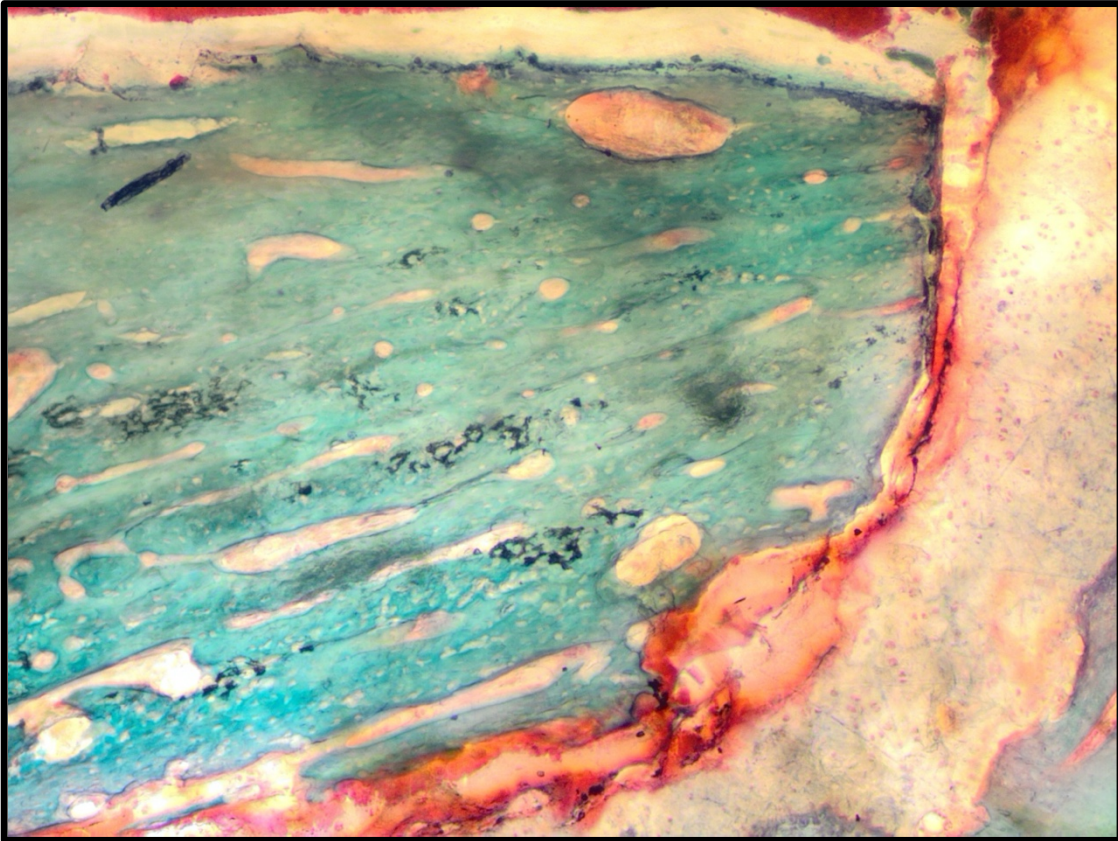


Figura 66. Imagen histológica del grupo de estudio C (20G5). En ella se aprecia el aloinjerto con signos de vitalidad, como son la presencia de elementos vasculares entre las trabéculas y la de osteocitos nucleados en el tejido óseo. Apenas se puede observar presencia de tejido cartilaginoso, ni de la metacromasia que sería signo de osificación endondral. Las trabéculas están formadas por láminas de depósito inicial de hueso condroide, sobre el que se depositan láminas concéntricas de hueso laminar, con una estructura característica de la osificación de tipo membranoso. Esto indica que la neovascularización ha elicitado un crecimiento de tejidos óseos maduros, resistentes a las sollicitaciones mecánicas a las que es sometida la estructura ósea.

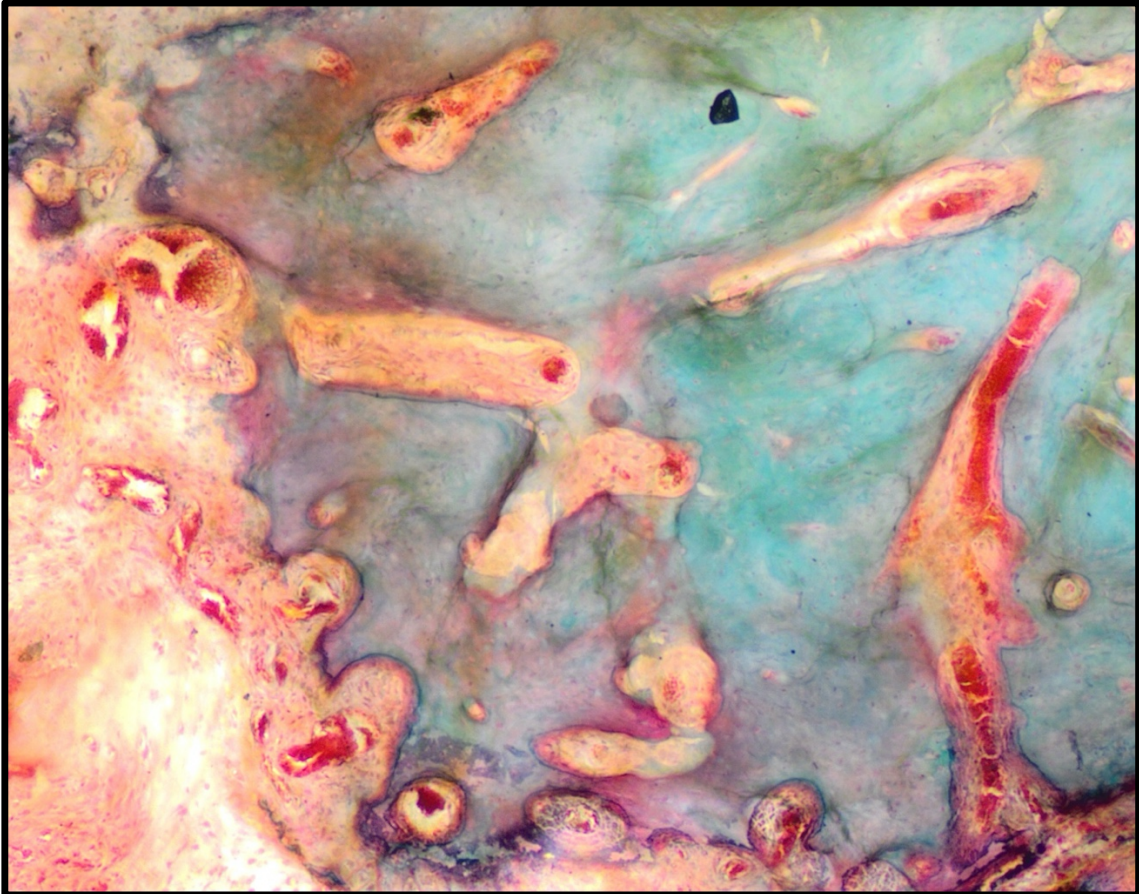


Figura 67. Imagen histológica del grupo de estudio C (20G5) obtenida mediante microscopio óptico después de la tinción de Tricrómico de Masson Goldner. En esta imagen aumentada (x10) se puede observar la importante actividad angiogénica que se nos presenta en los grupos experimentales (vasos con eritrocitos en su interior) invadiendo el tejido óseo mineralizado (azul).

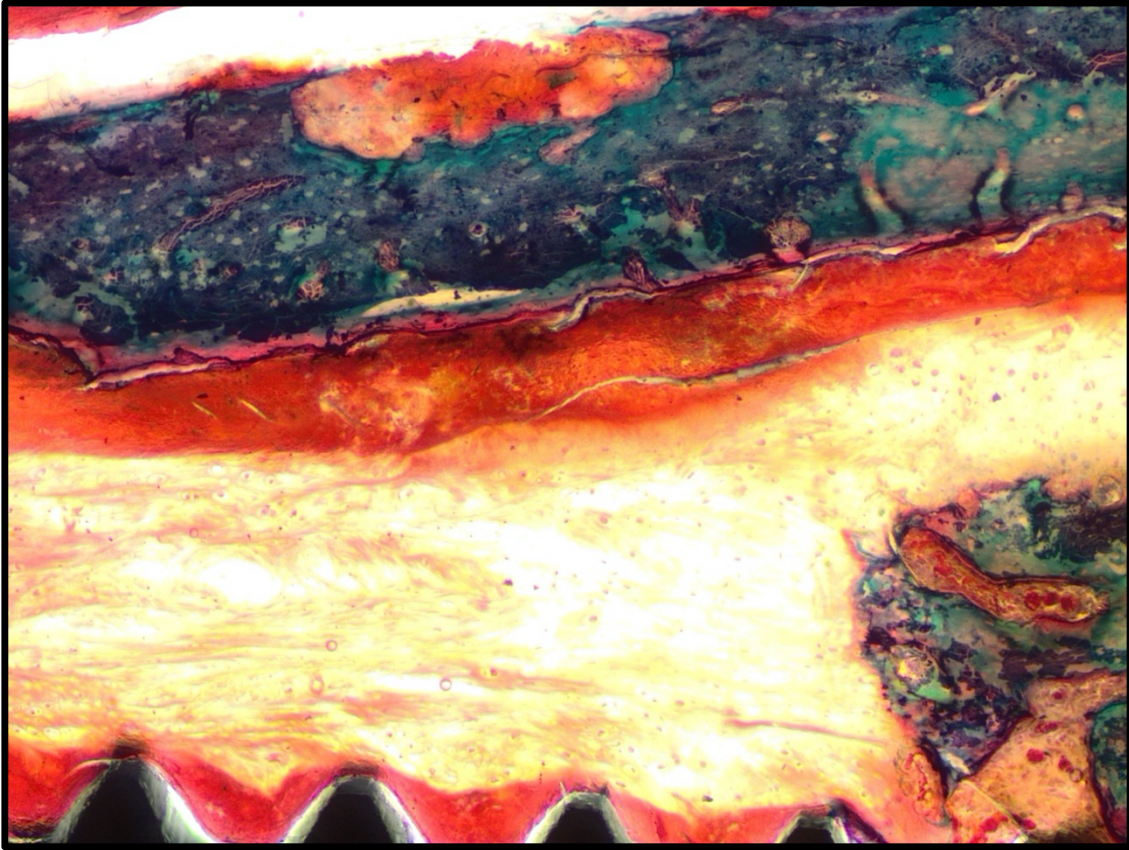


Figura 68. Imagen histológica del grupo de estudio D (20P30). Se nos presenta el fragmento no vascularizado del injerto, alejado del implante, con una notable zona de osteoclasia en la superficie más alejada del implante. En cambio, el fragmento situado en el ángulo inferior derecho de la imagen muestra evidentes signos de vitalidad, como son la presencia de elementos vasculares en los espacios entre las trabéculas.

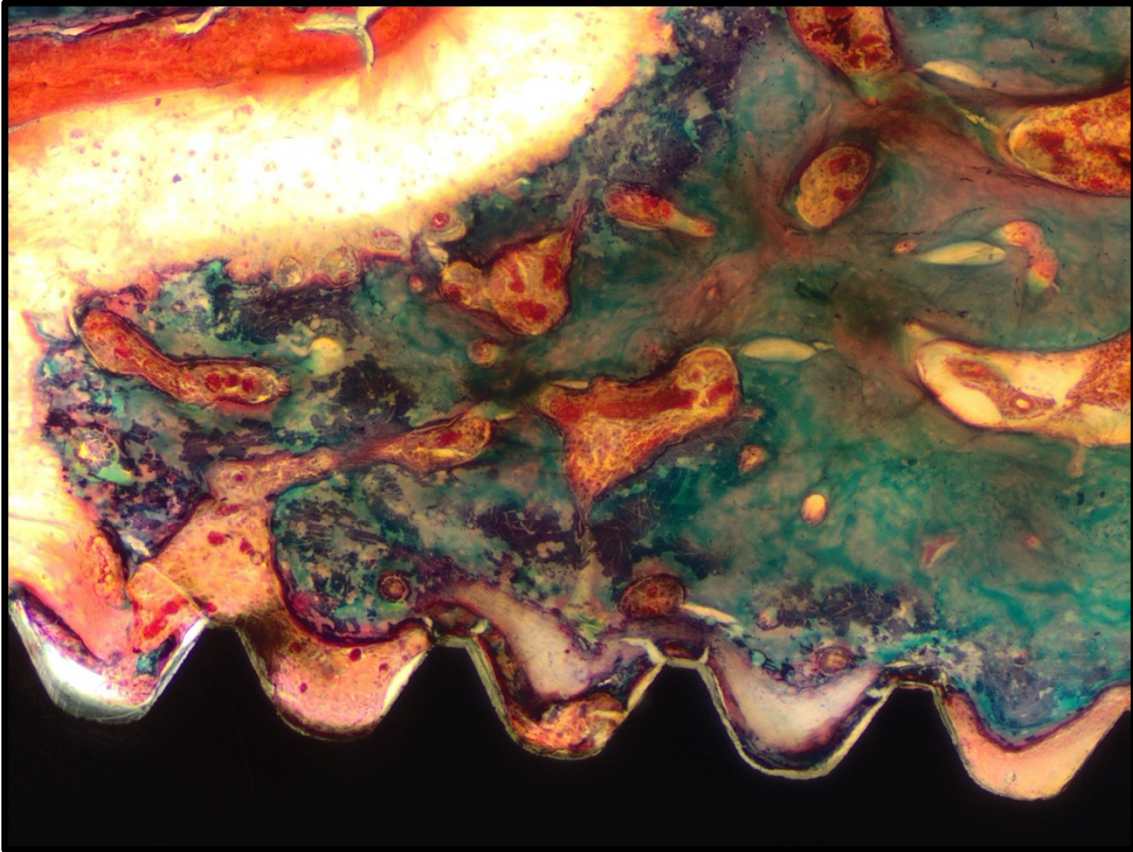


Figura 69. Imagen histológica del grupo de estudio D (20P30), en la que el fragmento cercano al implante muestra abundantes signos de actividad proliferativa, como son la presencia de abundantes canales vasculares con eritrocitos en su interior, que están contorneados por células lineares depositando matriz extracelular ósea (“osteóide”) que muestra una intensa metacromasia. Los tejidos visibles en la mitad derecha de la imagen presentan signos de neovascularización como grandes espacios vasculares con presencia de elementos de la sangre que atraviesan tejido óseo de apariencia vital, con células ocupando las lagunas osteocitarias.

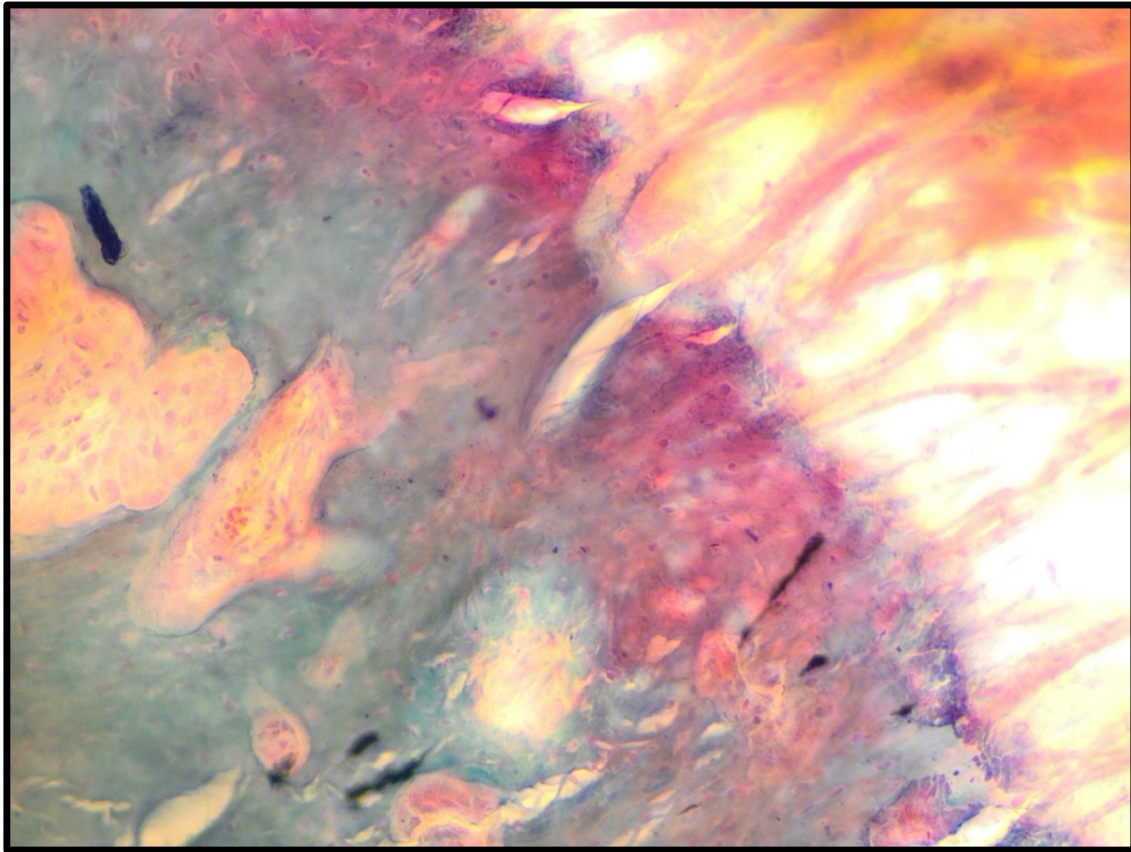


Figura 70. En el ángulo inferior izquierdo observamos el tejido óseo preexistente, con signos de remodelación, en forma de líneas cementantes, signo de actividad osteoclástica. En una de las lagunas de Howship observamos dos células que parecen formar parte de una lamela ósea neoformada, como las que rodean el vaso contiguo. Los tejidos superficiales, en los que son visibles lagunas celulares grandes, confluentes e irregulares dentro de una matriz extracelular intensamente metacromásica, presentan además una indudable conexión física con las fibras que se observan en el ángulo superior derecho de la imagen, lo que sugiere que se trata de fibras de Sharpey.

DISCUSIÓN

Hoy en día, la mayoría de los esfuerzos en el campo de la cirugía reconstructiva osteoarticular van encaminados a intentar preservar la extremidad con la mayor funcionalidad posible, sin poner en riesgo la vida del paciente. Los avances en oncología musculoesquelética durante las últimas décadas han supuesto que los pacientes presenten unas mayores tasas de supervivencia sin necesidad de amputar la extremidad como único tratamiento posible (164). Como es lógico pensar, los pacientes a los cuales se les ofrece un salvamiento de la extremidad presentan una mejor calidad de vida comparados con aquellos que acaban en amputación (165,166). Es curioso como la literatura más reciente presenta tasas de supervivencia mayores y una menor recurrencia metastásica en aquellos pacientes que se trataron mediante un salvamiento de la extremidad. Esto puede ser debido a que los pacientes amputados presentan un peor pronóstico (167). Si bien es cierto que en el estudio de Bacci y cols. (3), con más de 500 pacientes, se encontró que las tasas de recurrencia local eran similares entre el salvamiento de la extremidad y la amputación. En la literatura encontramos estudios que demuestran que la cirugía de preservación de la extremidad no influye en la supervivencia de los pacientes con sarcoma de partes blandas y osteosarcoma (168,169).

El éxito de un producto en el campo de la bioingeniería de tejidos, más allá de cuestiones como la disponibilidad de los materiales o su facilidad de fabricación, dependerá de la reacción biológica que es capaz de provocar *in vivo*, y de si dicho producto tiene un perfil de seguridad acorde a los establecidos por las autoridades sanitarias de los diferentes países. Los estudios *in vitro* se realizan en un primer momento en cultivos celulares para establecer las posibles interacciones biológicas, tales como la citotoxicidad, la proliferación celular y la inducción a la diferenciación, pasando al estudio en animales (*in vivo*) una vez se ha superado esta primera fase.

Como bien se sabe, las modalidades adyuvantes como la quimioterapia y la radioterapia desempeñan un papel esencial en el tratamiento integrado de estos pacientes, y el cirujano debe ser consciente de que la interacción y coordinación entre las diversas

disciplinas de tratamiento es importante para proporcionar la secuencia más óptima. Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que nos ofrecen, tanto la quimioterapia como la radioterapia tienen un efecto nocivo en nuestros pacientes asociando complicaciones como la inmunosupresión, úlceras inducidas y dehiscencias de la herida quirúrgica (170). Es por este motivo que el producto que queremos asociar no debe influir en el proceso de curación de los diferentes aspectos de la cirugía.

Ya que el comportamiento celular en 2D (cultivos) es diferente al que se presenta en 3D, nace el interés de trasladar los avances a modelos animales (171). Se han realizado varios estudios sembrando osteoblastos o *osteoblastos-like* en polímeros degradables (172,33) para evaluar cual es el posible potencial de crecimiento celular y diferenciación, o bien si se produce una muerte celular. Sin embargo, estos estudios sólo nos muestran resultados sobre cultivos, en condiciones estáticas. Para poder valorar estos perfiles correctamente deben realizarse estudios dinámicos en 3D, donde el material trabaja sobre unas condiciones diferentes. Por la literatura sabemos que el ácido poliláctico no es citotóxico y que el fosfato cálcico fue testado con anterioridad por parte del grupo de biomateriales del IBEC, habiéndose podido observar las capacidades que tenían la combinación de ambos a diferentes concentraciones, y que la presencia de partículas de vidrio parece mejorar la diferenciación celular (29,173). De la misma manera, en nuestro estudio el producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico no presenta un incremento de la dehiscencia de la herida quirúrgica ni un aumento de las complicaciones asociadas a la cirugía.

Los materiales que se utilizan en el campo de la bioingeniería deben cumplir una serie de criterios para ser considerados óptimos. Principalmente, deben ser biocompatibles, bioactivos y actuar como un molde que active a las células con el objetivo de integrarse en el entorno biológico y desencadenar respuestas celulares específicas. Los materiales acelulares también deben degradarse a una velocidad adecuada para permitir que estos procesos tengan lugar durante la reabsorción progresiva. En el caso ideal, el material introducido debe generar una serie de respuestas mientras es reabsorbido, evitando así nuevas cirugías para su extracción (32,174). En nuestro estudio pudimos observar como el material se había reabsorbido a las 12 semanas postoperatorias, sin encontrar

ninguna sustancia macroscópica en la cirugía de obtención de muestras. Es por este motivo que se confirma uno de los principios fundamentales de los biomateriales que no queremos que den un soporte durante largos periodos de tiempo. La biodegradabilidad de un implante es muy importante e incluso puede ser crítica a la hora de promover la capacidad inherente del cuerpo de regenerar y actuar como un promotor celular. Si se liberan subproductos tóxicos durante la degradación de un biomaterial, el tejido sano local puede verse afectado, alterando el proceso de reparación.

A la hora de analizar un biomaterial se deben tener en cuenta muchos parámetros como la arquitectura, la porosidad, la hidrofilia, la cristalinidad y la composición química, ya que todos pueden afectar a los mecanismos de biodegradación (175). Esto depende de su diseño y, más precisamente, de sus componentes y método de fabricación. Dependiendo del uso clínico y del tejido objetivo, se necesitan diferentes propiedades del material. En nuestro caso, se buscaba un material que indujese a la regeneración ósea y sobretodo a la angiogénesis sin necesidad de dar soporte estructural, ya que esto quedaba resuelto mediante el aloinjerto. Por lo tanto, una vez realizada la tarea de inducción ósea y proliferación vascular, el material debía degradarse.

Es en el campo de la bioingeniería ósea donde los biomateriales híbridos hechos de polímeros sintéticos o biodegradables y vidrios bioactivos son compuestos interesantes, ya que pueden formar una interfaz estable entre el implante y el tejido del huésped e incluso desencadenar las respuestas celulares deseadas (176,177). Cuando se une una fase inorgánica a una orgánica permite un mejor control de la degradación de la matriz polimérica, gracias a un aumento en la hidrofilia, así como en la nanoporosidad, aumentando el área de superficie y mejorando la degradación hidrolítica. Algunos polímeros, como el ácido poliglicólico o poliláctico, tienden a degradarse más rápidamente *in vivo* en comparación con otros polímeros como la policaprolactona (alifático, es decir, de cadena abierta), que permanece durante más tiempo en el cuerpo después de su implantación (178–180). Por lo tanto, al combinar estas dos familias de materiales, como en nuestro caso el ácido poliláctico con fosfato cálcico, se pueden producir implantes completamente bioabsorbibles con propiedades mecánicas y

bioactivas. A pesar de todo esto, la biodegradación es un mecanismo complejo, influenciado por varios factores biológicos, como por ejemplo el pH, el oxígeno y la actividad enzimática, por lo que es difícil lograr un control exacto del proceso.

Si bien es cierto que clásicamente los biomateriales en el campo de la reparación ósea habían sido osteoconductores, es decir, capaces de promover la migración de las células a través del material, en los últimos años los esfuerzos se han centrado en la osteoinducción de los materiales, definida como la capacidad de inducir a células osteoprogenitoras indiferenciadas que aún no están comprometidas con el linaje osteogénico (181). De esta manera, subimos un escalón en el tratamiento de los grandes defectos óseos.

El mecanismo por el cual un biomaterial tiene capacidades osteoinductoras es complejo y faltan estudios para determinar el proceso exacto; sin embargo, lo que sí sabemos es que un número creciente de materiales han demostrado tener potencial osteoinductivo, y esto se observa al implantarlos en sitios heterotópicos como el músculo o el tejido subcutáneo de varios modelos animales (182). Estos estudios demuestran la formación de hueso heterotópico por biomateriales como la hidroxiapatita, el fosfato tricálcico, el fosfato cálcico bifásico y el fosfato de octacalcio en varios modelos animales (34,183–185). Mientras que la osteoconducción se ha demostrado en ciertos polímeros y metales porosos, los biomateriales con potencial osteoinductivo son principalmente cerámicas o biovidrios de fosfato de calcio. Se intentan obtener composiciones químicas cercanas a la del mineral óseo, y en este sentido los compuestos de fosfato cálcico han despertado un interés considerable en la regeneración ósea.

Biológicamente, los biovidrios poseen las propiedades de osteointegración y osteoconducción. Al contactar con un medio acuoso fisiológico, los iones de calcio y fosfato presentes precipitan en cristales de hidroxiapatita y forman un fuerte enlace químico con el hueso. Es en este punto donde el término bioactivo hace referencia a su unión directa con el hueso. Si bien es cierto que el fosfato cálcico ha demostrado el mayor potencial osteoinductivo entre los materiales sintéticos, su fragilidad intrínseca limita su uso como sustituto del injerto óseo en sitios de carga. Pero como ya hemos comentado,

en nuestro caso no era necesario que el biomaterial realizase la función de soporte estructural, ya que esta necesidad se veía cubierta por el aloinjerto femoral. Así, el principal objetivo era intentar favorecer la osteointegración del mismo, y los estudios que se fueron realizando a lo largo del experimento confirmaron su capacidad.

Al final hay que entender que la combinación de polímeros y cerámicas ofrece numerosas oportunidades para mejorar las propiedades de las cerámicas mientras conservan su bioactividad. Por ejemplo, el ácido poliláctico, utilizado en nuestro estudio, es un poliéster alifático biocompatible y biodegradable, que, junto al fosfato cálcico, forman un excelente compuesto. Se obtiene por la polimerización por apertura del anillo del dímero cíclico del ácido láctico. El polímero derivado del monómero natural L-láctico presenta un elevado grado de cristalinidad (37%). El material tiene alta tensión y baja elongación, lo que lo convierte en un material muy adecuado en el mundo de la regeneración ósea por su capacidad de soportar fuerzas. Se ha podido demostrar que la adición de micropartículas de fosfato cálcico o hidroxiapatita al ácido poliláctico aumenta la resistencia a la compresión y a la flexión de una manera dosis-dependiente (186). Aunque en este caso no debía dar un soporte estructural (ya teníamos el aloinjerto), es interesante su capacidad de poder soportar las fuerzas de tensión durante el postoperatorio inmediato. De manera similar, la resistencia a la tracción del ácido poliláctico mejoró con la incorporación de hidroxiapatita. Fueron Nejati y cols. quienes demostraron que el tamaño de las partículas de cerámica se puede utilizar para adaptar las propiedades mecánicas de los compuestos: las nanopartículas aumentaron la resistencia a la compresión del compuesto en comparación con las micropartículas, lo que lo hace comparable al hueso esponjoso (187).

Un tema a discutir dentro del análisis del estudio fue cómo se decidió la selección del tipo de fijación del aloinjerto. No existe una clara evidencia a favor de un sistema u otro a la hora de realizar una fijación que proporcione un ambiente ideal para su integración. Cuando nos fijamos en el enclavado endomedular del aloinjerto, vemos que se asocia una mayor tasa de pseudoartrosis y de reintervención (188). Hay autores que defienden que montajes más estables con fijaciones más rígidas pueden incrementar las tasas de integración del aloinjerto al huésped, como fue postulado por Vander Griend y cols.

(189). Estos mismos autores destacan que pese a una fijación interna estable no está exento de complicaciones, hallando la fractura del aloinjerto como una de las más temidas. Se ha podido asociar dicha fractura con la penetración de la cortical del aloinjerto por parte del implante, cosa que sucede en mayor grado con las placas (190).

Un factor determinante para decantarnos sobre el tipo de osteosíntesis que debíamos realizar fue la experiencia del grupo con el uso de enclavados endomedulares a través de una aguja de Kirschner roscada en un modelo animal en rata. Es cierto que existen placas y fijadores externos compatibles con el fémur del animal, que pueden aportar una fijación correcta al aloinjerto, pero dada la falta de evidencia y los buenos resultados obtenidos en estudios previos, se decidió continuar con la misma técnica (26). El procedimiento se basaba en colocar una aguja de Kirschner roscada a través de la resección femoral de manera retrógrada, para a continuación pasarla desde el trocánter mayor de manera anterógrada junto al aloinjerto. Esto nos permite disminuir la tasa de penetración cortical que está reportada en la literatura, evitando también la penetración en la rodilla (158).

Como ya conocíamos, la limitación de esta técnica es la incapacidad de dar estabilidad rotacional al aloinjerto, posiblemente siendo uno de los principales motivos de la osteolisis periimplante que presenta nuestra serie, además de la morfología propia del fémur, que es más ancho en la metáfisis, por lo que la osteotomía distal queda menos fijada. Sabemos que compañías dedicadas al material de osteosíntesis en animales roedores han diseñado un implante endomedular bloqueado (RatNail, RISystem®) que podría ayudar a disminuir la osteolisis que se produce por el micromovimiento del implante, pero valoramos la experiencia del equipo investigador con la osteosíntesis mediante la aguja roscada.

Hay que ser capaces de entender cuales son las potenciales complicaciones que nos podemos encontrar al tratar un defecto femoral masivo con una reconstrucción mediante aloinjerto. Uno de los principales enemigos del cirujano que se dedica a la cirugía reconstructiva osteoarticular es la infección, ya sea por las grandes cirugías que se realizan, o bien por el tipo de paciente que se trata. Es una de las complicaciones más

frecuentes y graves, siendo los organismos Gram positivo los causantes de la mayoría de estas infecciones (*Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*) (191).

Existen factores que aumentan la incidencia de infecciones en este tipo de cirugía como son los inherentes a la implantación del aloinjerto, tiempo quirúrgico prologando, resecciones amplias, paciente inmunodeprimido, etc. También juegan un papel fundamental los tratamientos adyuvantes de radioterapia y quimioterapia. Por otra parte, la poca penetración de los antibióticos a nivel del aloinjerto. La mayoría de las series hablan de hasta 10-15% de infecciones (192).

Es cierto que la rata presenta una capacidad innata para sobrevivir y que su índice de infección es mucho menor que el del ser humano, pese a eso, todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo estrictas medidas de esterilidad en el quirófano del estabulario. Incluso siendo rigurosos con la esterilidad del medio, presentamos unas tasas de infección considerable, hasta el 50% en el grupo control A (sin producto). En cambio, en los grupos de investigación experimental los índices de pseudoartrosis séptica se reducen de manera drástica, donde sólo encontramos un caso por grupo. Es posible que la mayor experiencia de los investigadores haya resultado en un mayor refinamiento de la técnica quirúrgica y disminución del tiempo intraoperatorio, pero incluso valorando esta opción las tasas de infección son elevadas en los grupos control A y B. Por otro lado, el poder angiogénico y osteoformativo del producto contribuye a disminuir el riesgo de pseudoartrosis séptica.

Otra de las complicaciones clásicas de los aloinjertos es la falta de consolidación o integración al hueso del huésped. Como ya hemos comentado con anterioridad, la consolidación se dificulta cuando el aloinjerto no está mecánicamente estable. En el ser humano el tiempo de integración varía desde los 3 meses hasta los 2 años dependiendo de diversos factores. El aloinjerto de esponjosa se integra alrededor de los 6 meses y los corticales se pueden demorar hasta 2 años. Dentro de los factores que influyen en la consolidación tenemos la edad, tipo de osteosíntesis, tipo de unión y tratamientos asociados, entre otros. En general, las diferentes series muestran tasas de pseudoartrosis que van desde el 2% para uniones metafisiarias hasta el 20%-30% para

uniones diafisarias (193), incluso hay autores que postulan que sólo el 25% de los aloinjertos se integran (16).

La fractura es una complicación grave en este tipo de reconstrucción; sin embargo, no existe un consenso general sobre el manejo de esta complicación y existe poca información sobre los resultados del tratamiento de fracturas. En la serie de publicaciones encontramos que la tasa de fractura varía desde el 7 al 30%, dependiendo de los autores (9,10,15,16,18,19,194). Es por este motivo que nuestro grupo investigador lleva años tratando de mejorar los resultados en la integración de los aloinjertos estructurales, utilizando un modelo animal en rata como estudio preclínico.

Ya pudimos demostrar mediante microCT la falta de unión a las 4, 6 y 10 semanas de los grupos control del proyecto sobre la revitalización que aportaba un colgajo de periostio vascularizado. Incluso en un modelo animal como la rata que presenta una tasa de curación mayor, el aloinjerto por si sólo presenta una tasa de pseudoartrosis elevada (26). En nuestro estudio actual se ha podido comprobar que dicha pseudoartrosis persiste a las 12 semanas postquirúrgicas cuando se trata del grupo control o control negativo (Fig. 71).

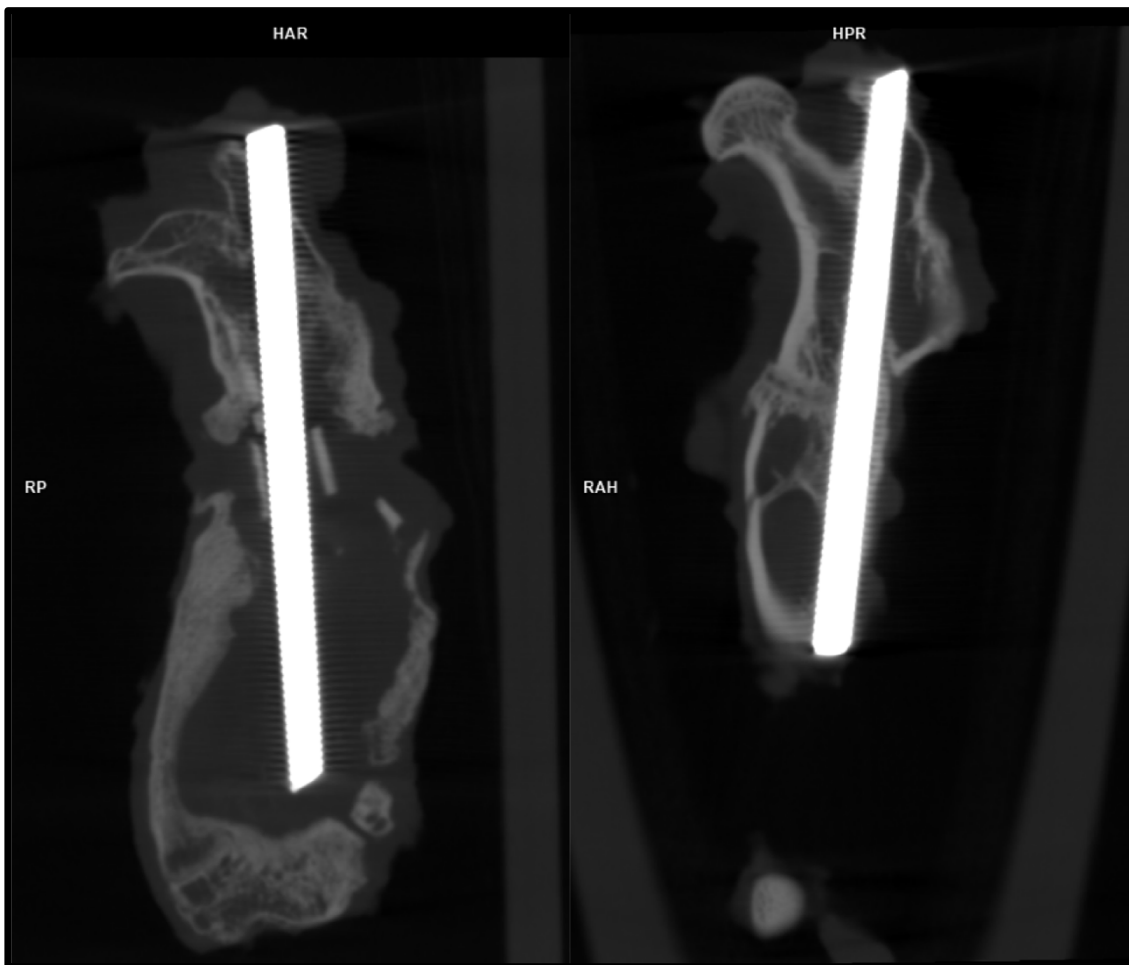


Figura 71. MicroCT comparativo entre el grupo control y el grupo experimental a las 12 semanas postoperatorias. En la imagen de la izquierda se aprecia una clara pseudoartrosis del aloinjerto, con una importante osteolisis alrededor del producto, signos de falta de estabilidad del montaje de osteosíntesis. Por lo contrario, en la imagen de la derecha, que es una muestra del grupo experimental, se aprecia una estabilidad del constructo, sin una osteolisis aparente y con indicios de integración de las osteotomías, con el fin de poder estabilizar el aloinjerto.

En cambio, de la misma manera que en el estudio anterior de nuestro grupo de investigación (26), a través del microCT se pudo observar un aumento de las tasas de consolidación en los grupos experimentales. Esto concuerda con la línea de investigación que desde hace años sigue el grupo de biomateriales del IBEC. Esta institución es referente internacional, donde llevan años investigando en la regeneración ósea a través de materiales compatibles con el organismo (27,29,173).

Uno de los puntos más importantes de nuestro trabajo es valorar la capacidad que parece tener la asociación de un producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico en la integración del aloinjerto femoral en el modelo animal en rata. En nuestro estudio se presentan tasas de consolidación que mejoran con la aportación de los diferentes biovidrios de fosfato cálcico, encontrando diferencias estadísticamente significativas en comparación con los grupos de control.

Las tasas de consolidación proximal fueron superiores a la consolidación distal, esto puede ser explicado por una mejor vascularización a nivel de la osteotomía proximal y una mayor estabilidad del foco de fractura. A nivel de la osteotomía distal sólo encontramos diferencias entre los grupos controles y el grupo experimental D. Uno de los supuestos que creemos que puede haber provocado esta falta de diferencias con el grupo C es, como se comentó anteriormente, la insuficiente estabilidad que aporta el clavo a nivel más distal por la propia morfología femoral y el número reducido de la muestra.

No podemos olvidar el poder limitado del biovidrio de fosfato cálcico, cuyo objetivo principal es intentar mejorar la integración del aloinjerto, siendo conscientes del efecto de éste. Quizá el hecho que mejor nos orienta sobre la participación del producto en favorecer la integración del aloinjerto es la capacidad de inducir una mayor tasa de consolidación en comparación a los grupos controles. Podemos observar, por lo menos, un incremento de la formación de puentes óseos en dichos grupos experimentales (Fig. 72).



Figura 72. Imagen de microCT del grupo experimental centrada en la osteotomía proximal, donde se aprecia la formación de puentes óseos. A nivel proximal del fémur no se observa osteolisis, lo que se traduce en una correcta estabilidad del implante.

A través del estudio con el marcaje con fluorocromos en diferentes fases del seguimiento postoperatorio (0 semanas – 4 semanas – 8 semanas) se pudo observar la tasa de aposición ósea que nos explica a qué velocidad se ha producido la formación de hueso. Estas tasas son muy variables, ya que dependen de la zona de medición. Lo que sí que se puede observar es el patrón mucho más organizado de los grupos de estudio C y D; en contrapartida podemos ver una formación ósea mucho más desorganizada en los grupos control, con escasa formación lineal de los marcajes con fluorescencia. Se observa que se producía una aposición ósea sincrónica y mucho más organizada si comparamos los diferentes grupos (experimental vs control) (Fig. 73) (Fig. 74).

Todo esto va en concordancia con los resultados obtenidos hasta el momento, tanto los datos clínicos como radiológicos. Nuestra hipótesis parece ir cogiendo fuerza a medida

que vamos analizando las diferentes pruebas realizadas a las muestras. El biovidrio de estudio induce una formación ósea más efectiva, quizá debido a su efecto angiogénico, que favorece un ambiente idóneo para la neoformación ósea. Si lo comparamos con la línea de investigación del grupo, parece que este producto podría facilitar el ambiente necesario para la integración del injerto intercalar, del cual ya pudimos mejorar las tasas de consolidación mediante la asociación de un colgajo de periostio vascularizado (26). Hoy en día podemos encontrar numerosas publicaciones que corroboran que la asociación de el ácido poliláctico con el fosfato cálcico tiene función osteoconductora y osteoinductora ya sea *in vitro* como *in vivo* (195–198).

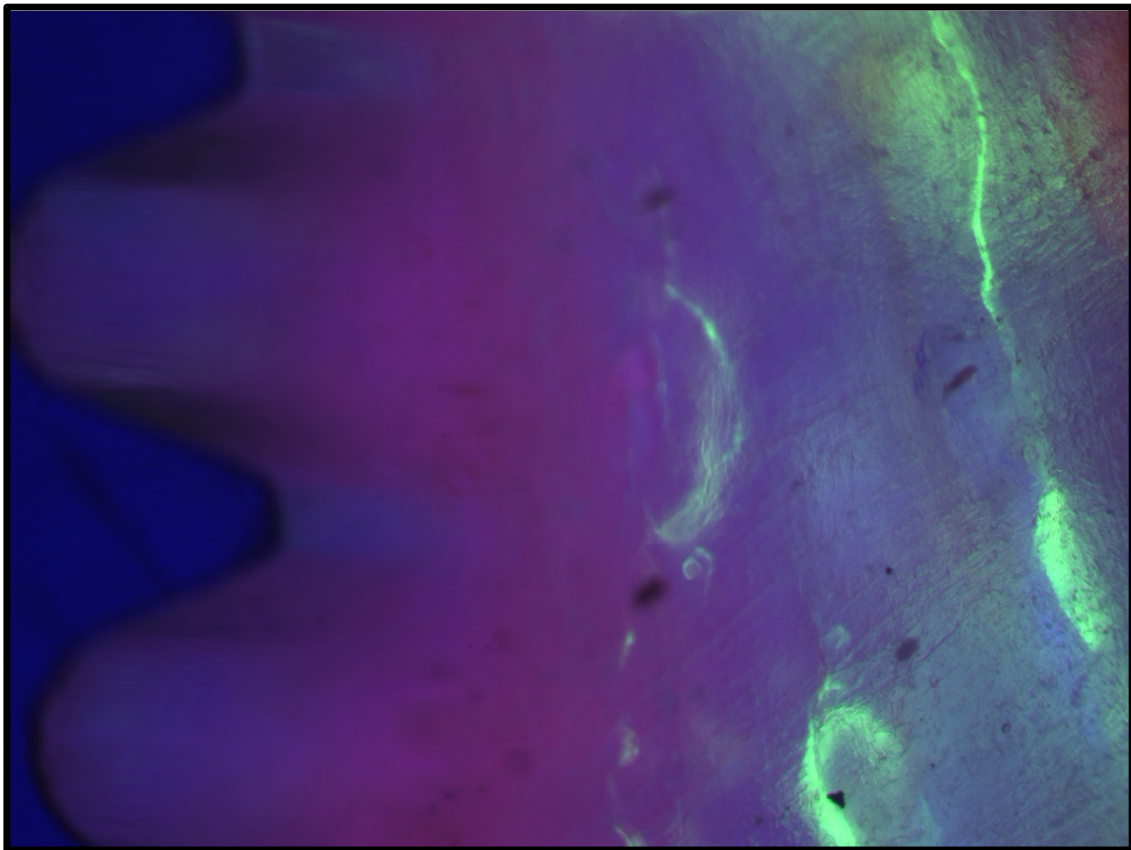


Figura 73. Imagen de microscopía de fluorescencia del grupo experimental C (20G5). En ella se aprecia un patrón de crecimiento entre los diferentes marjajes fluorescentes *Calcein Green*. Entre ambos se puede calcular la tasa de aposición ósea (crecimiento y velocidad). El patrón de disposición es lineal, dando un crecimiento organizado y efectivo del hueso formado.

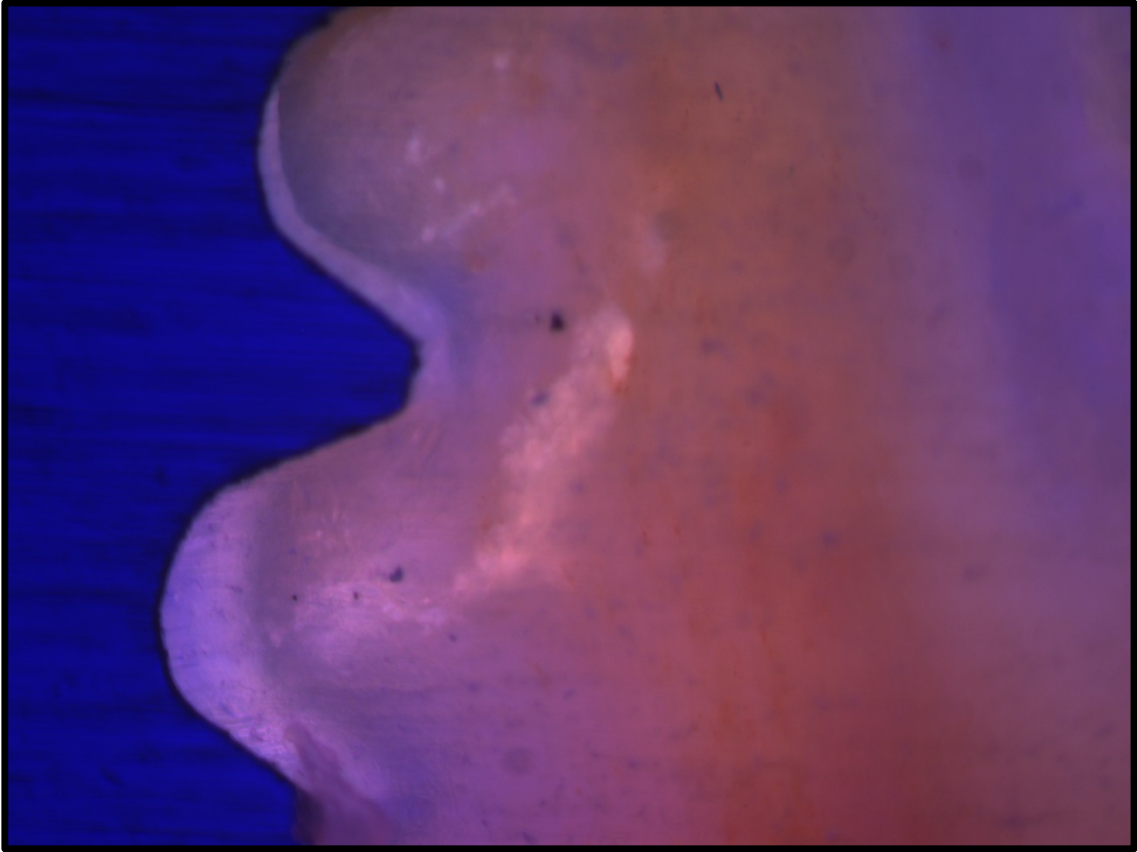


Figura 74. Imagen de microscopía de fluorescencia del grupo control A, donde no se observa ningún marcaje, es decir, no se presenta un patrón de neoformación ósea lineal y estructurado, cómo tampoco un depósito de calcio que debería contener dichos marcadores. No es posible calcular la tasa de aposición ósea.

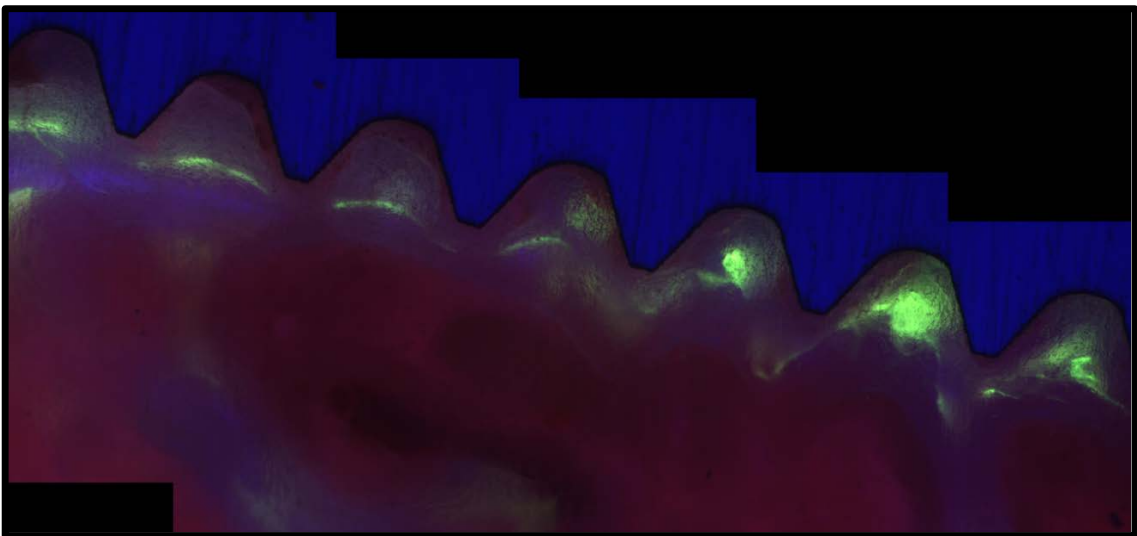


Figura 75. Imagen de microscopía de fluorescencia del grupo experimental tras realizar un *stitching*, proceso por el cual se combinan múltiples imágenes para producir una

imagen panorámica. Podemos observar claramente la disposición sincrónica de la formación ósea en el grupo experimental. Las bandas lineares del marcaje fluorescente nos hablan de un crecimiento organizado, de una neoformación ósea estructurada. La estructura del tejido óseo muestra la linealidad característica del hueso laminar, con un marcador fluorescente que permite reconocer como un patrón continuado y coherente de crecimiento de hueso maduro.

Tras el estudio mediante la microscopía de fluorescencia, se procedió a realizar la microscopía de barrido. En este punto se analiza la calidad y vitalidad del tejido óseo mediante la emisión de electrones que reflejan la superficie del material, que penetran en el bloque y son captados por un detector en ángulo; el microscopio es capaz de obtener imágenes de elementos pesados y darnos imágenes en una escala de grises. En esta parte del estudio observamos que los grupos controles no presentaban ningún signo de revitalización del aloinjerto, incluso en diversas muestras se observaron zonas de reabsorción del injerto óseo por parte de los osteoclastos.

En contrapartida, pudimos obtener imágenes sugestivas de un remodelado óseo en la zona de la osteotomía, con un incremento de la vascularización y del tejido óseo inmaduro intentando organizarse ya en un sistema similar al tejido maduro (Fig. 76). Posiblemente, para poder apreciar una mayor integración del aloinjerto en las pruebas de imagen, deberíamos haber ampliado el tiempo para la extracción de muestras (12 semanas), pero ya presentamos en el trabajo del colgajo de periostio vascularizado sobre un aloinjerto femoral en el mismo modelo animal que se observaban signos de integración a las 10 semanas (26). Seguramente la capacidad de favorecer el proceso de integración del aloinjerto es superior si se asocia una estructura vital vascularizada como es un colgajo de periostio con todas sus propiedades biológicas, pero este no está exento de comorbilidades en caso de realizarlo en un paciente. Nuestro producto es un coadyuvante que favorece la angiogénesis y el ambiente para que dicha integración puede producirse, sin necesidad de aumentar la agresión quirúrgica.



Figura 76. Imagen de microscopía electrónica de barrido a x25 aumentos en la que podemos observar la vitalidad característica de un proceso de consolidación endondral. Además, presenta actividad proliferativa de tipo membranoso en el borde. Se observan trabéculas formadas por hueso condroide recubiertas por un depósito linear de hueso laminar y se reconocen espacios vasculares, que son además mayores y más numerosos, a diferencia del aloinjerto maduro y desvitalizado que se presenta en los grupos control. Algunos de estos espacios vasculares están rodeados de líneas concéntricas de lamelas óseas que constituyen osteonas de tipo haversiano.

Un factor fundamental a tener en cuenta cuando se intenta evaluar al proceso de consolidación del aloinjerto óseo es la angiogénesis, ya que es primordial para que la integración de segmento óseo introducido sea efectiva. Ya en trabajos previos del grupo de la Dra. Engel del IBEC se demostró el potencial de membranas basadas en fibra de ácido poliláctico que contienen fosfato cálcico para provocar la angiogénesis *in vivo*, en un modelo subcutáneo en ratones (199). Posteriormente, publicaron la acción del producto en un modelo de defecto óseo en rata, pensando que se podría favorecer la formación ósea a través de mejorar la angiogénesis (200).

Cuando se intenta abordar la regeneración ósea en nuestros pacientes solemos encontrarnos con una gama de limitaciones como suelen ser la edad y la pluripatología concomitante, es por ese motivo que un producto que favorece la angiogénesis puede jugar un papel en este campo de la medicina. Con el fin de poder ofrecer un tratamiento más eficaz e intentando disminuir las complicaciones asociadas a los aloinjertos, pensamos que el hecho de introducir un producto a base de ácido poliláctico que libera fosfato cálcico, entre otros, puede favorecer la integración. Es en esta nueva visión que hemos sido capaces de demostrar que hay un incremento del proceso de neoformación de vasos en los grupos donde se asociaba el producto (Fig. 77).

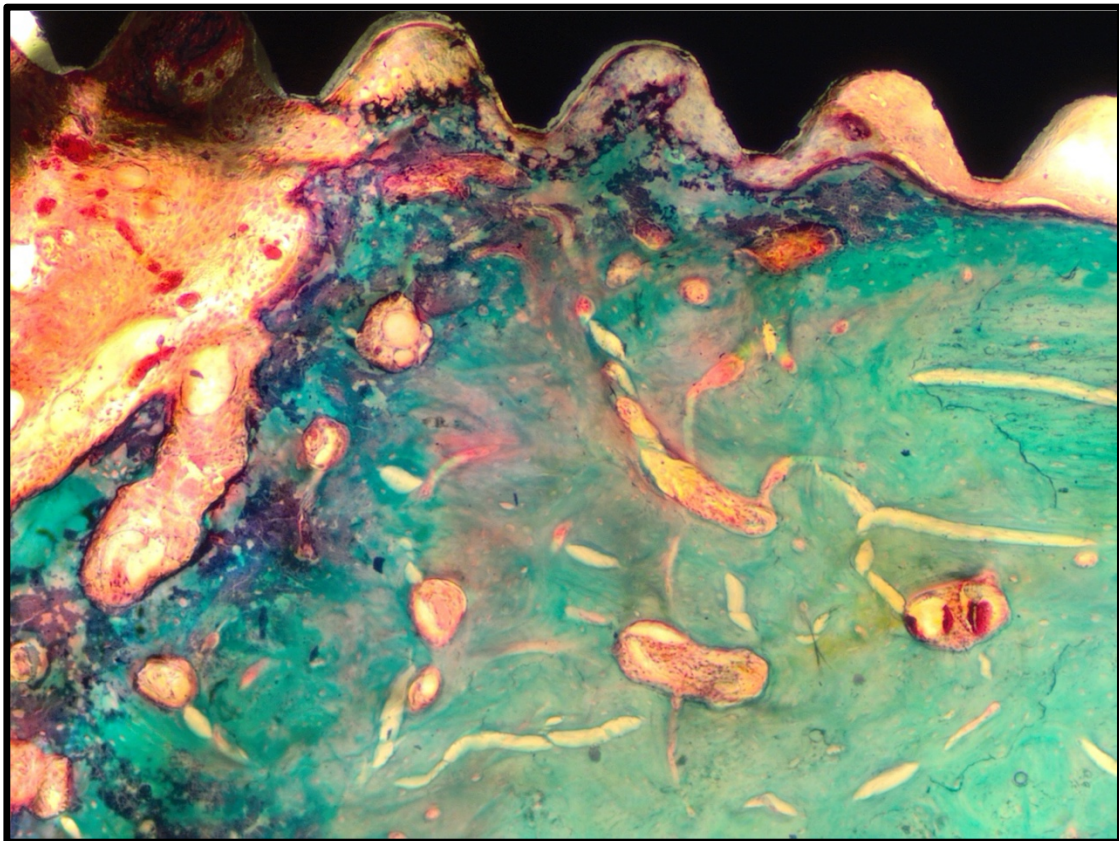


Figura 77. Imagen histológica con abundantes signos de actividad proliferativa como son la presencia de abundantes canales vasculares con eritrocitos en su interior y que están contorneados por células lineares depositando matriz extracelular ósea (“osteoid”) que muestra una intensa metacromasia.

De hecho, una crítica que se nos podría realizar es por qué asociamos factores de crecimiento de la vascularización o células madre que puedan inducir a ésta, pero estos

productos no están exentos de unos costes elevados y a menudo presentan problemas con la duración de la exposición a los factores de crecimiento y con el supervivencia de las células (201). Además, debido a los riesgos inherentes del uso de células madre y factores de crecimiento, éstos no deben ser utilizados en pacientes que han sufrido un cáncer, que justamente son en muchas ocasiones los que deben ser sometidos a procesos reconstructivos de la extremidad (202). Es por este motivo que creemos que el producto que se estudia podría tener una implicación clínica en la mayoría de los pacientes, una vez confirmada su efectividad en el ser humano. Las partículas de fosfato cálcico con capacidad para liberar iones de calcio bioactivos, de forma controlada, son un enfoque alternativo y rentable para lograr un proceso de neoformación ósea.

Sabemos que el aumento rápido de la concentración local de iones de calcio induce a la migración, la maduración y la organización de los progenitores endoteliales, y que estos materiales podrían provocar la expresión local de factores angiogénicos (199). Por otro lado, hay que resaltar que estos productos de fosfato de calcio son una alternativa prometedora para para lograr mayores tasas de liberación de iones controlados, ya que es fundamental para la curación o integración ósea que la estimulación por parte de los iones de calcio sea lenta y sostenida en el tiempo. Es por este motivo que podemos justificar el interés creciente en el desarrollo de biomateriales bioactivos que pueden modular el proceso de angiogénesis durante la regeneración del tejido óseo.

Una de las limitaciones con respecto a los biomateriales de este tipo reside en su rápida degradación, después de inmersión en líquido y, por lo tanto, liberación acelerada de iones en los primeros días, para pasar a continuación a una tasa de liberación relativamente lenta (177). Por lo tanto, se ha estudiado la manera de poder producir una liberación más sostenida y constante en el tiempo, y parece ser que a través de la introducción de una fase nanocristalina se puede obtener dicho objetivo de liberación de calcio. Además, el producto diseñado por el IBEC contrasta con los materiales de fosfato de calcio que generalmente presentan un caída de pH dramática e inmediata, debido al mecanismo de liberación (177). Este producto presenta una mínima variación del pH, por lo que se entiende que disminuye la muerte celular de los osteoblastos y la liberación de citocinas proinflamatorias por las células osteoblásticas (203). Estudios

previos han demostrado que niveles elevados de Ca^{2+} podrían promover el reclutamiento de células progenitoras de médula ósea en vivo, regulan las proteínas morfogenéticas óseas, favorecen la síntesis de colágeno tipo I mediante células osteoblásticas y modulan la osteoinducción de células madre mesenquimales (204,205).

Nosotros hemos sido capaces de demostrar mediante el estudio histológico y de microscopía que dicho material favorece e induce a la angiogénesis, por lo tanto, es de suponer que el calcio y sus niveles juegan un papel importante en la proliferación, quimiotaxis y diferenciación de las células. Los niveles de calcio pueden actuar como reguladores paracrinos para diversas funciones celulares, y se puede suponer que unos niveles locales elevados y mantenidos de calcio pueden inducir el reclutamiento de células capaces de favorecer tanto un medio proangiogénico como de mantener la formación de hueso.

Limitaciones del estudio

Nuestro estudio se basa en un modelo animal en rata de cepa Sprague-Dawley en el cual creamos un defecto óseo crítico en el fémur del animal. Este modelo fue validado por Poser y sus colaboradores (156), y como todo modelo animal tiene sus limitaciones a la hora de trasladar los resultados sobre la especie humana. En concreto, la rata como modelo animal no presenta similitudes biomecánicas, su potencial de curación es mucho mayor y presenta tasas de supervivencia muy elevadas tras procedimientos especialmente agresivos. Inclusive la tasa de infección es mucho menor de lo esperado, si lo comparamos con el ser humano o especies de mayor tamaño. Por otro lado, nuestro trabajo es un estudio preclínico, por lo que trae asociado un conjunto de limitaciones inherentes a este tipo de investigación.

Otra de las limitaciones de nuestro estudio es conocer cual es la cantidad idónea de biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico para llegar a favorecer la consolidación del aloinjerto. Tampoco podemos asegurar que las cantidades introducidas dentro del modelo animal sean exactamente las mismas, pese a que se colocaron dimensiones del biovidrio similares, tratando de ser exactas. Es por esto que creemos que en un futuro se deberían testar diferentes concentraciones de un mismo producto con tal de poder discernir una cantidad mínima que favoreciese la integración del aloinjerto. Además, creemos sensato explicar cual es el principal efecto observado en el producto, siendo este un aumento considerable de la angiogénesis si lo comparamos con los grupos control, pero que todavía dista de las tasas de consolidación reales que nos gustaría obtener en nuestros pacientes. Pese a que su morbilidad es escasa en el procedimiento quirúrgico, hay que ser conscientes del efecto que este producto puede producir sobre una zona de transición entre el hueso propio y el aloinjerto.

Nuestro modelo de fijación presenta como complicación más destacable la osteolisis que se formaba alrededor del implante. Esto es debido a que no aporta una excelente fijación y estabilidad rotacional, hechos que son fundamentales para la consolidación. Por eso creemos que implantes bloqueados como clavos o placas hubiesen aportado

una mayor fijación al constructo diseñado, pudiendo eliminar la variable de la ecuación en la consolidación.

Seguramente se debería haber realizado un estudio transversal en diferentes momentos de la evolución de la consolidación. En nuestro caso se decidió escoger las 12 semanas basándonos en la experiencia del grupo investigador (26), tratando de seguir una línea de investigación similar a estudio previos y aprendiendo de los posibles errores.

Con todo esto, el grupo investigador quiere poner de manifiesto las limitaciones referentes al estudio, explicando de manera clara cuales han podido ser las variables que influyen en nuestros resultados sin poder cuantificar su efecto.

Implicaciones en la práctica clínica

Todo estudio experimental en el campo de la medicina tiene como objetivo la traslación hacia el ser humano, por lo tanto, nuestro objetivo principal fue intentar demostrar la posible implicación del producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato de calcio embebido en ácido poliláctico en la osteointegración del aloinjerto utilizado para solventar el defecto femoral segmentario.

Con nuestro estudio hemos podido comprobar que el producto de estudio presenta una influencia positiva en la tasa de consolidación del aloinjerto femoral en el modelo animal en rata o, como mínimo, crea un ambiente favorable para que dicho proceso se produzca, aumentando la angiogénesis.

El trabajo de años de investigación del IBEC en este campo, junto a la experiencia del grupo investigador de ingeniería tisular musculoesquelética (26,29,173,206), han dado el fruto de una simbiosis entre dos instituciones nacionales con ganas de avanzar en el campo de la regeneración ósea, aprovechando cada uno de los recursos que ambos equipos pueden aportar. Cada día es más frecuente y necesaria la colaboración entre diferentes equipos, formando unidades de investigación multidisciplinarias, con el objetivo de poder potenciarnos mutuamente.

Como es conocido, la tasa de pseudoartrosis en los aloinjertos femorales para el tratamiento de pacientes oncológicos, traumáticos o sépticos, ronda entre el 12 y el 57% (10,16,18,194,207), presentando un elevado número de complicaciones en nuestros pacientes. Por lo tanto, el mundo de la cirugía reconstructiva osteoarticular necesita técnicas que puedan reducir el índice de complicaciones en este tipo de cirugías. Es cierto que las técnicas microquirúrgicas que aportan vascularización (22,24–26) para intentar fomentar la consolidación han mostrado unos resultados prometedores, pero éstas no están exentas de morbilidad y complicaciones añadidas (25). Por lo tanto, con este estudio se intenta buscar un material externo que no implique una morbilidad añadida en el paciente y que pueda incrementar la tasa de consolidación, siendo una alternativa para el equipo médico que trata a este tipo de pacientes.

Hoy en día carecemos de un tratamiento idóneo para poder tratar este tipo de patología, por eso cada aportación a la mejora de los resultados quirúrgicos nos sirve para avanzar en el campo de la cirugía reconstructiva ósea.

A pesar de ello, los estudios prospectivos y randomizados que puedan verificar los avances que realiza nuestro grupo de investigación son necesarios. Por este motivo esperamos que en los próximos años el campo de la investigación en biomateriales pueda garantizar el uso de un producto que facilite la osteointegración ósea, mejorando así la cirugía reconstructiva de nuestros pacientes.

CONCLUSIONES

1. Un producto a base de biovidrio nanoparticulado de fosfato de calcio embebido en fibra de ácido poliláctico no interfiere en el proceso de cicatrización del abordaje quirúrgico, no aumenta la tasa de dehiscencia de la herida quirúrgica ni está asociado a una mayor morbimortalidad del procedimiento quirúrgico.
2. La asociación de un producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato de calcio embebido en fibra de ácido poliláctico a un aloinjerto óseo estimula la angiogénesis.
3. La asociación de un producto de biovidrio nanoparticulado de fosfato de calcio embebido en fibra de ácido poliláctico a un aloinjerto óseo promueve y acelera el proceso de neoformación ósea y favorece la osteointegración del aloinjerto mediante una osificación intramembranosa.
4. Las dos composiciones del biovidrio nanoparticulado de fosfato de calcio embebido en fibra de ácido poliláctico no presentan diferencias significativas en su capacidad de estimular la osteointegración ni la angiogénesis.
5. La capacidad de inducir la osteointegración y la angiogénesis de un biovidrio nanoparticulado de fosfato de calcio embebido en fibra de ácido poliláctico hacen de este biomaterial una alternativa a considerar en investigación traslacional y su futura aplicación en cirugía reconstructiva de defectos óseos segmentarios.

ANEXO

Comité de ética de experimentación animal (CEEA)



Generalitat de Catalunya
Departament de Territori i Sostenibilitat
Direcció General de Polítiques Ambientals
i Medi Natural

RESOLUCIÓ

Assumpte: autorització de projecte d'experimentació núm. **9535**

Identificació de l'expedient

Expedient núm. FUE-2017-00509217 relatiu a la sol·licitud d'autorització d'un projecte d'experimentació amb animals.

Antecedents

1. El centre usuari Vall d'Hebron Institut de Recerca va presentar sol·licitud d'autorització per a l'execució del projecte d'experimentació:
 - a. Títol: "Estudio preclínico sobre la revitalización de aloinjertos óseos mediante el uso de un biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico. Modelo animal en rata"
 - b. Responsable del projecte: Roberto Vélez Villa
2. La Comissió d'Experimentació Animal, com a òrgan habilitat, en data 11.10.2017 va avaluar el projecte d'acord amb l'article 34 del Reial Decret 53/2013, d'1 de febrer, amb un informe Favorable.

Fonaments de dret

1. Llei 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
2. El Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per altres finalitats científiques.
3. Directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu i del Consell de 22 de setembre de 2010 relativa a la protecció dels animals utilitzats per a finalitats científiques.
4. Reial Decret 53/2013, d'1 de febrer, pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres fins científics, incloent-hi la docència.
5. Llei 6/2013, d'11 de juny, de modificació de la Llei 32/2007, de 7 de novembre, per a la cura dels animals, en la seva explotació, transport, experimentació i sacrifici.

Resolució

Per tant, resolc:

1. Informar Favorablement la sol·licitud d'autorització del projecte d'experimentació que es relaciona a continuació:

Títol: "Estudio preclínico sobre la revitalización de aloinjertos óseos mediante el uso de un biovidrio nanoparticulado de fosfato cálcico embebido en fibra de ácido poliláctico. Modelo animal en rata"

Responsable del projecte: Roberto Vélez Villa

Usuari: Vall d'Hebron Institut de Recerca

Instal·lació on es realitzarà el projecte: Vall d'Hebron Institut de Recerca

2. Assignar al projecte el núm. d'ordre: 9535
3. Autoritzar la realització d'aquest projecte d'experimentació cinc anys a partir de la data de signatura d'aquesta resolució.

Aquesta autorització no eximeix del compliment i disposició d'altres autoritzacions, d'acord amb la normativa sectorial vigent.

Contra aquesta resolució que no exhaureix la via administrativa, es pot interposar recurs d'alçada davant la secretària de Medi Ambient i Sostenibilitat en el termini d'un mes, a comptar de l'endemà de la notificació d'aquesta resolució, segons el que estableix l'article 112, 121 i 122 de la Llei 39/2015, d'1 d'octubre, del procediment administratiu comú de les administracions públiques.

El director general de Polítiques Ambientals i Medi Natural

CPISR-1 C
Ferran
Miralles
Sabadell

Signat digitalment per CPISR-1 C Ferran
Miralles Sabadell
DNI e-CPISR-1 C Departament de Territori i
Sostenibilitat, Medi Natural i Medi Urbà
www.ssr.cat CPISR-1 C Ferran Miralles
Departament de Territori i Sostenibilitat, Medi Natural i Medi Urbà
Sabadell, Spain Ferran Miralles
cpisr@cpisr.cat CPISR-1 C
Ferran Miralles Sabadell
Data: 2017.03.01 14:20:48 -0700

BIBLIOGRAFÍA

1. Kawaguchi N, Ahmed AR, Matsumoto S, Manabe J, Matsushita Y. The concept of curative margin in surgery for bone and soft tissue sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Feb;(419):165–72.
2. Allison DC, Carney SC, Ahlmann ER, Hendifar A, Chawla S, Fedenko A, et al. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma*. 2012;2012:704872.
3. Bacci G, Ferrari S, Lari S, Mercuri M, Donati D, Longhi A, et al. Osteosarcoma of the limb. Amputation or limb salvage in patients treated by neoadjuvant chemotherapy. *J Bone Joint Surg Br*. 2002 Jan;84(1):88–92.
4. Bacci G, Longhi A, Fagioli F, Briccoli A, Versari M, Picci P. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities: 27 year experience at Rizzoli Institute, Italy. *European Journal of Cancer*. 2005 Dec 1;41(18):2836–45.
5. Kawaguchi N, Ahmed AR, Matsumoto S, Manabe J, Matsushita Y. The concept of curative margin in surgery for bone and soft tissue sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Feb;(419):165–72.
6. Pollock RC, Stalley PD. Biopsy of musculoskeletal tumours--beware. *ANZ J Surg*. 2004 Jul;74(7):516–9.
7. Cañadell J, Forriol F, Cara JA. Removal of metaphyseal bone tumours with preservation of the epiphysis. Physeal distraction before excision. *J Bone Joint Surg Br*. 1994 Jan;76(1):127–32.
8. Kumta SM, Chow TC, Griffith J, Li CK, Kew J, Leung PC. Classifying the location of osteosarcoma with reference to the epiphyseal plate helps determine the optimal skeletal resection in limb salvage procedures. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1999;119(5–6):327–31.
9. Farfalli GL, Aponte-Tinao L, Lopez-Millán L, Ayerza MA, Muscolo DL. Clinical and functional outcomes of tibial intercalary allografts after tumor resection. *Orthopedics*. 2012 Mar 7;35(3):e391-396.
10. Aponte-Tinao L, Farfalli GL, Ritacco LE, Ayerza MA, Muscolo DL. Intercalary Femur Allografts Are an Acceptable Alternative After Tumor Resection. *Clin Orthop Relat Res*. 2012 Mar;470(3):728–34.

11. Fowler BL, Dall BE, Rowe DE. Complications associated with harvesting autogenous iliac bone graft. *Am J Orthop*. 1995 Dec;24(12):895–903.
12. Gazdag null, Lane null, Glaser null, Forster null. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg*. 1995 Jan;3(1):1–8.
13. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts : a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am*. 2001 Jul;83-A(7):971–86.
14. Garcia-Coiradas J, Garcia-Maroto R, Cebrian JL, Lopez-Duran L. Structural bone allograft fractures in oncological procedures. *Int Orthop*. 2015 Nov;39(11):2261–5.
15. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Mar;(324):86–97.
16. Bullens PHJ, Minderhoud NM, de Waal Malefijt MC, Veth RPH, Buma P, Schreuder HWB. Survival of massive allografts in segmental oncological bone defect reconstructions. *Int Orthop*. 2009 Jun;33(3):757–60.
17. Hazan EJ, Hornicek FJ, Tomford W, Gebhardt MC, Mankin HJ. The effect of adjuvant chemotherapy on osteoarticular allografts. *Clin Orthop Relat Res*. 2001 Apr;(385):176–81.
18. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA. Massive allograft use in orthopedic oncology. *Orthop Clin North Am*. 2006 Jan;37(1):65–74.
19. Ortiz-Cruz E, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Mankin HJ. The results of transplantation of intercalary allografts after resection of tumors. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Am*. 1997 Jan;79(1):97–106.
20. Capanna R, Bufalini C, Campanacci M. A new technique for reconstructions of large metadiaphyseal bone defects. *Orthop Traumatol*. 1993 Sep 1;2(3):159–77.
21. Soldado F, Fontecha CG, Haddad S, Corona P, Collado D, Llusá M, et al. Composite vascularized fibular epiphyseo-osteo-periosteal transfer for hip reconstruction after proximal femoral tumoral resection in a 4-year-old child. *Microsurgery*. 2012 Sep;32(6):489–92.
22. Soldado F, Garcia Fontecha C, Haddad S, Hernandez-Fernandez A, Corona P, Guerra-Farfan E. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia with vascularized fibular periosteal transplant. *Microsurgery*. 2012 Jul;32(5):397–400.
23. Trignano E, Fallico N, Faenza M, Rubino C, Chen H-C. Free fibular flap with

- periosteal excess for mandibular reconstruction. *Microsurgery*. 2013 Oct;33(7):527–33.
24. Soldado F, Gallardo P, Lidia S-C, Md F, Josep B-D, Mascarenhas V, et al. Vascularized fibular grafts extended with vascularized periosteum in children. *Microsurgery*. 2016 Apr 26;37.
25. Barrera-Ochoa SS, Soldado F, Rodriguez-Baeza A, Diaz-Gallardo P, Hodgson F, Corona PS, et al. Vascularized humeral periosteal flap to treat lateral humeral condyle nonunion: An anatomical study and report of two successfully-treated pediatric cases. *Microsurgery*. 2017 Nov 10;
26. Gallardo-Calero I, Barrera-Ochoa S, Manzanares MC, Sallent A, Vicente M, López-Fernández A, et al. Vascularized Periosteal Flaps Accelerate Osteointegration and Revascularization of Allografts in Rats. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®] [Internet]. 2018 Oct 2 [cited 2018 Oct 8]; Publish Ahead of Print. Available from: https://journals.lww.com/clinorthop/Abstract/publishahead/Vascularized_Periosteal_Flaps_Accelerate.98440.aspx?platform=hootsuite
27. Ginebra MP, Aparicio C, Engel E, Navarro M, Javier Gil F, Planell JA. Calcium phosphate bone substitutes. *Med J Malaysia*. 2004 May;59 Suppl B:65–6.
28. Charles-Harris M, Navarro M, Engel E, Aparicio C, Ginebra MP, Planell JA. Surface characterization of completely degradable composite scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Dec;16(12):1125–30.
29. Charles-Harris M, Koch MA, Navarro M, Lacroix D, Engel E, Planell JA. A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Apr;19(4):1503–13.
30. Zekry KM, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Alkhoody AZA, Abd-Elfattah AS, et al. Reconstruction of intercalary bone defect after resection of malignant bone tumor. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2019 Apr;27(1):2309499019832970.
31. Shibuya N, Jupiter DC. Bone graft substitute: allograft and xenograft. *Clin Podiatr Med Surg*. 2015 Jan;32(1):21–34.
32. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 2008 Oct 6;5(27):1137–58.
33. El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS, et al. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 Mar;24(7):1213–21.

34. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(7):944–53.
35. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLoS ONE*. 2019;14(6):e0218404.
36. Brotto M, Bonewald L. Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*. 2015 Nov;80:109–14.
37. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica. Texto y atlas*. 5a edición. Barcelona: Masson; 2002.
38. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem*. 2005;70:301–39.
39. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *CJASN*. 2008 Nov 1;3(Supplement 3):S131–9.
40. Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*. 1995 May;16(5):533–44.
41. Allgrove J. Physiology of Calcium, Phosphate, Magnesium and Vitamin D. *Endocr Dev*. 2015;28:7–32.
42. Bolívar G. Hidroxiapatita: Estructura, Síntesis, Cristales y Usos [Internet]. Lifeder. 2018 [cited 2019 Aug 15]. Available from: <https://www.lifeder.com/hidroxiapatita/>
43. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Dec 30;228(1–2):79–102.
44. Kylmaja E, Nakamura M, Tuukkanen J. Osteoclasts and Remodeling Based Bone Formation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(8):626–33.
45. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018;59(2):99–107.
46. Hueso. In: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 15]. Available from: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Hueso&oldid=118152303>
47. Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008 May;3(2):131–45.
48. C. Karaplis A. Embryonic Development of Bone and Regulation of

Intramembranous and Endochondral Bone Formation. In: Principles of Bone Biology. 2002. p. 33–58.

49. Osificación endocondral [Internet]. Los Húmero Uno. 2017 [cited 2019 Aug 15]. Available from: <https://loshumerouno.wordpress.com/embriologia/osificacion-endocondral/>

50. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. Eur J Cancer Care (Engl). 2017 Nov;26(6).

51. Judex S, Garman R, Squire M, Donahue L-R, Rubin C. Genetically based influences on the site-specific regulation of trabecular and cortical bone morphology. J Bone Miner Res. 2004 Apr;19(4):600–6.

52. Kapur S, Baylink DJ, Lau K-HW. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. Bone. 2003 Mar;32(3):241–51.

53. Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004 Aug 6;320(4):1163–8.

54. Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. Gene. 2006 Feb 15;367:1–16.

55. Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, Bevis PJR, Huang CL-H. Forty years of calcitonin--where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre, FRS. Bone. 2002 May;30(5):655–63.

56. Cosman F, Lindsay R. Therapeutic potential of parathyroid hormone. Curr Osteoporos Rep. 2004 Mar;2(1):5–11.

57. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. Compr Physiol. 2016 Mar 15;6(2):561–601.

58. van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2001;11(1–3):199–226.

59. La Calcitonina Es El Agonista A PTH Ilustración del Vector - Ilustración de hueso, enfermedad: 59085590 [Internet]. Dreamstime. [cited 2019 Aug 15]. Available from: <https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustración-la-calcitonina-es-el-agonista-pth-image59085590>

60. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001 Mar 9;104(5):719–30.
61. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*. 2002 Jun;23(3):279–302.
62. Herrmann BL, Saller B, Janssen OE, Gocke P, Bockisch A, Sperling H, et al. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Dec;87(12):5476–84.
63. Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O'Fallon WM. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Apr;87(4):1550–4.
64. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev*. 2004 Jun;25(3):389–425.
65. Frysak Z, Schovanek J, Iacobone M, Karasek D. Insulin-like Growth Factors in a clinical setting: Review of IGF-I. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015 Sep;159(3):347–51.
66. Muñoz-Torres M, Mezquita-Raya P, Lopez-Rodriguez F, Torres-Vela E, de Dios Luna J, Escobar-Jimenez F. The contribution of IGF-I to skeletal integrity in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001 Dec;55(6):759–66.
67. Barhanpurkar AP, Gupta N, Srivastava RK, Tomar GB, Naik SP, Joshi SR, et al. IL-3 promotes osteoblast differentiation and bone formation in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb 24;418(4):669–75.
68. Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. *J Immunol*. 2005 Jul 15;175(2):917–25.
69. Sims NA. Cell-specific paracrine actions of IL-6 family cytokines from bone, marrow and muscle that control bone formation and resorption. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;79:14–23.
70. Kim JG, Lim KS, Ku S-Y, Kim SH, Choi YM, Moon SY. Relations between interleukin-1, its receptor antagonist gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *J Bone Miner Metab*. 2006;24(1):53–7.

71. Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S227-232.
72. Dole NS, Mazur CM, Acevedo C, Lopez JP, Monteiro DA, Fowler TW, et al. Osteocyte-Intrinsic TGF- β Signaling Regulates Bone Quality through Perilacunar/Canalicular Remodeling. *Cell Rep.* 2017 Nov 28;21(9):2585–96.
73. Zhen G, Wen C, Jia X, Li Y, Crane JL, Mears SC, et al. Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med.* 2013 Jun;19(6):704–12.
74. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Jun 1;8(6).
75. Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology.* 2001 Aug;142(8):3546–53.
76. Upadhyay J, Farr OM, Mantzoros CS. The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metab Clin Exp.* 2015 Jan;64(1):105–13.
77. Tu P, Duan P, Zhang R-S, Xu D-B, Wang Y, Wu H-P, et al. Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in post-menopausal women. *Osteoporos Int.* 2015 Jan;26(1):179–85.
78. McGrath EE. OPG/RANKL/RANK pathway as a therapeutic target in cancer. *J Thorac Oncol.* 2011 Sep;6(9):1468–73.
79. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology.* 2001 Dec 1;142(12):5050–5.
80. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011 May 31;9:66.
81. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(5):315–37.
82. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S7-21.
83. Komatsu DE, Warden SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *J Cell Biochem.* 2010 Feb 1;109(2):302–11.
84. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6.

85. Choi IH, Cho T-J, Moon HJ. Ilizarov Treatment of Congenital Pseudarthrosis of the Tibia: A Multi-Targeted Approach Using the Ilizarov Technique. *Clin Orthop Surg*. 2011 Mar;3(1):1–8.
86. Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop Relat Res*. 1990 Jan;(250):81–104.
87. Kirane YM, Fragomen AT, Rozbruch SR. Precision of the PRECICE® Internal Bone Lengthening Nail. *Clin Orthop Relat Res*. 2014 Dec;472(12):3869–78.
88. Fischgrund J, Paley D, Suter C. Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res*. 1994 Apr;(301):31–7.
89. Gubin AV, Borzunov DY, Marchenkova LO, Malkova TA, Smirnova IL. Contribution of G.A. Ilizarov to bone reconstruction: historical achievements and state of the art. *Strategies Trauma Limb Reconstr*. 2016 Nov;11(3):145–52.
90. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2000 Jun;45(3):346–53.
91. Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res*. 2004 Jan;22(1):73–9.
92. Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) system. *Injury*. 2009 Nov;40(11):1231–6.
93. Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury*. 2011 Jun;42(6):591–8.
94. Morelli I, Drago L, George DA, Gallazzi E, Scarponi S, Romanò CL. Masquelet technique: myth or reality? A systematic review and meta-analysis. *Injury*. 2016 Dec;47 Suppl 6:S68–76.
95. Ley P, Gosselin RA, Villar R. The Masquelet induced-membrane technique: an option for a tertiary-referral conflict setting. *J Surg Case Rep [Internet]*. 2019 Jun 28 [cited 2019 Aug 21];2019(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6598633/>
96. Gerwin M, Weiland AJ. Vascularized bone grafts to the upper extremity. Indications and technique. *Hand Clin*. 1992 Aug;8(3):509–23.

97. Yajima H, Tamai S, Ono H, Kizaki K. Vascularized bone grafts to the upper extremities. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Mar;101(3):727–35; discussion 736-737.
98. Trignano E, Fallico N, Nitto A, Chen H-C. The treatment of composite defect of bone and soft tissues with a combined latissimus dorsi and serratus anterior and rib free flap. *Microsurgery*. 2013 Mar;33(3):173–83.
99. Brenner P, Zwipp H, Rammelt S. Vascularized double barrel ribs combined with free serratus anterior muscle transfer for homologous restoration of the hindfoot after calcaneotomy. *J Trauma*. 2000 Aug;49(2):331–5.
100. Zaker Shahrak A, Zor F, Kanatas A, Acikel C, Sapountzis S, Nicoli F, et al. Morphological and morphometric evaluation of the ilium, fibula, and scapula bones for oral and maxillofacial reconstruction. *Microsurgery*. 2014 Nov;34(8):638–45.
101. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Feb;(371):10–27.
102. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 May;84(5):716–20.
103. Petersen MM, Hovgaard D, Elberg JJ, Rechnitzer C, Daugaard S, Muhic A. Vascularized Fibula Grafts for Reconstruction of Bone Defects after Resection of Bone Sarcomas. *Sarcoma* [Internet]. 2010 [cited 2019 Aug 17];2010. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871185/>
104. Calvo R, Figueroa D, Díaz-Ledezma C, Vaisman A, Figueroa F. [Bone allografts and the functions of bone banks]. *Rev Med Chil*. 2011 May;139(5):660–6.
105. Houdek MT, Wagner ER, Stans AA, Shin AY, Bishop AT, Sim FH, et al. What Is the Outcome of Allograft and Intramedullary Free Fibula (Capanna Technique) in Pediatric and Adolescent Patients With Bone Tumors? *Clin Orthop Relat Res*. 2016 Mar;474(3):660–8.
106. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014 Oct;25(10):2445–61.
107. Charalambides C, Beer M, Cobb AG. Poor results after augmenting autograft with xenograft (Surgibone) in hip revision surgery: a report of 27 cases. *Acta Orthop*. 2005 Aug;76(4):544–9.

108. Pasquali PJ, Teixeira ML, de Oliveira TA, de Macedo LGS, Aloise AC, Pelegrine AA. Maxillary Sinus Augmentation Combining Bio-Oss with the Bone Marrow Aspirate Concentrate: A Histomorphometric Study in Humans. *Int J Biomater* [Internet]. 2015 [cited 2019 Sep 9];2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620258/>
109. Rose FRAJ, Oreffo ROC. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 22;292(1):1–7.
110. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004 Aug 9;4(8):743–65.
111. Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int*. 2010 Nov 11;2010:215625.
112. Kim S-J, Shin Y-W, Yang K-H, Kim S-B, Yoo M-J, Han S-K, et al. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast(Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009 Feb 12;10:20.
113. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, et al. Tissue engineered ceramic artificial joint--ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*. 2005 Aug;26(22):4654–61.
114. Anusuya GS, Kandasamy M, Jacob Raja SA, Sabarinathan S, Ravishankar P, Kandhasamy B. Bone morphogenetic proteins: Signaling periodontal bone regeneration and repair. *J Pharm Bioallied Sci*. 2016 Oct;8(Suppl 1):S39–41.
115. Blokhuis TJ. Formulations and delivery vehicles for bone morphogenetic proteins: latest advances and future directions. *Injury*. 2009 Dec;40 Suppl 3:S8-11.
116. 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.
117. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br*. 2009 Aug;91(8):987–96.
118. Argintar E, Edwards S, Delahay J. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic

trauma surgery. *Injury*. 2011 Aug;42(8):730–4.

119. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jul;87(7):1430–7.

120. Jäger M, Hertel M, Fochtmann U, Fischer J, Hernigou P, Zilkens C, et al. Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *J Orthop Res*. 2011 Feb;29(2):173–80.

121. Im G-I, Shin Y-W, Lee K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Oct;13(10):845–53.

122. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211–28.

123. Castillo AB, Jacobs CR. Mesenchymal stem cell mechanobiology. *Curr Osteoporosis Rep*. 2010 Jun;8(2):98–104.

124. Chahla J, Mannava S, Cinque ME, Geeslin AG, Codina D, LaPrade RF. Bone Marrow Aspirate Concentrate Harvesting and Processing Technique. *Arthroscopy Techniques*. 2017 Apr 1;6(2):e441–5.

125. Kondo H, Matsuda R, Yonezawa Y. Platelet-derived growth factor in combination with collagen promotes the migration of human skin fibroblasts into a denuded area of a cell monolayer. *Exp Cell Res*. 1992 Sep;202(1):45–51.

126. Tsai C-H, Hsu H-C, Chen Y-J, Lin M-J, Chen H-T. Using the growth factors-enriched platelet glue in spinal fusion and its efficiency. *J Spinal Disord Tech*. 2009 Jun;22(4):246–50.

127. Yang D, Chen J, Jing Z, Jin D. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA: a self-imposed cytokine in the proliferation of human fetal osteoblasts. *Cytokine*. 2000 Aug;12(8):1271–4.

128. Weiner BK, Walker M. Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions. *Spine*. 2003 Sep 1;28(17):1968–70; discussion 1971.

129. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-27.

130. Akkouch A, Zhang Z, Rouabhia M. A novel collagen/hydroxyapatite/poly(lactide-

co- ϵ -caprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Mar 15;96(4):693–704.

131. Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2007 Aug;82(2):494–505.

132. Lerner T, Bullmann V, Schulte TL, Schneider M, Liljenqvist U. A level-1 pilot study to evaluate of ultraporous beta-tricalcium phosphate as a graft extender in the posterior correction of adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2009 Feb;18(2):170–9.

133. Bigi A, Foresti E, Gregorini R, Ripamonti A, Roveri N, Shah JS. The role of magnesium on the structure of biological apatites. *Calcif Tissue Int*. 1992 May;50(5):439–44.

134. Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S, Sandri M, Logroscino G. Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. *Acta Biomater*. 2007 Nov;3(6):961–9.

135. Hydroxyapatite for Biomolecule Purification [Internet]. GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News. 2010 [cited 2019 Sep 9]. Available from: <https://www.genengnews.com/magazine/131/hydroxyapatite-for-biomolecule-purification/>

136. Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*. 1995 Mar 24;267(5205):1796–9.

137. Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC. BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J Biomed Mater Res*. 1998;43(4):428–32.

138. Podaropoulos L, Veis AA, Papadimitriou S, Alexandridis C, Kalyvas D. Bone regeneration using beta-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. *J Oral Implantol*. 2009;35(1):28–36.

139. Walsh WR, Morberg P, Yu Y, Yang JL, Haggard W, Sheath PC, et al. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Jan;(406):228–36.

140. Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (ϵ -caprolactone), and their copolymers in

vivo. *Biomaterials*. 1981 Oct;2(4):215–20.

141. Porter JR, Henson A, Popat KC. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):780–8.

142. Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials*. 1991 Apr;12(3):292–304.

143. Hak DJ. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg*. 2007 Sep;15(9):525–36.

144. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015 Dec;81:112–21.

145. Tsuchiya H, Shirai T, Nishida H, Murakami H, Kabata T, Yamamoto N, et al. Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine. *J Orthop Sci*. 2012 Sep;17(5):595–604.

146. Tampieri A, Celotti G, Landi E, Sandri M, Roveri N, Falini G. Biologically inspired synthesis of bone-like composite: self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Nov 1;67(2):618–25.

147. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Oct 1;71(1):108–17.

148. Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G. In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. *Biomaterials*. 1993;14(2):97–106.

149. Lawson AC, Czernuszka JT. Collagen--calcium phosphate composites. *Proc Inst Mech Eng H*. 1998;212(6):413–25.

150. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect*. 2001 Oct;49(2):87–93.

151. Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater*. 2006 Mar 28;11:43–56.

152. Pape HC, Pufe T. Bone defects and nonunions--What role does vascularity play in filling the gap? *Injury*. 2010 Jun;41(6):553–4.

153. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 Dec;36(12):1392–404.

154. Andreassen TT, Fledelius C, Ejersted C, Oxlund H. Increases in callus formation and mechanical strength of healing fractures in old rats treated with parathyroid hormone. *Acta Orthop Scand*. 2001 Jun;72(3):304–7.
155. Tebruegge M, Jones C, de Graaf H, Sukhtankar P, Allan RN, Howlin RP, et al. Invasive *Propionibacterium acnes* infections in a non-selective patient cohort: clinical manifestations, management and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Mar;34(3):527–34.
156. Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A Standardized Critical Size Defect Model in Normal and Osteoporotic Rats to Evaluate Bone Tissue Engineered Constructs. *Biomed Res Int [Internet]*. 2014 [cited 2019 Sep 11];2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967594/>
157. Yasuda H, Yano K, Wakitani S, Matsumoto T, Nakamura H, Takaoka K. Repair of critical long bone defects using frozen bone allografts coated with an rhBMP-2-retaining paste. *J Orthop Sci*. 2012 May;17(3):299–307.
158. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl)*. 2005 May;50(5):137–42.
159. Koefoed M, Ito H, Gromov K, Reynolds DG, Awad HA, Rubery PT, et al. Biological effects of rAAV-caAlk2 coating on structural allograft healing. *Mol Ther*. 2005 Aug;12(2):212–8.
160. Hoffman MD, Benoit DSW. Emerging ideas: Engineering the periosteum: revitalizing allografts by mimicking autograft healing. *Clin Orthop Relat Res*. 2013 Mar;471(3):721–6.
161. Amorosa LF, Lee CH, Aydemir AB, Nizami S, Hsu A, Patel NR, et al. Physiologic load-bearing characteristics of autografts, allografts, and polymer-based scaffolds in a critical sized segmental defect of long bone: an experimental study. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:1637–43.
162. Seo SW, Cho SK, Storer SK, Lee FY. Zoledronate reduces unwanted bone resorption in intercalary bone allografts. *Int Orthop*. 2010 Apr;34(4):599–603.
163. Glatt V, Matthys R. Adjustable stiffness, external fixator for the rat femur osteotomy and segmental bone defect models. *J Vis Exp*. 2014 Oct 9;(92):e51558.
164. Jaffe N. Historical perspective on the introduction and use of chemotherapy for

the treatment of osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol.* 2014;804:1–30.

165. Mason GE, Aung L, Gall S, Meyers PA, Butler R, Krüg S, et al. Quality of life following amputation or limb preservation in patients with lower extremity bone sarcoma. *Front Oncol.* 2013;3:210.

166. Han G, Bi W-Z, Xu M, Jia J-P, Wang Y. Amputation Versus Limb-Salvage Surgery in Patients with Osteosarcoma: A Meta-analysis. *World J Surg.* 2016 Aug;40(8):2016–27.

167. Li X, Zhang Y, Wan S, Li H, Li D, Xia J, et al. A comparative study between limb-salvage and amputation for treating osteosarcoma. *J Bone Oncol.* 2016 Mar;5(1):15–21.

168. Rosenberg SA, Tepper J, Glatstein E, Costa J, Baker A, Brennan M, et al. The treatment of soft-tissue sarcomas of the extremities: prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy. *Ann Surg.* 1982 Sep;196(3):305–15.

169. Karakousis CP, Emrich LJ, Rao U, Khalil M. Selective combination of modalities in soft tissue sarcomas: limb salvage and survival. *Semin Surg Oncol.* 1988;4(1):78–81.

170. Jeys LM, Luscombe JS, Grimer RJ, Abudu A, Tillman RM, Carter SR. The risks and benefits of radiotherapy with massive endoprosthetic replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 Oct;89(10):1352–5.

171. Sorkin AM, Dee KC, Knothe Tate ML. “Culture shock” from the bone cell’s perspective: emulating physiological conditions for mechanobiological investigations. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2004 Dec;287(6):C1527-1536.

172. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res.* 2001 May;55(2):203–16.

173. Barbeck M, Serra T, Booms P, Stojanovic S, Najman S, Engel E, et al. Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioact Mater.* 2017 Jun 23;2(4):208–23.

174. Perán M, García MA, López-Ruiz E, Bustamante M, Jiménez G, Madeddu R, et al. Functionalized nanostructures with application in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3847–86.

175. Dziadek M, Pawlik J, Menaszek E, Stodolak-Zych E, Cholewa-Kowalska K. Effect of the preparation methods on architecture, crystallinity, hydrolytic degradation, bioactivity, and biocompatibility of PCL/bioglass composite scaffolds. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2015 Nov;103(8):1580–93.
176. Sanzana ES, Navarro M, Ginebra M-P, Planell JA, Ojeda AC, Montecinos HA. Role of porosity and pore architecture in the in vivo bone regeneration capacity of biodegradable glass scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Jun;102(6):1767–73.
177. Castaño O, Sachot N, Xuriguera E, Engel E, Planell JA, Park J-H, et al. Angiogenesis in bone regeneration: tailored calcium release in hybrid fibrous scaffolds. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 May 28;6(10):7512–22.
178. Álvarez Z, Mateos-Timoneda MA, Hyroššová P, Castaño O, Planell JA, Perales JC, et al. The effect of the composition of PLA films and lactate release on glial and neuronal maturation and the maintenance of the neuronal progenitor niche. *Biomaterials*. 2013 Mar;34(9):2221–33.
179. Álvarez Z, Castaño O, Castells AA, Mateos-Timoneda MA, Planell JA, Engel E, et al. Neurogenesis and vascularization of the damaged brain using a lactate-releasing biomimetic scaffold. *Biomaterials*. 2014 Jun;35(17):4769–81.
180. Yildirimer L, Seifalian AM. Three-dimensional biomaterial degradation - Material choice, design and extrinsic factor considerations. *Biotechnol Adv*. 2014 Oct;32(5):984–99.
181. Friedenstein AY. Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clin Orthop Relat Res*. 1968 Aug;59:21–37.
182. Tang Z, Li X, Tan Y, Fan H, Zhang X. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regen Biomater*. 2018 Feb;5(1):43–59.
183. Yang Z, Yuan H, Tong W, Zou P, Chen W, Zhang X. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*. 1996 Nov;17(22):2131–7.
184. Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, Feng J, Yang Z, De Groot K, et al. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 Jan;12(1):7–13.
185. Barrère F, van der Valk CM, Dalmeijer RAJ, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal

- implants. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Sep 15;66(4):779–88.
186. Lin P-L, Fang H-W, Tseng T, Lee W-H. Effects of hydroxyapatite dosage on mechanical and biological behaviors of polylactic acid composite materials. *Materials Letters*. 2007 Jun 1;61(14):3009–13.
187. Nejati E, Firouzdor V, Eslaminejad MB, Bagheri F. Needle-like nano hydroxyapatite/poly(l-lactide acid) composite scaffold for bone tissue engineering application. *Materials Science and Engineering: C*. 2009 Apr 30;29(3):942–9.
188. Bus MPA, Dijkstra PDS, van de Sande M a. J, Taminiau AHM, Schreuder HWB, Jutte PC, et al. Intercalary allograft reconstructions following resection of primary bone tumors: a nationwide multicenter study. *J Bone Joint Surg Am*. 2014 Feb 19;96(4):e26.
189. Vander Griend RA. The effect of internal fixation on the healing of large allografts. *J Bone Joint Surg Am*. 1994 May;76(5):657–63.
190. Thompson RC, Pickvance EA, Garry D. Fractures in large-segment allografts. *J Bone Joint Surg Am*. 1993 Nov;75(11):1663–73.
191. Ketonis C, Barr S, Adams CS, Hickok NJ, Parvizi J. Bacterial colonization of bone allografts: establishment and effects of antibiotics. *Clin Orthop Relat Res*. 2010 Aug;468(8):2113–21.
192. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Mar;(324):86–97.
193. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao L, Ranalletta M, Abalo E. Intercalary femur and tibia segmental allografts provide an acceptable alternative in reconstructing tumor resections. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Sep;(426):97–102.
194. Jamshidi K, Bahrabadi M, Mirzaei A. Long-term Results of Osteoarticular Allograft Reconstruction in Children with Distal Femoral Bone Tumors. *Arch Bone Jt Surg*. 2017 Sep;5(5):296–301.
195. Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AG, Bock N, Textor M, Downes S. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 2001 Jun 15;55(4):475–86.
196. Hasegawa S, Tamura J, Neo M, Goto K, Shikinami Y, Saito M, et al. In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/poly-DL-lactide composite for use as a bone substitute. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Dec 1;75(3):567–79.

197. Jeong SI, Ko EK, Yum J, Jung CH, Lee YM, Shin H. Nanofibrous poly(lactic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration. *Macromol Biosci.* 2008 Apr 9;8(4):328–38.
198. Wang XH, Shi S, Guo G, Fu SZ, Fan M, Luo F, et al. Preparation and characterization of a porous scaffold based on poly(D,L-lactide) and N-hydroxyapatite by phase separation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011;22(14):1917–29.
199. Oliveira H, Catros S, Boiziau C, Siadous R, Marti-Munoz J, Bareille R, et al. The proangiogenic potential of a novel calcium releasing biomaterial: Impact on cell recruitment. *Acta Biomater.* 2016 Jan;29:435–45.
200. Oliveira H, Catros S, Castano O, Rey S, Siadous R, Clift D, et al. The proangiogenic potential of a novel calcium releasing composite biomaterial: Orthotopic in vivo evaluation. *Acta Biomater.* 2017;54:377–85.
201. Nguyen LH, Annabi N, Nikkhah M, Bae H, Binan L, Park S, et al. Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012 Oct;18(5):363–82.
202. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.* 2011 Jun;11(6):471–91.
203. Lee G-H, Hwang J-D, Choi J-Y, Park H-J, Cho J-Y, Kim K-W, et al. An acidic pH environment increases cell death and pro-inflammatory cytokine release in osteoblasts: the involvement of BAX inhibitor-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Sep;43(9):1305–17.
204. Nakade O, Takahashi K, Takuma T, Aoki T, Kaku T. Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic protein-2 and -4 of normal human bone cells. *J Bone Miner Metab.* 2001;19(1):13–9.
205. González-Vázquez A, Planell JA, Engel E. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 2014 Jun;10(6):2824–33.
206. Bertuoli PT, Ordoño J, Armelin E, Pérez-Amodio S, Baldissera AF, Ferreira Carlos A, et al. Electrospun Conducting and Biocompatible Uniaxial and Core–Shell Fibers Having Poly(lactic acid), Poly(ethylene glycol), and Polyaniline for Cardiac Tissue Engineering. *ACS Omega.* 2019 Feb 19;4(2):3660–72.
207. Capanna R, Campanacci DA, Belot N, Beltrami G, Manfrini M, Innocenti M, et al. A new reconstructive technique for intercalary defects of long bones: the association of

massive allograft with vascularized fibular autograft. Long-term results and comparison with alternative techniques. *Orthop Clin North Am.* 2007 Jan;38(1):51–60, vi.

