

Evaluación de nuevos biomateriales para la regeneración del tejido óseo. Proyecto BIOSCAFF-Hueso

Víctor Primo Capella^{1,2}, Irene Lara Sáez^{1,2}, Isabel Roger López², José Luis Peris Serra^{1,2}, Carlos Atienza Vicente^{1,2}, Alberto Ferreras Remesal², Andrés Soler Valero², Carolina Ávila Carrasco²

¹CIBER DE BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y NANOMEDICINA (CIBER-BBN)

²INSTITUTO DE BIOMECÁNICA DE VALENCIA

El Instituto de Biomecánica (IBV) tiene una amplia trayectoria de participación en proyectos para el desarrollo de nuevos biomateriales y tratamientos destinados a la medicina regenerativa, sobre todo en ingeniería de tejido óseo. Uno de esos proyectos es el BIOSCAFF-Hueso, perteneciente a los Proyectos Intramurales del CIBER-BBN. A continuación se describirá la metodología seguida para la evaluación *in vivo* de los cinco biomateriales desarrollados en el proyecto.

Assessment of novel biomaterials for bone tissue regeneration. BIOSCAFF-Hueso Project

The Instituto de Biomecánica (IBV) has long history of participation in development projects of novel biomaterials and treatments led to regenerative medicine, more specifically in bone tissue engineering. One of them is BIOSCAFF-Hueso project, in which five novel biomaterials were developed. Below, we present the methodology followed at the IBV for the *in vivo* assessment of these novel biomaterials.

INTRODUCCIÓN

Desde sus inicios, la medicina regenerativa, y más en concreto la ingeniería de tejidos, ha dirigido sus esfuerzos al desarrollo de nuevos biomateriales y tratamientos destinados a la regeneración y reparación de órganos y tejidos en aquellas situaciones donde el propio organismo es incapaz de hacerlo de forma natural. Para ello no sólo es imprescindible un estudio exhaustivo de los tejidos destino y de los procesos naturales de reparación que se llevan a cabo en los mismos, sino que también es necesaria la realización de estudios que permitan evaluar el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de estos nuevos biomateriales.

Desde hace años, el ámbito de Tecnología Sanitaria del IBV participa en proyectos de diseño, desarrollo y evaluación de nuevos biomateriales para la obtención de nuevos tratamientos superficiales, recubrimientos porosos y matrices de soporte (*scaffolds*) biodegradables para la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso. Estas participaciones se han centrado sobre todo en tres fases muy concretas de los desarrollos:

- **La definición de especificaciones y requisitos mecánicos y biológicos del biomaterial y de los implantes obtenidos a partir de él.** En esta fase se definen los parámetros mínimos que debe cumplir en relación con el tejido de destino, el modelo de evaluación biológica y la aplicación final de los nuevos desarrollos.
- **Caracterización mecánica de los desarrollos.** En esta fase de caracterización mecánica se comprueba el cumplimiento de los requisitos mecánicos definidos anteriormente, permitiendo hacer un primer *screening* en las fases iniciales del proyecto.
- **Evaluación *in vivo* de la funcionalidad de los nuevos desarrollos.** Esta evaluación implica la implantación de muestras de los biomateriales y de sus constructos, así como la posterior evaluación de la funcionalidad mediante tres técnicas diferentes y complementarias:
 - **Análisis densitométrico de las muestras**
A partir de imágenes de micro-TAC o de TAC clínico se lleva a cabo un estudio cuantitativo basado en la comparación entre la densidad ósea del nuevo tejido formado y la del tejido sano. Además de ello, también se realizan reconstrucciones 3D a partir de estas imágenes que permiten el estudio cualitativo del proceso de crecimiento del nuevo tejido. El objetivo es estimar la cantidad y calidad del nuevo tejido formado en comparación con su correspondiente grupo control.
 - **Evaluación biomecánica**
Tras la finalización de la fase de implantación, las muestras son recuperadas y ensayadas mecánicamente para determinar el grado y calidad del nuevo tejido formado. Los ensayos mecánicos

➤ más utilizados son el de flexión a cuatro puntos (no destructivo), el de torsión (destructivo), el de extracción o *pull-out* (destructivo) y el de indentación (destructivo).

• **Evaluación histomorfométrica**

Las muestras obtenidas en la fase de implantación son estudiadas mediante técnicas histológicas que permiten conocer la calidad del nuevo tejido formado y la cantidad de tejido, pudiendo llegar al detalle de la actividad celular presente en el mismo.

El objetivo de este artículo es mostrar la metodología seguida en la evaluación *in vivo* realizada por el Instituto de Biomecánica (IBV) en el marco del proyecto BIOSCAFF-Hueso, perteneciente al conjunto de Proyectos Intramurales del CIBER-BBN (Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina), cuyo propósito era el desarrollo de matrices de soporte porosas de distinta naturaleza (polimérica y cerámica) destinadas a la ingeniería tisular de tejido óseo.

DESARROLLO

Diseño de la experimentación *in vivo*

Como modelo animal para llevar a cabo la evaluación *in vivo* de los biomateriales desarrollados se seleccionó el modelo de regeneración de tejido óseo en defectos de cóndilo femoral de conejo. Este modelo consiste en la generación de un defecto cilíndrico en la cara medial del cóndilo femoral, que es posteriormente tratado con los distintos biomateriales. El grupo control seleccionado en este proyecto, para la posterior comparación de la reparación lograda con los nuevos biomateriales, fue el no tratamiento del defecto, es decir, el defecto vacío. Los periodos de estudio seleccionados fueron dos, de modo que se garantizara poder comprobar la regeneración del tejido en fases intermedias y avanzadas del proceso de reparación del defecto. En la **tabla 1** se muestra un resumen del diseño de experiencias con una descripción de los biomateriales implantados.

Tabla 1. Tabla resumen del diseño de experiencias.

GRUPOS DE ESTUDIO	8 SEMANAS	16 SEMANAS
Control (Defecto vacío)	5 defectos	5 defectos
Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)	5 muestras	5 muestras
Fosfato tricálcico (β-TCP)	5 muestras	5 muestras
HEMA+Wollastonita (HEMA/W)	5 muestras	5 muestras
Hidroxiapatita dopada con Silicio (HA/Si)	5 muestras	5 muestras
HEMA+Biovidrios (HEMA/BG)	5 muestras	5 muestras
ANIMALES TOTALES	15 animales	15 animales

Evaluación histomorfométrica

Tras el sacrificio de los animales, las muestras de cóndilo con el defecto tratado y sin tratar fueron recuperadas y procesadas para su posterior análisis histológico. Este análisis se basó en la obtención de cortes ultrafinos (entre 5 y 10 micras de espesor) a partir de las muestras previamente incluidas **sin descalcificar** en bloques de polimetil metacrilato

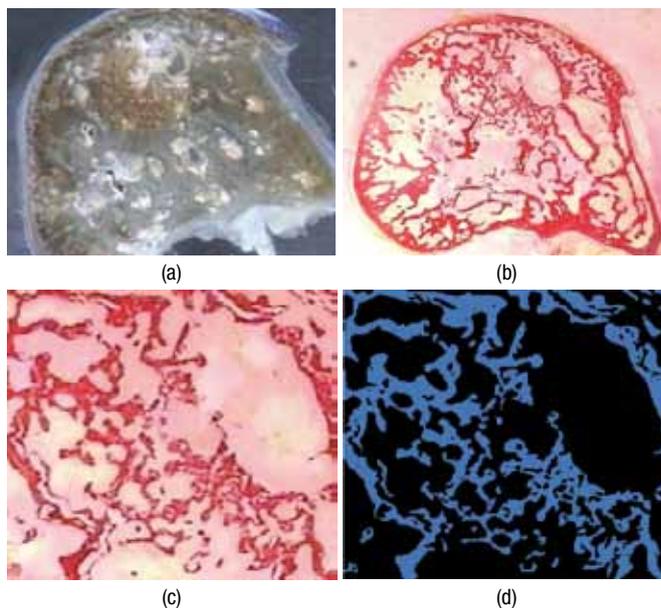


Figura 1. Proceso de análisis de imágenes. (a) Muestra incluida en bloque de metacrilato. (b) Corte teñido con Rojo Sirio. (c) Selección de la región de interés. (d) Análisis de imagen con Visilog 6.11.

(Figura 1a). Como orientación para la obtención de los cortes se eligió el plano transversal al implante. Fueron dos las zonas de estudio seleccionadas; la primera fue la zona más externa del implante y la más cercana a la zona de hueso cortical del cóndilo, y la segunda la más profunda rodeada por tejido óseo trabecular. Posteriormente los cortes fueron sometidos a una tinción específica para diferenciar los distintos tejidos y materiales. Generalmente, para tejido óseo, la tinción más frecuente es la realizada con Von Kossa, en la cual se tiñen específicamente de negro los tejidos con fosfatos cálcicos. En el presente proyecto, y debido a la naturaleza cerámica de los biomateriales utilizados, la tinción seleccionada fue el Rojo Sirio o Picrosirio que tiñe específicamente las fibras de colágeno en un tono rojo intenso.

Una vez teñidos los cortes, se adquirieron imágenes de los mismos y se seleccionó la región de interés a estudiar, que se correspondía con la zona de implantación (Figura 1b y Figura 1c). Esta región fue analizada mediante el *software* de análisis de imagen Visilog 6.11 con el objetivo de determinar los parámetros que permitieran calcular la variable de interés, el **ratio de hueso regenerado**. Esta variable hace referencia a la relación existente entre el hueso que se ha formado en el defecto gracias a un tratamiento frente al hueso existente en el defecto sin tratar.

Ecuación 1. Ecuación correspondiente al cálculo de la variable *ratio de hueso regenerado*.

$$\text{Ratio de hueso regenerado} = \frac{\% \text{ de tejido óseo observado en la zona regenerada}}{\% \text{ de tejido óseo observado en el defecto vacío}}$$

donde:

- *% de tejido óseo observado en la zona regenerada*: valor de % de área segmentada como tejido óseo obtenido a partir de imágenes de defectos tratados con biomaterial (Figura 2a).
- *% de tejido óseo observado en el defecto vacío*: valor de % de área segmentada como tejido óseo obtenido a partir de imágenes de defectos no tratados (Figura 2b).

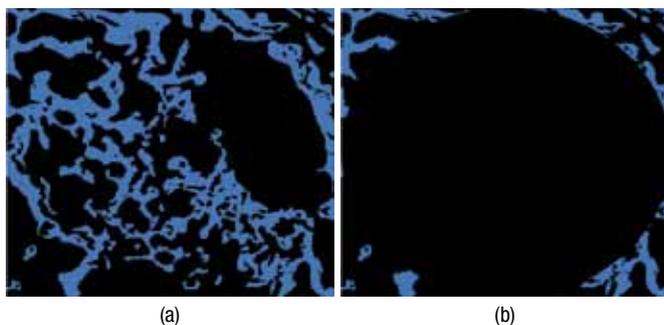


Figura 2. Cálculo de la variable de estudio. (a) % de tejido óseo observado en la zona regenerada. (b) % de tejido óseo observado en el defecto vacío.

A partir de estos datos de *ratio de hueso regenerado*, se realizó un análisis estadístico con el objetivo de evaluar la reparación tisular obtenida mediante el uso de los andamios desarrollados en el proyecto. Este análisis estadístico se dividió en dos partes:

- **Obtención de los diagramas de cajas.** Información cualitativa que permite hacer una primera aproximación al comportamiento de los biomateriales.
- **Test de comparación de medias.** El objetivo es comprobar si existen diferencias entre los distintos tratamientos utilizados en el proceso de reparación del defecto. Dadas las condiciones de las poblaciones disponibles, se seleccionó el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Cabe destacar que uno de los grupos de estudio, en concreto el grupo HA/Si, no pudo ser analizado debido a la naturaleza del implante utilizado, la cual no permitía la obtención de cortes histológicos válidos para su análisis.

En la figura 3 se muestran los diagramas de cajas agrupados obtenidos para cada una de las zonas y periodos de estudio. En la tabla 2 se muestran los resultados del estudio estadístico realizado mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, en el cual se realiza la comparación entre el rango medio obtenido para la variable *ratio de hueso regenerado* en el grupo control y en cada uno de los grupos tratados con biomaterial.

En cuanto a la regeneración del tejido óseo, únicamente los materiales HEMA/W y HEMA/BG han presentado, en alguno de los grupos de estudio, una regeneración de tejido menor que el grupo control (defecto no tratado). En el caso del

material HEMA/W se han encontrado diferencias significativas para la variable *ratio de hueso regenerado* en la zona externa y en ambos periodos de evolución, siendo menor el rango medio en el caso del tratamiento del defecto con el biomaterial HEMA/W.

En el caso del material HEMA/BG el rango medio del *ratio de hueso regenerado* es significativamente distinto e inferior

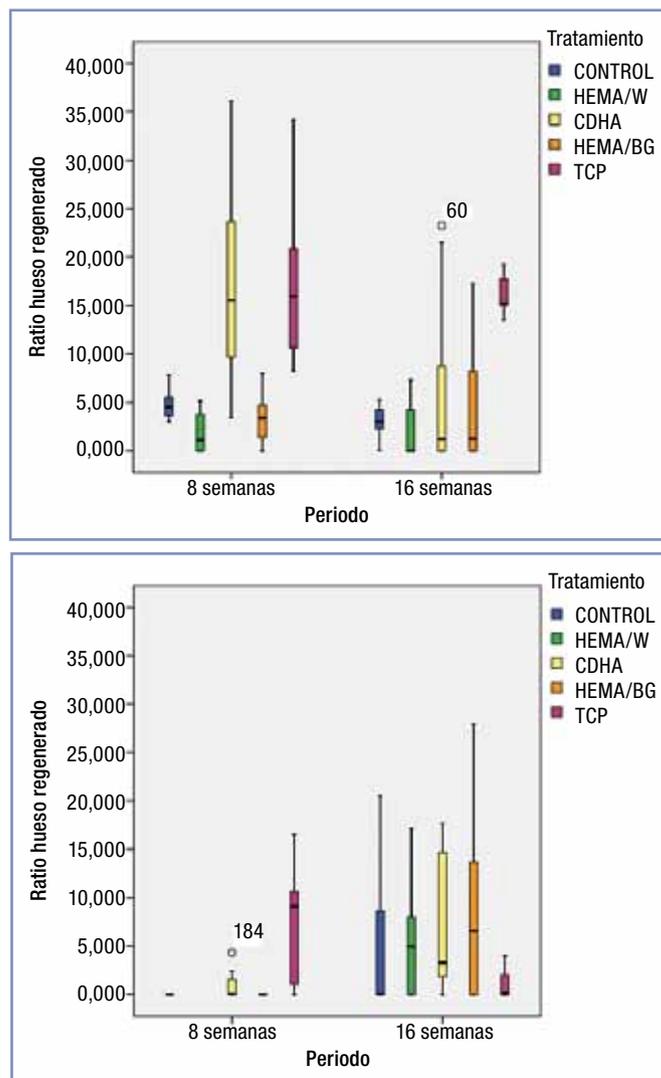


Figura 3. Diagramas de cajas agrupados para la variable *ratio de hueso regenerado*.

Tabla 2. Tabla resumen del análisis de comparación de medias mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

	Zona externa 8 semanas	Zona externa 16 semanas	Zona interna 8 semanas	Zona interna 16 semanas
HEMA+Wollastonita (HEMA/W)	Dif. Sig. ($p=0,011$)	Dif. Sig. ($p=0,043$)	No Dif. Sig.	No Dif. Sig.
Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)	Dif. Sig. ($p=0,011$)	No Dif. Sig.	Dif. Sig. ($p=0,009$)	No Dif. Sig.
HEMA+Biovidrios (HEMA/BG)	Dif. Sig. ($p=0,047$)	No Dif. Sig.	No Dif. Sig.	No Dif. Sig.
Fosfato tricálcico (β -TCP)	Dif. Sig. ($p=0,000$)	Dif. Sig. ($p=0,000$)	Dif. Sig. ($p=0,002$)	No Dif. Sig.

> que la del grupo control a 8 semanas en zona externa. En el resto de zonas y de periodos el material HEMA/BG presenta un comportamiento similar al del grupo control, por lo que podemos decir que aparentemente el material HEMA/BG no ofrece ninguna ventaja frente al defecto en vacío.

Este comportamiento de los materiales HEMA/BG y HEMA/W puede explicarse en vista a las observaciones realizadas durante la obtención de las muestras tras el sacrificio. Los materiales HEMA/BG y HEMA/W aparecían fuera del defecto, posiblemente por la excesiva expansión que sufrían tras la implantación. Indudablemente este hecho ha afectado a los resultados obtenidos.

Por otro lado los materiales CDHA y β -TCP son los materiales que mejor resultado han mostrado. En el caso del CDHA, en el periodo de 8 semanas, tanto en zona externa como interna, la media del *ratio de hueso regenerado* es significativamente diferente y mayor que la correspondiente al grupo control. A tiempos largos, de 16 semanas, no se han encontrado diferencias con el control. Cabe destacar que el nuevo tejido formado con el uso de este biomaterial se encuentra sobre todo en los alrededores del implante, pero también en el interior del mismo.

El biomaterial más destacable de todos es el β -TCP, que prácticamente en todas las muestras analizadas ha dado un rango medio de *ratio de hueso regenerado* significativamente diferente y mayor que el del grupo control. ●

AGRADECIMIENTOS

El CIBER-BBN es una iniciativa enmarcada en el VI Plan Nacional I+D+i 2008-2011, Iniciativa Ingenio 2010, programa Consolider, Acciones CIBER y financiada por el Instituto de Salud Carlos III con ayuda del Fondo Europeo de Desarrollo Regional.