

En la actualidad, uno de los mayores retos de la ingeniería tisular es encontrar biomateriales que actúen como sustitutos óseos para el tratamiento de fracturas y defectos óseos. Ante esta situación, el IBV, junto a INASMET-Tecnalia y otros grupos de investigación y empresas europeas, ha llevado a cabo el proyecto NANOBIOCOM, con el objetivo de desarrollar un nuevo biomaterial polimérico poroso para el tratamiento de defectos óseos de tamaño crítico.

El resultado de este proyecto ha sido la obtención de un nuevo biomaterial que presenta unas propiedades mecánicas y una tasa de regeneración de tejidos mejores que las alcanzadas por la mayor parte de los biomateriales del mismo tipo ya desarrollados.

### **NANOBIOCOM Project: New biomaterial development for treatment of bone defects**

Nowadays, one of the tissue engineering challenges is to find biomaterials for bone fractures and defects treatment. At this point, IBV, INASMET-Tecnalia and other European research groups and enterprises have collaborated in NANOBIOCOM project, in which a new porous polymeric biomaterial development for treatment of critical bone defects was carried out.

The result of this project has been a new biomaterial with better mechanical properties and a tissue regeneration rate than other similar biomaterials.

## **Proyecto NANOBIOCOM: Desarrollo de un nuevo biomaterial para el tratamiento de defectos en tejido óseo**

**Víctor J. Primo Capella\***, **José Luis Peris Serra\*\***, **Iñigo Morales Martín\***, **Ignacio Bermejo Bosch\*\***, **Carlos Atienza Vicente\*\***, **María Jesús Jurado Oñate\*\*\***, **Raquel Lax Pérez\*\*\*\***, **Juan Vicent Vera\*\*\*\***, **Benito R. Picazo Gabaldón\*\*\*\***

\* CIBER-BBN

\*\* INSTITUTO DE BIOMECÁNICA DE VALENCIA

\*\*\* FUNDACIÓN INASMET

\*\*\*\* HOSPITAL GENERAL DE CASTELLÓN

### **INTRODUCCIÓN**

Durante muchos años, uno de los retos de la **Ingeniería tisular** aplicada a la cirugía ortopédica y traumatológica ha sido y es encontrar materiales que actúen como sustitutos óseos para el tratamiento de fracturas y regeneración de defectos producidos por causas tan diversas como las resecciones tumorales o graves traumatismos por accidente.

Hasta el momento, existen gran cantidad de biomateriales capaces de regenerar tejido óseo. Dichos materiales se basan, generalmente, en cerámicas y polímeros biodegradables de estructura porosa que permiten el crecimiento celular y la formación de tejido óseo a través de ellos, consiguiendo con el tiempo ser sustituidos por este nuevo hueso formado. El principal problema de estos biomateriales es que, a pesar de poseer buenas cualidades biológicas, no presentan características mecánicas que permitan su implantación en zonas donde las sollicitaciones mecánicas son elevadas, como pueden ser la diáfisis de los huesos largos o la columna vertebral. Por ello, estos biomateriales han de acompañarse muchas veces por sistemas de fijación externa o por sistemas de osteosíntesis que garanticen la estabilidad mecánica del mismo.

Desde esta perspectiva, el Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV) junto con el resto de socios del proyecto NANOBIOCOM, coordinados por el centro tecnológico INASMET-Tecnalia, se plantearon como objetivo el desarrollo de un nuevo biomaterial polimérico poroso que fuera **osteoconductor** (que permita el crecimiento del hueso y lo dirija a lo largo del defecto), **osteoinductor** (que su composición induzca la formación de hueso en el defecto mediante la activación de las células implicadas en el proceso de reparación) y **biodegradable** (que finalmente el biomaterial se sustituya por hueso).

### **METODOLOGÍA EMPLEADA**

A fin de resumir la metodología empleada durante los tres años de proyecto para alcanzar el objetivo planteado, se distribuyen las tareas realizadas por los miembros del consorcio en los tres grandes bloques que se presentan a continuación por orden cronológico de ejecución.

#### **1. Definición de requisitos biomecánicos y selección de los componentes del biomaterial.**

En una primera fase, el IBV participó definiendo los **requisitos biomecánicos** que debía cumplir el material para asegurar su integridad a lo largo de la fase de evaluación *in vivo*. Para ello, el IBV utilizó un modelo de elementos finitos que permitía simular las condiciones de carga a las que se vería sometido el biomaterial una vez implantado. Como resultados de esta fase se obtuvieron

>

los valores mínimos de resistencia y módulo elástico que debía poseer el nuevo biomaterial a desarrollar.

Definidos estos requisitos, los especialistas en materiales del consorcio crearon una base de datos con todos los posibles materiales elementales (componentes) que podrían componer el nuevo biomaterial a desarrollar y seleccionaron los más adecuados, teniendo en cuenta las características de los mismos (tasa de degradación, hidrofobicidad, etc.), los requisitos anteriormente definidos y la técnica de fabricación requerida.

### 2. Selección del proceso de fabricación y elección de la composición definitiva del biomaterial.

Una vez seleccionados los componentes del nuevo biomaterial, INASMET-Tecnalia puso a punto la técnica de fabricación más adecuada a los mismos. Como resultado se obtuvo una batería de más de veinte biomateriales diferentes que variaban en la proporción de los componentes y en los parámetros del proceso de fabricación. Éstos se caracterizaron mecánicamente mediante ensayos de compresión estática realizados en el IBV, obteniendo valores para las variables: resistencia máxima, tenacidad, módulo elástico, tensión máxima, deformación y rigidez. El resultado de esta caracterización fue la selección de la composición más adecuada que debía poseer el nuevo biomaterial para que cumpliera los requisitos biomecánicos y biológicos.

### 3. Evaluación del nuevo biomaterial desarrollado.

Tras la selección del material se pasó a la fase de evaluación en la que se realizaron ensayos *in vitro* y ensayos *in vivo*. Los primeros permitieron conocer, de forma aproximada, el comportamiento biológico que poseía el material cuando se encontraba en un entorno similar al que se encontraría una vez fuese implantado.

Para los ensayos *in vivo* se seleccionó como modelo de defecto óseo el defecto de tamaño crítico en radio de conejo (Figura 1). Este modelo consiste en la generación de un defecto en radio de conejo de longitud suficiente como para asegurar que no repare por sí solo. La ventaja que ofrece este modelo frente a otros radica en que no es necesaria la utilización de fijación externa para estabilizar el defecto, dado que es el cúbito quien ejerce esta función.



Figura 1. Colocación del biomaterial en el defecto generado en la zona medial de radio de conejo.

Los tratamientos utilizados en el modelo experimental fueron los siguientes:

- Autoinjerto. Consiste en utilizar como tratamiento el fragmento óseo extraído al generar el defecto. Se elige este tratamiento como control, puesto que éste es considerado en la actualidad como el tratamiento óptimo.
- Biomaterial con **rhBMP-2**. El tratamiento consiste en la implantación del biomaterial definitivo, que incluye la adición por inmersión de proteína morfogenética para incrementar su **capacidad osteoinductiva**.
- Biomaterial sin BMP. Se realiza la implantación del biomaterial sin cargar con BMP. Este grupo permite saber si la rhBMP-2 puede tener algún efecto sobre el proceso de reparación.

Una vez cumplidos los plazos de evolución establecidos para el proceso de reparación de la fractura, se disecaron las muestras óseas y se procedió a realizar los estudios que permitieron evaluar la calidad del proceso de reparación. Estos estudios fueron:

- **Reconstrucciones 3D de los defectos y estudio densitométrico a partir de imágenes de TAC.** Todas las muestras (patas operadas y contralaterales hasta un total de 120) fueron analizadas mediante TAC clínico. Con las imágenes obtenidas se llevó a cabo la reconstrucción 3D y un estudio de las densidades a partir de la creación de cinco "máscaras" o isodensidades que abarcan el rango total de densidad de las muestras en el defecto (Figura 2).

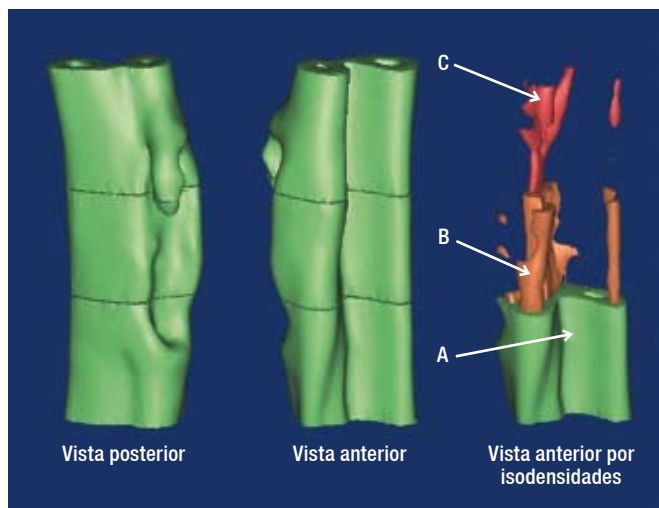


Figura 2. Reconstrucciones 3D de defecto tratado con Biomaterial con BMP a las 16 semanas.

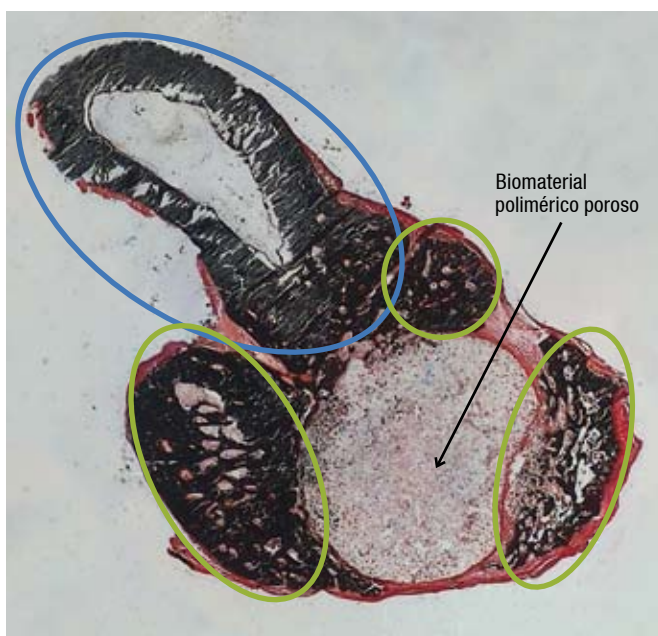
- A) "Máscara" de todo el rango de densidades del defecto (317,157 mm<sup>3</sup> de hueso con una densidad comprendida entre 0,309 – 2,586 g/cm<sup>3</sup>).
- B) "Máscara" de la isodensidad 3 (54,218 mm<sup>3</sup> de hueso regenerado con una densidad comprendida entre 1,537 – 2,061g/cm<sup>3</sup>).
- C) "Máscara" de la isodensidad 4 (2,062 – 2,586 g/cm<sup>3</sup>).

- **Ensayos mecánicos.** Se realizaron ensayos mecánicos no destructivos de flexión a cuatro puntos y destructivos de torsión con el fin de caracterizar mecánicamente los defectos reparados con cada uno de los tres tratamientos anteriormente descritos y compararlos con los valores de hueso sano.

**Tabla 1.** Tabla resumen de los resultados obtenidos para las variables de mayor interés de los estudios de densitometría, ensayos mecánicos e histomorfometría. Los valores corresponden al porcentaje resultante de comparar los valores de dichas variables para cada uno de los tratamientos con los obtenidos para el hueso sano.

	AUTOINJERTO		BIOMATERIAL CON MBP		BIOMATERIAL SIN BMP	
	8 SEMANAS	16 SEMANAS	8 SEMANAS	16 SEMANA	8 SEMANAS	
<b>RECONSTRUCCIONES 3D Y ESTUDIO DENSITOMÉTRICO</b>	% Hueso regenerado	146,68 ± 21,66 %	125,02 ± 7,57 %	126,44 ± 22,20 %	119,41 ± 13,01 %	130,43 ± 18,74 %
	Densidad media del tejido óseo en la zona central del defecto	1972 ± 82 mg/mm <sup>3</sup> (103 % con respecto al sano)	1951 ± 87 mg/mm <sup>3</sup> (102 % con respecto al sano)	1975 ± 66 mg/mm <sup>3</sup> (102 % con respecto al sano)	1994 ± 64 mg/mm <sup>3</sup> (105 % con respecto al sano)	1958 ± 53 mg/mm <sup>3</sup> (103 % con respecto al sano)
<b>ENSAYOS MECÁNICOS</b>	Par torsor	99,91 ± 25,89 %	90,65 ± 16,03 %	80,54 ± 29,92 %	85,05 ± 18,16 %	71,01 ± 19,26 %
	Rigidez torsional	115,15 ± 36,87 %	98,85 ± 21,34 %	69,78 ± 34,92 %	96,33 ± 23,18 %	100,47 ± 32,95 %
	Tenacidad	99,16 ± 33,11 %	91,19 ± 21,93 %	109,00 ± 44,92 %	79,09 ± 23,21 %	78,15 ± 27,01 %
<b>ESTUDIOS HISTOMORFOMÉTRICOS</b>	% Hueso regenerado en la zona central del defecto	84,82 ± 15,42 %	70,31 ± 7,62 %	58,51 ± 15,81 %	51,59 ± 20,60 %	56,45 ± 24,85 %

- **Estudios histomorfométricos.** Consisten en la medida de distintos parámetros indicadores de la calidad de callo de fractura, como es el área de tejido óseo mineralizado y el porcentaje de hueso regenerado, basándose en imágenes de cortes histológicos capturadas mediante fotografía digital adaptada al microscopio óptico y su posterior tratamiento mediante análisis de imagen (Figura 3).



**Figura 3.** Corte histológico de muestra de defecto óseo tratado con biomaterial con proteína morfogenética. 8 Semanas de evolución. En azul se señala el cúbito intacto y en verde el nuevo tejido óseo formado.

## RESULTADOS

La tabla 1 (arriba), muestra un resumen de los resultados obtenidos en los estudios anteriormente detallados:

- Del **estudio densitométrico** destaca que prácticamente para todos los tratamientos, en todas las zonas de estudio y para los dos tiempos de evolución, la cantidad de hueso que se ha regenerado en el defecto es mayor que la cantidad de

hueso que encontramos en un hueso sano y que, además de ello, la densidad media de este hueso regenerado es, como mínimo, igual a la de uno sano en la zona central del defecto, que es la zona donde se ha formado más tejido.

- En cuanto a los **ensayos mecánicos**, los resultados obtenidos revelan que los tratamientos aplicados permiten al hueso recuperar en gran medida las características mecánicas del hueso, alcanzando valores muy cercanos a los del hueso sano en el caso de la rigidez torsional y par torsor.
- Con respecto a la **histomorfometría** cabe destacar que no se encuentran diferencias entre los resultados obtenidos en los tratamientos con biomaterial con proteína y sin proteína ni a nivel de estructuras tisulares formadas, ni en relación con el porcentaje de hueso regenerado, siendo los valores muy similares.

## CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados se puede concluir que se ha alcanzado el objetivo de desarrollar un nuevo biomaterial altamente osteoinductor que presenta las características mecánicas adecuadas para su utilización en el modelo seleccionado y que permita prever su posterior utilización en clínica humana. Esto se evidencia por el hecho de que en tan sólo 16 semanas el biomaterial ha sido capaz de inducir la reparación del defecto generado hasta alcanzar niveles de volumen de tejido óseo y densidades muy similares a las presentes en un hueso sano y, además, presenta unas cualidades mecánicas que confirman la calidad y similitud del nuevo tejido con respecto al sano.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todos los grupos participantes en el proyecto: INASMET–Tecnalia, University Medical Center Nijmegen, Italian Consortium on Materials Sci. & Tech., University of Aberdeen, Istituti Ortopedici Rizzoli, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne y Progenika Biopharma S.A. Además de los integrantes del proyecto agradecer el trabajo realizado por el grupo GEMM–ISA de la Universidad de Zaragoza por el desarrollo y cesión de los resultados del modelo de elementos finitos.

Proyecto STREP, Prioridad NMP, cofinanciado por la Comisión Europea (NMP3–CT–2005–516943) a través del VI Programa Marco y el Ministerio de Educación y Ciencia a través de una Acción Especial del Plan Nacional de I+D. (MAT2004–22701–E).