

Inducción y regeneración ósea experimental con proteína morfogenética ósea y biomateriales

J.A. de Pedro^a, J. Blanco^a, M. Salvado^a, A. de Cabo^a, J. Domínguez^a, M.A. Cuadrado^b y A. Pérez-Caballer^c

^aServicio de Traumatología. Hospital Universitario de Salamanca. ^bServicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico de Madrid. ^cUnidad Docente de Traumatología. Universidad San Pablo CEU. Madrid.

Objetivo. Ante una pérdida ósea tras un accidente, un tumor o una infección se plantean diferentes posibilidades de reconstrucción. Un modelo experimental válido para el estudio de la osteorregeneración se basa en la resección de un defecto diafisario suficiente para impedir la reparación espontánea.

Material y método. La originalidad del tema elegido se cimenta en la utilización, *in vivo*, en un animal de talla media (conejo), de un biomaterial que está compuesto de una base estructural de poli (metacrilato de metilo) (PMMA) (serie 1), al que se añade hidroxiapatita (HA) como material osteoconductor (serie 2) y además, un factor de crecimiento, proteína morfogenética ósea (PMO) como osteoinductor (serie 3).

Resultados. Tras 2, 4 y 8 semanas después de la resección (20 mm) e implantación endomedular de los tres tipos de barras (25 mm de longitud), se procede al análisis radiológico e histológico. Parece que la reparación está influida por propiedades mecánicas de estabilidad, fuerza y carga. La regeneración ósea en el presente modelo sigue un patrón de desarrollo que va desde los extremos de resección diafisario a la zona media y siempre a expensas de la cortical radial.

Conclusiones. De los tres modelos de barras utilizados, los formados por PMMA, HA y PMO, presentan un proceso de reparación más avanzado, hecho observado tanto radiológicamente como histológicamente.

Palabras clave: inducción ósea, proteína morfogenética ósea, biomateriales.

Experimental bone induction and regeneration with bone morphogenetic protein and biomaterials

Aim. In cases of bone loss due to an accident, tumor, or infection, various reconstruction options exist. A valid experimental model for the study of bone regeneration is resection of a section of diaphysis large enough to impede spontaneous repair.

Materials and methods. The innovation proposed is the use *in vivo* in a medium-size animal (rabbit) with a biomaterial consisting of polymethyl methacrylate (PMMA) (series 1) to which hydroxyapatite (HA) is added as an osteoconductor (series 2) and bone morphogenetic protein (BMP) is added as an osteoinductor (series 3).

Results. Radiologic and histologic studies were made 2, 4, and 8 weeks after resection (20 mm) and endomedullary implantation of three types of rods (25 mm long). The repair appeared to be influenced by mechanical properties of stability, strength, and load. Bone regeneration in the present model progressed from the diaphyseal resection surfaces, filling the bone defect at the expense of the radial cortex.

Conclusions. Of the three models, the bar formed by PMMA, HA, and BMP elicited the most advanced repair process, as confirmed by radiology and histology.

Key words: bone induction, bone morphogenetic protein, biomaterials.

El mecanismo de reparación de las heridas se inicia y modula a través de la comunicación intercelular por medio de moléculas proteicas específicas, denominadas citoquinas.

Correspondencia:

J.A. de Pedro.
Unidad Docente de Traumatología.
Facultad de Medicina.
Avda. Alfonso X el Sabio.
37007 Salamanca.
Correo electrónico: jpedrom@usal.es

La secuencia de acción es, en general, síntesis y secreción por una célula y unión a receptores celulares induciendo una acción en la célula receptora¹. Esa acción puede ejercerse a distancia si la citoquina va al torrente sanguíneo (respuesta endocrina), sobre células próximas (interacción paracrina), sobre la misma célula que la secretó (interacción autocrina) o si permanece adherida a la célula que la secretó, pero ejerce su influencia sobre células adyacentes, se denomina yuxtacrina². La utilización de biomateriales de diversa naturaleza diseñados para la sustitución de tejido óseo

en lesiones de gran pérdida de hueso constituye uno de los principales temas de investigación básica en Traumatología. La naturaleza de los materiales utilizados para tales fines hasta la actualidad es de origen sintético o de origen natural. Los materiales de origen natural corresponden al hueso tanto homólogo como heterólogo, derivados óseos y polímeros naturales, como el colágeno. Los materiales sintéticos consisten en ciertos metales, polímeros biodegradables y fosfatos cálcicos que pretenden imitar a los de origen natural como corales y otros¹.

Dejando atrás los materiales sintéticos metálicos que siguen siendo de gran uso en la clínica, la búsqueda de un «biomaterial ideal» para las lesiones citadas intenta reproducir los beneficios de los injertos sin llegar a tener que formar parte de ellos. Un «biomaterial ideal» debe describirse para cada tipo de lesión, su localización y cada paciente, pero de modo general se puede definir como un material que presenta las siguientes premisas: ser biocompatible, no tóxico y en el mejor de los casos ser biodegradable. El déficit de hueso en determinadas zonas del esqueleto supone un mayor problema que en otras. Los elementos esenciales para la reparación de este tipo de lesiones² son, en primer lugar, la presencia de osteoblastos y factores osteogénicos y en segundo, un andamiaje en tres dimensiones; en definitiva las características de osteoinducción y osteoconducción descritas^{3,4}. En el presente trabajo se pretende estudiar las características de diversos biomateriales aislados o formando parte de la misma formulación, mediante la creación de un defecto de 2,5 cm de longitud en el cúbito de conejo. Con dicho defecto crítico se genera una lesión de tal envergadura que el propio hueso es incapaz de recuperarse mediante la regeneración natural⁵, de modo que los procesos de reparación serán llevados a cabo por la influencia de los biomateriales y factores de crecimiento (FC). La naturaleza de los biomateriales utilizados intenta conseguir el éxito de la reparación siguiendo dos de las premisas descritas anteriormente. Se utilizará un factor osteogénico u osteoinductor, la proteína morfogenética ósea (BMP), y como andamiaje o material osteoconductor la hidroxiapatita (HA).

Se denominan FC aquellos integrantes del grupo de las citoquinas que específicamente estimulan la proliferación celular. Se denominan proteínas morfogenéticas óseas (PMO) aquellas cuya acción principal se produce sobre la diferenciación de una subfamilia del TGF (*tissue growth factor*) celular, por ello suele denominarse a este grupo también como morfógenos, ya que son capaces de iniciar el desarrollo de tejidos y sistemas orgánicos estimulando células indiferenciadas para convertirlas fenotípicamente³. A la luz de estos conceptos deberíamos redefinir las sustancias osteoinductoras como aquellas que contienen morfógenos óseos⁴.

A lo largo de este artículo utilizaremos las abreviaturas en lengua castellana e inglesa de los distintos factores por compatibilidad con las publicaciones en este último idioma

(que hace algunas de ellas genéricas); en consecuencia, debe tenerse en cuenta que PMO es sinónimo de BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) y FCT (factor de crecimiento tisular) es sinónimo de TGF. Durante la reparación de una fractura, así como durante la regeneración ósea a partir de un injerto, ocurren una cascada de eventos moleculares y celulares, similares para ambas, que están coordinadas secuencialmente, reguladas y moduladas por los FCT y las PMO⁵⁻⁷. Si bien, hay pequeñas diferencias entre el injerto de hueso y la inserción de PMO a través de matriz colágena, por ejemplo, la secuencia de acontecimientos no varía sustancialmente y podemos desarrollarla como un evento único.

Cuando se realiza un injerto en un lecho quirúrgico, se colocan osteocitos, osteoblastos y células precursoras medulares, en un espacio muerto ocupado por coágulo sanguíneo, con plaquetas, glóbulos rojos y blancos en una matriz de fibrina, todo ello rodeado de un entorno fisiológico con población celular estructural y de células reparadoras y capilares seccionados con su endotelio expuesto.

Dos aspectos deben tenerse en cuenta, el primero son los gradientes de oxígeno y pH entre el injerto y el medio. En el injerto el medio es hipóxico (pO_2 5-10 mmHg) y ácido (pH 4-6), el entorno del lecho receptor es normóxico (pO_2 45-55) y se encuentra a pH fisiológico^{8,9}. Por otra parte, las células precursoras se encuentran en muy baja concentración relativa (respecto de las células estructurales), variable con la edad y estimable en alrededor de sólo 1/100.000 en un adolescente, 1/250.000 a los 35 años, 1/400.000 a los 50 y 1/1.200.000 a los 80 años; esto es una expresión más del ajustado empleo que hace el organismo de sus recursos, ya que en condiciones normales mantiene una población celular reparativa muy pequeña y sólo la activa en caso de necesidad a través de los factores de crecimiento. Desde el mismo momento de la sutura se inicia la degranulación de las plaquetas del injerto, liberando FC plaquetarios. La PDGF especialmente y el TGF estimula la mitosis de las células precursoras medulares y osteoblastos endostales del injerto a incrementarse en varios órdenes de magnitud, y al mismo tiempo inicia la angiogénesis de los capilares al estimular la mitosis de las células endoteliales. Así mismo, activa la mitosis de los fibroblastos y preosteoblastos y su maduración; su acción continuada los hace producir matriz colágena para soportar la penetración de los capilares y matriz ósea respectivamente. Simultáneamente, el gradiente de oxígeno, combinado a la acción de PDGF atrae a los macrófagos al lecho.

A partir del quinto día aproximadamente, la acción de los FC plaquetarios decae y es reemplazada por los osteoblastos originados en los segregados. Especialmente el TGF estimula la proliferación y diferenciación de las células precursoras en forma autocrina y por FC segregados por los osteoclastos (muy similares a PDGF) y macrófagos.

Los capilares, que comenzaron a penetrar en el injerto desde el tercer día lo han hecho completamente alrededor del día 14 a 17, cuando alrededor de la cuarta semana se completa la revascularización, desaparece el gradiente de oxígeno entre el injerto y el lecho y con él los macrófagos.

Cuando se implanta matriz ósea desmineralizada inductivamente activa o BMP la secuencia general de quimiotaxis, mitogénesis y diferenciación incluye una fase de diferenciación a condroblastos y síntesis de matriz extracelular. Con la invasión vascular aparece la maduración de los condrocitos, la calcificación del cartílago, la aparición de los osteoblastos, la formación de matriz ósea mientras el cartílago es removido, y por último la remodelación del hueso hasta tener el producto final de hueso maduro⁸⁻¹⁰.

En cualquier caso, la etapa final de maduración del hueso neoformado desorganizado en hueso trabecular involucra las PMO (que en rigor han estado presentes siempre, la secuencia se describe con fines fundamentalmente didácticos). Los FC, liberados por la acción osteoclástica sobre la matriz, actúan estimulando las células precursoras a multiplicarse y diferenciarse a osteoblastos que segregan activamente matriz ósea. La combinación de ambos fenómenos produce la maduración ósea.

Los factores de crecimiento son un subgrupo de citoquinas que específicamente estimulan la proliferación celular, actuando como mitógenos y afectan todos los aspectos del fenotipo celular. A través de complejos mecanismos bioquímicos introducen cambios en la expresión génica que producen una nueva síntesis proteica, cambios en la actividad celular y cambios en la proliferación celular. Así mismo, influyen en la cicatrización por varios mecanismos: actividades quimiotácticas que atraen células inflamatorias y fibroblastos al foco, como mitógenos estimulan la proliferación celular, pueden estimular la angiogénesis, tienen efecto importante en la producción y degradación de la matriz celular e influyen en la producción de factores de crecimiento y citoquinas en las células vecinas.

Los factores más importantes para los objetivos del presente trabajo son los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF [*platelet derived growth factor*]), factor de crecimiento fibroblástico (FGF [*fibroblastic growth factor*]), factor de crecimiento similar-insulina (IGF-I e IGF-II

[*insulin-like growth factor*]), factores de crecimiento transformadores beta (TGF [*transforming growth factor*]) y factor de crecimiento epidérmico (EGF [*factor epidermic growth factor*]); este último tal vez sea el menos relevante desde el punto de vista de la reparación ósea, pero es uno de los primeros en ser identificado. Utilizaremos las abreviaturas de los nombres en inglés, ya que son de uso universal para identificarlos (tabla 1).

1) Factor de crecimiento fibroblástico. Usualmente presente como dímeros AA, AB y BB, con receptores con distinta afinidad para cada dímero, que, como ocurre con muchas de las citoquinas, varía sus efectos¹¹⁻¹⁴. Descrito inicialmente en los gránulos de las plaquetas¹⁵ es también sintetizado y secretado en macrófagos, endotelio¹⁶ y otros tipos celulares¹⁷; el dímero AA es además producido por las células óseas. Es quimiotáctico para los fibroblastos, células del músculo liso, monocitos y neutrófilos¹⁸. Es mitógeno para las células del músculo liso y los fibroblastos¹⁹, produce profundos efectos sobre la matriz celular²⁰, aumentando la producción de células osteoprogenitoras. *In vitro* además presenta actividad en la reabsorción ósea. Parece ser el primer factor de crecimiento presente en una herida, iniciando la cicatrización del tejido conectivo, incluyendo reparación y regeneración ósea en humanos, las acciones principales son mitogénesis, angiogénesis y activación de macrófagos. Es una molécula muy potente, por lo que su concentración en el PRP se convierte en muy importante²¹.

2) Factores de crecimiento transformadores beta (TGF-beta). Constituyen un grupo de 5 isoformas, tres presentes en el humano, con 6 receptores, I a VI²², en la práctica, son una superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación de las cuales las BMP (13 descritas) son una parte¹⁶. Los factores de crecimiento más importantes son sintetizados por plaquetas²³. En la matriz ósea residen abundantemente en forma latente y son activados localmente. El conjunto de las TGF-beta desarrolla una actividad compleja en los procesos de remodelación ósea, tejido en el cual son abundantes. Este conjunto procede de la desgranulación de las plaquetas o es excretado por macrófagos y actúa como GF paracrino afectando a los fibroblastos, células precursoras de la médula ósea y preosteoblastos. Estas células blanco tienen capacidad de sintetizar y segregar proteínas para

Tabla 1. Acciones de los factores de crecimiento

Denominación	Efecto quimiotáctico	Efecto sobre la proliferación	Efecto sobre la síntesis del colágeno	Efecto sobre la diferenciación
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Leve	Leve	Inhibitoria	Inhibitoria
Factor de crecimiento similar-insulina (IGF-I)	Fuerte	Fuerte	Ninguna	Fuerte
Factores de crecimiento transformadores beta (TGF-β)	Ninguna	Inhibitoria	Moderada	No determinada
Factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF)	Fuerte	Fuerte	Moderada	No determinada
PDGF + IGF - 1	Más fuerte	Más fuerte	No determinada	No determinada

actuar sobre células adyacentes en forma paracrina o sobre sí mismas como autocrinas, representando un mecanismo de cicatrización y regeneración ósea a largo plazo (y eventualmente actuar sobre la remodelación ósea en el tiempo)²⁴.

Los factores TGF son osteogénicos potentes²⁵, parecen ser quimiotácticos y mitogénicos para los precursores de los osteoblastos y también estimulan la deposición de matriz colágena (así como impedir su ruptura)⁹ por los osteoblastos en la cicatrización de heridas y del hueso. Además inhiben la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea favoreciendo la formación sobre la reabsorción ósea por un doble mecanismo: regula y modula la respuesta inflamatoria²⁶ y modera la cicatrización. Por otro lado, TGF puede inhibirla, constituyendo un ejemplo más de los sistemas fisiológicos duales, estímulo/inhibición en equilibrio²⁷.

3) Factor de crecimiento simil-insulina. Grupo de potentes factores de crecimiento que presentan proteínas de unión que incrementan o decremantan su acción²⁸, se presentan en plaquetas, células óseas, así como en otros tipos celulares^{4,29}. IGF-I presenta profundos efectos sobre el crecimiento especialmente el secundario característico de la adolescencia, (el efecto anabólico de la hormona de crecimiento se produciría por incremento de los niveles de IGF-I)³⁰, por contra, IGF-II actuaría especialmente en el crecimiento fetal³¹. Sus principales actividades, en relación con el hueso, son: estímulo de la síntesis proteica³², así como de colágeno tipo I y matriz ósea por los osteoblastos^{26,29}; asociada a PDGF o FGF estimula la proliferación de múltiples tipos celulares, especialmente los fibroblastos³³; disminuye la degradación del colágeno³⁴; mitogénesis para los precursores de los osteoblastos²⁹ y potente potencial osteogénico⁴, así como estimulante de la regeneración ósea²⁶.

4) Factor de crecimiento fibroblástico. Constituye un grupo de, por lo menos, 9 factores de los cuales los mejor conocidos son el ácido (aFGF o FGF-1) y básico (bFGF o FGF-2)⁹. Abundantes en el hueso⁴, son mitógenos generales²⁹, con potente potencial osteogénico⁴ y capacidad de estimular la replicación de osteoblastos⁴, fibroblastos y sus células precursoras²⁹, así como estimular la angiogénesis⁹.

Proteínas morfogenéticas óseas

El análisis de los mecanismos de calcificación que llevaron al descubrimiento de las BMP es muy antiguo y se inicia con el estudio de la osteogénesis y calcificación heterotópica¹¹. La secuencia histórica es la siguiente:

Levander, en 1938, sugiere un factor extraíble del hueso; Lacroix (1945) sugiere un factor obtenible del cartílago que llama osteogenina. Urist (1960) induce hueso heterotópico implantando extractos proteicos que denominó proteínas morfogenéticas óseas. Wang y Wozney (1988) aislaron las formas monoméricas; a través de clones recombinantes para cada una obtuvieron BMP 1, 2A y 3 humanas y revelaron sus características bioquímicas y biológicas, incluyendo

sus secuencias de aminoácidos. Wozney (1992) produjo BMP2 recombinante por clonación, lo cual permitió acceder a cantidades significativas más fácilmente accesibles, permitiendo en consecuencia ampliar significativamente las posibilidades de investigación. Posteriormente, se aislaron y caracterizaron 5 BMP más (BMP 4 a 8), la 2B se red denominó 4 y la 2A, 2. Song (1995) identificó la BMP 9 y posteriormente las BMP 10 a 15; con todo, sólo las 7 primeras tienen capacidad osteoinductiva (tabla 2).

Las BMP 2-9, si bien son un subgrupo de la BMP, forman por sí mismas una subfamilia claramente identificable dentro de la superfamilia TGF. Están basadas en sus secuencias de aminoácidos, y por sus actividades biológicas bien diferenciadas, pueden ser agrupadas en función de las similitudes de sus secuencias de aminoácidos en una región específica de su molécula (tabla 2). La BMP 1, por su estructura, no sólo puede ser clasificada dentro de la superfamilia TGF, sino que recientemente ha sido identificada como una procolágeno-C-proteinasa^{10,11,29}. Debe considerarse, además, que las BMP son activas en forma dimérica, por lo que la posibilidad de existencia de homo y heterodímeros amplía el espectro de posibles acciones biológicas diferentes para esta familia de proteínas²⁹. A diferencia de los factores de crecimiento, que no son capaces de inducir formación ósea ectópica y necesitan la preexistencia del tipo celular que se pretende estimular o sus precursores, modulando o estimulando células osteoprogenitoras preexistentes, las BMP no sólo tienen efecto mayor sobre la dirección de diferenciación celular (excepto BMP 1, que no induce formación ósea, pero podría tener una actividad sinérgica con otras BMP), sino que también actúan como signos de posición y proveen información necesaria para la formación del patrón. Por ello se deben denominar, apropiadamente, antes que inductores, morfógenos, ya que si bien ambos proveen señal de posicionamiento sólo éstos especifican el patrón; tal vez las BMP actúen como verdaderos morfógenos durante el período embrionario y sólo como inductores en el adulto.

Tabla 2. Clasificación de las proteínas morfogenéticas óseas según la similitud de la secuencia de aminoácidos

Similitud
59%
92%
BMP 2 (BMP 2A)
BMP 4 (BMP 2B)
82%
BMP 5
BMP 6
BMP 7 (OP1)
BMP 8 (OP 2)
45%
BMP 3 (osteogenina)

BMP: *bone morphogenetic protein*.

Acciones de las proteínas morfogenéticas óseas

Las BMP tienen capacidad para actuar sobre células indiferenciadas o pluripotenciales e inducir su diferenciación hacia condroblastos (y aplicadas sobre condrocitos adultos, reforzar su expresión fenotípica) y hacia osteoblastos (para los cuales son mitogénicas, y también refuerzan su expresión fenotípica).

Por haber sido la primera en producirse por clonación en cantidades que la hicieron accesible a los investigadores, BMP 2 es la mejor conocida y se la suele utilizar como representativa del grupo. Tiene capacidad de inducir la secuencia completa de osificación endocondral (induce localmente la formación de tejido cartilaginoso que es luego reemplazado por hueso y médula ósea). Con cantidades crecientes, no sólo se acelera la formación ósea, sino que se puede producir cartílago y hueso simultáneamente, lo cual sugiere que puede influenciar la formación directa de hueso (intramembranoso).

BMP 4, 5, 6 y 7 producen el mismo efecto, si bien varía de una a otra, y para cada concentración los porcentajes de cartílago y hueso formado, así como la cantidad y velocidad. En trabajos experimentales, las BMP han demostrado la inducción de formación de hueso en distintas localizaciones y especies, en defectos de magnitud suficiente como para ser imposible la reparación sin una inducción adicional (tabla 3).

El periostio es rico en BMP, mientras la concentración en el hueso es mucho menor (serviría solo como una reserva de morfógeno), las fibras colágenas de la matriz ósea contienen BMP en un patrón estriado (la matriz colágena ósea está demostrado que es un mitógeno para las células mesenquimáticas). No está claro aún si actúa como una forma inmóvil o por difusión, y si la geometría de la matriz es importante para la inducción ósea.

A partir del conocimiento de la localización de la ubicación en la estructura génica del ADN que codifica las BMP (BMP 1 en el cromosoma 8, BMP 2 y 7 en el 20, BMP 3 en el 4, BMP 4 en el 14, etc.)¹¹ se convierte en posible actuar sobre el mismo. Existen actualmente en curso trabajos ex-

perimentales que tienden a desarrollar la posibilidad de estimular la producción de BMP por las células de un foco fracturario o lecho receptor de un injerto, a través de la activación del ADN que codifica las BMP.

El procedimiento consiste en desarrollar por ingeniería genética un ADN modificado que estimule la producción de BMP e introducirlo en las células del foco, utilizando por ejemplo, un retrovirus como vector (procedimiento denominado transfección). Los estudios experimentales han permitido aumentar hasta tres veces la producción de hueso a través de la estabilización de la diferenciación celular. Las barreras para la aplicación clínica del procedimiento son la seguridad biológica, los posibles efectos tóxicos, la necesidad de disponer de procedimientos para establecer límites al crecimiento y el riesgo potencial de activación de oncogenes¹⁹.

Si bien puede generarse hueso con BMP sin sustrato, hay varias ventajas para utilizarlo: la inmovilización de BMP en el área; se pueden usar cantidades menores de BMP, ya que no va a dispersarse y se va a mantener la concentración local, y se puede definir la forma que el hueso va a tener. Idealmente el sustrato debería ser inmunológicamente inerte, osteoconductor, bioabsorbible, soportar la angiogénesis y la subsiguiente vascularización. Se han probado gran número de sustratos (tabla 4)^{5,11-13,17,18}, en algunos casos combinados con membranas para regeneración tisular guiada^{5,7,35}.

El colágeno podría ser el ideal, pero el riesgo de transmitir partículas víricas presenta potenciales problemas, y no tiene resistencia estructural suficiente, por lo que requiere recursos de fijación adicionales. Idealmente, el diseño de un sustrato debería contemplar:

1) Diseño tridimensional acorde al segmento que se desea reemplazar (en defectos segmentarios mantener la for-

Tabla 3. Capacidad inductiva de las BMP

Denominación	Propiedades osteoinductivas
BMP-1	Inducción de cartílago
BMP-2 (BMP 2A)	Inducción de cartílago y hueso
BMP-3 (osteogenina)	Inducción de cartílago y hueso
BMP-4 (BMP 2B)	Inducción de cartílago y hueso (?)
BMP-5	Inducción de cartílago y hueso (?)
BMP-6	Inducción de cartílago y hueso (?)
BMP-7	Inducción de cartílago y hueso
OIF	Inducción de cartílago y hueso sólo en presencia de TGF

BMP: *bone morphogenetic protein*; TGF: *transforming growth factor*.

Tabla 4. Sustratos para aplicación de TGF y BMP

Biológicos
Esponja de colágeno
Esponja de fibrina
Hueso heterólogo desproteinizado
Sintéticos
Esponja de carboximetilcelulosa
Resinas
PLA - PLGA
PLA - PEG
Minerales
Sulfato de calcio
Fosfato tricálcico
Hidroxiapatita
Porosa
Sólida
Vidrios y cerámicas
Metales
Esponja de titanio

TGF: *transforming growth factor*; BMP: *bone morphogenetic protein*; PLA: poliláctico; PLGA: poliglicólico; PEG: polietilenglicol.

ma y tamaño; en aumento de contornos mantener la forma y volumen de la reconstrucción hasta que el nuevo hueso reemplace al portador).

2) Estructura (macro) que le provea resistencia adecuada para permitir su fijación y para resistir las cargas mecánicas hasta ser reemplazado por el tejido neoformado.

3) Estructura (micro) que permita la penetración por los capilares neoformados y el tejido que se pretende neoformar y su posterior reabsorción y reemplazo por éste.

4) En su uso específico para implantes debe ser totalmente reemplazado por hueso o sus remanentes no interfiriendo con la colocación e integración del implante.

MATERIAL Y MÉTODO

Se diseñaron varillas cilíndricas de poli (metacrilato de metilo) (PMMA), de 1,5 mm de diámetro y 2,5 cm de longitud, las cuales llevaban 5 ó 6 fibras de vicryl V-325-H (hilo de sutura reabsorbible trenzado de 0,5 mm de diámetro a la base de polyglactine 910 [copolímero de ácido glicólico y ácido láctico]). Dichas fibras van colocadas en forma de haces, longitudinalmente, en la varilla. El grupo I consistió en varillas de PMMA conteniendo en su interior dicho polímero, y las fibras de hilo de sutura de vicryl dispuestas longitudinalmente. La composición aproximada de las mismas es de 70% en peso de PMMA y un 30% en peso correspondiente a las fibras de vicryl. Las varillas del grupo II se prepararon de la misma forma que las anteriores, pero en este caso además se utiliza una mezcla de HA y metacrilato de metilo. La composición media de las varillas fue aproximadamente de 25% en peso de vicryl, 30% en peso de HA y 45% en peso de PMMA. Por último, el grupo III estaba formado por las varillas similares a las del grupo II, pero que en este caso se añadía un recubrimiento de poli (metacrilato de hidroxietilo), el cual contiene la BMP.

Técnica quirúrgica

Previo anestesia general y respiración asistida se coloca al animal en posición de decúbito lateral. Se realiza una incisión longitudinal sobre la superficie externa del antebrazo, incidiendo la piel y la aponeurosis hasta llegar al periostio. Una vez expuesto el cúbito se procede a su desperiostización y resección de la mitad central del hueso mediante el empleo de una sierra oscilante. La médula ósea del canal cubital es eliminada mediante el empleo de una mosquita y lavado con suero. A continuación se introduce la varilla en el canal cubital de modo que quede ocluido, evitando la influencia de la médula ósea en la regeneración. Posteriormente se realiza el cierre de la incisión por planos. Tras completar los tiempos de supervivencia se procede al sacrificio de los animales. Previo anestesia se procede a la desarticulación del hueso a nivel de codo y muñeca. Limpieza de

partes blandas y fijación en formol al 10% en suero salino. Primero se realiza el control radiográfico. A continuación, se procede al serrado macroscópico para la obtención de rodajas significativas de unos 3 a 5 mm de espesor, que incluyan hueso normal, hueso neoformado, varilla y partes blandas. El proceso de inclusión utilizado es mediante la utilización de metacrilato, que permite procesar el hueso sin decalcificar. Mediante un microtomo MICROM se obtienen cortes finos de 5-10 mm; estos cortes son teñidos con una variante del tricómico de Goldner y con Von Kossa. Esta técnica se caracteriza por demostrar la presencia de calcio en el tejido óseo, con el fin de estudiar el proceso biológico de la regeneración ósea y las variaciones a que hubiere lugar, tanto en distintos grupos temporales como con la diferencia de tratamiento en cuanto a composición de las varillas y administración de FGF.

RESULTADOS

Radiográficamente se ha podido estudiar el nuevo crecimiento óseo, dado que los distintos componentes de las varillas son radiotransparentes, de modo que en los diferentes grupos se observan zonas más o menos radiodensas que también varían en función de los tiempos estudiados. En todos los casos se observó un patrón de evolución de la lesión que consistía en el desarrollo de nuevas zonas de osificación en ambos extremos de resección diafisaria, a las dos semanas del estudio (fig. 1-A). A partir de este tiempo dichos extremos continuaban mostrándose hiperdensos, prolongándose hacia el centro de resección diafisario y más marcadamente en la cortical radial (figs. 1-B y 1-C). La distancia entre los extremos de resección, valorada al mismo tiempo (4 y 8 semanas), era mayor en el grupo I, se reducía ligeramente en el grupo II y era mucho menor en el grupo III, mostrando éste ya a las 4 semanas imágenes similares al grupo II al final de la experiencia. También a estos tiempos marcados se observa un engrosamiento de las corticales, fundamentalmente la cortical cubital radial y la radial cubital, que en determinados casos, debido a dicho engrosamiento, se describieron fenómenos de sinóstosis radio-cubital (figs. 1-B y 1-C). Aunque en menor medida el borde externo del radio también se mostró más densificado, hecho que se valoró en el estudio histológico.

Los resultados histológicos se basan fundamentalmente en el estudio de los acontecimientos que se dan durante la evolución de la lesión creada en el cúbito (resección crítica), en este caso en conejo albino. Se valora por una parte la capacidad osteoconductiva, osteoinductiva y osteosintética de los biomateriales que forman parte de las varillas, y por otra la respuesta inflamatoria que provocan en cada uno de los grupos analizados (fig. 2). Con respecto a la evolución de la lesión la formación de nuevo hueso se daba, en todos los grupos, en primer lugar en los extremos de resección

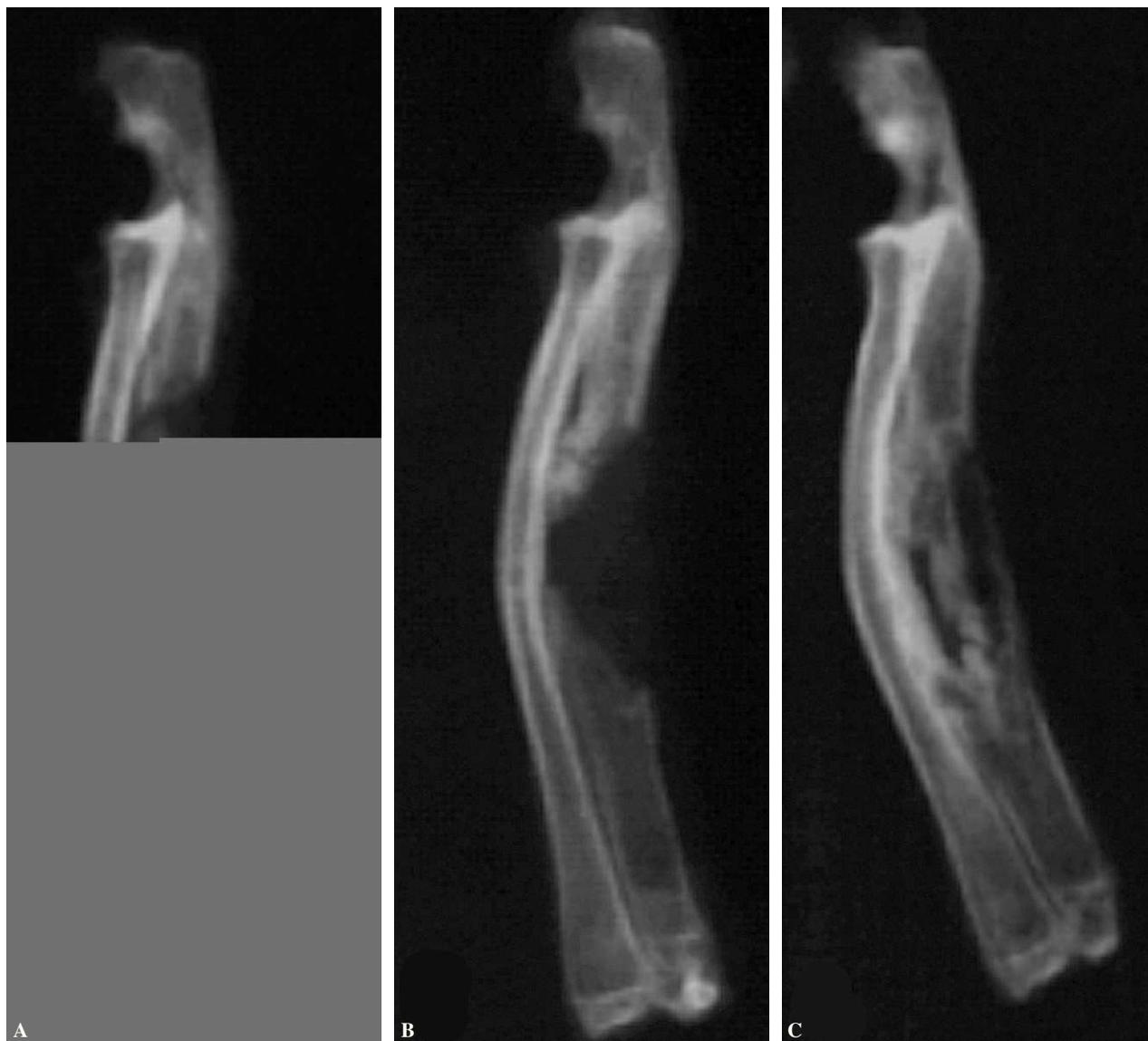


Figura 1. (A) Visión lateral del antebrazo con calcificación moteada irregular intensa y moderada del defecto cubital. Hay una sinóstitosis radiocubital distal con adelgazamiento de corticales y espongiación de la parte distal del cúbito. A nivel proximal el cúbito tiene abierto el conducto medular. El radio proximal está hipercorticalizado (HA 2 semanas). (B) Proyección lateral del antebrazo. Continuidad ósea tenue del defecto cubital. Las corticales radiales del cúbito se prolongan afiladamente hasta unirse en sinóstitosis radiocubital. Hay un moteado leve en el periostio del resto del defecto. El cúbito proximal está hiperdensificado e hipercorticalizado. El extremo distal está espongiado y con atrofia de corticales. El radio se encuentra con hiperdensificación de la zona del defecto cubital (HA 4 semanas). (C) Imagen anteroposterior de antebrazo de conejo donde se observa una continuidad ósea en el cúbito con tubulización del mismo. También se aprecia una sinóstitosis radio-cubital proximal y distal al defecto en el cúbito. En la zona del defecto óseo cubital se distingue una reacción esclerosa del radio en el borde cubital y una muesca del enclavado endomedular. La continuidad ósea cubital es más grande en el borde radial del cúbito (HA 8 semanas).

diafisarios y a expensas tanto del tejido conectivo (fig. 3) o cartilago (fig. 4) que forma parte de la interfase hueso-implante, como del tejido conectivo y/o cartilaginoso que se encuentra en la zona interósea. Por tanto, la formación de nuevo hueso se produce a partir de la influencia de los biomateriales utilizados en el estudio, siendo dicha osificación tanto membranosa como endocondral.

Las diferencias observadas entre los grupos sólo fueron en relación al tiempo pero no en la forma, es decir, que en

todos la síntesis de nuevo hueso se desarrolla de modo similar, pero de un modo más o menos precoz. Así el grupo I es el más lento en formar nuevo hueso (fig. 2), el grupo III es el más precoz (fig. 4), siendo el grupo II intermedio (fig. 3). Este proceso fue valorado mediante el estudio de cortes transversales seriados del cúbito junto con el hueso adyacente, el radio. Las propiedades de los biomateriales utilizados en el implante, son analizados de modo cualitativo mediante la correlación radiológica e histológica de la evo-

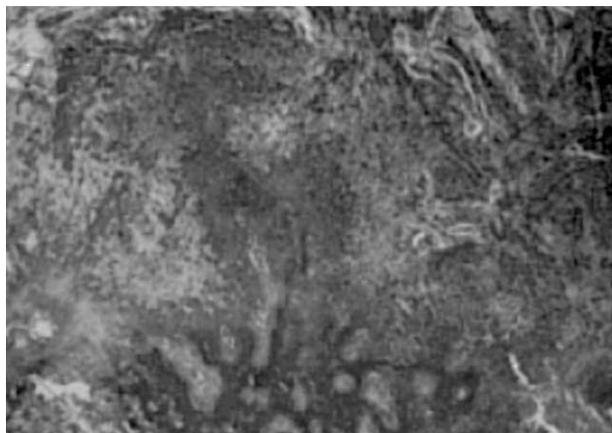


Figura 2. Panorámica del cúbito en una zona próxima a la implantación de la varilla. Muestra la desorganización de fibras de colágeno que se dan en las primeras semanas tras la lesión. En la parte inferior se aprecia una formación ósea primaria, a partir de condrocitos, y síntesis de sustancia osteoide (PMMA-4 semanas. T. Goldner, 4X).

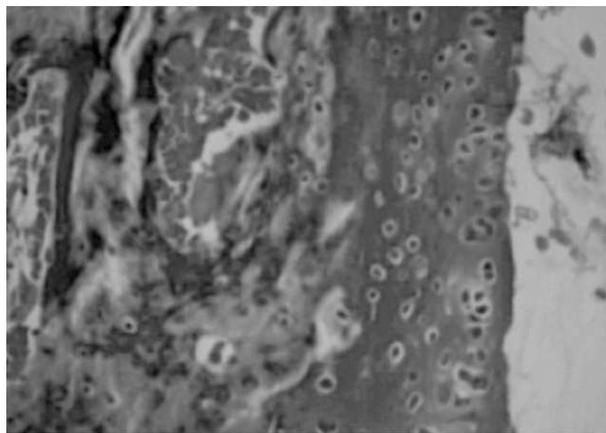


Figura 4. Detalle de un hueso más maduro que el de la anterior micrografía, donde destaca una interfase hueso-implante de tejido cartilaginoso. En el hueso cortical también se observan hileras de osteoblastos sintetizando hueso, pero destaca la cantidad de osteocitos que se están englobando y el hueso primario que se está mineralizando, hecho que no ocurre en este tiempo en los grupos anteriores.

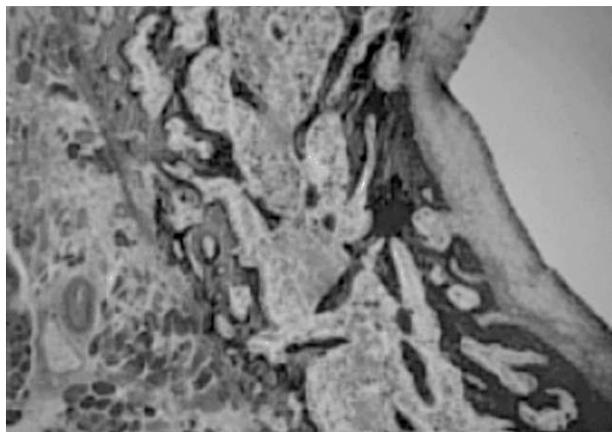


Figura 3. Micrografía que muestra de derecha a izquierda: en primer lugar (en blanco) el hueco dejado por la varilla (tras el proceso de inclusión de la muestra). A continuación un tejido de interfase hueso-implante, formado por tejido conectivo. Adyacente se encuentra el endostio con actividad osteoformadora y el hueso cortical. En éste aparecen grandes cavidades lacunares, en cuyos bordes se aprecian fundamentalmente hileras de osteoblastos mostrando su actividad sintética y en menos ocasiones osteoclastos llevando a cabo la reabsorción del hueso. Todo ello justifica el proceso de remodelación que sufre el hueso, necesario para su adaptación al nuevo sistema creado. Por último se observa el periostio con menor actividad sintética y el músculo adyacente (HA 4 semanas. Tricrómico de Goldner [TG], 4X).

lución de la lesión. Analizando la formación de hueso se puede decir que todos los grupos presentan capacidad osteoformadora. Los grupos que contienen hidroxiapatita mostraban radiológicamente una mayor cantidad de zonas densas en el espacio de resección e histológicamente formación de osículos en distintas zonas, así se han podido observar: en vecindad del implante, en zonas más lejanas, incluso, a las 8 semanas en el interior de la varilla. Por tanto, se puede decir que los grupos II y III presentan capacidad osteoconductora.

Con respecto a la capacidad osteoinductiva, característica de los factores de crecimiento, sólo pudo ser valorada en el grupo III ya que fue el único que presenta el FGF. Comparando la evolución de la lesión se puede decir que el FGF acelera el proceso de regeneración. Radiológicamente se aprecia en el grupo III cómo el tamaño del defecto ha disminuido considerablemente incluso en las primeras etapas del estudio. Lo más destacado de este grupo se observó histológicamente a las 8 semanas, donde aparecía hueso neoformado maduro alrededor de la varilla, que albergaba médula ósea de características hematógenas, y a su vez este hueso se encontraba rodeado por un tejido óseo más maduro que albergaba médula ósea amarilla (figs. 5 y 6).

En cuanto a la respuesta observada en el radio éste sufre en las primeras semanas un enorme crecimiento de nuevo hueso, a expensas del periostio, ofreciendo una imagen histológica similar a extensiones de morfología alar que parecen alargarse hacia la zona del defecto del hueso adyacente, es decir, el cúbito.

DISCUSIÓN

La formación de nuevo hueso se produce a partir de la influencia de los biomateriales utilizados en el estudio, siendo dicha formación tanto membranosa como endocondral. La evolución de la lesión, al igual que apuntaron otros autores⁶ comienza con la formación de hueso primario desde los extremos de resección y la membrana interósea. Posteriormente se produce una remodelación del mismo formando hueso trabecular y/o cortical maduro. Con respecto al estudio de las propiedades de los biomateriales utilizados en el implante, todos ellos presentan capacidad osteoformadora. Los grupos II y III, presentan capacidad osteoconductora,

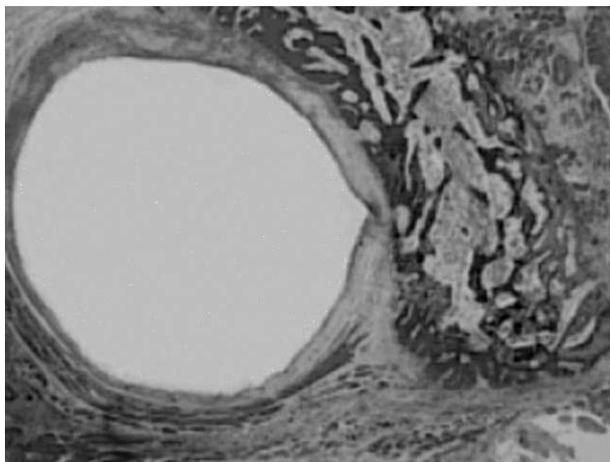


Figura 5. Corte proximal donde se observa alrededor de toda la varilla un tejido conectivo de interfase. En la parte derecha se observa un hueso cortical primario que se está sintetizando tanto a expensas del endostio como del periostio en la cortical cercana al radio. Por tanto, gracias a la influencia interósea.

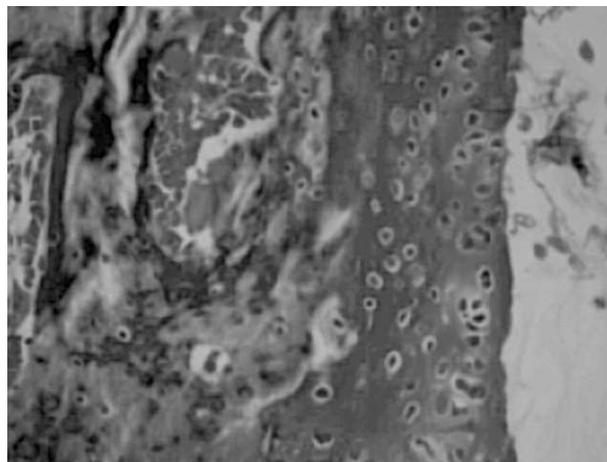


Figura 6. Corte central del mismo hueso donde se observa una interfase más celular formada por tejido conectivo. Adyacente a la zona interósea se está sintetizando un hueso primitivo (aún sin calcificar), a partir de tejido cartilaginoso (HA 4 semanas TG 2x).

debida a la HA y sólo el grupo III presenta capacidad osteoinductiva, debida al bFGF. Por tanto, las ventajas del modelo utilizado en el grupo III son evidentes, ya que presenta las características necesarias para la reparación de lesiones con defectos críticos. Por una parte, la HA permite que las células se alojen sobre su estructura dirigiendo la formación del nuevo hueso a lo largo del defecto^{7,8}, aunque quizás hubiera sido más efectiva con una mayor porosidad⁹. Con respecto al bFGF, éste acelera todo el proceso de reparación activando la síntesis de células osteoformadoras. En estudios *in vitro*¹⁰ se ha visto que tiene un alto potencial mitogénico sobre células mesenquimales en la formación de preosteoblastos¹¹. Estudios *in vivo* realizados en conejo¹² y rata¹³, muestran la estimulación de la formación intraósea. Además, se ha visto que inhibe la diferenciación de osteoclastos directa e indirectamente¹⁴. Por esto, el grupo III presenta una reparación más precoz que el resto de los grupos estudiados. Se ha descrito en la literatura², de modo generalizado en humanos, que probablemente las lesiones con un defecto mayor de 2,5 cm requieren injerto y las mayores de 7 cm requieren injerto vascularizado, siendo el aporte sanguíneo el factor limitante en estas lesiones. Pero a pesar de esta generalización, realizada después de múltiples estudios^{5,6,15}, concluyen que dependiendo del animal y la localización de la lesión el tamaño crítico del defecto es distinto. En el presente estudio, el defecto creado es de 2,5 cm, por tanto², sin la utilización de injerto la reparación podría tener éxito. Pero si nos basamos en las afirmaciones de otros autores^{5,6,15}, dicho tamaño en el cúbito de conejo sobrepasa el tamaño del defecto crítico. Además, cuando un defecto es crítico, el espacio entre los extremos de éste son invadidos por músculo y tejido fibroso evitando la formación de tejido óseo². Por tanto, podríamos decir que el modelo formulado en este trabajo cumple con el objetivo planteado que es la

estimulación, por parte de los biomateriales contenidos en las varillas, de la formación ósea en un defecto crítico. De cualquier manera, aún quedan muchos años de investigaciones para encontrar el sistema que no sólo cumpla el objetivo de formación ósea en un defecto crítico, sino que lo haga en un tiempo y con una calidad precisa. Hasta el momento tanto cirujanos como investigadores están de acuerdo con el éxito de los injertos, a pesar de sus desventajas. Pero obviando dicha técnica, el éxito se conseguiría mediante materiales con características osteoinductivas, osteoconductoras, biodegradables y con porosidad. En los últimos años también se ha optado por la implantación de cultivos celulares, pero en este caso también se requiere un soporte para la localización de dichos cultivos. Se ha debatido sobre la utilización de fijadores internos o externos en grandes defectos óseos. Se ha optado por fijadores externos^{16,17,36} y en otras ocasiones^{18,37}, al igual que en el presente trabajo, se prefieren los de fijación interna. El distinto acercamiento entre los extremos de la lesión puede tener consecuencias diferentes en la estimulación mecánica de los implantes y los extremos de resección diafisarios. Quizás la estimulación mecánica sea mayor por la utilización de un fijador externo (elástico) y menor o nula por la utilización de un fijador interno (rígido). Pero las desventajas que puede tener la colocación de placas y tornillos, como fijadores externos que necesitan su posterior extracción; sobre la utilización de uno o diversos biomateriales (sean o no biodegradables) como fijadores internos, hace plantearnos de nuevo la cantidad de premisas que hay que tener en cuenta a la hora de estudiar y tratar una lesión que conlleve un defecto de tamaño crítico³⁸.

Es posible disponer hoy en nuestro medio de factores de crecimiento en la forma de concentrado plaquetario; la técnica básica consiste en extraer sangre del mismo paciente, por centrifugado concentrar la fracción plaquetaria (tam-

bién parte de la fracción blanca para aprovechar sus citoquinas) y aplicarlo combinado con un material de relleno y un adhesivo de fibrina que puede ser comercial u obtenido en el mismo procedimiento^{14,16,29,23}.

Los usos de este concentrado plaquetario incluyen regeneración de defectos periodontales^{6,7,13,39} para incrementar el volumen, velocidad de integración y calidad de los injertos y hueso regenerado especialmente en áreas de densidad ósea precaria o en grandes reconstrucciones^{2,9,16,17,26,28}, mejorar la magnitud de osteointegración, así como la resistencia de la interfase titanio-hueso de los implantes^{4,40} y las aplicaciones en tejidos blandos.

Creemos firmemente que en un futuro muy próximo dispondremos de BMP comerciales producidas por ingeniería genética a un coste razonable (actualmente está disponible restringidamente con fines clínico-experimentales), unido a mejoras sustanciales en los materiales de relleno (*scaffold*). Ello nos permitirá emplearlos regularmente para aumentar la calidad de integración, así como la resistencia de la interfase hueso-implante de titanio^{1,41}, mejorar notablemente las posibilidades de las técnicas de regeneración tisular guiada, tanto en periodoncia como en defectos periimplantarios y cirugía protética en general^{5,10,15,20,21,29}, mejorar las opciones de las reconstrucciones óseas o los implantes en terrenos irradiados^{30,42}, mejorar los porcentajes de éxito y la calidad de los resultados en la reconstrucción de malformaciones y defectos óseos^{2,3,10,12,15,18,26} y reemplazar un porcentaje significativo de los injertos óseos actualmente utilizados^{2,10,12,15,18,26,43}.

En función de los desarrollos actualmente en curso hay por lo menos dos que seguramente impactarán en el futuro mediato, las técnicas de ingeniería genética y la ingeniería de tejidos.

La denominación conceptualmente más accesible de la ingeniería de tejidos (*Tissue Engineering* [IT o TE]) la define como la fabricación de partes del organismo en el laboratorio, y desde este punto de vista es la evolución inevitable de osteoconducción (biomateriales), osteoinducción (FCT, PMO y genes) y osteoproducción (IT).

En el caso particular del hueso se basa en el desarrollo de tres aspectos separados y confluentes:

1) El *Scaffold*, andamiaje, material de relleno: usualmente comienza con un estudio con tomografía axial computarizada (TAC) de alta resolución con reproducción tridimensional, el cual se somete a análisis por el método de los elementos finitos para obtener un análisis de las cargas a las cuales va a ser sometido, y en función de ello se diseña la pieza, variando la estructura macro de acuerdo a la resistencia mecánica necesaria y los recursos de fijación a utilizar. Una vez obtenido el diseño se fabrica la pieza por un proceso de endurecimiento con un haz de láser de hidroxiapatita en solución de manera similar a como se realiza una estereolitografía. Un aspecto interesante del proceso es que permite variar la estructura micro y macro de la pieza en cada

uno de sus puntos en función de las solicitaciones a las cuales va a ser sometida.

2) Población de células: se toman células del paciente, se identifican con genes marcadores las líneas celulares osteogénicas y se reproducen por cultivo de tejidos.

3) Factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas óseas: se aprovecha su poder angiogénico para mejorar la penetración capilar. En este punto se procede a «sembrar» las poblaciones celulares producidas en el laboratorio en la pieza fabricada, conjuntamente con los FC y PMO. A continuación se implanta el compuesto fijándolo con material de osteosíntesis reabsorbible^{24,25,44} que progresivamente será reabsorbido y reemplazado con los nuevos tejidos formados^{8,45-47}.

En conclusión, el modelo de enclavado endomedular para la fijación, consolidación y reparación de lesiones con defectos óseos de tamaño crítico, presenta fiabilidad para el estudio de la capacidad osteoinductiva y osteoconductor de distintos biomateriales. De los tres modelos de varillas utilizados, los formados por PMMA, HA y BMP presentan los mejores resultados tanto radiológicos como histológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cuadrado MA, de Pedro JA, de Lucas FG, Cebrián JL, Furió V, et al. Reparación experimental de grandes defectos óseos mediante el implante de un extracto parcialmente purificado de BMP. *Rev Ortop Traumatol.* 1992;36:488-94.
2. Pérez-Caballer AJ, de Pedro JA, López-Casero R, León C, López-Durán L. Inducción de la osteogénesis mediante campos eléctricos pulsátiles (PEMFS). Nuestra experiencia. *Inflamación.* 1993;6:49-52.
3. López-Casero R, de Pedro JA, Pérez-Caballer AJ, López-Valero I, San Román J, López-Bravo A. Reparación de un defecto óseo crónico experimental mediante aloinjerto y polímeros biodegradables. *Rev Ortop Traumatol.* 1995;39:350-61.
4. García de Lucas F, de Pedro JA, López-Bravo A, San Román J, Cuadrado MA, Pérez-Caballer AJ, et al. Osteorregeneración inducida por biomateriales y BMP en defectos diafisarios. *Rev Ortop Traumatol.* 1995;39:443-56.
5. García de Lucas F, de Pedro JA, San Román J, López Bravo A, López-Durán L. Bone regeneration induced by hydroxyapatite and BMP. *Orthop Int.* 1996;4:278-82.
6. Salvado M, Martín P, Collía F, Domínguez J, Blanco J, de Pedro JA. Estudio de la regeneración ósea mediante la implantación endomedular de biomateriales. *Pat Ap Locom.* 2005;3:24-30.
7. García de Lucas F, de Pedro JA, Cuadrado MA, San Román J, López Bravo A, López-Durán L. Bone regeneration induced by hydroxyapatite and bone morphogenic protein. *Bone.* 1996;4:1-6.
8. San Román J, Gallardo A, Elvira C, Vázquez B, López-Bravo A, de Pedro JA, et al. Contribution of Polymeric Supports to the Development of Tissue Engineering. *Macromol Symp.* 2001;168:75-89.
9. De la Torre B, Vázquez B, Fernández M, García de Lucas F, Guillén P, de Pedro JA, et al. Estudio experimental de cemen-

- tos óseos acrílicos de reducida toxicidad para Cirugía Ortopédica. *Mapfre Medicina*. 2002;13:155-64.
10. Salvado Muñoz M, Martín Rodríguez AP, Pérez de La Cruz MA, de Pedro Moro JA, Collía Fernández F, Domínguez Hernández J. Influencia del factor de crecimiento fibroblástico y la hidroxiapatita en la regeneración ósea tras resección crítica del cúbito del conejo. *Biomecánica*. 2002;10:68-71.
 11. De Pedro Moro JA, de La Torre Escudero B, Blanco Blanco JF, Salvado Muñoz M, Vázquez Lasa B, San Román del Barrio J, et al. Estudio experimental de la aplicación y biocompatibilidad de un nuevo cemento óseo de baja toxicidad. *Medicina Balear*. 2003;18:30-8.
 12. Méndez JA, González-Corchón A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, Levenfeld B, et al. *In vitro* and *in vivo* behaviour of bioactive glass composites bearing a NSAID. *Key Engineering Materials*. 2004;254-256:177-80.
 13. Méndez JA, Fernández M, González-Corchón A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, et al. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials*. 2004;25:13-24.
 14. Cuadrado MA, de Lucas FG, de Pedro JA, Tome JL, Peñas A, Lorenzo P, et al. Trasplante múltiple tisular. Evaluación del metabolismo óseo y muscular. *Arch Fac Med Zaragoza*. 1988;28:166.
 15. Cuadrado MA, de Pedro JA, Tainta JR, Navarrete FG, Tome JL, Asenjo JA, et al. Inducción ósea por proteína morfogenética parcialmente purificada. Libro de actas. León: II Congreso de la SEEA; 1989.
 16. Cuadrado MA, de Pedro JA, García de Lucas F, Tainta JR, Cebrián JL, Asenjo JA, et al. Evaluación de la proteína morfogenética ósea y la fibronectina en la inducción ósea y regeneración. Libro de Resúmenes. Barcelona: VI Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas; 1990. p. 85.
 17. De Pedro JA, Cuadrado MA, Asenjo JA, Tainta JR, García de Lucas F, López-Durán L. Regeneración ósea BMP-inducida. Aplicación en la reparación de grandes defectos óseos. 3.^{er} Simp. SEIOMM. Madrid: Jarpyo; 1991. p. 34.
 18. Cuadrado MA, de Pedro JA, Furió V, Tainta JR, Fernández-Criado F, Valor R, et al. Investigación experimental de la inducción ósea mediada por BMP. Aspectos ultraestructurales. 3.^{er} Simp. SEIOMM. Madrid: Jarpyo; 1991. p. 35.
 19. De Pedro JA. Biomodelos tisulares en Ortopedia. Abstracts, Murcia: III Cong. Nac. SEEA; 1991. p. 29-30.
 20. De Pedro JA, Cuadrado MA, García de Lucas F, Tomé JL, López-Durán L. Inducción ósea vehiculada por inmunocomplejos. Abstracts, Pamplona: VII Congreso Nnal. SEIQ; 1992. p. 47.
 21. López Casero R, de Pedro JA, Pérez Caballer AJ, López Durán L. Estudio de la regeneración ósea inducida por biomateriales en defectos yuxtacorticales. Abstracts, Zaragoza: XXXI Congreso SECOT; 1994. p. 46.
 22. García de Lucas F, de Pedro JA, López Bravo A, San Román J. Osteorregeneración inducida por biomateriales y BMP en defectos diafisarios. I Congreso Nacional sobre biomateriales (Abstract). Ávila: Fundación MAPFRE Medicina; 1996. p. 96.
 23. De La Torre B, Vázquez B, García de Lucas F, de Pedro JA, López Bravo A, P Guillén P, et al. Cementos óseos acrílicos de baja toxicidad. Parámetros de curado, propiedades y análisis de su biocompatibilidad. Libro de resúmenes. Pamplona: II Congreso General INVESCOT; 1999; p. 32.
 24. De La Torre Escudero B, Vázquez B, de Pedro JA, López Bravo A, San Román J, García de Lucas F. Cementos óseos acrílicos de baja toxicidad. Parámetros de curado, propiedades y análisis de su biocompatibilidad. Libro de resúmenes. Valencia: XXXVI Congreso Nacional SECOT; 1999. p. 211.
 25. De La Torre B, Vázquez B, Calvo-Fernández T, García de Lucas F, de Pedro JA, Casado I, et al. *In vivo* response of acrylic bone cements with activators of low toxicity. *BioAvila 2000*. I Iberic Congress on Biomaterials. XXIII Meeting of the Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales. Libro de Abstracts. Ávila; 2000. p. 59-60.
 26. De La Torre Escudero B, Vázquez B, Calvo-Fernández Babiano T, López Bravo A, García de Lucas F, de Pedro JA, et al. Estudio histológico de un nuevo cemento óseo de baja toxicidad. Libro de resúmenes. Madrid: XXXVII Congreso Nacional SECOT; 2000. p. 571.
 27. De La Torre Escudero B, Vázquez B, Calvo-Fernández Babiano T, López Bravo A, García de Lucas F, de Pedro JA, et al. Estudio histológico de un nuevo cemento óseo de baja toxicidad. *Forum*. 2000;425: 41.
 28. De Pedro JA, De La Torre B, Domínguez J, Blanco J, Salvado M, Collía F, et al. Valoración histológica de un nuevo cemento óseo activado. 24 Symposium de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales. Libro de abstracts. Barcelona; 2001.
 29. Salvado Muñoz M, San Juan Vidal A, Domínguez Hernández I, Amigo Liñares L, Pérez Ochagavía F, de Pedro Moro JA, et al. Valoración histológica de un cemento óseo activado. *Span J Surg Res*. 2002;5:113.
 30. Salvado Muñoz M, Ramírez Barragán A, Domínguez Hernández J, Canillas del Rey F, Martín Rodríguez P, de Pedro Moro JA, et al. Posibles focos de síntesis ósea en la regeneración tras resección crítica experimental en cúbito de conejo. 39 Congreso SECOT. Libro de resúmenes. Barcelona; 2002. p.185-6.
 31. González Corchón MA, Salvado Muñoz M, de La Torre Escudero B, Martín Rodríguez P, Vázquez Lasa B, de Pedro Moro JA, et al. Estudio de la regeneración ósea experimental influenciada por nuevas formulaciones de cementos óseos. 40 Congreso Nacional SECOT; Tenerife; 2003. p. 349-50.
 32. De Pedro JA, de Lucas FG, Navarrete FG, Cuadrado MA, Alsasua A, Lorenzo P. Transplantations tissulaires composites: Appréciation du métabolisme osseux. *Rev Chir Orthop*. 1989;75 (S1):193-4.
 33. De Pedro JA, Cuadrado MA, Tome JL, De Lucas FG, Asenjo JA, Cabadas MI. Bone morphogenesis by partial purified BMP. Preliminary results. *Eur Surg Res*. 1989;21 (S1):65.
 34. Cuadrado MA, de Pedro JA, de Lucas FG, Tome JL, López-Durán L. Osteoinduction by BMP. (Abstracts book). Montreal: SIROT; 1990. p. 73.
 35. De Pedro JA, Cuadrado MA, Tome JL, de Lucas FG, Asenjo JA, Furió V. Evaluation of BMP-Coated Titanium Implants for Use in Grafting Long-Bone Diaphyseal Defects. *Eur Surg Res*. 1991;23 (S1):122.
 36. Cuadrado MA, de Pedro JA, García de Lucas F, Tainta JR, Cebrián JL, Asenjo JA, et al. Assessing bone morphogenetic protein and fibronectin in bone induction and regeneration. *Res Surg*. 1991;3:112.
 37. De Pedro JA, Cuadrado MA, de Lucas FG, Asenjo JA, Furió V, López-Durán L. Experimental Repair of Massive Bone Defects by implantation of a compound of Hydroxyapatite and BMP with Fibronectin and Interleukin 1β. *Eur Surg Res*. 1992;24 S2:14.
 38. Cuadrado MA, de Pedro JA, Criado FF, et al. Action of Fibronectin on BMP-Induced Bone Formation. *Eur Surg Res*. 1992;24 S2:23-4.
 39. De Pedro JA, Cuadrado MA, López G, Asenjo JA, Tainta JR, de Lucas FG, et al. BMP-Induced bone regeneration. Use in

- the repair of massive bone defects. *Calcif Tissue Int.* 1992; 51:237.
40. Cuadrado MA, de Pedro JA, Furió V, et al. Experimental investigation of bone induction using bovine BMP. Ultrastructural aspects. *Calcif Tissue Int.* 1992;51:237.
41. Cuadrado MA, de Pedro JA, de Lucas FG, Furió V, Asenjo JAG, Domínguez I. Experimental repair of massive bone defects by implantation of a partially purified extract of BMP. *Rev Chir Orthop S1*; 1993;300.
42. López-Casero R, de Pedro JA, Pérez-Caballer AJ, López-Bravo A, López-Durán L. A histomorphological and Mechanical Study of Degradable Polymers Used in Bone Defects. *Eur Surg Res.* 1993;25 S1:5-6.
43. De Pedro JA, Cuadrado MA, de Lucas FG, Tomé JL, Pérez-Caballer AJ, Furió V, et al. Immunoinduction in bone with great defects. XXVIII Congress of the ESSR, May 23-26, Abstract book (Ed. H. Aro and J. Niinikoski); 1993. p. 178.
44. Cuadrado MA, de Pedro JA, de Lucas FG, Furió V, Asenjo JAG, Domínguez I, et al. Experimental repair of massive bone defects by implantation of a partially purified extract of BMP. *J Bone Joint Surg Br. Supl. II* 1993;75B:108-9.
45. De Pedro JA, López-Casero R, Rodríguez E, Pérez-Caballer AJ. Study of biomaterial-induced osseous regeneration in a chronic juxtacortical defect. *Eur Surg Res.* 1994;26 S1:43.
46. De Pedro JA, de Lucas FG, Pérez-Caballer AJ, et al. Bone regeneration induced by hydroxiapatite and BMP. XXX Congress of the ESSR, May 10-13, Abstract book. (En: van Gulik TM, Klopper PJ, Bannenberg JJG, Meijer DW, Bouwhuis C), editors. 1995. p. 68.
47. Domínguez J, de Pedro JA, De La Torre B, Blanco J, Collía F, De Cabo A, et al. Biological evaluation of a new bioactivated bone cement. 9th World triennial Congress. Abstract book. San Diego: SIROT; 2002. p. 77.

Conflicto de intereses. Los autores no han recibido ayuda económica para la realización de este trabajo. Tampoco han firmado ningún acuerdo por el que vayan a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial por la realización de este trabajo. Por otra parte ninguna entidad ha pagado ni pagará a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estén afiliados.