

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/26
I.S.B.N.: 978-84-15910-26-8

ANTONIO HERNÁNDEZ LECUONA

**Aplicación de sistemas
de liberación controlada BMP-2
y VEGF en regeneración ósea**

Directores

**CARMEN M.ª ÉVORA GARCÍA
ESTHER SÁNCHEZ SÁNCHEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Tras los años dedicados a este proyecto, quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que lo han hecho posible.

A la Dra. Carmen María Évora, por incluirme en su grupo de investigación y guiar todo el proceso.

A la Dra. Esther Sánchez, con la que he compartido muchas horas en el estabulario, por su dedicación y esfuerzo.

A la Dra. Araceli Delgado, haciendo posible este trabajo.

Al Dr. Manuel Baro, por haberme introducido en el equipo de investigación e iniciarme en las técnicas quirúrgicas de laboratorio.

Al Dr. Ricardo Reyes, por su trabajo histológico.

A la Dra. M^a Rosa Arnau, que siempre ha prestado su colaboración en el estabulario de la universidad.

A la Dra. Beatriz de La Riva y el Dr. Arístides León, cuya dedicación ha sido un ejemplo.

A Margarita de la Rosa, por hacer que los trámites parezcan un asunto sencillo.

Al Equipo de radiología de Hospiten Rambla, que siempre ha prestado su colaboración.

Al grupo Hospiten, como ejemplo de colaboración Universidad-Empresa.

ABREVIATURAS

BMSC: Células mesenquimales de médula ósea

BMP: Proteína Morfogenética Ósea

CPCs: Cementos de fosfato cálcico

Condr: Condrocitos

CRW: Cleveland-Rucker-Wolfe

DAKO: Antisuero policlonal anti-osteocalcina

D-MEM: un medio de cultivo

DRX: Difracción de rayos X

DSC: Differential scanning calorimetry calorimetría diferencial de barrido

ECGS: Suplemento de factores de crecimiento para células endoteliales

ECM: Matriz extracelular

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

FBS: Suero fetal bovino

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

GFs : Factores de crecimiento

GPC: Gel permeation chromatography cromatografía de permeación en gel

HA: Hidroxiapatita

HUVECs: Células endoteliales de cordón umbilical humano

ICDD: International Centre for Diffraction Data

IGF: Factor de crecimiento insulínico

¹²⁵I: Yodo 125 (isótopo radiactivo)

JCPDS: Joint Committee on Powder Diffraction Standards

KeV: Kilo electron voltio

Mw: Peso molecular medio en peso

PB: Tampón fosfato

PDGF: derivado de plaquetas

PLGA: Acido poli (láctico-co-glicólico)

RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

rMSCs: Actividad de la fosfatasa alcalina en células mesenquimales de rata

ROI: Región de interés

SEM: Microscopía electrónica de barrido

TBS: Tris Buffer Salino TAMPON?

TCP: Fosfato tricálcico

Tg: Temperatura de transición vítrea

TGF-² : Factor de crecimiento transformado beta

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

XTT: Sales de tetrazolium

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	9
2.- OBJETIVOS	25
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1.- Materias primas	29
3.2.- Elaboración de los sistemas de cesión	30
3.2.1.- Preparación de microesferas de PLGA.....	30
3.2.2.- Preparación de implantes de brushita.....	31
3.2.3.- Preparación de los cilindros porosos de PLGA.....	32
3.3.- Caracterización de los sistemas.....	33
3.3.1.- Tamaño de partícula de las microesferas de PLGA.....	33
3.3.2.- Eficiencia de encapsulación de BMP-2 y VEGF en las microesferas de PLGA	34
3.3.3.- Ensayos de cesión in vitro	34
1) Estabilidad del marcaje del 125I-GF en medio de cesión	35
2) Bioactividad de los GFs.....	35
a) BMP-2	35
b) VEGF.....	37
3.3.4.- Ensayos de captación de agua y pérdida de masa.....	38
3.3.5.- Estructura microporosa.....	39
3.3.6.- Porosidad de los implantes de brushita	39
3.3.7.- Propiedades y degradación del polímero PLGA	40
3.3.8.- Estructura cristalina de los implantes de brushita	42

3.4.- Estudio in vivo.....	42
3.4.1.- Organización del estudio in vivo	43
3.4.2.- Técnica Quirúrgica y defecto óseo.....	43
3.4.3.- Ensayos de cesión in vivo	45
3.4.4.- Evolución in vivo de las características de los sistemas	47
3.4.5.- Evaluación histológica, inmunohistoquímica e histomorfométrica.....	48

4.- RESULTADOS

4.1.- Características de los sistemas elaborados	56
4.1.1.- Microesferas de PLGA.....	56
4.1.2.- Implantes de brushita	56
4.1.3.- Implantes de PLGA	57
4.2.- Evolución in vitro e in vivo de las características de los sistemas de liberación de GFs.....	59
4.2.1.- Implantes de brushita conteniendo BMP-2	59
1) Ensayos de cesión in vitro.....	59
2) Bioactividad de BMP-2	61
3) Ensayos de cesión in vivo	63
4) Captación de agua y pérdida de masa de los implantes de brushita durante su incubación in vitro.....	64
5) Evolución de la estructura microporosa durante los ensayos in vitro e in vivo.....	65
6) Evolución de la porosidad de los implantes de brushita durante los ensayos in vitro e in vivo.....	68

7) Evolución de la estructura cristalina de los implantes de brushita durante los ensayos in vitro e in vivo	71
4.2.2.- Implantes de PLGA conteniendo BMP-2 o VEGF	76
1) Ensayos de cesión in vitro	76
2) Bioactividad de VEGF	77
3) Ensayos de cesión in vivo	79
4) Captación de agua y pérdida de masa de los cilindros porosos de PLGA durante su incubación in vitro	80
5) Cambios estructurales de los sistemas de PLGA durante los ensayos in vitro e in vivo	82
6) Degradación del PLGA durante los ensayos in vitro e in vivo...	84
4.3.- Análisis histológico, inmunohistológico e histomorfométrico	87
4.3.1.- Implantes de brushita conteniendo BMP-2	87
4.3.2.- Implantes de PLGA conteniendo BMP-2.....	92
4.3.3.- Implantes de PLGA conteniendo VEGF.....	101
4.3.4.- Implantes de PLGA conteniendo BMP-2 y VEGF	107
5.- DISCUSIÓN.....	111
5.1.- Sistemas de liberación de BMP-2. Brushita vs PLGA	112
5.2.- Sistemas de PLGA para la liberación de BMP-2 y VEGF.....	119
6.- CONCLUSIONES	128
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	131
8.- ANEXOS.....	147

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo se caracteriza por su capacidad para regenerarse tras la aparición de una lesión o un defecto. El proceso se lleva a cabo a través de determinados estímulos fisiológicos que convergen para provocar la respuesta reparadora. Sin embargo, determinadas condiciones como un microambiente desfavorable, técnicas quirúrgicas inadecuadas o una inestabilidad biomecánica, pueden conducir a un mal pronóstico de la regeneración del tejido óseo (Perry, 1999). Además, distintas situaciones fisio-patológicas pueden afectar al equilibrio fisiológico del hueso, contribuyendo así a un inadecuado proceso de consolidación de la fractura (Quarto *et al.*, 1995; Raisz, 1999; Lu *et al.*, 2003).

Todas estas situaciones pueden dar lugar a problemas clínicos y socioeconómicos importantes, con graves repercusiones en el estilo y calidad de vida de los pacientes (Giannoudis y Pountos, 2005). Las patologías del tejido óseo representan uno de los retos más importantes desde el punto de vista sanitario, social y económico. Considerando solo los desórdenes músculo-esqueléticos derivados de fracturas de origen osteoporótico [la probabilidad de sufrir una fractura a lo largo de la vida es de una cada tres mujeres y de uno cada dos hombres (Brinker y O'Connor, 2004)] o por extirpación de tumores óseos, anualmente más de 2,2 millones de personas requieren de implantes para recuperar la estructura y función del tejido óseo afectado (Hench, 2009).

A lo largo de la historia, el tratamiento de las fracturas óseas ha consistido en favorecer la capacidad regenerativa del propio organismo y facilitar la consolidación de forma adecuada, principalmente mediante medios mecánicos, inicialmente basados en la inmovilización y en algunos casos, en

la tracción. A lo largo del siglo XX se añade al arsenal terapéutico diversos sistemas de fijación mecánicos (agujas, placas, clavos, fijadores externos...), gracias a los avances de la asepsia, la anestesia y de los materiales, lo que ha supuesto un gran progreso en el tratamiento de algunas fracturas.

Aunque la mayoría de las fracturas consolidan por sí mismas, en el 5%-10% se produce un retraso o falta de consolidación que requerirá algún tipo de cirugía (Einhorn, 1995). Generalmente en las fracturas osteoporóticas y en las de alta de energía, la fragmentación a nivel del foco puede producir una pérdida de tejido óseo que hace necesario o aconsejable, en muchos casos, el aporte de material de relleno en el tratamiento inicial, para aumentar la tasa de consolidación y disminuir el tiempo de la misma (Cornell *et al.*, 2003; Pape *et al.*, 2010). Además, en cirugías como en la artrodesis de columna se mantienen en la actualidad una tasa de pseudoartrosis que alcanza el 35% (Lieberman *et al.*, 2002).

En este sentido, el tratamiento estándar para el retraso de la consolidación, la pseudoartrosis y la falta de tejido óseo a nivel de un foco conminuto, ha sido la fijación quirúrgica abierta con injerto óseo autólogo, que actúa como material de relleno y proporciona los elementos esenciales para la formación de hueso: osteoinducción, osteoconducción y células osteoprogenitoras. El injerto óseo autólogo se considera el “gold estándar” dentro de los sustitutos óseos (Coombes y Meikle, 1994; Yaszemski *et al.*, 1996; Pape *et al.*, 2010; Calori *et al.*, 2011). Sin embargo, el injerto óseo autólogo proporciona una opción limitada y se asocia a aumento del tiempo quirúrgico y complicaciones en la zona de obtención del injerto, tales como dolor, sangrado y/o infección (Damien y Parsons, 1991).

El injerto óseo alógeno es también ampliamente utilizado en la práctica clínica y no requiere una cirugía adicional en el paciente, ni presenta la desventaja de una cantidad limitada. Su principal inconveniente es la ausencia de células osteoprogenitoras, lo que supone una disminución de su capacidad osteoinductora en comparación con el injerto autólogo (Lane y Sandhu, 1987). Otras complicaciones descritas son la fractura del aloinjerto, fracaso en su osteo-integración y aumento de la tasa de infección (Mankin y Gebhardt, 1996). El riesgo de transmisión vírica (VHB, VHC y VIH) es otro riesgo potencial, a pesar de los estrictos controles que se emplean. Así por ejemplo, se ha descrito la transmisión de VIH-1 a un receptor de un cadáver sero-negativo (Simonds *et al.*, 1992).

En definitiva, a pesar de la gran capacidad intrínseca del tejido óseo para su auto-reparación, en numerosas ocasiones se supera la capacidad fisiológica regenerativa, por lo que estaríamos ante un defecto crítico que requiere aporte externo para inducir la osteogénesis (Friedlaender *et al.*, 2001). Para la reconstrucción y relleno de la zona dañada se aplican biomateriales mecánica y biológicamente adecuados, incluyendo cerámica, metales, polímeros y composites (Burg *et al.*, 2000). Estos materiales son la base para la obtención de sistemas que proporcionen los factores de crecimiento (GFs) necesarios para estimular la regeneración ósea, en combinación con la capacidad osteoconductora de los mismos y proporcionar así el soporte adecuado para un crecimiento tisular ordenado.

Por todo ello, se investiga intensamente en varias direcciones como posibles alternativas. Por un lado, muchos de los esfuerzos se dirigen hacia el diseño de materiales cuya actividad se enmarque en el terreno de las terapias regenerativas, en lugar de buscar soluciones de reemplazo del tejido natural por materiales artificiales permanentes (Arcos y Vallet-Regí, 2010). Y

por otro lado, en la búsqueda de estímulos que puedan mejorar las propiedades osteogénicas de dichos materiales, incluyendo el uso de moléculas de señalización como pueden ser los GFs (Kanczler *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011), la implantación de células madre de médula ósea (Derubeis y Cancedda, 2004; Lucarelli *et al.*, 2004) o de células transfectadas que expresan factores osteoinductores en el lugar del defecto (Kimelman *et al.*, 2007).

En el proceso de consolidación de una fractura están implicados factores reguladores locales y sistémicos, incluyendo los GFs y los factores de diferenciación, hormonas, citoquinas y la matriz extracelular que interactúan con varios tipos de células. En general podríamos decir que se produce una cascada de complejos procesos biológicos que siguen una secuencia temporal y espacial definida (Einhorn,1998; Reddi, 2001; Cho *et al.*, 2002).

Actualmente, el papel de los GFs en la regeneración tisular es indiscutible; sin embargo, la forma más apropiada para que estos factores estén disponibles en el lugar deseado no está aún establecida. La administración de los GFs en bolo es evidentemente sencilla pero por un lado, su distribución en el organismo puede producir efectos sistémicos adversos y toxicidad (Tayalia y Mooney, 2009) y por otro, su rápida degradación impide que se alcance la concentración deseada en el tejido específico dañado, durante el tiempo requerido para alcanzar el objetivo terapéutico (Termaat *et al.*, 2005). Por ello, muchos de los esfuerzos realizados se dirigen a la optimización de sistemas que cumplan con los requisitos de soporte y guía de la formación de nuevo tejido, conjuntamente con la capacidad para controlar la velocidad de liberación de moléculas de señalización implicadas en el proceso.

El fenómeno de osteoinducción fue descrito por primera vez por Urist en 1965 y asociado a la presencia de la proteína morfogenética ósea (BMP) (Urist, 1965). Desde entonces se han descrito diversos GFs implicados en la formación de hueso (tabla 1.1) (Devescovi *et al.*, 2008). Las BMPs forman parte del grupo de la superfamilia del factor transformado ² (TGF-²). Se han descrito más de 16 BMPs humanas diferentes (Wozney *et al.*, 1988) de gran interés tanto por su papel en la embriogénesis como en la reparación de hueso adulto (Barnes *et al.*, 1999; Gerstenfeld *et al.*, 2003; Wozney *et al.*, 1998).

Sólo algunas de estas BMPs tienen capacidad osteoinductora por sí mismas, de la BMP-2 a la BMP-7 y la BMP-9 (Cheng *et al.*, 2003); de éstas, en la práctica clínica se han introducido la BMP-2 y la BMP-7. Sin embargo, se ha visto que la inyección directa de estos factores en el foco de fractura no es efectiva por el poco tiempo de permanencia y la corta vida media de los mismos. En el año 2001, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó la utilización de una BMP obtenida mediante tecnología recombinante, concretamente la rhBMP-7 indicada para fracturas con problemas de consolidación y en el año 2002, fue aprobado un segundo factor, la rhBMP-2 (Bessa *et al.*, 2008a). Esto ha permitido la introducción de tratamientos puramente biológicos de acción directa en el foco de fractura, abriendo una nueva vía con el uso de terapias biológicas en el tratamiento de las fracturas.

GF	Fuente	Efecto biológico	Acción en hueso
BMP	Células osteoprogenitoras y endoteliales, osteoblastos, condr.	Condroosteogénesis, osteoinducción.	Migración de osteoprogenitoras, inducción de proliferación, diferenciación y síntesis de la matriz.
FGF	Macrófagos, monocitos, BMSC, condr., osteoblastos, células endoteliales.	Angiogénesis, proliferación de fibroblastos y células del músculo liso de vasos.	Maduración de condrocitos, proliferación y diferenciación de osteoblastos, inhibición de apoptosis de osteoblastos inmaduros, inducción de apoptosis de osteocitos maduros, resorción ósea.
IGF	Osteoblastos, condr., hepatocitos, células endoteliales.	Regulación de los efectos de la hormona de crecimiento.	Proliferación de osteoblastos y síntesis de la matriz ósea, resorción ósea.
PDGF	Plaquetas, osteoblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos	Proliferación células del tejido conectivo, quimiotaxis de monocitos, macrófagos, células del músculo liso, angiogénesis	Migración de células osteoprogenitoras, inducción de proliferación y, diferenciación.
TGF-²	Plaquetas, BMSC, osteoblastos, condr., células endoteliales, fibroblastos, macrófagos.	Inmunosupresión, angiogénesis, estimulación del crecimiento celular, diferenciación y síntesis de ECM.	Proliferación de células mesenquimales sin diferenciar, reclutamiento de precursores de osteoblastos y de osteoclastos; diferenciación de osteoblastos y condr. (inhibición de la diferenciación final), formación de matriz ósea.
VEGF	Plaquetas y osteoblastos.	Angiogénesis.	Conversión cartílago en hueso, proliferación y diferenciación de osteoblastos.

Tabla 1.1.- Principales factores de crecimiento implicados en la reparación de tejido óseo (Devescovi et al., 2008). *BMP: Proteína Morfogenética Ósea; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; IGF: insulínico; PDGF: derivado de plaquetas; TGF-²: transformado beta; VEGF: vascular endotelial; BMSC: células mesenquimales de médula ósea; ECM: matriz extracelular; Condr: condrocitos.*

Actualmente, la BMP-2 y BMP-7 se encuentran comercializadas para administración local, previamente embebidas en esponjas de colágeno. A pesar de que los resultados de los ensayos pre-clínicos y clínicos fueron esperanzadores mostrando la potencial eficacia de las BMPs en la reparación y regeneración ósea (Johnson *et al.*, 1992; Geesink *et al.*, 1999; Giannoudis y Tzioupis, 2005), no se ha podido demostrar su superioridad en comparación con los injertos de hueso autólogo (Gautschi *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en clínica han sido desalentadores, probablemente como consecuencia de una falta de optimización de la relación dosis-concentración en el lugar del defecto, y tiempo de permanencia de la proteína en el mismo. Todo ello indica que la causa en gran parte, puede ser una falta de optimización del sistema de liberación, con una velocidad de cesión excesivamente elevada que obliga al uso de dosis que podrían ser demasiado altas. Al igual que cualquier sustancia activa, concentraciones muy bajas pueden ser inadecuadas para estimular el crecimiento óseo, mientras que niveles muy altos pueden producir un sobrecrecimiento óseo, además de efectos secundarios sistémicos (Itoh *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2005a); Otro aspecto a tener en cuenta, es que la administración de dosis altas puede dar lugar a una resorción inicial de hueso, dado que las BMPs estimulan tanto la actividad osteogénica como osteoclástica (Udagawa., 2002).

Además de alcanzar la concentración adecuada de BMPs en el foco de fractura, es importante tener en cuenta que los diversos GFs han de ir apareciendo en una secuencia temporal determinada (Uchida *et al.*, 2003; Dimitriou *et al.*, 2005) para optimizar la respuesta. Así por ejemplo, el PDGF está presente en el lugar de la fractura sólo durante los primeros días, mientras que la BMP-2 parece que se expresa y realiza distintas funciones

desde los primeros días hasta la tercera o cuarta semana (Dimitriou *et al.*, 2005; Phillips, 2005; Devescovi *et al.*, 2008). El VEGF, de acuerdo con Dimitriou (2005), sólo se expresa a partir de la tercera semana y durante una única semana; sin embargo, según los resultados obtenidos por otros autores (Uchida *et al.*, 2003; Pufe *et al.*, 2002) a partir de experimentos realizados en ratas, el VEGF se expresa en angioblastos, células osteoprogenitoras y osteoblastos durante los primeros siete días y decrece a partir de los once. En resumen, actualmente no existe un consenso en la dinámica de la aparición de todos los GFs.

Un aspecto importante a resaltar es la elevada vascularización del tejido óseo. La conexión entre vasos sanguíneos y células óseas es imprescindible para mantener la integridad del esqueleto. La angiogénesis es crucial tanto en los procesos de formación y desarrollo óseo, como en los de reparación. El desarrollo de una red vascular es crítico para mantener la homeostasia y la capacidad regenerativa de un hueso vivo (Brandi y Collin-Osdoby, 2006). Los vasos sanguíneos transportan el oxígeno, nutrientes, factores solubles y distintos tipos de células a todos los tejidos del organismo. La formación y maduración de la estructura vascular es una de las primeras etapas de la organogénesis (Coultas *et al.*, 2005). En el proceso de neoangiogénesis están implicados un gran número de factores, tales como el FGF, varios miembros de la familia de TGF- β , PDGF, IGF, HGF (hepatocito); sin embargo, el VEGF y sus correspondientes receptores regulan la cascada de eventos moleculares y celulares que desembocan finalmente en los procesos de vasculogénesis, angiogénesis o formación de los vasos del sistema linfático (Carmeliet y Collen, 2000; Yancopoulos *et al.*, 2000; Ferrara y Gerber, 2001; Rossant y Howard, 2002; Tammela *et al.*, 2005; Devescovi *et al.*, 2008). Además de controlar la angiogénesis, el VEGF juega un papel muy importante en el desarrollo del tejido óseo (Gerber *et al.*, 1999; Haigh *et al.*,

2000; Zelzer *et al.*, 2002) y su reparación (Street *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2002). El VEGF está implicado en la promoción de la osificación endocondral e intramembranosa, que forma parte del proceso de crecimiento del hueso (Gerber y Ferrara, 2000; Ferrara *et al.*, 2003).

Los factores que estimulan la angiogénesis se han estudiado solos y en combinación con otros factores osteoinductores para promover el efecto sinérgico y favorecer el crecimiento del hueso y la reparación de las fracturas. Algunos estudios han puesto de manifiesto que la combinación de factores angiogénicos y osteogénicos puede potenciar la reparación y regeneración ósea (Geiger *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2005; Kanczler *et al.*, 2010).

Sin embargo, los resultados de algunos estudios indican que la combinación de VEGF y BMP-2 no ha producido el efecto sinérgico esperado (Kempen *et al.*, 2009). Los autores concluyeron que podría ser debido a la falta de control de la velocidad de liberación del VEGF. Estos resultados apoyan la necesidad de optimizar la cinética de liberación de cada uno de los GFs, no sólo con respecto a la concentración local, sino también en relación al tiempo de permanencia del factor en el defecto a reparar (Constantz *et al.*, 1998; Frayssinet *et al.*, 1998; Schilling *et al.*, 2004). Consecuentemente, la presencia localizada, secuencial y controlada de varios GFs podría simular las condiciones fisiológicas para acelerar la reparación de defectos óseos.

Para alcanzar estos objetivos será necesario disponer de sistemas o scaffolds que faciliten la interacción entre células y proporcionen el soporte estructural para la formación de nuevo tejido, además de actuar como sistemas de liberación controlada de sustancias bioactivas (Seeherman y Wozney, 2005).

El sistema ideal debe poseer diversas características para estimular la regeneración del hueso. Por ello, los sistemas deben ser:

Osteointegrables: Unirse químicamente al hueso sin interfase de tejido fibroso (Constantino y Freidman, 1997).

Osteoconductores: Facilitar el crecimiento óseo en su superficie (Constantino y Freidman, 1997).

Osteoinductores: Capacidad de inducir la diferenciación hacia la formación de osteoblastos (Cypher y Grossman, 1996).

Osteogénicos: Inducir la formación de nuevo tejido óseo a partir de los osteoblastos presentes en su estructura (Cypher y Grossman, 1996).

Estos sistemas han de provocar una respuesta inflamatoria adecuada; deben tener una porosidad suficiente para permitir la invasión tisular; deben ser biodegradables, para finalmente poder ser sustituidos por tejido regenerado; han de proteger a los GFs de la degradación y mantener su bioactividad hasta que sean liberados en el tiempo y el espacio requerido, estimulando la adhesión, proliferación y diferenciación celular para promover la regeneración ósea (Kanczler *et al.*, 2010; Kolambkar *et al.*, 2011). Finalmente, han de ser esterilizables, de fácil manejo, estables durante su almacenamiento, de fácil distribución comercial y superar la aprobación por parte de los organismos reguladores competentes (Bessa *et al.*, 2008b).

Un repaso de la literatura científica nos confirma que se han estudiado una gran variedad de scaffolds tridimensionales elaborados con distintos materiales que potencialmente podrían ser útiles como sistemas de liberación de fármacos inductores de la regeneración ósea (Saito *et al.*, 2005b; Chu T-MG *et al.*, 2007; Haidar *et al.*, 2009). Cabe destacar que la mayor parte de

ellos han sido elaborados con materiales cerámicos, polímeros y sus composites. En este trabajo hemos utilizado dos materiales sintéticos, el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) y la brushita, para la elaboración de dos sistemas diferentes conteniendo BMP-2 y/o VEGF.

El PLGA es un copolímero sintético extensamente utilizado por su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Ha sido aceptado para uso humano por la FDA para elaborar suturas, implantes vasculares, vehículos de fármacos y scaffolds en ingeniería de tejidos. Una de sus características fundamentales es que, en función de su composición y de la proporción ácido láctico:glicólico, pueden modificarse sus propiedades, como el grado de cristalinidad, peso molecular, porosidad y cinética de degradación (Miller *et al.*, 1977; Grayson *et al.*, 2004). Como consecuencia de ello, el periodo de permanencia en el organismo puede modificarse según se requiera, en función del objetivo terapéutico. Este material se ha usado ampliamente para la elaboración de sistemas de liberación tanto de fármacos convencionales, como de péptidos, proteínas y GFs.

Por otro lado, los cementos de fosfato cálcico (CPCs) son compuestos que se utilizan en clínica como sustitutivos óseos. La hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico (TCP) son los componentes de este grupo más estudiados. Estos dos productos se consideran biocompatibles y bioactivos por sus propiedades osteoconductoras y capacidad de reabsorberse; sin embargo, la degradación de la HA es considerablemente más lenta que la del TCP (Nilsson *et al.*, 2002). La velocidad de resorción del material influye evidentemente en el proceso de regeneración, los osteoclastos retiran partículas de material, los huecos formados pueden entonces rellenarse con el nuevo hueso formado por la actividad de los osteoblastos. Por tanto, los biomateriales con una lenta resorción interfieren en el proceso de

regeneración (Schilling *et al.*, 2004), mientras que la estabilidad durante dicho proceso puede verse comprometida por una velocidad de resorción muy elevada (Stavropoulos *et al.*, 2004; Lieberman *et al.*, 2005).

Además del TCP, la brushita presenta una velocidad de resorción *in vivo* más elevada que la HA, permitiendo la sustitución simultánea del material por el tejido formado (Chow *et al.*, 2003, Trisi *et al.*, 2003). En general, los cementos de brushita poseen menor resistencia mecánica que los cementos de apatita (Ishikawa *et al.*, 1994; Lemaitre, 1995; Andrianjatovo *et al.*, 1996). Sin embargo, con los cementos de apatita *in vivo*, debido a su elevada solubilidad a tiempos relativamente cortos, se observa una disminución de sus propiedades mecánicas que, después de unas semanas, aumentan como consecuencia del crecimiento óseo que se produce (Ikenaga *et al.*, 1998). Por tanto, en condiciones fisiológicas, la brushita es más soluble que la HA y presenta una mayor velocidad de reabsorción en animales implantados con este material (Klein *et al.*, 1985). La biodegradación del cemento de brushita se lleva a cabo por una serie de procesos simultáneos que incluyen disolución, fragmentación, transformación a HA (Constantz *et al.* 1998; Flautre *et al.*, 1999; Penel *et al.*, 1999) y fagocitosis (Theiss *et al.*, 2005).

Los cementos de brushita son biocompatibles a pesar del pH ácido que producen en su entorno, inmediatamente después de su implantación. De acuerdo con algunos autores, no se produce ningún tipo de reacción tisular en respuesta al cambio de pH, probablemente debido al efecto tampón del medio, *in vivo* (Frayssinet *et al.*, 1998, Constantz *et al.*, 1998). Por el contrario, otros autores observan procesos inflamatorios cuando se implantan cantidades elevadas del material, e indican que estas reacciones pueden producirse en respuesta a la HA formada durante la degradación de la brushita (Flautre *et al.*, 1999). Recientemente, se han introducido algunas

modificaciones para mejorar las propiedades y facilitar la aplicación de este tipo de cementos. Así, se ha conseguido un cemento de brushita que se puede aplicar en defectos maxilofaciales por técnicas no invasivas y que después de ocho semanas, produce un aumento vertical del hueso (Tamimi *et al.*, 2009). La brushita también se ha combinado con otros materiales como colágeno (Tamimi *et al.*, 2008), que incrementa su capacidad de cohesión y su tensión de compresión, aproximándose a la de hueso esponjoso, además de favorecer la adhesión celular.

Los cementos de fosfatos cálcicos, principalmente de HA o TCP, se han estudiado como sistemas de liberación de sustancias capaces de estimular la formación de tejido óseo, como pueden ser los GFs (Ginebra *et al.*, 2006). Entre otros, cabe destacar el empleo de estos cementos como vehículos de las BMPs para estimular el relleno de defectos críticos (Liang *et al.*, 2005; Kim S.S. *et al.*, 2008; Kim S. *et al.*, 2008) o de otras moléculas activas como el TGF- β 1 (Blom *et al.*, 2001; Link *et al.*, 2008) o PDGF (Cooke *et al.*, 2006). Sin embargo, la brushita, de acuerdo con la bibliografía consultada, no ha sido estudiada como potencial sistema de liberación de sustancias que estimulen la regeneración ósea. Como excepciones, debemos destacar el artículo de Nihouannen *et al.* (2008), en el que estudian la brushita para liberar la citoquina RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) y el publicado por nuestro grupo de investigación que estudia un sistema conteniendo PDGF y VEGF (De la Riva *et al.*, 2010).

La brushita se ha utilizado fundamentalmente como sistema de cesión de antibióticos, destacando trabajos como los de Bohner *et al.* (1997, 2000) con gentamicina, el de Tamimi *et al.* (2008) en el que modifican el cemento de brushita con doxiciclina hclato, o el trabajo de Hofmann *et al.* (2009) con vancomicina y ciprofloxacino. En estos estudios, el objetivo principal ha sido

reducir la velocidad de liberación de estos fármacos. En general, se libera un porcentaje elevado de antibiótico de forma cuasi-inmediata. Teniendo en cuenta que la porosidad es un factor que afecta de forma importante a la velocidad de liberación de los fármacos, la reducción de la porosidad del cemento ha sido una de las estrategias utilizadas. Sin embargo, si el objetivo es que el cemento actúe no sólo como sistema de liberación sino que a su vez ejerza su función de andamiaje para el crecimiento de nuevo tejido, la porosidad que debe perseguirse sería la máxima posible. Por tanto, estos trabajos no aportan resultados útiles para el desarrollo de un sistema para la liberación de GFs destinado a regenerar tejido óseo.

Por su parte, el PLGA se ha utilizado en la elaboración de sistemas de liberación controlada, fundamentalmente en forma de nano y micropartículas, con distintas finalidades. En cuanto a su aplicación en regeneración ósea, se ha empleado como material para elaborar scaffolds y sistemas de liberación de diversos GFs. Centrándonos en el PLGA como sistema-scaffold de BMP-2, hemos de citar entre otros, los estudios realizados para la reparación del seno maxilar en perros (Mayer *et al.*, 1996), la reparación de defectos óseos en el cúbito de conejo (Kokubo *et al.*, 2003), en defectos óseos de fémur de conejo en combinación con células de la médula ósea (Hu *et al.*, 2005), en ratas (Shimazu *et al.*, 2006) y en defectos del suelo orbital en la oveja (Zheng *et al.*, 2006). En todos ellos, se observa un aumento significativo de la regeneración ósea con respecto a los controles y con respecto al sistema de PLGA sin factores.

Por tanto, a pesar de que la BMP-7 y la BMP-2 se encuentran ya en el comercio, como ya hemos comentado, no se han alcanzado los efectos esperados y, probablemente la causa sea la falta de optimización de la formulación, que lleva a una liberación excesivamente rápida y a un corto

tiempo de permanencia en el lugar a reparar. Hay que destacar también, que la dosis recomendada de BMP-7 es de 7 mg y que de acuerdo con la presentación comercial, supone 2 viales de 3,5 mg cada uno, reconstituidos con un gramo de colágeno bovino tipo I. La necesidad de estas dosis tan elevadas se asocia a un alto coste, por lo que diversos autores ponen en duda su coste/eficacia o lo reservan para los casos más graves (Garrison *et al.*, 2007, 2010; Lissenberg-Thunnissen *et al.*, 2011).

Además, conociendo la cascada de procesos celulares y moleculares que tienen lugar durante la regeneración ósea, no parece razonable que con un solo factor, por muy potente que sea, se alcance el máximo grado de regeneración en un periodo de tiempo óptimo.

Todo lo expuesto nos indica que se requieren nuevos sistemas de liberación que proporcionen las sustancias bioactivas de acuerdo con una cinética pre-establecida y de esta forma, permitan obtener el máximo efecto con la dosis mínima.

Considerando el gran reto que supone la regeneración de defectos óseos críticos, las dos principales estrategias a aplicar serían las técnicas de ingeniería tisular y la regeneración tisular *in situ*. En la presente propuesta abordamos la segunda opción, que implica la implantación en el defecto óseo, de estructuras elaboradas con biomateriales y cargadas con factores de crecimiento, proporcionando un sustrato que estimule los procesos de auto-reparación del hueso. Sin dicho implante, la regeneración tisular está seriamente comprometida en los defectos críticos. En estos casos, el proceso de regeneración comienza con la interacción de las células remanentes en la interfaz tejido-implante-molécula de señalización y culmina con la regeneración del tejido reabsorbiéndose el material.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabajo se encuadra dentro del proyecto de investigación MAT 2008-02632/MAT cuyo objetivo final es la elaboración de un sistema de cesión sostenida biocompatible y osteoconductor conteniendo una combinación de factores de crecimiento implicados en la regeneración ósea.

El objetivo del presente trabajo es la elaboración, caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de dos tipos de sistemas, uno osteointegrable y otro biodegradable, ambos con capacidad osteoinductora y diseñados para controlar la cesión de BMP-2 o VEGF, y sus combinaciones, una vez implantado en un defecto óseo.

Los objetivos concretos que nos planteamos son los siguientes:

- 1.- Diseño y optimización de los distintos sistemas conteniendo distintas dosis de BMP-2 o VEGF y sus combinaciones.
- 2.- Caracterización físico-morfológica de las formulaciones y evolución de los materiales *in vitro* e *in vivo*.
- 3.- Estudio de los perfiles de cesión *in vitro* e *in vivo* de los dos GFs, de forma individualizada desde cada sistema y establecimiento de las posibles correlaciones.
- 4.- Evaluación del efecto regenerativo de los factores formulados en los distintos sistemas implantados en un defecto intramedular practicado en el fémur de conejos.

5.- Elección de uno de los sistemas para aplicar y evaluar la combinación de BMP-2 y VEGF.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materias primas

En el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizaron como factores de crecimiento (GFs) los denominados “Vascular endothelial growth factor” (VEGF) o factor de crecimiento vascular endotelial y “Bone morphogenetic protein” (BMP-2) o proteína morfogenética ósea-2, suministrados por Chemicon y Biomedal, respectivamente. Sus correspondientes trazadores radiactivos marcados con ^{125}I , fueron adquiridos a Perkin Elmer.

Tanto el VEGF como la BMP-2 se presentan en forma de polvo liofilizado que se reconstituyen de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y en condiciones asépticas. VEGF se reconstituyó con agua destilada y desionizada ultrapura (milli-Q) estéril (0,1 mg/mL) y la BMP-2 en una disolución estéril de ácido cítrico 20 mM.

El ácido poli-(d,l-láctico-co-glicólico) (Resomer® RG504) (PLGA 50:50) con viscosidad intrínseca declarada de 0,50 dL/g, fue suministrado por Boehringer-Ingelheim.

El fosfato tricálcico beta ($\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$) fue suministrado por Fluka. El fosfato monocálcico [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$] y pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

Se utilizó bicarbonato amónico ($\text{CH}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_3\text{N}$) de Sigma y ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de Merck.

Todo el material de laboratorio utilizado en la elaboración de los sistemas de cesión fue esterilizado en autoclave, así como el agua milli Q y el ácido cítrico.

El resto de productos y disolventes como el diclorometano, fueron empleados sin tratamiento previo.

3.2. Elaboración de los sistemas de cesión

Se prepararon dos tipos de sistemas, implantes de brushita conteniendo microesferas de BMP-2 y cilindros porosos de PLGA conteniendo microesferas de BMP-2 y/o de VEGF.

La preparación de todos los sistemas de cesión se llevó a cabo en condiciones asépticas.

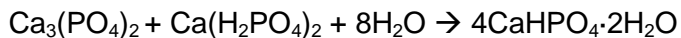
1) Preparación de microesferas de PLGA

Las microesferas de PLGA se elaboraron mediante el método de doble emulsión. Para ello, se añadió la fase interna acuosa formada por 200 µl de alcohol polivinílico (PVA) al 0,07% conteniendo 180 µg de BMP-2 ó 15 µg de VEGF sobre la fase oleosa formada por 100 mg de PLGA en 2 ml de diclorometano (1,8 µg de BMP-2 y 150 ng de VEGF por mg de PLGA). Estas dos fases se emulsificaron durante 3 minutos en Vortex (Genie[®]2, Scientific Industries); seguidamente la emulsión se vertió sobre la fase externa acuosa (100 ml de PVA 0,1%) bajo agitación magnética y se dejó evaporar el disolvente durante dos horas. Las microesferas fueron recogidas por filtración a vacío (filtro Supor[®]-450 de 0,45 µm, Pall Corporation), liofilizadas y conservadas a 4°C hasta su uso.

Algunos lotes de microesferas fueron preparados con ^{125}I -BMP-2 o ^{125}I -VEGF, añadidos como trazadores para determinar la incorporación de los GFs y la cinética de cesión de los mismos.

2) Preparación de implantes de brushita

La fase sólida del cemento de brushita se elaboró según describe Tamimi-Mariño *et al.* (2007), mezclando 1,428 g de fosfato tricálcico beta (β -TCP), 0,8 g de fosfato monocálcico (MCP) y 0,012 g de pirofosfato sódico (NaPy) como sustancia retardante de la reacción, homogeneizando bien con pistilo y mortero. Como fase líquida para la formación del cemento se utilizó ácido cítrico 0,5 M.



El cemento se preparó mezclando 200 mg de la fase sólida con 100 μl de la fase líquida (proporción de polvo/líquido igual a 2 g/ml), homogeneizando con la ayuda de un agitador tipo Vortex (Genie[®]2, Scientific Industries) durante 30 segundos. Como molde para formar el cemento, se utilizó un cilindro de polietileno abierto por una cara con un diámetro interno de 5 mm. La temperatura de fraguado del cemento fue de $20,23 \pm 1,17$ °C, medida con una sonda termométrica (Traceable[®] 2-channel, Cole-Parmer). La mezcla resultante se dejó fraguar a temperatura ambiente durante 1 hora en el interior de los moldes, obteniéndose implantes cilíndricos, que posteriormente fueron mantenidos a 4°C durante 12 h y, conservándose a esta temperatura hasta el momento de su uso.

Las microesferas de PLGA conteniendo BMP-2 fueron incorporadas en la fase sólida. Dependiendo de la dosis de BMP-2 deseada, se incluyeron

20 mg (17,5 µg de BMP-2) ó 4 mg (3,5 µg de BMP-2), completando hasta un total de 20 mg con microesferas blancas (microesferas sin GF) para mantener la estructura y composición del sistema.

3) Preparación de cilindros porosos de PLGA

La preparación de los cilindros se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Yoon y Park (2001) con algunas modificaciones. Primero, se disolvieron 750 mg de PLGA en 4 ml de acetona, mezclándose con 750 mg de bicarbonato amónico previamente pulverizado, que actúa como porogén. La mezcla se realiza en un soporte de teflón y se mantiene a 40°C para que se produzca la evaporación parcial del disolvente, obteniendo así una pasta fácilmente manejable. Para formar los cilindros, la pasta se introduce en una jeringa de polietileno abierta por una cara, con un diámetro interno de 5 mm. Para crear un reservorio central, en el cilindro se introduce un vástago de acero inoxidable de 3,5 mm. Posteriormente, se ejerce presión a través del extremo opuesto de la jeringa, con la ayuda del émbolo, para expulsar el vástago con el polímero adherido a su superficie e introducirlo en una disolución de ácido cítrico al 40% (p/v) para inducir la formación de gas y la creación de poros en el sistema. Después de 24 horas bajo agitación orbital a 50 rpm (Orbital shaking platform POS-300, Grant-bio) y temperatura ambiente, los cilindros se separan fácilmente del vástago y se mantienen en la disolución de ácido cítrico, en agitación durante tres días más, para asegurar la completa disolución del porogén. Transcurrido este tiempo, los cilindros se lavan con agua Milli-Q, se cortan en piezas de 1 cm de largo y se mantienen en una disolución de tampón fosfato salino (PBS) otras 24 horas en agitación. Finalmente y tras controlar el pH, se lavan con agua y se liofilizan.

Los cilindros elaborados fueron cargados con microesferas de PLGA conteniendo GFs, a distintas dosis:

- a) BMP-2: (17,5 μg en 20 mg de microesferas) o (3,5 μg en 4 mg de microesferas).
- b) VEGF: (1,75 μg en 20 mg de microesferas) o (0,35 μg en 4 mg de microesferas).
- c) BMP-2 (17,5 μg o 3,5 μg) con VEGF (0,35 μg).

En todos los casos, el sistema se completa con microesferas blancas hasta 30 mg, capacidad total que admite el cilindro. Finalmente, el extremo abierto del cilindro se cubre con una fina película (2 mm) de pasta de PLGA en acetona.

La distribución de tamaño de partícula del bicarbonato amónico en acetona fue determinado mediante difracción láser utilizando un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd.), resultando una distribución de diámetro medio en volumen (μm) de <52.9 (10%), < 155.0 (50%) and < 348.3 (90%).

3.3. Caracterización de los sistemas

1) Tamaño de partícula de las microesferas de PLGA

La distribución de tamaño en volumen de las microesferas de PLGA fue obtenida por difracción de luz láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd.).

2) Eficiencia de encapsulación de BMP-2 y VEGF en las microesferas de PLGA

La eficiencia de encapsulación de los GFs en las microesferas se determinó a través de la medida de los niveles de radiactividad en tres alícuotas de microesferas liofilizadas, usando un contador gamma (Cobra II®, Packard). La radiactividad obtenida por peso de microesferas, se comparó con la radiactividad inicial de ^{125}I -VEGF o ^{125}I -BMP-2 utilizados como trazadores en la preparación de los distintos lotes.

3) Ensayos de cesión *in vitro*

El estudio de la cinética de liberación *in vitro* de los GFs se llevó a cabo en incubador de CO_2 (5% de CO_2 , humedad relativa del 95% y 37°C). Un cilindro de PLGA o un implante de brushita, según el ensayo, se incubó en 3 ml de medio de cesión, compuesto por D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrich) con 10% de suero fetal bovino (FBS) (PAA Laboratories) y 0,02% de azida sódica (Roth). El ensayo se llevó a cabo por triplicado, utilizando tubos de polipropileno "vent valve", que permitieron el intercambio de gases con la atmósfera del incubador, bajo agitación lenta (100 rpm) usando un agitador orbital (Orbital shaking platform POS-300, Grant-bio). A tiempos preestablecidos, se tomaron muestras de 0,25 ml que inmediatamente se repusieron con el mismo volumen de medio fresco, manteniéndose así las condiciones sumidero durante todo el ensayo. La radiactividad de las muestras tomadas se midió en el contador gamma. El porcentaje de ^{125}I -GF cedido desde cada una de las formulaciones ensayadas se estimó teniendo en cuenta la actividad inicial en el sistema y la desintegración radiactiva del ^{125}I , cuyo periodo de semidesintegración es de 60 días.

1- **Estabilidad del marcaje del ^{125}I -GF en medio de cesión**

La integridad del marcaje de los GFs con el ^{125}I en el medio de cesión a lo largo del tiempo fue monitorizada por cromatografía en capa fina (TLC). Para ello, se incubó una disolución de ^{125}I -GF ($1\mu\text{Ci/ml}$) en el mismo medio y condiciones dadas para los ensayos de cesión, durante 5 semanas. A determinados intervalos de tiempo se toma una alícuota de $7\mu\text{l}$ y se deposita sobre una tira ($0,9\text{ cm} \times 8\text{ cm}$) de sílica gel (60 F_{254} , Merck) usando como fase móvil una mezcla de metanol:agua ($85:15$). Una vez desarrollada la cromatografía a lo largo de 5 cm , las placas se cortan en 3 porciones iguales (desde la base hasta el frente) y se mide la radiactividad en cada una de ellas. La radiactividad que permanece en la base corresponde al producto marcado ^{125}I -GF ($R_f = 0$) mientras que la que se detecta en el frente corresponde al $^{125}\text{I}^-$ libre ($R_f = 1$).

2- **Bioactividad de los GFs**

Este estudio se llevó a cabo con las microesferas de BMP-2 y VEGF, con el fin de determinar la posible influencia del método de elaboración de las microesferas y de la incubación a 37°C , sobre la actividad de dichos factores.

a) ***BMP-2***

La bioactividad de BMP-2 liberada desde las microesferas de PLGA se determinó midiendo su efecto diferenciador en términos de actividad de la fosfatasa alcalina en células mesenquimales de rata (rMSCs).

Las rMSCs fueron obtenidas a partir de ratas Sprague-Dawley, machos de 6 semanas de vida y pesos de aproximadamente $150\text{-}180\text{ g}$,

siguiendo el método descrito por Dobson *et al.* (1999). Para ello, la médula ósea de las tibias y fémures de 4 ratas se extrae por centrifugación. El pool de células de médula ósea fue resuspendido y expandido en frascos de cultivo con medio D-MEM (glucosa, 4,5 g/l) y HEPES (25 mM) (Biochrom, Cambridge, UK), suplementado con 20% de FBS Gold (suero bovino fetal), 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y L-glutamina (200 mM) (PAA Laboratories). Las células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂. Después de tres días, los cultivos fueron lavados con PBS, para eliminar las células no adheridas, añadiendo posteriormente, medio fresco. Una vez confluyente, las células fueron despegadas con tripsina y congeladas en un medio de congelación (90% de FBS y 10% de Dimetilsulfóxido) (DMSO, Sigma) en nitrógeno líquido hasta su uso.

Para medir la actividad de la fosfatasa alcalina en rMSCs (Huang *et al.*, 2010) se sembraron 2×10^5 células en pase 2 por pocillos en placas de seis, conteniendo el mismo medio de cultivo que el descrito anteriormente. Después de 24 y 72 horas, el medio fue reemplazado con D-MEM enriquecido con 10% de FBS Gold, suplementado con las disoluciones estándares de BMP-2 (rango de concentraciones entre 50 y 300 ng/ml) o con las alícuotas procedentes de los medios conteniendo BMP-2 liberada desde las microesferas. El aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina citosólica fue medida después de 6 días de añadir la BMP-2 al medio, usando un kit comercial colorimétrico (SensoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit, AnaSpec, Inc. Fremont, CA) y siguiendo las instrucciones del laboratorio.

La actividad de la fosfatasa alcalina inducida por la BMP-2 cedida desde las microesferas tras 1 y 7 días de incubación fue comparada con la inducida por las disoluciones estándares de BMP-2 (Patel *et al.*, 2008). Para

verificar el efecto de la BMP-2 se utilizaron como blancos rMSCs sin tratar (medio sin BMP-2).

b) VEGF

La actividad del VEGF liberado desde las microesferas de PLGA se determinó a través de su efecto proliferativo sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs).

Previamente al ensayo de bioactividad, las HUVECs proporcionadas por el Dr. Díaz (Hospital Universitario de Canarias), fueron expandidas en placas de cultivo cubiertas con gelatina (Sigma) conteniendo medio de cultivo completo: Medio 199 con Hank's BSS, 100 mg/l de L-glutamina, 25 mM de HEPES y 1,4 g/l de NaHCO₃ (BioWhittaker), suplementado con 20% de FBS Gold (PAA Laboratories), 50 mg/ml de suplemento de factores de crecimiento para células endoteliales (ECGS de Becton Dickinson), 3,33 UI/ml de heparina porcina (Sigma), 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina.

Para el ensayo de actividad del VEGF se sembraron 5×10^3 HUVECs por pocillo en 150 µl de medio de cultivo básico (igual que el descrito anteriormente pero sin ECGS ni heparina) usando placas gelatinadas de 96 pocillos. A continuación se añadieron otros 150 µl de medio conteniendo disoluciones estándares de VEGF (concentración final entre 1 y 4 ng/ml) o conteniendo alícuotas procedentes de la incubación de las microesferas de PLGA durante 1 ó 7 días. Al cabo de 3 días de la siembra, se realizó un cambio de medio con las mismas disoluciones estándares de VEGF o las correspondientes alícuotas procedentes de los ensayos de cesión.

Al final del ensayo (quinto día desde la siembra) se determinó el número de células viables mediante un ensayo colorimétrico usando sales de tetrazolium (XTT) según las instrucciones del fabricante (Cell proliferation Kit, Roche Molecular Biochemicals). Este método se basa en la capacidad que tienen las células vivas, en concreto las deshidrogenasas presentes en las mitocondrias, de reducir la sal de tetrazolium dando lugar a compuestos coloreados (naranja intenso) de formazan. Se incubaron las células con una disolución de XTT durante 2 horas, tras lo cual el color desarrollado se cuantificó espectrofotométricamente en un lector de placas Synergy HT (Biotek, Vermont, USA) a 492 nm (referencia a 690 nm).

La bioactividad del VEGF cedido desde las microesferas tras 1 y 7 días de incubación se determinó por comparación con la proliferación celular inducida por disoluciones estándares de VEGF (Patel *et al.*, 2008). Para verificar el efecto del VEGF se utilizaron como blancos HUVECs sin tratar (medio sin VEGF).

4) Ensayos de captación de agua y pérdida de masa.

Se realizaron para los sistemas de brushita y cilindros porosos de PLGA, elaborados con microesferas blancas.

Para llevar a cabo estos ensayos, los sistemas fueron incubados en 3 ml de medio de cesión, en las mismas condiciones que se describen para los ensayos de cesión (apartado 3). La captación de agua y la pérdida de masa fueron determinadas gravimétricamente. Para ello, a determinados tiempos, se retiran tres muestras de cada formulación, se les elimina el exceso de agua y se pesan. Después, estos sistemas se liofilizan y se vuelven a pesar. Los

porcentajes de agua captada y la pérdida de masa se calculan mediante las ecuaciones (3.1) y (3.2), respectivamente. El ensayo se realizó por triplicado.

$$\text{Captación de agua (\%)} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100 \quad (\text{ec. 3.1})$$

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = [(W_0 - W_d) / W_0] \times 100 \quad (\text{ec. 3.2})$$

donde, W_w es el peso de la muestra húmeda a tiempo t , W_d es el peso de la muestra seca a tiempo t , y W_0 es el peso inicial de la muestra.

5) Estructura microporosa

La estructura superficial e interna de los sistemas elaborados fue examinada por microscopía electrónica de barrido (SEM, Jeol® JSM-6300, Tokyo) a 20 kV, previo recubrimiento con oro/paladio bajo atmósfera de argón. El análisis se realizó antes ($t=0$) y durante los ensayos de cesión *in vitro* e *in vivo*. Las microfotografías obtenidas fueron usadas para la evaluación de la morfología y microestructura de los sistemas y para determinar, en el caso de los implantes de PLGA, la porosidad y el tamaño medio de poro mediante la medida manual del diámetro de 400 poros.

La morfología de la superficie y la estructura interna de los sistemas fue también observada utilizando un microscopio estereoscópico (Leica M205C) con su correspondiente software (Leica LAS, v.3).

6) Porosidad de los implantes de brushita

La porosidad y la distribución de diámetro de poros del sistema de brushita, antes y durante su incubación en el medio de cesión *in vitro* y durante los ensayos *in vivo*, se determinaron por porosimetría de intrusión de

mercurio (Autopore IV 9500, Micromeritics Instrument Co). La determinación de la distribución del tamaño de poro se basó en la relación entre la presión aplicada y el diámetro de poro en el cual el mercurio se introduce, siguiendo la ecuación de Washburn (1921) (ecuación 3.3):

$$D = \left(\frac{-4\gamma \cos \theta}{P} \right)^{1/2} \quad (\text{ec. 3.3})$$

donde, P es la presión aplicada (desde 0,5 hasta 58.000 psia), D es el diámetro de poro, γ es la tensión superficial del mercurio (484 dinas/cm), y θ es el ángulo de contacto entre el mercurio y la pared del poro (141°).

Para los análisis se utilizó un penetrómetro de sólidos de 3,5 cm³ y 0,42 cm³ de stem.

7) Propiedades y degradación del polímero PLGA

Para el estudio de las propiedades y la degradación del polímero de los cilindros porosos de PLGA, se aplicaron las técnicas de GPC (Gel permeation chromatography) y DSC (Differential scanning calorimetry) después de la elaboración de los scaffolds y durante los experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*.

Mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se obtuvieron los correspondientes termogramas depositando las muestras, obtenidas por pulverización de los cilindros secos, en cápsulas de alúmina. El equipo empleado fue un calorímetro diferencial de barrido Mettler (DSC 821^e Mettler Toledo). La temperatura de transición vítrea (T_g) fue determinada realizando las medidas en atmósfera de nitrógeno, entre 10 y 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

La determinación de la distribución de pesos moleculares del polímero se llevó a cabo antes de su utilización y durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*, por la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC) relativa a patrones de poliestireno monodispersos (Tokio Soda Ltd), de acuerdo con el método que se detalla a continuación. Se determinó el peso molecular medio en peso (M_w) y en número (M_n), así como la polidispersividad (pd), para obtener una medida de la dispersión de la curva de distribución. La GPC se llevó a cabo utilizando un equipo Waters compuesto por una bomba (Model 515), un inyector manual (Rheodyne®), un refractómetro diferencial (Model 2414) que permite el control interno y externo de la temperatura y, un horno calefactor para el control de la temperatura de las columnas colocadas en serie. La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el programa de Waters (Waters Breeze GPC software). Las condiciones cromatográficas empleadas fueron:

- Tres columnas: Styragel® HR4, HR3, y HR1.
- Temperatura: 31 °C (detector y columnas).
- Fase móvil: tetrahidrofurano (THF, Merck), filtrado (filtros Millipore FH con tamaño de poro de 0,5 μm) y desgasificado.
- Flujo: 0,9 ml/min.
- Tiempo de análisis: 35 min.
- Volumen de inyección: 20 μl (patrones y muestras).
- Concentración: 0,08% (m/v) en el caso de los patrones y 0,6% (m/v) en el de las muestras a analizar. Tanto los patrones, como las muestras se disolvieron en THF.
- Número de replicados: 3

8) Estructura cristalina de los implantes de brushita

La determinación y evolución de la estructura cristalina de los implantes de brushita secos fue hecha por difracción de rayos X (DRX) a temperatura ambiente con un difractómetro de polvo (Philips XPER'T), equipado con un monocromador secundario y utilizando la radiación $K\alpha$ del Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). El intervalo angular fue $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$, utilizando un tamaño de paso de $0,01^\circ/\text{s}$ (2 s por paso). Los análisis fueron hechos antes y durante los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Las posiciones de los picos de Bragg de la brushita, $\text{Ca}(\text{HPO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se encuentran recogidos en la base de datos ICSD (Inorganic Crystal Structure Database) con el nº 16132.

Los difractogramas de la hidroxiapatita y del fosfato tricálcico se encuentran recogidos en la base de datos JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) del ICDD (International Centre for Diffraction Data) con el nº 40-0008 y 24-0033, respectivamente.

3.4. Estudio *in vivo*

Los ensayos *in vivo* que se describen a continuación fueron aprobados previamente por el Comité de Ética de la Universidad de La Laguna y se llevaron a cabo según las directrices de las guías sobre cuidado y uso de animales en procedimientos de experimentación, recogidas en la legislación española (R.D. 1201/2005) y europea (Directive 2010/63/EU).

Los animales utilizados en los experimentos fueron conejos neozelandeses machos con pesos entre 3 y 3,5 kg. Antes y después de la intervención quirúrgica a la que fueron sometidos, se mantuvieron estabulados bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura de

22°C y con comida y agua *ad libitum* en el Estabulario de la Universidad de La Laguna, en jaulas y condiciones de acuerdo a la normativa europea vigente.

1) Organización del estudio *in vivo*

Como se mencionó en los objetivos, la finalidad de este estudio fue la evaluación del efecto osteogénico y angiogénico de dos factores de crecimiento:

- a) BMP-2 en dos sistemas diferentes: brushita e implantes de PLGA
- b) VEGF en implantes de PLGA
- c) BMP-2 y VEGF combinados en el sistema que mejor se ajuste al perfil de cesión deseado.

Para ello, se llevaron a cabo los correspondientes ensayos para determinar la cinética de cesión, estudiar la evolución de los materiales y finalmente, evaluar histológicamente la capacidad osteoregenerativa de los sistemas elaborados. La descripción de los grupos experimentales se recoge en las tablas 3.1 y 3.2, y la metodología en los apartados que siguen a continuación.

2) Técnica quirúrgica y defecto óseo

Los animales, una vez pesados, son anestesiados con una mezcla de ketamina (35 mg/Kg) y xilazina (5 mg/Kg), vía intramuscular. Aproximadamente 30 minutos antes de la intervención, se les administra una dosis profiláctica de antibiótico (enrofloxacino, Alsir®, 5-15 mg/kg, s.c.) y una de analgésico, buprenorfina (Buprex®, 0,05-0,1 mg/kg, s.c.), para minimizar el dolor post-quirúrgico. A continuación, se procede al afeitado de la pata

trasera derecha y se traslada al área quirúrgica donde se realiza la limpieza de la zona a intervenir, delimitándola seguidamente con povidona yodada (Betadine®). Tras la colocación de campos estériles para aislar la zona, se realiza un abordaje longitudinal en la región parapatelar externa, seccionando las estructuras periarticulares de la cara externa de la articulación de la rodilla, para poder así luxar la rótula tras la artrotomía correspondiente. Esta maniobra se acompaña de un movimiento de flexo-extensión de la rodilla, que deja expuestos los cóndilos femorales (Fig. 3.1).

El defecto óseo consistió en una perforación practicada en la región intercondílea del fémur con una fresa dental Shanon Burr de 6 mm adaptada a un motor eléctrico que alcanza las 1200 rpm. De esta manera, se accede a la zona metafisaria y posteriormente, avanzando en profundidad y respetando las corticales, a la diáfisis femoral. (Sánchez *et al.*, 2001; Baro *et al.*, 2002).

Para evitar posibles calcificaciones periarticulares, se procede a la limpieza de la viruta ósea, producto del fresado, y se introduce el implante elaborado en la cavidad medular.

Posteriormente se procede a la reducción de la rótula, para continuar con la sutura por planos, con material reabsorbible, para luego suturar la piel del animal con material no reabsorbible. Una vez terminada la intervención, se limpia nuevamente la herida quirúrgica con povidona yodada y se les administra una dosis de ketoprofeno (2-5 mg/kg, s.c.), un analgésico antiinflamatorio, para garantizar la analgesia durante la noche. A continuación, se colocan los animales en jaulas independientes, provistas de comida y agua. Posteriormente y tras recuperarse de la anestesia, al cabo de 20-30 minutos, se permite que el animal cargue libremente sobre la pata intervenida.

Durante las 72 horas siguientes a la intervención quirúrgica se les administra una dosis de buprenorfina cada 12 horas.

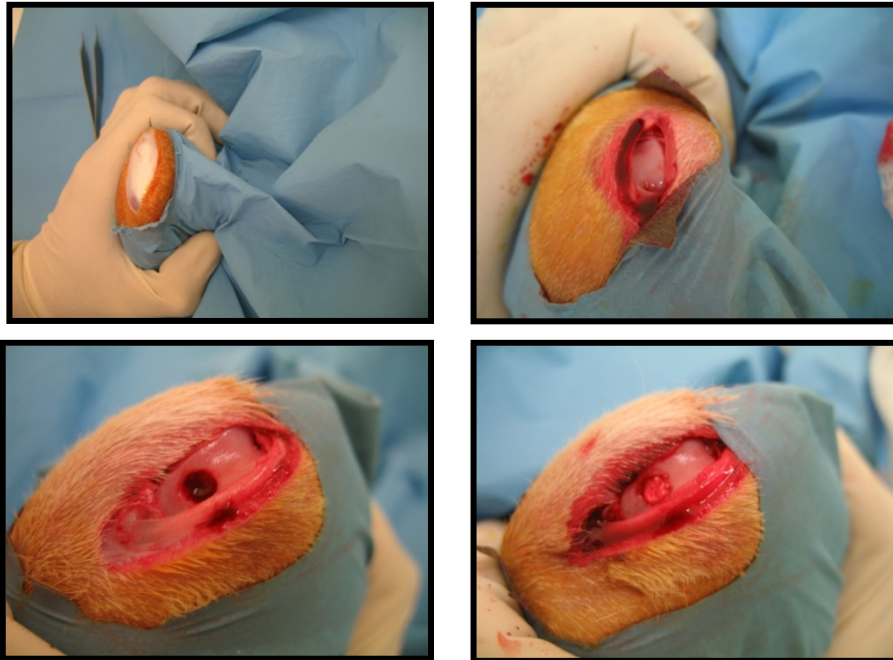


Figura 3.1. Imágenes del procedimiento quirúrgico

3) Ensayos de cesión *in vivo*

El porcentaje de GF remanente en el defecto óseo se calculó midiendo la radiactividad de forma externa (método no invasivo) utilizando un contador gamma tipo sonda (Captus® Nuclear Iberica) según el método previamente descrito y validado por el grupo de investigación (Delgado *et al.*, 2006). Para

focalizar la zona del fémur del animal donde estaba localizado el implante, se colocó al final del detector un colimador de 3,2 x 2 cm.

A cada tiempo muestreado, se toman cinco medidas a 27 KeV, máximo de emisión del ^{125}I , durante 1 minuto. El valor medio de las cinco medidas se toma como la radiactividad remanente para el tiempo muestreado.

La medida inicial tras la administración (tiempo cero) fue considerada como la dosis total administrada (100%). El porcentaje de ^{125}I -GF cedido en cada intervalo de tiempo fue obtenido por diferencia entre la dosis inicial administrada y la radiactividad remanente en el fémur a ese mismo tiempo corregida por el decaimiento asociado al trazador ^{125}I ($t_{1/2}=60$ días). Los perfiles de cesión para cada formulación se obtuvieron a través del seguimiento de la radiactividad remanente en el lugar del defecto óseo.

Los experimentos de cesión se llevaron a cabo en tres grupos de cinco conejos cada uno, a los que se les implantaron los sistemas elaborados con los dos materiales estudiados (tabla 3.1).

Con la finalidad de detectar una posible distribución sistémica de los GFs, se extrajo una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja de cada conejo, a los tiempos de muestreo establecidos para el ensayo de cesión *in vivo*. La radiactividad de las muestras fue determinada con el contador gamma (Cobra II®, Packard).

Grupos	Nº de animales	Sistemas implantados
• BMP-brushita	5	Implantes de brushita con microesferas de ^{125}I -BMP-2/BMP-2.
• BMP-PLGA	5	Implantes de PLGA con microesferas de ^{125}I -BMP-2/BMP-2.
• VEGF-PLGA	5	Implantes de PLGA con microesferas de ^{125}I -VEGF/VEGF.

Tabla 3.1. Grupos de animales experimentales usados para los ensayos de cesión.

Una vez finalizada la cesión de los GFs desde los sistemas ensayados, se sacrificaron los animales con CO_2 , previamente anestesiados y se les extrajo el fémur intervenido, conservándolo a -80°C el tiempo suficiente hasta el decaimiento del ^{125}I . Por último, para asegurar la muerte del animal se procedió a seccionar el diafragma.

4) Evolución *in vivo* de las características de los sistemas

Estos experimentos se llevaron a cabo en dos grupos de 12 conejos cada uno. A uno de ellos, se le implantó el sistema de PLGA con microesferas blancas y al otro, el de brushita, también con microesferas blancas (tabla 3.2). Los tiempos establecidos fueron: 2, 4, 8 y 12 semanas.

Transcurrido el tiempo de estudio los animales fueron sacrificados, tal y como se indica en el apartado anterior. Se procedió entonces a la extracción del fémur, desarticulándolo de la rodilla y de la cadera y extrayéndolo con la mínima cantidad posible de tejido muscular. El hueso fue cortado longitudinalmente con una sierra fina, de tal forma que el implante quedara situado en una de las dos caras, para poder extraerlo sin dañarlo.

Una vez extraídos los implantes, se les elimina cuidadosamente los posibles restos de material biológico y se secan en pentóxido de fósforo. Los implantes son entonces caracterizados por distintas técnicas. Concretamente, los implantes de brushita fueron analizados por porosimetría de mercurio, SEM y DRX. Los implantes de PLGA fueron observados por SEM y analizados por GPC y DSC.

5) Evaluación histológica, inmunohistoquímica e histomorfométrica

El efecto regenerativo y angiogénico tanto de los GFs por separado como de la combinación de ambos, cedidos desde los implantes elaborados en este trabajo, se analizó en cada uno de los grupos de animales (tabla 3.2).

La evaluación histológica se realizó a las 2, 4, 8 y 12 semanas de la implantación de los sistemas en el fémur de conejo, excepto para el caso de los grupos estudiados con la combinación de los dos factores para los cuales se tomaron muestras a las 4 y 12 semanas post-implantación.

A los tiempos preestablecidos, se sacrificaron los animales y se les extrajo el fémur tratado. Los huesos se fijaron en una solución de formol al 10% tamponado en PB (tampón fosfato) pH=7,4. Seguidamente, las piezas se deshidrataron de forma gradual usando disoluciones de concentraciones crecientes de alcohol, se aclararon en toluol e incluyeron en parafina. Se realizaron secciones entre 3 y 8 μm de espesor que fueron recogidas en portas xilanizados. Las secciones fueron posteriormente desparafinadas en toluol e hidratadas usando disoluciones de concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada. Se realizaron cinco series en paralelo sobre cada una de las cuales se aplicaron las diferentes técnicas histológicas

e inmunohistoquímicas para valorar la respuesta reparadora y la vascularización.

Para evaluar la neoformación ósea, se realizaron tres tipos de tinciones: hematoxilina-eritrosina, como tinción topográfica para valorar de forma general la estructura tisular, y las técnicas del tricrómico de Masson y de Cleveland-Rucker-Wolfe (CRW), ambas específicas para tejido conjuntivo y cualquiera de sus variantes. Tras teñir, las secciones fueron nuevamente deshidratadas usando disoluciones de concentraciones crecientes de alcohol, aclaradas en toluol y montadas con Eukitt® para su posterior evaluación histológica.

Para valorar la madurez del hueso neoformado, las secciones fueron sometidas a una técnica inmunohistoquímica indirecta utilizando un antisuero policlonal anti-osteocalcina (Millipore, Barcelona, España), marcador tardío de diferenciación osteogénica y mineralización.

Para evaluar la angiogénesis, las secciones fueron sometidas a una técnica inmunohistoquímica indirecta utilizando un antisuero policlonal anti-factor de von Willebrand, que marca endotelio vascular y permite identificar de manera específica los vasos sanguíneos.

Grupos	Nº de animales	Sistemas implantados
• C (control)	12	Defecto óseo vacío
• B-brushita ⁽¹⁾	12	Implantes de brushita cargados con microesferas blancas.
• B-PLGA ⁽¹⁾	12	Implantes de PLGA cargados con microesferas blancas.
• BMP-3,5-brushita	12	Implantes de brushita cargados con 3,5 µg de BMP-2.
• BMP-17,5-brushita	12	Implantes de brushita cargados con 17,5 µg de BMP-2.
• BMP-3,5-PLGA	12	Implantes de PLGA cargados con 3,5 µg de BMP-2.
• BMP-17,5-PLGA	12	Implantes de PLGA cargados con 17,5 µg de BMP-2.
• VEGF-0,35	12	Implantes de PLGA cargados con 0,35 µg de VEGF.
• VEGF-1,75	12	Implantes de PLGA cargados con 1,75 µg de VEGF.
• BMP-3,5/VEGF-0,35	6	Implantes de PLGA cargados con 3,5 µg de BMP-2 y 0,35 µg de VEGF.
• BMP-17,5/VEGF-0,35	6	Implantes de PLGA cargados con 17,5 µg de BMP-2 y 0,35 µg de VEGF.

Tabla 3.2. Grupos de animales experimentales usados para el análisis histológico. (1): animales con implantes en ambos fémures. El derecho, para histología y el izquierdo, para el estudio de la evolución temporal de los sistemas.

Para el análisis histomorfométrico, se evaluaron entre cuatro y seis secciones por animal, obtenidas principalmente de la zona central del implante, usando el sistema de análisis de imagen (Leica Q-win V3 Pro-image

system, Barcelona, España). La valoración se realizó en una región de interés (ROI) que incluyó tanto la zona del defecto como la zona adyacente al mismo (Fig. 3.2). La ROI comprendió una superficie rectangular de 6 x 5,5 mm situada en la mitad superior del defecto óseo, región correspondiente a la epífisis distal del fémur, y en la cual la neoformación ósea y la osteointegración del implante podían ser evaluadas correctamente.

La valoración de la respuesta reparadora se realizó mediante cuantificación de la superficie de hueso neoformado en las secciones procesadas con las diferentes técnicas histoquímicas.

La neoformación ósea dentro de la ROI se distinguió del implante por diferencias en la estructura y el color. La cuantificación se realizó seleccionando un umbral fijo para la tinción positiva (verde para Masson y azul para CRW). La superficie de hueso neoformado se expresó en mm².

La superficie de contacto hueso-implante se cuantificó midiendo el perímetro de implante en contacto directo con el hueso sin presencia de tejidos blandos. La degradación de los implantes de PLGA y brushita se determinó calculando la superficie de implante remanente, la cual se expresó como porcentaje de la superficie inicial del implante.

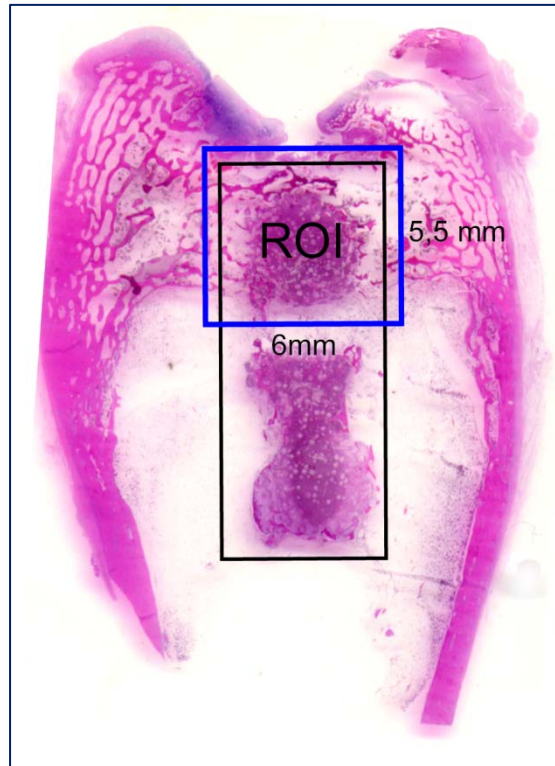


Figura 3.2. Sección horizontal de fémur de conejo tratado con uno de los implantes elaborados, en la región correspondiente a la epífisis y metáfisis. El rectángulo negro indica la localización del implante y el azul, la región de interés (ROI) donde se midió la neoformación ósea y la neovascularización.

Para valorar la madurez del hueso neoformado, la tinción con el antisuero policlonal anti-osteocalcina (DAKO, Barcelona, Spain) se realizó mediante una técnica inmunoenzimática indirecta. Para ello, las secciones se desparafinaron en toluol y se hidrataron en disoluciones de concentraciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada y posteriormente en tampón Tris Buffer Salino (TBS) (pH 7,4 0,1M) que se utilizó en todos los lavados e incubaciones posteriores. Tras ser hidratadas, las secciones fueron sometidas a un proceso de desenmascaramiento antigénico en tampón Tris:EDTA (pH 9, 10:1 mM) a 65°C durante 20 minutos y bloqueadas en suero bovino fetal

(SBF) al 2% en TBS-Tritón X-100 al 0,2%. Posteriormente las secciones se incubaron con el antisuero específico anti-osteocalcina (1/100) toda la noche y a continuación y tras sucesivos lavados con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a biotina (Millipore, Barcelona, España) (1/1000) 60 minutos y un complejo Streptavidina-Peroxidasa (Millipore, Barcelona, España) (1/1000) 60 minutos. La actividad peroxidasa se reveló con una disolución de 4-Cloro-1-naftol al 0,04% y H₂O₂ en Tris-HCl (pH 7,6; 0,05 M). La especificidad de la reacción inmunohistoquímica se verificó en secciones paralelas en las cuales se sustituyó el antisuero específico por suero bovino fetal, no observándose marcaje en este caso.

La intensidad de marcaje de osteocalcina se cuantificó midiendo la intensidad de color en la ROI en las diferentes secciones y normalizando estos valores con respecto a animales conteniendo el implante blanco. El valor correspondiente a la intensidad de marcaje, se expresó en unidades arbitrarias como marcaje relativo (intensidad de marcaje relativo).

Para estudiar el efecto de los factores de crecimiento sobre la neo-vascularización, la tinción con el antisuero policlonal anti-Factor de von-Willebrand (DAKO, Barcelona, España), se realizó mediante una técnica inmunoenzimática indirecta. Para ello, las secciones se desparafinaron en toluol y se hidrataron en disoluciones de concentraciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada y posteriormente en tampón Tris Buffer Salino (TBS) (pH 7,4 0,1M) que se utilizó en todos los lavados e incubaciones posteriores. Tras ser hidratadas, las secciones fueron sometidas a un proceso de desenmascaramiento antigénico en tampón Tris:EDTA (pH 9, 10:1 mM) a 65°C durante 20 minutos y bloqueadas en suero bovino fetal (FBS) al 2% en TBS-Tritón X-100 al 0,2%. Posteriormente, las secciones se incubaron con el antisuero específico anti-Factor de von-Willebrand (1/50) toda la noche y a

continuación y tras sucesivos lavados con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a biotina (Millipore, Barcelona, Spain) (1/1000) 60 minutos y un complejo Streptavidina-Peroxidasa (Millipore, Barcelona, España) (1/1000) 60 minutos. La actividad peroxidasa se reveló con una disolución de 4-Cloro-1-naftol al 0,04% y H₂O₂ en Tris-HCl (pH 7,6 0,05 M). La especificidad de la reacción inmunohistoquímica se verificó en secciones paralelas en las cuales se sustituyó el antisuero específico por suero bovino fetal, no observándose marcaje en este caso.

La neovascularización dentro de la ROI se cuantificó a través del número de vasos sanguíneos (densidad de vasos sanguíneos) y, paralelamente, de la medida de la superficie vascular. La densidad de vasos sanguíneos se expresó en valor absoluto y la superficie vascular se expresó en mm².

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características de los sistemas elaborados

1) Microesferas de PLGA

El rendimiento de encapsulación de BMP-2 en las microesferas de PLGA preparadas con una proporción BMP-2/PLGA fija de 1,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fue del $48,5 \pm 4,7\%$, con un rendimiento de producción del $81 \pm 3,8\%$. En el caso de las microesferas de PLGA conteniendo VEGF en una proporción VEGF/PLGA de 150 ng/mg , el rendimiento de encapsulación fue del $58,4 \pm 3,2\%$ y el de producción, del $87 \pm 2,5\%$.

La distribución del diámetro en volumen (μm) de las microesferas, fue: $< 118,9$ (10%), $< 202,4$ (50%), $< 471,9$ (90%) para las microesferas de PLGA con BMP-2, y $< 87,3$ (10%), $< 189,7$ (50%), $< 456,7$ (90%) para las de VEGF.

2) Implantes de brushita

El tamaño de los implantes cilíndricos de brushita (Fig. 4.1) cargados con las microesferas de BMP-2 fue de $4,8 \pm 0,4$ mm de diámetro x $9,9 \pm 1,3$ mm de altura, con un peso promedio de $248 \pm 8,7$ mg ($n = 10$).

La estructura interna inicial del sistema puede observarse en la imagen del corte transversal obtenido con microscopio estereoscópico (Fig. 4.2).



Figura 4.1.- Implante cilíndrico de brushita.

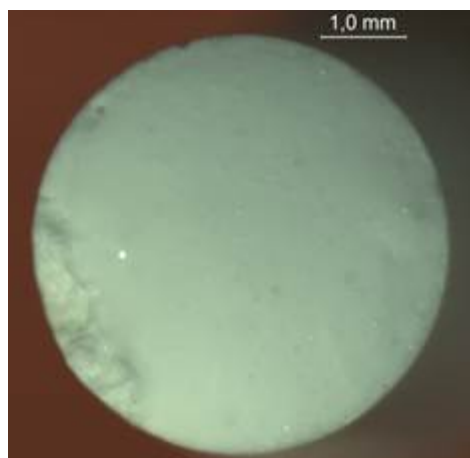


Figura 4.2.- Morfología del sistema de brushita. Sección transversal del sistema observada con microscopio estereoscópico.

3) Implantes de PLGA

Las dimensiones de los implantes cilíndricos de PLGA fueron $5,2 \pm 0,4$ mm de diámetro x $10,8 \pm 0,5$ mm de altura. El peso medio fue de $96,9 \pm 9,2$ mg para los cilindros conteniendo los distintos GFs (Fig. 4.3). La imagen

de un corte transversal del cilindro poroso de PLGA con las microesferas en su interior se muestra en la figura 4.4.

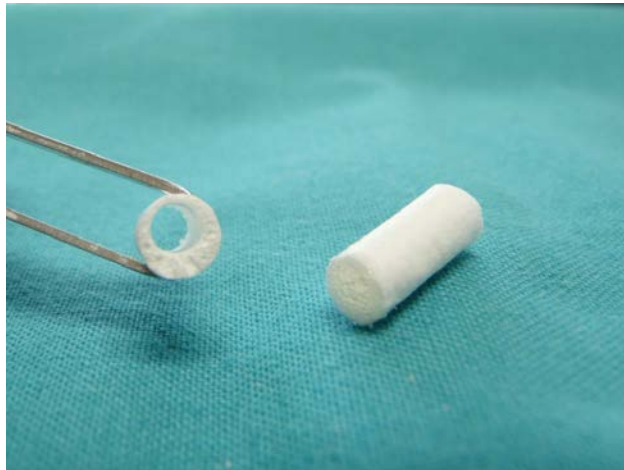


Figura 4.3.- *Implantes cilíndricos de PLGA.*

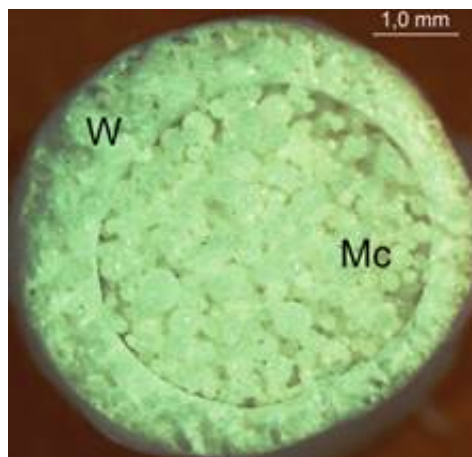


Figura 4.4.- *Sección transversal del cilindro de PLGA observada con microscopio estereoscópico. Mc: microesferas; W: pared del cilindro.*

4.2. Evolución *in vitro* e *in vivo* de las características de los sistemas de liberación de GFs

Para determinar la posible modificación de las propiedades de los sistemas elaborados con respecto a su estructura inicial, se procedió a su caracterización a lo largo del tiempo, tanto durante su incubación en el medio de cesión, como durante su implantación en el fémur del animal. En el caso de los implantes de PLGA y debido a la pérdida de su integridad física, el seguimiento, para la mayoría de sus propiedades, tuvo que limitarse a las primeras semanas del ensayo.

4.2.1. Implantes de brushita conteniendo BMP-2

1) Ensayos de cesión *in vitro*

La cinética de cesión de la BMP-2 encapsulada en microesferas de PLGA, incorporadas en la brushita, fue analizada usando ^{125}I -BMP-2. En la figura 4.5 se muestra la gráfica correspondiente. La cesión de BMP-2 desde los implantes de brushita sigue un comportamiento bifásico. Durante el primer día, aproximadamente un 10% de la BMP-2 encapsulada fue cedida desde los implantes de brushita. Después de la primera semana, un 50% de BMP-2 fue liberado al medio de cesión y a partir de aquí, la velocidad de cesión disminuyó, alcanzándose un 87% cedido después de 5 semanas de incubación.

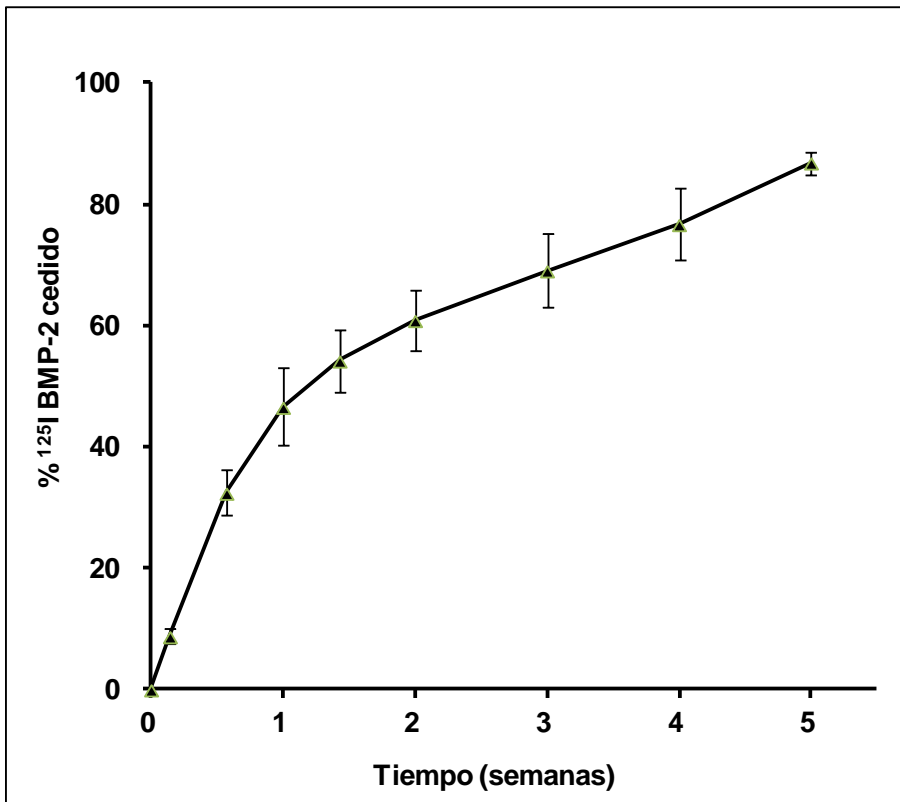


Figura 4.5.- Perfil de cesión in vitro de ^{125}I -BMP-2 desde microesferas incorporadas en el cemento de brushita.

Cada una de las fases de la curva de cesión de la proteína se ajusta a una cinética de orden cero, cediéndose aproximadamente un 6,7% al día durante la primera semana (ecuación 4.1) y un 1,4% al día durante las siguientes cuatro semanas (ecuación 4.2).

$$\% \text{ cedido} = 1,82 + 6,7 * T \text{ (días)} \quad (R^2 = 0,9837) \quad (\text{ec. 4.1})$$

$$\% \text{ cedido} = 39,7 + 1,36 * T \text{ (días)} \quad (R^2 = 0,9869) \quad (\text{ec. 4.2})$$

Los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina para determinar la estabilidad del marcaje en medio de cesión, indicaron que sólo se detecta entre un 14-16% de ^{125}I libre al cabo de las 5 semanas que se prolongó el ensayo, comparado con el 5-7% del ^{125}I libre inicial.

2) Bioactividad de BMP-2

La actividad biológica de la BMP-2 cedida desde las microesferas de PLGA fue determinada a través de la actividad de la fosfatasa alcalina inducida en rMSCs, obteniéndose una relación dosis-respuesta lineal en el rango de concentraciones entre 50 y 300 ng/ml, en términos de actividad de fosfatasa alcalina (Fig. 4.6).

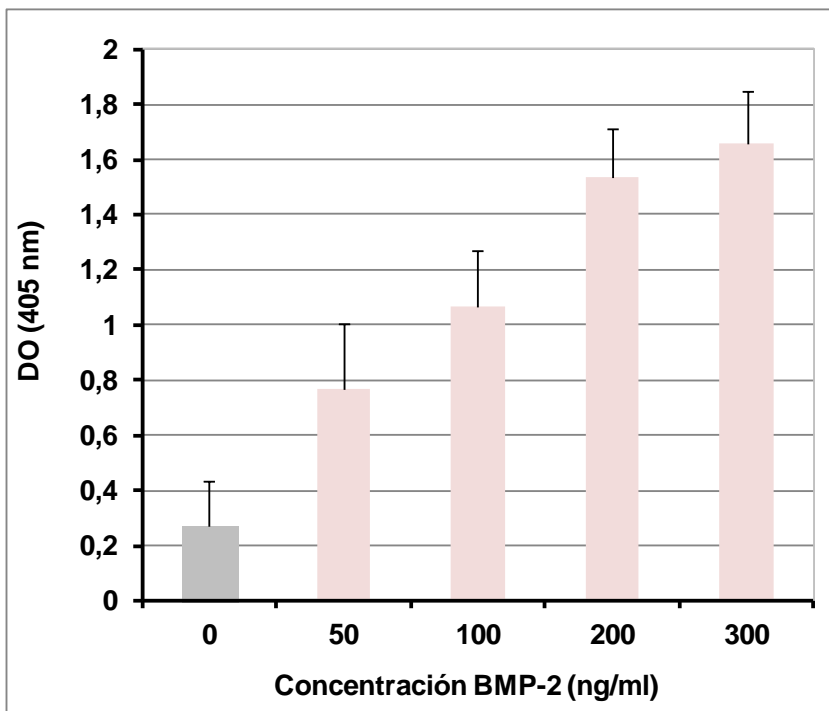


Figura 4.6.- Relación entre la densidad óptica (DO) de la fosfatasa alcalina en rMSCs y las concentraciones estándares de BMP-2.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre la actividad de la fosfatasa alcalina inducida por la BMP-2 procedente del medio de cesión después de 1 y 7 días de incubación, y la inducida por los correspondientes estándares, incubados en las mismas condiciones de ensayo (Fig.4.7). Estas disoluciones estándares fueron preparadas de acuerdo con las cantidades de BMP-2 detectadas por medida de la radioactividad para esos tiempos en el medio de cesión. Los resultados indican que la BMP-2 no sufre una pérdida significativa de su actividad biológica, ni como consecuencia del proceso de elaboración de las microesferas, ni al menos tras 7 días de incubación en el medio de cesión descrito.

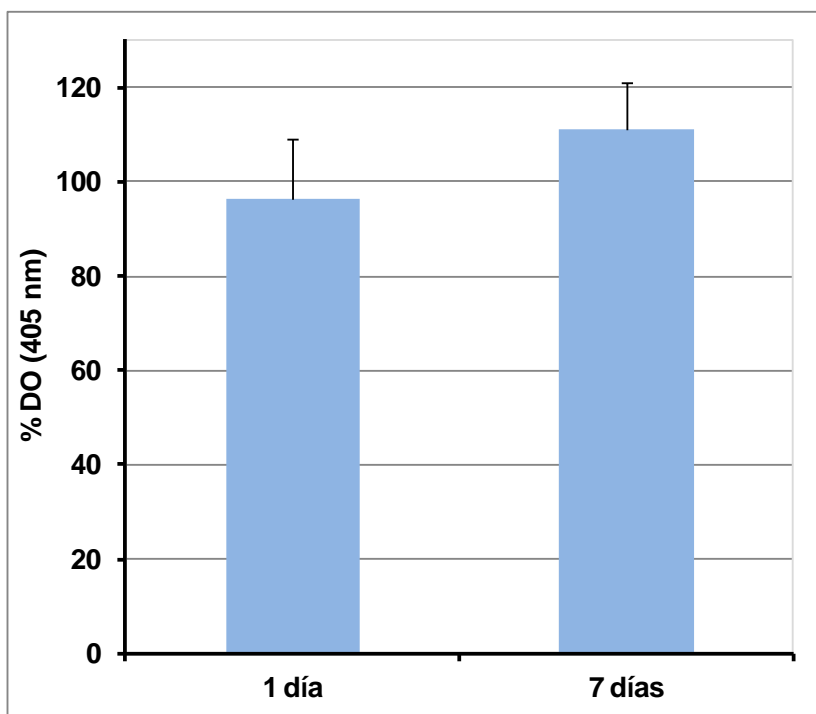


Figura 4.7.- Densidad óptica (DO) de la fosfatasa alcalina inducida por la BMP-2, liberada desde las microesferas de PLGA, expresada como porcentaje de su correspondiente estándar.

3) Ensayos de cesión *in vivo*

La cantidad de BMP-2 remanente en los sistemas de brushita fue medida durante 6 semanas. El perfil bifásico obtenido se muestra en la figura 4.8. Aproximadamente un 12% de la proteína encapsulada fue liberada desde los implantes de brushita al cabo de 24 horas de la implantación en el fémur del conejo, y un 50% después de una semana. Al final de la sexta semana, aproximadamente el 90% de la carga de BMP-2 había sido liberada desde estos sistemas de brushita.

La cinética de cesión *in vivo* de BMP-2 desde los implantes de brushita se asemeja a la cinética *in vitro*. La correlación lineal obtenida fue:

$$y = 0,965x + 4,6 \quad (R^2 = 0,998)$$

La radiactividad medida en las muestras de sangre resultó ser en todos los casos, del mismo orden de magnitud que los niveles de radiación de fondo del contador gamma, asumiendo por tanto, que las concentraciones sistémicas de BMP-2 alcanzadas no son significativas.

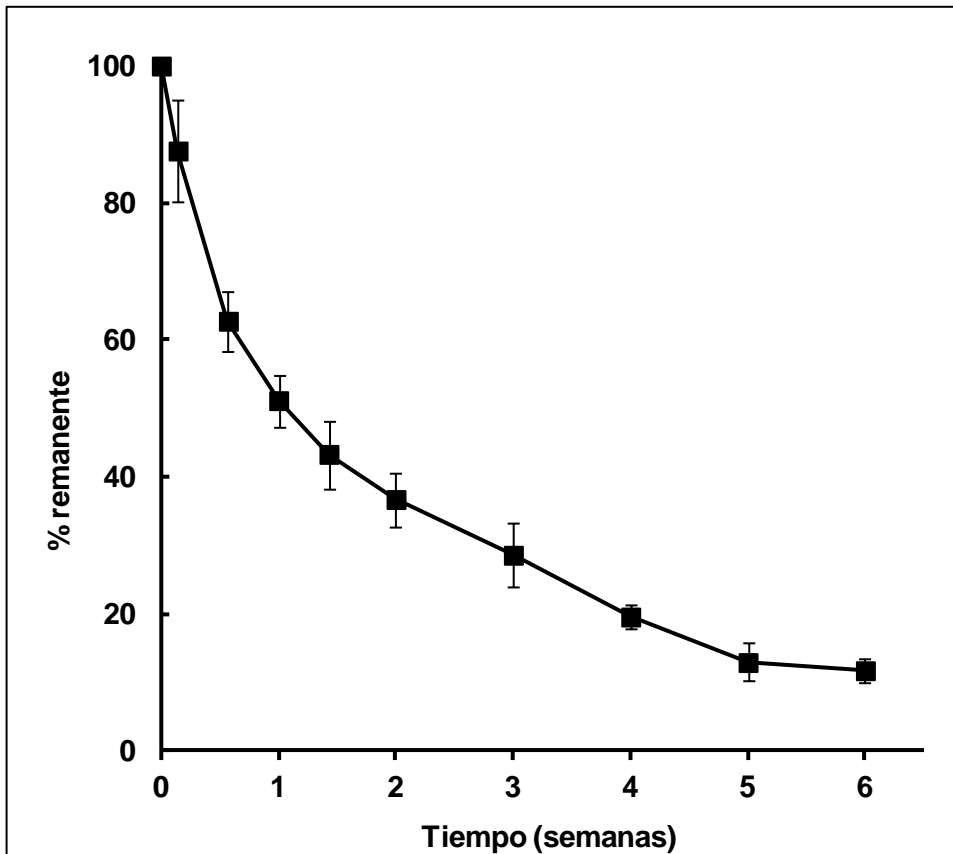


Figura 4.8.- Perfil de ^{125}I -BMP-2 remanente en el implante de brushita tras su implantación en el fémur de conejo.

4) Captación de agua y pérdida de masa de los implantes de brushita durante su incubación *in vitro*

La figura 4.9 recoge los perfiles de captación de agua y pérdida de masa de los implantes de brushita obtenidos tras la incubación en el medio de cesión. La capacidad de adsorción de agua de los sistemas de brushita es relativamente baja, con una pérdida de masa inferior al 30% después de las 12 semanas de incubación (Fig. 4.9).

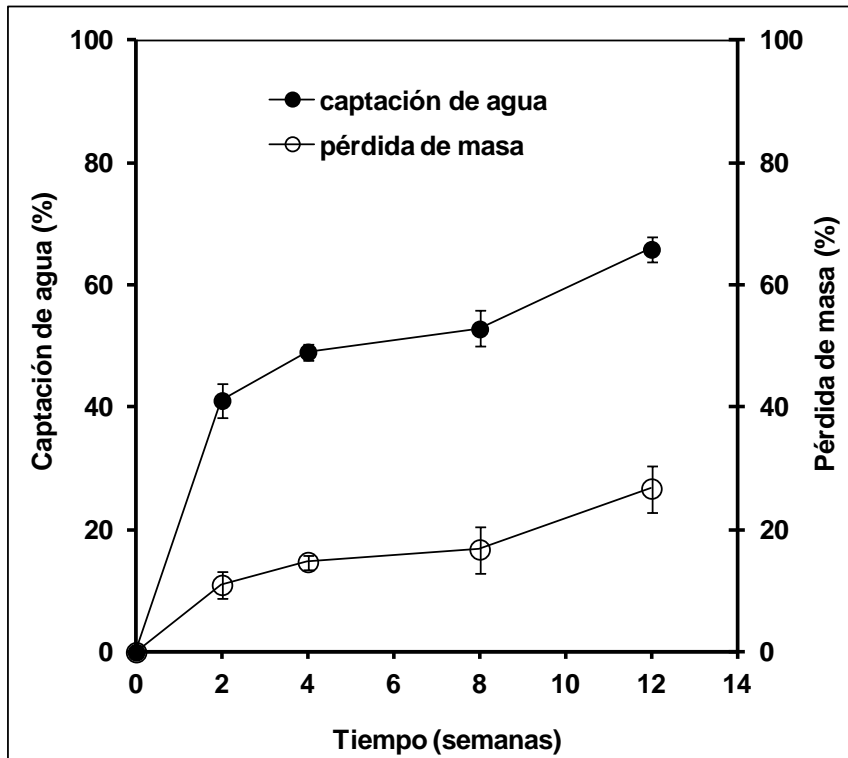


Figura 4.9.- Perfiles de captación de agua y pérdida de masa obtenidos con los implantes de brushita a lo largo del ensayo *in vitro*.

5) Evolución de la estructura microporosa durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*

En las figuras 4.10 y 4.11 se muestran las microfotografías realizadas por SEM para los sistemas de brushita, tanto de la superficie del implante, como de las secciones transversales, a lo largo del ensayo de cesión *in vitro* e *in vivo*. En la superficie del implante se advierte una erosión continua, sugiriendo una pérdida de masa en capas desde el exterior hacia el interior. Sin embargo, el corte transversal muestra que la estructura interna prácticamente no se modifica, ni *in vitro*, ni *in vivo*. Las oquedades que se observan son consecuencia de la degradación de las microesferas de PLGA.

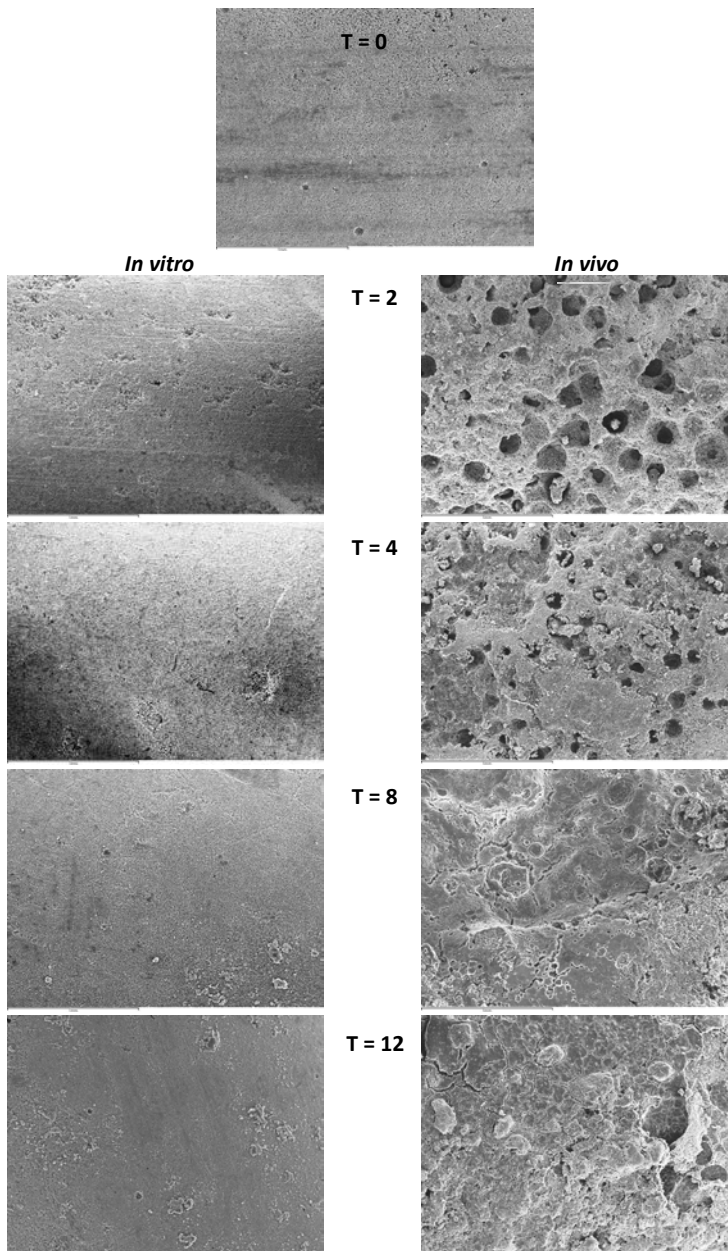


Figura 4.10.- Evolución de la superficie de los implantes de brushita después de su incubación en medio de cesión (*in vitro*) y tras su implantación en el fémur del conejo (*in vivo*). (x 50). (T = tiempo en semanas).

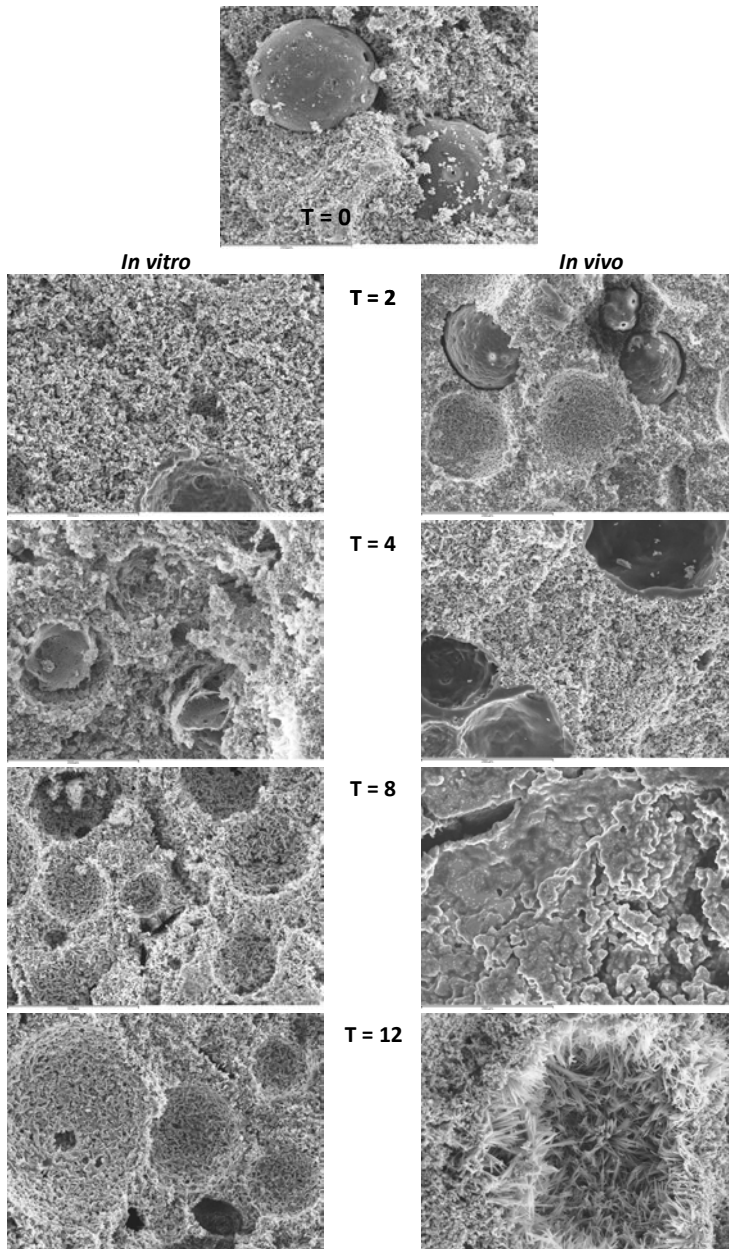


Figura 4.11.- Evolución de la estructura interna de los implantes de brushita después de la incubación en medio de cesión (*in vitro*) y tras la implantación en el fémur del conejo (*in vivo*). Las microfotografías de SEM muestran el interior (corte transversal) del implante de brushita ($\times 250$). (T = tiempo en semanas).

6) Evolución de la porosidad de los implantes de brushita durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*

Los cambios observados en la distribución de tamaño de poro, determinada por porosimetría de mercurio, a lo largo de los ensayos *in vitro* e *in vivo*, se muestran en las figuras 4.12 y 4.13. En la tabla 4.1 se recogen los valores de diámetro medio de poro y porosidad inicial, así como su evolución durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Durante los ensayos *in vitro*, la porosidad aumenta ligeramente, pasando de un 45% inicial al 58% después de 12 semanas de incubación en el medio de cesión. Este cambio moderado se refleja también en la estructura de los implantes de brushita, en cuanto a pérdida de masa y morfología (SEM). Sin embargo, a pesar de que *in vivo* no se produce un aumento de la porosidad global del implante, la evolución de la distribución es similar *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente se tiende hacia tamaños de poro mayores y con el tiempo se ensancha la distribución, apreciándose una distribución multimodal.

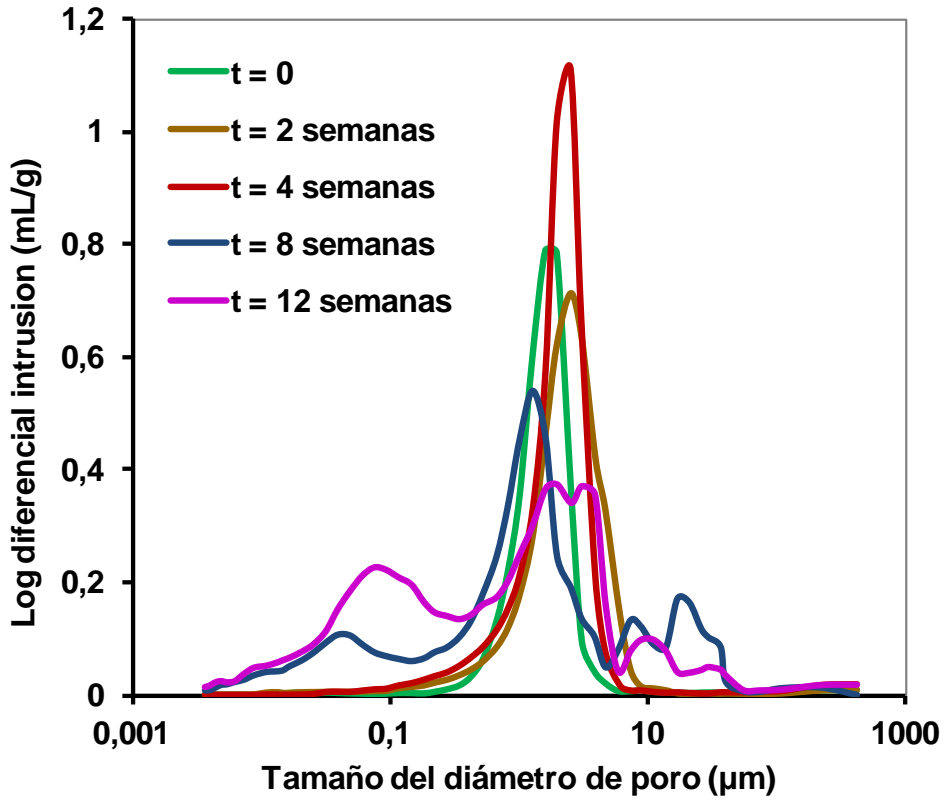


Figura 4.12.- Evolución de la distribución de tamaño de poro de los implantes de brushita durante los ensayos in vitro.

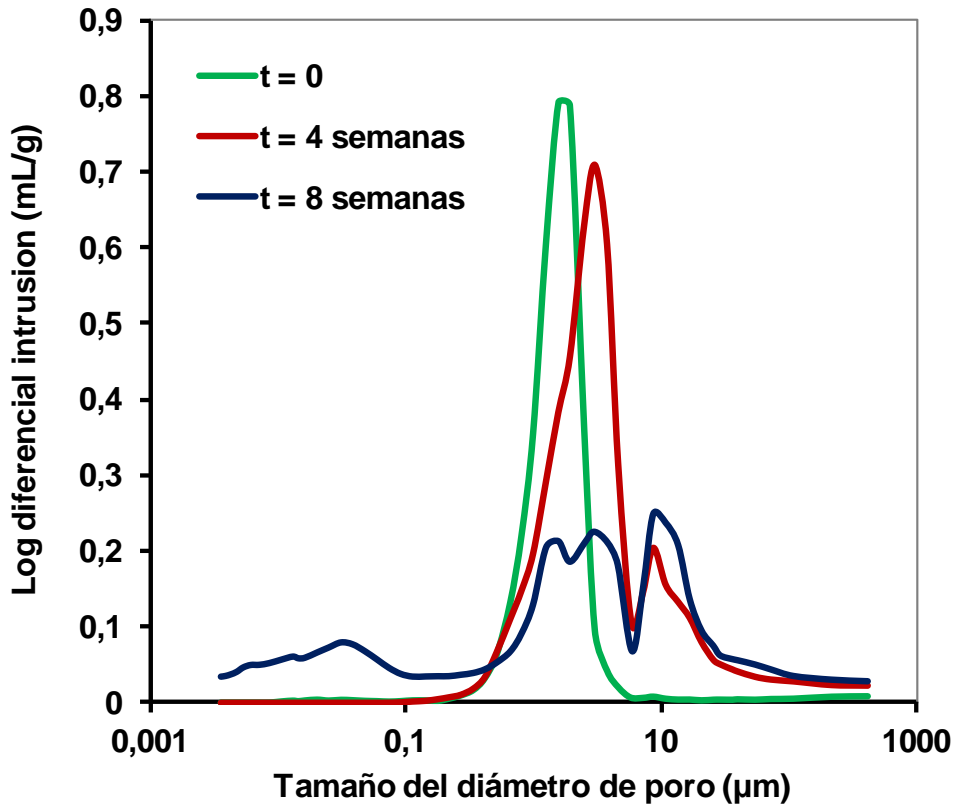


Figura 4.13. Evolución de la distribución de tamaño de poros de los implantes de brushita durante los ensayos in vivo.

Tiempo (semanas)	Diámetro medio de poro (μm)		Porosidad (%)	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
0	1,586		45,4	
2	2,324	n.d.	48,2	n.d.
4	2,078	2,999	51,2	47,2
8	1,462	2,753	55,1	43,2
12	0,914	n.d.	58,3	n.d.

Tabla 4.1.- Diámetro medio de poro y porosidad de los implantes de brushita al inicio y a lo largo de los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

7) Evolución de la estructura cristalina de los implantes de brushita durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

En la figura 4.14 se muestra el difractograma de rayos X del sistema de brushita pulverizado, así como el de cada uno de sus componentes. Como puede observarse, el difractograma del implante recién elaborado, difiere de los obtenidos para los componentes. El pico que aparece a $30,6^\circ$ podría corresponder al MCP o NaPy. Sin embargo, esto último no parece probable teniendo en cuenta la cantidad tan baja de NaPy que contiene el implante, comparada con la del MCP, aproximadamente sesenta y cinco veces menor. Por otra parte, el pico localizado a $34,5^\circ$ correspondería al 2 -TCP.

En la figura 4.15 se muestra la secuencia de difractogramas de rayos X de los implantes de brushita a lo largo de los ensayos de cesión

in vitro. Como puede observarse, durante la incubación en el medio de cesión, el perfil de rayos X no sufre modificación alguna con respecto al inicial.

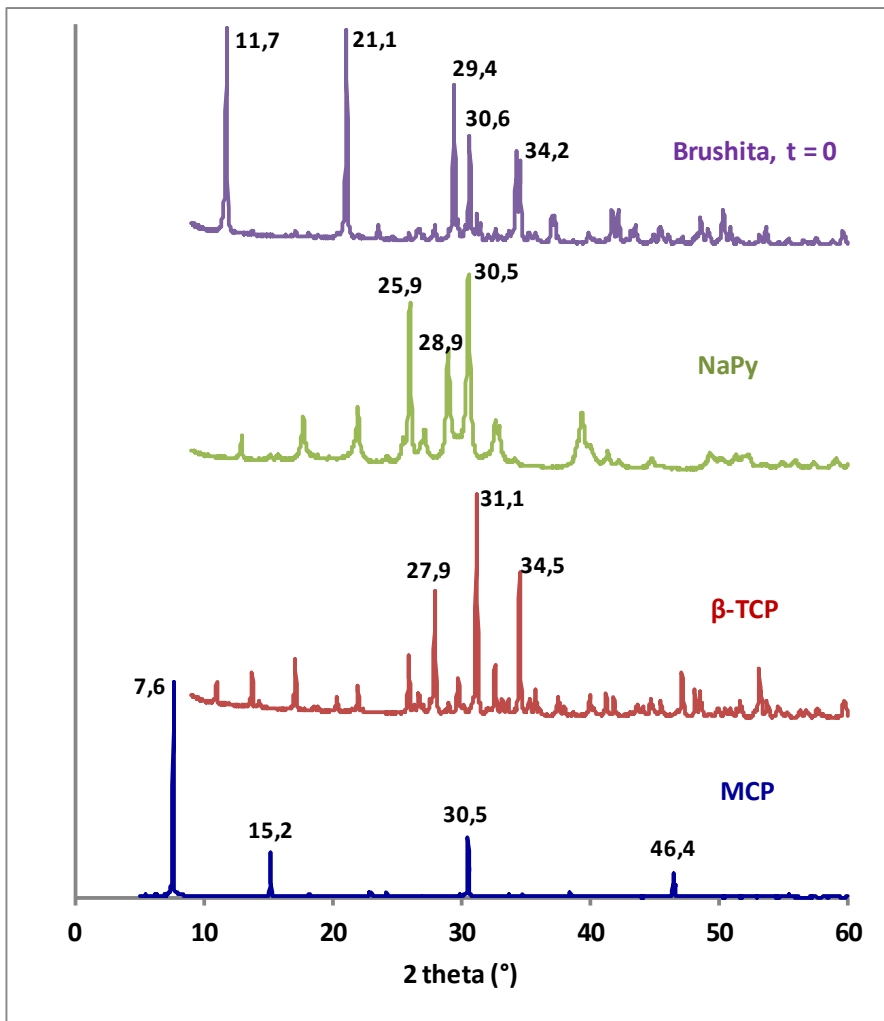


Figura 4.14.- Perfil de difracción de rayos X correspondiente al cemento de brushita y a cada uno de sus componentes. NaPy: pirofosfato sódico; β -TCP: fosfato tricálcico; MCP: fosfato monocálcico.

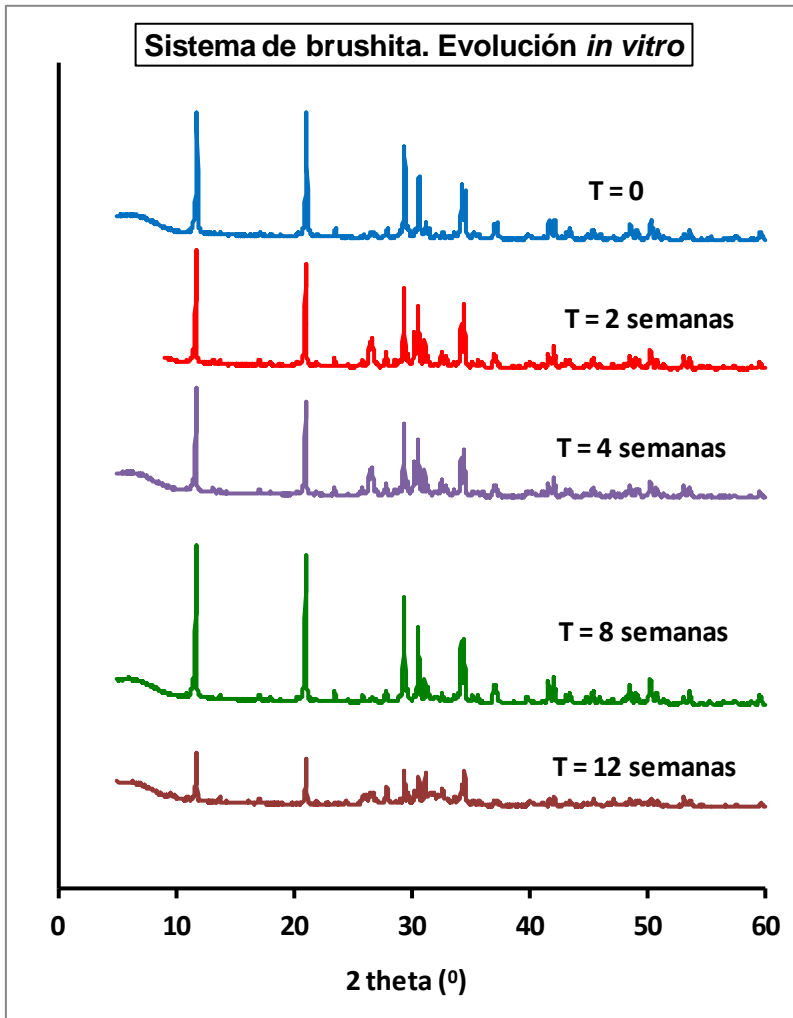


Figura 4.15.- Evolución de los perfiles de difracción de rayos X correspondientes a los implantes de brushita antes y durante su incubación en el medio de cesión.

El comportamiento *in vivo* es similar. Los perfiles de difracción de rayos X (Fig. 4.16) no se modifican hasta las 8 semanas de la implantación del sistema en el fémur del conejo. Sin embargo, sí se observa un cambio significativo a las 12 semanas post-implantación. A este tiempo, se detectó la transformación parcial de brushita en HA (Fig. 4.17). El análisis del

difractograma de las 12 semanas, muestra picos de alta intensidad de HA a un ángulo de $26,2^\circ$ y 32° , con picos de baja intensidad de brushita a $11,8^\circ$ y $21,1^\circ$, además de la presencia de una fase amorfa del producto en el rango entre 10 y 25° de ángulo.

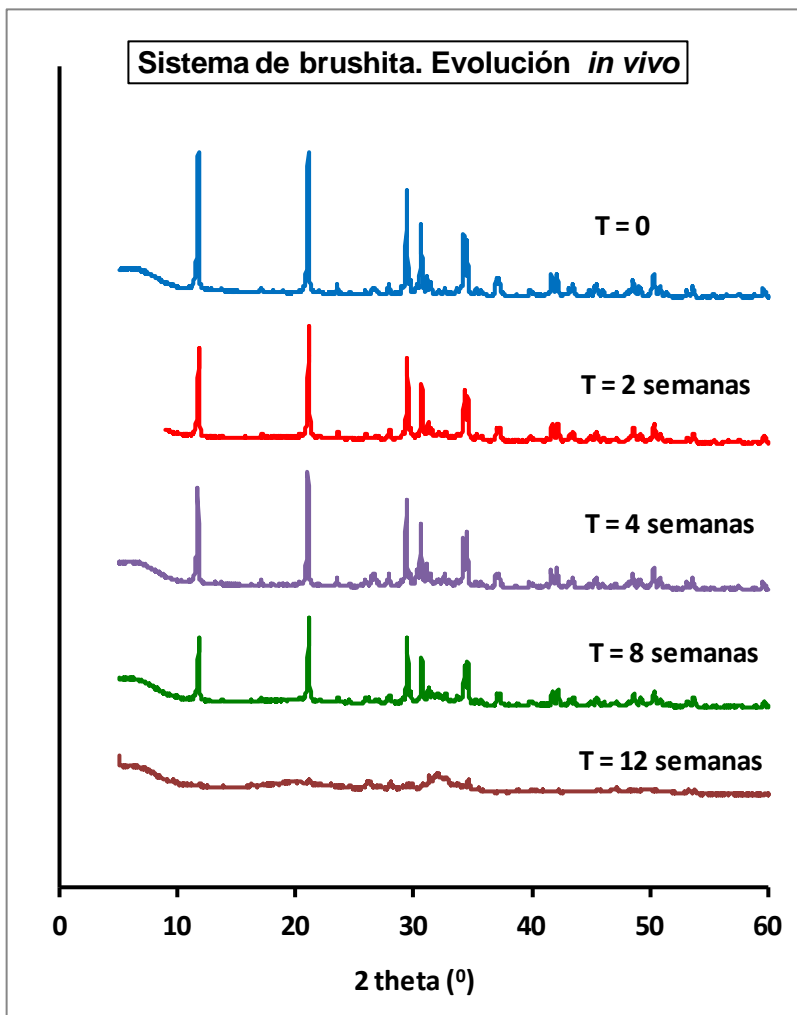


Figura 4.16.- Evolución de los perfiles de difracción de rayos X correspondientes a los implantes de brushita a lo largo del ensayo *in vivo*.

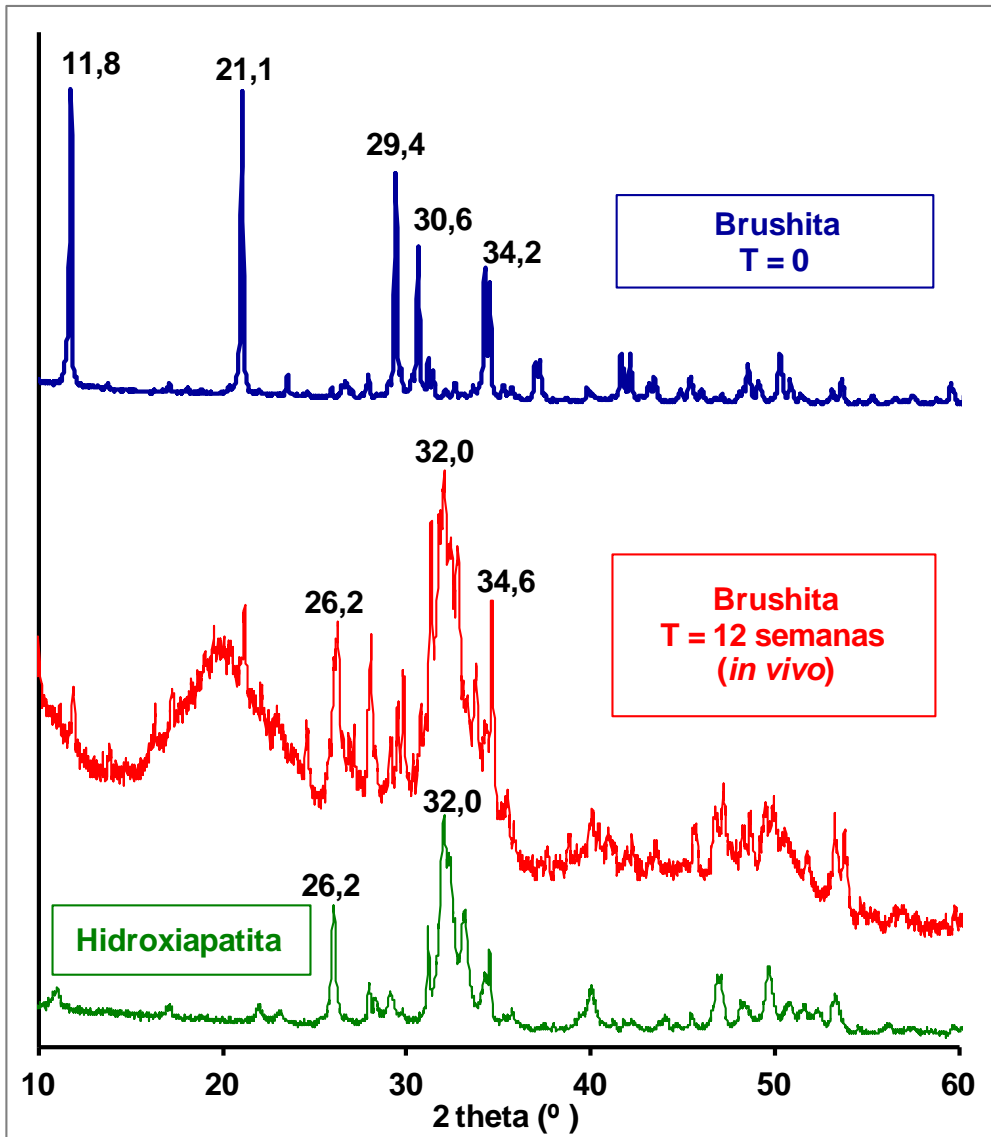


Figura 4.17.- Perfiles de difracción de rayos X correspondientes a los implantes de brushita antes y después de su implantación en el fémur de conejos y el correspondiente a la hidroxiapatita.

4.2.2. Implantes de PLGA conteniendo BMP-2 o VEGF

1) Ensayos de cesión *in vitro*

En la figura 4.18 se muestra el perfil de cesión de BMP-2 y VEGF desde microsferas incluidas en cilindros de PLGA. La cinética de cesión de BMP-2 y VEGF encapsulada desde estos sistemas, fue analizada usando ^{125}I -BMP-2 y ^{125}I -VEGF, respectivamente.

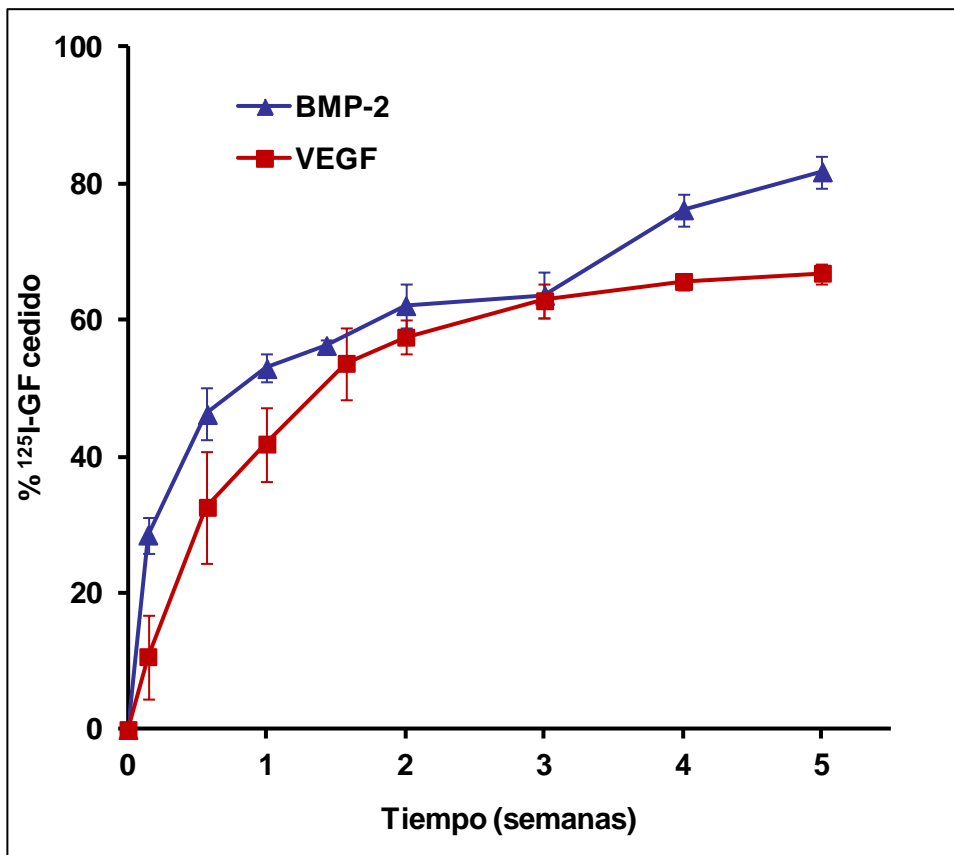


Figura 4.18.- Perfiles de cesión *in vitro* de ^{125}I -BMP-2 y ^{125}I -VEGF desde microsferas incluidas en cilindros porosos de PLGA.

Durante las primeras 24 horas del ensayo *in vitro*, aproximadamente un 30% de BMP-2 fue cedido desde el sistema frente a solo un 10% de VEGF. Posteriormente, el VEGF fue liberado a una velocidad de un 3,6%/día hasta el final de la segunda semana. A partir de este momento, la velocidad disminuyó drásticamente, llegando a cederse alrededor de un 67% al final de la quinta semana.

De forma similar, aproximadamente un 50% de BMP-2 fue cedido al final de la primera semana de incubación, reduciéndose la velocidad de forma que al final de la quinta semana, aproximadamente un 80% del contenido fue liberado. En la segunda fase, el perfil de cesión de la BMP-2 se ajustó a una cinética de orden cero (Eq. 4.3):

$$\% \text{ cedido} = 45,9 + 1,02 * T \text{ (días)} \quad (R^2 = 0,9679) \quad (\text{ec. 4.3})$$

Los controles de estabilidad del marcaje mostraron un aumento de $^{125}\text{I}^-$ libre muy similar al obtenido con ^{125}I -BMP-2 en los implantes de brushita, entre un 12-16% al final de los ensayos de cesión *in vitro*, indicando por tanto una buena estabilidad del marcaje para ambos GFs.

2) Bioactividad del VEGF

La bioactividad del VEGF cedido desde las microesferas de PLGA se evaluó sobre cultivos de HUVECs, cuya respuesta proliferativa resultó ser dosis dependiente para concentraciones de VEGF hasta 4 ng/ml (Fig. 4.19).

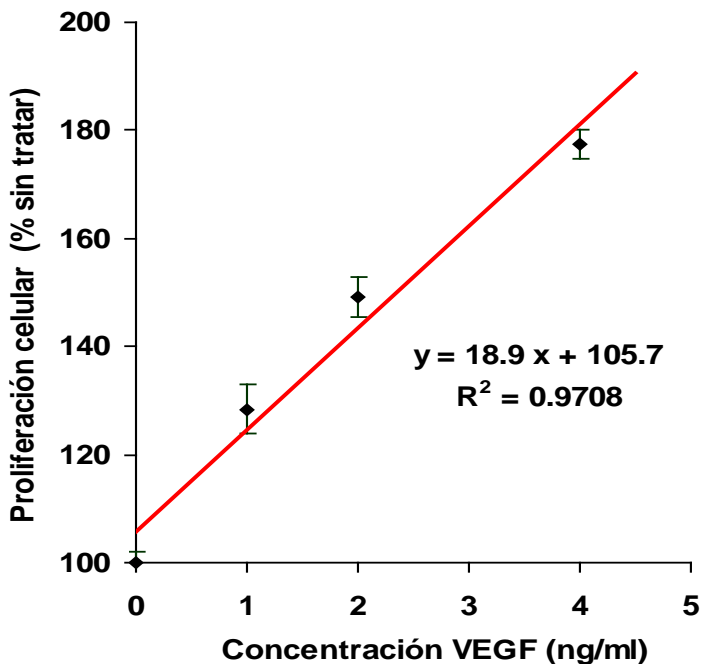


Figura 4.19.- Curva dosis-respuesta proliferativa de células HUVEC tratadas con concentraciones estándares de VEGF.

La bioactividad se expresó como porcentaje de crecimiento celular inducido con respecto al obtenido con concentraciones estándares de VEGF, preparadas de acuerdo con las cantidades detectadas por medida de la radiactividad para esos tiempos en el medio de cesión (Fig. 4.20).

Los resultados muestran que la actividad del VEGF se mantiene durante al menos siete días de incubación en el medio de cesión y a 37° C (Fig. 4.20) y que durante la elaboración de la formulación no hubo pérdida significativa de bioactividad por parte del VEGF incorporado. Por tanto, el proceso de elaboración de las microesferas por la técnica de la doble emulsión, no afecta a la estabilidad de este factor.

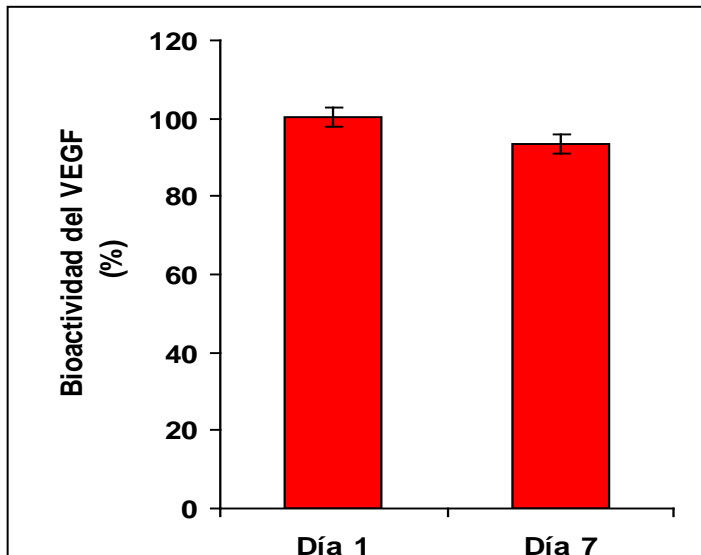


Figura 4.20.- Bioactividad del VEGF liberado desde las microesferas de PLGA (expresado como porcentaje de la proliferación celular observada con respecto a la proliferación celular esperada).

3) Ensayos de cesión *in vivo*

La cantidad remanente de ^{125}I -BMP-2 en los cilindros porosos de PLGA fue medida durante 4 semanas (Fig. 4.21). Desde estos sistemas, la BMP-2 fue cedida más rápidamente que desde los implantes de brushita. Aproximadamente un 30% de la proteína fue liberada durante las primeras 24 horas, comparado con el 12% cedido en el mismo tiempo, desde los implantes de brushita. Después de una semana de implantación en el fémur del conejo, aproximadamente un 60% de la carga de BMP-2 fue liberado desde los sistemas de PLGA. Al final de la 4ª semana, el porcentaje de BMP-2 cedido fue prácticamente de un 96%.

La cesión inicial *in vivo* e *in vitro* de BMP-2 desde los implantes porosos de PLGA fue similar, aproximadamente de un 30%. Posteriormente,

durante la segunda fase, la cesión *in vivo* fue más rápida que *in vitro*. La correlación lineal obtenida fue:

$$y = 1,424 x - 11,0 \quad (R^2 = 0,96)$$

Los niveles de radiactividad determinados en las muestras de sangre, fueron siempre similares a los niveles de radiación de fondo del contador gamma, indicando que no hay riesgo de exposición sistémica.

Así mismo, el comportamiento del VEGF fue parecido al de la BMP-2. Inicialmente, la cesión *in vivo* e *in vitro* fue aproximadamente de un 15% y a partir de aquí, la velocidad de cesión *in vivo* fue mayor que *in vitro*. Después de 4 días de implantación del sistema en el fémur del animal, se había cedido un 50% de la carga inicial de VEGF y al final de las 3 semanas, prácticamente el 95% (Fig. 4.21). La correlación lineal obtenida fue:

$$y = 1,54 x + 0,34 \quad (R^2 = 0,998)$$

4) Captación de agua y pérdida de masa de los cilindros porosos de PLGA durante su incubación *in vitro*

La figura 4.22 recoge los resultados obtenidos en los ensayos de captación de agua y pérdida de masa para los cilindros de PLGA, realizados según se detalla en el correspondiente apartado 3.3 (4). Los sistemas de PLGA captan gran cantidad de agua de forma continua a lo largo de las cuatro semanas de incubación en el medio de cesión, alcanzando un valor de aproximadamente el 500%, con una pérdida de peso del 40% al final del experimento.

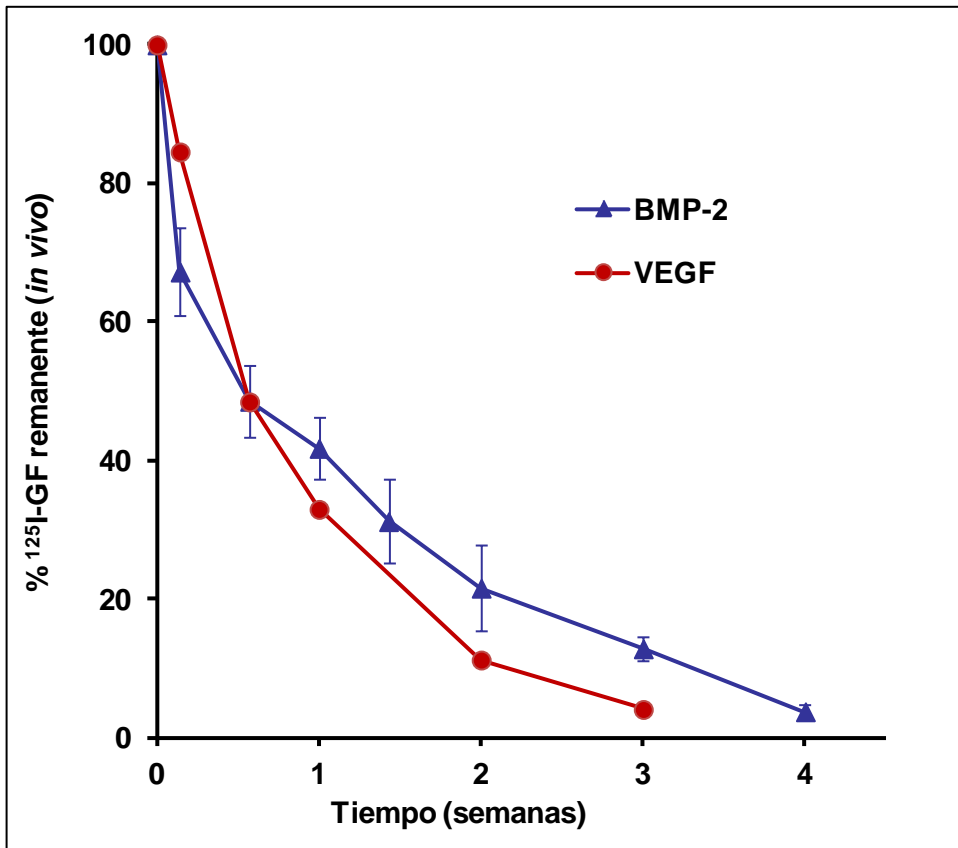


Figura 4.21.- Perfiles de ^{125}I -BMP-2 y ^{125}I -VEGF remanente en el cilindro poroso de PLGA tras su implantación en el fémur de conejo.

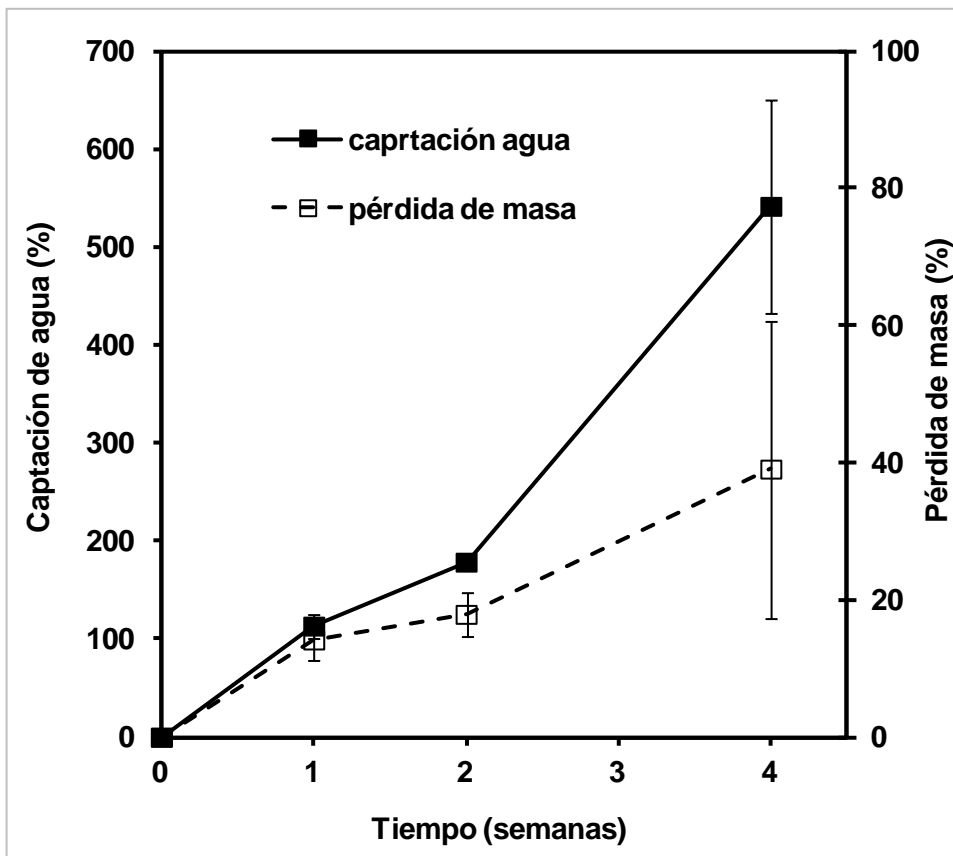


Figura 4.22.- Perfiles de captación de agua y pérdida de masa obtenidos con los cilindros de PLGA a lo largo del ensayo *in vitro*.

5) Cambios estructurales de los sistemas de PLGA durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*

El tamaño de poro en los cilindros de PLGA, determinado mediante imágenes del SEM a lo largo de los ensayos *in vitro*, aumentó drásticamente, incrementándose desde un valor inicial de $18,09 \pm 12,7 \mu\text{m}$ a $60,57 \pm 33,9 \mu\text{m}$ al cabo de una semana, para permanecer estable hasta el final de las dos semanas de incubación (Tabla 4.2).

T (semanas)	Tamaño de poro (μm) (media \pm sd)
0	18,09 \pm 12,7
1	60,57 \pm 33,9
2	66,04 \pm 49,2

Tabla 4.2. - Evolución del tamaño de poro de los cilindros de PLGA a lo largo del ensayo *in vitro* ($n = 400$).

Como se indicó anteriormente, al final de cuatro semanas de incubación, estos sistemas habían perdido un 40% de su peso, así como su estructura inicial. En las imágenes obtenidas por SEM (Fig. 4.23) puede apreciarse una película no porosa cubriendo los restos que quedan del cilindro de PLGA. *In vivo*, el colapso estructural es más acusado, apreciándose desde las dos semanas post-implantación (Fig. 4.23).

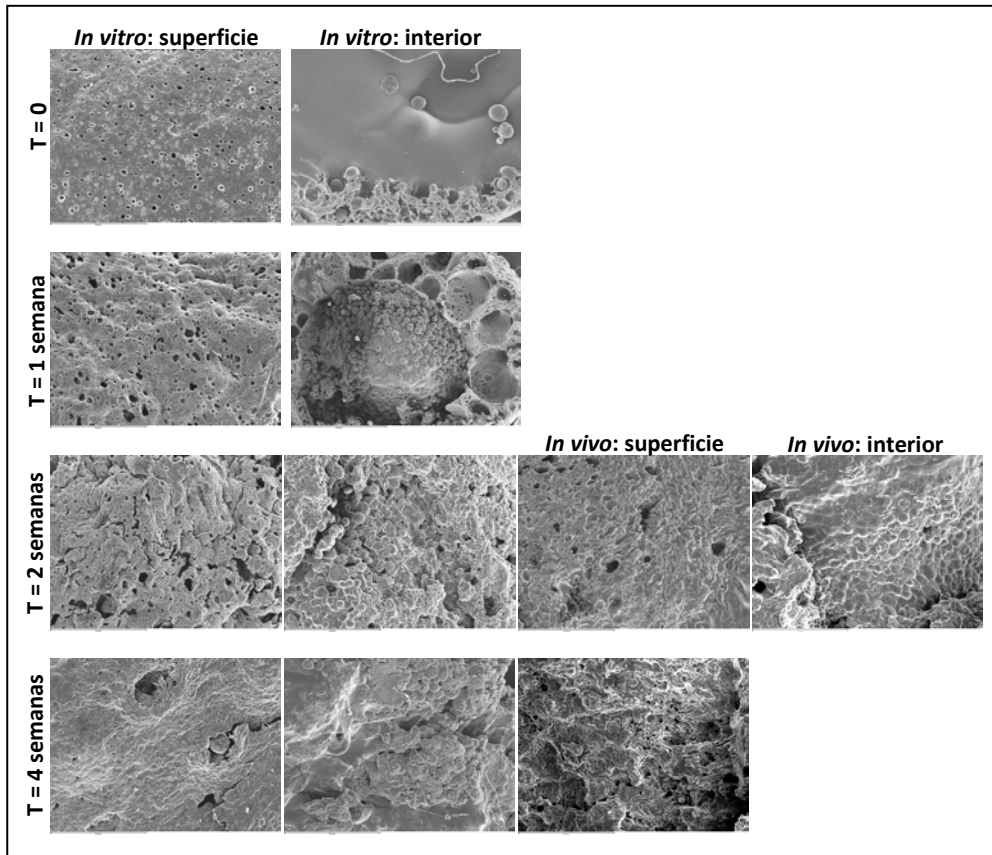


Figura 4.23.- Microfotografías de SEM; superficie y cortes trasversales de los cilindros de PLGA antes, durante y al final del ensayo *in vitro* e *in vivo* (x 50). No se dispone de fotos del interior del cilindro, a las 4 semanas por la imposibilidad de hacer los cortes.

6) Degradación del PLGA durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*

El seguimiento de la degradación del polímero se llevó a cabo determinando los pesos moleculares y la temperatura de transición vítrea (T_g) a lo largo de la incubación de los cilindros cargados con microesferas blancas, en el medio de cesión y tras la implantación en el fémur de los animales.

La evolución del peso molecular y polidispersividad del polímero PLGA (50:50) de la cubierta del cilindro, así como de su Tg, tanto para los ensayos *in vitro* como *in vivo*, se recoge en las tablas 4.3, 4.4 y 4.5.

Tiempo (semanas)	Mw (D)	Mn(D)	pd
0	31614,5 ± 468,8	20040,5 ± 823,8	1,578 ± 0,04
1	27671 ± 1469,4	17035,5 ± 1231,1	1,625 ± 0,03
2	19716 ± 353,6	11550 ± 538,8	1,708 ± 0,05
4	6093,5 ± 2348,3	3683,5 ± 1526,6	1,665 ± 0,05

Tabla 4.3.- Evolución de los pesos moleculares medios en peso (Mw) y en número (Mn), y polidispersividad del PLGA de la cubierta de los cilindros a lo largo del ensayo *in vitro*. Media ± desviación estándar (n= 3).

Tiempo (semanas)	Mw (D)	Mn(D)	pd
0	31614,5 ± 468,8	20040,5 ± 823,8	1,578 ± 0,04
2	9009,5 ± 2441,6	4592,5 ± 1086,8	1,954 ± 0,07
4	1295,5 ± 37,5	1227,5 ± 30,4	1,055 ± 0,01

Tabla 4.4.- Evolución de los pesos moleculares medios en peso (Mw) y en número (Mn), y polidispersividad del PLGA de la cubierta de los cilindros a lo largo del ensayo *in vivo*. Media ± desviación estándar (n= 3).

Tiempo (semanas)	Tg (°C)	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
0	46,38 ± 1,17	46,38 ± 1,17
2	46,43 ± 0,707	43,75 ± 0,33
4	39,63 ± 0,33	28,11 ± 0,99

Tabla 4.5.- Evolución de la temperatura de transición vítrea (Tg) del PLGA a lo largo de los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

El peso molecular medio en peso (Mw) y la polidispersividad del PLGA (50:50) determinados por GPC fue de 47 kD y 1,56, respectivamente. El valor de Tg determinado por DSC fue 50,5°C. Después de la elaboración del cilindro, el peso molecular medio en peso (Mw) se redujo aproximadamente hasta 31 kD, la Tg a 46,38°C y la polidispersividad no se modificó. El Mw continuó reduciéndose a lo largo de los ensayos *in vitro* e *in vivo*, observándose que *in vivo*, la reducción fue más rápida que *in vitro*, hecho descrito previamente por Lu y col. (2000). Esos resultados coinciden con los obtenidos por DSC (tabla 4.5). Después de 4 semanas de incubación, la Tg se redujo a 39,6°C mientras que *in vivo*, el descenso fue más acentuado, alcanzando un valor de 28,1°C. El continuo aumento de captación de agua por el PLGA durante el ensayo *in vitro* (Fig 4.22), concuerda con el aumento de su hidrofilia intrínseca. Este comportamiento está de acuerdo con la degradación de films de poliéster propuesta por Hutchinson y Furr (1989). La absorción de una cantidad significativa de agua en la estructura interna de un material amorfo influye en las propiedades de los sólidos (Kontny y Zografi, 1995). Por tanto, el agua con muy baja Tg, actúa como plastificante sobre el PLGA, disminuyendo su Tg e induciendo una transición hacia un estado gomoso asociado con un aumento de la movilidad de las cadenas del polímero.

4.3. Análisis histológico, inmunohistoquímico e histomorfométrico

Para determinar el efecto regenerativo y angiogénico de los GFs cedidos desde los implantes elaborados en este trabajo, se realizó el análisis histológico, inmunohistoquímico e histomorfométrico en la región de interés (ROI) del fémur (Fig. 3.1), sobre cada uno de los grupos de conejos (tabla 3.2).

Como se ha indicado previamente, la evaluación histológica se realizó a las 2, 4, 8 y 12 semanas de la implantación de los sistemas en el fémur de conejo, excepto para el caso de los grupos estudiados con la combinación de los dos factores, para los cuales se tomaron muestras a las 4 y 12 semanas post-implantación.

4.3.1. Implantes de brushita conteniendo BMP-2.

Como se muestra en las figuras 4.24 y 4.25, el análisis a las dos y cuatro semanas post-implantación reveló cierto grado de neoformación ósea en todos los grupos experimentales si bien, no se observaron diferencias significativas en el análisis histomorfométrico (Fig. 4.26). Tanto a las dos como a las cuatro semanas, se pudo observar claramente la estructura del implante, que aparecía prácticamente intacto (Figs. 4.24 y 4.25), así como la presencia de microesferas en su interior y neoformación ósea en los márgenes del mismo (Figs. 4.24 y 4.25).

El análisis de la intensidad de inmunoreacción para la osteocalcina reveló valores bajos, coincidentes con las tasas de neoformación ósea (Fig. 4.27).

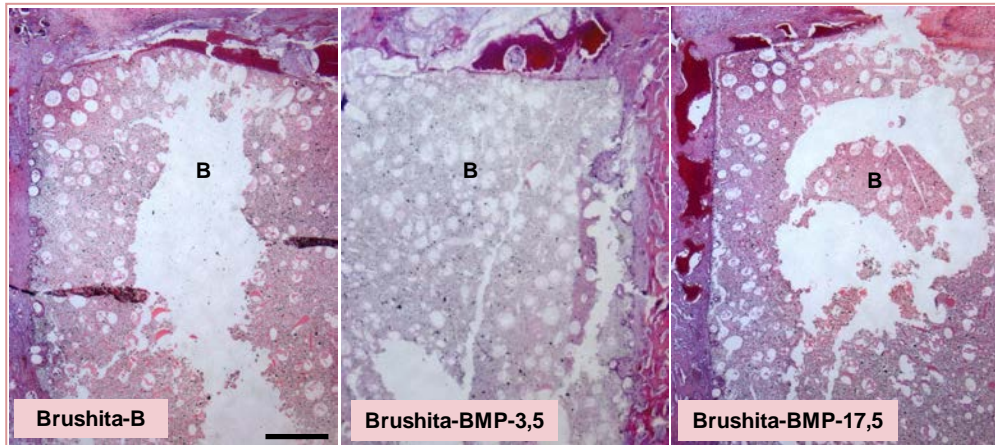


Figura 4.24.- Sistema de brushita a las 2 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tinción hematoxilina-eritrosina; B: Brushita. Barra de escala: 1 mm.

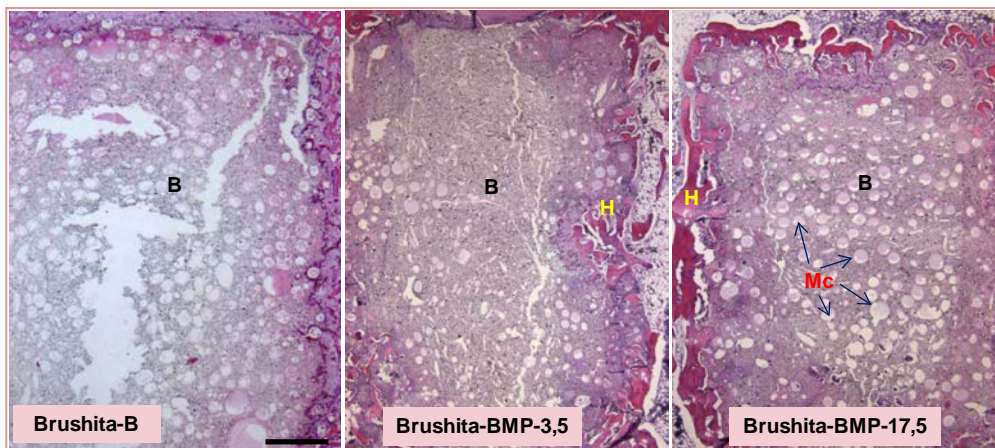


Figura 4.25.- Sistema de brushita a las 4 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tinción hematoxilina-eritrosina. B: Brushita; H: Tejido óseo; Mc: Microesferas. Barra de escala: 1 mm.

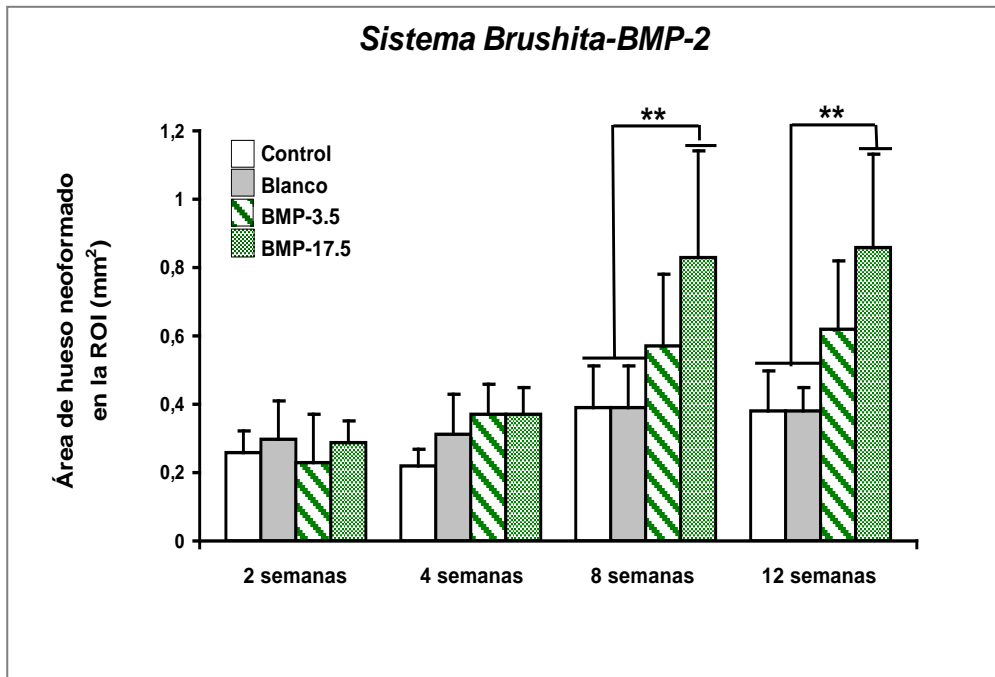


Figura 4.26.- Formación de hueso. Histograma que muestra la neoformación de hueso en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos con el sistema de brushita. Las barras representan la media \pm SD. ** $p < 0.001$.

A las ocho semanas post-implantación, las tasas de neoformación ósea en los grupos Brushita-C y Brushita-B fueron similares a las observadas a las dos y cuatro semanas (Fig. 4.26 y Fig. 4.28). No obstante, se observó un aumento diferencial en los grupos tratados con BMP-2, siendo significativamente más elevado en el grupo Brushita-BMP-17,5 (Fig.4.26 y Fig.4.28). El análisis histológico mostró áreas más extensas de hueso neoformado en los márgenes del implante en comparación a lo observado a las cuatro semanas (Fig. 4.28). Se observaron fenómenos de fagocitosis activa e infiltración tisular (Fig. 4.29a, b y c), siendo visibles fragmentos del material en el interior de algunas células fagocíticas (Fig. 4.29c y d). En este punto de análisis, se detectó en todos los animales la

presencia del implante, cuya morfología mostraba variación sustancial a consecuencia de los procesos de degradación (Fig. 4.28 y Fig. 4.29).

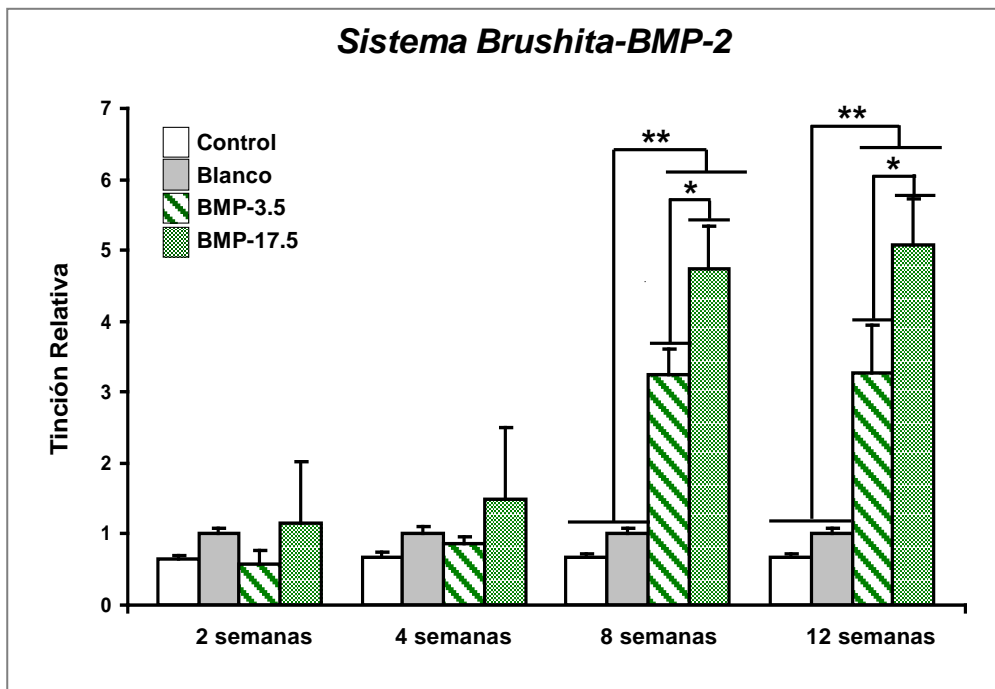


Figura 4.27.- Expresión de osteocalcina: Análisis de imagen semi-cuantitativo de la inmunotinción relativa para osteocalcina en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos con el sistema de brushita. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

Los resultados del análisis histológico e histomorfométrico a las doce semanas post-implantación, fueron similares a los observados a las ocho semanas (Fig. 4.26 y Fig. 4.30). En este punto de análisis, se observó igualmente la presencia del implante, cuya morfología fue similar a la observada a las ocho semanas (Fig. 4.30).

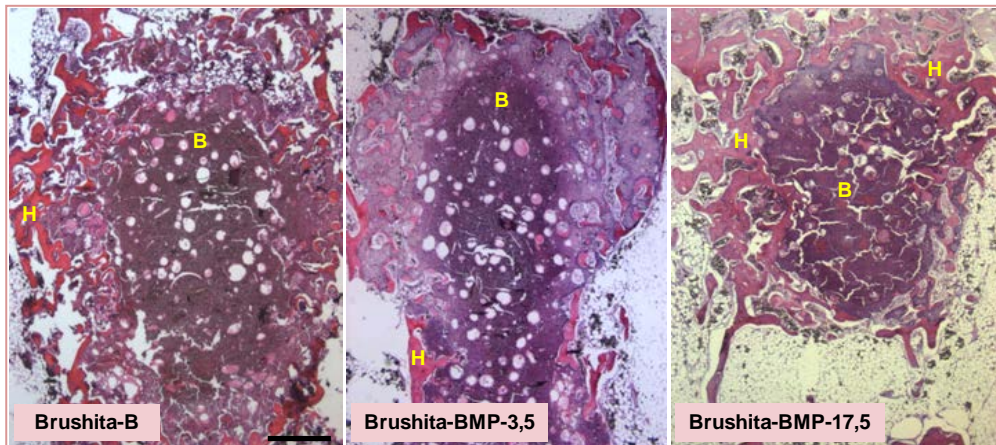


Figura 4.28.- Sistema de brushita a las 8 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tinción hematoxilina-eritrosina. B: Brushita; H: Tejido óseo. Barra de escala: 1 mm.

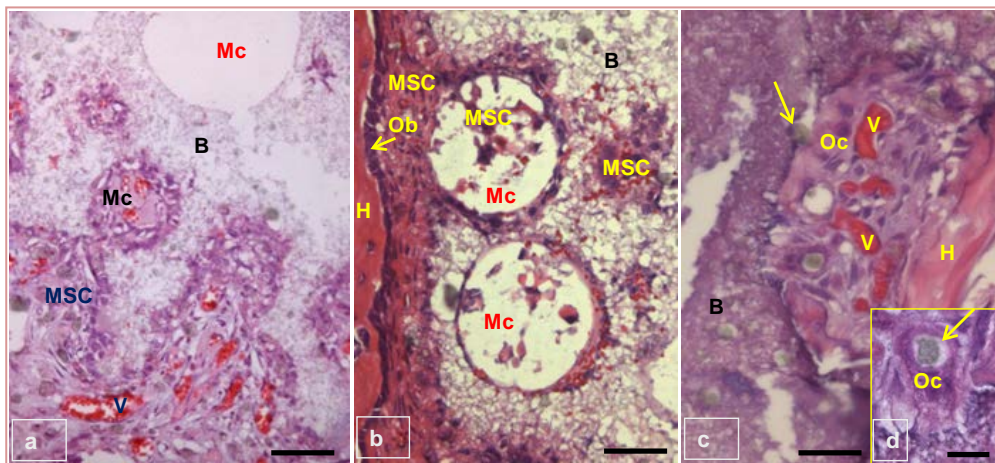


Figura 4.29.- Sistema de brushita. Detalles a mayor aumento en el grupo Brushita- BMP-17,5 a las 8 semanas post-implantación mostrando la presencia de células mesenquimales y vasos sanguíneos en el interior del implante de brushita (a,b). Detalle a mayor aumento en el grupo Brushita-BMP-17,5 a las 8 semanas post-implantación que muestra actividad fagocítica (flecha) en los márgenes del implante de brushita (c). Detalle de la imagen anterior que muestra un fagocito conteniendo un fragmento de brushita en el interior de un fagosoma (flecha) (d). Tinción hematoxilina-eritrosina (a,d); B: Brushita; H: Tejido óseo; Mc: Microesferas; MSC: células mesenquimales; Ob: Osteoblastos; Oc: Osteoclastos; V: Vasos sanguíneos. Barras de escala: (a) 130 μ m, (b) 60 μ m, (c) 20 μ m, (d) 5 μ m.

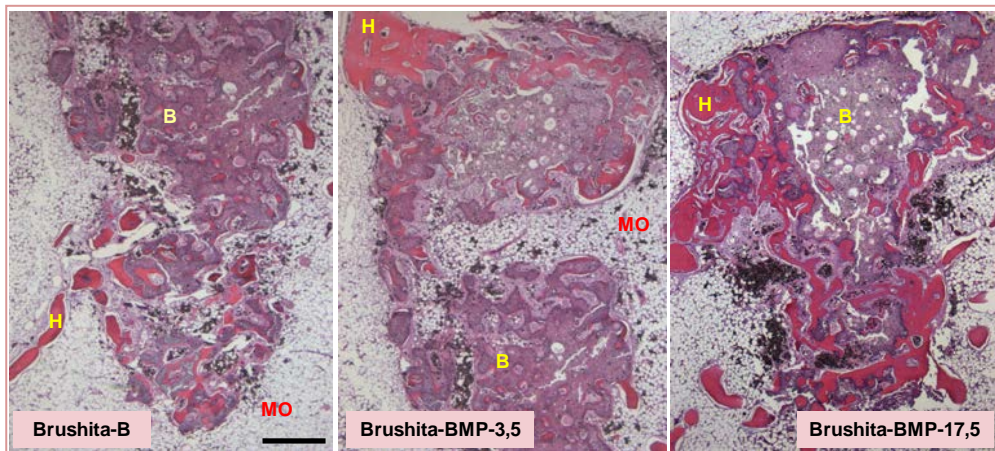


Figura 4.30.- Sistema de brushita a las 12 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tinción hematoxilina-eritrosina. B: Brushita; H: Tejido óseo. Barra de escala: 1 mm.

El análisis de la intensidad de inmunoreacción para la osteocalcina exhibió un aumento significativo en los grupos tratados con BMP-2, tanto a las ocho como a las doce semanas post-implantación (Fig. 4.27). Se observó una buena correlación entre la neoformación de hueso y la intensidad de marcaje de osteocalcina en ambos puntos de análisis (Fig. 4.26 y Fig. 4.27).

4.3.2. Implantes de PLGA conteniendo BMP-2.

Dos semanas después de la implantación, el análisis histológico mostró leve neoformación de hueso en los bordes del defecto en todos los grupos experimentales (Fig. 4.31). Asimismo, se observaron claros signos de reacción inflamatoria con abundante contenido hemático en los bordes e interior del defecto (Fig. 4.31). En este momento, se pudo observar claramente la estructura del implante, constatando además, la presencia de tejido conectivo y vasos sanguíneos en su interior rodeando las

microesferas, así como en el interior de las mismas (Fig. 4.32). Se observaron igualmente, microesferas con restos de PLGA en su interior (Fig. 4.33). El análisis histomorfométrico confirmó que, a las dos semanas post-implantación, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 4.34).

El análisis de la intensidad de inmunoreacción para la osteocalcina reveló valores bajos de intensidad relativa, coincidentes con los valores de neoformación ósea en todos los grupos, excepto para el grupo PLGA-BMP-17,5 donde se observó un incremento estadísticamente significativo (Fig. 4.35).

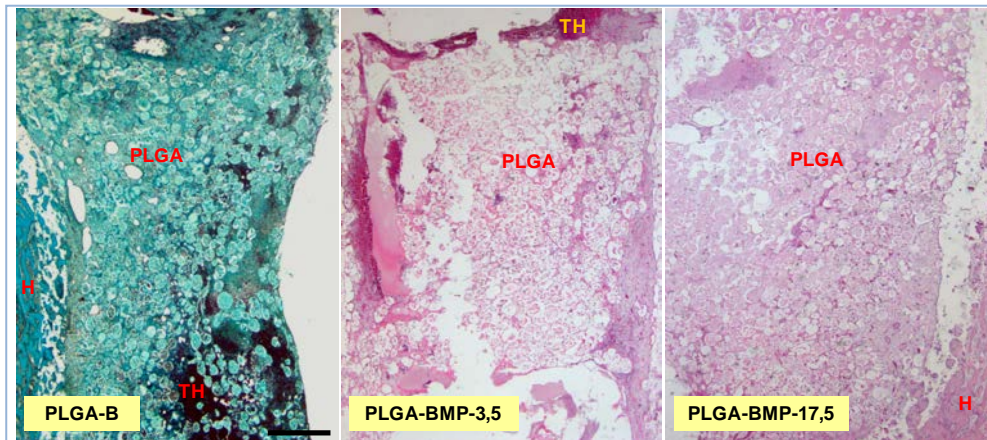


Figura 4.31.- Sistema de PLGA a las 2 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos, mostrándose la estructura del implante. En las secciones correspondientes al blanco y a la dosis alta de BMP-2 se muestra la presencia de neoformación ósea en los márgenes. Tricrómico de Masson (PLGA-B); Hematoxilina-eritrosina (PLGA-BMP-3,5 y PLGA-BMP-17,5); H: Tejido óseo; TH: Tejido hemático. Barra de escala: 1 mm.

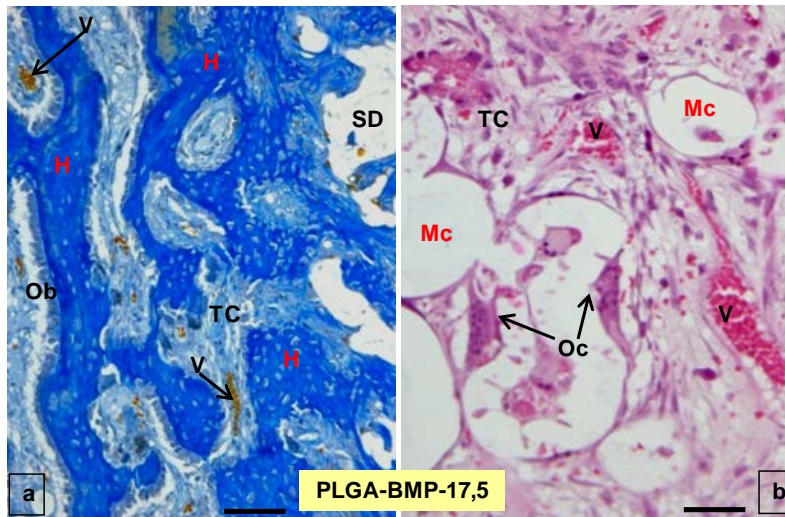


Figura 4.32.- Sistema de PLGA. Detalle a mayor aumento que muestra la neoformación ósea en los márgenes del defecto en el grupo con mayor dosis de BMP-2, a las 2 semanas post-implantación (a). Detalle a mayor aumento del interior del implante que muestra la presencia de tejido conectivo y vasos sanguíneos rodeando las microesferas de PLGA, en cuyo interior pueden observarse la presencia de osteoclastos (b). Cleveland-Wolfe (a); Hematoxilina-eritrosina (b); H: Tejido óseo; Mc: Microesferas; Ob: Osteoblastos; Oc: Osteoclastos; SD: sitio del defecto; TC: Tejido conectivo; V: Vasos sanguíneos. Barra de escala (a): 90 μm , (b): 50 μm .

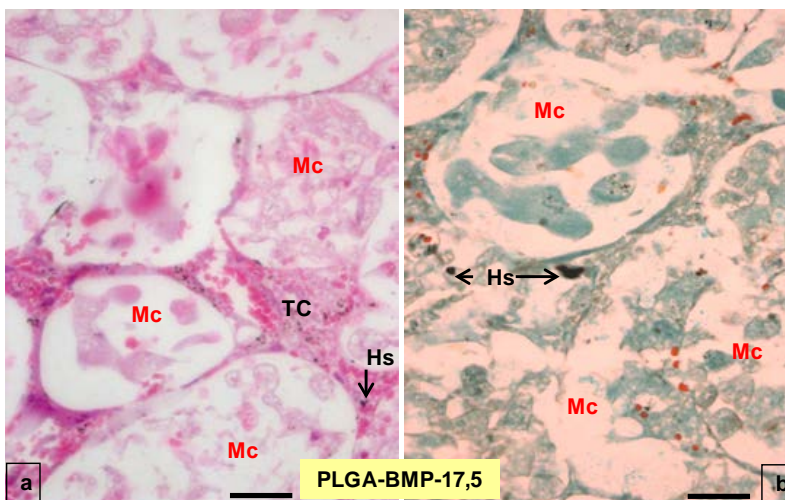


Figura 4.33.- Sistema de PLGA. Detalles a mayor aumento en el grupo de dosis alta de BMP-2, mostrando la estructura interna de las microesferas a las 2 semanas post-implantación. Hematoxilina-eritrosina (a); Tricrómico de Masson (b); Hs: Granos de hemosiderina; Mc: Microesferas; TC: Tejido conectivo. Barras de escala: 40 μm .

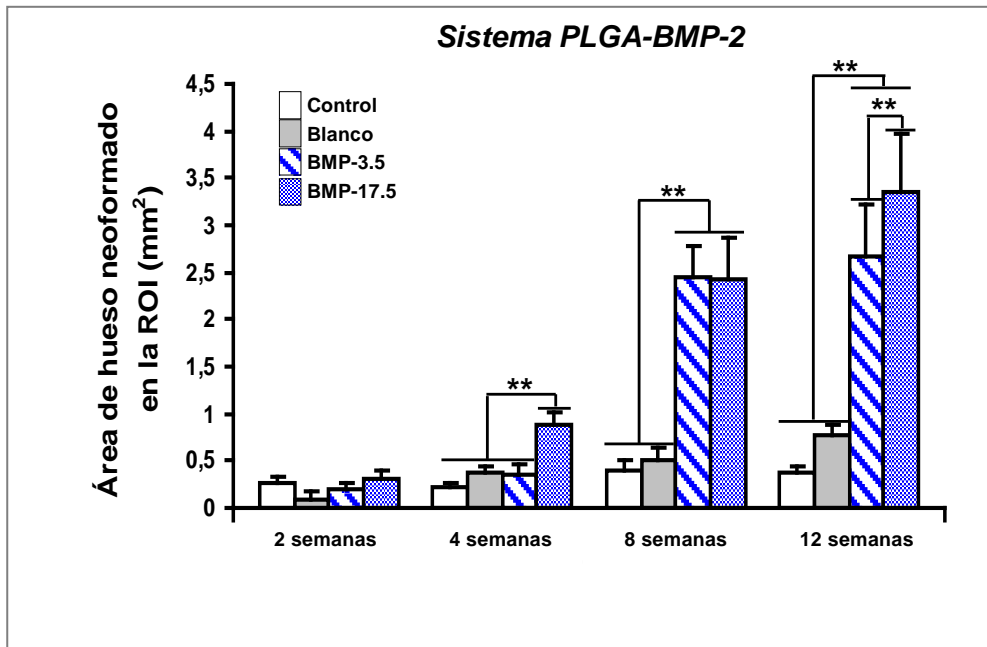


Figura 4.34.- Formación de hueso: Histograma que muestra la neoformación de hueso en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos, con el sistema de PLGA. Las barras representan la media \pm SD. ** $p < 0.001$.

A las cuatro semanas después de la implantación, el grado de neoformación ósea no varió significativamente del observado a las dos semanas excepto en el grupo PLGA-BMP-17,5 donde se detectó un aumento estadísticamente significativo tras el análisis histomorfométrico (Fig. 4.34 y Fig. 4.36).

En este momento se observaron aún, en algunos animales, restos del implante. Éstos aparecían como cavidades de tamaño variable con fragmentos del implante en su interior (Fig. 4.36). En este punto, no se observó la presencia de microesferas. El análisis de la intensidad de inmunoreacción para la osteocalcina reveló valores similares a los observados a las dos semanas. La correlación con el grado de

neoformación ósea fue buena y similar a la observada a las dos semanas (Fig. 4.35).

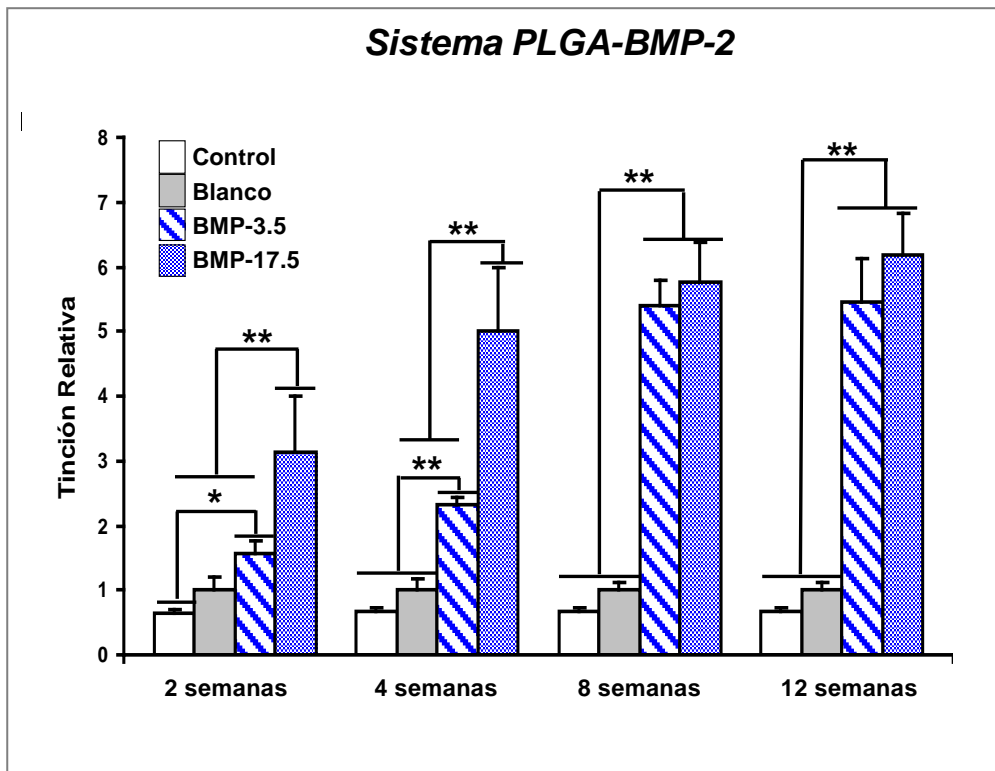


Figura 4.35.- Expresión de osteocalcina: Análisis de imagen semi-cuantitativo de la inmunotinción relativa para osteocalcina en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos con el sistema de PLGA. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

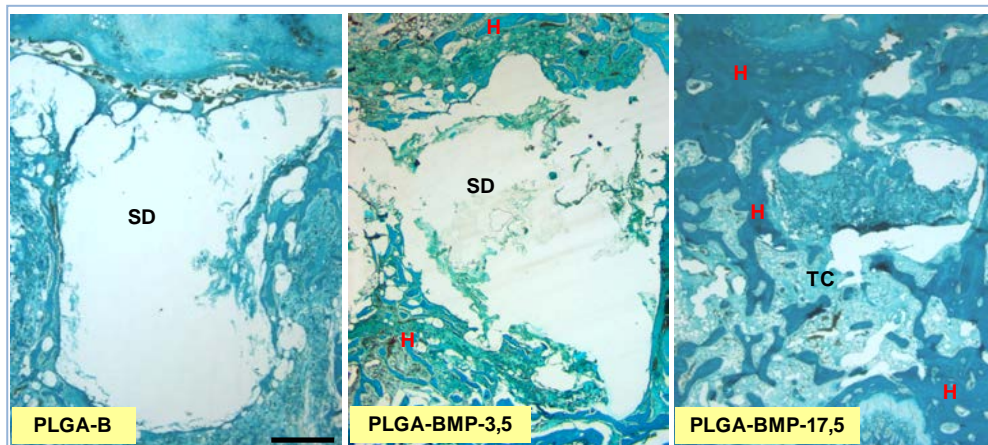


Figura 4.36.- Sistema de PLGA a las 4 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tricrómico de Masson; H: Tejido óseo; SD: sitio del defecto; TC: Tejido conectivo. Barra de escala: 1 mm.

A las 8 semanas post-implantación (Fig. 4.37) no se observaron diferencias significativas en el grado de neoformación ósea entre los grupos PLGA-C y PLGA-B (Fig. 4.34). No obstante, se observó un aumento muy llamativo en los grupos tratados con BMP-2 con respecto a los valores observados a las cuatro semanas (Fig. 4.34). En este punto del análisis no se observaron restos ni signos del implante en ninguno de los animales (Fig. 4.37).

El análisis de la intensidad de inmunoreacción para la osteocalcina reveló valores similares a los observados a las cuatro semanas, excepto en el grupo PLGA-BMP-3,5 que presentó un aumento significativo (Fig. 4.35). Nuevamente, la correlación con el grado de neoformación ósea fue buena (Fig. 4.34 y Fig. 4.35).

En los resultados obtenidos a las ocho (Fig. 4.37) y a las doce semanas (Fig. 4.38) post-implantación se observaron pocas diferencias, tanto en la neoformación ósea (Fig. 4.34), como en la intensidad de inmunoreacción para la osteocalcina (Fig. 4.35).

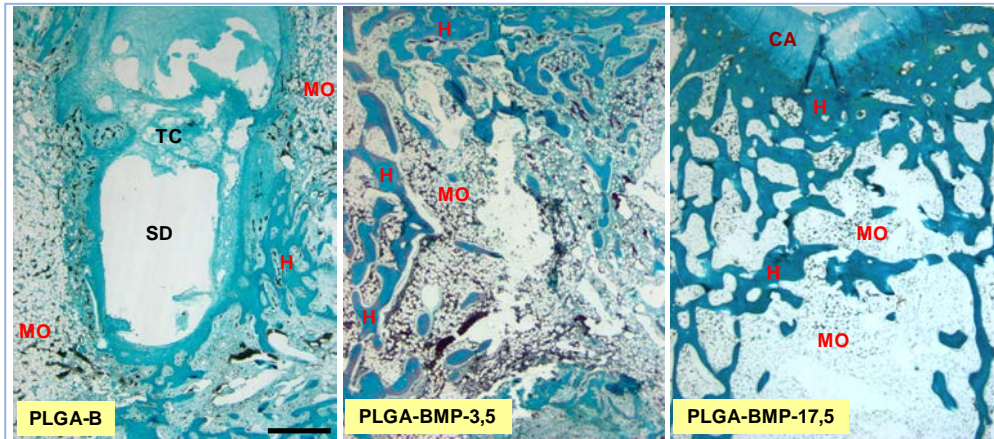


Figura 4.37.- Sistema de PLGA a las 8 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tricrómico de Masson; CA: Cartílago articular; H: Tejido óseo; MO: Medula ósea; SD: Sitio del defecto; TC: Tejido conectivo. Barra de escala: 1mm.

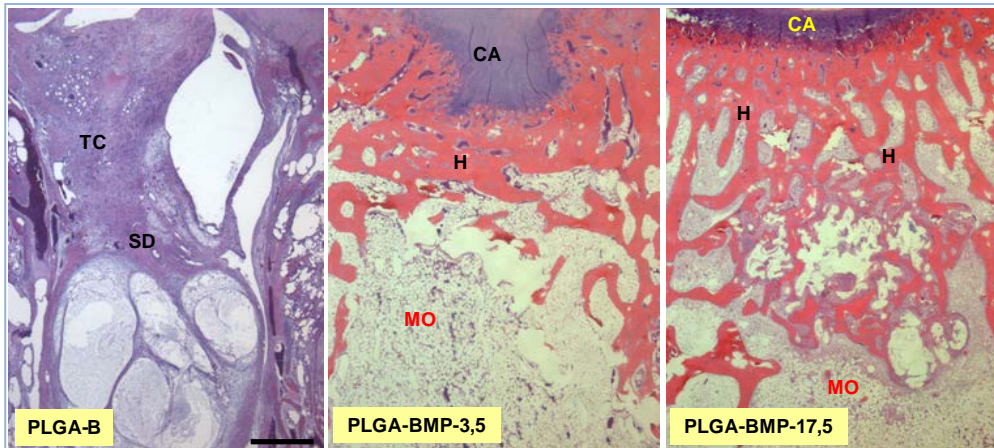


Figura 4.38.- Sistema de PLGA a las 12 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Hematoxilina-eritrosina. CA: Cartílago articular; H: Tejido óseo; MO: Medula ósea; SD: Sitio del defecto; TC: Tejido conectivo. Barra de escala: 1mm.

El análisis de la neovascularización reveló un aumento significativo en la densidad de vasos sanguíneos (Fig. 4.39a), así como en el área de

superficie vascular (Fig. 4.39b), a dos y cuatro semanas post-implantación, que se mantuvo con pequeñas diferencias a las ocho y a las doce semanas (Fig. 4.39).

Análisis histológico de la evolución de los sistemas de brushita y PLGA conteniendo BMP-2.

La degradación de los implantes se detectó por una pérdida de integridad y una disminución del área de los mismos, reemplazada por hueso no formado a lo largo del periodo experimental. Los implantes de PLGA fueron visibles tras dos semanas de implantación solamente, mientras que los implantes de brushita se observaron a lo largo de todo el periodo experimental (Tabla 4.6). El porcentaje de superficie remanente en los implantes de brushita se mantuvo casi al 100% durante las primeras cuatro semanas del experimento, reduciéndose posteriormente de manera progresiva (Tabla 4.6). No se observaron diferencias significativas a lo largo del experimento entre los grupos conteniendo implantes de brushita.

En los animales implantados con el sistema de brushita, se observó un aumento del área de contacto hueso/implante en los grupos tratados con BMP-2, a las ocho y doce semanas post-implantación (Tabla 4.7).

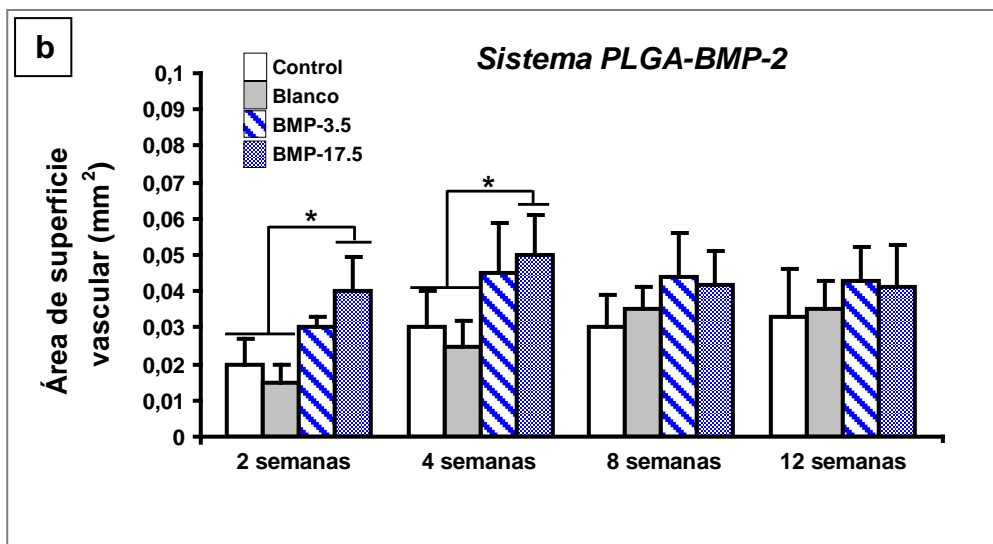
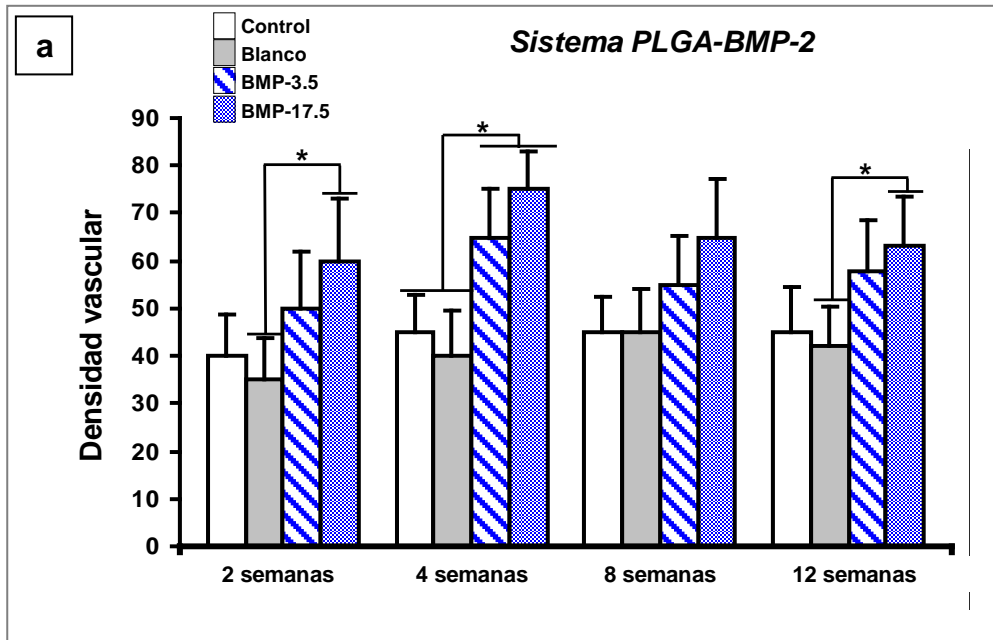


Figura 4.39.- Neovascularización. Histogramas que muestran la densidad vascular (a) y el área de superficie vascular (b) en los diferentes puntos de análisis. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$.

Tiempo (semanas)	PLGA Blanco	PLGA-BMP-2		Brushita Blanco	Brushita-BMP-2	
		3,5 µg	17,5 µg		3,5 µg	17,5 µg
2	64±12	56±12	56±14	74±6	72±8	64±8,4
4	--	--	--	72±12	68±14	66±10,8
8	--	--	--	62±12,8	49,6±18	46,4±18,8
12	--	--	--	55,2±12	42±15,2	36±20,8

Tabla 4.6.- Superficie de implante remanente (porcentaje) en los sistemas de PLGA y brushita.

Tiempo (semanas)	Brushita Blanco	Brushita-BMP-2	
		3,5 µg	17,5 µg
2	30±12	30±15	32±16,5
4	33±12,5	35±15	36±18
8	40±24	68±27	65±22,5
12	47±15,5	65,5±20	70±25

Tabla 4.7.- Superficie de contacto hueso/implante (porcentaje) de brushita.

4.3.3. Implantes de PLGA conteniendo VEGF

A las dos y cuatro semanas post-implantación (Fig. 4.40 y Fig. 4.41), el análisis histológico e histomorfométrico reveló diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. A las dos semanas post-implantación, se observó un aumento significativo de hueso neoformado en el grupo PLGA-VEGF-1,75 con respecto al resto de los grupos (Fig. 4.42). Tras cuatro semanas de implantación, la diferencia entre los grupos PLGA-C y PLGA-B y los grupos tratados con VEGF fue más acusada (Fig. 4.42). No se observaron diferencias entre los grupos tratados con VEGF (Fig. 4.42).

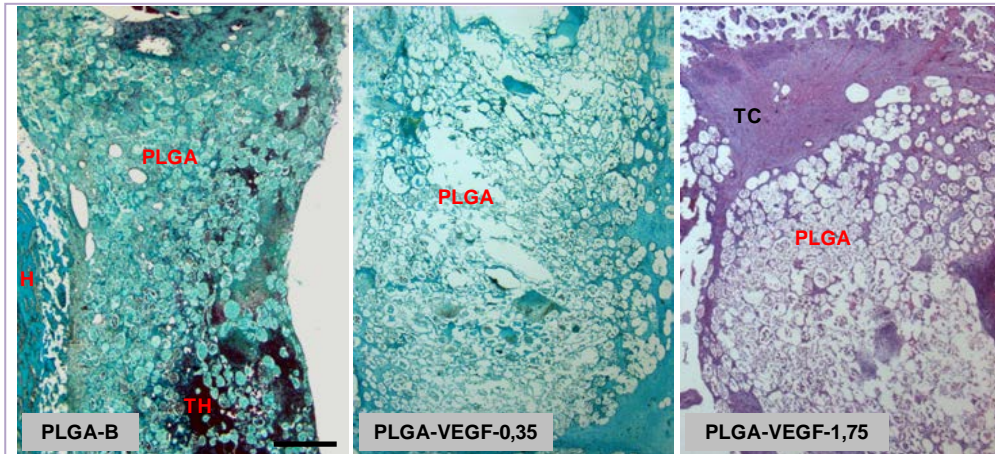


Figura 4.40.- Sistema de PLGA con VEGF a las 2 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tricrómico de Masson (PLGA-B y PLGA-VEGF-0,35); Hematoxilina-eritrosina (PLGA-VEGF-1,75); H: Tejido óseo; TC: Tejido conectivo; TH: Tejido hemático. Barra de escala: 1 mm.

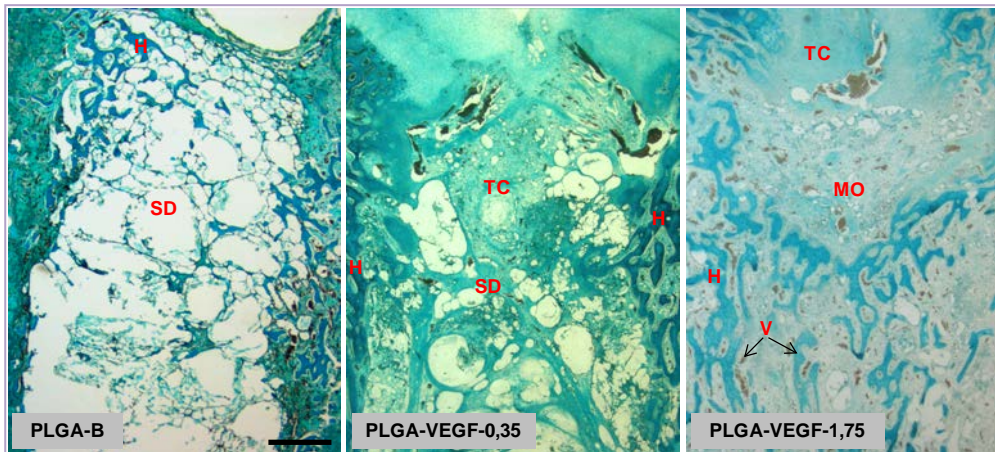


Figura 4.41.- Sistema de PLGA con VEGF a las 4 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Tricrómico de Masson. H: Tejido óseo; MO: Médula ósea; SD: Sitio del defecto; TC: Tejido conectivo; V: Vasos sanguíneos. Barra de escala: 1 mm.

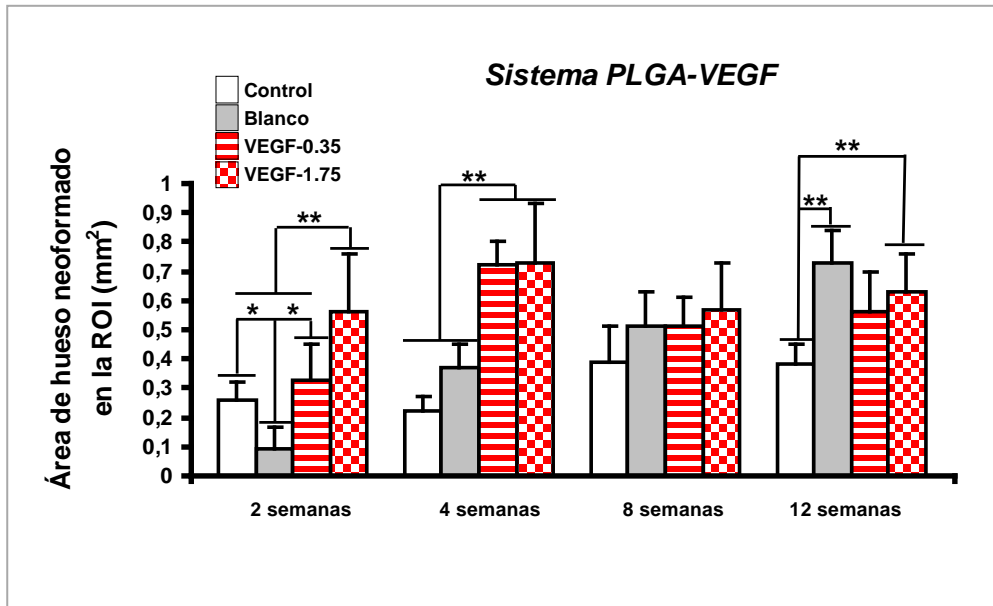


Figura 4.42.- Formación de hueso: Histograma que muestra la neoformación de hueso en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos con el sistema de PLGA-VEGF. Las barras representan la media \pm SD. ** $p < 0.001$

En las figuras 4.43 y 4.44, se muestran imágenes de secciones histológicas del sistema PLGA-VEGF correspondientes a las ocho y doce semanas post-implantación, respectivamente. En ambos puntos de análisis, el grado de neoformación ósea mostró una ligera disminución con respecto a las cuatro semanas (Fig. 4.42). No se observaron diferencias significativas relevantes ni a las ocho, ni a las doce semanas (Fig. 4.42).

La intensidad de inmunoreacción para osteocalcina mostró una buena correlación con la tasa de hueso neoformado (Fig. 4.45).

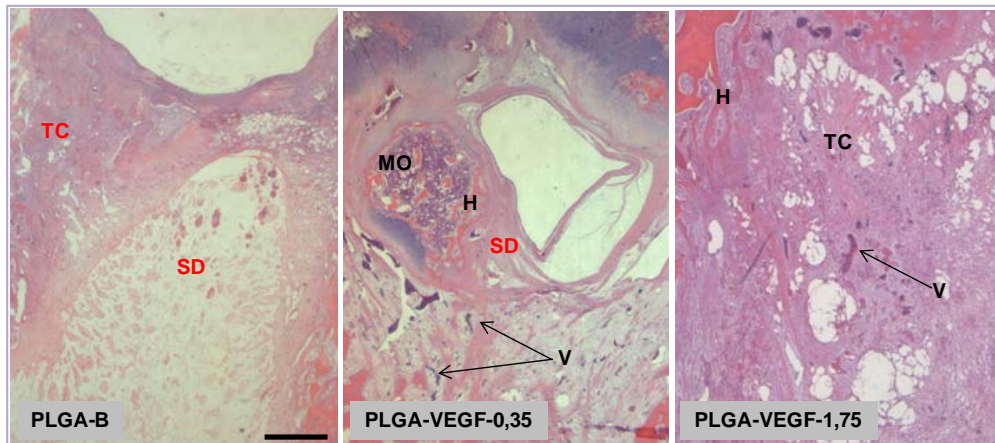


Figura 4.43.- Sistema de PLGA con VEGF a las 8 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Hematoxilina-eritrosina. H: Tejido óseo; MO: Médula ósea; SD: Sitio del defecto; TC: Tejido conectivo; V: Vasos sanguíneos. Barra de escala: 1 mm.

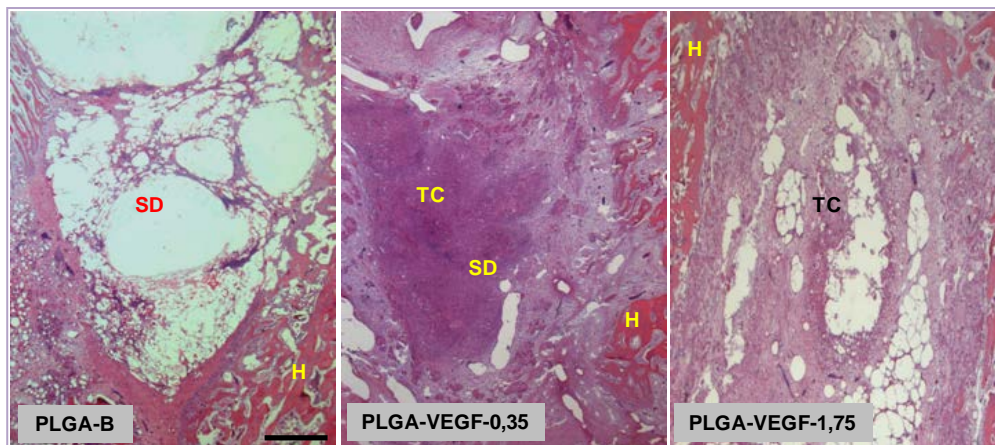


Figura 4.44- Sistema de PLGA con VEGF a las 12 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Hematoxilina-eritrosina. H: Tejido óseo; SD: Sitio del defecto; TC: Tejido conectivo. Barra de escala: 1 mm.

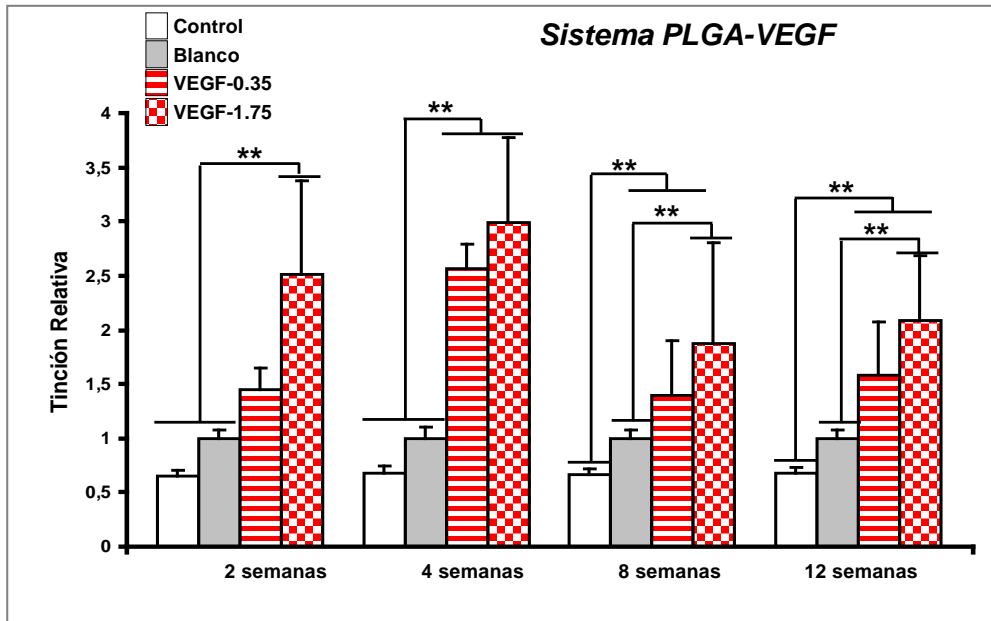


Figura 4.45.- Expresión de osteocalcina: Análisis de imagen semi-cuantitativo de la inmunotinción relativa para osteocalcina en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos con el sistema de PLGA. Las barras representan la media \pm SD. ** $p < 0.001$.

El análisis de la neovascularización reveló un aumento significativo en la densidad de vasos sanguíneos (Fig. 4.46a), así como en el área de superficie vascular (Fig. 4.46b), tras dos y cuatro semanas post-implantación. A las ocho semanas, se observó una disminución en ambos parámetros que se mantuvo hasta el final del experimento (Fig. 4. 46).

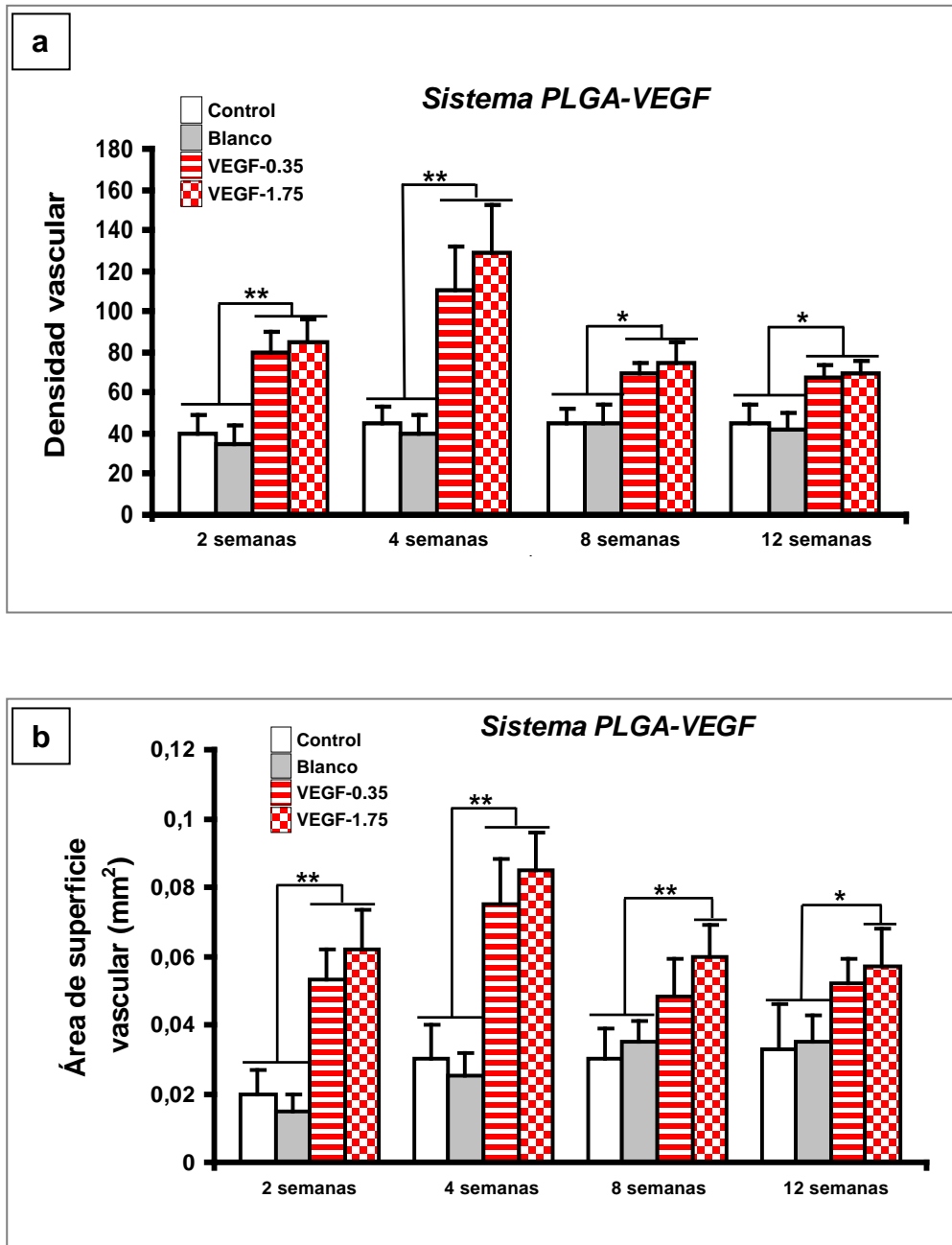


Figura 4.46.- Neovascularización. Histogramas que muestran la densidad vascular (a) y el área de superficie vascular (b) en los diferentes puntos de análisis. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

4.3.4. Implantes de PLGA conteniendo BMP-2 y VEGF

A las cuatro semanas de la implantación, la combinación de BMP-2 con la dosis seleccionada de VEGF (0,35 μ g), mostró un aumento significativo en el área de hueso neoformado (Fig. 4.47) con respecto a los grupos PLGA-C y PLGA-B (Fig. 4.48). Tras doce semanas de implantación, se observó la completa reparación del defecto con ambas combinaciones de BMP-2/VEGF (Fig. 4.49), siendo la diferencia respecto a los grupos PLGA-C y PLGA-B, similar a la observada a las cuatro semanas (Fig. 4.48).

Los valores de tinción relativa obtenidos para la osteocalcina mostraron una buena correlación con la tasa de hueso neoformado a las cuatro y doce semanas post-implantación (Fig. 4.50).

El análisis de la neovascularización mostró, paralelamente a la neoformación de hueso, un aumento significativo en la densidad de vasos sanguíneos (Fig. 4.51a) y área de superficie vascular (Fig. 4.51b), tras cuatro semanas de implantación. A las doce semanas los valores fueron similares a los observados en los grupos PLGA-C y PLGA-B.

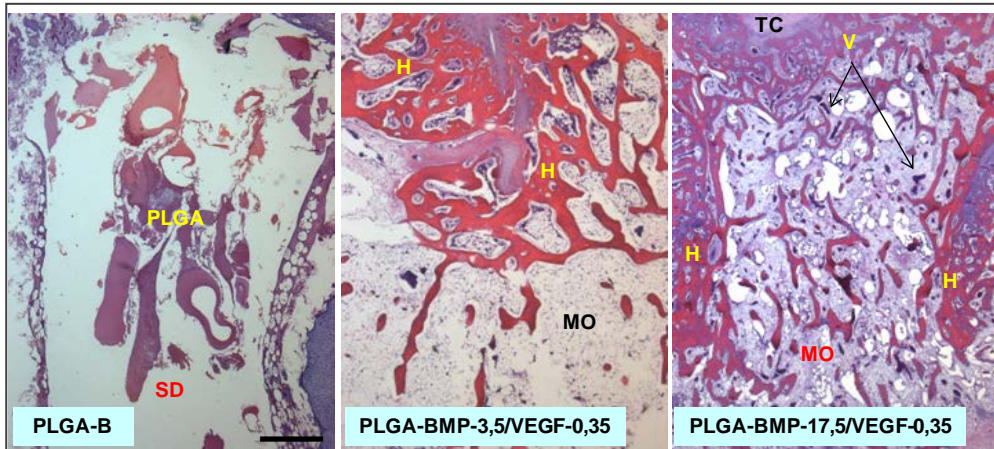


Figura 4.47.- Sistema de PLGA con BMP-2/VEGF a las 4 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Hematoxilina-eritrosina. H: Tejido óseo; MO: Médula ósea; SD: Sitio del defecto; TC: Tejido conectivo; V: Vasos sanguíneos. Barra de escala: 1 mm.

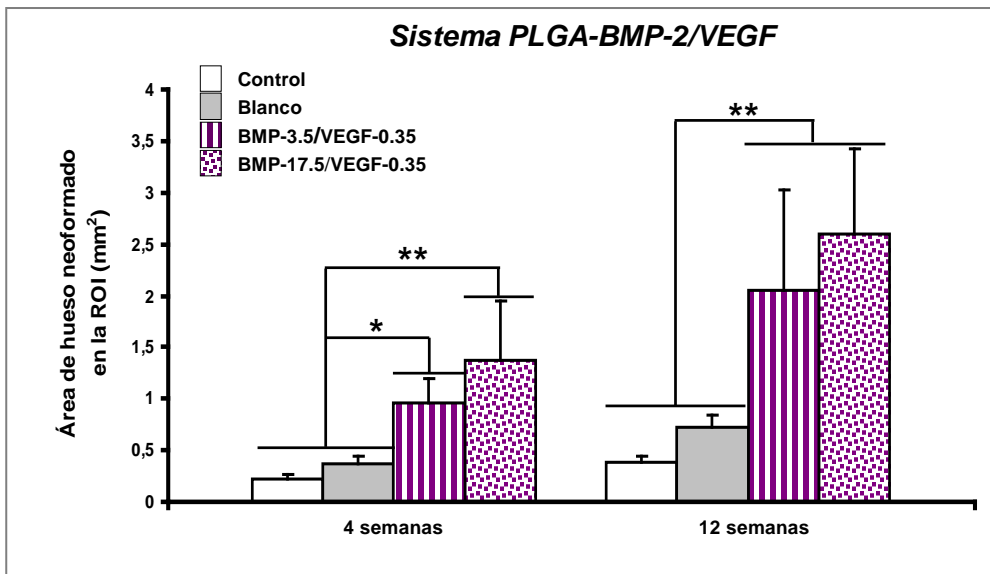


Figura 4.48.- Formación de hueso: Histograma que muestra la neoformación de hueso en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos con el sistema de PLGA. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

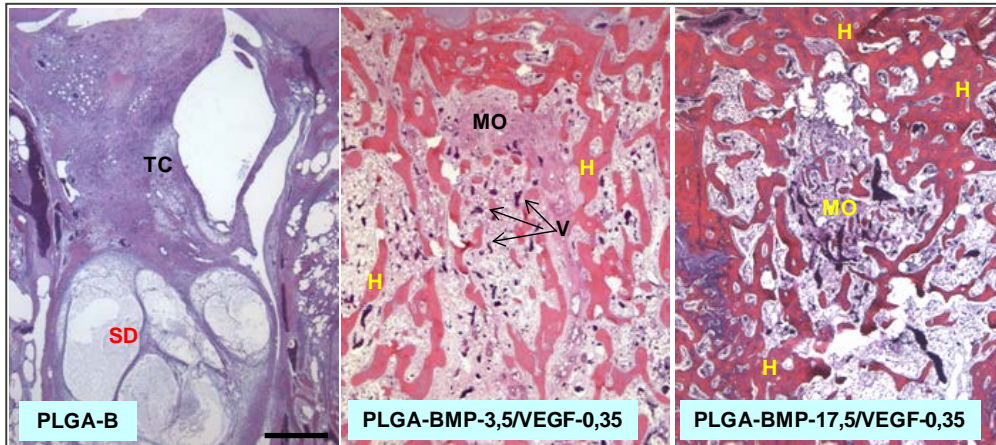


Figura 4.49.- Sistema de PLGA con BMP-2/VEGF a las 12 semanas post-implantación. Secciones horizontales de fémur de conejo a nivel del defecto en animales de los distintos grupos. Hematoxilina-eritrosina. H: Tejido óseo; MO: Médula ósea; SD: Sitio del defecto; TC: Tejido conectivo; V: Vasos sanguíneos. Barra de escala: 1 mm.

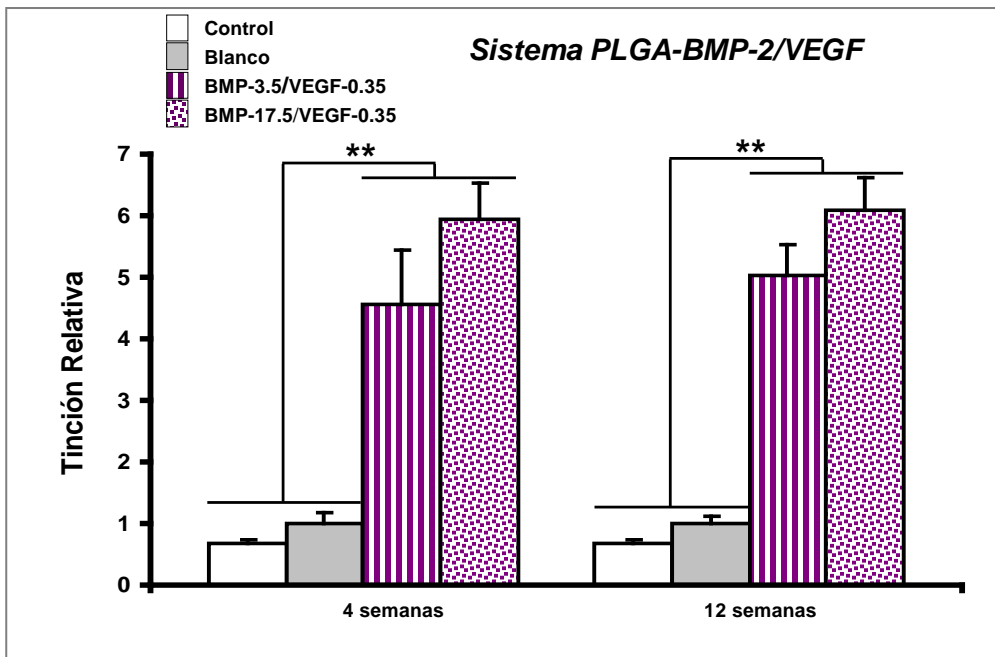


Figura 4.50.- Expresión de osteocalcina. Análisis de imagen semi-cuantitativo de la inmunotinción relativa para osteocalcina en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos con el sistema de PLGA. Las barras representan la media \pm SD. ** $p < 0.001$.

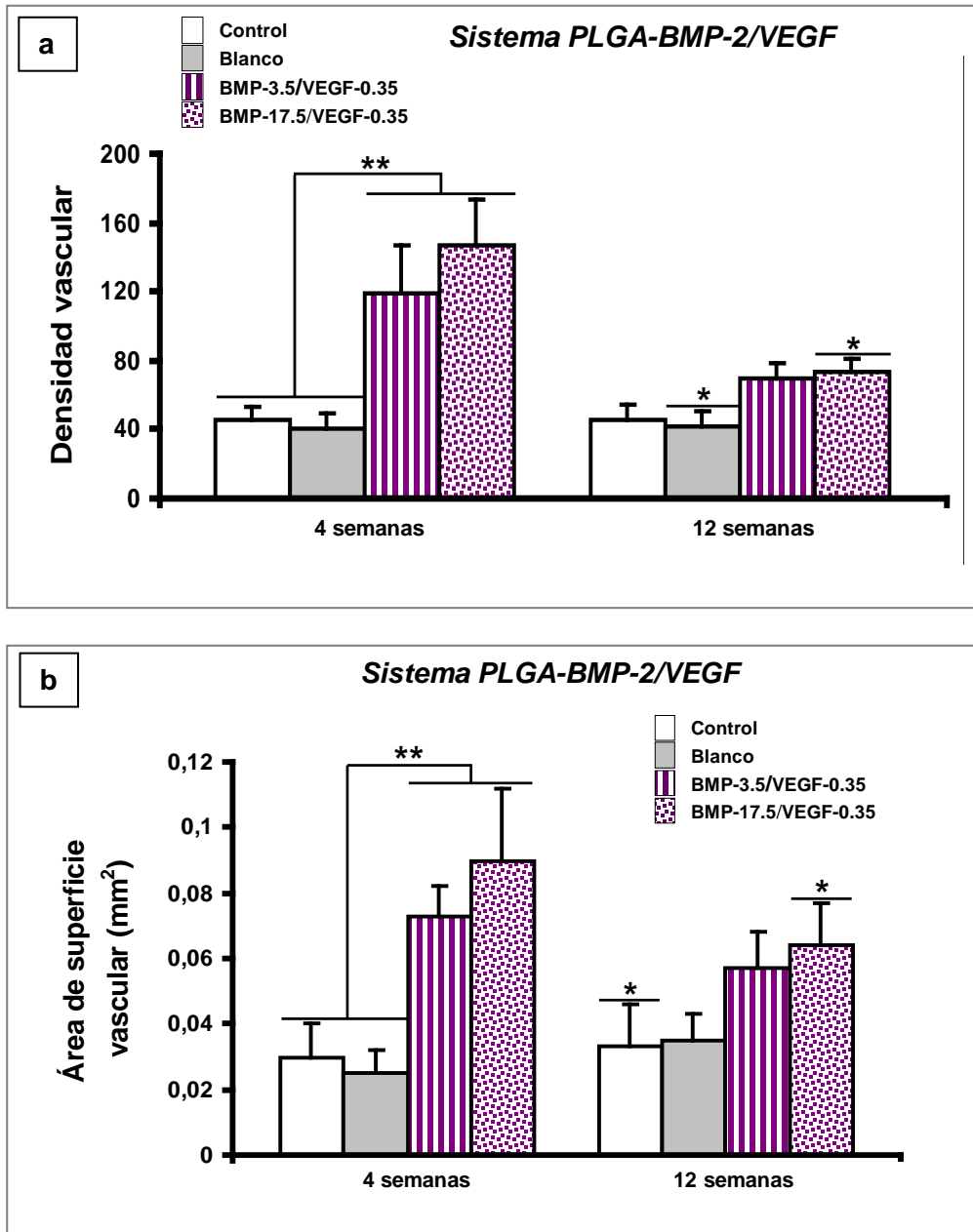


Figura 4.51.- Neovascularización. Histograma que muestra la densidad vascular (a) y el área de superficie vascular (b) en los diferentes puntos de análisis. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

La terapia osteo-regenerativa propuesta en este trabajo está orientada a reemplazar hueso enfermo o dañado, intentando imitar la compleja cascada de reacciones que tienen lugar en el proceso de regeneración ósea. En dicho proceso, los factores de crecimiento juegan un papel fundamental, específicamente la BMP-2 y el VEGF. A priori, ambos deben formar parte de esta terapia puesto que angiogénesis y osteogénesis son imprescindibles si se pretende reparar tejido óseo. Sin embargo, para que este tipo de terapias resulte eficaz debemos controlar tanto la liberación de cantidades específicas de los distintos factores en el lugar a reparar, como el tiempo de permanencia en el mismo.

Hoy en día, a pesar de los esfuerzos realizados, aún no se conoce la dosis ni la cinética específica con la que deben presentarse los factores administrados de forma exógena para conseguir una respuesta óptima.

En este trabajo se han elaborado dos sistemas diferentes para estudiar por un lado, el efecto de la dosis de BMP-2 y del material y por otro, la potenciación del efecto que puede producir la adición del segundo factor, el VEGF. Los resultados muestran que se pueden obtener distintas cinéticas de cesión modificando las características de la matriz que los contiene y consecuentemente, diferentes efectos tisulares.

5.1.- Sistemas de liberación de BMP-2. Brushita vs PLGA

En esta primera parte, hemos analizado las consecuencias del tipo de material utilizado en la elaboración de un sistema de cesión controlada conteniendo dos dosis de BMP-2 (3,5 and 17,5 µg), pre-encapsulada en

microesferas de PLGA, tanto en cuanto a cinética de cesión, como fundamentalmente, en cuanto a la respuesta regenerativa, en un modelo de defecto intramedular en el fémur de conejos.

Aún considerando que las propiedades mecánicas son un aspecto importante en los sistemas destinados a regeneración ósea, hay que tener en cuenta que la capacidad de remodelación ósea depende de la resorción del material por los osteoclastos y de la actividad de los osteoblastos para la formación de hueso que rellene los espacios que van formándose. Cuando la velocidad de resorción de los biomateriales es muy lenta pueden interferir y retrasar el crecimiento óseo (Schilling *et al.*, 2004), mientras que en el caso contrario, una velocidad de resorción muy rápida compromete la estabilidad de la zona afectada durante el proceso de reparación (Stavropoulos *et al.*, 2004; Lieberman *et al.*, 2005).

Aunque la brushita presenta una velocidad de resorción más rápida que la mayoría de los fosfatos convencionales, debe considerarse un material duro, con una velocidad de resorción relativamente lenta en comparación con los polímeros biodegradables, tipo PLGA. No obstante, el análisis histológico nos indica que ninguno de los sistemas elaborado es capaz por sí mismo de inducir regeneración en el defecto practicado en el fémur de los conejos. Por el contrario, ambos sistemas cargados con BMP-2 producen un efecto regenerativo significativamente mayor que sus correspondientes grupos control (C) y blanco (B), si bien al comparar los dos sistemas entre sí, se aprecian notables diferencias (Fig. 5.1). El sistema elaborado con PLGA resultó extremadamente más eficaz, presentando mayor capacidad osteoinductora a lo largo de todo el periodo de estudio, independientemente de la dosis de BMP-2. Estos resultados están en relación directa con el comportamiento y evolución de los dos materiales-

sistemas durante los experimentos realizados. *In vivo*, el sistema de PLGA libera BMP-2 a mayor velocidad que el sistema de brushita, quedando en éste último, parte de la proteína retenida al final del experimento.

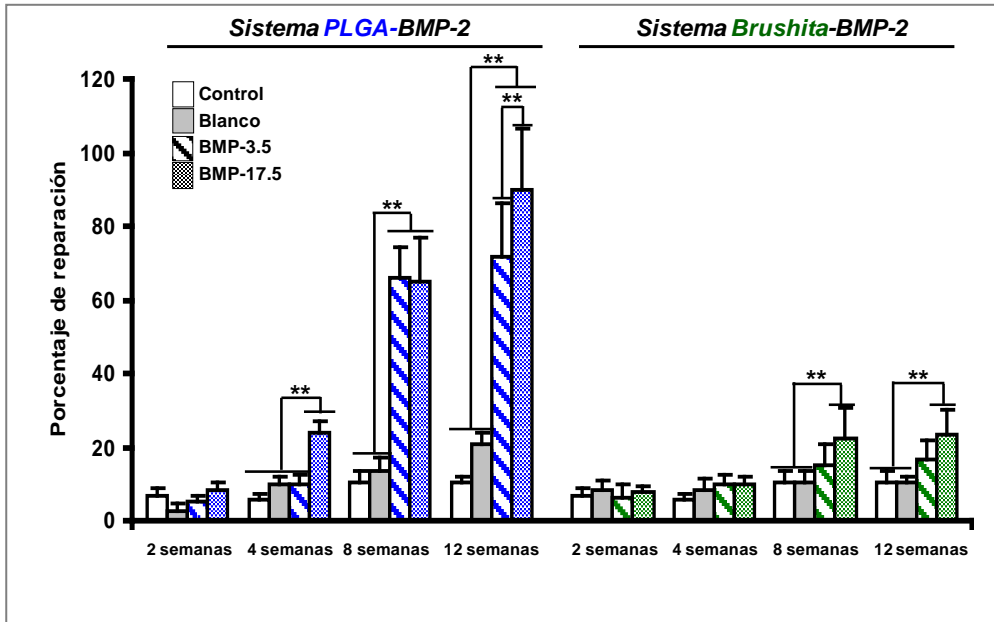


Figura 5.1.- Formación de hueso. Histograma que muestra la neoformación de hueso en la región de interés (ROI) a los diferentes tiempos, con los sistemas de PLGA y de brushita cargados con microesferas de PLGA conteniendo BMP-2. Las barras representan la media \pm SD. ** $p < 0.001$.

Además, desde el sistema de PLGA, la BMP-2 se cede más rápidamente *in vivo* que *in vitro*, mientras que desde la brushita los perfiles de cesión son superponibles, probablemente debido a que la estructura de estos implantes permanece prácticamente inalterada. Los resultados obtenidos del análisis de los implantes de brushita por distintas técnicas como las imágenes obtenidas por SEM, los datos de porosidad, captación de agua y pérdida de masa, junto con los hallazgos histológicos, sugieren

que a lo largo del tiempo, la superficie de la matriz de brushita se va erosionando lenta y progresivamente. Las pequeñas piezas que se desprenden como consecuencia de dicha erosión, se van disolviendo o son retiradas por los osteoclastos (Fig. 4.29c y d). El núcleo central del implante se mantiene intacto, la erosión desde el exterior hacia el interior produce una pérdida continua de material en los bordes del implante. Al final del experimento, 12 semanas post-implantación, el área del implante se reduce a un 45% de su tamaño original (Tabla 4.6). Ocasionalmente, a las 8 y 12 semanas se observa también cierta disgregación interna, consecuencia de la formación de pequeñas fisuras que permiten la entrada de células en zonas muy concretas (Fig. 4.29a y b y Fig. 4.30). Este comportamiento es similar al tipo de degradación observado por Bohner *et al.* (2003), en implantes de brushita, después de 6 meses en un defecto óseo; sin embargo, no es coincidente con el descrito por Klammert *et al.* (2011); estos autores no detectan cambio alguno en la superficie ni en el volumen del implante, después de 15 meses, en un modelo ectópico.

El análisis histológico pone de manifiesto la presencia de restos del implante de brushita, grandes fragmentos que dificultan el proceso regenerativo, quedando la formación de hueso restringida a la superficie externa y raramente, ocupando pequeñas zonas en el interior del sistema. Como consecuencia de ello, no se consigue la reparación del defecto.

Además, esta situación empeora debido a una serie de cambios en la estructura cristalina que tienen lugar a lo largo del tiempo de experimentación. Después de 12 semanas de implantación, la brushita se transforma parcialmente en hidroxiapatita (Fig. 4.17), observándose estructuras microcristalinas tipo “bigote de gato” (Fig. 4.11) similares a las descritas por Klammert *et al.* (2011). Para explicar este proceso debemos

tener en cuenta que la porosidad del implante de brushita no se modifica y además, en la superficie externa se observa la formación gradual de una capa externa de tejido que contribuye a aislar aún más el núcleo de la matriz, favoreciendo la precipitación de los fosfatos cálcicos poco solubles. Este cambio en la composición de fases previamente descrito Bohner *et al.* (2003), ha sido atribuido a la sobresaturación iónica, consecuencia del escaso fluido que accede al interior del sistema y que lleva a la precipitación de los fosfatos cálcicos poco solubles.

Por el contrario, los implantes de PLGA se degradan con rapidez, lo que se refleja en la drástica reducción del peso molecular y del valor de Tg del polímero. Histológicamente, después de 12 semanas, en el grupo de animales implantados con el sistema blanco (B) se observan aún grandes zonas fibróticas, evidenciando que el material no tiene capacidad para favorecer la formación de hueso. Sin embargo, hay que resaltar que el PLGA, contrariamente a la brushita, no impide la acción osteoinductora generada por la BMP-2, permitiendo la entrada de tejido en el sistema y consecuentemente, la regeneración del defecto. Al cabo de ocho semanas, la zona se encuentra prácticamente reparada como consecuencia de la actividad de la BMP-2 cedida en el defecto.

Como se ha descrito previamente, el método no invasivo utilizado en este trabajo para establecer la cinética de cesión de la BMP-2, nos permite esperar concentraciones locales elevadas de proteína durante la primera semana (Fig. 5.2). De acuerdo con nuestros resultados, la presencia inicial de una cierta cantidad de BMP-2 podría ser crítica para activar el entramado de señalizaciones que implica el proceso de reparación. Así, el sistema cargado con la dosis baja, aunque después de ocho semanas produce un grado de regeneración similar al obtenido con la dosis alta de BMP-2, a

tiempos cortos es prácticamente ineficaz. Probablemente, la liberación sostenida durante un periodo relativamente prolongado, de pequeñas cantidades de proteína activa en los alrededores de la matriz extracelular, a la larga induce formación de tejido óseo de buena calidad. Sin embargo, a pesar de que la velocidad de liberación de la BMP-2 desde los implantes de brushita es más lenta y por tanto más prolongada, no se consigue un efecto evidente. Hay que tener en cuenta que después de cuatro semanas, aproximadamente el 20% de la dosis de BMP-2 está aún disponible para liberarse desde los implantes de brushita, lo que significa que aproximadamente unos 700 ng ó 3,5 µg de BMP-2 se encuentran aún disponibles en los sistemas de brushita cargados con dosis baja y alta, respectivamente. Aun considerando que los 700 ng remanentes en el sistema de brushita cargado con la dosis baja, podría ser una cantidad despreciable de BMP-2 para inducir un efecto óseo apreciable, los 3,5 µg remanentes en los implantes con dosis elevada deberían producir mejores resultados, de acuerdo al grado de regeneración observado con la dosis baja en los sistemas de PLGA. La acción trófica de la BMP-2 liberada desde los implantes de brushita se encuentra manifiestamente reducida por la extremadamente lenta resorción de este fosfato, confirmándose de esta manera, la importancia del comportamiento del material para la consecución de una respuesta óptima.

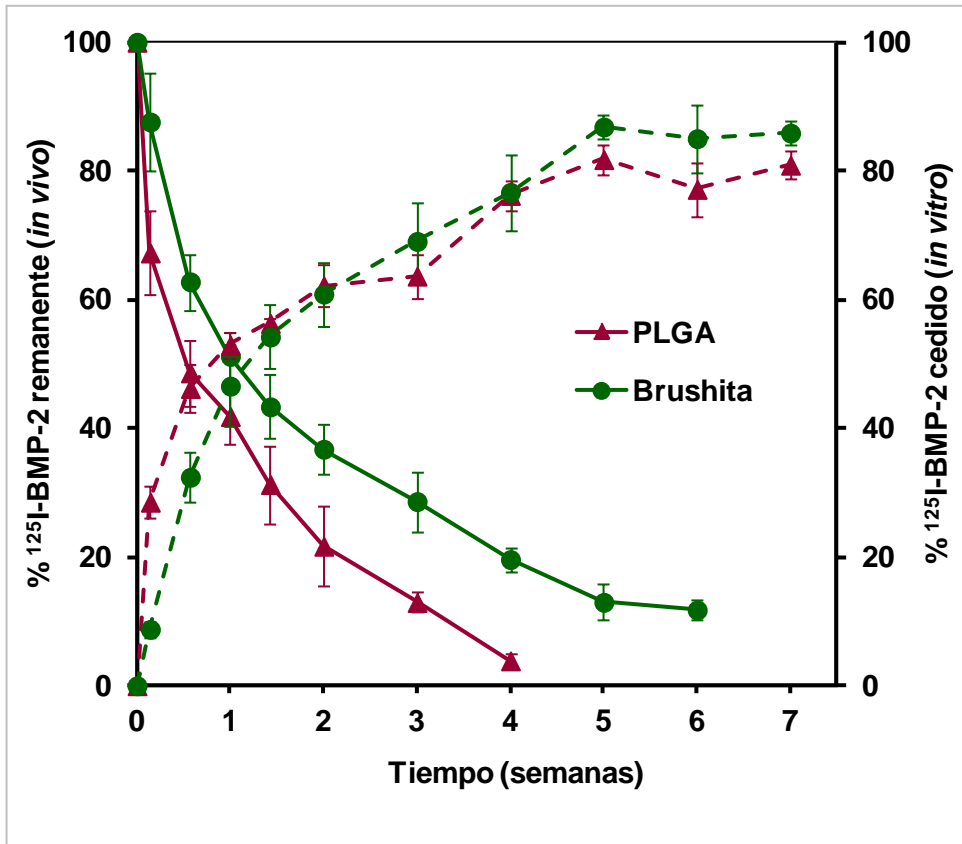


Figura 5.2.- Porcentajes de BMP-2 remanente en el defecto óseo realizado en el fémur de conejos (líneas sólidas) después de la implantación de los sistemas de brushita y de PLGA y cedidos (líneas discontinuas) desde ambos sistemas incubados en DMEM.

En resumen, la comparación de dos sistemas similares elaborados con dos materiales diferentes, revela la superioridad del PLGA sobre el cemento de brushita, aunque el perfil de cesión de la sustancia activa obtenido, sea similar. La elevada velocidad de degradación del polímero facilita que el espacio ocupado por el implante sea rápidamente invadido por células y tejido y como consecuencia de ello, en un corto periodo se produce una efectiva regeneración del defecto óseo. Nuestros resultados coinciden con aquellos que han puesto de manifiesto que los sistemas de

liberación o los scaffolds destinados a producir osteoinducción, elaborados con materiales lentamente reabsorbibles, impiden o dificultan la formación de nuevo tejido (Oest *et al.*, 2007; Kolambkar *et al.*, 2011). Por tanto, el scaffold debe controlar la liberación de la sustancia activa que contiene y temporalmente, proporcionar soporte para el desarrollo tisular; sin embargo, es preferible sacrificar las propiedades mecánicas, frente a la degradación del material, para ajustar la velocidad de neoformación tisular a la velocidad de resorción o degradación.

5.2.- Sistema de PLGA para la liberación de BMP-2 y VEGF

Una vez puesto de manifiesto la superioridad del PLGA sobre la brushita como material para elaborar sistemas de liberación de sustancias osteoinductoras, en esta segunda parte del trabajo valoramos la eficacia del sistema en cuanto a su capacidad para favorecer la concurrencia controlada de dos factores de crecimiento en el defecto óseo, tanto en cantidad, como en tiempo de permanencia, para simular el proceso fisiológico reparador. En concreto, el objetivo de esta sección es comprobar si la adición de una dosis fija de VEGF al sistema puede incrementar el efecto regenerador provocado por la BMP-2, a cualquiera de las dos dosis estudiadas en el mismo defecto intramedular en el fémur de conejo. Como hemos puesto en evidencia, la eficacia de un sistema va a depender no solo de su estructura para actuar como guía en la formación de nuevo tejido, sino también de su capacidad para controlar la velocidad de cesión y consecuentemente, las concentraciones locales y el tiempo de permanencia de los factores de crecimiento en el defecto.

Para alcanzar los objetivos planteados en esta parte del estudio, se han tenido en cuenta fundamentalmente tres aspectos:

Primero, que las características del sistema no sean un impedimento para que tenga lugar el proceso de regeneración del defecto. Los análisis histológicos indican que el sistema, aunque no potencia el efecto de los GFs tampoco dificulta la libre entrada de células pre-osteoblásticas. El sistema no impide ni favorece la vascularización, ni la formación de tejido óseo en el defecto. Las diferencias entre las observaciones histológicas de los grupos de referencia (C y B) y los grupos tratados (Fig. 5-3 y Fig. 5.4), son manifiestas transcurridas cuatro semanas tras la implantación. A lo largo de este periodo, el peso molecular del polímero cae aproximadamente a 1 kDa y a dicho tiempo, el sistema no es detectable y evidentemente, los factores de crecimiento que contiene han sido liberados en su totalidad.

Segundo, que el sistema sea capaz de controlar la liberación de los factores que contiene. Tanto el perfil de cesión del VEGF como de la BMP-2 se caracteriza por un efecto burst moderado, seguido de una liberación sostenida a lo largo de 3 y 4 semanas, respectivamente (Fig. 4.21). De acuerdo con los resultados obtenidos por Jeon *et al.* (2008) en un modelo ectópico, la BMP-2 liberada durante periodos prolongados presenta mayor eficacia osteogénica que cuando es cedida en corto tiempo. En el presente estudio, el perfil de cesión de la BMP-2 obtenido desde el sistema de PLGA coincide significativamente con el tiempo durante el cual la BMP-2 es expresada para reparar una fractura ósea (Dimitreou *et al.*, 2005; Phillips, 2005).

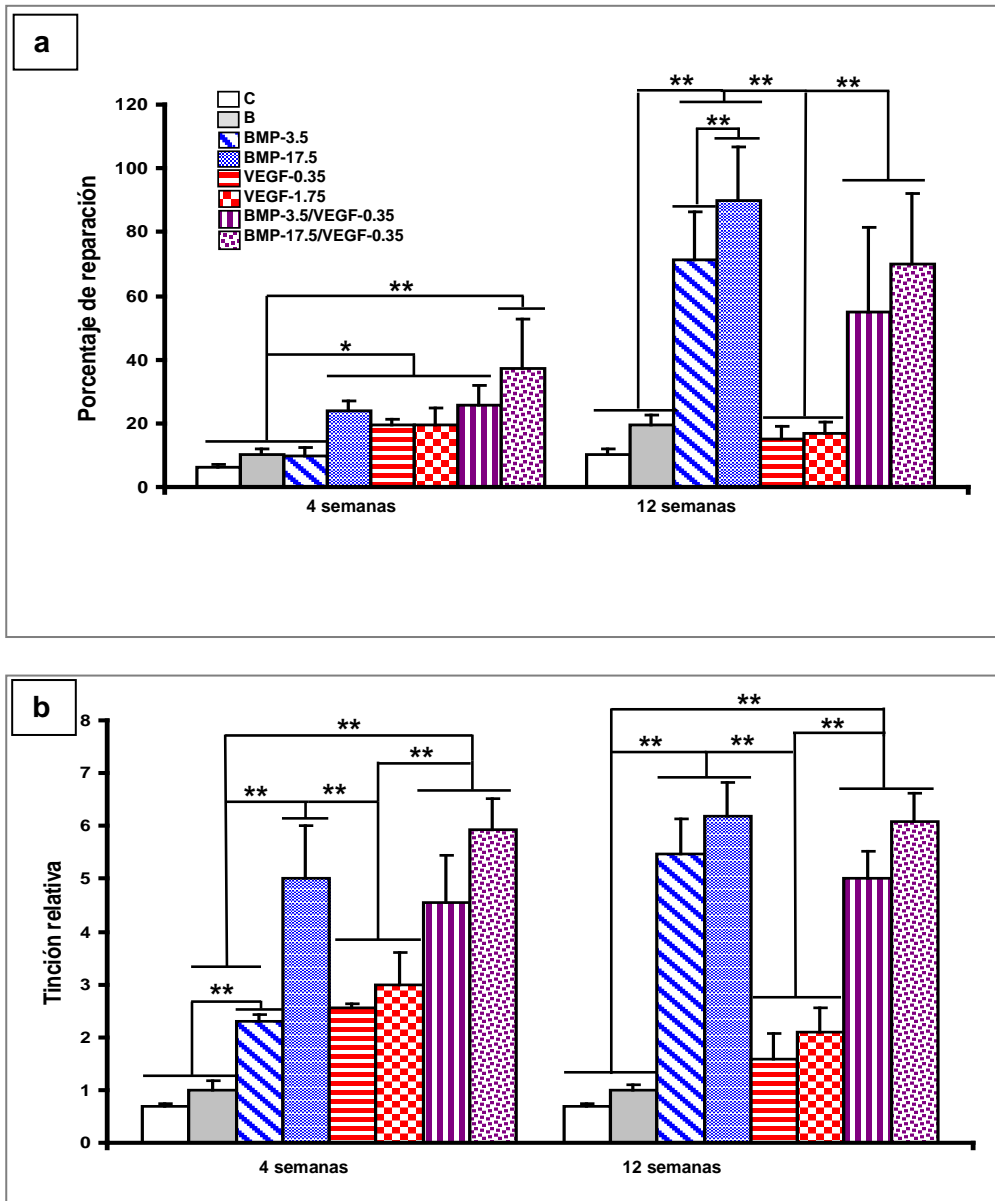


Figura 5.3.- Formación de hueso y expresión de osteocalcina. Histograma que muestra la neoformación de hueso (a) y análisis de imagen semi-cuantitativo de la inmunotinción relativa para osteocalcina (b), en la región de interés (ROI) a las 4 y 12 semanas post-implantación de sistemas de PLGA cargados con microesferas de PLGA conteniendo BMP-2, VEGF y la combinación de ambos factores. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

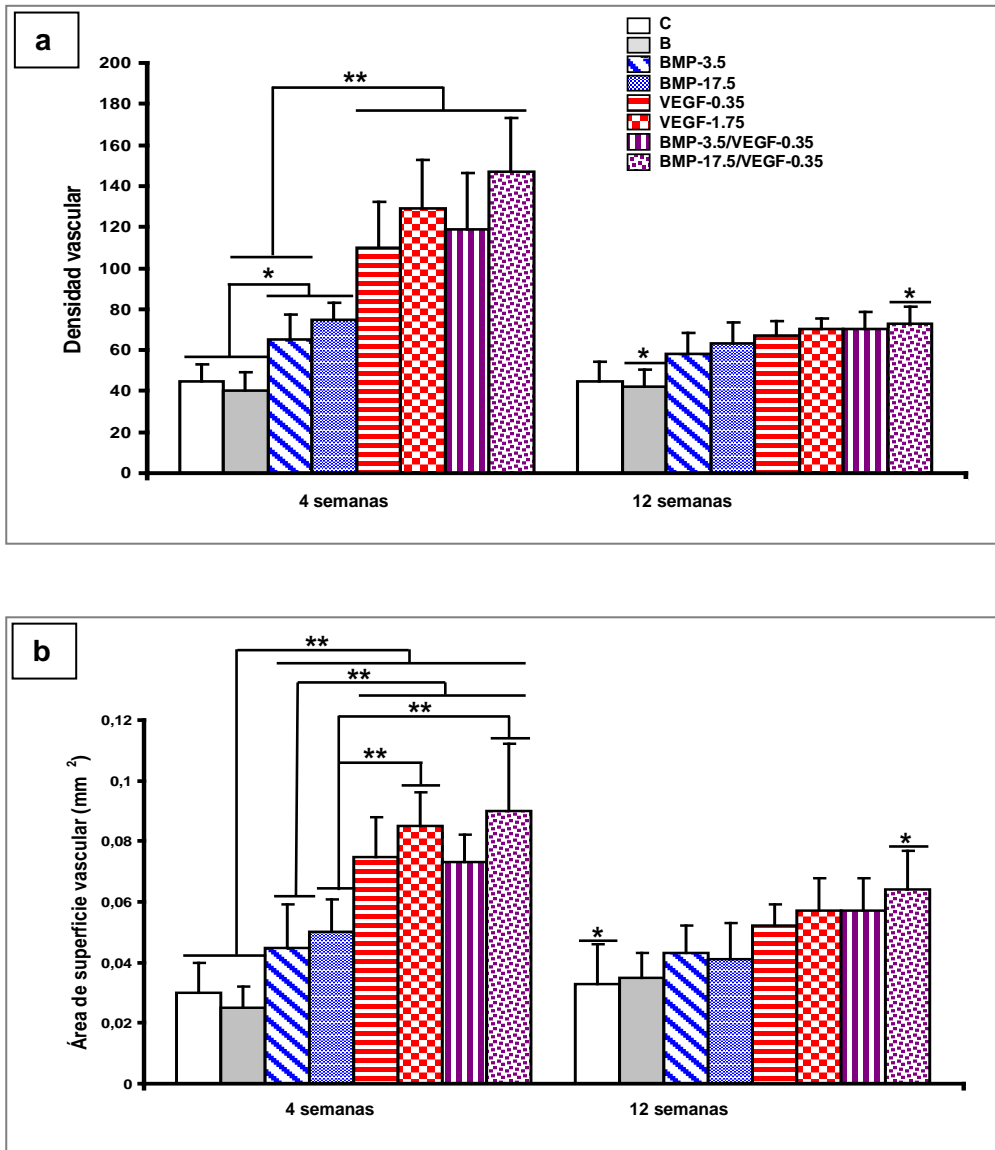


Figura 5.4.- Neovascularización. Histograma que muestra la densidad vascular (a) y el área de superficie vascular (b) a las 4 y 12 semanas post-implantación de sistemas de PLGA cargados con microesferas de PLGA conteniendo BMP-2, VEGF y la combinación de ambos factores. Las barras representan la media \pm SD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

Con respecto al VEGF, Dimitreou *et al.* (2005) indican que este factor se expresa única y exclusivamente a lo largo de la tercera semana después de producirse el daño óseo, por lo que de acuerdo con estos autores, la liberación desde el sistema elegido con PLGA es más temprana y rápida que lo deseado, cediéndose en aproximadamente tres semanas. Se supone que el modelo ideal de liberación de VEGF evitaría la liberación del GF durante las dos primeras semanas. Si bien, hay que tener en cuenta que los sistemas utilizados en regeneración ósea deben cumplir dos funciones, actuar como sistema de cesión y a su vez, servir de sostén para permitir el crecimiento de hueso. Además, como hemos comentado, para facilitar la formación de tejido es necesaria una matriz porosa, lo que hace difícil impedir la liberación del factor de crecimiento. Evidentemente, esta estructura porosa no tiene capacidad para evitar la cesión y la presencia de VEGF en el lugar del defecto durante las dos primeras semanas. Sin embargo, otros autores defienden, en estudios realizados en ratas, que la expresión normal del VEGF después de una fractura ósea ocurre durante los primeros 10 días, con un pico entre el quinto y el décimo día (Pufe *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2003; Kempen *et al.*, 2009). En el presente estudio, aproximadamente un 90% de la dosis de VEGF es liberada durante las 2 primeras semanas (Fig. 4.21), coincidiendo con el modelo de expresión fisiológico propuesto por dichos autores, para reparación ósea en ratas. Por ello, podemos considerar que el sistema elaborado nos proporciona VEGF de forma similar a la fisiológica y por tanto adecuada para ejercer una acción óptima y evitar el riesgo de interferir a largo plazo en la posterior cascada de señalizaciones.

El tercer aspecto es la proporción de BMP-2/VEGF presente en el sistema. De acuerdo con las observaciones histológicas, las dos dosis de BMP-2 son suficientes para reparar y regenerar totalmente el defecto en un

periodo de 8-12 semanas después de la implantación del sistema. Además, la BMP-2 induce un débil efecto angiogénico, independientemente de la dosis, que se mantiene a lo largo del tiempo de experimentación. Sin embargo, las dos dosis de VEGF producen vascularización máxima similar a las 4 semanas de la implantación; paralelamente aunque menos intenso, se observa un pico osteogénico. En general, el perfil de respuesta al VEGF se caracteriza por un máximo a las cuatro semanas seguido de una disminución progresiva del efecto, alcanzando niveles próximos a los observados en los grupos de referencia (C y B). Por tanto, al no apreciarse diferencias significativas entre las dos dosis de VEGF en los parámetros evaluados, fue seleccionada la dosis de 0,35 µg para investigar el posible efecto sinérgico de la combinación con BMP-2 (3,5 y 17,5 µg), respetando la relación “BMP-2 mayor que VEGF”, puesto que estudios previos (Peng *et al.*, 2005) han puesto de manifiesto la reducción de la respuesta osteoregenerativa cuando la relación se invierte. Sin embargo, nuestros resultados histológicos indican que la combinación de VEGF con la dosis elevada de BMP-2 produce única y exclusivamente un efecto sinérgico sobre la formación de tejido óseo a las 4 semanas de la implantación. Posteriormente la combinación de los dos factores no mejora el efecto e incluso habría que resaltar que al cabo de 12 semanas el grado de regeneración observado en el defecto tiende a ser ligeramente menor que el producido por cualquiera de las dosis de BMP-2 (Fig. 5.3). Estos resultados coinciden parcialmente con los de Patel *et al.* (2008), Young *et al.* (2009) y Kempen *et al.* (2009) que, al combinar BMP-2 y VEGF no observan sinergismo en la formación de tejido. Igualmente, Roldán *et al.* (2010) observan que la combinación BMP-7 con VEGF no potencia el efecto producido por la proteína sola.

Sin embargo, a pesar de que algunos autores detectan un efecto osteogénico sinérgico con sistemas de liberación combinado sugiriendo así

la necesidad de la presencia conjunta de los dos factores en las primeras fases de la regeneración ósea, hemos de resaltar la reciente publicación de resultados contrapuestos. Por un lado, los estudios de Peng *et al.* (2005) apoyan, tras 6 semanas post-implantación, la mejora que inducen ambos factores y demuestran la importancia de la presencia de VEGF endógeno para facilitar la angiogénesis y cubrir las necesidades de vascularización requeridas para incrementar la neoformación ósea a través de la resorción de cartílago hipertrófico. Estos autores, como ya hemos mencionado, resaltan claramente la importancia de una alta proporción de BMP-2 en relación al VEGF para conseguir acelerar la respuesta. Sin embargo, en otros estudios en los que se aplican relaciones BMP-2/VEGF mayores a la unidad, de acuerdo con Peng *et al.* (2005), no se observan beneficios con dicha combinación, como puede comprobarse con los resultados obtenidos por Kempen *et al.* (2009), los presentados en esta memoria o los observados por Roldán *et al.* (2010) con BMP-7, cuando los análisis histológicos se prolongan al menos más de 6 semanas.

En este punto hemos de poner en evidencia, que el sistema evaluado en este trabajo no sólo fue diseñado con una elevada relación BMP-2/VEGF, sino que la evaluación *in vivo* de la cinética de cesión, nos permite comprobar que dicha relación se mantiene a lo largo del tiempo de experimentación (Fig. 5.5), un aspecto que no es habitualmente tenido en cuenta en otros estudios. Así, a pesar de que el sistema desarrollado por Kempen *et al.* (2009) contiene inicialmente mayor cantidad de BMP-2, la relación se invierte rápidamente debido a la falta de control en la velocidad de liberación del VEGF, no observándose ninguna mejoría en la respuesta osteogénica ni angiogénica frente a los factores administrados individualmente. Alternativamente, los estudios realizados por Young *et al.* (2009) y Patel *et al.* (2008) parten de sistemas elaborados con relaciones BMP2/VEGF bajas y observan un

incremento de los parámetros de medida de formación de hueso a tiempos cortos, cuatro semanas, pero al igual que los resultados obtenidos en el presente trabajo, la tendencia no se mantiene y a tiempos prolongados (12 semanas) la combinación no supera a los factores individuales.

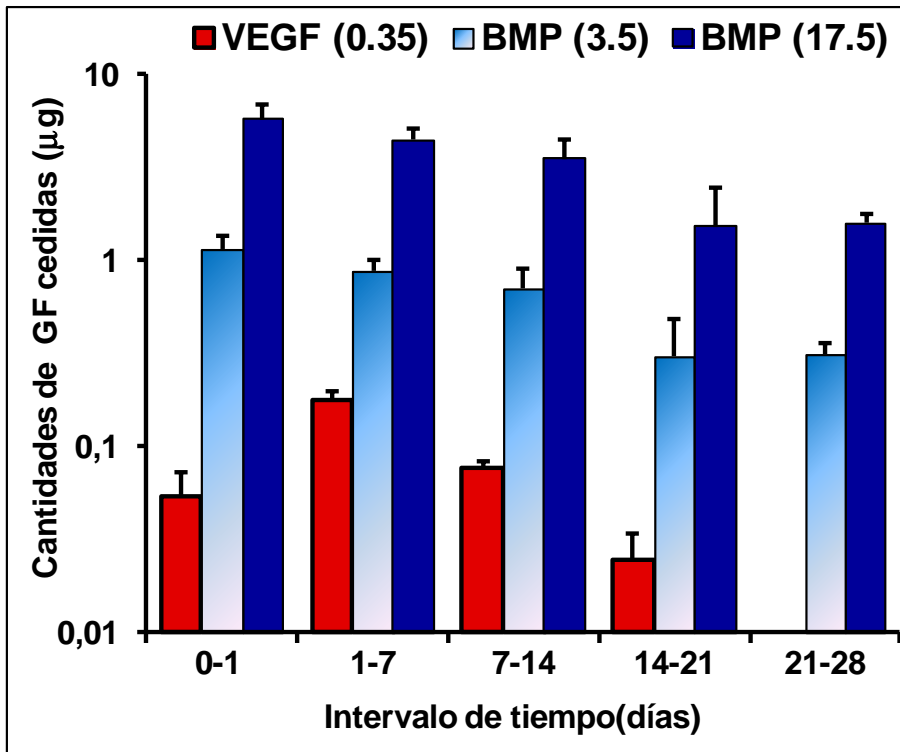


Figura 5.5.- Relación BMP-2/VEGF a lo largo del periodo de cesión in vivo. Los histogramas representan las cantidades cedidas de VEGF y BMP-2 desde los sistemas combinados, dosis baja de VEGF (0,35 µg) con dosis baja (3,5 µg) y alta (17,5 µg) de BMP-2. Las barras representan la media ± SD.

Por tanto, parte de las diferencias en grado de regeneración ósea obtenidas con la aplicación conjunta de BMP-2 y VEGF pueden tener su origen en la proporción con la que se utilizan y en el periodo de evaluación. Sin embargo, otra parte importante creemos que es debida a que

frecuentemente no se conoce el perfil de cesión *in situ* por lo que la dosis disponible es desconocida, tanto en cantidad como en permanencia en el defecto. Además, el uso de diferentes modelos de defectos, tanto en tipo de huesos como diferencias entre especies animales, junto con los distintos métodos de evaluación (radiografías, densitometrías, histología, microtomografía computerizada), aumentan la confusión a la hora de evaluar y comparar resultados.

A pesar de los resultados obtenidos en este trabajo, consideramos que la vascularización es un proceso fundamental para alcanzar una rápida regeneración ósea. La ineficacia observada del VEGF para mejorar la acción regenerativa de la BMP-2 a largo plazo puede ser debido fundamentalmente a la falta de optimización de las dosis y cinéticas de liberación. Incluso como hemos comentado, aún se está evaluando cuál es el intervalo de tiempo en el que el VEGF podría ser imprescindible para justificar el uso combinado de ambos factores. Es necesario continuar investigando para alcanzar la combinación óptima y conseguir los máximos beneficios del uso de ambos factores.

No obstante, hemos de resaltar que de acuerdo con la bibliografía consultada, aparte de artículos publicados por este grupo de investigación cuyos resultados han sido en parte discutidos en el presente trabajo (De la Riva *et al.*, 2009, 2010; Reyes *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2012), son muy pocas las publicaciones que estudian la farmacocinética de los GFs cedidos localmente desde sistemas de liberación. Como excepciones debemos mencionar los trabajos de Ennett *et al.* (2006) realizados con un sistema de liberación de VEGF elaborado con PLGA implantado en tejido subcutáneo y el anteriormente mencionado, de Kempen *et al.* (2009).

CONCLUSIONES

1. El método de doble emulsión utilizado para elaborar las microesferas de PLGA no reduce la bioactividad de la BMP-2 ni del VEGF.
2. La BMP-2 pre-encapsulada en microesferas de PLGA se libera a una velocidad controlada tanto desde el sistema de brushita, como desde el elaborado con PLGA.
3. La buena correlación *in vivo-in vitro* de la cinética de liberación de la BMP-2 desde los implantes de brushita es debido a la no degradación del material. La proteína se libera, las microesferas se degradan y la estructura cilíndrica de fosfato cálcico se mantiene, erosionándose lenta y superficialmente.
4. El sistema de liberación elaborado con PLGA se degrada *in vivo* rápidamente. Su peso molecular en peso se reduce drásticamente. Tanto el VEGF como la BMP-2 se liberan en su totalidad en aproximadamente tres y cuatro semanas, respectivamente.
5. La degradación del sistema de PLGA *in vitro* es ligeramente más lenta que *in vivo*; consecuentemente, la buena correlación *in vivo-in vitro* en la cinética de cesión observada inicialmente se desvía a tiempos más prolongados.
6. El comportamiento del material utilizado para elaborar los sistemas limita en gran medida la respuesta regeneradora inducida por la BMP-2. La mayor velocidad de degradación del PLGA facilita una reparación rápida y eficaz, rellenándose más del 90% del defecto en 12 semanas, frente a aproximadamente un 20% aplicando el sistema

de brushita. Por tanto, consideramos que las propiedades mecánicas deben sacrificarse en favor de una rápida degradación.

7. Aunque el efecto de la dosis de BMP-2 se aprecia una vez reparado aproximadamente el 20% del defecto, tiene mucha menor repercusión que el material.
8. La diferencia de dosis de VEGF no se refleja en la magnitud de los parámetros medidos para evaluar su posible acción angiogénica ni osteogénica.
9. La combinación de dosis baja de VEGF con dosis alta de BMP-2, lo que supone una relación superior a la mínima recomendada de 1:5, produce un ligero efecto sinérgico a tiempos cortos. Sin embargo, aun manteniéndose esta relación a tiempos prolongados, la combinación no supera el efecto osteogénico inducido incluso por la dosis baja de BMP-2. Por tanto, la combinación de estos dos factores en las condiciones utilizadas en este trabajo no es eficaz.
10. Los estudios de biodistribución muestran que los niveles de factores de crecimiento a nivel sistémico son indetectables y por tanto, la administración local de los mismos en los sistemas elaborados en este trabajo no supone riesgo de exposición sistémica.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Andrianjatovo H., Jose F. y Lemaitre J. Effect of b-TCP granulometry on setting time and strength of calcium phosphate hydraulic cements. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1996; 7:34-9.
- Arcos D. y Vallet-Regí M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2010; 6:2874-88.
- Barnes G.L., Kostenuik P.J., Gerstenfeld L.C. y Einhorn T.A. Growth factor regulation of fracture repair. *J. Bone Miner. Res.* 1999; 14:1805-15.
- Baro M., Sánchez E., Delgado A., Perera A. y Evora C. *In vitro-in vivo* characterization of gentamicin bone implants. *J. Control. Release.* 2002; 83(3):353-64.
- Bessa P.C., Casal M. y Reis R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part I (BMP delivery). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2008a; 2(1):1-13.
- Bessa P.C., Casal M. y Reis R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2008b; 2(2-3):81-96.
- Blom E.J., Klein-Nulend J., Yin L., van Waas M.A.J. y Burger E.H. Transforming growth factor- β 1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteoconductivity in rat calvarial bone defects. *Clin. Oral Impl. Res.* 2001; 12:609-16.
- Bohner M., Lemaitre J., Merkle H.P. y Gander B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J. Pharm. Sci.* 2000; 89:1262-70.
- Bohner M., Lemaitre J., van Landuyt P., Zambelli P.Y., Merkle H.P. y Gander B. Gentamicin-loaded calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86:565-72.
- Bohner M., Theiss F., Apelt D., Hirsgier W., Houriet R., Rizzoli G., Gnos E., Frei C., Auer J.A. y von Rechenberg B. Compositional changes of a dicalcium phosphate dehydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 2003; 24(20):3463-74.

- Brandi M.L. y Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J. Bone Miner. Res.* 2006; 21(2):183-92.
- Brinker M.R. y O'Connor D.P. The incidence of fractures and dislocations referred for orthopedic services in a capitated population. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 2004; 86:290-7.
- Burg K., Porter S. y Kellam J. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21:2347-59.
- Carmeliet P. y Collen D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000; 902:249-62; discussion 262-4.
- Calori G.M., Mazza E., Colombo M. y Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury* 2011; 42 Suppl 2:S56-63.
- Cheng H., Jiang W., Phillips F.M., Haydon R.C., Peng Y., Zhou L., Luu H.H., An N., Breyer B., Vanichakarn P., Szatkowski J.P., Park J.Y. y He T.C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone Joint Surg. Am.* 2003; 85:1544-52. Erratum in: *J. Bone Joint Surg. Am.* 2004; 86:141.
- Cho T.J., Gerstenfeld L.C. y Einhorn T.A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 2002; 17: 513-20.
- Chow L.C., Markovic M. y Takagi S.A. Dual constant-composition titration system as an in vitro resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003; 65B:245-51.
- Chu T-M.G., Warden S.J., Turner C.H. y Stewart R.L. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 2007; 28:459-67.
- Chu T.W., Wang Z.G., Zhu P.F., Jiao W.C., Wen J.L. y Gong S.G. Effect of vascular endothelial growth factor in fracture healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2002; 16(2):75-8.

- Constantino P.D. y Freidman C.D., Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol. Clin. North. Am.* 1997; 27:1037-73.
- Constantz B.R., Barr B.M., Ison I.C., Fulmer M.T., Barker J., McKinney L., Goodman S.B., Gunasekaren S., Delaney D.C., Ross J. y Poser R.D. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 43:451-61.
- Cooke J.W., Sarment D.P., Whitesman L.A., Miller S.E., Jin Q., Lynch S.E. y Giannobile W.V. Effect of rhPDGF-BB Delivery on Mediators of Periodontal Wound Repair. *Tissue Eng.* 2006; 12:1441-50.
- Coombes A.G. y Meikle M.C. Resorbable synthetic polymers as replacements for bone graft. *Clin. Mater.* 1994; 17(1): 35-67.
- Cornell C.N., Lane J.M. y Poynton A.R. Orthopedic management of vertebral and long bone fractures in patients with osteoporosis. *Clin. Geriatr. Med.* 2003; 19(2):433-55.
- Coultas L., Chawengsaksophak K. y Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005; 438(7070): 937-45.
- Cypher T.J. y Grossman J.P. Biological principles of bone graft healing. *J. Foot Ankle Surg.* 1996; 35(5):413-7.
- Damien C.J. y Parsons J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J. Appl. Biomater.* 1991; 2:187-208.
- De la Riva B., Nowak C., Sánchez E., Hernández A., Schulz-Siegmund M., Pec M.K., Delgado A. y Evora C. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *Eur. J. Pharm. Bopharm.* 2009; 73:50-8.
- De la Riva B., Sánchez E., Hernández A., Reyes R., Tamimi F., López-Cabarcos E., Delgado A. y Evora C. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite-chitosan system enhances bone regeneration. *J. Control. Release* 2010; 143(1):45-52.

- Delgado J.J., Evora, C., Sánchez E., Baro M. y Delgado A. Validation of a method for non-invasive in vivo measurement of growth factor release from a local delivery system in bone. *J.Control. Release* 2006; 114(2):223-9.
- Derubeis A.R. y Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann. Biomed. Eng.* 2004; 32(1):160-5.
- Devescovi V., Leonardi E., Ciapetti G. y Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir. Organi. Mov.* 2008; 92(3):161-8.
- Dimitriou R., Tsiridis E. y Giannoudis P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury, Int. J. Care Injured* 2005; 36(12):1392-404.
- Dobson K.R., Reading L., Haberey M., Marine X. y Scutt A. Centrifugal isolation of bone marrow from bone: An improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells rat tibiae and femurae. *Calcif. Tissue Int.* 1999; 65:411-3.
- Einhorn T.A. Enhancement of fracture-healing. *J.Bone Joint Surg. Am.* 1995; 77:940-56.
- Einhorn T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop.* 1998; 355S:7-21.
- Ennett A.B., Kaigler D. y Mooney D.J. Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006; 79:176-84.
- Ferrara N. y Gerber H.P. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 2001; 106(4):148-56.
- Ferrara N., Gerber H.P. y LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; 9(6):669-76.
- Flautre B., Delecourt C., Blary M.C., Van Landuyt P., Lemaitre J. y Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone* 1999; 25:35S-39S.

- Frayssinet P., Gineste L., Conte P., Fages J. y Rouquet N. Short-term implantation effects of DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials* 1998; 19:971-7.
- Friedlaender G.E., Perry C.R., Cole J.D., Cook S.D., Cierny G., Muschler G.F., Zych G.A., Calhoun J.H., LaForte A.J. y Yin S. Osteogenic protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.
- Garrison K.R., Donell S., Ryder J., Shemilt I., Mugford M., Harvey I. y Song F. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technol. Assess.* 2007; 11(30): 1-150.
- Garrison K.R., Shemilt I., Donell S., Ryder J.J., Mugford M., Harvey I., Song F. y Alt V. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; junio 16(6): CD006950.
- Gautschi O.P., Frey S.P. y Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J. Surg.* 2007; 77(8):626-31.
- Geesink R.G., Hoefnagels N.H. y Bulstra S.K. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1999; 81: 710–8.
- Geiger F., Bertram H., Berger I., Lorenz H., Wall O., Eckhardt C., Simank H.G. y Richter W. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J. Bone Miner. Res.* 2005; 20(11):2028-35.
- Gerber H.P., Hillan K.J., Ryan A.M., Kowalski J., Keller G.A., Rangell L., Wright B.D., Radtke F., Aguet M. y Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; 126(6):1149-59.
- Gerber H.P. y Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc. Med.* 2000; 10(5):223-8.

- Gerstenfeld L.C., Cullinane D.M., Barnes G.L., Graves D.T. y Einhorn T.A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* 2003; 88:873-84.
- Giannoudis P.V. y Pountos I. Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Injury* 2005; 36 (suppl. 4):S2–5.
- Giannoudis P.V. y Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7. The UK perspective. *Injury* 2005; 36S:S47–S50.
- Ginebra M.P., Traykova T. y Planell J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J. Control. Rel.* 2006; 113:102-10.
- Grayson A.C., Voskerician G., Lynn A., Anderson J.M., Cima M.J. y Langer R. Differential degradation rates in vivo and in vitro of biocompatible poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) homo- and copolymers for a polymeric drug-delivery microchip. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2004; 15(10): 1281-304.
- Haidar Z.S., Hamdy R.C. y Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol. Lett.* 2009; 31:1825-35.
- Haigh J.J., Gerber H.P., Ferrara N. y Wagner E.F. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 2000; 127(7):1445-53.
- Hench L.L. Genetic design of bioactive glass. *J. Eur. Ceramic Soc.* 2009; 29: 1257–65.
- Hernández A., Sánchez E., Soriano I., Reyes R., Delgado A. y Évora C. Material-related effects of BMP-2 delivery systems on bone regeneration. *Acta Biomater.* 2012; 8 (2):781–91.
- Hoffman M.P., Mohammed A.R., Perrie Y., Gbureck U. y Barralet J.E. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. *Acta Biomater.* 2009; 5:43-9.

- Hu J.J., Jin D., Quan D.P., Zhong S.Z., Chen J.H., Wei K.H., Zhao J. y Pei G.X. Bone defect repair with a new tissue-engineered bone carrying bone morphogenetic protein in rabbits. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005; 25(11):1369-74.
- Huang Z., Ren P-G, Ma T., Smith R.L. y Goodman S.B. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine* 2010; 51:305–10.
- Hutchinson F.G. y Furr B.J. Biodegradable polymers for peptides and proteins. In: *Drug Carrier Systems*. Roerdik and Kroon editors. 1989; pp: 111-29.
- Ikenaga M., Hardouin P., Lemaitre J., Andrianjatovo H. y Flautre B. Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 40:139-44.
- Ishikawa K., Takagi S., Chow L., Ishikawa Y., Eanes E. y Asaoka K. Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma *in vitro*. *Dent. Mater.* 1994; 10:26-32.
- Itoh K., Udagawa N., Katagiri T., Iemura S., Ueno N., Yasuda H., Higashio K., Quinn J.M., Gillespie M.T., Martin T.J., Suda T. y Takahashi N. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology* 2001; 142:3656-62.
- Jeon O., Song S.J., Yang H.S., Bhang S-H., Kang S-W., Sung M.A., Lee J.H. y Kim B-S. Longterm delivery enhances *in vivo* osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 369:774-80.
- Johnson E.E., Urist M.R. y Finerman G.A.M. Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of a composite of human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed, antigen-extracted, allogeneic (AAA) bone. *Clin. Orthop. Relat.* 1992; 277:229-37.

- Kanczler J.M., Ginty P.J., White L., Clarke N.M., Howdle S.M., Shakesheff K.M. y Oreffo R.O. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 2010; 31(6):1242-50.
- Kempen D.H., Lu L., Heijink A., Hefferan T.E., Creemers L.B., Maran A., Yaszemski M.J. y Dhert W.J. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 2009; 30(14):2816-25.
- Kim S., Kim S.S., Lee S.H., Ahn S.E., Gwak S.J., Song J.H., Kim B.S. y Chung H.M. *In vivo* bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)/hydroxy-apatite composite scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29:1043-53.
- Kim S.S., Gwak S.J. y Kim B.S. Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008; 87-A: 245-53.
- Kimelman N., Pelled G., Helm G.A., Huard J., Schwarz E.M. y Gazit D. Gene- and stem- cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng.* 2007; 13:1135-50.
- Klammert U., Ignatius A., Wolfram U., Reuther T. y Gbureck U. *In vivo* degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta Biomater.* 2011; 7(9):3469-75.
- Klein C.P., de Groot K., Driessen A.A. y Van der Lubbe H.B. Interaction of biodegradable beta-whitlockite ceramics with bone tissue: an *in vivo* study. *Biomaterials* 1985; 6:189-92.
- Kokubo S., Fujimoto R., Yokota S., Fukushima S., Nozaki K., Takahashi K. y Miyata K. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials* 2003; 24(9):1643-51.
- Kolambkar Y.M., Dupont K.M., Boerckel J.D., Huebsch N., Mooney D.J., Hutmacher D.W. y Guldberg R.E. An alginate-based hybrid

system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 2011; 32:65-74.

- Kontny M.J. y Zografi G. Sorption of water by solids. In: H.G. Brittain editors. *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. 1995; New York: Marcel Dekker.
- Lane J.M. y Sandhu H.S. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop. Clin. North Am.* 1987; 18(2): 213-25.
- Lee K., Silva E.A. y Mooney D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface* 2011; 8(55):153-70.
- Lemaitre J. Injectable calcium phosphate hydraulic cements: new developments and potential applications. *Innovations in Tech. Biol. Med.* 1995; 16:109-20.
- Liang G., Yang Y., Oh S., Ong J.L., Zheng C., Ran J. y Yin G., Zhou D. Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous $\text{Ca}_2\text{-tricalcium phosphate}$ in mice. *Biomaterials* 2005; 26:4265-71.
- Lieberman H., Togawa D. y Kayanja M.M. Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. *Spine J.* 2005; 5:305S-316S.
- Lieberman J.R., Daluiski A. y Einhorn T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 2002; 84: 1032-44.
- Link D.P., Van den Dolder J., Van den Beucken J.J., Wolke J.G., Mikos A.G. y Jansen J.A. Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF-beta1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials* 2008; 29(6):675-82.
- Lissenberg-Thunnissen S.N., de Gorter D.J., Sier C.F. y Schipper I.B. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int. Orthop.* 2011; 35(9):1271-80.
- Lu H., Kraut D., Gerstenfeld L. y Graves D. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors

- that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2003; 144:346–52.
- Lu L., Peter S.J., Lyman M.D., Lai H.L., Leite S.M., Tamada J.A., Uyama S., Vacanti J.P., Langer R. y Mikos A.G. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly (DLlactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials* 2000; 21:1837-45.
 - Lucarelli E., Donati D., Cenacchi A. y Fornasari P.M. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus. Apher. Sci.* 2004; 30(2):169-74.
 - Mankin H.J. y Gebhardt M.C. Long term results of allograft replacement in the management of bone tumours. *Clin. Orthop.* 1996; 324:86-97.
 - Mayer M., Hollinger J., Ron E. y Wozney J. Maxillary alveolar cleft repair in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a polymer carrier. *Plast. Reconstr. Surg.* 1996; 98(2): 247-59.
 - Miller R.A., Brady J.M. y Cutright D.E. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J. Biomed. Mater. Res.* 1977; 11:711-9.
 - Nihouannen D.Le, Hacking S.A., Gbureck U., Komarova S.V. y Barralet J.E. The use of RANKL-coated brushite cement to stimulate bone remodeling. *Biomaterials* 2008; 29:3253-9.
 - Nilsson M., Fernandez E., Sarda S., Lidgren L. y Planell J.A. Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 61:600-7.
 - Oest M.E., Dupont K.M., Kong H.J., Mooney D.J. y Guldborg R.E. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *J. Orthop. Res.* 2007; 25:941-50.
 - Pape H.C., Evans A. y Kobbe P. Autologous bone graft: properties and techniques. *J. Orthop. Trauma.* 2010; 24 Suppl 1: S36-40.

- Patel Z.S., Young S., Tabata Y., Jansen J.A., Wong M.E.K. y Mikos A.G. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 2008; 43:931-40.
- Penel G., Leroy N., Van Landuyt P., Flautre B., Hardouin P., Lemaître J. y Leroy G. Raman microspectrometry studies of bruhsite cement: *in vivo* evolution in a sheep model. *Bone* 1999; 25:81S-84S.
- Peng H., Usas A., Olshanski A., Ho A.M., Gearhart B., Cooper G.M. y Huard J. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 2005; 20(11):2017-27.
- Peng H., Wright V., Usas A., Gearhart B., Shen H.C., Cummins J. y Huard J. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J. Clin. Invest.* 2002; 110(6):751-9.
- Perry C. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin. Orthop. Res.* 1999; 360:71–86.
- Phillips A.M. Overview of the fracture healing cascade. *Injury, Int. J. Care Injured* 2005; 36S: S5-S7.
- Pufe T., Wildemann B., Petersen W., Mentlein R., Raschke M. y Schmidmaier G. Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res.* 2002; 309(3):387-92.
- Quarto R., Thomas D. y Liang C. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56:123–9.
- Raisz L. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999; 45:1353–8
- Reddi A.H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J. Bone Joint. Surg. [Am]* 2001; 83- A(Suppl. 1):1-6.

- Reyes R., De la Riva B., Delgado A., Hernández A., Sánchez E. y Evora C. Effect of triple growth factor controlled delivery by a brushite–PLGA system on a bone defect. *Injury, Int. J. Care Injured* 43 (2012) 334-42.
- Roldán J.C., Detsch R., Schaefer S., Chang E., Kelantan M., Weiss W., Reichert T.E. Gurtner G.C. y Deisinger U. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2010; 38:423-30.
- Rossant J. y Howard L. Signaling pathways in vascular development. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2002; 18:541-73.
- Saito A., Suzuki Y., Ogata S., Ohtsuki C. y Tanihara M. Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2005a; 72(1): 77-82.
- Saito N., Murakami N., Takahashi J., Horiuchi H., Ota H., Kato H., Okada T., Nozaki K. y Takaoka K. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005b; 57(7):1037-48.
- Sánchez E., Baro M., Soriano I., Perera A. y Evora C. *In vivo-in vitro* study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. *Eur.J. Pharm. Biopharm.* 2001; 52(2):151-8.
- Schilling F.A., Linhart W., Filke S., Gebauer M., Schinke T., Rueger, M. y Amling J. M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 2004; 25:3963-72.
- Schmid J., Wallkamm B., Hammerle C.H., Gogolewski S. y Lang N.P. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin.Oral Implants Res.* 1997; 8:244-8.
- Seeherman H. y Wozney J.M. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopaedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16:329-45.
- Shimazu C., Hara T., Kinuta Y., Moriva K., Maruo Y., Hanada S. y Minagi S. Enhanced vertical alveolar bone augmentation by

recombinant human bone morphogenetic protein-2 with a carrier in rats. *J. Oral Rehabil.* 2006; 33(8): 609-18.

- Simonds R.J., Holmberg S.D., Hurwitz R.L., Coleman T.R., Bottenfield S., Conley L.J., Kohlenberg S.H., Castro K.G., Dahan B.A. y Schable C.A. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a sero-negative organ and tissue donor. *N. Engl.J. Med.* 1992; 326 (11): 726-32.
- Stavropoulos A., Kostopoulos L., Nyengaard J. R. y Karting T. Fate of bone formed by guided tissue regeneration with or without grafting of Bio-Oss or Biogran. An experimental study in the rat. *J. Clin. Periodontol.* 2004; 31:30-9.
- Street J., Bao M., deGuzman L., Bunting S., Peale F.V. Jr, Ferrara N., Steinmetz H., Hoeffel J., Cleland J.L., Daugherty A., van Bruggen N., Redmond H.P., Carano R.A. y Filvaroff E.H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(15):9656-61.
- Tamimi F., Kumarasami B., Doillon C., Gbureck U., Le Nihouannen D., Cabarcos E. y Barralet J.E. Brushite-collagen composites for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2008; 4(5):1315-21.
- Tamimi F., Torres J., Lopez-Cabarcos E., Bassett D.C., Habibovic P., Luceron E. y Barralet J.E. Minimally invasive maxillofacial vertical bone augmentation using brushite based cements. *Biomaterials* 2009; 30(2):208-16.
- Tamimi-Mariño F., Mastio J., Rueda C., Blanco L. y López-Cabarcos E. Increase of the final setting time of brushite cements by using chondroitin 4-sulfate and silica gel. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007; 18(6):1195-201.
- Tammela T., Enholm B., Alitalo K. y Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65(3):550-63.
- Tayalia P. y Mooney D.J. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv. Mater.* 2009; 21(32-33):3269-85.

- Termaat M.F., Den Boer F.C., Bakker F.C., Patka P. y Haarman H.J. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2005; 87(6):1367-78.
- Theiss F., Apelt D., Brand B., Kutter A., Zlinszky K., Bohner M., Matter S., Frei C., Auer J.A. y von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005; 26:4383-94.
- Trisi P., Rao W., Rebaudi A. y Fiore P. Histologic effect of pure-phase beta tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 2003; 23:69-77.
- Uchida S., Sakai A., Kudo H., Otomo H., Watanuki M., Tanaka M., Nagashima M. y Nakamura T. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 2003; 32: 491-501.
- Udagawa N. Mechanisms involved in bone resorption. *Biogerontology* 2002; 3:79-83.
- Urist M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.
- Wasburn E.W. Note on a Method of Determining the Distribution of Pore Sizes in a Porous Material. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1921; 7:115-6.
- Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M. y Wang E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242:1528-34.
- Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J. y Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407(6801):242-8.

- Yaszemski M.J., Payne R.G., Hayes W.C., Langer R. y Mikos A.G. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 1996; 17(2):175-85.
- Yoon J.J. y Park T.G. Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J.Biomed Mater Res.* 2001; 55(3):401-8.
- Young S., Patel Z.S., Kretlow J.D., Murphy M.B., Mountziaris P.M., Baggett L.S., Ueda H., Tabata Y., Jansen J.A., Wong M. y Mikos A.G. Dose Effect of Dual Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Bone Regeneration in a Rat Critical-Size Defect Model. *Tissue Engineering: Part A* 2009; 15: 2347-62.
- Zheng Y.X., Zhao H.Y., Jing X.B., Qin Q.L., Gu J.J., Tian N. y Huang D.P. Reconstruction of orbital floor defect with polylactideglycolide acid/recombinant human bone morphogenetic protein 2 compound implanted material in sheep. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2006; 42(6): 535-9.
- Zelzer E., McLean W., Ng Y.S., Fukai N., Reginato A.M., Lovejoy S., D'Amore P.A. y Olsen B.R. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002; 129(8):1893-904.

ANEXOS

ANEXO 1



Material-related effects of BMP-2 delivery systems on bone regeneration

Antonio Hernández^{a,c}, Esther Sánchez^{a,b}, Isabel Soriano^a, Ricardo Reyes^{a,b}, Araceli Delgado^{a,b}, Carmen Évora^{a,b,*}

^a Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Spain

^b Institute of Biomedical Technology, Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Spain

^c Traumatology Service, Hospital Ramón y Cajal, Santa Cruz de Tenerife, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2011
Received in revised form 3 October 2011
Accepted 6 October 2011
Available online 13 October 2011

Keywords:

Brushite
Poly(lactic-co-glycolic acid)
Delivery system
Bone regeneration
Bone morphogenetic protein-2

ABSTRACT

Material-related effects of a brushite and a PLGA controlled release system loaded with two distinct doses of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (3.5 and 17.5 µg), pre-encapsulated in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), were investigated in an intramedullary femur defect model in rabbits. The systems were characterized *in vitro* and *in vivo* over 12 weeks in terms of morphology, release kinetics, porosity, molecular weight, and composition using scanning electron microscopy, mercury porosimetry, radioactivity counting, X-ray diffractometry, differential scanning calorimetry, and gel permeation chromatography. During the experimental period the investigated systems underwent significant changes *in vitro* as well as *in vivo*. It should be stressed that the two *in vitro* release patterns were similar, however *in vivo* parallel profiles were observed with a higher burst effect for BMP-2 in the PLGA system. The PLGA system degraded and disintegrated significantly faster than the brushite system, which suffered slowly progressing external erosion and, additionally, material resorption by osteoclasts *in vivo*. The consequences of this were reflected in the degree of bone regeneration. Although a sustained delivery of BMP-2 was achieved with both systems, the brushite construct, independent of the loaded growth factor dose, failed to consistently induce defect repair, a result attributed to its slow resorption rate. In contrast, the PLGA system resulted in complete regeneration with mature trabecular bone formation 8 weeks after implantation.

© 2011 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The regeneration potential of human bone appears to be limited. Under certain conditions injured bone is not repaired and a replacement material is required. Routine treatment of such cases consists of autogenic or allogenic bone grafting. In general these strategies are associated with problems such as limited sources of donor bone, the risk of disease transmission, graft rejection with a concomitant necessity for secondary surgery, and, finally, high costs. Consequently, alternative strategies to promote bone regeneration have been intensively investigated, applying implantation of bone marrow stem cells or genetically transduced cells which express osteoinductive factors at the damage site [1] or signaling molecules such as growth factors (GF) [2,3]. However, a key component in bone regeneration is the scaffold, which serves as a template for cell interactions and provides structural support to the newly formed tissue. In addition, scaffolds can serve as carriers for pre-seeded cells and as delivery systems for GF, mainly bone

morphogenetic proteins (BMP). Bone tissue repair requires the action of growth factors at the site of injury that stimulate progenitor and inflammatory cell migration and trigger the healing process [4–6]. GF have been included within bioactive scaffolds in various studies to encourage cell adhesion, proliferation and differentiation to promote bone regeneration [3,7]. Precise control over GF signaling through adequate therapeutic concentration levels and time-frames in a local area may potentially favor a complete, well-defined regenerative process [2,8,9]. An ideal system should provide good biocompatibility, porosity, a biodegradation rate commensurate with remodeling and the capability to control sustained GF release. Besides, biomaterials designed for stimulation of osseous regeneration should combine osteogenic, osteoinductive, and osteoconductive properties. A literature analysis confirmed a wide range of three-dimensional bioactive scaffolds that can potentially serve as delivery systems for relevant therapeutic drugs for bone repair [10–12]. However, ceramics, polymers and their composites basically make up the majority of materials in use.

In the present study two synthetic materials have been used to fabricate two different porous BMP-2 loaded systems, a PLGA copolymer and a brushite cement.

Poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), and their copolymer (PLGA), possess excellent biocompatibility and

* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Spain. Tel.: +34 922 318957; fax: +34 922 318506.

E-mail address: cevora@ull.es (C. Évora).

biodegradability and have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) as sutures, vascular grafts, drug carriers, and scaffolds for tissue engineering [13]. The degradation rate of these polymers after fulfilling their function in the body are decisive aspects of their suitability. Crucial parameters for this phenomenon are, among others, the degree of crystallinity, molar mass, porosity, pH, and environmental conditions, and in the case of copolymers the glycolide/lactide ratio [14].

Calcium phosphate compounds, on the other hand, are already well established as bone substitute materials in clinical applications. A major requirement for them is that they should be resorbed and gradually replaced by newly formed bone; the material itself should be biodegradable through either cell-related events or as a result of the surrounding milieu [15]. However, the exact mechanisms of scaffold biodegradation have only been partially clarified and the conclusions are often contradictory. Some studies showed that calcium phosphate- and hydroxyapatite (HA)-based materials, such as bioactive glasses and tricalcium phosphate (TCP), degrade mainly by physico-chemical dissolution, with osteoclasts playing only a minor role [16]. In contrast, other authors have reported that scaffold biodegradation occurred mainly as a result of osteoclast activity [16,17]. The latter mechanism of biodegradation is to be preferred, since physiological bone remodeling depends on material resorption by osteoclasts and subsequent replacement by newly formed bone through osteoblast activity.

Brushite exhibits a higher resorption rate *in vivo* than HA materials, allowing simultaneous material resorption and bone formation [5,6]. Under physiological conditions brushite is more soluble than HA and, consequently, has been shown to be resorbed to a higher degree following implantation in animals [18,19]. According to some *in vitro* studies [17,20] cement resorption occurred through dissolution, resulting in cement disintegration and particle formation and, finally, phagocytosis of the cement particles by macrophages and osteoclasts.

The aim of the present study was to compare the osteogenic effect of two three-dimensional bioactive scaffolds fabricated from a bioresorbable calcium phosphate (brushite) and a biodegradable polymer (PLGA). The constructs were tested alone or loaded with two doses of BMP-2 pre-encapsulated in PLGA microspheres to control protein release patterns. Bone regeneration was quantified in an intramedullary defect in rabbit femurs.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of systems

The systems consisted of PLGA (Resomer[®] RG504, Boehringer-Ingelheim, Germany) microspheres containing BMP-2 (Biomedical Life Sciences, Sevilla, Spain) which were incorporated into two types of scaffold, solid porous PLGA and brushite cylinders.

2.1.1. PLGA microsphere fabrication

The BMP-2-containing microspheres were prepared using a double emulsion (water/oil/water) process. Briefly, the first emulsion was made by vortexing 200 μ l of a BMP-2 (180 μ g) solution in 0.07% poly(vinyl alcohol) (PVA) with 2 ml of a PLGA methylene chloride solution (50 mg ml⁻¹). Then it was poured into a 0.1% PVA solution under constant stirring (1.5 h), and the resulting microspheres were lyophilized. Batches for release assay and growth factor incorporation were prepared with ¹²⁵I-BMP-2 (Perkin-Elmer, Boston, MA), added as a tracer together with the pure protein.

2.1.2. Porous PLGA system fabrication by gas foaming in acidic aqueous solution

A modification of a previously described method was used to prepare the porous PLGA rods [21]. First, 750 mg of PLGA (Resomer RG[®] 504) dissolved in 4 ml of acetone were mixed with 750 mg of ammonium bicarbonate salt particles. To obtain a workable paste the mix was kept at 40 °C for partial elimination of the organic solvent. Scaffolds were prepared by filling one face open polyethylene syringes (5 mm internal diameter) with the polymer paste. To create a central reservoir a 3.5 mm diameter stainless steel wire was introduced in the middle of the cylinder. The cylinder and wire were plunged out together and transferred to a 40% aqueous citric acid solution to induce gas foaming, as well as salt leaching, within the polymer/salt matrices. After 24 h incubation at room temperature under slow orbital shaking at 50 r.p.m. (POS-300 orbital shaking platform, Grant-Bio, NJ) the wire was taken out and the cylinders kept in fresh acid solution for three more days to ensure complete dissolution of the porogen. Then the cylinders were rinsed with Milli-Q water and cut into 1 cm pieces. They were immersed for a further 24 h in phosphate-buffered saline (PBS), checked for pH, rinsed again with water and freeze-dried. The cylinders were filled with 20 (17.5 μ g) or 4 mg (3.5 μ g) of BMP-2-loaded PLGA microspheres, made up to 30 mg with blank microspheres. The open ends of the scaffolds were covered with a 2 mm film of PLGA paste in acetone.

Ammonium bicarbonate salt particles were pulverized, sieved and the particle size was measured in acetone (Mastersizer 2000 with Hydro 2000 SM, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). The volume diameter (μ m) distribution was <54.1 (10%), <165.5 (50%) and <345.8 (90%).

2.1.3. Preparation of the brushite system

The brushite system was made as previously described [22,23]. First, 1.428 g of β -tricalcium phosphate (β -TCP, Fluka, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 0.8 g of monocalcium phosphate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were mixed with 0.012 g of the chemical retardant, sodium pyrophosphate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The cement was prepared by mixing 200 mg of the solid phase with 100 μ l of 0.5 M citric acid solution using a mixer (Headolph Reax) for 30 s. To prepare the implants one face open polyethylene cylinders (internal diameter 5 mm) were filled with the cement paste and left to harden at room temperature for 1 h. The implants were kept at 4 °C for 12 h before use. The setting temperature was approximately 20 °C.

20 mg (17.5 μ g) or 4 mg (3.5 μ g) of BMP-2-loaded PLGA microspheres made up to 20 mg with blank microspheres were included in the solid phase.

2.2. System characterization

2.2.1. BMP-2 loading

The encapsulation efficiency of BMP-2 microspheres was determined by measuring the radioactivity levels in three aliquots using a gamma counter (Cobra[®] II, Packard, Meriden, CT). To determine total BMP-2 loading the radioactivity in each manufactured system was counted.

2.2.2. *In vitro* release experiments

The *in vitro* release assays were carried out in 3 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) and 0.02% sodium azide at 37 °C, in a 5% CO₂ atmosphere and at a relative humidity of 95%, under slow orbital shaking of 100 r.p.m. (Orbital shaking platform POS-300, Grant-Bio). The amount of released BMP-2 was calculated by measuring sample radioactivity at each time point. The radiolabeling stability of

^{125}I -BMP-2 in the release medium was checked by thin layer chromatography (TLC) in silica gel (60 F₂₅₄, Merck-España, Madrid, Spain) with 85% methanol in water, as previously described [24].

2.2.3. Water uptake and mass loss

Systems were incubated in 2 ml of DMEM under the same conditions as in the *in vitro* release assays (Section 2.2.2). Water uptake and weight loss were determined gravimetrically. At specific time points three samples of each formulation were withdrawn, blotting away excess water, and weighed. The systems were freeze-dried and the final weight recorded. The percentage water uptake and mass loss were calculated using Eqs. (1) and (2), respectively:

$$\text{Water uptake (\%)} = [(W_w - W_d)/W_d] \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Mass loss (\%)} = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad (2)$$

where W_w is the wet weight of the swollen sample at time t , W_d is the weight of the dried sample at time t and W_0 is the initial weight of the sample [24].

2.2.4. Scanning electron microscopy (SEM)

The PLGA and brushite systems and cross-sections through them were analyzed by SEM (JEOL JSM-6300) at 20 keV. The dried samples were coated with gold–palladium under an argon atmosphere. SEM photomicrographs were used for scaffold morphology and microstructure evaluation before and during incubation in the *in vitro* release medium. Mean pore size of the PLGA system was determined in 400 pores using the SEM images.

2.2.5. Mercury porosimetry

Pore diameter distribution and porosity of the brushite system before and during incubation in the *in vitro* release medium were assessed by means of a mercury intrusion porosimeter (Autopore IV 9500, Micromeritics Instrument Co.). Determination of the pore size was based on the relationship between the applied pressure and the diameter of the pores into which mercury intrudes, according to the Washburn equation [25]:

$$D = (-4\gamma \cos \theta)/P$$

where P is the applied pressure (0.5–58,000 psia), D is the pore diameter, γ is the surface tension of mercury (484 dyne cm^{-1}), and θ is the contact angle between mercury and the pore wall (141°).

2.2.6. Gel permeation chromatography (GPC) and differential scanning calorimetry (DSC)

DSC and GPC were applied to study the polymer properties of the PLGA scaffolds after fabrication and during the *in vitro* experiment. The glass transition temperature (T_g) was determined by DSC (DSC 821°, Mettler Toledo). The temperature was scanned from 10 to 250 °C at a heating rate of 10 °C min^{-1} in a nitrogen atmosphere. The average molecular weights and polydispersity (pd) of the PLGA scaffolds dissolved in tetrahydrofuran (THF) (Merck) and filtered (0.45 μm GHP Acrodisc® syringe filters, PALL, Madrid, Spain) were determined by GPC using a Waters® chromatograph. The system was equipped with a model 515 pump, Rheodyne injector, model 2414 refractive index detector, an oven for the columns, and Waters Breeze GPC software for data acquisition. The GPC conditions were as follows: three columns (Styragel® HR4, HR3, and HR1, Waters Corp.), oven temperature 31 °C, and THF flow rate 0.9 ml min^{-1} .

2.2.7. X-ray diffraction measurement

X-ray diffraction (XRD) analyses of brushite implants were carried out before and during the *in vitro* assay with a Phillips X'pert

automated diffractometer using $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Patterns for phase identification were collected with a scanning step of 0.02° in 2θ over the angular range $5 < 2\theta \leq 80^\circ$ with a scan speed of 0.01° s^{-1} (2 s per step). The Bragg peak position of mineral brushite, $\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (HA) were identified using the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) reference data Nos. 16132 and 24-003, respectively.

2.3. Animal experiments

All the experiments were carried out in conformity with the Guidelines on Care and Use of Animals in Experimental Procedures (directive 2010/63/EU and Spanish directive R.D.1201/2005). The animal experiments had prior approval by the local committee of the University of La Laguna and were carried out under aseptic conditions. The number of animals used in each group of *in vivo* experiment is given in Table 1.

2.3.1. Surgical procedure: bone defect

Surgery to create the bone defect was performed as previously described [26]. Briefly, male New Zealand rabbits (3–4 kg) were anesthetized intramuscularly with ketamine (35 mg kg^{-1}) and xylazine (5 mg kg^{-1}) and their right hind legs shaved and disinfected. A subcutaneous (s.c.) dose of antibiotic (5–15 mg kg^{-1} Enrofloxacin, Alsir®) for prophylaxis and of the analgesic buprenorphine (0.05–0.1 mg kg^{-1} Buprex®) were administered 30 min before the intervention. A vertical external parapatellar incision was made in the knee. Then the patellar tendon and quadriceps were displaced to allow access to the femoral condyles. A hole in the intercondylar space was made with a 6 mm dental burr to reach the medullar cavity. The scaffold was inserted in the damaged femur and the patella and patellar tendon were reduced. The surgical wound was closed with stitches and disinfected. A 2–5 mg kg^{-1} s.c. dose of the anti-inflammatory analgesic ketoprofen, to guarantee an overnight effect, and thereafter buprenorphine (every 12 h for 72 h) were administered. After recovery from the surgery (20–30 min) the animals were allowed free movement, food and water.

2.3.2. *In vivo* release assays

The release experiments were carried out with two groups of five rabbits each (Table 1). One group was implanted with PLGA cylinders containing ^{125}I -BMP-2/BMP-2-loaded microspheres and

Table 1
Experimental animal groups.

Group	Animals	Commentaries
<i>Release assays</i>		
BMP-PLGA	5	^{125}I -BMP-2/BMP-2 in microsphere-loaded PLGA system
BMP-brushite	5	^{125}I -BMP-2/BMP-2 in microsphere-loaded brushite system
<i>Histological analyses</i>		
C (control)	12	Empty defect
B-PLGA ^a	12	Blank microsphere-loaded PLGA system
B-brushite ^a	12	Blank microsphere-loaded brushite system
BMP-3.5 PLGA	12	3.5 μg BMP-2 in microsphere-loaded PLGA system
BMP-17.5 PLGA	12	17.5 μg BMP-2 in microsphere-loaded PLGA system
BMP-3.5 brushite	12	3.5 μg BMP-2 in microsphere-loaded brushite system
BMP-17.5 brushite	12	17.5 μg BMP-2 in microsphere-loaded brushite system

^a One implant was introduced into each femur. The right leg was used for histological analysis. The system in the left leg was extracted for later characterization.

the other one with brushite implants containing ^{125}I -BMP-2/BMP-2-loaded microspheres.

The BMP-2 release kinetics from the scaffolds inside the femur defects were followed by a non-invasive method as previously described and validated [27]. The non-invasive method permitted periodic assessment of the remaining ^{125}I -BMP-2 at the defect site using an external probe-type gamma counter (Captus[®], Nuclear Iberica). Briefly, the detector was focused on the femur area with the implanted scaffold. At each sampling time point five 1 min readings were taken at the ^{125}I emission peak (maximum 27 keV) and the mean taken as the remaining radioactivity. Measurement at time point 0 was considered the total administered dose (100%).

In order to determine the BMP-2 systemic distribution a blood sample was extracted from the marginal vein of each rabbit ear at each sampling time point and the radioactivity determined with a well-type gamma counter (Cobra[®] II, Packard).

2.3.3. Evolution of system characteristics after implantation

These experiments were carried out with two groups of 12 rabbits each, one group receiving the blank PLGA system and the other one the blank brushite system (Table 1). At 2, 4, 8 and 12 weeks three rabbits were killed, the femurs extracted and the implants removed.

The brushite systems were analyzed by SEM, XDR and mercury porosimetry, while the PLGA systems were studied by SEM, GPC and DSC. Procedures were performed as described above.

2.3.4. Histological, immunohistochemical and histomorphometrical evaluation

To determine the degree of bone defect regeneration upon BMP-2 release from the two systems seven groups of 12 animals each were assigned for histological examination (Table 1).

Defect containing femurs from three animals per experimental group were prepared for histological evaluation 2, 4, 8 and 12 weeks post-implantation. The samples were fixed in 10% formalin solution (pH 7.4), decalcified in 10% formic acid solution, dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in Paraplast[®] highly purified paraffin for tissue embedding. Longitudinal microtome (Shandon Finesse 325) sections 3–5 μm thick were prepared from all parts of the defect site. The sections were stained with haematoxylin–eosin, Cleveland–Rucker–Wolfe and Masson's trichrome to identify new bone formation. The sections were inspected with a Leica DM 4000B light microscope. For histomorphometrical analysis all sections for each specimen were evaluated using computer-based image analysis software (Q-win V3 Pro-image analysis system, Leica, Barcelona, Spain). Quantitative evaluation of new bone formation was carried out by determining a region of interest (ROI), defined as the tissue within the defect site to the periphery delineated by the host bone. This ROI was set as a rectangle of 6 × 5.5 mm positioned in the superior half of the defect, the region corresponding to the epiphysis, where new bone formation and osteointegration are best evaluated. New bone formation, distinguished from the implant by structure and color differences, was quantified from six neighboring sections, by selecting a fixed threshold for positive staining (green for Masson's trichrome and blue for Cleveland–Rucker–Wolfe) and calculating the positive pixel area. New bone formation was expressed in mm^2 , using standardization of the two-dimensional area of analysis.

Contact zones between bone and implant were evaluated by defining the percentage of the implant perimeter in direct contact with bone tissue without any intervening soft tissue layer. Degradation of the PLGA and brushite scaffolds was determined by calculating the remaining surface area of the implants. The remaining scaffold was expressed as a percentage of the initial implant surface.

For immunohistochemical analysis sections were deparaffined and rehydrated in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4, 0.01 M Trizma base, 0.04 M Tris hydrochloride, 0.15 M NaCl), which was used for all further incubations and rinse steps. Sections were incubated in citrate buffer (pH 6) at 90 °C for antigen retrieval, followed by incubation in 0.3% hydrogen peroxide in TBS buffer for 20 min. After a rinse step, sections were blocked with 2% FBS in TBS–0.2% Triton X-100 (blocking buffer). The indirect immunohistochemical procedure was carried out by incubating the sections with osteocalcin antiserum (1/100) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer overnight at 4 °C. Sections were rinsed three times, then incubated with biotin-SP-conjugated donkey anti-rabbit F(ab') fragment (1/200) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer for 1 h followed, after another rinse step, by incubation in peroxidase-conjugated streptavidin (1/300) (Millipore, Barcelona, Spain) for 1 h. Peroxidase activity was revealed in Tris–HCl buffer (0.05 M, pH 7.6) containing 0.04% of 4-chloro-1-naphthol (Sigma, Poole, UK) and 0.01% hydrogen peroxide. Reaction specificity was confirmed by replacing the specific antiserum with normal serum or following pre-absorption of the antiserum with the corresponding antigen. Osteocalcin staining was evaluated using computer-based image analysis software (ImageJ, NIH, Bethesda, MD). Osteocalcin staining was measured by applying a fixed threshold to select for positive staining within the ROI. Positive pixel areas were divided by the total surface size (mm^2) of the ROI. Values were normalized to those measured from blank scaffolds and are reported as relative staining intensities.

Statistical analysis was performed with SPSS software using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey multiple comparison post test. Significance was set at $P < 0.05$. Results are given as means \pm SD.

3. Results

3.1. System characteristics

The microspheres, size determined by laser diffractometry using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments), had the diameter (μm) distribution: 10% <118.9 μm , 50% <202.4 μm and 90% <471.7 μm . The microsphere encapsulation efficiency was $48.5 \pm 4.7\%$.

The PLGA systems were approximately 5.2 ± 0.4 mm in diameter and 10.8 ± 0.5 mm high, with an average weight of 97.9 ± 14.2 mg. The brushite implants were also cylindrical, 4.8 ± 0.4 in diameter and 9.9 ± 1.3 mm high, with an average weight of 248 ± 8.7 mg.

3.2. In vitro and in vivo evolution of system characteristics

The initial structure as well as transformation of the systems were determined throughout the in vitro and in vivo experiments. However, monitoring of most of the PLGA system properties were limited to the first weeks, as later sampling indicated structural damage.

3.2.1. Brushite

The brushite implant porosity, determined by mercury intrusion porosimetry, was 46%, with a unimodal pore size distribution (Fig. 1a). SEM observations revealed a crystalline internal matrix with PLGA microspheres dispersed in it (Fig. 1c). After 12 weeks incubation a slight increase in porosity of about 12% (Fig. 1b) was found. SEM images showed that brushite maintained its structure, however, as the microspheres had degraded only their imprinted shape was discernible (Fig. 1d–f). These results fit well with the 65% water uptake and a mass loss of about 30% assessed

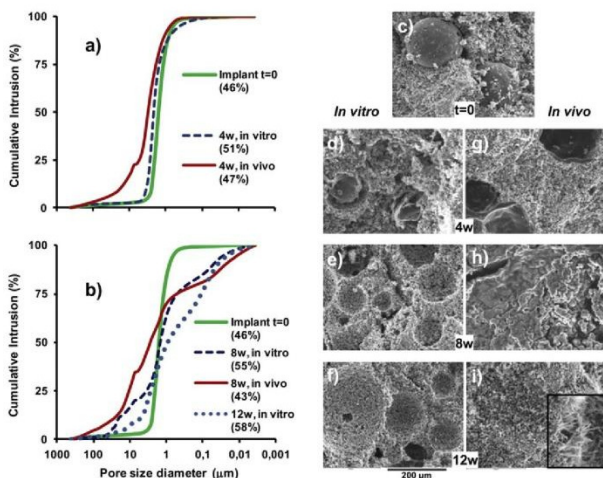


Fig. 1. Evolution of the porosity and internal structure of brushite implants after incubation in DMEM medium (in vitro) and implantation in a rabbit femur defect (in vivo). (Left) Cumulative pore size distribution curves of the initial implants ($t = 0$) and (a) after 4 weeks in vitro and in vivo and (b) 8 weeks in vitro and in vivo, as well as 12 weeks in vitro (in vivo determination was not performed because there was not enough sample). Implant porosities are given in parentheses. (Right) SEM microphotograph showing cross-sectional images of (c) the initial brushite implants and (d–f) after 4, 8 and 12 weeks incubation in vitro or (g–i) after 4, 8 and 12 weeks implantation in vivo.

after 12 weeks incubation. More important structural changes took place in vivo (Fig. 1g–i). After 4 weeks PLGA microspheres were still present (Fig. 1g). Eight-week post-implantation a homogeneous rubbery layer had formed as a result of polymer degradation (Fig. 1h). After 12 weeks this rubbery layer had disappeared and a crystalline structure re-emerged, containing a few whisker-like crystals (Fig. 1i). Porosity did not change throughout 8 weeks after implantation. Twelve-week post-implantation implant size reduction and a strong union with the tissue led to difficulties in the removal of enough implant sample to carry out porosimetry measurements.

Both in vivo and in vitro the pore size distribution gradually changed from initially unimodal to multimodal with a broader pore size distribution (Fig. 1a and b).

The SEM observations were reflected in the XRD analyses. The XRD pattern of brushite did not change throughout the in vitro as well as the in vivo experiments except for 12 weeks

post-implantation (Fig. 2). At this time point a partial transformation of brushite into HA was detected. XRD exhibited high intensity peaks of HA at $2\theta = 26.2^\circ$ and 32.0° , with low intensity peaks of brushite at $2\theta = 11.8^\circ$ and 21.1° , and additionally the presence of an amorphous phase in the range $10\text{--}25^\circ$ (2θ).

3.2.2. PLGA

Pore size in the PLGA cylinders increased markedly from an initial 18.1 ± 12.7 to 60.6 ± 33.9 μm after 1 week and then stabilized during the course of the second week of incubation (Fig. 3). Moreover, PLGA underwent high and continuous water uptake during the 4 weeks of the in vitro experiment, ending at approximately 500%, with a mass loss of 40%. At this time PLGA cylinders had lost their structure and SEM pictures of the rests showed a non-porous film (Fig. 3). In vivo this structural collapse was already apparent 2 weeks post-implantation.

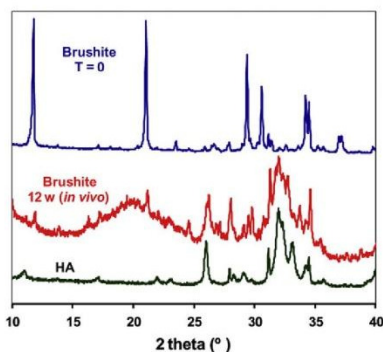


Fig. 2. XRD pattern of brushite cylinders before and 12 weeks after implantation, and XRD pattern of hydroxyapatite (HA).

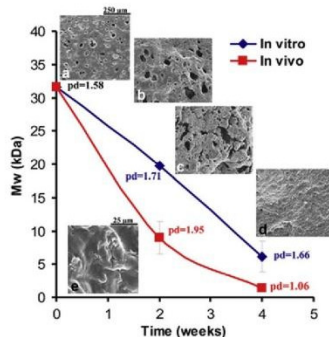


Fig. 3. Evolution of weight average molecular weight (M_w) and polydispersity of PLGA cylinders during incubation in DMEM medium and implantation in a rabbit bone defect. SEM microphotographs of a PLGA cylinder (a) before and (b–d) after incubation in DMEM medium for (b) 1 week, (c) 2 weeks, and (d) 4 weeks, as well as (e) after implantation in the rabbit bone defect for 2 weeks.

The initial weight average molecular weight (M_w) and the polydispersity (pd) of the PLGA (50:50) determined by GPC were 47 kDa and 1.56, respectively. T_g determined by DSC was 50.52 °C. After cylinder manufacture the M_w was reduced to about 31 kDa, T_g to 46.38 °C, while pd did not change. The evolution of the polymer characteristics during the *in vitro* and *in vivo* assays is shown in Fig. 3. The reduction in M_w *in vivo* was faster than *in vitro*, as previously described by Lu et al. [28]. These results are in agreement with the DSC results. After 4 weeks incubation the T_g was reduced to 39.6 °C, whereas *in vivo* the decline was

greater, reaching 28.1 °C. The continuously rising water uptake of PLGA during the release assay is concordant with the increase in its intrinsic hydrophilicity. This behavior is in agreement with the polyester film degradation proposed by Hutchinson and Furr [29]. Absorption of a significant amount of water into the internal structure of an amorphous material has been shown to influence the properties of solids [30]. Thus water with a very low T_g acted as a plasticizer for PLGA, lowering its T_g and inducing transition from a glassy to a rubbery state associated with an increase in water and polymer chain mobility.

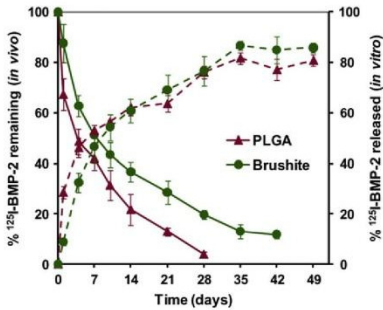


Fig. 4. Percentages of remaining BMP-2 at the implantation site (solid lines) after implantation of the PLGA and brushite cylinders in a rabbit bone defect and cumulative BMP-2 release profiles (dashed lines) obtained from the systems incubated in DMEM.

3.3. Release experiments

3.3.1. *In vitro* assay

The release kinetics for BMP-2 encapsulated within the brushite and PLGA implants were analyzed using ^{125}I -BMP-2. During the first day BMP-2 was released in an initial burst of approximately 30% from the PLGA systems, whereas only 10% of the BMP-2 was released from the brushite implants. Subsequently both formulations released approximately 50% of the encapsulated BMP-2 up to the end of the first week. Then the release rate slowed down to reach approximately 80% release after the fifth week. The release profiles of BMP-2 from both systems could be superimposed (Fig. 4).

About 14–16% free $^{125}\text{I}^-$ was detected at the end of the *in vitro* release assays, indicating good radiolabeling stability.

3.3.2. *In vivo* assay

The remaining ^{125}I -BMP-2 in the PLGA and brushite systems was measured during weeks 4 and 6, respectively, due to the

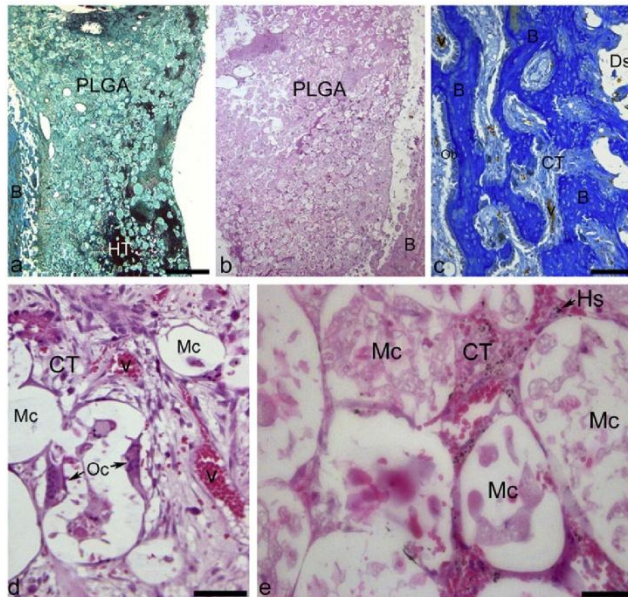


Fig. 5. PLGA system I. Horizontal sections of a rabbit femur at the defect site level in animals of (a) group B-PLGA and (b) group BMP-17.5 PLGA 2 weeks post-implantation, showing the implant structure and new bone tissue in the margins. (c) Detail at high magnification of new bone formation in the margins of the defect site in animals from group BMP-17.5 PLGA. (d) Detail at high magnification of inside the implant structure with connective tissue and blood vessels surrounded by microspheres with osteoclasts inside them (arrows). (e) Detail at high magnification of the PLGA implant showing the internal structure of the microspheres. (a) Masson's Trichrome staining; (b, d, e) haematoxylin–eosin staining; (c) Cleaveland–Wolfe staining. B, bone tissue; Ds, defect site; Ob, osteoblast; Oc, osteoclast; Mc, microspheres; CT, connective tissue; V, blood vessels; HT, haematic tissue; Hs, hemosiderin grains. Scale bars: (a, b) 1 mm; (c) 90 μm ; (d) 50 μm ; (e) 40 μm .

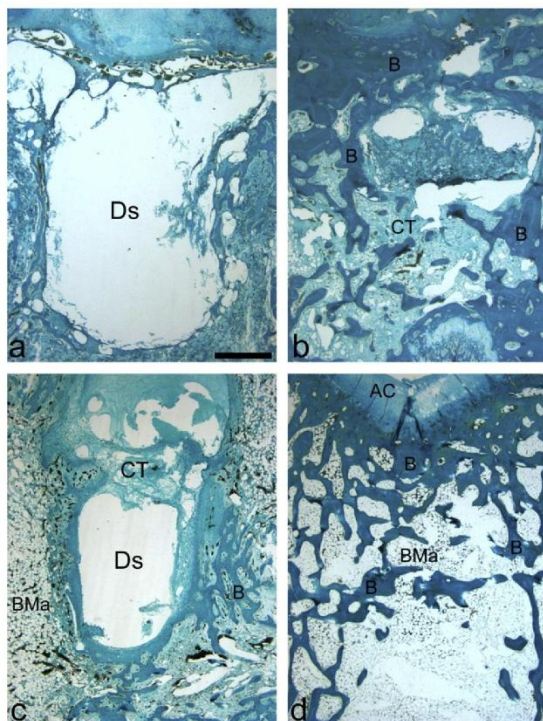


Fig. 6. PLGA system II. Horizontal section of a rabbit femur at the defect site level in animals from (a) group B-PLGA and (b) group BMP-17.5 PLGA 4 weeks post-implantation and from (c) group B-PLGA and (d) group BMP-17.5 PLGA 8 weeks post-implantation. Masson's trichrome staining. AC, articular cartilage; B, bone tissue; BMa, bone marrow; CT, connective tissue; Ds, defect site. Scale bars (a–d) 1.5 mm.

different release rates. BMP-2 was delivered faster from the PLGA cylinders; approximately 30% of the protein was liberated within the first day, compared with about 12% from the brushite implants (Fig. 4). Thereafter approximately 50% and 60% was released from the brushite and PLGA systems, respectively, after 1 week. Then the release profiles maintained quasi-parallel. At the end of the fourth week a total of approximately 95% of the loaded BMP-2 had been liberated from the PLGA cylinders, while only about 80% had been released from the brushite implants.

The *in vivo* release kinetics of BMP-2 from the brushite implants resembled the *in vitro* kinetics, with a slope of the linear correlations of 0.96. In contrast, the slope of the PLGA system was 1.4, due to the slower *in vitro* release rate of BMP-2 during the second phase (after the first week).

The radioactivity levels determined in blood samples always remained around the counter background level.

3.4. Histological and histomorphometrical evaluation

Histological and histomorphometrical analyses were carried out within the ROI.

3.4.1. PLGA implants

Two weeks post-implantation the histological analyses showed some new bone formation at the defect borders in all experimental groups (Fig. 5a–c). Clear signs of inflammatory reaction with abundant hematic tissue were also evident at the borders and inside the

defect (Fig. 5a). At this time point the implant structure was still evident (Fig. 5a and b). Connective tissue and blood vessels were observed surrounding the microspheres within the implants, as well as inside them (Fig. 5d). Microspheres with fragments of PLGA in their interior were also observed (Fig. 5e). Histomorphometrical analysis confirmed no significant differences in new bone formation between the experimental groups at this time point (Fig. 8).

Osteocalcin (Ost) immunoreactivity analyses revealed low relative staining values in concordance with the rate of new bone formation in all groups except for the group BMP-17.5 PLGA, in which a significant increase was detected (Fig. 9).

Four-week post-implantation new bone formation did not differ very much from that observed after 2 weeks except for a significant increase in the group BMP-17.5 PLGA, revealed by histomorphometrical analyses (Fig. 8). At this time point some residues of the implant structure were evident. These appeared as spaces or cavities within the defect site (Fig. 6a and b). No microspheres were detected inside these cavities. Ost immunoreactivity values resembled those at 2 weeks. There was a perfect correlation with the degree of new bone formation at this time point (Fig. 9).

Eight-week post-implantation no significant variation in new bone formation was observed in the control and B-PLGA groups (Fig. 6c). However, a dramatic increase in both BMP-2-treated groups was observed with respect to 4 weeks (Fig. 6d). No other signs of the implant were detected in most of the animals. Ost immunoreactivity analyses gave similar values of relative staining as observed after 4 weeks except for the group BMP-3.5 PLGA, in

which a significant increase was found (Fig. 9). Again, Ost immunoreactivity correlated perfectly with new bone formation rates at this time point (Fig. 9).

Few variations between the results for 8 and 12 weeks post-implantation were observed (Fig. 8), with a good correlation between Ost immunoreactivity and new bone formation (Fig. 9).

3.4.2. Brushite implants

The analyses 2 and 4 weeks post-implantation revealed similar rates of new bone formation in all experimental groups (Fig. 7a–c). No significant differences were detected by histomorphometrical analysis (Fig. 8).

At both time points the implant structure was clearly evident. It appeared largely intact (Fig. 7a–c). Microspheres were observed

inside the implants (Fig. 7a–c). Some bone synthesis was detected in the margins (Fig. 7a–c).

Ost immunoreactivity analyses showed low values of relative staining at both time points, in accordance with the observed rates of new bone formation (Fig. 9).

Eight-week post-implantation the rates of new bone formation detected in the control and B-brushite groups (Fig. 7d) were similar to those observed after 2 and 4 weeks. However, a differential increase was observed in groups treated with BMP-2 (Fig. 7e). This increase was significantly higher in the group BMP-17.5 brushite (Fig. 8). The histological analyses exhibited a more extensive process of new bone synthesis in the margins of the implant compared with the specimens from 4 weeks post-implantation (Fig. 7d and e). Active phagocytosis and tissue infiltration were observed

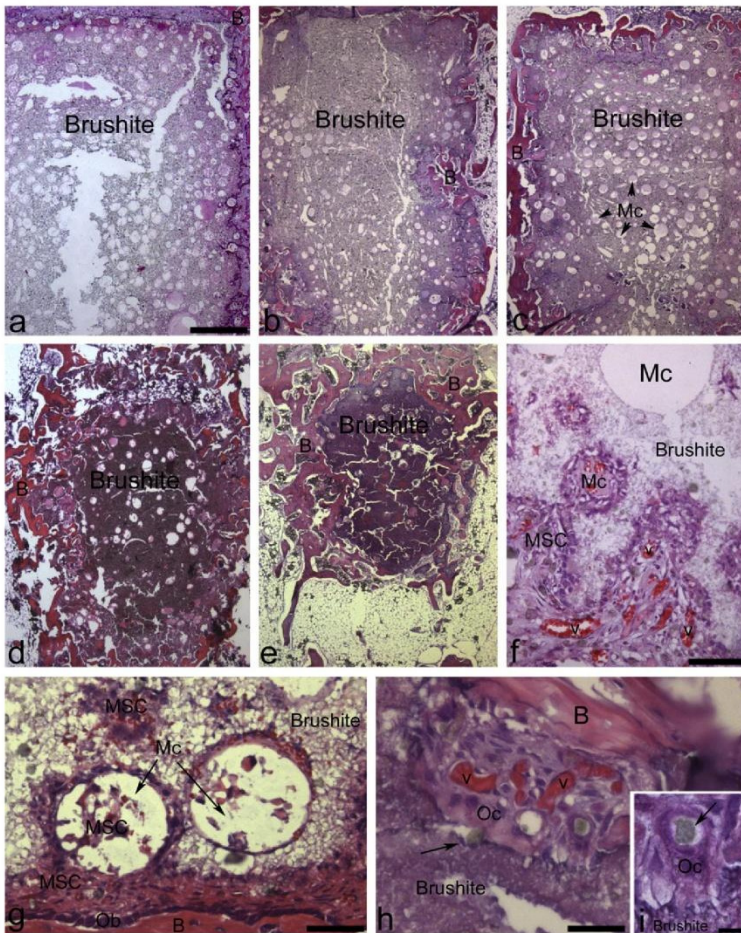


Fig. 7. Brushite system. Horizontal sections of the rabbit femur at the defect site level in animals from (a) group B-brushite, (b) group BMP-3.5 brushite and (c) group BMP-17.5 brushite 4 weeks post-implantation and from (d) group B-brushite and (e) group BMP-17.5 brushite 8 weeks post-implantation. The image from group BMP-17.5 brushite is also representative of the outcome for group BMP-3.5 brushite after 8 weeks. (f, g) Details at high magnification from the group BMP-17.5 brushite implants 8 weeks post-implantation, showing the presence of mesenchymal cells and blood vessels inside the brushite implant. (h) Detail at high magnification from group BMP-17.5 brushite implants 8 weeks post-implantation, showing phagocytic activity (arrow) in the border zones of the brushite implant. (i) Detail of previous images showing a phagocyte with a brushite particle inside the phagosome (arrow). Haematoxylin–eosin staining. B, bone tissue; Mc, microspheres; MSC, mesenchymal cells; Oc, osteoclast; V, blood vessels. Scale bars: (a–e) 1 mm; (f) 130 μ m; (g) 60 μ m; (h) 20 μ m; (i) 5 μ m.

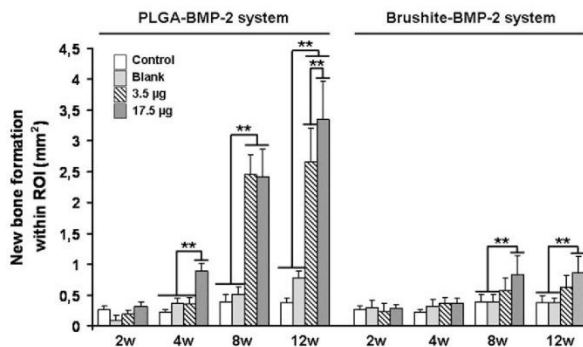


Fig. 8. Bone formation. Bar graph representing the new bone formation rate at different time points of analysis with the PLGA and brushite systems. Bars represent means \pm SD. ** $P < 0.001$.

(Fig. 7f and g), with brushite fragments clearly appreciable inside phagosomes (Fig. 7h and i). At this time point the implant was still

apparent in all animals, but with varying shape as a result of the degradation process (Fig. 7d and e).

The results of the histological and histomorphometrical analyses from 12 weeks post-implantation resembled those from 8 weeks (Fig. 8). Implants were still observable and their shape had hardly changed compared with those from week 8.

Ost immunoreactivity analyses of both BMP-2-treated groups exhibited significantly increased relative staining at 8 and 12 weeks post-implantation. There was a good correlation between the rate of new bone formation and Ost immunoreactivity (Fig. 9).

3.4.3. Histological analysis of system evolution

Scaffold degradation was observed, evident as a loss of the integrity of the implants and as the decline in implant area and concomitant replacement by newly formed bone with time post-implantation. PLGA cylinders were only discernible 2 weeks post-implantation (Table 2). However, the percentage surface area of the brushite implants remained similar for 4 weeks after implantation, from which point on it declined continuously (Table 2). No significant differences between the brushite groups were detected at any time point. In this material a noteworthy increase in bone/implant contact area was observed in both BMP-2-treated groups only 8 and 12 weeks post-implantation (Table 3).

4. Discussion

In this study we examined the material-related effect of two fabricated controlled release systems loaded with two different doses of BMP-2 (3.5 and 17.5 µg) on the repair of a bone defect in an intramedullary rabbit model. Mechanical system properties constitute an important aspect of scaffolds destined for bone regeneration. However, the remodeling ability of bone depends on resorption of the material by osteoclasts and subsequent replacement by newly formed bone through osteoblast activity. Biomaterials with a slow resorption rate interfere with bone

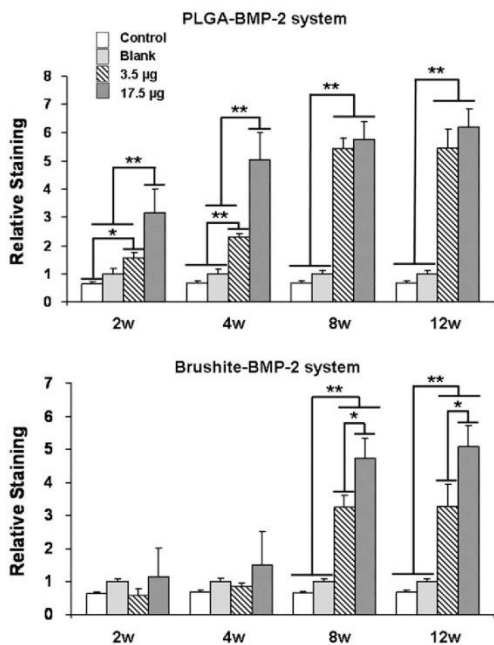


Fig. 9. Osteocalcin expression. Semi-quantitative image analyses of relative osteocalcin staining at different experimental time points. Bars represent means \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

Table 2
Remaining surface area of the PLGA and brushite systems (per cent).

Time (weeks)	PLGA			Brushite		
	Blank	3.5 µg	17.5 µg	Blank	3.5 µg	17.5 µg
2	64 \pm 12	56 \pm 12	56 \pm 14	74 \pm 6	72 \pm 8	64 \pm 8.4
4	72 \pm 12	68 \pm 14	66 \pm 10.8	62.4 \pm 12.8	49.6 \pm 18	46.4 \pm 18.8
8	55.2 \pm 12	42 \pm 15.2	36 \pm 20.8			

Table 3

Bone/brushite system contact areas (per cent).

Time (weeks)	Brushite		
	Blank	3.5 µg	17.5 µg
2	30 ± 12	30 ± 15	32 ± 16.5
4	33 ± 12.5	35 ± 15	36 ± 18
8	40 ± 24	68 ± 27	65 ± 22.5
12	47 ± 15.5	65.5 ± 20	70 ± 25

growth [31], while biomaterials with a fast resorption rate compromise the stability of the surgery site during the healing process [32,33]. In a previous study PDGF and PDGF/VEGF-loaded brushite–chitosan scaffolds resulted in enhanced bone formation compared with non-loaded implants [9]. Despite brushite resorption being faster than that of most conventional phosphates it may be considered a hard material with a relatively slow resorption rate in comparison with a biodegradable polymer such as PLGA. In the present study we observed that both brushite and PLGA systems without BMP-2 were unable to significantly induce bone formation.

Nonetheless, comparative analyses with BMP-2-loaded systems clearly revealed differences with respect to the regeneration process. The PLGA system was much more efficient, independent of the dose of BMP-2, than the brushite implants throughout the analysis time period. Protein release was faster in the PLGA cylinders and, consequently, there was more BMP-2 retained in the brushite system at the end of the experiment. BMP-2 *in vivo* release from the PLGA system was also faster than *in vitro*, whereas the two brushite release profiles were similar. This could be partially due to the fact that the brushite implant did not change substantially throughout the experimental period. SEM pictures, porosity data and water uptake, mass loss and histological findings suggested a slow progressive surface erosion of the brushite matrix. The small pieces that split off dissolved or were gradually cleared up by osteoclasts (Fig. 7h and i).

These findings are in agreement with the degradation of a brushite implant observed by Bohner et al. [34] in an orthotopic model 6 months after implantation. Similarly, as the core of the implant remained intact in the present study and degradation at 12 weeks post-implantation had occurred for the most part at the borders, a reduction in the implant area to 45% of the original size was observed (Table 2). Additionally, some internal degradation had occurred, as a result of small fissure formation, which permitted cell entry (Fig. 7f and g). In contrast, Klammert et al. [35] observed almost no changes, either in implant volume or in implant surface area 15 months after implantation in a heterotopic site.

Histological observation demonstrated the presence of large fragments of the remaining implant hindering the regeneration process and restricting bone formation to the external surface and a few very small internal areas of the scaffold. Consequently, incomplete defect repair was achieved. Making this situation worse, after 12 weeks the implanted brushite had partially transformed into HA (Fig. 2), with whisker-like microcrystalline structures (Fig. 1i) similar to those described by Klammert et al. [35]. This phase composition change has been described previously [34] and is a result of ionic oversaturation and precipitation of less soluble CaP, a consequence of poor fluid access. *In vivo* the porosity of the system did not increase. Moreover, an external tissue layer gradually formed, isolating the core and favoring the precipitation process described above.

In contrast, degradation of the PLGA implants was extremely rapid, due to hydrolytic degradation, correlated with a reduction in M_w and T_g . The PLGA cylinder was only located in histological preparations of specimens from the first weeks post-implantation.

Histological analyses demonstrated that the non-loaded PLGA systems did not improve bone formation. Twelve-week post-implantation large areas of fibrosis were still detectable. However, the material allowed osteoinduction triggered by BMP-2, leading to good tissue infiltration and active bone synthesis in the defect area. The degree of bone formation correlated significantly with the ongoing delivery of BMP-2. Defects were completely repaired 8 weeks post-implantation, as a result of the availability of active protein at the defect site.

The non-invasive method used in the present work permitted follow-up of the BMP-2 release profiles *in vivo* (Fig. 4). Higher tissue concentrations were expected during the first week. The results in terms of bone regeneration indicate that the initially available amount of protein could be essential for activating the signaling network responsible for the repair process. Probably, despite the burst release, the system loaded with the lower dose of BMP-2 did not provide enough protein to increase the repair rate during the early phase. However, the sustained long-term delivery of small amounts of biologically active BMP-2 into the surrounding extracellular matrix led to good repair. Actually, a slowly liberated low dose of BMP-2 resulted in the same level of regeneration as a high dose of BMP-2 8 weeks post-implantation. On the other hand, the *in vivo* BMP-2 release rate from the brushite system was slightly reduced, with a smaller burst and sustained release for a long period; after 4 weeks 20% of the protein remained within the scaffold. Thus 700 ng and 3.5 µg of BMP-2 were still encapsulated in the low and high dose brushite systems, respectively, at the end of the fourth week of the experiment. Although 700 ng could be considered a negligible dose, the 3.5 µg of protein still available through the last weeks should have produced better results, according to the data obtained with the low dose of BMP-2 in the PLGA system. The trophic action of BMP-2 was obviously counteracted by the extremely slow degradation of brushite, confirming the importance of material behavior in obtaining a successful system.

In summary, our study has revealed that the PLGA construct constitutes a system with a similarly sustained BMP-2 release profile but clearly material-related advantages over brushite cements. The fast degradation rate of PLGA facilitates quicker replacement by host tissue and, therefore, more effective and rapid repair. Finally, these data are in agreement with the results of other authors [7,36] who reported that the use of slowly resorbed materials for the fabrication of osteoinductive delivery systems or scaffolds can hinder bone regeneration.

5. Conclusions

A brushite and a PLGA delivery system loaded with PLGA microsphere-encapsulated BMP-2 were compared in the present study. Although sustained delivery of BMP-2 was achieved with both systems, the brushite construct, independent of the loaded growth factor dose, failed to consistently induce defect repair, a finding attributed to its slow resorption rate. In contrast, the PLGA system resulted in complete regeneration, with mature trabecular bone formation.

According to our results scaffolds should temporally provide support and control delivery of the incorporated osteoinductive substance. However, mechanical stability may have to be sacrificed for material degradability to enhance tissue infiltration and thus lead to successful defect repair.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science and Technology (MAT2008-02632/MAT to C.E.). R.R. was financed by the

Proyecto Motiva de la ACISI. The authors would like to thank Martina K. Pec for assistance with the manuscript preparation. The authors are also grateful for the technical assistance of Antonio Perera.

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Certain figures in this article, particularly Figures 1–7, are difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the on-line version, at doi:10.1016/j.actbio.2011.10.008.

References

- [1] Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D. Gene- and stem-cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng* 2007;13:1135–50.
- [2] Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface* 2011;8:153–70.
- [3] Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM, et al. The effect of delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 2010;31:1242–50.
- [4] Bishop GA, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 2007;31:721–7.
- [5] Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 2007;28:5068–73.
- [6] Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:339–59.
- [7] Kolambkar YM, Dupont KM, Boerckel JD, Huebsch N, Mooney DJ, Hutmacher DW, et al. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 2011;32:65–74.
- [8] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* 2009;31:1817–24.
- [9] De la Riva B, Sánchez E, Hernández A, Reyes R, Tamimi F, López-Cabarcos E, et al. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite-chitosan system enhances bone regeneration. *J Control Release* 2010;143:45–52.
- [10] Saito N, Murakami N, Takahashi J, Horiuchi H, Ota H, Kato H, et al. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1037–48.
- [11] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett* 2009;31:1825–35.
- [12] Chu T-MG, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 2007;28:459–67.
- [13] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000;23:2475–90.
- [14] Ciešlik M, Mertas A, Morawska Chochól A, Sabat D, Orlicki R, Owczarek A, et al. The evaluation of the possibilities of using PLGA co-polymer and its composites with carbon fibers of hydroxyapatite in the bone tissue regeneration process – in vitro and in vivo examinations. *Int J Mol Sci* 2009;10:3224–34.
- [15] Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, Pearce SG, et al. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials* 2007;28:1376–84.
- [16] Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M. Effect of β -tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials* 2008;29:2249–58.
- [17] Xia Z, Grover LM, Huang Y, Adamopoulos IE, Gbureck U, Triffitt JT, et al. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. *Biomaterials* 2006;27:4557–65.
- [18] Apelt D, Theiss F, El-Warrack AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfsberger R, Bohner M, et al. In vivo behaviour of three different injectable hydraulic calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2004;25:1439–51.
- [19] Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defect. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:69–77.
- [20] Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Bohner M, et al. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005;26:4383–94.
- [21] Yoon JJ, Park TG. Degradation behavior of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J Biomed Mater Res* 2001;55:401–8.
- [22] Tamimi F, Torres J, Bettini R, Ruggera F, Rueda C, López-Ponce M, et al. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases. *J Biomed Mater Res* 2008;85A:707–14.
- [23] Tamimi Mariño F, Torres J, Tresguerres I, Blanco Jerez L, López Cabarcos E. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. *J Biomed Mater Res* 2007;81A:93–102.
- [24] De la Riva B, Nowak C, Sánchez E, Hernández A, Schulz-Siegmund M, Pec MK, et al. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:50–8.
- [25] Washburn EW. Note on a method of determining the distribution of pore sizes in a porous material. *Proc Natl Acad Sci USA* 1921;7:115–6.
- [26] Baro M, Sánchez E, Delgado A, Perera A, Evora C. In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J Control Release* 2002;83:353–64.
- [27] Delgado JJ, Evora C, Sánchez E, Baro M, Delgado A. Validation of a method for non-invasive in vivo measurement of growth factor release from a local delivery system in bone. *J Control Release* 2006;114:223–9.
- [28] Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai HL, Leite SM, Tamada JA, et al. In vitro and in vivo degradation of porous poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials* 2000;21:1837–45.
- [29] Hutchinson FG, Furr BJ. Biodegradable polymers for peptides and proteins. *Horiz Biochem Biophys* 1989;9:111–29.
- [30] Kontny MJ, Zograf G. Sorption of water by solids. In: Brittain HG, editor. *Physical characterization of pharmaceutical solids*. New York: Marcel Dekker; 1995.
- [31] Schilling FA, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, et al. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 2004;25:3963–72.
- [32] Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karting T. Fate of bone formed by guided tissue regeneration with or without grafting of Bio-Oss or Biogran. An experimental study in the rat. *J Clin Periodontol* 2004;31:30–9.
- [33] Liebermann H, Togawa D, Kayanja MM. Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. *Spine J* 2005;5:3055–165.
- [34] Bohner M, Theiss F, Apelt D, Hirsiger W, Hourier R, Rizzoli G, et al. Compositional changes of a dicalcium phosphate dehydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 2003;24:3463–74.
- [35] Klammert U, Ignatius A, Wolfram U, Reuther T, Gbureck U. In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta Biomater* 2011. doi:10.1016/j.actbio.2011.05.022.
- [36] Oest ME, Dupont KM, Kong HJ, Mooney DJ, Guldberg RE. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *J Orthop Res* 2007;25:941–50.

ANEXO 2

***In vivo* osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system**

Antonio Hernández,^{1,2} Ricardo Reyes,^{1,3} Esther Sánchez,^{1,3} María Rodríguez-Évora,^{1,3} Araceli Delgado,^{1,3} Carmen Évora^{1,3}

¹Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, University of La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

²Traumatology Service, Hospitén Rambla Ltd., Santa Cruz de Tenerife, Spain

³Institute of Biomedical Technology, University of La Laguna, Spain

Received 5 October 2011; revised 20 February 2012; accepted 12 March 2012

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.34183

Abstract: Bone regeneration and vascularization with porous PLGA scaffolds loaded with VEGF (0.35 and 1.75 μg) and BMP-2 (3.5 and 17.5 μg), incorporated in PLGA microspheres, or the combination of either dose of BMP-2 with the low dose of VEGF were investigated in an intramedullary femur defect in rabbits. The system was designed to control growth factor (GF) release and maintain the GFs localized within the defect. An incomplete release was observed *in vitro* whereas *in vivo* VEGF and BMP-2 were totally delivered during 3 and 4 weeks, respectively. A weak synergistic effect of the dual

delivery of VEGF and BMP-2 (high dose) was found by 4 weeks. However, the absence of an apparent synergistic long-term effect (12 weeks) of the combination over BMP-2 alone suggests that more work has to be done to optimize VEGF dose, sequential presentation, and the ratio of the two GFs to obtain a beneficial bone repair response. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 00A:000–000, 2012.

Key Words: VEGF, BMP-2, PLGA, bone regeneration, delivery system

How to cite this article: Hernández A, Reyes R, Sánchez E, Rodríguez-Évora M, Delgado A, Évora C. 2012. *In vivo* osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. *J Biomed Mater Res Part A* 2012;00A:000–000.

INTRODUCTION

Bone regeneration is a complex process that requires the coordinated activity of multiple cell types, involving a concerted regulatory system of growth factors (GFs) and cytokines. Synergistic contribution and crosstalk between GF signaling pathways was suggested to be crucial for the overall outcome in osteogenesis.^{1–3} Prominent amongst osteogenic factors are the bone morphogenetic proteins (BMPs), which play an important role in many processes associated with embryogenesis and in adult bone repair.^{4–7} Bone is a highly vascularized tissue reliant on the close spatial and temporal association between blood vessels and bone cells to maintain skeletal integrity. Angiogenesis thus plays a pivotal role in skeletal development and bone fracture repair.⁸ A variety of molecules are implicated in tissue vascularization. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is regarded as the key molecule for neo-angiogenesis and also plays a significant role in skeletal growth and repair.^{9,10} Thus, it seems to be a crucial molecule to address bone repair. However, according to the complexity of osseous regeneration, it is improbable that a single factor, no matter how potent it is, could induce bone healing without the contribution of other GFs, cytokines, and cells.

Therefore, combinations of growth factors have been intensely investigated in bone regeneration studies.⁷ What does seem clear to date is that BMPs have the potential to significantly improve management of critical bone defects, on the one hand, and that VEGF plays an important role during the initial phase of fracture healing^{10,11} and bone regeneration, on the other hand.⁸

Despite some authors report a synergistic effect of dual delivery of VEGF and BMP-2 on bone formation and suggest interplay between these GFs in bone regeneration, inconsistent results can be found in the recent literature. The studies by Peng et al.,¹² Kakudo et al.,¹³ and Kanczler et al.¹⁴ seem to suggest that the combination of BMP-2 and VEGF provides bone tissue engineering constructs with increased osteogenic potential over BMP-2 or VEGF alone. However, the results obtained by Young et al.,¹⁵ Patel et al.,¹⁶ and Kempen et al.¹⁷ suggest an unclear long-term effect of the combined delivery of VEGF and BMP-2 versus BMP-2 alone.

These contradictions may be result of various discrepancies as for example in doses and routes of GF administration as well as the ratio of the combinations and the delivery kinetics. Although GFs are clearly implicated in harnessing and controlling cell activity in tissue regeneration, the

Correspondence to: C. Évora; e-mail: cevora@ull.es

Contract grant sponsor: Ministry of Science and Technology; contract grant number: MAT2011-23819

appropriate combinations and rates of presentation at the damage site seem to be decisive.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of a PLGA porous scaffold, containing different proportions of VEGF and BMP-2 loaded PLGA microspheres, on vascularization and regeneration of an intramedullary defect in rabbit femurs. The whole system was designed to control GF release rates, maintain the GFs localized at the damage site and thus avoid or reduce systemic exposure. Besides, the system is thought to support osteogenic differentiation, guide bone regeneration and be well-resorbed and gradually replaced by newly formed bone. Scaffolds were tested empty, loaded with two distinct doses of PLGA microsphere-encapsulated BMP-2 or one of VEGF or with combinations of both of them. Release kinetics of the GFs were externally monitored and vascularization and bone regeneration quantified in histological specimens.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of systems

The systems consisted of PLGA (Resomer® RG504, Boehringer-Ingelheim) microspheres containing BMP-2 (Biomedical Life Sciences, Spain) and microspheres containing VEGF₁₆₅ (Chemicon), which were incorporated into solid porous PLGA (Resomer® RG504 Boehringer-Ingelheim) cylinders.

PLGA microsphere fabrication

Microspheres were prepared using a double emulsion (water/oil/water) process. Briefly, the first emulsion was made by vortexing either 200 µL of a solution of BMP-2 (180 µg) or VEGF (15 µg), both dissolved in 0.07% polyvinyl alcohol (PVA), with 2 ml of a PLGA methylene chloride solution (50 mg/mL). Then, this emulsion was poured into 100 mL of a 0.1% PVA solution under constant stirring (2 h); the resulting microspheres were collected by filtration and then lyophilized. Batches for release assays and growth factor incorporation were prepared with ¹²⁵I-BMP-2 or ¹²⁵I-VEGF (Perkin-Elmer), as tracers, mixed with the respective pure protein.

Porous scaffold fabrication by gas foaming/salt leaching technique

A modification of a previously described method was used to prepare the porous cylinders.¹⁸ First, 750 mg of PLGA dissolved in 4 ml of acetone was mixed with 750 mg of ammonium bicarbonate salt particles. Ammonium bicarbonate salt particles were pulverized, sieved; then, particle size was measured in acetone (Mastersizer 2000 with Hydro 2000 SM, Malvern Instruments Ltd.). The volume diameter (µm) distribution was <54.1 (10%), < 165.5 (50%), and < 345.8 (90%). To obtain a workable paste, the mix was kept at 40°C for partial elimination of the organic solvent. Scaffolds were prepared by filling one-face-open polyethylene syringes (5 mm of internal diameter) with the polymer paste. To create a reservoir, a stainless steel wire, 3.5 mm in diameter, was introduced in the center of the cylinder. Cylinder and wire were plunged out together and transferred to a 40% aqueous citric acid solution to induce gas foaming as

well as salt leaching within the polymer/salt matrices. After 24 h of incubation at room temperature under slow orbital shaking at 50 rpm (Orbital shaking platform POS-300, Grant-bio), the wire was taken out and the cylinders kept in fresh acid solution for 3 more days to ensure complete dissolution of the porogen. Then, the cylinders were rinsed with Milli-Q water, cut into 1 cm pieces, immersed for further 24 h in PBS (phosphate buffered saline), which was checked for pH, rinsed again with water, and freeze-dried. The scaffolds were filled with 4 mg (3.5 µg) or 20 mg (17.5 µg) of BMP-2 loaded microspheres and/or 4 mg (0.35 µg) or 20 mg (1.75 µg) of VEGF microspheres and completed to 30 mg with blank microspheres. The open ends of the scaffolds were covered with a 2 mm film of PLGA paste in acetone.

Scaffold characterization

Primarily, microsphere size was determined by laser diffractometry using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments). Encapsulation efficiency of BMP-2 and VEGF microspheres was assessed measuring radioactivity levels in three aliquots each using a gamma counter (Cobra® II, Packard). To determine total GF loading, the radioactivity level of every manufactured system was counted.

Scaffolds and their cross-sections morphology were observed with a stereo microscope (Leica M205 C) and Leica LAS software, v.3. The wall of the cylinders was analyzed by scanning electron microscopy (Jeol JSM-6300) at 20 kV. The dried samples were coated with gold-palladium under argon atmosphere. SEM photomicrographs were used for pore size determinations.

In vitro release experiments

The *in vitro* release assays with scaffolds loaded with ¹²⁵I-BMP-2 or ¹²⁵I-VEGF were carried out separately by incubating each individual scaffold in 2 mL of DMEM medium, supplemented with 10% FBS (PAA) and 0.02% sodium azide at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere and relative humidity of 95%, under slow orbital shaking of 100 rpm (Orbital shaking platform POS-300, Grant-bio). At days 1, 4, 7, 10, and 14 and thereafter every week, 250 µL were withdrawn and replaced by fresh medium. The amount of released BMP-2 and VEGF was each calculated by measuring sample radioactivity at every time point. Radiolabeling stability of ¹²⁵I- GF in the release medium was checked by thin layer chromatography (TLC) in silica gel (60 F₂₅₄, Merck) with 85% methanol in water, as previously described.¹⁹

BMP-2 and VEGF bioactivity

To determine the biological activities of the BMP-2 and the VEGF released from our scaffolds, cell based *in vitro* activity assays were carried out.

Biological activity of the released BMP-2 was tested by measuring alkaline phosphatase (AP) activity in rat bone marrow-derived stem cells (rMSCs).²⁰ rMSCs were obtained from 6 weeks old male Sprague-Dawley rats by centrifugal isolation, as previously described.²¹ 2 × 10⁵ freshly thawed cells/6-well were seeded in passage 2 in complete DMEM

with 20% FBS. After 24 and 72 h, medium was replaced by DMEM with 10% FBS, supplemented with adequately diluted BMP-2 standar solutions (0-300 ng/mL) or scaffold release medium. AP activity was assessed after 6 days of GF-treatment using a commercially available kit (Sensolyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit, AnaSpec, Inc. Fremont, CA), following the manufacturer's instructions.

Biological activity of the released VEGF was tested by quantifying its proliferative effect on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), as previously described.¹⁹ Briefly, 5×10^3 freshly thawed cells/96-well were seeded in culture medium (Medium 199 with Hanks' BSS, 100 mg/L L-glutamine, 25 mM HEPES, 1.4 g/L NaHCO₃ [BioWhittaker], and 20% FBS), supplemented with adequately diluted VEGF standard solutions (0-4 ng/mL) or scaffold release medium. On day 5, cell viability was quantified with the colorimetric XTT tetrazolium assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), following the manufacturer's instructions.

Bioactivity of the GFs, released from the scaffolds after 1 and 7 days, was determined by comparing the induced cell response to the one with its equivalent GF standard solution.

Animal experiments

All animal experiments were carried out in conformity with the Guidelines on Care and Use of Animals in Experimental Procedures, (Directives 2010/63/EU and the Spanish R.D.1201/2005). Furthermore, the animal experiments were previously approved by the local committee for animal studies of the University of La Laguna. The *in vivo* assays were carried out in aseptic conditions. Scaffolds were exposed to UV-light for 30 min before implantation.

Surgical procedure

To create the bone defect, surgery was performed as previously described.²² Briefly, male New Zealand rabbits (3-4 kg) were anaesthetized intramuscularly with ketamine (35 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and their right hind legs shaved and disinfected. A dose of prophylactic antibiotic (enrofloxacin, Alsir® s.c., 5-15 mg/kg) and one of the analgesic buprenorphine (Buprex®, 0.05-0.1 mg/kg, s.c.) were administered 30 min before the intervention. A vertical external parapatellar incision was made in the knee. Then, a dislocation of the patellar tendon and quadriceps was performed to allow access to the femoral condyles. A hole of 1.5-2 cm depth, to reach the medullar cavity, was made in the intercondylar space with a 6 mm dental burr. The scaffold was inserted in the damaged femur, and the patella and the patellar tendon were reduced. The surgical wound was closed with stitches and disinfected. One dose of the anti-inflammatory analgesic ketoprofen (2-5 mg/kg, s.c.), to guarantee an overnight effect, and thereafter buprenorphine (every 12 h during 72 h) were administered. After recovery from the surgery (20-30 min), the animals were allowed free movement, food, and water uptake.

In vivo release assays

The release experiments for each GF were carried out separately in two groups of five rabbits each. One group was implanted with scaffolds containing solely ¹²⁵I-BMP-2/BMP-2 loaded microspheres and the other one with scaffolds loaded exclusively with microspheres of ¹²⁵I-VEGF/VEGF.

GF release kinetics from the implanted scaffolds was followed up by a non-invasive method as previously described and validated²³. This method permitted periodic assessment of the remaining ¹²⁵I-GF at the defect site using an external probe-type gamma counter (Captus®, Nuclear Iberica). Briefly, at each sampling time point, five 1-min readings were taken at the ¹²⁵I emission peak (maximum 27 KeV) and the mean accepted as the remaining radioactivity. The measurement at time point 0 was considered 100% (total administered dose).

To check for systemic GF distribution, a blood sample was extracted from the marginal vein of each rabbit's ear at every sampling time point and the radioactivity determined with a well-type gamma counter (Cobra® II, Packard).

Histology, immunohistochemistry, and histomorphometrical evaluation

To determine the degree of bone defect regeneration upon BMP-2, VEGF, and combined BMP-2/VEGF release from the PLGA systems, six groups of 12 animals each and two groups of 6 animals (GF combinations) were assigned for histological examination:

- Group C: Control group (empty bone defect)
- Group B: unloaded scaffolds
- Group BMP-3.5: scaffolds loaded with 3.5 µg of BMP-2
- Group BMP-17.5: scaffolds loaded with 17.5 µg of BMP-2
- Group VEGF-0.35: scaffolds loaded with 0.35 µg of VEGF
- Group VEGF-1.75: scaffolds loaded with 1.75 µg of VEGF
- Group BMP-3.5/VEGF-0.35: scaffolds loaded with 3.5 µg of BMP-2 and 0.35 µg of VEGF
- Group BMP-17.5/VEGF-0.35: scaffolds loaded with 17.5 µg of BMP-2 and 0.35 µg of VEGF

Defect comprising femurs from three animals per experimental group at the time points 2, 4, 8, and 12 weeks post-implantation and at 4 and 12 weeks for the groups treated with both GFs were prepared for histological evaluation. The samples were fixed in 10% formalin solution (pH = 7.4), decalcified in 10% formic acid solution, dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in paraplast®. Longitudinal microtome (Shandon Finesse 325) sections with 3-5 µm thickness were prepared throughout the defect site. The sections were stained with hematoxylin-erythrosine, Cleveland-Rucker-Wolfe and Masson's Trichrome to identify new bone formation. Sections were inspected with a light microscope (LEICA DM 4000B). All sections from each specimen were evaluated for histomorphometrical analysis using computer-based image analysis software (Leica Q-win V3 Pro-image analysis system, Barcelona, Spain). Quantitative evaluation of new bone formation was carried out by determining a region of interest (ROI), defined as the area of the tissue within the defect site until

to the periphery given by the host bone. This ROI was set as a rectangle of $6 \times 5.5 \text{ mm}^2$, positioned in the superior half of the defect, the region corresponding to the epiphysis (see Fig. 1), where new bone formation and osteointegration are best evaluated. New bone formation, distinguished from the scaffold through structure and color differences, was quantified from six neighboring sections by selecting a fixed threshold for positive stain (green for Masson's Trichrome and blue for Cleveland-Rucker-Wolfe) and calculating the positive pixel area. Newly generated bone was expressed as percent of repair relative to intact normal bone.

For immunohistochemical analysis, sections were deparaffinized and rehydrated in TBS buffer (pH 7.4, 0.1M), which was used for all further incubations and rinse steps. Sections were incubated in citrate buffer (pH 6) at 90°C for antigen retrieval, followed by incubation in 0.3% hydrogen peroxide in TBS buffer for 20 min. After a rinse step, sections were blocked with 2% bovine fetal serum in TBS-0.2% Triton X-100 (blocking buffer). The indirect immunohistochemical procedure was carried out by incubating the sections with osteocalcin antiserum (1/100) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer overnight at 4°C. Sections were rinsed three times, then incubated with biotin-SP-conjugated F(ab') fragment donkey anti-rabbit (1/200) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer for 1 h followed, after another rinse step, by an incubation in peroxidase-conjugated streptavidin (1/300) (Millipore, Barcelona, Spain) for 1 h. Peroxidase activity was revealed in Tris-HCl buffer (pH 7.6, 0.05M) containing 0.04% of 4-chloro-1-naphthol (Sigma, Poole, UK) and 0.01% of hydrogen peroxide. Reaction specificity was confirmed by replacing the specific antiserum by normal serum or following preabsorption of the antiserum with the corresponding antigen. Osteocalcin staining was evaluated using computer based image analysis software (ImageJ, NIH, USA). Staining intensities were determined by applying a fixed threshold to select for positive stain within the ROI. Positive pixel areas were divided by total surface size (mm^2) of the ROI. Values were normalized to those from blank scaffolds and reported as relative staining intensity.

Neovascularization was quantified determining blood vessel density and vessel surface area within the ROI. For this purpose, sections were immunolabeled with anti-von Willebrand factor polyclonal antiserum (1/50) (DAKO, Barcelona, Spain) as described above. Reaction specificity was confirmed as aforementioned. Blood vessel density was expressed in absolute values and vessel surface area in mm^2 based on the quantitative evaluation of the ROI.

Statistical analysis was performed with SPSS software using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey multiple comparison post-test. Significance was set at $p < 0.05$. Results are given as means \pm SD.

RESULTS

System characteristics

Microspheres, size determined by laser diffractometry, gave the following volume diameter (μm) distribution: <118.9 (10%), <202.4 (50%), <471.7 (90%) for BMP-2 and $<$

87.3 (10%), <189.7 (50%), <456.7 (90%) for VEGF. Microsphere-encapsulation efficiency was $48.5 \pm 4.7 \%$ and $58.4 \pm 3.5 \%$, respectively.

The PLGA systems sized approximately $4.9 \pm 0.8 \text{ mm}$ diameter \times $10.3 \pm 0.7 \text{ mm}$ height with an average weight of $95.7 \pm 11.9 \text{ mg}$. Figure 2 shows the cross section view of the system with microspheres in the entire, solid, porous cylinder. Mean pore size of the walls of the PLGA-cylinders was $21.1 \pm 11.9 \mu\text{m}$, determined in 400 pores.

In vitro and in vivo release assays

Release kinetics for system encapsulated BMP-2 and VEGF was analyzed using ^{125}I -BMP-2 or ^{125}I -VEGF.

In vitro, BMP-2 was released in a higher burst of $\sim 30\%$, whereas only about 10% of VEGF was delivered from the system during the first day. Subsequently, VEGF was released at 3.6%/day until to the end of the second week. Then, the release rate strongly decreased to reach about 63% of released GF after the 5th week. Approximately 50% of BMP-2 was released until to the end of the first week. Afterwards, the release rate slowed down. Approximately 80% of BMP-2 was liberated at the end of experiment [Fig. 3(a)].

Burst effects *in vivo* were similar for both GFs to the ones *in vitro*. Thereafter, VEGF exhibited a faster release rate than *in vitro*. 50% of the two GFs were delivered during the first 4 days and more than 90% were released in 3 and 4 weeks for VEGF and BMP-2, respectively [Fig. 3(a)]. According to previous studies, degradation of PLGA cylinders occurs faster *in vivo* than *in vitro*.²⁴ Consequently, in this study the release rate was higher *in vivo* than *in vitro* for both GFs. In addition, the clearing effect of the blood flow may also have contributed to the faster release.

To better understand the quantitative relationship between GFs, we compared the released amounts during the experiment. Figure 3(b) visualizes that the ratio between released VEGF and both doses of BMP-2 stayed below 1 throughout the whole release period.

Bioactivity and radiolabeling stability assays, carried out *in vitro*, indicated good stability of both GFs. GF bioactivity was expressed as percentage of the observed cell response to the release media with respect to standard solutions that had been prepared according to GF release determined by radioactivity. There was no statistically significant difference ($p > 0.05$) between bioactivity of BMP-2 and VEGF containing release media after 1 day and 7 days of incubation and the corresponding standards, incubated in the same conditions. These results indicate that BMP-2 and VEGF did not suffer significant loss of bioactivity during the process of scaffold preparation and the release assays. In addition, radiolabeling controls demonstrated an increase of free ^{125}I of about 12-16% at the end of the *in vitro* release assays, indicating good radiolabeling stability for both GFs.

Lastly, the radioactivity measured in blood throughout the experiments was not significantly different from the background. The released GFs were located at the defect site and no systemic exposure was detected.

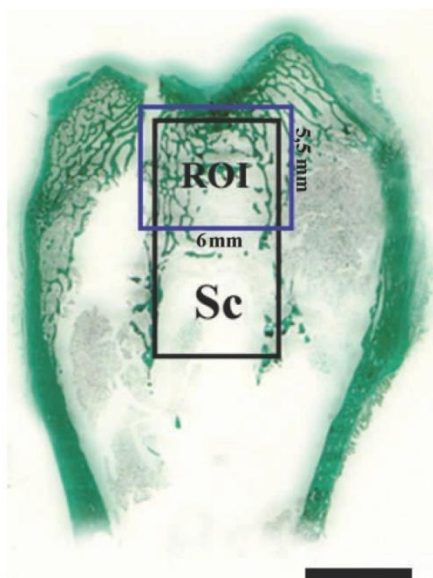


FIGURE 1. Bone defect. Horizontal section of a rabbit femur implanted with a PLGA scaffold (Sc) in the regions of the epiphysis and metaphysis. The black rectangle indicates the scaffold location and the blue rectangle defines the region of interest (ROI) in which the repair response (new bone formation, osteocalcin expression and neovascularization) were quantified. Scale bar: 0.5 mm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

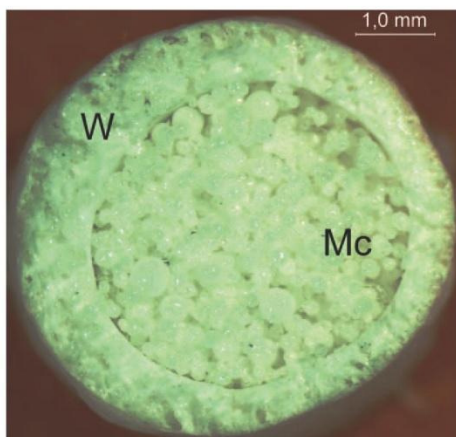


FIGURE 2. System morphology. Cross section view of the system observed by a stereo microscope (Leica M205 C). Mc, PLGA-microspheres; W, wall of the system. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Histological and histomorphometrical analyses

Histological and histomorphometrical analyses were carried out within the ROI. PLGA BMP 2 implant. Two weeks post-implantation, histological evaluation revealed some new bone formation at the defect boundaries in all experimental groups [Fig. 4(a-c)]. Clear signs of inflammatory reaction with abundant hematic tissue at the defect borders as well as the inner zones were evident [Fig. 4(a)]. At this time point, the implant structure was still visible [Fig. 4(a,b)]. Connective tissue and blood cells, surrounding the microspheres, as well as PLGA debris were observed [Fig. 4(d,e)]. Histomorphometrical analysis detected no significant differences between the experimental groups (data not shown). Osteocalcin-immunoreactivity (Ost-ir) gave low values of relative staining in accordance with the bone formation

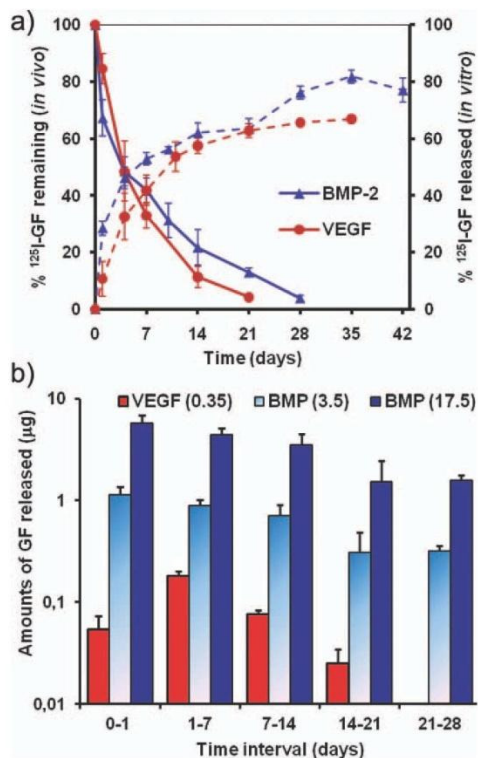


FIGURE 3. Release kinetics. Percentages of remaining BMP-2 and VEGF at the defect site (solid lines) after implantation of the PLGA system in rabbit femur and cumulative BMP-2 and VEGF release profiles (dashed lines), obtained from the system incubated in DMEM medium (a). *In vivo* BMP-2/VEGF ratio throughout the release period. The histogram represents the released amounts of the fixed low dose of VEGF combined with the low dose of BMP-2 versus VEGF with the high dose of BMP-2 (b). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

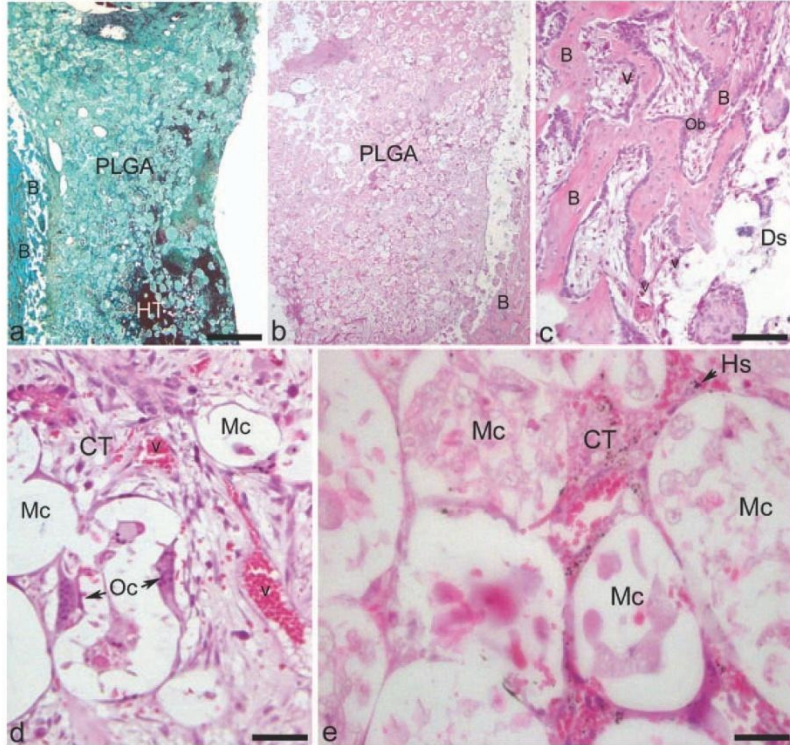


FIGURE 4. PLGA BMP-2 I. Horizontal sections of a rabbit femur at the defect site level in animals from group B (a) and group BMP-17.5 (b), 2 weeks post implantation, showing the implant structure and new bone tissue at the boundaries. Detail at high magnification with new bone formation at the boundaries of the defect site in animals from group BMP-17.5 (c). Detail at high magnification from inside the implant with connective tissue and blood vessels, surrounded by microspheres with osteoclasts inside of them (d). Detail at high magnification of the PLGA implant showing the internal structure of the microspheres (e). (a) Masson Trichrome staining; (b-e) Hematoxylin-erythrosine staining. B, bone tissue; Ds, Defect site; Ob, osteoblast; Oc, osteoclast; Mc, microspheres; CT, connective tissue; V, blood vessels; HT, hematic tissue; Hs, hem siderin grains. Scale bars: a,b = 1 mm; c = 90 μ m; d = 50 μ m; e = 40 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

rates in all groups except for the group BMP-17.5, in which a significant increase was detected (data not shown).

Four weeks postimplantation, percentages of new bone formation were similar to those observed after two weeks [Fig. 7(a)]. The significant increase in bone repair in the group BMP-17.5 [Figs. 5(b) and 7(a)] continued by that time. Only pieces of the implant structure were evidenced in most of the animals, apparent as spaces or cavities within the defect site [Fig. 5(a)]. No more microspheres were detected inside these cavities. Ost-ir gave similar values of relative staining as the ones observed 2 weeks postimplantation [Fig. 7(b)]. There was a perfect correlation with new bone formation, determined by histological staining, at this time point (Fig. 7).

Eight weeks postimplantation, percentages of repaired bone did not differ significantly between groups C and B

compared with those observed by 4 weeks [Fig. 5(c)]. However, a dramatic increase in newly formed bone was observed in the two BMP-2 treated groups compared with 4 weeks postimplantation [Fig. 5(d)]. No more implant residues were detected in most of the animals. Ost-ir intensities were similar as observed after 4 weeks except for the group BMP-3.5, where a significant increase was found (data not shown). Again, the Ost-ir intensities and histological staining correlated perfectly well (data not shown).

Data obtained after twelve weeks (Fig. 7) hardly varied from those observed at 8 weeks.

Analysis of neovascularization revealed a continuous increase in blood vessel density [Fig. 8(a)] and vessel surface area [Fig. 8(b)] up to four weeks postimplantation. From then on, levels stayed constant until the end of data uptake (by 12 weeks) (Fig. 8).

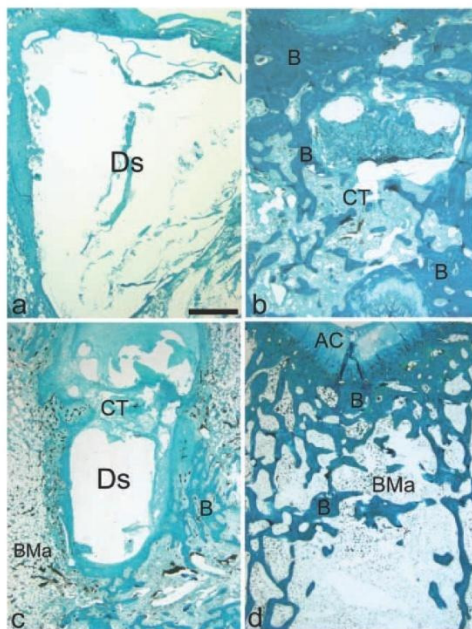


FIGURE 5. PLGA BMP-2 II. Horizontal section of rabbit femur at the defect site level in animals from group B (a) and group BMP-17.5 (b) four weeks postimplantation and from group B (c) and group BMP-17.5 (d) eight weeks post implantation. (a–d) Masson Trichrome staining. AC, articular cartilage; B, bone tissue; BMa, bone marrow; CT, connective tissue; Ds, defect site. Scale bars: a–d = 1.5 mm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

PLGA VEGF implant. At the two first time points of evaluation, histological analysis revealed significant differences between the experimental groups: Two weeks post-implantation, percent of repaired bone had augmented significantly in the group VEGF-1.75 compared with the other groups (data not shown). After 4 weeks, the significant differences between groups C and B [Fig. 6(a)], on the one hand, and the two VEGF treated groups, on the other hand, were more pronounced [Figs. 6(b) and 7(a)]. No differences were observed between the two doses of VEGF [Fig. 7(a)].

Eight and twelve weeks postimplantation, percentages of repaired bone had slightly decreased compared to the data assessed at four weeks [Fig. 6(e)]. No more differences between the experimental groups were detected by the end of the experiment [Fig. 7(a)]. Ost-ir matched with calculated new bone formation [Fig. 7(b)].

Analysis of neovascularization revealed a significant increase in blood vessel density [Fig. 8(a)] and vessel surface area [Fig. 8(b)], again two and four weeks postimplantation. After 8 weeks, a decrease in both parameters was observed and was maintained at least until the 12th week [Fig. 8].

PLGA BMP-2/VEGF implant. Four weeks postimplantation, the combination of BMP-2 with a single dose of VEGF not only resulted in a significant increase in repaired bone [Fig. 6(c)] compared with groups C and B [Fig. 6(d)] but also to the groups treated with BMP-2 only [Fig. 7(a)]. Notably, 12 weeks postimplantation, no more differences between the groups treated with BMP-2 alone and those treated with the combination of either of the doses of BMP-2 and VEGF [Figs. 6(e) and 7(a)] were observed.

Ost-ir corresponded with the values obtained for new bone formation, 4 and 12 weeks postimplantation [Fig. 7(b)]. After 4 weeks, relative staining had augmented significantly compared with the one obtained with BMP-2 treatment only [Fig. 7(b)]. Again, 12 weeks post-implantation no more differences were detected between groups treated with the combination of BMP-2 and VEGF and those treated with BMP-2 alone [Fig. 7(b)].

Neovascularization paralleled new bone formation with a significant increase in blood vessel density [Fig. 8(a)] and vessel surface area [Fig. 8(b)] 4 week postimplantation. Similarly as with VEGF alone, a decrease, more pronounced in blood vessel density, was observed with the combined treatment by twelve weeks [Fig. 8(a)].

DISCUSSION

The objective of this study was to evaluate whether osteoinduction enhanced by two distinct doses of BMP-2 could be improved through combination with a fixed dose of VEGF, released from a highly porous PLGA system, in an intramedullary rabbit femur defect model.

Three important aspects were taken into account:

First, the system characteristics do not hinder GF promoted tissue expansion. Histological analysis demonstrated that the applied system acts as an inert material. It does not enhance neither hinder vascularization nor bone formation since no significant differences with respect to the control groups were found up to 4 weeks (Figs. 7 and 8). The system degraded at ~4 weeks postimplantation,²⁴ time enough for the GFs to be totally released.

Second, the system is capable of controlling the delivery of the incorporated GFs [Fig. 3(a)]. VEGF and BMP-2 were delivered sustained, with a moderated burst release, for 3 and 4 weeks, respectively. BMP-2 is expressed early and throughout the fracture healing process. Furthermore, Jeon et al.²⁵ showed that long-term delivery of BMP-2 enhances its osteogenic efficacy in an ectopic model. The observed BMP-2 release profile fitted well with its physiological temporal expression pattern during fracture healing,^{26,27} justifying the prolonged osteoinduction response observed throughout the 12-week period.

Despite some authors²⁶ support that VEGF expression takes place exclusively during the third week after bone fracturing, other authors report that the peak expression of VEGF occurs between the 5th and the 10th day in rats.^{17,28,29} Thus, the VEGF release profile obtained in this study coincides well with its physiological expression pattern. After 2 weeks, ~90% of VEGF was already released.

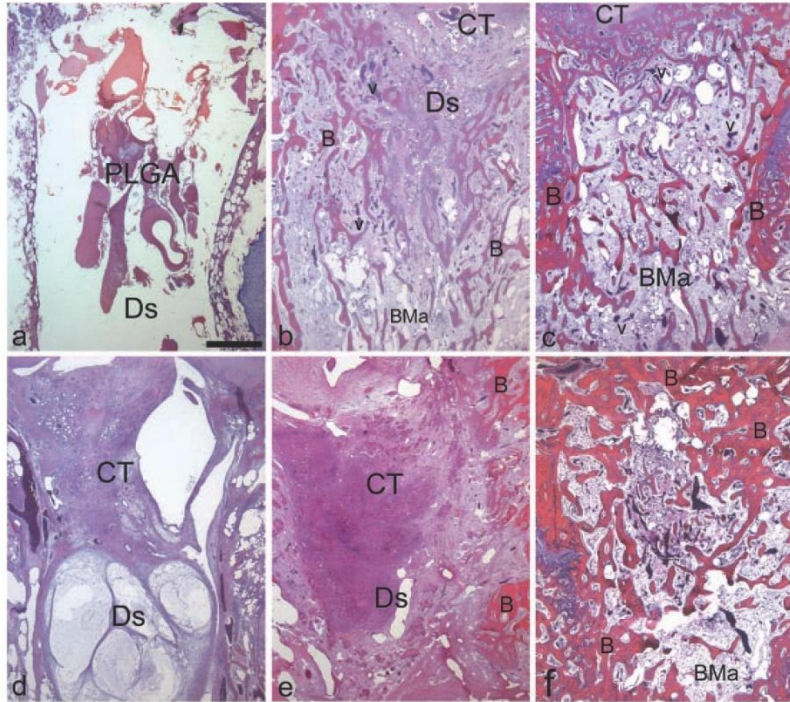


FIGURE 6. PLGA VEGF and PLGA BMP-2/VEGF. Horizontal section of rabbit femur at the defect site level in animals from group B (a), group VEGF-0.35 (b), and group BMP-17.5/VEGF-0.35 (c) 4 weeks post-implantation and from group B (d), group VEGF-0.35 (e), and group BMP-17.5/VEGF-0.35 (f) 12 weeks post-implantation. (a–f) Hematoxylin-erythrosine staining. B: bone tissue; BMa, bone marrow; CT, connective tissue; Ds, defect site. Scale bars: a–d = 1.5 mm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Consequently, a potential risk of prolonged interference with the signaling cascades during bone healing was avoided.

Third, BMP-2/VEGF ratio: The osteoinductive potential of the two doses of BMP-2 seems to be sufficient, as total defect repair had been achieved with both doses within a period of 8–12 weeks. A slight effect of vascularization, irrespective of the dose, was observed throughout the experiment with both BMP-2 treatments. However, the two tested doses of VEGF resulted in maximum vascularization and concomitant, though less pronounced, bone formation by 4 weeks. Afterwards, a decrease in both parameters was observed with a tendency to resemble the controls (groups C and B). Therefore, the low dose of VEGF was selected for being combined with the two doses of BMP-2. Also, a study of Peng et al.¹² was taken into account that had demonstrated that a higher ratio of VEGF/BMP-2 resulted in less bone regeneration than a lower one.

Noteworthy, despite significantly more new bone formation in the group treated with the combination of high dose BMP-2 and VEGF by 4 weeks, neither of the BMP-2/VEGF combinations enhanced bone formation furthermore. Twelve

weeks postimplantation, the amount of newly formed bone tended to be even lower compared with defects treated with BMP-2 alone [Fig. 7(a)]. These data correlate partially with the results of Young et al.,¹⁵ Patel et al.,¹⁶ and Kempen et al.¹⁷ who also found no increase in bone formation by combining BMP-2 with VEGF. Similar effects were observed by Roldán et al.³⁰ with BMP-7 combined with VEGF.

The data of Peng et al.¹² suggest interplay between the two growth factors in early bone formation (analyses for up to 6 weeks) and demonstrate the importance of the presence of endogenous VEGF for involving angiogenesis with consequent hypertrophic cartilage resorption and enhanced bone formation; but they also stress the importance of a high BMP-2/VEGF ratio, when the two GFs are applied to accelerate bone regeneration. However, when ratios higher than one were applied, the data assessed by Kempen et al.,¹⁷ in the present study, and by Roldán et al.³⁰ (with BMP-7) did not indicate improved bone formation, if followed up for more than 6 weeks. Importantly, the high GF ratio, achieved in the present work, was maintained within the defect site throughout the whole experimental period [Fig. 3(b)], an aspect which is not frequently considered in

other studies. The release system developed by Kempen et al.¹⁷ was also designed with a superior quantity of BMP-2; but the lack of control of VEGF release in that study led to a reversal of the ratio during the early phase. Alternatively, the low BMP-2/VEGF starting point ratio tested by Young et al.¹⁵ and Patel et al.¹⁶ did improve bone regeneration on a short-term basis (4 weeks) but no longer after 12 weeks, where their data resemble very much the ones presented herein.

So, part of the inconsistencies found with the combined application of BMP-2 and VEGF for bone repair may have their origin in GF ratios and study duration. However, frequently missing *in situ* control of GF delivery kinetics, varying models for bone formation and even assessment methods (i.e., radiographic bone mineral density versus histological analysis of bone area) may be adding more confusion to the issue.

In conclusion, the generally observed absence of a beneficial long-term effect of the combined delivery of VEGF and BMP-2 over BMP-2 alone could be the simple result of a non-optimized dose and/or release kinetics of VEGF from the systems explored to date. On the other hand, some studies indicate that the presence of VEGF may not be of physiological importance at later stages of bone regeneration. The

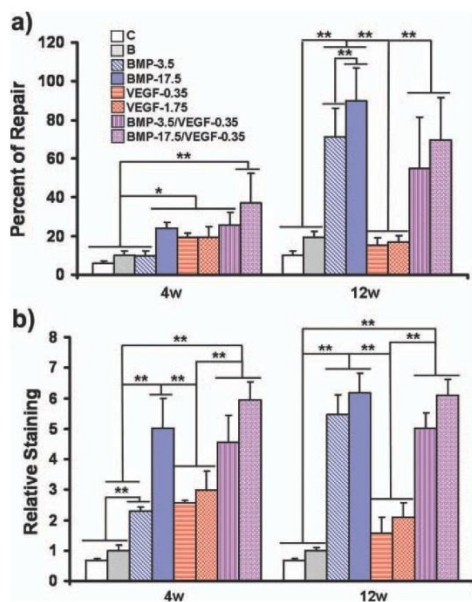


FIGURE 7. Bone formation and osteocalcin expression. Bar graph represents percent of repair at different time points of analysis with the porous PLGA system (a). Semi-quantitative image analysis of relative osteocalcin staining at different experimental time points (b). Bars represent means \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://www.interscience.wiley.com).]

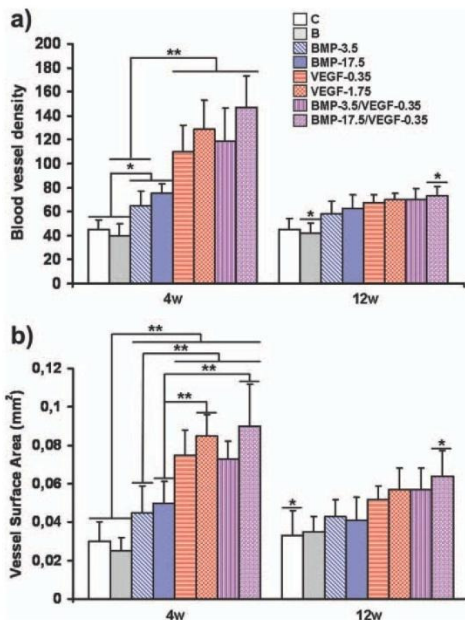


FIGURE 8. Neovascularization. Bar graph representing blood vessel density (a) and vessel surface area (b) at different time points of analysis with the porous PLGA system. Bars represent means \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://www.interscience.wiley.com).]

present work examined the effectiveness of *in vivo* controlled BMP-2 and VEGF release, although simultaneous liberation could not be maintained throughout experimental duration. Thus, further investigation is still required to even determine whether the combination of these two GFs could be of benefit for bone repair or not.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Martina K. Pec for assistance with manuscript preparation. The authors are also grateful for technical support from Antonio Perera.

REFERENCES

- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone Joint Surg* 2002;84:1032–1044.
- Chao TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513–520.
- Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H, Imamura Y, Fukuda M. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *Eur J Histochem* 2000;44: 269–278.
- Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarmann HJTHM. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1367–1378.

5. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:1–13.
6. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:81–96.
7. Diederik HR, Kempen MD, Creemers LB, Alblas J, Lu L, Verbout AJ, Yaszemski MJ, Dhert JAW. Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng B* 2010;16:551–566.
8. Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering. *Bone Eur Cells Mater* 2008;15:100–114.
9. Street J, Bao M, de Guzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N Jr, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9656–9661.
10. Geris L, Gerisch A, Sloten JV, Weiner R, Oosterwyck HV. Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. *J Theor Biol* 2008; 251:137.
11. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:1434–1438.
12. Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 2005;20:2017–2027.
13. Kakudo N, Kusumoto K, Wang YB, Iguchi Y, Ogawa Y. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2. *Life Sci* 2006;79:1847–1857.
14. Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo ROC. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 2010;31:1242–1250.
15. Young S, Patel ZS, Kretlow JD, Murphy MB, Mountziaris PM, Baggett LS, Ueda H, Tabata Y, Jansen JA, Wong M, Mikos AG. Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng A* 2009;15:2347–2362.
16. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 2008;43:931–940.
17. Kempen DHR, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WAJ. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 2009;30:2816–2825.
18. Yoon JJ, Park TG. Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J Biomed Mater Res* 2001;55:401–408.
19. De la Riva B, Nowak C, Sánchez E, Hernández A, Schulz-Siegmund M, Pec MK, Delgado A, Evora C. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:50–58.
20. Huang Z, Ren P-G, Ma T, Smith RL, Goodman SB. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine* 2010;51:305–310.
21. Dobson KR, Reading L, Haberey M, Marine X, Scutt A. Centrifugal isolation of bone marrow from bone: An improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells rat tibiae and femuræ. *Calcif Tissue Int* 1999;65:411–413.
22. Baro M, Sánchez A, Delgado A, Perera A, Evora C. In vitro–in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J Control Release* 2002;83:353–364.
23. Delgado JJ, Evora C, Sánchez E, Baro M, Delgado A. Validation of a method for non-invasive in vivo measurement of growth factor release from a local delivery system in bone. *J Control Release* 2006;114:223–229.
24. Hernández A, Sánchez E, Soriano I, Reyes R, Delgado A, Evora C. Material-related effects of BMP-2delivery systems on bone regeneration. *Acta Biomater* 2012;8:781–791.
25. Jeon O, Song SJ, Yang HS, Bhang S-H, Kang S-W, Sung MA, Lee JH, Kim B-S. Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:774–780.
26. Dimitriou R, Tsiroidis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392–1404.
27. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005;36S:S5–S7.
28. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G. Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: A study in the rat. *Cell Tissue Res* 2002;309:387–392.
29. Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, Nagashima M, Nakamura T. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 2003; 32:491–501.
30. Roldán JC, Detsch R, Schaefer S, Chang E, Kelantan M, Weiss W, Reichert TE, Gurtner GC, Deisinger U. Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model. *J Craniomaxillofac Surg* 2010;38: 423–430.