

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/42
I.S.B.N.: 978-84-7756-993-0

BEATRIZ DE LA RIVA VALENZUELA

**Desarrollo y optimización de implantes
de brushita/chitosano para la liberación sostenida
de factores de crecimiento en defectos óseos**

Directoras

**ARACELI DELGADO HERNÁNDEZ
CARMEN MARÍA ÉVORA GARCÍA**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mis padres

Una vez llegado el final de mi doctorado, resulta muy difícil resumir en pocas líneas todo lo que me gustaría expresar. Quiero dar las gracias a todas las personas que durante estos años, han contribuido (en la mayoría de los casos, de forma desinteresada) a que yo pueda llegar hasta aquí.

A la Dra. Carmen María Évora, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo y por introducirme con su ilusión a la investigación.

A la Dra. Araceli Delgado, por enseñarme, corregirme y ser mis ojos en muchos momentos.

A la Dra. Esther Sánchez, por ser mi guía, mi tutora y confidente, la mano que me impulsó para seguir siempre hacia adelante en los buenos momentos y en aquellos en los que lo más fácil habría sido abandonar. Gracias por ser como eres, conmigo y con todos los doctorandos que pasan por aquí. No soy la única en decir que “tenerte aquí cerca es esencial”.

A la Dra. Martina K.Pec por ser mi maestra, compañera y amiga, por transmitirme su pasión por los cultivos celulares y brindarme tantos buenos ratos acompañados de deliciosos cafés.

Al Dr. Ricardo Reyes, por su generosidad, simpatía y por su paciencia para iniciarme en los estudios de histología.

Al Dr. Manuel Baro, cuya ayuda ha sido fundamental para llevar a cabo todos los estudios in vivo, por contribuir a que las intervenciones quirúrgicas fueran más amenas.

A mis compañeros del departamento, Dr. José Fariña, Dr. Matías Llabrés, Dra. Obdulia Murguía, Dr. Alexis Oliva, Dra. Isabel Soriano, Dra. Ana Santoveña, por su gran apoyo y buenos consejos.

A mis compañeros y sobretodo amigos con los que compartí de una forma u otra el camino del doctorado y que seguirán estando siempre conmigo: Juan José Delgado, Arístides de León, Antonio Hernández, Beatriz Hernández, Mónica Jarabo, María Rodríguez, Vicente Mateu, Silvia Oliva, Rayco García, Julia Pérez-Godiño, David Rentería, Konny Flämig, Fanny Chaillet y Ana Beloqui.

A Margarita de la Rosa y Diego Molina, por tenderme su mano siempre que lo necesité.

A Faleh Tamimi de la Universidad Complutense de Madrid y a Christian Nowak de la Universidad de Leipzig por transmitirme con ilusión sus conocimientos y su pasión por la ciencia.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Farmacia del Hospital Ntra. Sra. De La Candelaria y de la farmacia de Las Caletillas por apoyarme y entenderme tanto durante estos años.

A toda mi familia, por transmitirme desde lejos tanta fuerza e ilusión.

A mi abuela Agustina por darme tanto amor y enseñarme a ser fuerte y a mis abuelos Esperanza, Cremencio y Francisco por enviarme desde arriba tanto cariño.

A mis incondicionales amigos y amigas por empujarme siempre a seguir hacia delante, por compartir conmigo tantos buenos ratos, por hacerme reír y animarme cuando estaba de bajón y a la vez comprender con paciencia mis ausencias en ocasiones especiales.

Por último, me gustaría hacer una mención especial a las dos personas más importantes de mi vida: mis padres, José y Conchi. Sólo gracias a vosotros ha sido posible que yo llegue hasta aquí. Gracias por estar a mi lado, por ayudarme y por sacrificaros tanto por y para mí. Gracias por darme fuerza en los momentos difíciles y por no dejarme abandonar nunca; os pido perdón por no comprenderos en alguna ocasión (os aseguro que ahora lo entiendo todo... gracias!). Gracias por ofrecerme siempre todo lo que está en vuestras manos y mucho más. Gracias por esperarme para cenar siempre con una sonrisa en la boca y sólo palabras de ánimo... por todas las figuras y gráficas para la tesis (Papá) y por los dibujitos de ánimo por debajo de la puerta (mamá). Gracias por compartir conmigo esta vida tan inmensamente feliz que me habéis dado. Esta tesis también es vuestra... os debo todo, os quiero muchísimo.

ABREVIATURAS

Ad: adipocitos
BSA: albúmina de suero bovino
CHT: chitosano
D: diáfisis
DD: diáfisis distal
DM: diáfisis media
D-MEM: Dulbecco's modified eagle medium
DMO: densidad mineral ósea
DP: diáfisis proximal
ED: epífisis distal
EP: epífisis proximal
FBS: suero fetal bovino
GF: factor de crecimiento
HM: hueso mineral
Imp: implante
MCP: monofosfato cálcico
 α -MEM: α modified eagle medium
MD: metáfisis distal
MO: médula ósea
MP: metáfisis proximal
OB: osteoblastos
Os: osteocito
Ost: osteoide
P/S: penicilina/estreptomina
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLGA: ácido poli-d,l-láctico-glicólico
PVA: alcohol polivinílico
Sc: Scaffold (implante).
TCP- β : fosfato tricálcico beta
TF: tejido fibroso
TGF: factor de crecimiento transformado
SD: sitio del defecto
V: vaso sanguíneo
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- OBJETIVOS.....	11
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1.- Materiales.....	13
3.2.- Elaboración de los sistemas de cesión conteniendo VEGF.....	14
3.2.1.- Preparación de las microesferas de alginato.....	14
3.2.2.- Elaboración de las matrices de alginato y quitosano.....	16
3.2.3.- Preparación de microesferas de PLGA.....	17
3.3.- Preparación de implantes de brushita.....	18
3.4.- Elaboración de los implantes de brushita conteniendo varios GFs.....	20
3.4.1.- Elaboración de los sistemas brushita-chitosano, conteniendo PDGF y VEGF.....	20
3.4.2.- Elaboración de los sistemas brushita-microesferas de PLGA conteniendo VEGF, PDGF y TGF- β_1	21
3.5.- Caracterización de los sistemas.....	22
3.5.1.- Tamaño de partícula de las microesferas conteniendo VEGF	
a) Microesferas de alginato.....	22
b) Microesferas de PLGA.....	22
3.5.2.- Determinación de la eficiencia de encapsulación del VEGF en las microesferas.....	23

3.5.3.- Determinación del contenido y distribución de los ¹²⁵ I-GFs en los distintos sistemas.....	23
3.5.4.- Porosimetría de mercurio.....	23
3.5.5.- Resistencia a la fractura.....	24
3.6.- Estudios <i>in vitro</i>	25
3.6.1- Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	25
3.6.2.- Estabilidad del marcaje del ¹²⁵ I-GF en medio de cesión.....	25
3.6.3.- Bioactividad del VEGF.....	26
3.6.4.- Evolución temporal de las características de los sistemas	
a) Hinchamiento de las microesferas de alginato.....	28
b) Ensayos de captación de agua y pérdida de masa.....	28
c) Determinación del peso molecular del PLA-H por GPC.....	29
d) Estructura microporosa de los sistemas.....	29
3.7.- Estudios <i>in vivo</i>	30
3.7.1.- Técnica quirúrgica: defecto óseo.....	30
3.7.2.- Determinación del perfil de cesión <i>in vivo</i> (método no invasivo).....	33
3.7.3.- Ensayo de biodistribución de los GFs (método invasivo).....	34
3.7.4.- Planificación de los ensayos de cesión <i>in vivo</i>	35
a) Matrices de quitosano conteniendo VEGF	
b) Sistemas burshita-chitosano conteniendo PDGF y VEGF	

c) Sistemas brushita-microesferas de PLGA conteniendo PDGF, VEGF y TGF- β_1	
3.7.5.- Análisis histológico del fémur sin decalcificar.....	37
a) Implantes de brushita-chitosano	
b) Implantes de brushita-microesferas de PLGA	

4.- RESULTADOS

4.1.- Características de los sistemas de liberación de GFs.....	43
4.1.1.- Matrices de alginato y de chitosano conteniendo microesferas de VEGF-alginato.....	43
4.1.2.- Implantes de brushita-chitosano conteniendo PDGF y VEGF.....	45
4.1.3.- Implantes de brushita-microesferas de PLGA conteniendo PDGF, VEGF y TGF- β_1	48
4.2.- Caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de las matrices de alginato y chitosano conteniendo VEGF.....	50
4.2.1.- Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	50
4.2.2.- Bioactividad del VEGF.....	52
4.2.3.- Captación de agua, pérdida de masa y cambios estructurales durante el ensayo de cesión <i>in vitro</i>	54
4.2.4.- Ensayos de cesión <i>in vivo</i>	58
4.2.5.- Biodistribución del VEGF.....	61

4.3.- Caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los implantes de brushita-chitosano conteniendo VEGF y PDGF.....	63
4.3.1.- Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	63
4.3.2.- Captación de agua, pérdida de masa y porosidad durante el ensayo de cesión <i>in vitro</i>	65
4.3.3.- Ensayos de cesión <i>in vivo</i>	68
4.3.4.- Biodistribución del PDGF y VEGF.....	70
4.4.- Caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los implantes de brushita- microesferas de PLGA conteniendo VEGF, PDGF y TGF.....	72
4.4.1.- Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	72
4.4.2.- Bioactividad de VEGF.....	74
4.4.3.- Captación de agua, pérdida de masa y porosidad durante el ensayo de cesión <i>in vitro</i>	75
4.4.4.- Ensayos de cesión <i>in vivo</i>	78
4.4.5.- Biodistribución del VEGF, PDGF y TGF.....	80
4.5.- Evaluación histológica e histomorfométrica tras la implantación de los sistemas de liberación de GFs.....	83
4.5.1.- Implantes de brushita-chitosano conteniendo PDGF y VEGF.....	83
4.5.2.-Implantes de brushita-microesferas de PLGA conteniendo VEGF, PDGF y TGF-β1.....	93

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Matrices de alginato y quitosano conteniendo VEGF.....103

5.2.- Sistemas elaborados con brushita.....108

6.- CONCLUSIONES.....121

7.- BIBLIOGRAFÍA.....123

8.- ANEXOS

8.1.-“VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds”. De la Riva B., Nowak C., Sánchez E., Hernández A., Shulz-Siegmund M., Pec M.K., Delgado A., Évora C. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 73(1):50-58.

8.2.- “Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration”. De la Riva B., Sánchez E., Hernández A., Reyes R., Tamimi F., López-Cabarcos E., Delgado A. y Évora C. *Journal of Controlled Release* 2010; 143:45-52.

1.- INTRODUCCIÓN

El objetivo fundamental de la ingeniería de tejidos *in situ* es reemplazar o regenerar el tejido dañado aplicando biomateriales combinados con células y/o moléculas bioactivas como son los factores de crecimiento (GFs). Actualmente su papel 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 clara. 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 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. Por tanto, los esfuerzos en el campo de la tecnología farmacéutica aplicada a la ingeniería de tejidos se centran en el diseño de sistemas que permitan la liberación controlada de estos factores.

En el diseño de un sistema de liberación controlada para GFs hay que tener en cuenta:

- 1.- La variedad y complejidad de sus efectos, por lo que es esencial identificar el factor o los factores a liberar desde el sistema para conseguir la regeneración de cada tejido específico.
- 2.- Que los GFs deben dirigirse hacia la población celular deseada evitando que la acción se propague hacia tejidos y células no diana, como ocurre con la administración IV. Además la administración sistémica no dirigida es ineficaz pues la vida media de estos factores es extremadamente corta, así el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el transformado (TGF- β_1), el fibroblástico (FGF) y el vascular endotelial (VEGF) presentan vidas medias de 2 (Bowen-Pope et al., 1984), de unos 2-11 minutos, (Coffey et al., 1987, Zioncheck et al., 1994), de 3 (Edelman et al. 1993) y 50 minutos,

respectivamente (Lanzarous. et al. 1996). Por tanto, la administración por vías convencionales requiere dosis muy elevadas que pueden producir efectos indeseables (Yancopoulos et al. 2000).

3.- La estabilidad del GFs en el sistema. Los métodos de elaboración empleados deben evitar la utilización de disolventes agresivos o elevadas temperaturas que generalmente degradan a las proteínas.

4.- La cinética de cesión del GFs o el perfil de cesión debe ser el adecuado tanto en cuanto a dosis liberadas como a duración. Para obtener los efectos regenerativos deseados el sistema debe proporcionar al tejido los GFs necesarios durante un cierto periodo de tiempo (días o semanas).

A pesar de la gran capacidad intrínseca del tejido óseo para su auto-reparación, en numerosas ocasiones es necesario estimular la osteogénesis (Friedlaender et al., 2001). En particular cabe destacar el gran número de fracturas asociadas a la osteoporosis y la pérdida de tejido óseo debida a cáncer, mielomas o accidentes (Rose y Orfeo, 2002). Todo ello, plantea la necesidad de disponer de sistemas que proporcionen los factores de crecimiento necesarios para estimular la regeneración ósea en combinación con materiales osteoconductivos que faciliten el soporte adecuado para el crecimiento tisular ordenado.

En particular, en el caso de la ingeniería de tejido óseo hay que tener en cuenta que no sólo se requiere la reparación para proporcionar un soporte mecánico adecuado sino la vascularización del nuevo tejido. Para alcanzar estos objetivos los sistemas elaborados deben presentar propiedades osteoinductivas y osteoconductoras. Los GFs son osteoinductores pues inducen la migración, proliferación y diferenciación de células presentes en el organismo capaces de formar nuevo tejido óseo (tabla 1.1).

GF	Fuente	Efecto biológico	Acción en hueso
BMP	Células osteoprogenitoras y endoteliales, osteoblastos, condrocitos.	Condro-osteogénesis, osteoinducción.	Migración de osteoprogenitoras, inducción de proliferación, diferenciación y síntesis de la matriz.
FGF	Macrófagos, monocitos, BMSC, condrocitos, osteoblastos, cel. Endoteliales.	Angiogénesis, proliferación de fibroblastos y cel. 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, condrocitos, hepatocitos, cel. Endoteliales.	Regulación de los efectos de la hormona de crecimiento.	Proliferación de osteoblastos y síntesis de matriz ósea, resorción ósea.
PDGF	Plaquetas, osteoblastos, cel. endoteliales, manocitos, macrófagos	Proliferación cel. tejido conectivo, quimiotaxis de monocitos, macrófagos, cel músculo liso, angiogénesis	Migración de osteoprogenitoras, inducción de proliferación y, diferenciación.
TGF-β	Plaquetas, BMSC, osteoblastos, condrocitos, cel. endoteliales, fibroblastos, macrófagos.	Inmunosupresión, angiogénesis, estimulación del crecimiento celular, diferenciación y síntesis de ECM.	Proliferación de cel. mesenquimales sin diferenciar, reclutamiento de precursores de osteoblastos y de osteoclastos; diferenciación de osteoblastos y condrocitos (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 implicados en la reparación de tejido óseo (Devescovi et al., 2008).

Los materiales osteoconductores proporcionan la matriz adecuada en forma de soporte poroso y permeable que favorece la entrada de células y actúa de guía para que se produzca la osteogénesis. Los materiales conductores pueden también conferir estabilidad mecánica durante el proceso de remodelación. La utilización de un material conductor como vehículo de biomoléculas inductivas puede favorecer o acelerar la regeneración ósea debido a la acción combinada del vehículo y el factor.

Por ello, tanto los GFs elegidos como el material utilizado van a condicionar los objetivos alcanzados. En resumen, los objetivos planteados en este trabajo incluyen el diseño y caracterización de un sistema que permita por un lado el control de la cinética de cesión de una combinación de GFs y por otro que actúe de guía para la correcta formación de nuevo tejido.

Los materiales o mejor los biomateriales usados como sustitutivos óseo para estimular la regeneración de hueso deben ser idealmente:

- 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).

Además, una característica muy deseable en el caso de materiales empleados en tejido óseo es que puedan ser reabsorbidos por los osteoclastos, para que gradualmente sean sustituidos por el nuevo hueso formado (Schilling et al., 2004).

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 que más se han estudiado. 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) En cuanto a los materiales sintéticos, hay que indicar que además del TCP, la brushita presentan una velocidad de resorción *in vivo* más elevada que la HA, permitiendo la sustitución simultánea del material por el nuevo 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 (Lemaitre 1995, Andrianjatovo et al., 1996, Ishikawa et al., 1994). Sin embargo, *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 hidroxiapatita 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 hidroxiapatita (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 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). Otros autores por el contrario observan procesos inflamatorios cuando se implantan cantidades elevadas del material e indican que estas reacciones pueden producirse en respuesta a la hidroxiapatita formada en la degradación de la brushita (Flautre et al., 1999). Recientemente, se ha desarrollado un biomaterial a base de brushita y colágeno, para su preparación el colágeno se incluye junto con ácido cítrico en la fase líquida. El composite que se obtiene combina una serie de propiedades que se traducen en un incremento de su capacidad de cohesión y tensión de compresión que se aproxima a la de hueso esponjoso además de favorecer la adhesión celular (Tamimi et al., 2008). Estos mismos autores han desarrollado un cemento de brushita que se puede aplicar en defectos maxilofaciales empleando técnicas no invasivas observando que se produce un aumento vertical del hueso, después de ocho semanas (Tamimi et al., 2009).

Por otro lado, 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 nuevo tejido óseo como pueden ser los GFs (Ginebra et al., 2006). Entre otros, cabe destacar el empleo de estos cementos como vehículos de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) para estimular el relleno de defectos críticos (Liang et al., 2005, Kim S.S. et al., 2008, Kim S. et al., 2008). También se han estudiado otras moléculas activas

como pueden ser TGF- β_1 (Blom et al., 2001, Link et al., 2008) o PDGF en TCP (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 y que es parte de este trabajo (De la Riva et al., 2010).

La brushita se ha utilizado fundamentalmente como sistema de cesión de antibióticos, cabe destacar los trabajos de Bohner et al., (Bohner et al. 1997, 2000) con gentamicina, modificando el cemento de brushita con doxiciclina hclato (Tamimi et al., 2008) 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.

Además de los compuestos inorgánicos los polímeros naturales han sido ampliamente utilizados como materiales adecuados para la elaboración de andamios o estructuras 3D. Concretamente, se le ha prestado especial interés al quitosano debido a sus propiedades, entre las que cabe destacar

biodegradación, biocompatibilidad, actividad antimicrobiana, no tóxico ni antigénico y además puede modelarse en estructuras porosas. Estas estructuras tipo scaffolds se suelen fabricar por liofilización de disoluciones acuosas de estos polímeros y posterior estrecruzamiento químico para mejorar sus propiedades mecánicas (Peniche et al., 2007). Con esta misma finalidad se han desarrollado y estudiado composites formados por combinación del quitosano tanto con materiales inorgánicos como con polímeros sintéticos (Hsieh et al., 2006). El quitosano solo o en combinación con otros polímeros, se ha utilizado como scaffolds en cultivos *in vitro* y los resultados avalan su gran capacidad para adherir células así como para promover su proliferación y diferenciación medida a través de la expresión de marcadores óseos (Jiang et al., 2006, 2010a)

El quitosano se ha formulado en distintas estructuras para actuar como sistema de liberación de GFs utilizados en regeneración ósea. El quitosano en forma de esponjas, andamios porosos o en forma de nanofibras ha sido combinado con diferentes GFs para estimular la formación de hueso (Martino Di A. et al., 2005). El método más frecuente para incorporar GFs en estos scaffolds es por adsorción física (Kim et al. 2002; Carstens et al. 2005; Jiang et al., 2010b; Akman et al., 2010). A pesar de que este método resulta muy atractivo por su sencillez, no resulta fácil un control adecuado de la velocidad de liberación de los factores. Para intentar paliar este problema se han empleado distintas estrategias, entre ellas podemos citar la combinación del quitosano con polímeros sintéticos para incorporar BMP-2 (Hsieh et al. 2006), la encapsulación de BMP-2 en microesferas de quitosano que son incorporadas a su vez en un scaffold de HA-colágeno-PLLA (Niu et al., 2009) o bien la inclusión de microesferas de polímeros sintéticos cargadas con BMP en scaffolds de quitosano (Yilgor et al., 2009).

Por tanto, para que los factores de crecimiento actúen de forma eficaz en la regeneración tisular y en particular en la de tejido óseo debemos tener en cuenta que deben presentarse de forma secuencial en una cierta cuantía, y a la velocidad adecuada. En las primeras fases del proceso de reparación ósea los GFs deben actuar atrayendo y favoreciendo la proliferación de las MSC (Fiedler et al., 2002 y 2004). En una segunda fase deben estar presentes los factores que inducen la formación de la matriz, especialmente los que inducen la formación de colágeno I, proteína constituyente del tejido óseo. Uno de los factores más potentes en estas primeras fases es el factor de crecimiento transformado $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Arnold et al., 2002 y Lilli et al., 2002). Sin embargo en las etapas finales se requiere la presencia de un potente diferenciador como puede ser la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), durante periodos prolongados para conseguir finalmente la formación de verdadero tejido óseo (Yamamoto et al., 2003, Uludag, et al. 2001, Friess et al., 1999).

La aplicación de los GFs en sistemas de liberación controlada permitiría que las células dispusieran de estos factores de acuerdo a sus necesidades. Así, la presencia de PDGF es probablemente crucial en las primeras fases de la regeneración ósea (Dimitriou et al., 2005). Sin embargo su permanencia posterior puede inhibir la diferenciación celular y por consiguiente la formación tisular (Yu et al., 1997). El TGF- $\beta 1$, es necesario durante las primeras semanas pero al igual que el PDGF posteriormente inhibiría la diferenciación (Lieb et al., 2004a y Lieb et al., 2004b). Finalmente para la regeneración de tejido funcional es necesaria la formación de nervios y vasos sanguíneos. Concretamente la formación de la red vascular es esencial para la generación de nuevo tejido óseo, en este caso es necesario la participación del VEGF (Street et al., 2002, Kaigler et al., 2006, Leach et al., 2006). Por todo ello, parece necesaria la presencia de múltiples factores con

capacidad tanto para inducir proliferación y diferenciación celular ósea como angiogénesis. De hecho se ha puesto en evidencia que la liberación conjunta de VEGF y PDGF favorece la formación de estructuras vasculares largas y maduras (Richardson et al., 2001, Sun et al., 2010), la adición de heparina a dicha combinación potencia aún más el efecto (Hosack et al., 2008). La combinación de BMP-4 and VEGF también favorecen la formación de hueso ectópico, resultados que se ven aún más potenciados por la presencia de células mesenquimales de médula ósea (Huang, Y.C 2005). Estos resultados coinciden con los publicados posteriormente (Kempen et al., 2009), en cuanto a que la combinación BMP-2 con VEGF, formulada en un implante, produce mayor cantidad de hueso ectópicamente, sin embargo, estos mismo autores cuando lo aplican localmente en un defecto óseo no observan mayor vascularización ni formación de tejido óseo por la presencia de VEGF. Igualmente los efectos del TGF- β_1 , aplicado localmente en el defecto (Lind et al., 1993, 1996), sobre la regeneración ósea se ven potenciados por la combinación con otros factores como puede ser con IGF (Schmidmaier et al., 2002).

Teniendo en cuenta el efecto de los factores de crecimiento, consideramos que la combinación de PDGF, TGF- β_1 y VEGF en un sistema que permita la liberación de cada uno de los factores en la etapa adecuada puede ser una estrategia muy útil para acelerar la regeneración ósea. Esta misma combinación de factores ha sido estudiada recientemente en un scaffold de alginato y se ha comprobado que una vez implantado en tejido subcutáneo se produce un efecto sinérgico sobre la vascularización (Freeman y Cohen, 2009).

2.- OBJETIVOS

Este trabajo se encuadra dentro de los proyectos de investigación SAF 2005-02753 y 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 un sistema osteointegrable y osteoinductor capaz de controlar la cesión de PDGF, VEGF, TGF- β_1 y sus combinaciones una vez implantado en un defecto óseo.

Los objetivos concretos que nos planteamos son los siguientes:

- 1.-** Formulación y optimización de los GFs (PDGF, VEGF, TGF- β_1) y sus combinaciones (PDGF-VEGF, TGF- β_1 -VEGF y PDGF-VEGF-TGF- β_1) en distintos sistema de cesión.
- 2.-** Caracterización físico-morfológica de las formulaciones y estabilidad de los GFs.
- 3.-** Estudio de los perfiles de cesión *in vitro* e *in vivo* de los tres GFs, de forma individualizada desde el sistema completo 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.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

Los factores de crecimiento (GFs), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformado β_1 (TGF- β_1) fueron suministrados por R&D o Chemicon y sus correspondientes trazadores radiactivos marcados con ^{125}I , por Perkin-Elmer.

Todos los factores de crecimiento empleados fueron suministrados en forma de polvo liofilizado, siendo reconstituidos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y en condiciones estériles. El PDGF (R&D) se reconstituyó con una disolución de HCl 4 mM conteniendo 0,1% de BSA a una concentración final de 0,1 mg/ml, el VEGF (0,1 mg/ml) con agua MQ y el TGF (0,05 mg/ml) con una disolución de ácido cítrico 10 mM (pH=3).

El alginato (Pronova® UP MVG) estéril, de peso molecular medio 200 kDa, con una viscosidad de 206 mPa·s (solución acuosa al 1% w/w, 20°C) y un contenido de ácido glucurónico del 60% y el quitosano ultrapuro (Protasan UP CL 213), de peso molecular de 150-400 kDa, 86% de deacetilación y una viscosidad (al 1% en una disolución de acético al 1%, 20°C) de 150 mPa·s fueron adquiridos a Biopolymers, Oslo, Noruega.

El ácido poli-DL-láctico (Resomer® R203H) (PLA-H) y el poli-(láctico-co-glicólico) (Resomer® RG504) (PLGA) con una viscosidad intrínseca de 0,31 dl/g y 0,50 dl/g respectivamente, fueron suministrados por Boehringer-Ingelheim, Alemania.

El fosfato cálcico dibásico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato monocálcico ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), carbonato cálcico (CaCO_3), y pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El fosfato tricálcico

β ($\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$) fue suministrado por Fluka. El ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) usado fue de la marca Merck. El Miglyol-812[®] (Acofarma), CO_3Ca , (Merck) y Cl_2Ca (Merck) fueron esterilizados por calor seco (2 horas a 160°C) antes de su uso.

Los materiales, antes de ser utilizados fueron previamente esterilizados con una dosis de 25KGy (Aragogamma, Barcelona) siguiendo las recomendaciones de la USP. Tanto los productos líquidos como el material de laboratorio fueron esterilizados en autoclave, excepto los GFs.

El resto de productos incluyendo albúmina sérica bovina (BSA), disolventes y reactivos (diclorometano, n-hexano y ácido acético) fueron empleados sin tratamiento previo.

3.2.- Elaboración de los sistemas de cesión conteniendo VEGF

Hay que indicar que la preparación de todos los sistemas de cesión se llevó a cabo en condiciones asépticas.

3.2.1.- Preparación de microesferas de alginato

Las microesferas de alginato fueron elaboradas por el método emulsificación/gelificación iónica (Fig. 3.1) (de la Riva B. et al., 2009). Para ello, sobre una disolución acuosa de 5 ml de alginato (30 mg/ml) se dispersa la cantidad necesaria de CaCO_3 para obtener una concentración final del 0,375% p/v agitando durante 30 minutos a 60 rpm usando un agitador (AGV-8 Brunsen) provisto de varilla (R1002, Ika). Se añade, entonces, 300 μl de una disolución acuosa conteniendo 7,5 μg ó 15 μg de VEGF (según que el contenido inicial fuese de 50 ó de 100 ng/mg de alginato respectivamente),

^{125}I -VEGF (0,5-2 μCi) y albúmina al 1% y se continúa la agitación durante otros 30 minutos.

La dispersión resultante se recoge en una jeringa y cada ml de la misma se inyecta (aguja BD, 1,2 x 40 mm) lentamente en 5 ml de Miglyol-812[®] bajo agitación (1150 rpm). Se emulsifica durante 5 minutos y se añaden 500 μl de una disolución de Miglyol-812[®]: ácido acético (100:1), lo que permite la solubilización del CaCO_3 , agitándose durante 5 minutos más. Por último, se añaden 2,5 ml de una disolución acuosa de CaCl_2 al 0,73% y se para la agitación. Se deja que se separen la fase oleosa de la acuosa, conteniendo las microesferas. Se elimina la fase oleosa y las microesferas se lavan dos veces con 1 ml de CaCl_2 al 0,73%, una vez con agua (2 ml), luego con 1 ml de n-hexano para eliminar los posibles restos de la fase oleosa y finalmente dos veces con 1 ml de H_2O . Las microesferas aisladas se congelan con nitrógeno líquido, se liofilizan y se mantienen a 4°C hasta su uso.

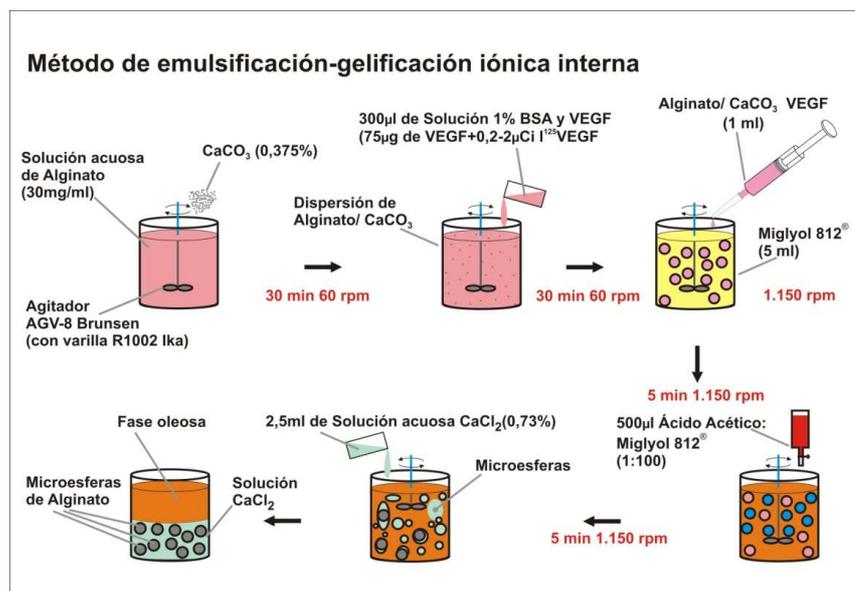


Figura 3.1.- Esquema ilustrativo de la elaboración de las microesferas de alginato.

3.2.2.- Elaboración de matrices de alginato y quitosano

Básicamente, atendiendo al material en el que se incorporaron las microesferas de alginato conteniendo VEGF y ^{125}I -VEGF, podemos hablar de la preparación de tres tipos de matrices (de la Riva B. et al., 2009):

- matrices de alginato (A)
- matrices de quitosano (CH)
- matrices de quitosano recubiertas con una película de PLA-H de 30 kDa (CH-PLA).

Para ello, 7 mg de microesferas de alginato conteniendo VEGF y ^{125}I -VEGF se dispersan en 150 μl de una disolución de alginato al 1% o bien en una de quitosano al 1,5%, ambas en agua, se congelan con nitrógeno líquido y se liofilizan. Tras la liofilización, el procedimiento a seguir dependerá de la formulación a preparar (Fig. 3.2):

- a) Formulaciones A-1 y CH-1: Se procede al entrecruzamiento del material usado como matriz. Las matrices de alginato se incuban durante 30 s en 100 μl de CaCl_2 al 0,7% (formulación A-1) y las de quitosano, en NaOH 1N (formulación CH-1), se lavan dos veces con 150 μl de agua, se congelan en nitrógeno líquido y se liofilizan.
- b) Formulaciones A-2 y CH-2: Se procede a incluir las matrices de alginato o quitosano en otros 150 μl de la correspondiente disolución, se congelan y liofilizan, obteniéndose las matrices con doble cantidad de alginato (formulación A-2) y quitosano (formulación CH-2). Luego se entrecruzan con CaCl_2 y NaOH respectivamente, se lavan y se liofilizan, de la misma forma descrita en el apartado anterior.

- c) Formulación CH-1-PLA: Las matrices CH-1 (anteriormente descritas) se sumergen en una disolución de PLA-H 30 kDa en diclorometano (500 mg/ml) e inmediatamente se sacan, y se dejan secar al menos durante 12 horas a temperatura ambiente en desecador.

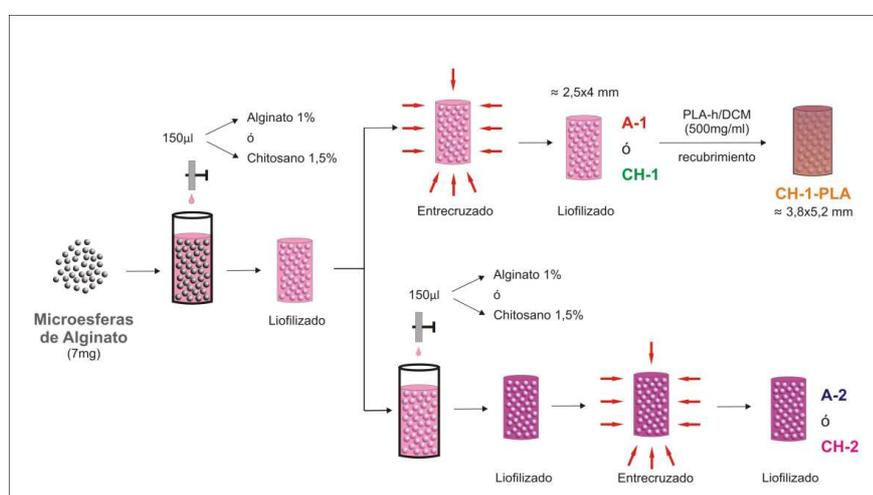


Figura 3.2.- Esquema ilustrativo de la elaboración de las matrices.

3.2.3.- Preparación de microesferas de PLGA

Las microesferas de PLGA se elaboraron mediante el método de doble emulsión (figura 3.3). Para ello, se añadió la fase interna acuosa formada por 200 µl de PVA al 0,07% conteniendo 10 µg de VEGF/¹²⁵I-VEGF (0.5-2µCi) sobre la fase oleosa formada por 200 mg de PLGA en 2 ml de diclorometano (50 ng de VEGF por mg de PLGA). Estas dos fases se emulsificaron durante 3 minutos en Vortex (Genie[®]2, posición 7) y seguidamente 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.

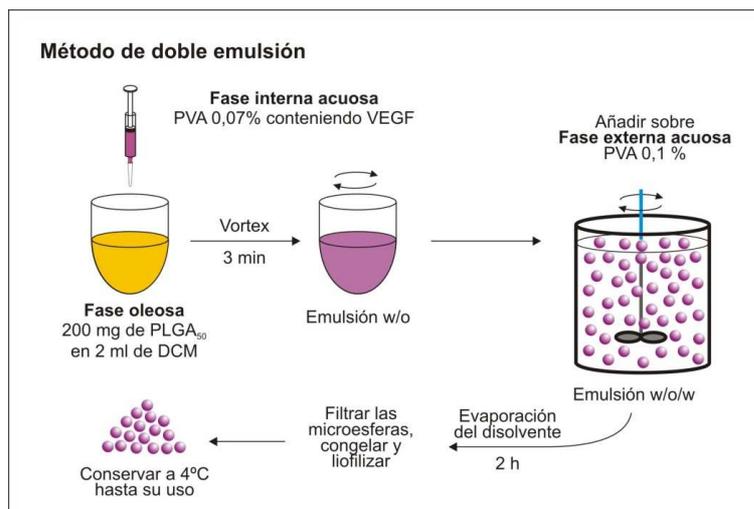
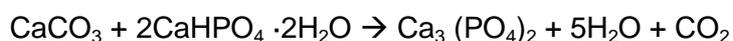


Figura 3.3.- Esquema ilustrativo de la elaboración de las microsferas de PLGA

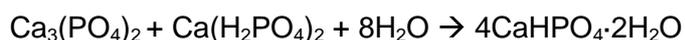
3.3. - Preparación de implantes de brushita

En la preparación de los implantes de brushita, inicialmente se utilizó β -TCP (fosfato tricálcico beta) preparado por nosotros según se detalla a continuación y, con posterioridad, se utilizó β -TCP disponible comercialmente (Fluka) tras haber comprobado que no presentaba diferencias en su espectro de difracción de rayos X ni en tamaño de partícula con el previamente sintetizado en nuestro laboratorio.

La preparación β -TCP se llevó a cabo según el método descrito por Tamimi et al. (2007), calentando una mezcla estequiométrica de carbonato cálcico y fosfato cálcico dibásico dihidratado a 900°C durante 14h. El producto de esta reacción se analizó por difracción de rayos X para asegurar la pureza del β -TCP formado.



La fase sólida del cemento de brushita se elaboró según describe Tamimi et al. (2007) mezclando 1,428 g de β -TCP, 0,8 g de fosfato monocalcico (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 la fase líquida en una proporción de polvo/líquido de 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 4,8 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. Los implantes de brushita, se conservaron durante unas 12 horas a 4°C hasta el momento de usarlos (Fig. 3.4).

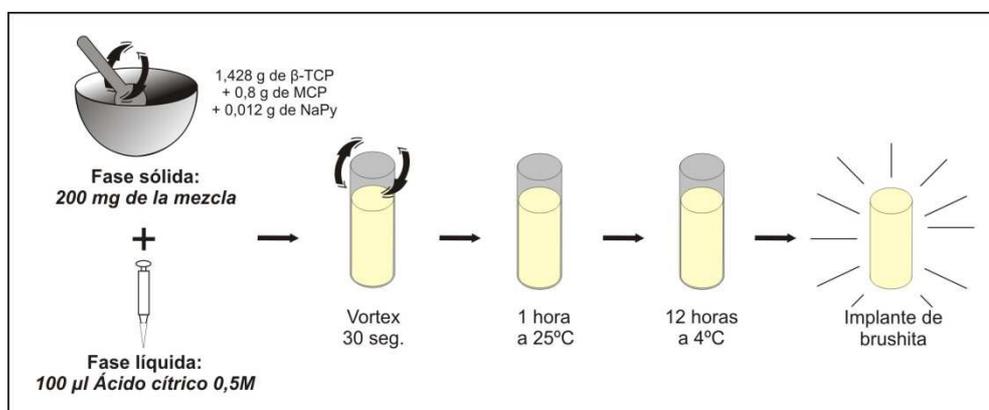


Figura 3.4.- Esquema ilustrativo de la elaboración de los implantes de brushita

3.4.- Elaboración de los implantes de brushita conteniendo varios GFs

3.4.1.- Elaboración de los sistemas brushita-chitosano, conteniendo PDGF y VEGF

El PDGF (250 ng) reconstituido tal y como se describe en el apartado 3.1 y su correspondiente trazador radiactivo ^{125}I -PDGF (0,5-2 μCi) tal y como fue suministrado, se incorporaron en la fase líquida. El VEGF (350 ng), pre-encapsulado en las microesferas de alginato e incluidas en la matriz de doble recubrimiento de chitosano (elaboración descrita en el apartado 3.2.2) se incorporó al molde con la pasta de cemento antes de que se completara el fraguado (Fig. 3.5). Todas las formulaciones se elaboraron con una matriz de chitosano (CH-2) en su interior, con o sin VEGF según el grupo experimental.

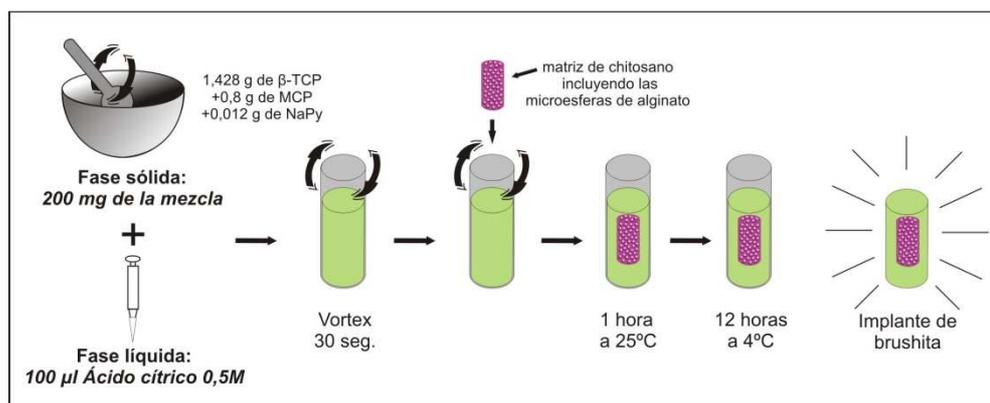


Figura 3.5.- Esquema ilustrativo de la elaboración de los sistemas conteniendo PDGF (disperso en la brushita) y VEGF (encapsulado en microesferas de alginato e incluidas en una matriz de chitosano).

3.4.2.- Elaboración de los sistemas brushita-microesferas de PLGA conteniendo VEGF, PDGF y TGF- β_1

En la elaboración de estos sistemas se utilizó β -TCP disponible comercialmente (Fluka).

El PDGF (250 ng) y el TGF- β (100 ng) en disolución se incorporaron en la fase líquida. El VEGF (350 ng), se incorporó, pre-encapsulado en microesferas de PLGA, cuya elaboración se describió en el apartado 3.2.3. Las microesferas de PLGA se añadieron en la fase sólida del cemento (Fig. 3.6). Todas las formulaciones se elaboraron con un total de 20 mg de microesferas en su interior, con VEGF o sin VEGF según el grupo experimental.

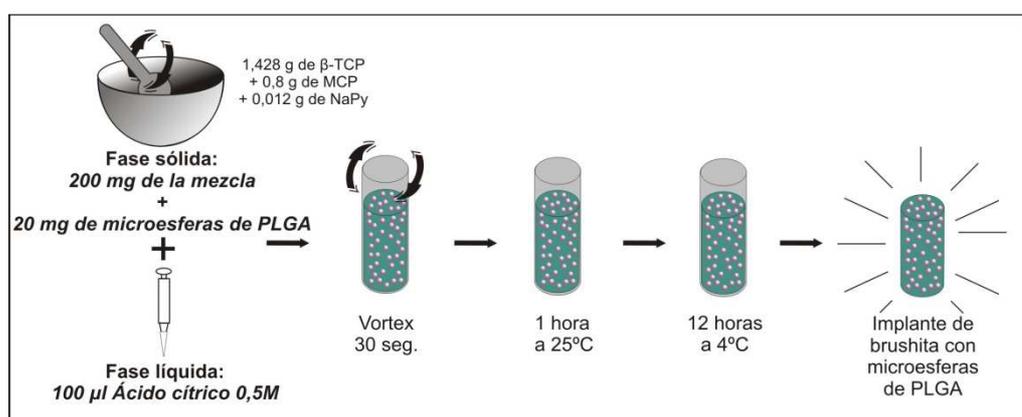


Figura 3.6.- Esquema ilustrativo de la elaboración de los sistemas conteniendo PDGF, TGF- β (ambos dispersos en la brushita) y VEGF (encapsulado en microesferas de PLGA).

3.5.- Caracterización de los sistemas

3.5.1.- Tamaño de partícula de las microesferas conteniendo VEGF

a) Microesferas de alginato

El tamaño de partícula tanto de las microesferas de alginato recién elaboradas, como de las liofilizadas y de las rehidratadas, es decir, tras su incubación en medio acuoso, se determinó usando un microscopio Hund Wetzlar SM33 con cámara acoplada (Nikon DS-2M) y el programa de imagen Nikon NIS-Element AR 2.30. Para determinar el tamaño de partícula de las microesferas recién elaboradas y de las rehidratadas, éstas se deben incubar durante 2 minutos con una disolución de azul de metileno (100 µl), tras lo cual se lavan con agua destilada. El tamaño de partícula de las microesferas liofilizadas se determina sin tratamiento previo. La medida se realiza sobre 300 partículas. La comparación de los tamaños de partícula se realizó a través de los correspondientes diámetros medios acumulados para el 50% y 90% de las partículas.

b) Microesferas de PLGA

La distribución de tamaño de las microesferas de PLGA fue obtenida por difracción de luz láser (Coulter ® LS100), expresándose los resultados obtenidos según una distribución en volumen.

3.5.2.- Determinación de la eficiencia de encapsulación del VEGF en las microesferas

La eficiencia de encapsulación del VEGF se determinó a través de la medida de los niveles de radiactividad en tres alícuotas de microesferas liofilizadas, bien de alginato o de PLGA, usando un contador gamma (Cobra II, Packard). La radiactividad obtenida por peso de microesferas, se comparó con la radiactividad inicial de ^{125}I -VEGF utilizado como trazador en la preparación del lote.

3.5.3.- Determinación del contenido y distribución de los ^{125}I -GFs en los distintos sistemas.

De la misma manera que las microesferas, el contenido de los GFs en los sistemas, se determinó midiendo la radiactividad total en cada uno de ellos. En el caso de las matrices de quitosano, la posible pérdida de GF durante el proceso de elaboración de las mismas, se controló midiendo los niveles de radiactividad en la disolución de agente entrecruzante y en el agua de lavado.

La distribución espacial de los GFs en los distintos sistemas se estudió midiendo la radiactividad (Cobra II, Packard) en las tres secciones (los dos extremos y el centro), previamente pesadas, en las que se dividió cada implante.

3.5.4.- Porosimetría de mercurio

La porosidad y la distribución de diámetro de poros de los distintos sistemas 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. De acuerdo con la ecuación de Washburn (ecuación 3.1):

$$D = \frac{-4\gamma \cos\theta}{P} \quad (\text{ec. 3.1})$$

donde P es la presión aplicada (desde 0.5 hasta 58000 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 cc y 0,42 cc de stem.

3.5.5.- Resistencia a la fractura

Las propiedades mecánicas de los implantes de brushita, tanto de los sistemas brushita-chitosano como de brushita-microesferas de PLGA se evaluaron utilizando un durómetro (Erweka, modelo THB 100). El ensayo consiste en la medida de la carga axial aplicada para producir la rotura del implante (“fuerza de rotura”). El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

La resistencia a la fractura de cada uno de los sistemas evaluados se estimó a partir de la siguiente ecuación (ec. 3.2)

$$\text{Resistencia a la fractura (MPa)} = \frac{2F}{\pi Ld} \quad (\text{ec. 3.2})$$

Donde F es la fuerza de rotura (en Newton), L y d la longitud y el diámetro del implante respectivamente, expresados ambos en mm.

3.6.- Estudios *in vitro*

3.6.1.- Ensayos de cesión *in vitro*

El estudio de la cinética de liberación de los GFs *in vitro* se llevó a cabo en incubador de CO₂ (5% de CO₂, humedad relativa del 95% y 37° C) usando como medio de cesión, 2 ml de α-MEM (Minimal Essential Medium, Sigma Aldrich) con 2% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y 0,02% de azida sódica (Roth) ó D-MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) con 2% de FBS (Gibco) y 0,02% Azida sódica (Roth) según la formulación. Los ensayos se realizaron en tubos de polipropileno "vent valve" que permitieron el intercambio de gases con la atmósfera del incubador y bajo agitación lenta (75 rpm) usando un agitador orbital (Mini Orbital Shaker SO₅ Stuart Scientific). 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 ¹²⁵I-GF cedido desde cada una de las formulaciones ensayadas se estimó teniendo en cuenta la actividad inicial en el sistema y el decay del ¹²⁵I. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.6.2.- Estabilidad del marcaje del ¹²⁵I-GF en medio de cesión

La integridad del marcaje de los GFs con el ¹²⁵I 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 ¹²⁵I-GF (1μCi/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 7μl y se deposita

sobre una tira (0,9 cm x 8 cm) de sílica gel (60 F₂₅₄, 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 ¹²⁵I-GF (Rf = 0) mientras que la que se detecta en el frente corresponde al ¹²⁵I libre (Rf = 1).

3.6.3.- Bioactividad del VEGF

Este estudio sólo se llevó a cabo con el VEGF porque fue el único GF que se pre-encapsuló antes de incluirlo en los diferentes sistemas estudiados. La actividad del VEGF liberado desde las microesferas tanto de alginato como 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 que nos fueron cedidas por el Dr. Díaz (Hospital Universitario de Canarias), fueron expandidas en placas de cultivo gelatinadas 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), 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 50µl/ml de estreptomina.

Para el ensayo de actividad del VEGF, se sembraron 5 x 10³ 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 añaden otros 150 µl de medio conteniendo

concentraciones estándar de VEGF (0-4 ng/ml) o conteniendo alícuotas procedentes de la incubación de las diferentes formulaciones durante 1 ó 7 días. Al cabo de 3 días de la siembra se lleva a cabo un cambio de medio en las células y éste se suplementa nuevamente con las mismas disoluciones estándar de VEGF o con las alícuotas procedentes de los medios de incubación correspondientes a las formulaciones ensayadas, según cada caso.

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 (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. El método consiste en incubar las células con una solución de XTT (0,5 μ l de disolución de XTT/ μ l medio de cultivo, Cell proliferation Kit, Roche) durante 2 horas, tras lo cual el color desarrollado se cuantifica 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 formulaciones tras 1 y 7 días de incubación se determinó por comparación con la inducción de la proliferación celular obtenida en las células tratadas con concentraciones conocidas de VEGF (estándares). Además, para verificar el efecto del VEGF, se utilizaron como blancos HUVECs sin tratar (concentración cero de VEGF).

3.6.4.- Evolución temporal de las características de los sistemas

a) Hinchamiento de las microesferas de alginato

Se estudió la capacidad de hinchamiento de las microesferas liofilizadas determinando el tamaño de partícula (tal y como se describe en el apartado 3.5.1 a) antes y después de 1, 2 y 9 días de incubación en el medio de cesión.

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

Para llevar a cabo estos ensayos, los sistemas fueron incubados en 2 ml de medio de cesión, en las mismas condiciones que se describen para los ensayos de cesión (apartado 3.6.1). La captación de agua y la pérdida de masa fueron determinadas gravimétricamente. Para ello, cada cierto intervalo de tiempo se retira 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 la ecuación (3.3) y (3.4) respectivamente. El ensayo se realiza por triplicado.

$$\text{Captación de agua (\%)} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100 \quad (\text{ec. 3.3})$$

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = [(W_0 - W_d) / W_0] \times 100 \quad (\text{ec. 3.4})$$

donde,

W_w es el peso de la muestra húmedo 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.

c) Determinación del peso molecular del PLA-H por GPC

El peso molecular medio del PLA-H antes y durante los ensayos de cesión *in vitro* fue determinado por cromatografía de permeación en gel (GPC) relativa a patrones de poliestireno monodisperso (Tokyo Soda Ltd.). Se utilizó un equipo Waters® con detector de índice de refracción (Modelo 410), horno calefactor para mantener la temperatura (31°C) de las tres columnas colocadas en serie (Waters Styragel® HR 4, HR 3 y HR 1) y que permiten la resolución de pesos moleculares entre 100 y 500.000 y el programa Maxima 820, para la adquisición y tratamiento de datos. La fase móvil empleada fue tetrahidrofurano (Merck) a un flujo de 1 ml/min. El volumen inyectado de muestra fue de 20 µl y el tiempo de análisis de 45 minutos.

d) Estructura microporosa

La estructura superficial e interna de las matrices antes, durante y al final del ensayo de cesión fue examinada por microscopía electrónica de barrido (SEM, Jeol® JSM-6300, Tokyo) a 15 kV, previo recubrimiento con oro/paladio bajo atmósfera de argón.

La distribución del diámetro de poro y la porosidad de los sistemas se midió al principio y al final de los ensayos de cesión *in vitro* usando un porosímetro de intrusión de mercurio (Autopore IV 9500, Micromeritics Instrument Co).

3.7.- Estudios *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 ajustan a E.C. Guideline (86/609/CEE). Los animales utilizados en estos ensayos fueron ratas Wistar machos con pesos comprendidos entre 250 y 280 g y conejos neozelandeses machos con pesos entre 3 y 3,5 kg. Los animales antes y después de someterlos a la intervención quirúrgica fueron 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.

3.7.1.- Técnica quirúrgica: defecto óseo

En primer lugar se pesa el animal y se anestesia con ketamina (35 mg/Kg) y xilazina (5 mg/Kg), vía intramuscular. Tras ello, se procede al afeitado de la pata trasera derecha. Posteriormente se traslada al animal al área quirúrgica donde se realiza la limpieza de la zona a intervenir, delimitándola seguidamente con povidona yodada (Betadine®). Tras la colocación de los campos 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 hacia el lado interno, tras la artrotomía correspondiente. Esta maniobra se acompaña de un movimiento de flexo-extensión de la rodilla, que deja expuestos los cóndilos femorales.

El defecto óseo consistió en una perforación practicada en la región intercondílea del fémur con una fresa dental Shanon Burr de 1,8 mm para ratas (Fig. 3.7) y de 6 mm para los conejos (Fig. 3.8) 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).



Figura 3.7.- Realización del defecto óseo en rata.

Tras la limpieza de la viruta ósea (producto del fresado) para evitar posibles calcificaciones periarticulares que alterarían los resultados radiológicos, el sistema de cesión fue introducido con pinzas, en el defecto óseo practicado en el fémur.

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 a continuación se coloca cada animal en una jaula independiente, provista 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.

Los conejos reciben antes de la intervención y cada 12 horas una dosis de buprenorfina (Buprex[®], 25 µg/Kg) durante las 36 primeras horas del periodo postoperatorio y durante los cuatro días siguientes se aplica povidona yodada (Betadine[®]) sobre la herida. Las ratas, así mismo, reciben postoperatoriamente metamizol magnésico vía intramuscular (Nolotil[®], 60

mg/Kg) en una sola administración. Tras la intervención, el estado general de los animales se controla durante varios días.

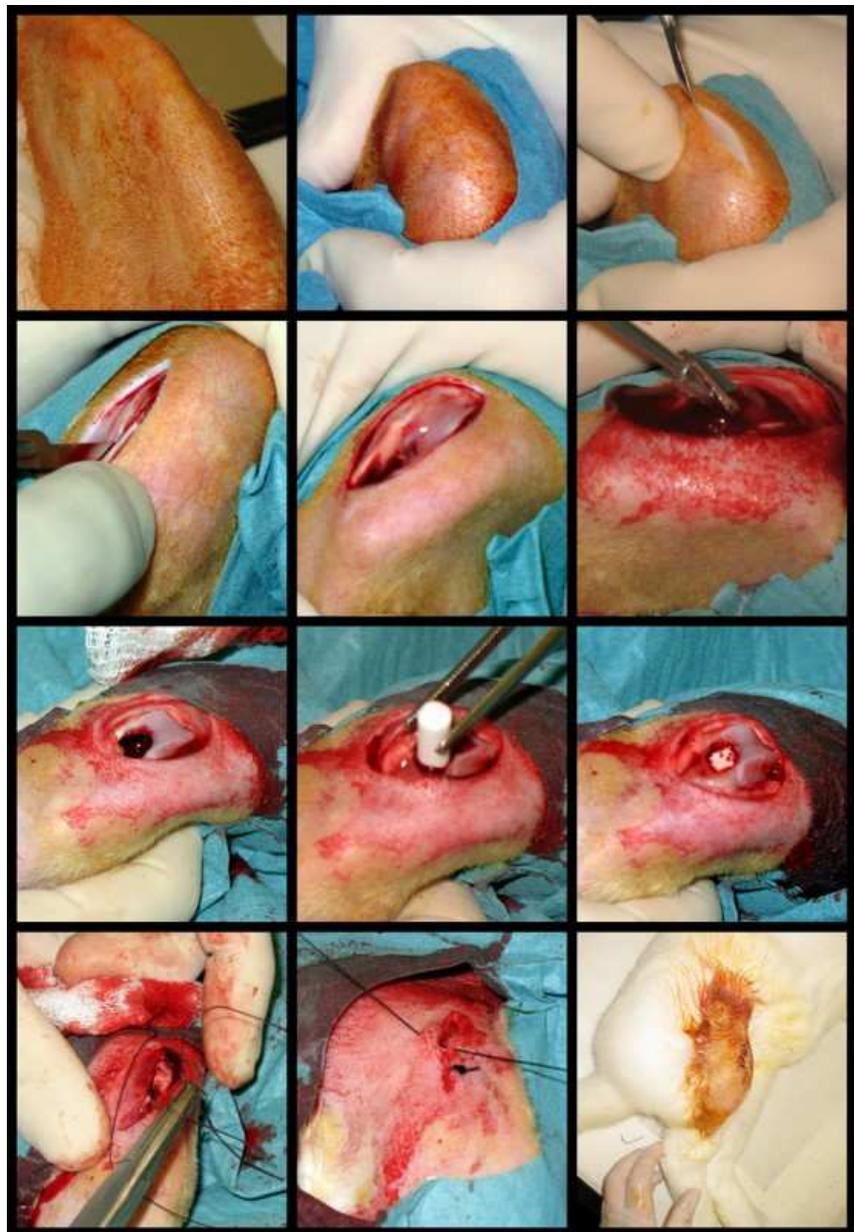


Fig. 3.8.- Imágenes del procedimiento quirúrgico en conejo.

3.7.2.- Determinación del perfil de cesión in vivo (método no invasivo).

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 J.J. 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 2 cm de diámetro en el caso de las ratas (Fig. 3.9) y de 3,2 x 2 cm para los conejos.



Figura 3.9.- Ejemplo de la medida de la radiactividad mediante el método no invasivo en rata.

A cada tiempo muestreado, se toman cinco medidas a 27 KeV, máximo de emisión del ^{125}I durante 1 minuto. Los valores mayor y menor fueron excluidos y la media de las tres medidas restantes se toma como la radiactividad remanente para el tiempo muestreado.

La medida inicial tras la administración (tiempo 0) 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 de 5 animales.

3.7.3.- Ensayo de biodistribución de los GFs (método invasivo).

Para determinar la biodistribución de los GFs, las medidas de radiactividad en los distintos tejidos (fémur, músculo adyacente, tiroides y sangre) se llevaron a cabo usando un contador gamma tipo pozo (Cobra II®, Packard). Para cada tiempo de muestreo, se sacrificaron 3 animales (previamente anestesiados) mediante inhalación de CO_2 . Se les extrajo el fémur y se recuperó el implante. El fémur, libre de tejido blando, se dividió en partes (Fig. 3.10 a y b). La radiactividad tanto de las muestras de tejido como de los implantes se midió en el rango de energía del ^{125}I (15 - 75 KeV) durante 30 segundos.

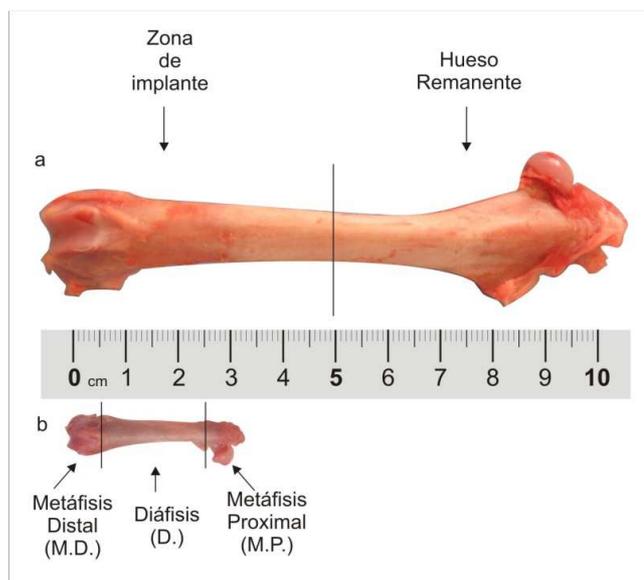


Figura 3.10.- Partes en las que se dividió el hueso. Modelo de fémur de conejo (a) y de rata (b)

3.7.4.- Planificación de los ensayos de cesión *in vivo*

a) Matrices de chitosano conteniendo VEGF

Los sistemas CH-1, CH-2 y CH-1-PLA conteniendo exclusivamente VEGF (^{125}I -VEGF/VEGF) encapsulado en microesferas de alginato fueron estudiados en ratas.

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizaron 3 grupos animales:

Grupo CH-1, formado por 15 ratas a las que se administró las microesferas de VEGF-alginato embebidas en una matriz de chitosano.

Grupo CH-2, formado por 15 ratas a las que se administró las microesferas de VEGF-alginato embebidas en una doble matriz de chitosano

Grupo CH-1-PLA, formado por 12 ratas a las que se administró la formulación CH-1 recubierta con PLA-H.

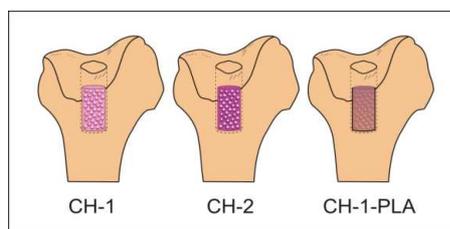


Figura 3.11.- Ilustración de los grupos de sistemas de chitosano estudiados *in vivo* (rata)

b) Sistemas brushita-chitosano conteniendo PDGF y VEGF

Para realizar estos experimentos se utilizaron dos grupos de conejos.

Grupo P-CH, formado por 12 animales tratados con los implantes conteniendo PDGF disperso en la brushita (^{125}I -PDGF/PDGF) y la matriz de chitosano blanca (sin proteína).

Grupo V-CH de 18 animales, fue tratado con los implantes de brushita conteniendo el VEGF (^{125}I -VEGF/VEGF) encapsulado en microesferas de alginato e incluidas en una matriz de chitosano (CH-2).

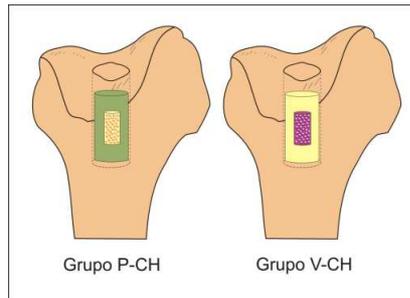


Figura 3.12.- Ilustración de los grupos de brushita-chitosano estudiados *in vivo* (conejo)

c) Sistemas brushita-microesferas de PLGA conteniendo PDGF, VEGF y TGF- β_1

Estos experimentos se llevaron a cabo en tres grupos de conejos.

Grupo P, formado por 12 animales tratados con los implantes conteniendo PDGF disperso en la brushita (^{125}I -PDGF/PDGF) + 20 mg de microesferas de PLGA blancas.

Grupo T, formado por 10 animales tratados con los implantes conteniendo TGF disperso en la brushita (^{125}I -TGF/TGF) + 20 mg de microesferas de PLGA blancas.

Grupo V, de 17 animales, fue tratado con los implantes de brushita blancos conteniendo el VEGF (^{125}I -VEGF/VEGF) pre-encapsulado en las microesferas de PLGA (11 mg) + 9 mg de microesferas blancas.

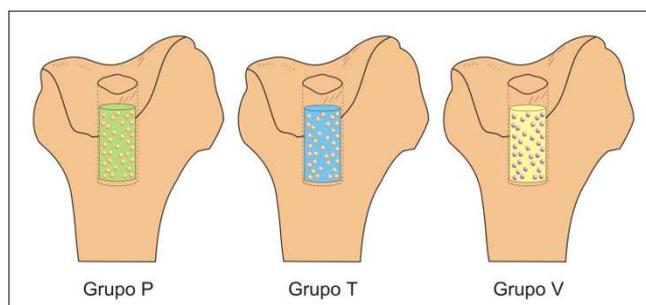


Figura 3.13.- Ilustración de los grupos de brushita-microesferas de PLGA estudiados *in vivo* (conejo)

3.7.5.- Análisis histológico e histomorfométrico del fémur sin decalcificar

La evaluación histológica se realizó a las 4 semanas de la administración de cada uno de los sistemas ensayados en fémur de conejo.

El efecto regenerativo y angiogénico tanto de los GFs por separado como de las combinaciones de PDGF, VEGF y TGF- β_1 , cedidos desde los dos tipos de implantes de brushita elaborados en este trabajo, se analizó sobre cada uno de los siguientes grupos, formados por 6 conejos cada uno.

Grupo C: defecto sin tratar

a) Implantes de brushita-chitosano

Grupo B1: defecto con implante blanco

Grupo P: defecto con implante conteniendo 250 ng de PDGF disperso

Grupo VP: defecto con implante conteniendo 250 ng de PDGF disperso y 320 ng VEGF en microesferas de alginato incluidas en la matriz de chitosano.

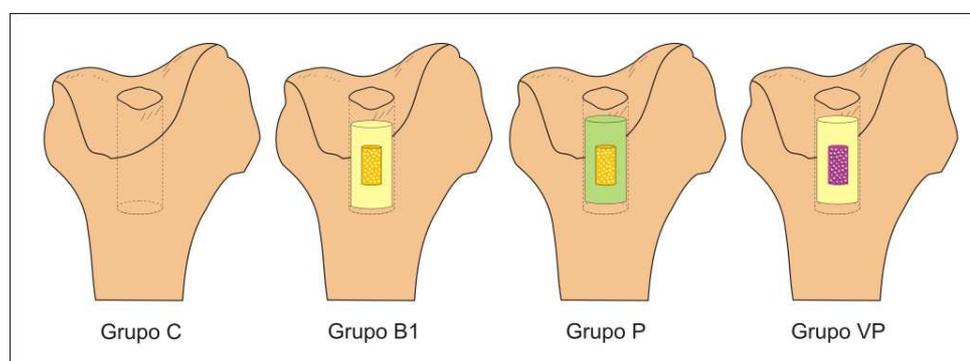


Figura 3.14.- Ilustración de los grupos de brushita-chitosano estudiadas histológicamente.

b) Implantes de brushita-microesferas de PLGA

Grupo B2: defecto con implante blanco

Grupo T: defecto con implante conteniendo 100 ng de TGF disperso.

Grupo V: defecto con implante conteniendo 320 ng de VEGF en microesferas de PLGA.

Grupo VT: defecto con implante conteniendo 100 ng de TGF disperso y 320 ng de VEGF en microesferas de PLGA.

Grupo VPT: defecto con implante conteniendo 250 ng de PDGF, 100 ng de TGF dispersos y 320 ng de VEGF en microesferas de PLGA.

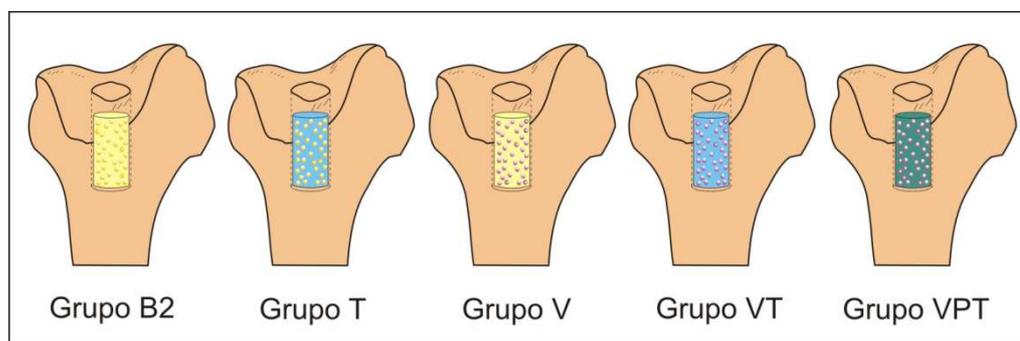


Fig.3.15.- Ilustración de grupos de brushita-microesferas de PLGA estudiadas histológicamente.

Para marcar el frente de mineralización del hueso, todos los animales recibieron 40 mg/kg de clorhidrato oxitetraciclina por vía IM y 15 mg/kg de calceína azul por vía SC a los 12 y 4 días antes del sacrificio, respectivamente.

Para realizar el análisis histológico, a las cuatro semanas post-implantación se sacrificaron los animales y se les extrajo el fémur tratado. Inicialmente, se procede al corte longitudinal del fémur con una sierra fina, para posteriormente llevar a cabo un corte transversal que permita separar la

zona donde se encuentra situado el sistema de liberación (metáfisis distal) junto con la epífisis distal del resto del fémur.

El hueso es entonces fijado con 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 y se introdujeron en metilmetacrilato (MMA). Por último, se procede a la polimerización de las muestras a 32°C durante 3 días.

Después de la polimerización, se cortaron secciones longitudinales con un microtomo (Leica SM 2500) de 10µm de espesor que fueron recogidas en portas xilanizados. Las secciones fueron posteriormente desplastificadas en xilol-cloroformo proporción (1:1), e hidratadas usando disoluciones de concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada.

Para evaluar la neoformación ósea, estas secciones fueron teñidas con von Kossa (Nitrato de plata al 3% 5 minutos, Formol-carbonato de sodio 5 minutos, Escarlata de Biebrich-Fucsina ácida 15 minutos, Ácido fosfofungstico-Orange G 10 min.) y con la tinción tricrómica de Masson-Goldner (Hematoxilina férrica de Weigert 5 min., Escarlata de Biebrich-Fucsina ácida 15 min., Ácido Fosfofungstico-Orange G 10 min., Verde luz 2% 15 min.), tras lo cual, las secciones fueron nuevamente deshidratadas usando disoluciones de concentraciones crecientes de alcohol, aclaradas en xilol y montadas con eukitt para su posterior evaluación histológica.

Para valorar la angiogénesis, las secciones fueron teñidas con un antisuero policlonal anti-factor de von Willebrand, un marcador de vasos sanguíneos.

Las secciones utilizadas para valorar el proceso de mineralización ósea con los diferentes fluorocromos, no fueron sometidas a ninguna tinción y fueron analizadas con un microscopio óptico LEICA DM 4000B provisto de

lámpara de mercurio para fluorescencia, acoplado a una cámara digital (LEICA DFC 300 FX).

Para el análisis histomorfométrico, se evaluaron cuatro secciones por animal, obtenidas de la zona central del implante, usando el sistema de análisis de imagen (Leica Q-win V3 Pro-image system, Barcelona, Spain). La valoración se realizó en una región de interés (ROI) que incluyó tanto la zona del defecto como la zona más adyacente al mismo. La ROI comprendió una superficie cuadrangular de 5 x 5,5 mm situada en la mitad superior del defecto óseo, región correspondiente a la epífisis proximal del fémur, y en la cual la neoformación ósea y la osteointegración del implante podían ser evaluadas de forma objetiva (Fig. 3.16).

La valoración de la respuesta reparadora se realizó mediante cuantificación de la superficie de hueso neoformado por un lado y de la tasa de aposición mineral por otro.

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-Goldner y negro para von Kossa). La superficie de hueso neoformado se expresó en mm².

La tasa de aposición mineral se cuantificó midiendo la distancia entre los dos frentes de mineralización marcados con tetraciclina y calceína respectivamente y dividiendo dicho valor por el tiempo transcurrido entre los dos pulsos de marcaje. La tasa de aposición mineral se expresó en $\mu\text{m}/\text{día}$.

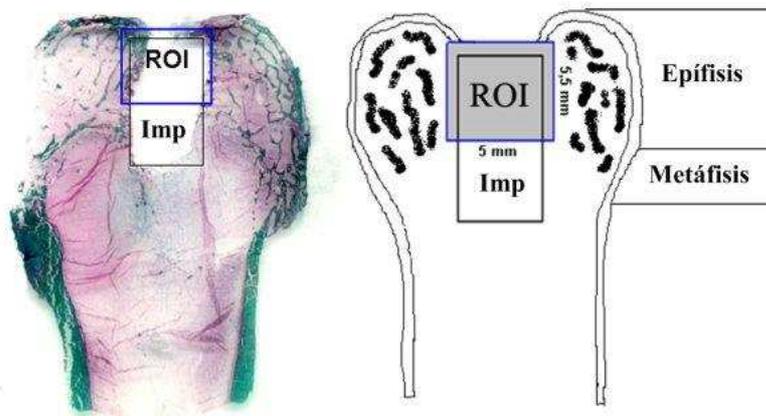


Fig.3.16.- Sección horizontal de fémur de conejo tratado con un implante de brushita-chitosano (B-CH) en la región correspondiente a la epífisis y metáfisis. El rectángulo indica la localización del implante y el cuadrado sombreado indica la región de interés (ROI) donde se midió la neoformación ósea, la mineralización (MAR) y la neovascularización.

Para estudiar el efecto de los factores de crecimiento sobre la vascularización. La tinción con el antisuero policlonal anti-Factor de von-Willebrand (DAKO, Barcelona, Spain), se realizó mediante una técnica inmunohistoquímica indirecta. Para ello, las secciones se desplastificaron en una mezcla de xilol-cloroformo (1:1) 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-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, Spain) (1/1000) 60 minutos. La actividad peroxidasa se reveló con una solución 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.

4.- RESULTADOS

4.1.- Características de los sistemas de liberación de GFs

4.1.1.- Matrices de alginato y de quitosano conteniendo microesferas de VEGF-alginato

El rendimiento de encapsulación del VEGF en las microesferas de alginato preparadas con una proporción VEGF/alginato fija de 50 ng/mg fue del $50,7 \pm 9,5\%$ (tabla 4.1), con un rendimiento de producción del $44,0 \pm 3,8\%$

Dado que el alginato es un hidrogel y, por tanto, su volumen se modifica con el grado de hidratación, las medidas de tamaño de estas partículas se llevaron a cabo sobre las microesferas recién preparadas, una vez liofilizadas y tras ser rehidratadas en medio de cesión (Tabla 4.1).

Lote	EI %	Diámetro de partícula (μm)					
		Antes de liofilizar		Después de liofilizar		Microesferas rehidratadas (Día 1)	
		< 50%	< 90%	< 50%	< 90%	< 50%	< 90%
1	60,4	339,6	435,1	220,0	302,0	420,0	480,0
2	41,5	422,9	649,4	164,5	272,0	366,0	549,2
3	50,2	341,8	642,6	209,4	286,9	406,3	648,2
Media	50,7	368,1	575,7	198,0	287,0	397,5	592,4
sd	9,5	47,5	121,8	29,5	15,0	28,0	50,7

Tabla 4.1.- Eficiencia de incorporación y diámetros medios correspondientes al 50% y 90% acumulado de la distribución de tamaño de partículas, correspondientes a tres lotes de microesferas de VEGF-alginato.

Durante el proceso de liofilización el diámetro medio de partícula se reduce aproximadamente a la mitad, volviendo a alcanzar su tamaño inicial tras 1 día de incubación en medio acuoso, no observándose incremento de tamaño al mantenerse en incubación durante un periodo de 9 días (Fig. 4.1).

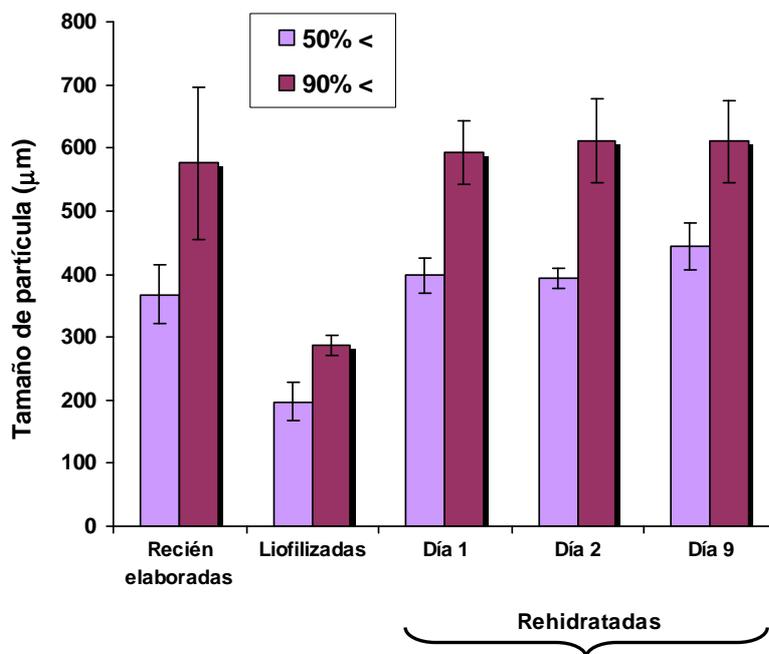


Figura 4.1.- Diámetro de partícula de las microesferas recién elaboradas, liofilizadas y de las rehidratadas.

Los sistemas elaborados incorporando las microesferas de VEGF-alginato en matrices de alginato o chitosano presentaron una forma cilíndrica con un tamaño (diámetro x alto) de 2,5 x 4 mm, perteneciente a las matrices A-1 hasta 3,8 x 5,2 mm en las de CH-1-PLA. El peso medio también varió desde $8,3 \pm 0,55$ mg en las matrices A-1 hasta $13,7 \pm 1,21$ mg correspondiente a las matrices CH-1-PLA.

Durante el proceso de incorporación de las microesferas de alginato en las matrices, tanto de alginato como de quitosano, las pérdidas de VEGF que se produjeron fueron despreciables, tal y como indicaron las medidas de radiactividad en los medios de entrecruzamiento y lavado, los cuales fueron del orden, o ligeramente superiores, a los niveles de fondo en el contador usado.

También se comprobó la distribución de las microesferas en las matrices. La radiactividad medida en cada una de las tres secciones, dos extremos y una central, en las que se dividieron las matrices fue del 30-35%, indicando una distribución homogénea de las microesferas de VEGF a lo largo del sistema.

4.1.2.- Implantes de brushita-chitosano conteniendo PDGF y VEGF

La eficacia de encapsulación del VEGF en las microesferas de alginato y rendimiento de producción de las mismas, elaboradas con una carga fija de 100 ng/mg, fue similar a las preparadas con una carga de 50 ng/mg.

Las matrices cilíndricas de quitosano (CH-2) conteniendo 7 mg de las anteriores microesferas, presentaron un tamaño (diámetro x alto) de 3,2 x 4 mm y un peso de $12,7 \pm 0,81$ mg.

Por último, los sistemas completos, implantes cilíndricos de brushita conteniendo las matrices de quitosano (CH-2) (Fig 4.2) presentaron un tamaño (diámetro x alto) de 4,8 x 10 mm y un peso de $296,7 \pm 9,35$ mg.



Figura 4.2.- Implante cilíndrico de brushita-chitosano

Los resultados de la distribución de la radiactividad en el sistema indicaron que el ^{125}I -PDGF se encuentra uniformemente distribuido a lo largo del implante, localizándose aproximadamente el 30-35% de la radiactividad (normalizado por peso) correspondiente a este factor en cada una de las tres secciones medidas. Por el contrario, en el caso del ^{125}I -VEGF, la radiactividad se concentra en el centro del implante, donde se localiza la matriz de chitosano. En este caso, el 65-70% de la radiactividad total se detectó en el centro y aproximadamente un 15-18% en cada uno de los extremos. Por tanto, las microesferas de VEGF-alginato se distribuye de forma homogénea dentro de la esponja de chitosano, que a su vez se mantiene centrada en el implante de brushita.

Los implantes de brushita-chitosano presentaron una resistencia a la fractura de $0,66 \pm 0,07$ MPa en comparación con los de brushita sola que fue de $1,12 \pm 0,15$ MPa.

La distribución de tamaño de poros de los sistemas de brushita-chitosano y de cada uno de los componentes por separado se muestra en la figura 4.3. La porosidad original del implante de brushita puro fue de un 39% y la del sistema brushita-chitosano se incrementó hasta un 53,1% en parte como consecuencia de la elevada porosidad de la esponja de chitosano (80%). Además, la influencia de los componentes del sistema se refleja también en la distribución bimodal del tamaño de poro obtenida.

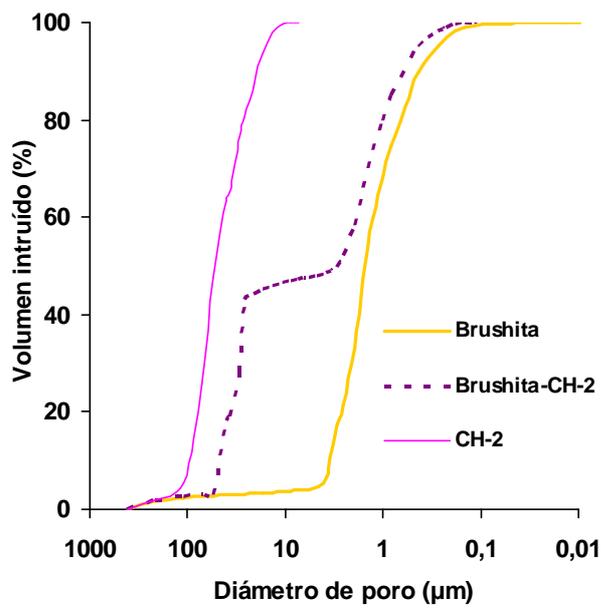
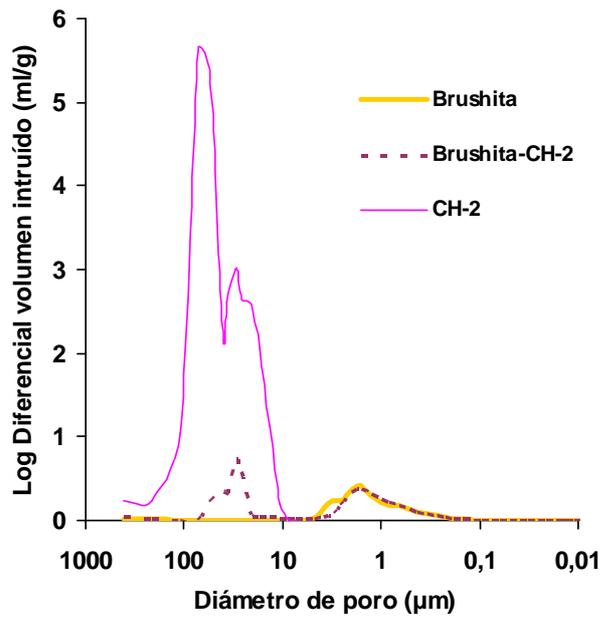


Figura 4.3.- Curvas de distribución de tamaño de poros de implantes de brushita y brushita-CH-2, así como de la matriz CH-2.

4.1.3.- Implantes de brushita-microesferas de PLGA conteniendo PDGF, VEGF y TGF- β_1

Las microesferas de PLGA (fig. 4.4) preparadas con una dosis fija de 50 ng de VEGF/mg de polímero, presentaron un rendimiento de encapsulación de un $61,7 \pm 4,9\%$ y un diámetro medio acumulado del 50% de $179,5 \mu\text{m}$. El rendimiento de producción de estas microesferas fue del $91 \pm 7,8\%$.

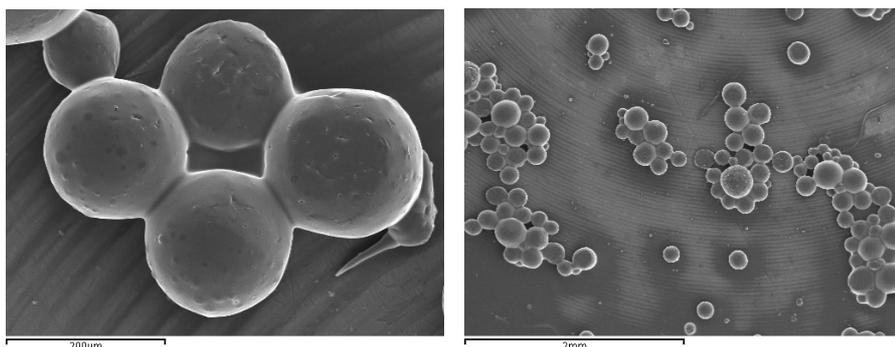


Figura 4.4.- Microfotografías SEM de las microesferas de PLGA

El peso medio de los sistemas completos, implantes cilíndricos de brushita conteniendo las microesferas de PLGA (20 mg) fue de $304,91 \pm 2,5$ mg y su tamaño (diámetro x alto) de $4,8 \times 11,90$ mm.

Los resultados de la distribución de la radiactividad en el sistema indicaron que los GFs se encuentran uniformemente distribuido a lo largo del implante, localizándose aproximadamente el 33-35% de la radiactividad correspondiente en cada una de las tres secciones medidas.

La resistencia a la fractura que presentaron estos implantes de brushita-microesferas de PLGA fue de $0,69 \pm 0,05$ MPa.

La distribución de tamaño de poros del sistema brushita-microesferas de PLGA con respecto al implante de brushita sin microesferas se muestran en la figura 4.5 Como se puede observar el implante de brushita-

microesferas de PLGA presentó tanto una distribución de tamaño de poro como una porosidad (50%) similar al implante de brushita (47%).

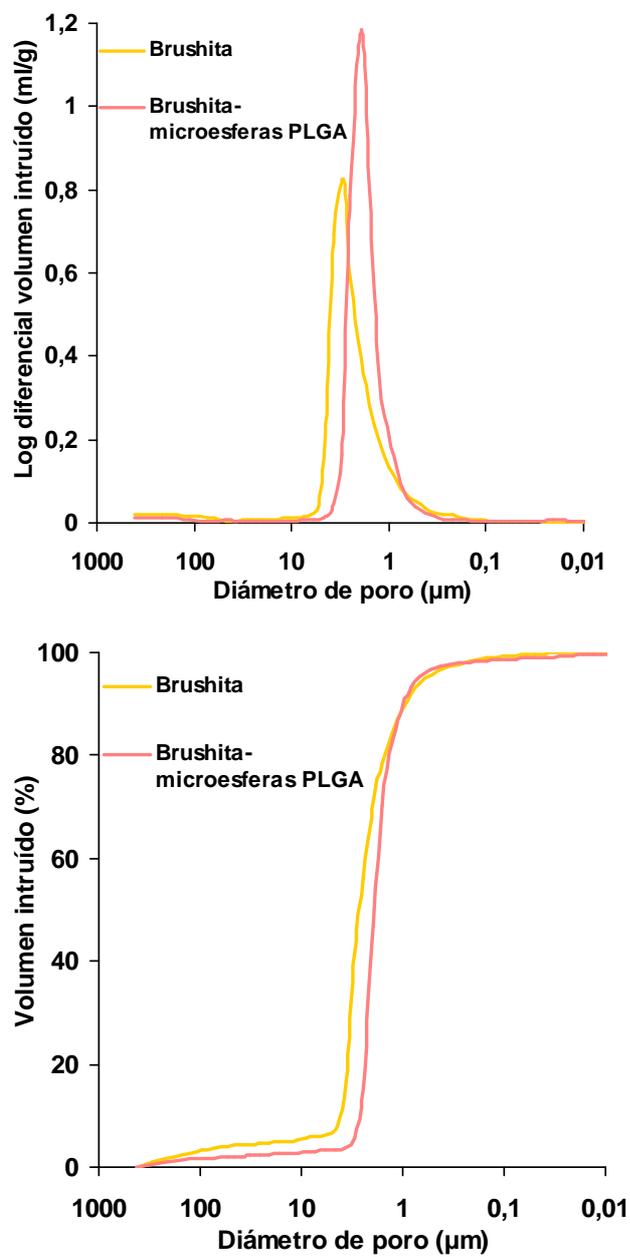


Figura 4.5.- Curvas de distribución de tamaño de poros de los implantes de brushita y brushita-microesferas de PLGA.

4.2.- Caracterización *in vitro* e *in vivo* de las matrices de alginato y chitosano conteniendo VEGF

4.2.1.- Ensayos de cesión *in vitro*

La cinética de cesión de VEGF encapsulado en las microesferas de alginato incorporado en las distintas matrices de alginato o chitosano, fue analizada usando ^{125}I -VEGF y se muestran en la figura 4.6. Los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina sobre la estabilidad del marcaje en medio de cesión, indicaron que sólo se detecta alrededor de un 16% de ^{125}I -libre al cabo de las 5 semanas que duró el ensayo comparado con el 5-7% del ^{125}I inicial.

Según se observa en la figura 4.6, el VEGF fue liberado rápidamente desde las microesferas de alginato. Aproximadamente el 75% fue cedido en los 3 primeros días, seguido de una cesión más lenta alcanzándose el 90% liberado en las 2 semanas que duró el ensayo. La alta capacidad de captación de agua por parte del alginato explicaría la rápida cesión inicial, recordemos que tras un día de incubación en medio de cesión, las microesferas de alginato liofilizadas duplicaban su tamaño.

La incorporación de las microesferas en la matriz de alginato (A-1) no modificó de forma apreciable la cinética de liberación del VEGF obtenida con las microesferas libres. En los primeros 3 días se cedió un 65% y aproximadamente un 90% durante las 2 semanas siguientes. Sin embargo, la velocidad de cesión del VEGF desde la matriz A-2 se redujo considerablemente. En las primeras 24 horas el porcentaje liberado disminuyó a un 25%, alcanzándose alrededor del 90% cedido en las 5 semanas que se prolongó el ensayo.

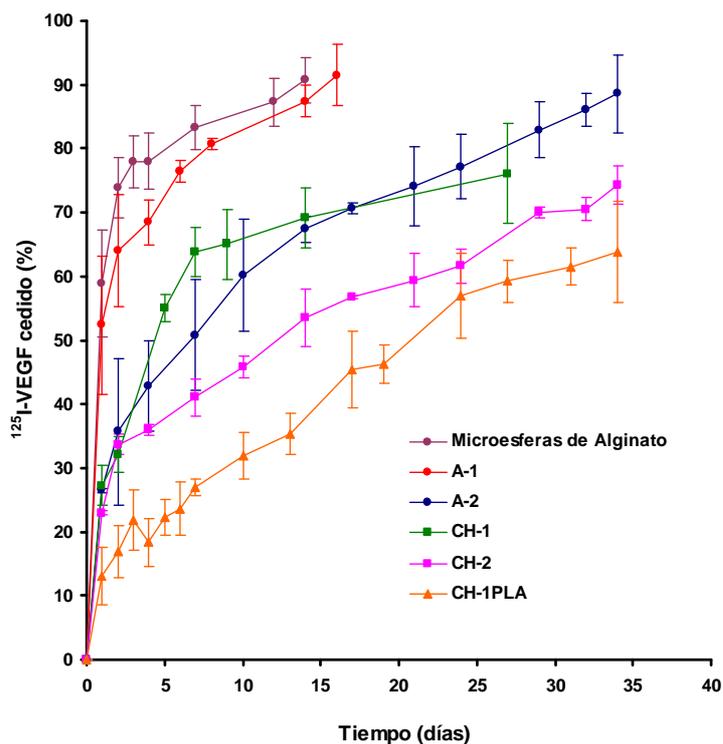


Figura 4.6.- Perfil de cesión *in vitro* de ^{125}I -VEGF desde las microesferas de alginato (7 mg), y de estas microesferas incorporadas en matrices de alginato (A-1 y A-2), chitosano (CH-1 y CH-2) o de chitosano recubierta con PLA-H (CH-1-PLA).

La inclusión de las microesferas en las matrices de chitosano resultó también eficaz para reducir la velocidad de liberación del VEGF. En las primeras 24 horas la cesión fue de aproximadamente un 25%, tanto con la matriz CH-1 como con la CH-2. Sin embargo, la mayor cantidad de chitosano presente en la composición de la matriz CH-2 se puso de manifiesto a partir de los tres primeros días. Se observó que, mientras el porcentaje de VEGF liberado desde la matriz CH-1 fue de un 65% en una semana, el porcentaje liberado desde la CH-2, en ese mismo periodo, fue de aproximadamente un 40%.

La cesión de VEGF desde las formulaciones CH-1 recubiertas con una película de PLA (CH-1-PLA) fue mucho más lenta en comparación con las anteriores. La cantidad inicial de proteína cedida se redujo hasta un 13% en las primeras 24 horas alcanzándose un 65% a las 5 semanas. En este caso, el perfil de cesión de la proteína se ajusta a una cinética de orden cero, cediéndose aproximadamente un 1,6% al día (ecuación 4.1) durante las 5 semanas que se mantuvo el ensayo.

$$\% \text{ cedido} = 14,78 + 1,58 \text{ tiempo (días)} \quad (R^2 = 0,9788) \quad (\text{ec. 4.1})$$

4.2.2.- Bioactividad del VEGF

La bioactividad del VEGF cedido tanto desde las microesferas de alginato como desde las matrices en las que posteriormente se incorporaron, se evaluó sobre cultivos de HUVECs, cuya respuesta proliferativa resultó ser dosis dependiente para concentraciones de VEGF de hasta 4 ng/ml (Fig. 4.7).

Al igual que en el estudio realizado por Patel et al., (2008) la bioactividad del factor de crecimiento cedido desde las microesferas de alginato, las cuales constituyen el nivel más básico de las formulaciones elaboradas, o desde las matrices CH-1-PLA, siendo ésta la formulación más compleja, se expresó como porcentaje de crecimiento celular con respecto al obtenido con concentraciones estándar de VEGF. Las alícuotas de VEGF procedentes de la incubación de cada una de las formulaciones ensayadas fueron analizadas tras su adecuada dilución teniendo en cuenta la concentración esperada según el perfil de cesión in vitro obtenido en cada caso (Fig. 4.6).

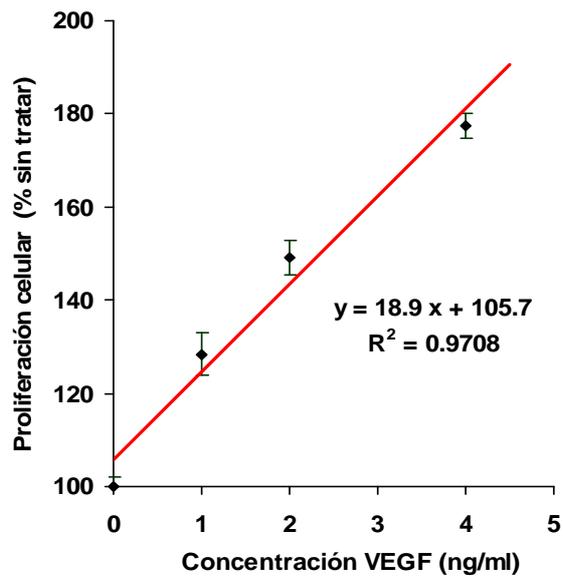


Figura 4.7.- Curva dosis-respuesta proliferativa de células HUVEC tratadas con concentraciones estándares de VEGF.

Los resultados mostraron que la actividad del VEGF cedido desde las dos formulaciones ensayadas (Fig. 4.8) se mantuvo por encima del 90% con respecto a la actividad estimada, durante al menos 7 días de incubación. Estos resultados también prueban que durante la elaboración de las distintas formulaciones no hubo pérdida significativa de bioactividad por parte del VEGF incorporado.

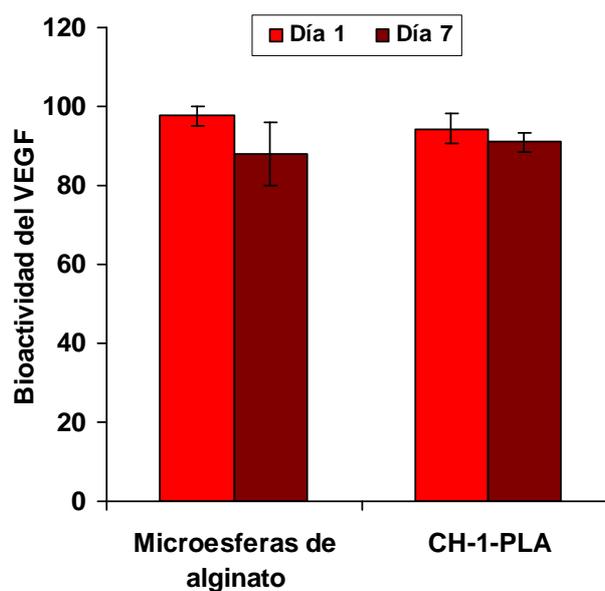


Figura 4.8.- Bioactividad del VEGF liberado, expresado como porcentaje de la proliferación celular observada con respecto a la proliferación celular esperada.

4.2.3.- Captación de agua, pérdida de masa y cambios estructurales durante el ensayo de cesión *in vitro*

La figura 4.9 recoge los resultados obtenidos en los ensayos de captación de agua y pérdida de masa para las formulaciones CH-1 y CH-1-PLA, realizados según se detalla en el correspondiente apartado 3.6.4 b.

Estos resultados muestran la gran capacidad de adsorción de agua de estos sistemas sin recubrir, si bien, se observa cómo la película de PLA limita la captación de agua y la pérdida de masa durante los ensayos de cesión desde la formulación CH-1-PLA. Se pone así de manifiesto la influencia de estos parámetros sobre el perfil de cesión del VEGF desde las formulaciones elaboradas con quitosano.

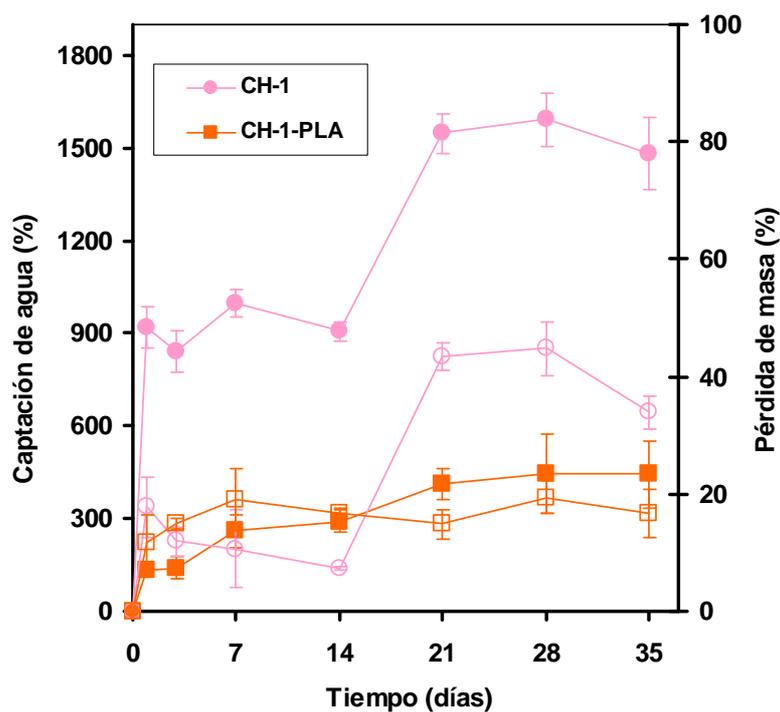


Figura. 4.9.- Perfiles de captación de agua (símbolos rellenos) y pérdida de masa (símbolos huecos) obtenidos con las formulaciones CH-1 y CH-1-PLA a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*.

A pesar de la gran pérdida de masa que sufre la formulación CH-1 durante el experimento de cesión, la distribución homogénea del VEGF en la estructura se mantuvo inalterada. La radiactividad remanente en cada una de las tres secciones en que fue dividida cada matriz tras su incubación en medio de cesión durante 3 y 5 semanas, se mantuvo en el 30-35% en cada una de las partes.

Las microfotografías de la superficie y cortes transversales de las matrices CH-1 y CH-1-PLA obtenidas por SEM (Fig 4.10) a lo largo del ensayo de cesión muestran también un aumento en la porosidad de ambas formulaciones.

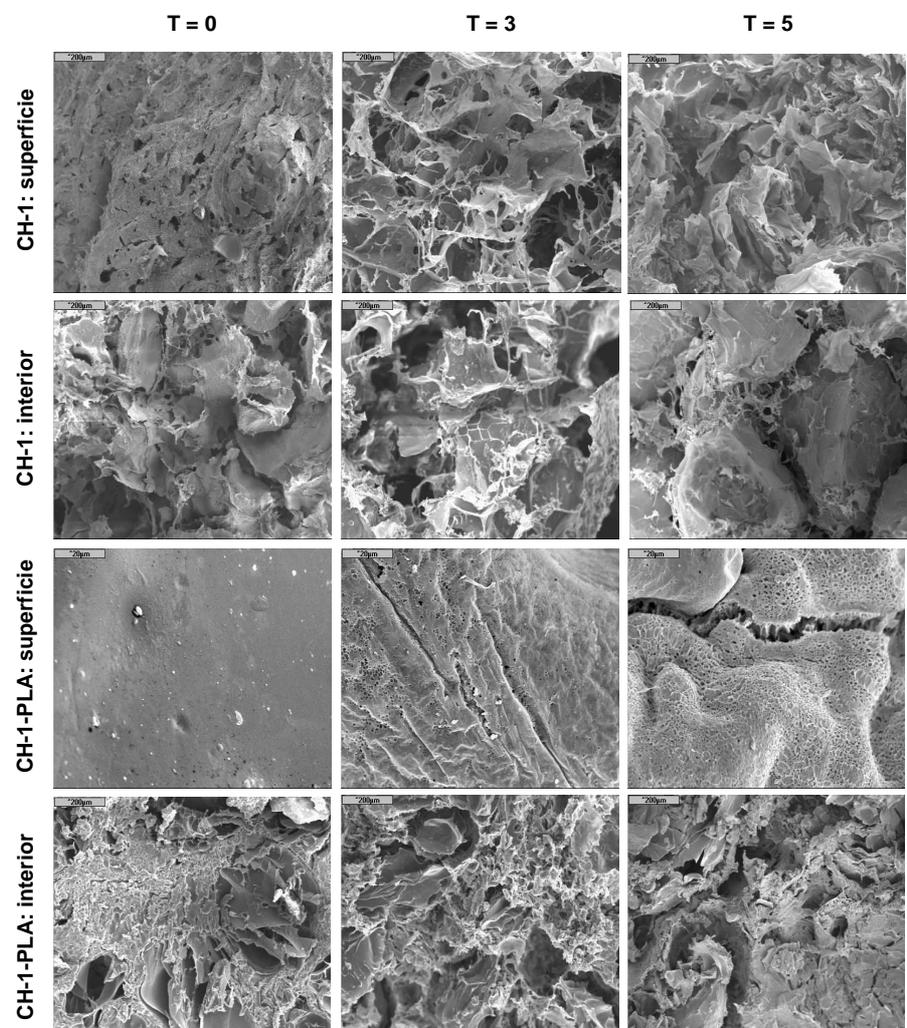


Figura 4.10.- Microfotografías de SEM; superficie y cortes trasversales de las formulaciones antes, durante y al finalizar el ensayo de cesión *in vitro* para las formulaciones CH-1 y CH-1-PLA.

La porosidad del film de PLA-H fue incrementándose de forma lenta y constante, manteniéndose prácticamente intacta la estructura interna de la matriz. Estos resultados concuerdan con la ligera reducción del peso molecular medio de la película de PLA-H, determinada por GPC, a lo largo del ensayo de cesión. Al cabo de tres semanas se redujo de 25 KDa a 20 KDa y a las cinco semanas el peso molecular fue de unos 17 KDa. Por el contrario, la porosidad de la matriz CH-1 sufrió un incremento rápido y muy acusado.

La evolución de la estructura de las formulaciones CH-1 y CH-1-PLA, durante los ensayos de cesión, en cuanto a pérdida de masa, morfología (SEM) y degradación del PLA de la cubierta se reflejan en los cambios de porosidad y distribución de tamaño de poro determinados por porosimetría de mercurio (Fig. 4.11). Inicialmente, la cubierta de PLA redujo la elevada porosidad de la matriz CH-1 de un 85,9% a un 53,1% en la formulación recubierta. Además, la matriz CH-1-PLA presentó un tamaño de poro menor y una distribución de poros más estrecha que la formulación sin recubrir. Durante los ensayos de cesión se apreció un incremento de la porosidad y una modificación de la distribución del tamaño de poro en ambas formulaciones. La porosidad total de la matriz CH-1 aumentó a un 93,3% durante las primeras 3 semanas y se mantuvo hasta el final del ensayo (5 semanas) y la distribución de tamaño de poro se desplazó ligeramente hacia tamaños mayores. De forma similar se comporta la formulación CH-1-PLA durante las primeras semanas, la porosidad aumenta hasta un 81,5% y se aprecia también un aumento en el número de poros de mayor tamaño. Sin embargo, entre la tercera semana y el final del experimento se observa un importante incremento de poros de pequeño tamaño en la cubierta de PLA que se refleja en el valor de la porosidad (86,6%). Las fotografías obtenidas por SEM (Fig. 4.10) también muestran este mismo comportamiento.

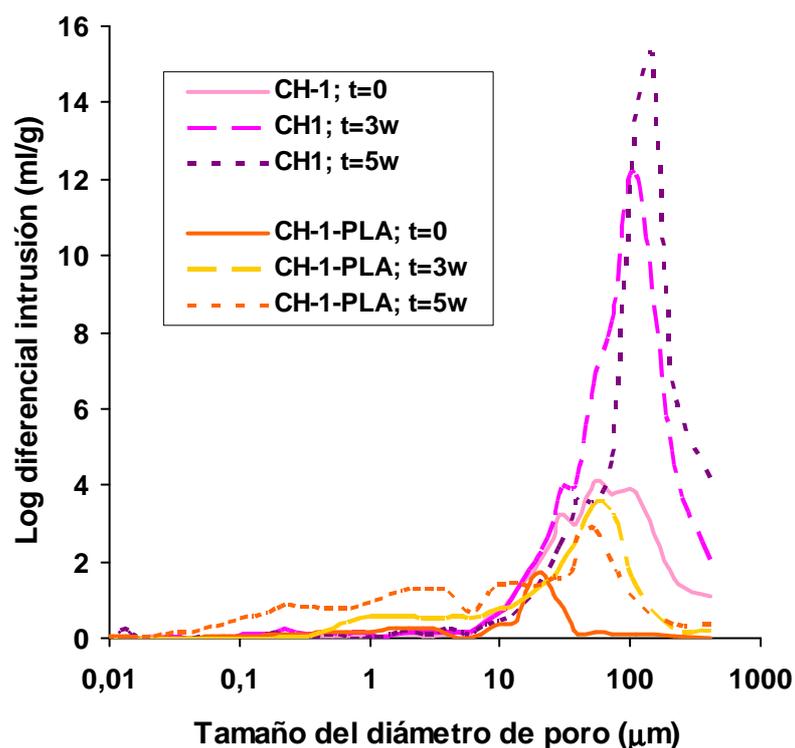


Figura 4.11.- Evolución de la distribución de tamaño de poros durante los ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones CH-1 y CH-1-PLA.

4.2.4.- Ensayos de cesión *in vivo*

Para la realización del ensayo de cesión *in vivo* se escogieron las formulaciones CH-1, CH-2 y CH-1-PLA, ya que en base a los ensayos de cesión *in vitro* fueron las que presentaron una liberación inicial menor. Para ello se insertó cada una de las formulaciones en el fémur de rata, y la cesión de VEGF fue cuantificada a través del porcentaje remanente de ^{125}I -VEGF en el lugar de implantación haciendo uso del método no invasivo descrito en materiales y métodos (apartado 3.7.2).

La figura 4.12 muestra los perfiles de cesión obtenidos con cada una de las formulaciones ensayadas. El VEGF pre-encapsulado en las microesferas de alginato, e incorporadas en matrices de quitosano (CH-1 y CH-2) mostraron una cesión inicial de aproximadamente un 50% en las primeras 24 horas, mucho mayor que la obtenida en los ensayos *in vitro*. A partir del primer día las formulaciones CH-1 y CH-2 mostraron diferentes perfiles de cesión. Desde la formulación CH-1, el VEGF se cedió de forma muy rápida; aproximadamente el 80% en menos de una semana, no detectándose cesión posterior alguna. La velocidad de cesión del VEGF desde las matrices CH-2 se reduce de forma considerable transcurridas las primeras 24 horas. Presenta una fase muy lenta durante la primera semana, seguida de una liberación más rápida, de aproximadamente un 1,7%/día, durante las dos semanas siguientes, alcanzándose el 80% cedido en 3 semanas.

A diferencia de las otras dos formulaciones ensayadas *in vivo*, la cesión inicial de VEGF desde la formulación recubierta con PLA-H presentó una liberación más controlada a lo largo de las 5 semanas que se mantuvo el ensayo. La cesión inicial de VEGF se redujo de forma notable, liberándose alrededor de un 20% durante las primeras 24 horas, seguido de una cesión sostenida de aproximadamente 15%/semana durante las tres primeras semanas. La velocidad de cesión disminuyó a 7%/semana en las dos últimas semanas, lo que dio lugar a un porcentaje total cedido del 80% de VEGF al final del ensayo.

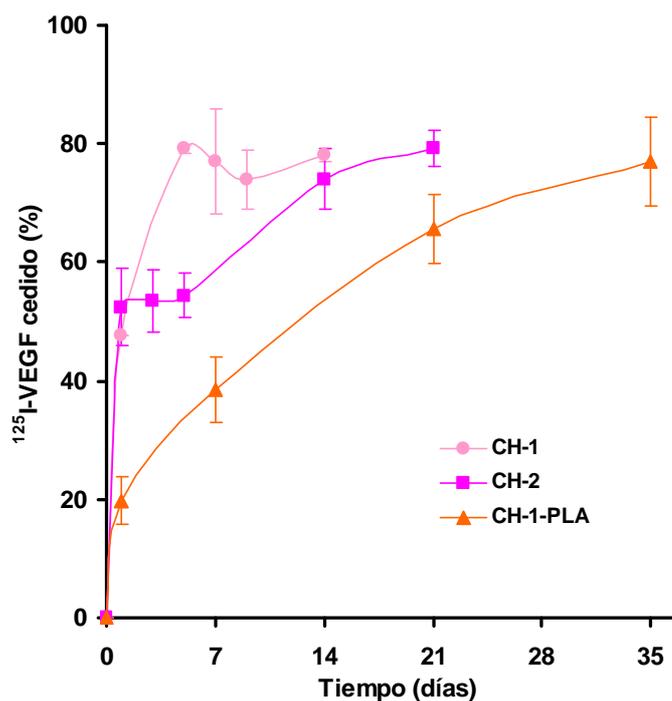


Figura 4.12.- Perfiles de cesión de ^{125}I -VEGF obtenidos con las formulaciones CH-1, CH-2 y CH-1-PLA tras su implantación en fémur de rata.

Es de destacar que la formulación recubierta con una capa de PLA-H presentó un perfil de liberación *in vivo* similar al mostrado *in vitro*, que se refleja en la correlación lineal obtenida entre ambos perfiles de cesión (Fig. 4.13).

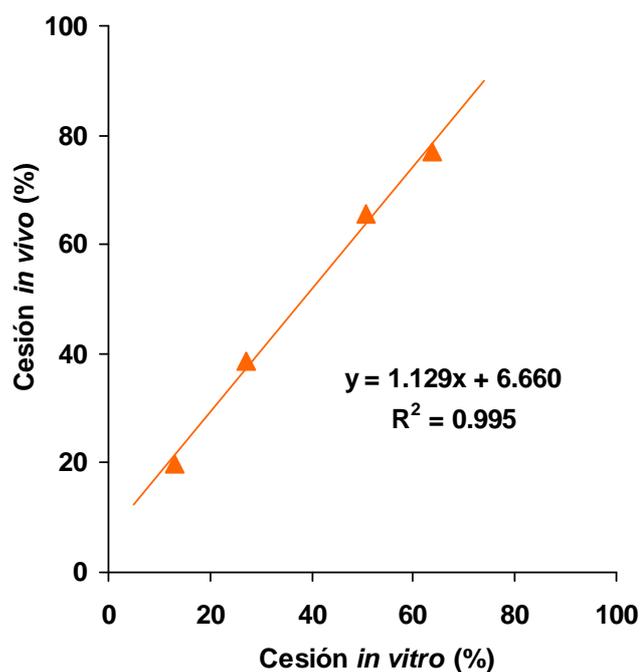


Figura 4.13.- Correlación *in vitro-in vivo* de los perfiles de liberación de ^{125}I -VEGF desde la formulación recubierta con una película de PLA-H (CH-1-PLA)

4.2.5.- Biodistribución del VEGF

La distribución del ^{125}I -VEGF cedido desde las formulaciones CH-1 y CH-1-PLA, fue estudiada midiendo los niveles de radiactividad en las distintas zonas del fémur así como en el músculo que lo rodea, tiroides y sangre, utilizando, en este caso, el método invasivo.

Los resultados (Fig. 4.14) indican que los niveles de VEGF más altos se localizan en la zona del fémur que contiene el implante y disminuyen al alejarse del mismo.

Tras la implantación de la formulación CH-1, el pico de concentración máximo se alcanzó al quinto día en metáfisis distal, que es el área más cercana al defecto. Las concentraciones en la diáfisis y metáfisis proximal fueron menores. 24 horas post-implantación, los niveles de VEGF detectados en diáfisis fueron de unos 20ng/g de tejido, disminuyendo a lo largo del tiempo. En metáfisis proximal la concentración de VEGF se mantuvo alrededor de 3ng/g durante las 2 semanas de ensayo.

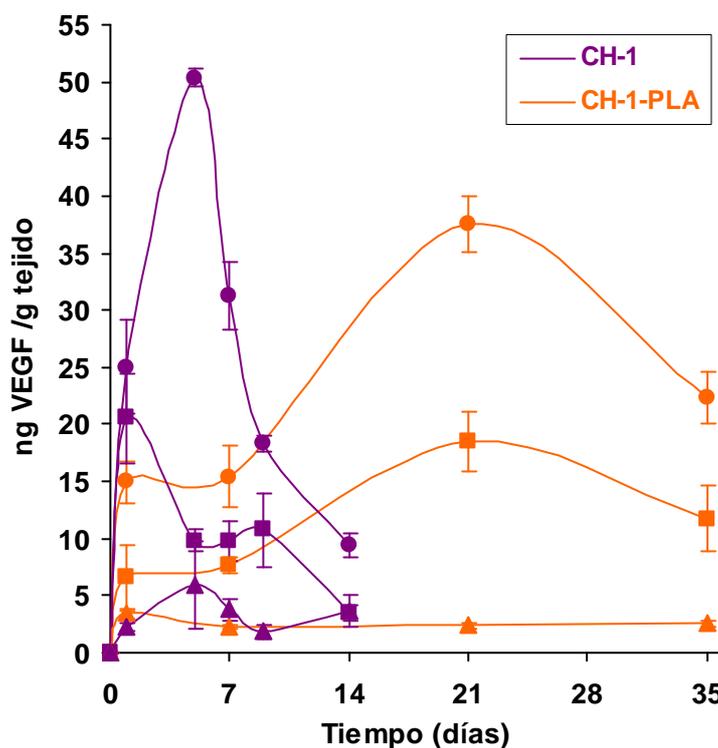


Fig 4.14.- Concentraciones de ^{125}I -VEGF en metáfisis distal (círculos), diáfisis (cuadrados) y metáfisis proximal (triángulos), tras la implantación de las formulaciones CH-1 y CH-1-PLA en fémur de rata.

Por el contrario, los resultados obtenidos con la formulación CH-1-PLA revelan que la concentración máxima de VEGF en metáfisis distal y diáfisis, (zonas más cercanas al defecto) se alcanzó a las tres semanas post-implantación (Fig. 4.14). Con ambas matrices, CH-1 y CH-1-PLA, los niveles de VEGF se mantuvieron aproximadamente en unos 7-10 ng por gramo de tejido óseo durante las cinco semanas que se extendió el experimento. Sin embargo, los niveles detectados en metáfisis proximal (área del hueso más alejada del implante), músculo, sangre y tiroides fueron mucho menores, no diferenciándose, en la mayoría de los casos, de los niveles de fondo del contador.

4.3.- Caracterización *in vitro* e *in vivo* de los implantes de brushita-chitosano conteniendo VEGF y PDGF

4.3.1.- Ensayos de cesión *in vitro*

La cinética de cesión de los factores encapsulados en los distintos sistemas se estudió por separado mediante el marcaje con ^{125}I . Hay que indicar que el incremento de $^{125}\text{I}^-$ libre durante los ensayos de cesión fue de aproximadamente un 12-15%.

El perfil de cesión del PDGF se caracterizó por una liberación inicial rápida, cediéndose el 45% durante el primer día. Sin embargo, en la segunda fase, la liberación fue más lenta, cediéndose alrededor del 70% durante las 2 semanas siguientes (Fig. 4.15).

Por el contrario el VEGF se cede lentamente. El perfil de cesión se caracteriza por un efecto burst de tan solo el 13% en las primeras 24 horas

liberándose un 58% al cabo de 3 semanas. El efecto de la inclusión de la matriz de quitosano en la brushita se refleja en la reducción de la cesión de VEGF durante los primeros días. Posteriormente, los perfiles son similares hasta aproximadamente las 3 semanas y a partir de ahí, se produce una cesión más lenta desde el sistema incluido en la brushita (Fig 4.15).

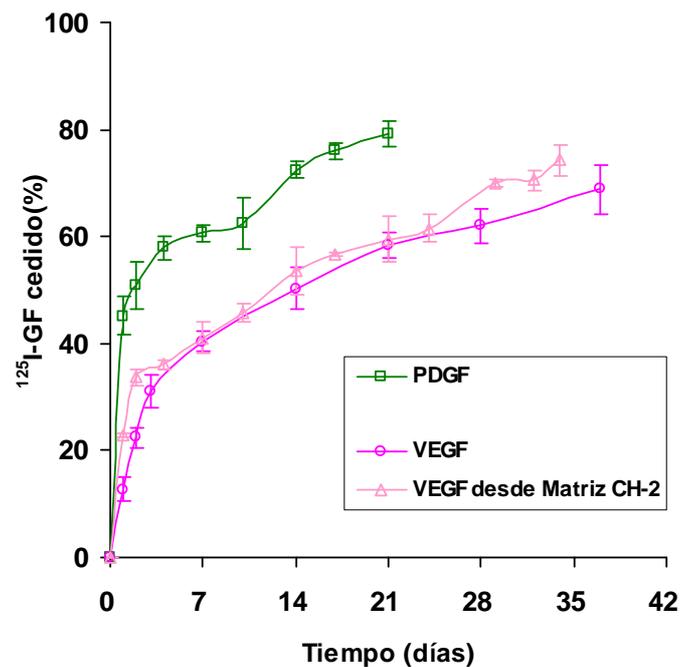


Fig. 4.15.- Perfil de cesión *in vitro* del ^{125}I -PDGF (disperso en la brushita), y del ^{125}I -VEGF (incluido en la matriz de quitosano), desde los implantes brushita-chitosano. A título comparativo se representa la cesión de ^{125}I -VEGF desde la matriz de quitosano (CH-2).

4.3.2.- Captación de agua, pérdida de masa y porosidad durante el ensayo de cesión *in vitro*.

La figura 4.16 muestra los perfiles de captación de agua y pérdida de masa desde los implantes de brushita-chitosano a lo largo del ensayo de cesión *in vitro* en comparación con el comportamiento presentado por implantes de brushita sola. Como se puede observar la pérdida de masa durante el ensayo de cesión *in vitro*, es similar en ambos sistemas (20-25%), mientras que la captación de agua es ligeramente mayor en el caso de los implantes de brushita-chitosano (8%) en comparación con los de brushita sola (4%). En ambos sistemas, tanto la captación de agua como la pérdida de masa se producen inicialmente y se mantiene a lo largo del tiempo de ensayo.

Por otro lado, la porosidad de los implantes de brushita-chitosano (50%) se mantiene constante durante el ensayo de cesión (49% a las 4 semanas) si bien la distribución de tamaño de poros se desplaza hacia tamaños más pequeños (Fig 4.17)

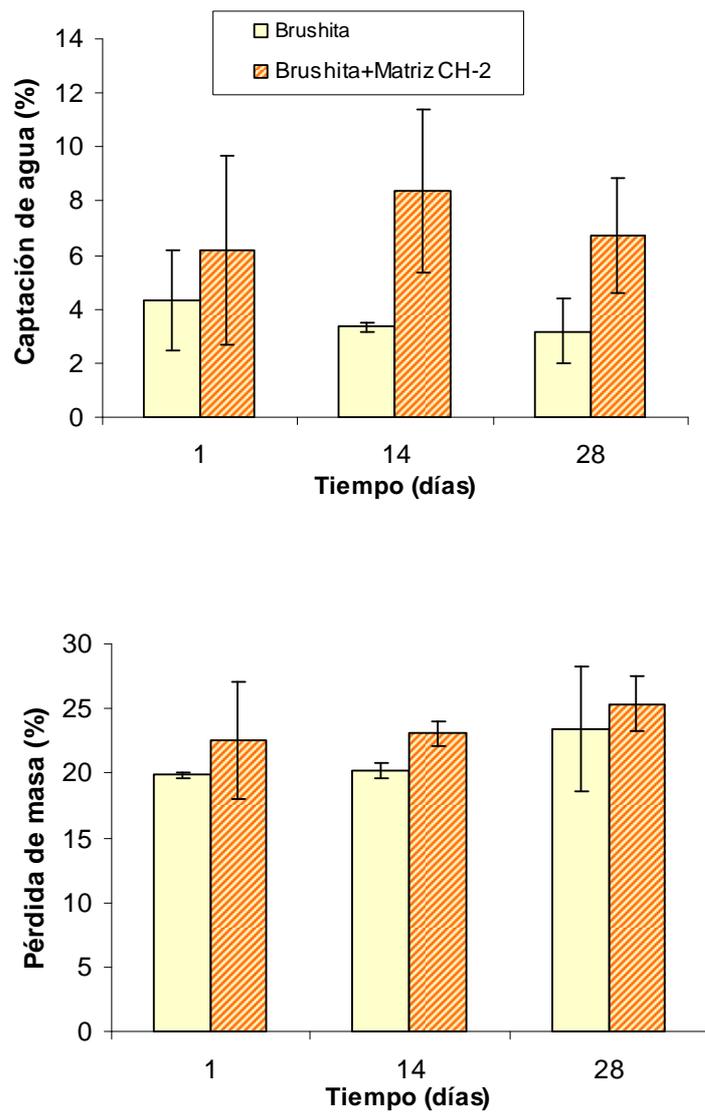


Fig. 4.16.- Perfiles de captación de agua y pérdida de masa a lo largo del ensayo de cesión *in vitro* obtenidos con los implantes de brushita-chitosano en comparación con implantes de brushita sola.

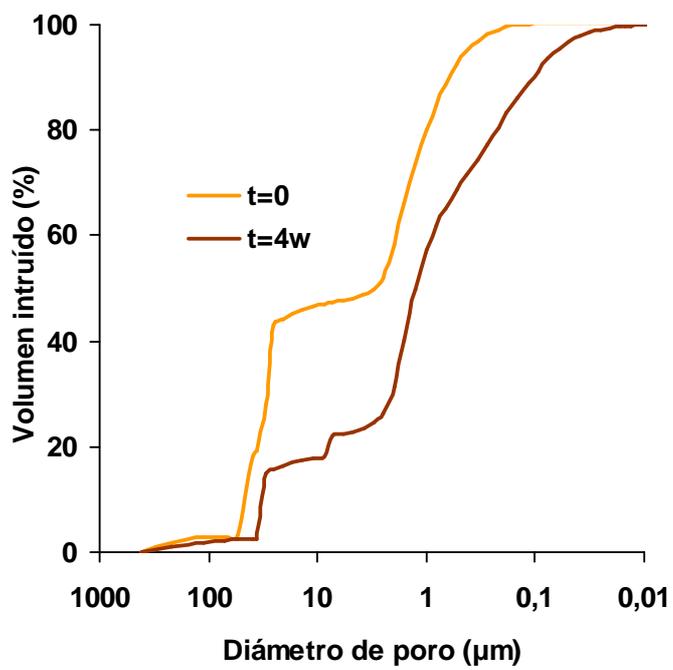
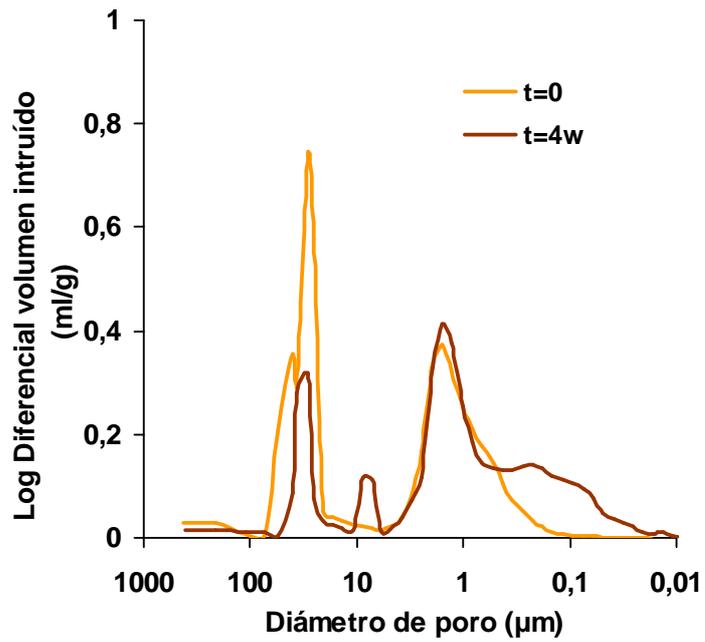


Figura 4.17.- Evolución de la distribución de tamaño de poros de los implantes de brushita-chitosano durante el ensayo de cesión *in vitro*.

4.3.3.- Ensayos de cesión *in vivo*

La cinética de cesión de VEGF y PDGF desde los implantes de brushita-chitosano se estudió por separado, utilizando los correspondientes trazadores radiactivos, tras su implantación en fémur de conejos. Los perfiles obtenidos en cada caso se recogen en la figura 4.18.

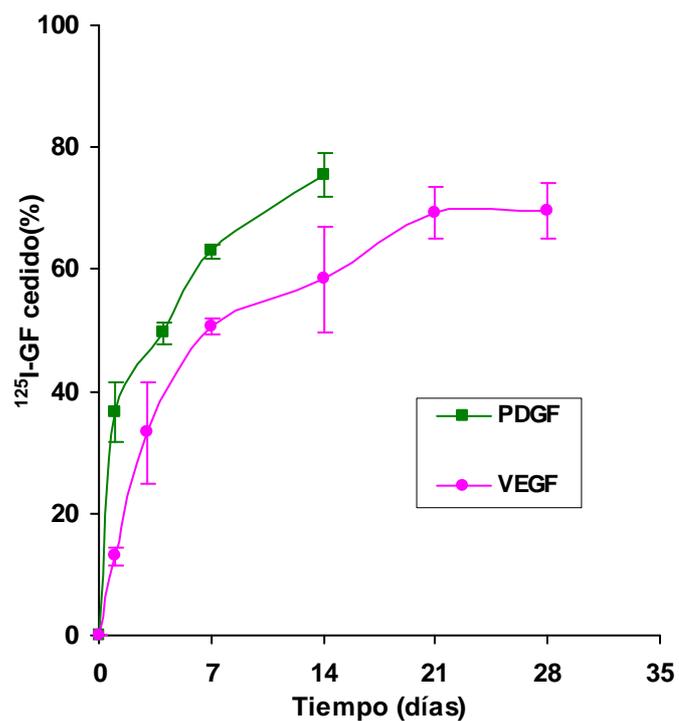


Fig. 4.18.- Perfiles de cesión del ^{125}I -PDGF (disperso en la brushita) y del ^{125}I -VEGF (incluido en la matriz de chitosano) obtenidos con el sistema brushita-chitosano tras su implantación en fémur de conejo.

La cantidad de ^{125}I -PDGF remanente en el implante se monitorizó durante dos semanas. El PDGF se liberó rápidamente, un 37% en las primeras 24 horas. Durante los 6 días siguientes se observan una reducción de la velocidad de cesión a aproximadamente un 4,3%/día, seguido por una liberación aún más lenta de aproximadamente un 2%/día durante la última semana, cediéndose cerca del 80% en dos semanas (Fig. 4.18).

La correlación entre el porcentaje cedido *in vitro* e *in vivo* se muestra en la figura 4.19. Se observa una relación lineal entre los resultados obtenidos en ambos ensayos, sin embargo, la diferencia entre los perfiles de liberación se refleja en el valor de 1,46 obtenido para la pendiente. El efecto burst *in vitro* es ligeramente más pronunciado que *in vivo*. Posteriormente, durante la primera semana, se reduce la velocidad de cesión *in vitro* hasta aproximadamente un 2,5%/día frente al 4,3%/día que se detiene *in vivo*. Finalmente, durante la última semana, las velocidades de liberación fueron muy similares.

La curva de cesión de ^{125}I -VEGF *in vivo* (Fig.4.18), se caracteriza por una liberación inicial controlada, un 13% en las primeras 24 horas seguida de una velocidad del 11%/día durante los siguientes 3 días. A continuación, y hasta el final de la primera semana, la velocidad de liberación disminuyó hasta un 4%/día. Después, durante las dos semanas siguientes, la tasa de liberación cayó a un 1,3%/día, no cediéndose más VEGF durante el tiempo estudiado. Por tanto, aproximadamente el 70% del VEGF encapsulado se liberó en tres semanas. En este caso, los perfiles de cesión *in vitro* e *in vivo* son similares obteniéndose una correlación lineal, con una pendiente próxima a la unidad (Fig. 4.19).

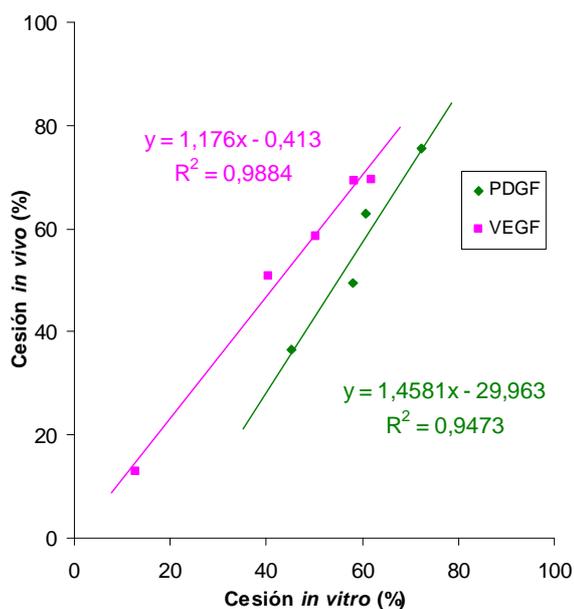


Figura 4.19.- Correlaciones *in vitro-in vivo* de los perfiles de cesión de ^{125}I -PDGF y ^{125}I -VEGF desde los implantes de brushita-chitosano.

4.3.4.- Biodistribución del PDGF y VEGF

La distribución del PDGF y del VEGF, liberado desde los implantes de brushita-chitosano, tras la implantación en el fémur de conejo se estudió midiendo la radiactividad remanente tanto en hueso como en el músculo adyacente a la zona del implante, glándula tiroidea y sangre. La radiactividad presente en los distintos tejidos analizados indica que los GF quedan localizados en la zona de implantación. Las concentraciones más elevadas tanto de PDGF como de VEGF se detectan en la zona del defecto, disminuyendo con la distancia, tal y como se muestra en la figura 4.20 lo que indica que no existe prácticamente riesgo de exposición sistémica.

La concentración máxima del PDGF se observa en el área del implante (5 cm), alcanzando un pico de aproximadamente 5ng/g cuatro días después de la implantación. Además, durante la primera semana, la concentración de PDGF se mantuvo por encima de 2ng/g y después de este tiempo, y hasta el final del experimento, se mantuvo por debajo de 2ng/g de tejido. Por el contrario en las zonas del fémur más alejadas del defecto, la concentración de PDGF se mantuvo aproximadamente en 0,5ng/g durante todo el periodo experimental (Fig. 4.20).

La concentración más elevada de VEGF se alcanzó, también en la zona cercana al implante, a los siete días de la implantación. Durante las dos primeras semanas, los niveles de VEGF en el tejido se situaron por encima de 3 ng/g, con un máximo de 5,5 ng/g. A partir de la segunda semana y durante el periodo experimental restante la concentración de VEGF se situó alrededor de 3 ng/g. En la zona del hueso más alejada del implante la concentración de VEGF fue de aproximadamente 1,5 ng/g. (Fig.4.20).

Por último, los niveles tanto de PDGF como de VEGF en músculo adyacente, sangre y tiroides son indetectables ya que la radiactividad medida en dichos tejidos es prácticamente igual al nivel de fondo del contador gamma.

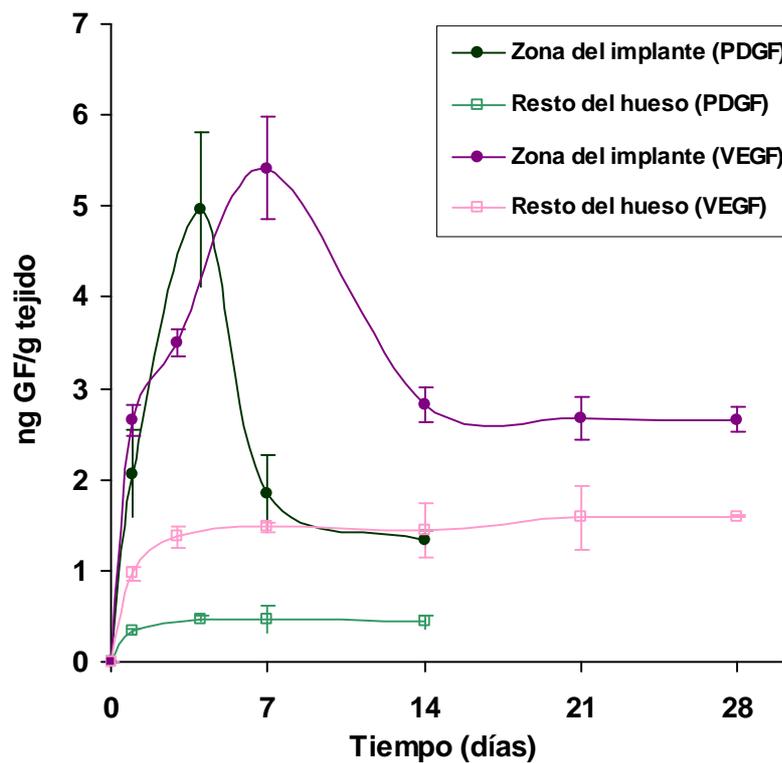


Figura 4.20.- Concentraciones de ^{125}I -VEGF y ^{125}I -PDGF en la zona del implante y en el resto del hueso obtenidos con los implantes de brushita-chitosano en fémur de conejo.

4.4.- Caracterización *in vitro* e *in vivo* de los implantes de brushita-microesferas de PLGA conteniendo VEGF, PDGF y TGF

4.4.1.- Ensayos de cesión *in vitro*

La cinética de cesión de los distintos GFs se estudió por separado mediante el marcaje con ^{125}I y se muestran conjuntamente en la figura 4.21.

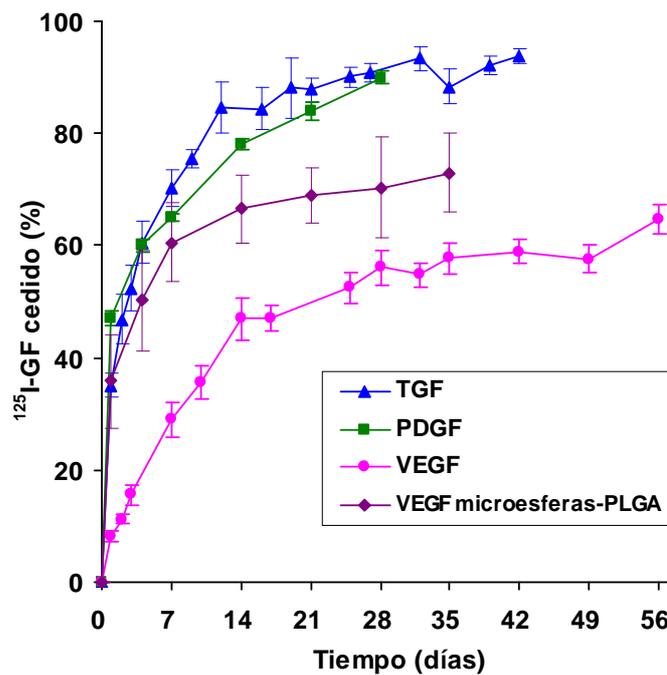


Figura 4.21.- Perfiles de cesión *in vitro* de los tres factores desde implantes de brushita-microesferas de PLGA: ^{125}I -TGF (disperso en la brushita), ^{125}I -PDGF (disperso en la brushita) y ^{125}I -VEGF (en microesferas de PLGA dispersa en la brushita). Se recoge también el perfil de cesión de ^{125}I -VEGF desde las microesferas de PLGA.

El perfil de cesión del ^{125}I -PDGF se caracterizó por una liberación inicial rápida, cediéndose aproximadamente un 47% el primer día, alcanzándose alrededor del 80% en 2 semanas. La cinética de liberación del ^{125}I -TGF- β_1 , fue similar, a excepción del periodo inicial en el que la velocidad es inferior, en las primeras 24 horas se cede aproximadamente un 35% y el 84% se libera en unas dos semanas. En ambos casos al cabo de 4 semanas se alcanzó el 90% cedido. Por el contrario el ^{125}I -VEGF se cede lentamente. El perfil de cesión se caracteriza por una cesión inicial próxima al 10% en las primeras 24 horas, un 45% es liberado en 2 semanas y solamente un 10% más en las siguientes dos semanas, no alcanzándose el 60% en 4 semanas.

El efecto de encapsulación del ^{125}I -VEGF en las microesferas de PLGA se refleja en una reducción importante de la cesión inicial en comparación con el ^{125}I -PDGF y ^{125}I -TGF- β_1 .

4.4.2.- Bioactividad de VEGF

Los resultados de bioactividad del VEGF cedido desde las microesferas de PLGA mostraron que éste mantiene su actividad al menos durante siete días (Fig 4.22). Por tanto, el proceso de elaboración de las microesferas por la técnica de la doble emulsión, no afecta a la estabilidad de este factor.

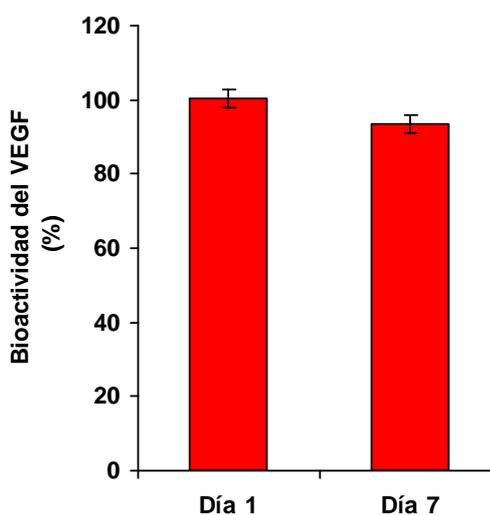


Figura 4.22.- Bioactividad del VEGF liberado desde las microesferas de PLGA (expresado como porcentaje de la proliferación celular observada con respecto a la proliferación celular esperada).

4.4.3.- Captación de agua, pérdida de masa y porosidad durante el ensayo de cesión *in vitro*.

La figura 4.23 muestra los porcentajes de captación de agua y pérdida de masa desde los implantes de brushita-microesferas de PLGA al cabo de 4 semanas de incubación en medio de cesión en comparación con los valores obtenidos con implantes de brushita sola. Como se puede observar, la pérdida de masa que se produce en ambos sistemas es similar (26-30%), mientras que la captación de agua es ligeramente mayor por parte de los implantes de brushita-microesferas de PLGA (10%) en comparación con los de brushita sola (4,6%).

La figura 4.24 muestra la evolución de la porosidad y distribución de tamaño de poro tras 4 semanas de incubación en medio de cesión. La porosidad inicial de los implantes fue de un 50%, manteniéndose aproximadamente en el mismo valor (52%) al cabo de 4 semanas, sin embargo se observa un desplazamiento de la distribución de tamaño de poro hacia valores más pequeños.

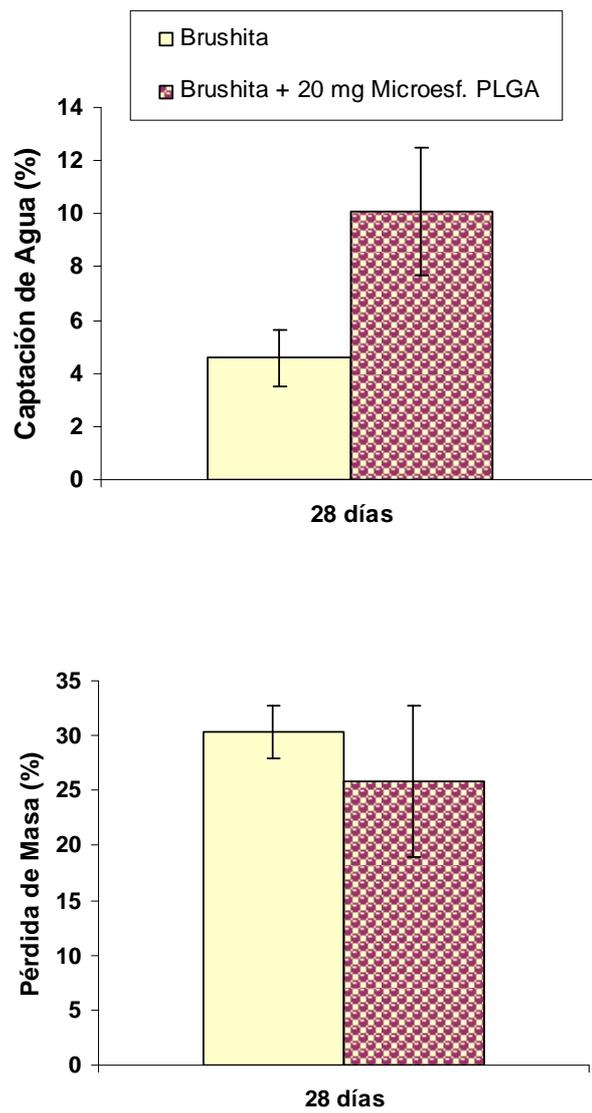


Figura 4.23.- Porcentajes de captación de agua y pérdida de masa durante el ensayo de cesión *in vitro* obtenidos con los implantes de bushita-microesferas PLGA en comparación con implantes de brushita sola.

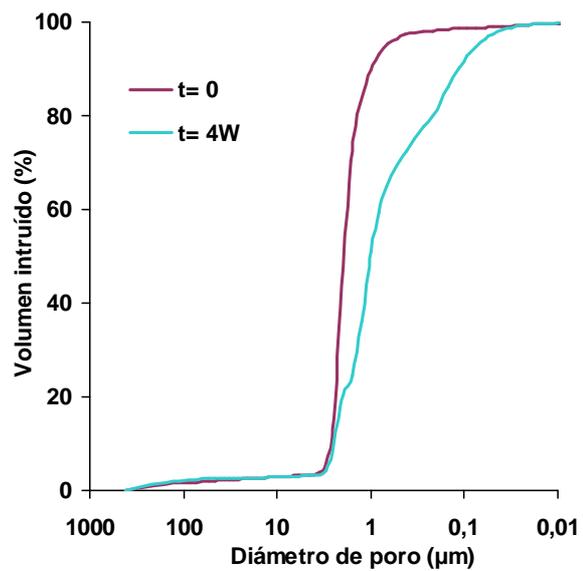
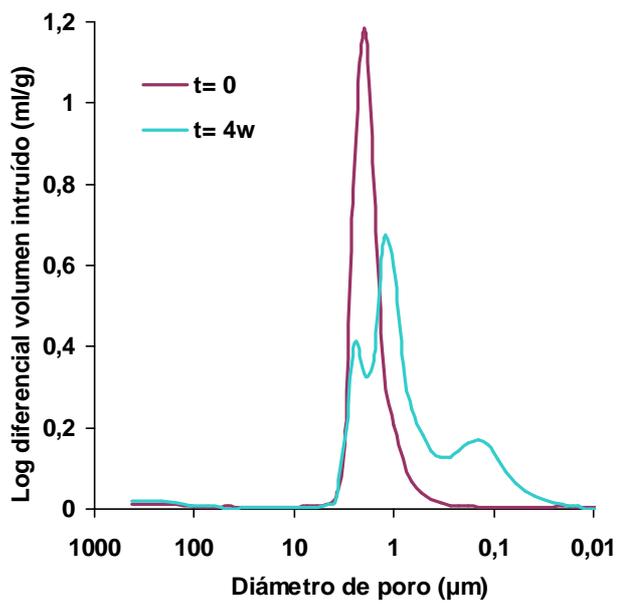


Figura 4.24.- Evolución de la distribución de tamaño de poros de los implantes de brushita-microesferas de PLGA durante el ensayo de cesión *in vitro*.

4.4.4.- Ensayos de cesión *in vivo*.

La cinética de cesión de los tres factores (VEGF, PDGF y TGF) desde implantes de brushita-microesferas de PLGA, se estudió por separado después de su implantación en el fémur de conejos (Fig. 4.25).

La cantidad de ^{125}I -PDGF y ^{125}I -TGF- β_1 remanente en el implante se monitorizó durante tres semanas.

El ^{125}I -PDGF se liberó rápidamente, un 40% en las primeras 24 horas. Durante los días siguientes y hasta el final de la primera semana se observa una reducción de la velocidad de cesión a aproximadamente un 5,5%/día, seguido por una liberación aún más lenta de aproximadamente un 1,2%/día durante las dos últimas semanas (Fig. 4.25).

La curva de cesión de ^{125}I -TGF- β_1 , al igual que *in vitro*, es prácticamente superponible a la de ^{125}I -PDGF, en las primeras 24 horas se liberó un 37%/día. Durante los días siguientes y hasta el final de la primera semana se cede a una velocidad de un 5,5%/día, seguido por una liberación más lenta de aproximadamente un 2%/día durante la segunda semana y la tercera semana menos de 1%/día.

El porcentaje total cedido para ambos factores al finalizar el ensayo, tres semanas después de la implantación, se encuentra próximo al 90%.

El ^{125}I -VEGF, incluido en el sistema de brushita previa encapsulación en microesferas de PLGA, no presenta efecto burst. Durante la primera semana se cede aproximadamente a un 7%/día y en las siguientes tres semanas la velocidad se reduce a aproximadamente a un 1,2%/día, alcanzándose prácticamente el 80% en cuatro semanas.

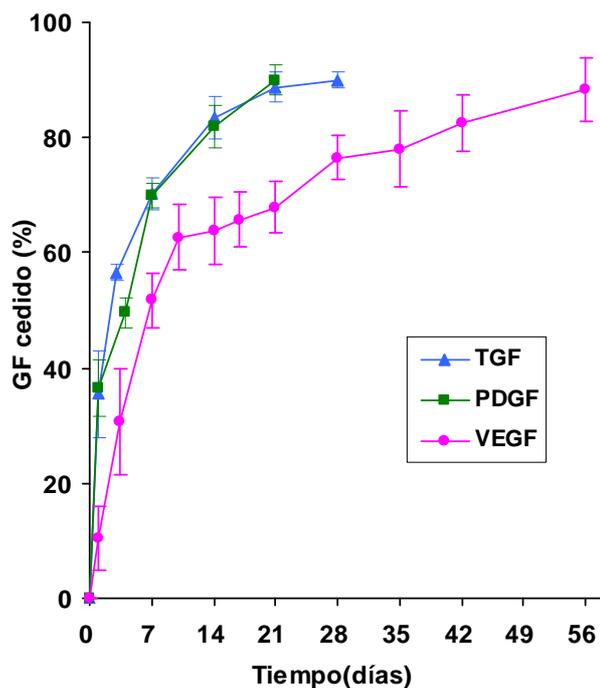


Figura 4.25.- Perfiles de cesión de ^{125}I -TGF (disperso en brushita), ^{125}I -PDGF (disperso en brushita) y ^{125}I -VEGF (en microesferas de PLGA dispersas en brushita) desde el sistema brushita-microesferas de PLGA tras su implantación en fémur de conejo.

La correlación entre los porcentajes cedidos *in vitro* e *in vivo* para cada uno de los GFs, se muestra en la figura 4.26. Se observa una relación lineal entre los resultados obtenidos en ambos ensayos para cada uno de los factores estudiados. Los perfiles obtenidos con TGF- β_1 *in vivo* e *in vitro* son superponibles con una pendiente de 0,96. La pendiente de la relación lineal obtenida para PDGF y VEGF es ligeramente superior a la unidad. En el caso del VEGF, el efecto burst *in vivo* es menor que *in vitro*, a partir de este tiempo el porcentaje liberado *in vivo* fue ligeramente superior. En cuanto al PDGF, excepto en las primeras 24 horas que se libera prácticamente el mismo porcentaje, la curva de cesión *in vivo* muestra un perfil de liberación superior al *in vitro* y, por tanto, una cesión más rápida.

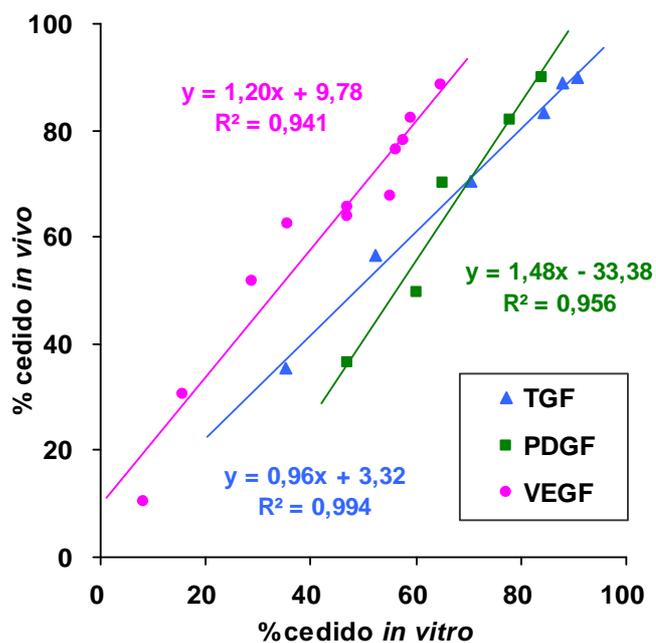


Figura 4.26.- Correlaciones *in vitro-in vivo* de los perfiles de cesión de ^{125}I -PDGF, ^{125}I -VEGF y ^{125}I -TGF β -1 desde los implantes de brushita-microesferas de PLGA.

4.4.5.- Biodistribución del VEGF, PDGF y TGF

La distribución de los tres factores de crecimiento (VEGF, PDGF y TGF), liberados desde el sistema de brushita-microesferas de PLGA, tras la implantación en el fémur de conejo se estudió midiendo la radiactividad remanente tanto en hueso como en el músculo adyacente a la zona del implante, glándula tiroidea y sangre. En todos los casos, los picos de concentración máxima se detectan en la zona del defecto, disminuyendo con la distancia al mismo. La radiactividad detectada en el resto de los tejidos estudiados indica que los GFs quedan localizados en la zona de implantación, lo que indica que no existe riesgo de exposición sistémica.

Según se observa en la figura 4.27, la concentración máxima de los GFs se observa en el área del implante (5 cm), alcanzando un pico a los tres días de aproximadamente 4,3 ng/g y 1,4 ng/g tras la implantación de los sistemas con PDGF y TGF- β_1 , respectivamente. Para estos dos factores los niveles detectados al cabo de una semana descendieron hasta valores próximos a 1ng/g.

En el caso del VEGF, la concentración máxima se alcanza más tarde, a los siete días se detecta un pico de unos 6 ng/g que cae a valores próximos a 1 ng/g a las dos semanas. Por el contrario en las zonas del fémur más alejadas del defecto, la concentración de los GFs se mantuvo baja, inferiores a 1ng/g, durante todo el periodo experimental (Fig. 4.27).

La medida de la radiactividad en músculo adyacente, sangre y tiroides fue prácticamente igual al nivel de fondo del contador gamma, confirmando la no exposición sistémica a ninguno de los factores de crecimiento administrados en el sistema elaborado.

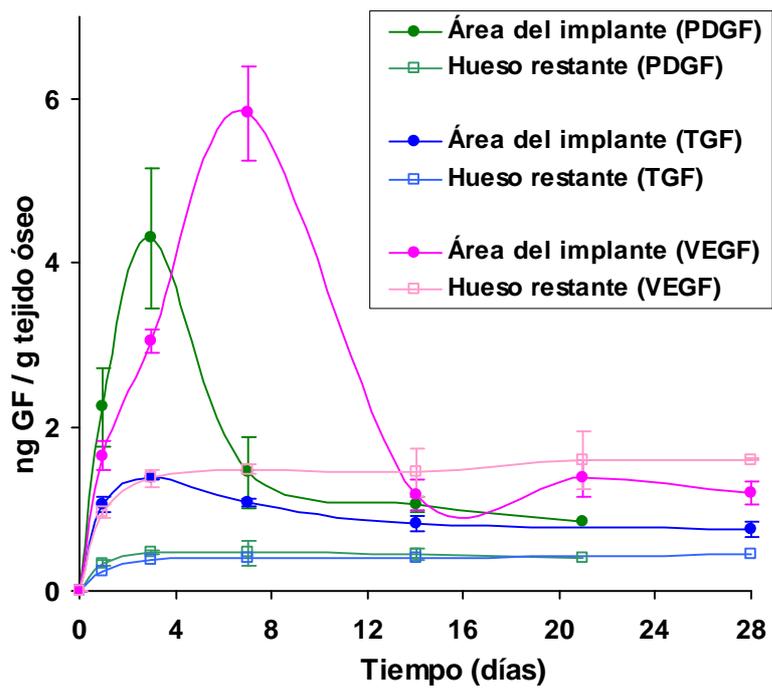


Figura 4.27.- Concentraciones de VEGF, PDGF y TGFβ-1, en la zona del implante y en el resto del hueso, obtenidos con los implantes de brushita-microesferas de PLGA en fémur de conejo.

4.5.- Evaluación histológica e histomorfométrica tras la implantación de los sistemas de liberación de GFs.

La evaluación histológica e histomorfométrica se realizó en la región de interés (ROI) que comprendió la mitad superior del defecto más la zona de transición del hueso receptor, según se define en el apartado 3.7.5 de materiales y métodos.

4.5.1.- Implantes de brushita-chitosano conteniendo PDGF y VEGF.

A las cuatro semanas desde la implantación, no se observaron diferencias significativas en neoformación ósea (Fig 4.28 a, b y 4.31) ni en la tasa de aposición mineral (Fig. 4.32 a,b y Fig. 4.33) entre los animales del grupo C, animales no implantados y con defecto en el fémur, y los animales del grupo B (implante sin GF). No obstante, se observó formación de hueso en el margen del defecto y hacia el interior del mismo, en ambos grupos. El análisis de las secciones procesadas según la técnica de Masson-Goldner, mostró de forma general zonas más o menos extensas de fibrosis con numerosos fibroblastos dispuestos entre las fibras de colágeno en la zona del defecto en el grupo C (defecto vacío) y en torno al área del implante en el grupo B (implante blanco) (Fig. 4.28 a,b). A partir de la zona de fibrosis, se observó en algunas áreas diferenciación osteoblástica con neoformación ósea de grado variable hacia la zona del defecto (Fig. 4.28 a,b) indicando buena integración y un grado de compatibilidad aceptable entre el material (brushita-chitosano) y el tejido hospedador. Hay que destacar que en algunos casos la integración fue tal que no se produjo reacción de fibrosis o ésta fue escasa (Fig. 4.28 c).

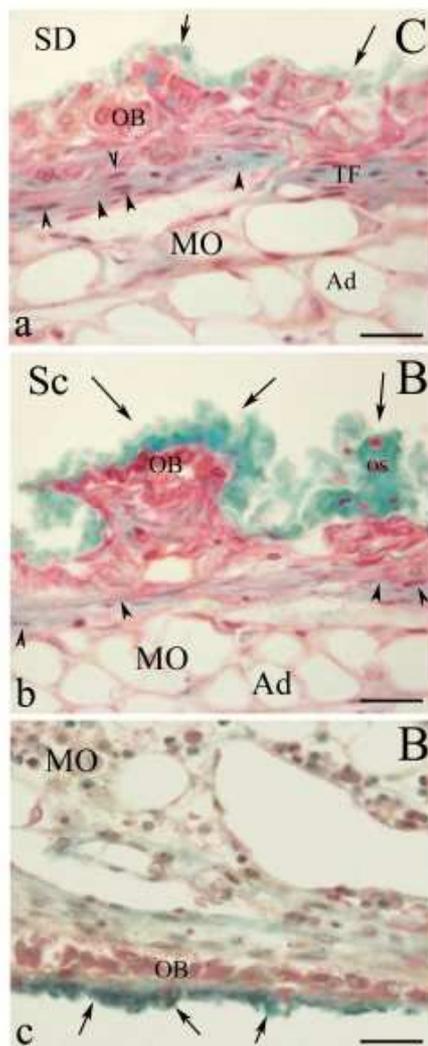


Fig. 4.28.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes a los dos grupos control. Las imágenes muestran la zona adyacente al defecto en los grupos C (defecto vacío) (a) y B (implante blanco) (b,c). Obsérvese la presencia de hueso neoformado y mineralizado (flechas) hacia la zona del defecto, en C, y hacia el implante, en B. Obsérvese en ambos grupos (a,b) la presencia de fibrosis leve entre el tejido medular y la capa de osteoblastos hipertróficos responsables de la síntesis de hueso nuevo. Barra de escala: 25 μ m OB: Osteoblastos; MO: Médula ósea; Ad: Adipocitos; TF: Tejido fibroso; Os: Osteocito; SD: Sitio del defecto; Sc: Scaffold (implante).

En el grupo de animales implantados con PDGF (Platelet Derived Growth Factor) dosis de 250 ng (Grupo P), se observó de forma general un mayor grado de respuesta tisular. El grado de fibrosis fue similar al observado en el grupo B aunque mostró mayor variabilidad. En general se observó

mayor grado de neoformación ósea en los márgenes y zona del defecto, con áreas relativamente amplias de hueso neoformado (Fig. 4.29) en relación a los grupos C y B. Se observaron trabéculas óseas mineralizadas de gran calibre, con zonas de matriz ósea (osteóide) sin mineralizar en algunos márgenes (Fig. 4.29 c) resultado de una mayor actividad osteoblástica. Se observaron numerosos osteoblastos hipertróficos recubriendo la superficie de

las trabéculas así como osteocitos inmersos en el hueso neoformado (Fig. 4.29 c).

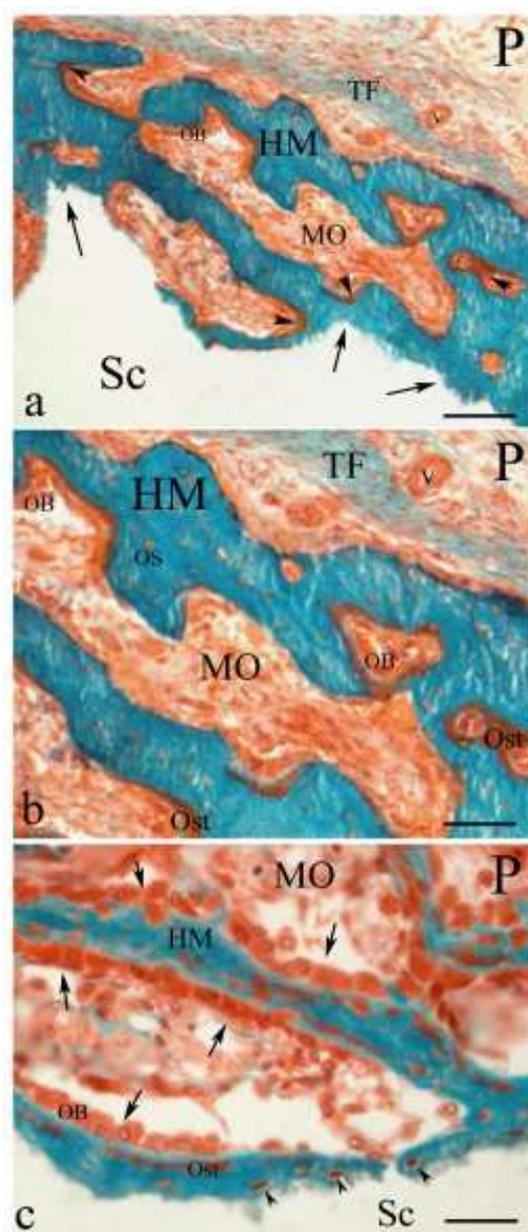


Fig. 4.29.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes al grupo P (PDGF). Imagen que muestra la zona adyacente al defecto, donde se observan amplias zonas de hueso mineral neoformado ocupando todo el margen del mismo. Obsérvese la síntesis de hueso hacia el implante (flechas) y la síntesis de osteoide aún sin mineralizar en diferentes zonas de la superficie trabecular (puntas de flecha) (a). b) Detalle a mayor aumento de la imagen anterior. Obsérvese en ambas imágenes (a,b) la presencia de vasos sanguíneos de calibre medio así como tejido fibroso rodeando los márgenes del defecto. c) Detalle a gran aumento que muestra la presencia de síntesis activa de hueso en el margen del defecto en el grupo P. Observe la presencia de numerosos osteoblastos hipertróficos de morfología cúbica (flecha) tapizando por completo la superficie de las trabéculas, así como la presencia de osteocitos inmersos en el hueso mineral neoformado (puntas de flecha). Barra de escala: a) 120 μ m, b) 65 μ m, c) 30 μ m. OB: Osteoblastos; MO: Médula ósea; Ad: Adipocitos; TF: Tejido fibroso; Os: Osteocito; Ost: Osteoide; Sc: Implante; HM: Hueso mineral; V: Vaso sanguíneo.

En el grupo de animales implantados con la combinación PDGF+VEGF, con dosis de 250 ng y 350 ng respectivamente (Grupo VP), se observó, de forma general, un mayor grado de respuesta tisular en relación a los grupos C, B y P. En este grupo, el grado de fibrosis observado fue mucho menor que en el resto de los grupos. En general, se observó mayor grado de neoformación ósea en los márgenes y zona del defecto con áreas muy extensas de hueso neoformado (Fig 4.30 a). El calibre de las trabéculas fue mucho mayor, llegando en algunos casos a confluir varias de ellas (Fig 4.30 a). La combinación de ambos factores intensificó de forma apreciable la diferenciación y la actividad osteoblástica. Consecuentemente, se observó una elevada densidad de osteoblastos llegando incluso a formar varias capas sobre algunas de las trabéculas (Fig 4.30 b,c). Resaltando además zonas muy extensas de matriz ósea sin mineralizar no sólo en los márgenes de las trabéculas sino ocupando amplias áreas (Fig 4.30 a, d). Se observó además la presencia de células osteoprogenitoras en división sobre la superficie de algunas de las trabéculas en formación (Fig 4.30 d).

En general, en todos los grupos analizados (C, B, P y VP), se observó escasa o nula actividad de resorción ósea, lo cual se evidenció por la escasa presencia de osteoclastos en la ROI.

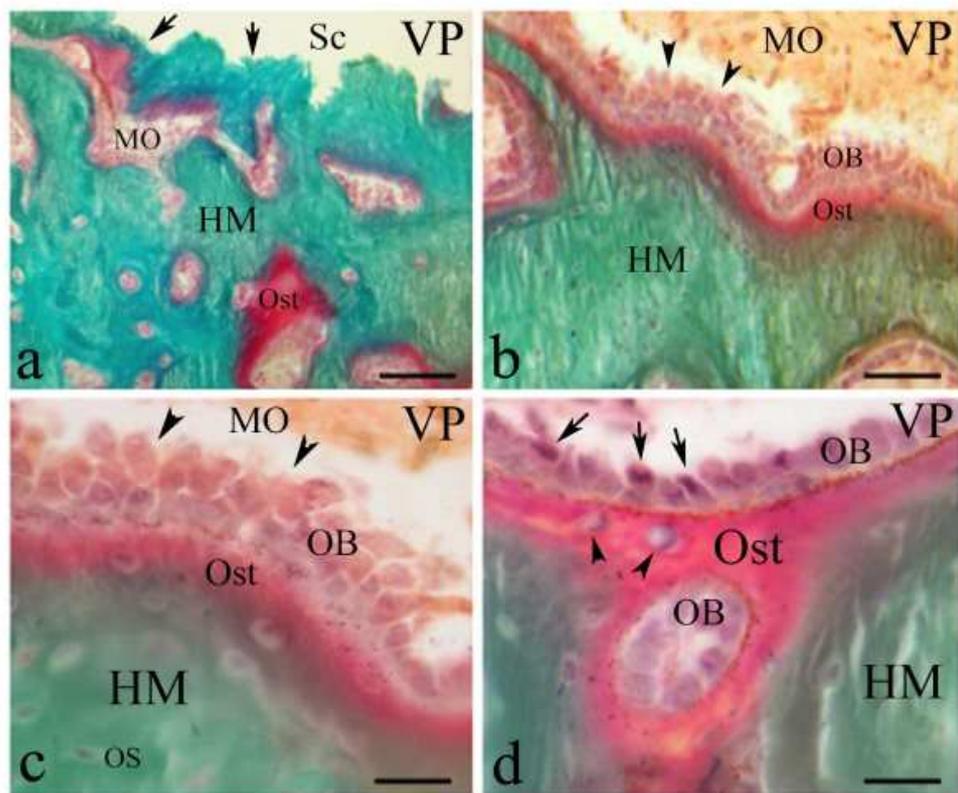


Fig. 4.30.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes al grupo VP (VEGF/PDGF). Imagen que muestra la zona adyacente al defecto. Obsérvese la confluencia de las diferentes trabéculas de hueso mineral neoformado que forman una superficie muy amplia en todo el margen del defecto (a). (b,c) Detalles a diferentes aumentos que muestran la superficie de una trabécula ósea en formación en la ROI. Obsérvese la intensa actividad osteoblástica reflejada en amplias zonas de osteoide (a) así como en la presencia de varias capas de osteoblastos en la superficie de las trabéculas en formación (b,c). d) Detalle a gran aumento que muestra la presencia de varias células osteoprogenitoras en división (flechas) sobre la superficie de una trabécula en formación. Obsérvese asimismo la presencia de osteoblastos recién englobados en el osteoide aún sin mineralizar (puntas de flecha). Barra de escala: a) 250 μm , b) 75 μm , c,d) 25 μm . OB: Osteoblastos; MO: Médula ósea; Ad: Adipocitos; TF: Tejido fibroso; Os: Osteocito; Sc: Implante. HM: Hueso mineral; Ost: Osteoide

La evaluación histomorfométrica de la región de interés (ROI), que comprendió los márgenes y el sitio del defecto (Fig. 3.16), mostró diferencias significativas entre los grupos C y B, con áreas de hueso neoformado de $0.12 \pm 0.008 \text{ mm}^2$ and $0.13 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ respectivamente, en relación a los grupos P con $0.82 \pm 0.033 \text{ mm}^2$ y VP con $1.74 \pm 0.036 \text{ mm}^2$. Asimismo se observaron diferencias significativas entre los grupos P y VP (Fig. 4.31).

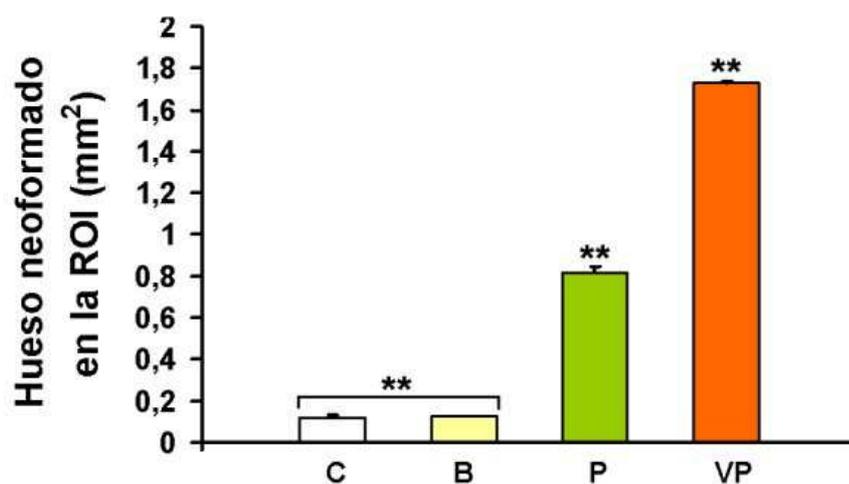


Figura 4.31.- Superficie de hueso neoformado en mm^2 en la ROI en los grupos C y B y en los grupos P y VP. Los histogramas representan el valor medio \pm desviación estándar. $**p < 0.001$.

En resumen, el análisis tras la implantación de este sistema de brushita-chitosano, dio como resultado diferencias significativas en cuanto a neoformación ósea entre los grupos C (animales no implantados) y B (blanco), con respecto a los grupos P (PDGF) y VP (VEGF y PDGF), encontrándose también diferencias significativas entre estos dos últimos.

Para estudiar el proceso de mineralización del hueso neoformado, se midió la tasa de aposición mineral (MAR). El análisis mostró claramente doble marcaje con ambos fluorocromos (oxitetraciclina=verde y calceína=azul), demostrando así neoformación y mineralización ósea a las cuatro semanas (Fig. 4.32).

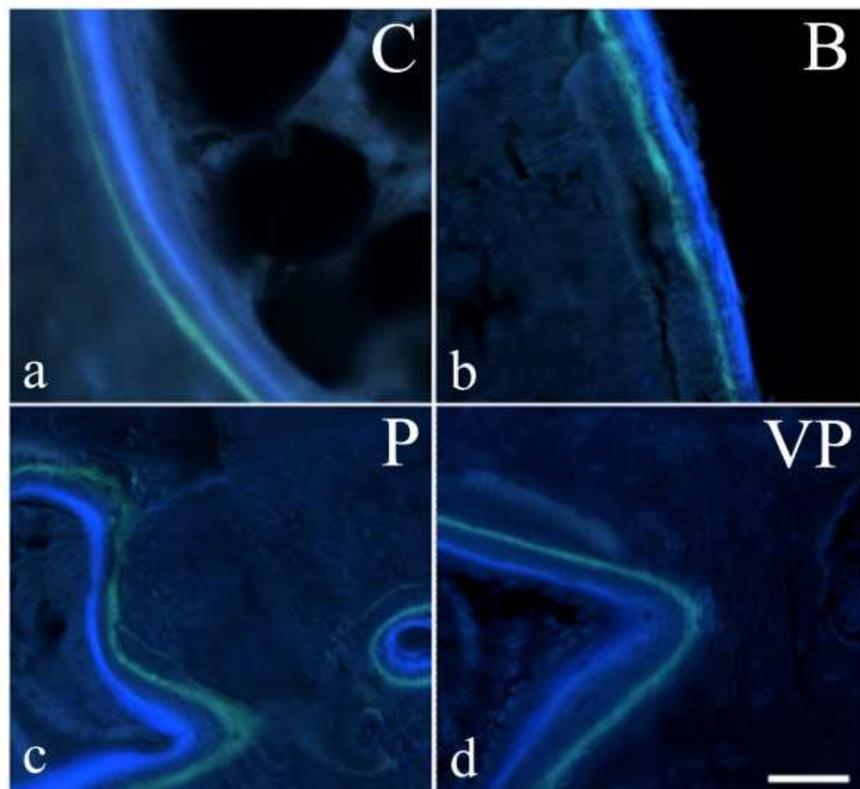


Fig. 4.32.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes a los grupos C y B y a los P y VP que muestran los frentes de mineralización correspondientes a la Oxitetraciclina (verde) y a la calceína (azul). Barra de escala: 40 μ m.

Las diferencias observadas en la tasa de aposición mineral no fueron estadísticamente significativas tanto cuando se comparan los grupos C y B con los tratados con los factores de crecimiento como cuando se comparan

éstos últimos entre ellos (Fig. 4.33). En los grupos C y B, el marcaje se observó exclusivamente en la periferia del defecto. Sin embargo en los grupos tratados con los factores de crecimiento tanto individualmente, PDGF, como en combinación, PDGF y VEGF, se observó marcaje tanto en la periferia del defecto como en zonas alejadas del mismo, indicando que el proceso de reparación y regeneración se produjo a mayor escala.

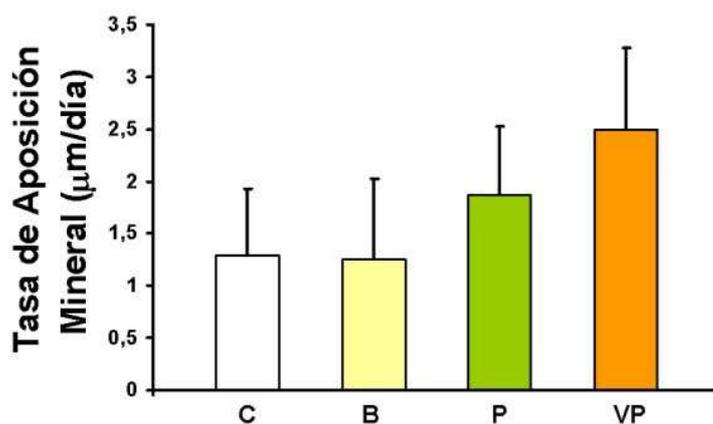


Fig. 4.33.- Tasa de aposición mineral en $\mu\text{m}/\text{día}$ en la ROI en los grupos control (C y B) y en los grupos tratados (P y VP). Los histogramas representan el valor medio \pm desviación estándar. No se observaron diferencias significativas para $p < 0.05$.

Para evaluar el proceso de neovascularización en la ROI, se cuantificó el número de vasos sanguíneos y se midió el área relativa que ocupaban. La presencia de vasos sanguíneos se identificó tanto en secciones de Masson-Goldner como en secciones tratadas con antisero anti-Factor de von-Willebrand, un marcador de vasos sanguíneos. En estas últimas se cuantificó el número de vasos sanguíneos (densidad) y se midió la superficie vascular.

En general se observaron numerosos vasos sanguíneos de tamaño variable entre las trabéculas óseas neoformadas en los grupos P y VP (Fig 4.34 b,d) con respecto a los grupos C y B.

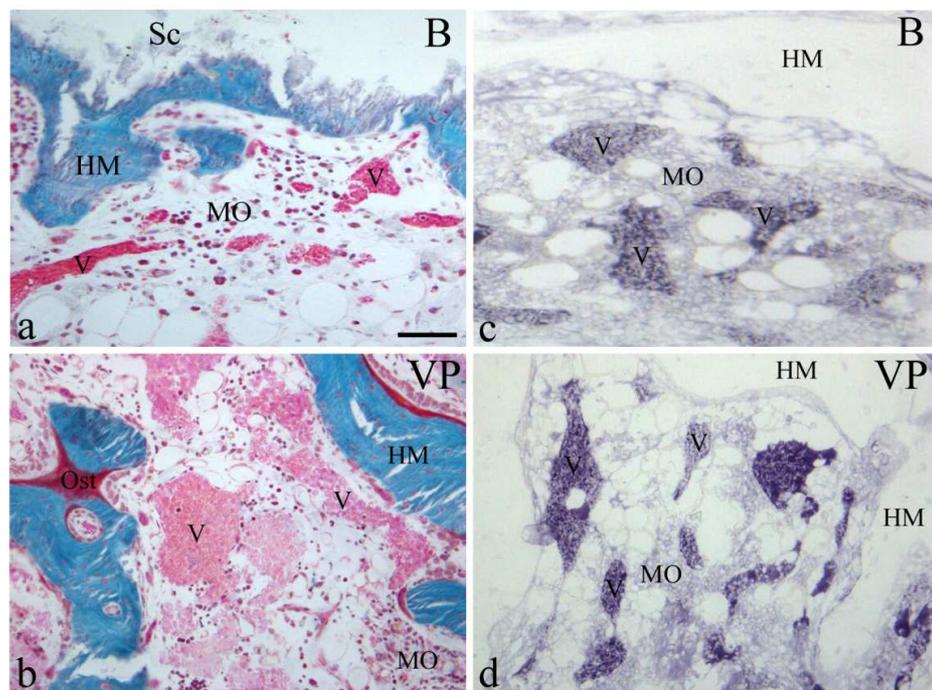


Figura 4.34.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes al grupo B (a,c) y al grupo experimental VP (b,d) en las que se observan la presencia de vasos sanguíneos en la ROI. (a,b) Técnica de Masson-Goldner. (c,d) Inmunohistoquímica con anti-Factor de von Willebrand. Barra de escala: 70 μ m. HM: Hueso mineral; MO: Médula ósea; Sc: Scaffold; V: Vasos sanguíneos.

De hecho, el análisis de la densidad de vasos sanguíneos (Fig. 4.35 a) y la superficie vascular (Fig. 4.35 b) mostró diferencias significativas en ambos parámetros entre los grupos C y B en comparación con los grupos P y VP.

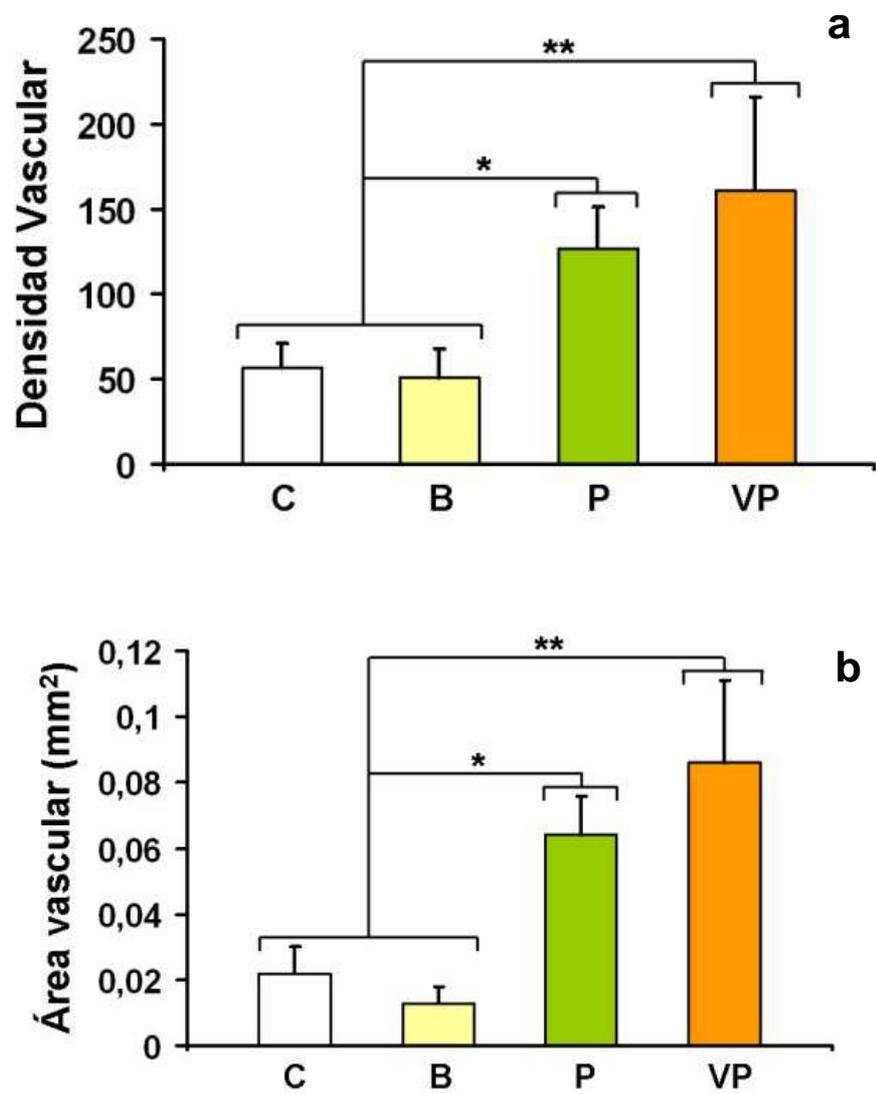


Figura 4.35.- Densidad vascular (a) y el área vascular (b) en la ROI en los grupos control C y B y en los grupos P y VP. Los histogramas representan el valor medio \pm desviación estándar, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

4.5.2.- Implantes de brushita-microesferas de PLGA conteniendo VEGF, PDGF y TGF- β 1.

Cuatro semanas después de la implantación, periodo experimental estudiado, se observó neoformación ósea limitada a la zona adyacente al defecto y hacia el interior del mismo en los grupos C y B (Fig. 4.36 a y b). Así mismo, se observaron áreas de fibrosis de extensión variable con fibroblastos entre las fibras colágenas en los márgenes del defecto en ambos grupos (Fig. 4.36 a y b).

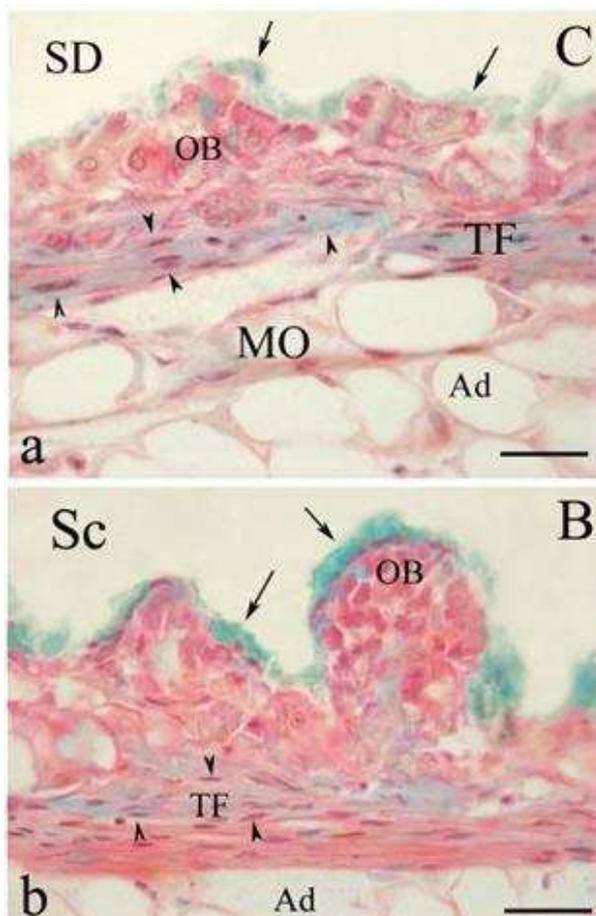


Figura 4.36.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes a los dos grupos control y blanco. Las imágenes muestran la zona adyacente al defecto en los grupos C (defecto vacío) (a) y B (implante blanco) (b). Obsérvese la presencia de hueso neoformado y mineralizado (flechas) hacia la zona del defecto, en C, y hacia el implante, en B. Obsérvese en ambos grupos (a,b) la presencia de fibrosis leve entre el tejido medular y la capa de osteoblastos hipertróficos responsables de la síntesis de hueso nuevo. Barra de escala: 25 μ m. OB: Osteoblastos; MO: Médula ósea; Ad: Adipocitos; TF: Tejido fibroso; SD: Sitio del defecto; Sc: Implante.

En todos los animales analizados, se observó diferenciación osteoblástica y neoformación ósea hacia el interior del implante, indicando buena integración y un grado de compatibilidad aceptable entre el material y el tejido hospedador. No hubo diferencias significativas en la neoformación de hueso entre los grupos C (control) y blanco (B) (Fig. 4.39).

Con respecto a los grupos T, V y VT, hay que indicar que se observó un mayor grado de respuesta tisular que en los grupos C y B, siendo la neoformación ósea en estos tres grupos significativamente mayor (Fig. 4.39). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en cuanto a neoformación ósea (Fig. 4.39) entre los tres grupos. En general, se observaron áreas más extensas de hueso mineral en la zona adyacente al implante e invasión del mismo por el tejido óseo neoformado (Fig. 4.37 a,b,c). Se observó una intensa actividad osteoblástica, reflejada por la presencia de extensas zonas de matriz ósea no mineralizada (osteóide) (Fig 4.37 d). Los implantes presentaron un elevado grado de osteointegración en estos tres grupos de animales, reflejado en la estrecha interacción de los mismos con el hueso mineral neoformado (Fig 4.37 e,f). La compatibilidad del material con el tejido hospedador no sólo se manifestó en la interacción del hueso mineral con el material sino en la invasión del mismo por células mesenquimales procedentes de la médula ósea circundante así como de vasos sanguíneos (Fig 4.37 g). La presencia de signos de fibrosis en estos tres grupos fue escasa en comparación con los grupos C y B aunque se observó cierto grado de variabilidad entre los distintos animales.

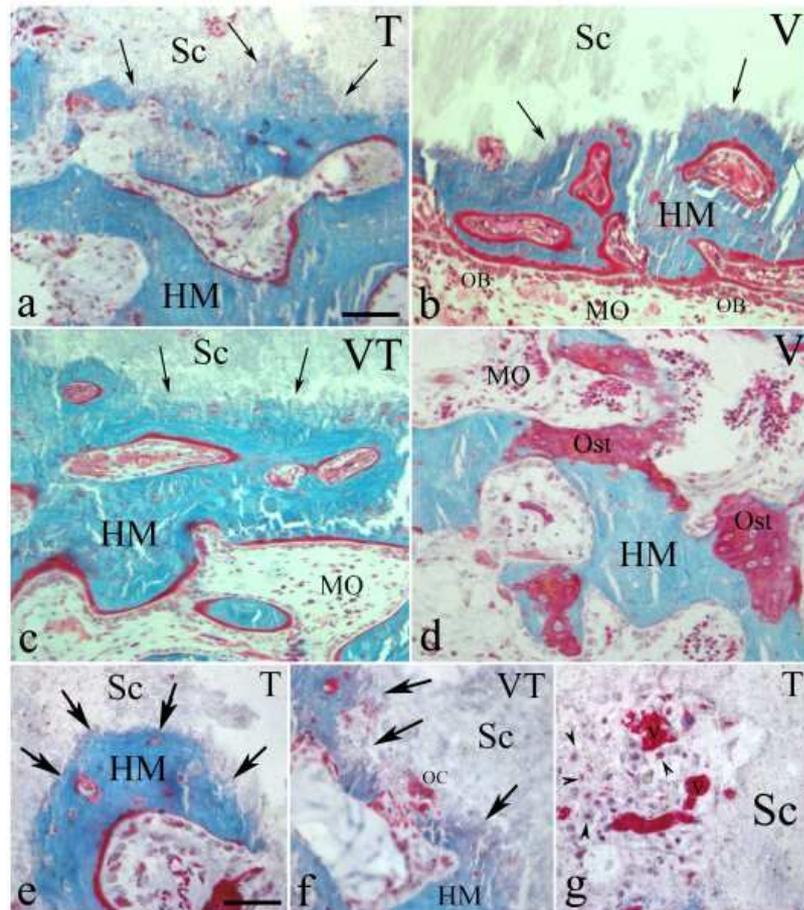


Figura 4.37.-Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes a los grupos TGF (T) (a), VEGF (V) (b) y VT (c) mostrando la presencia de neoformación ósea en la zona adyacente al implante y hacia el interior del mismo. d) Imagen semipanorámica que muestra la presencia en el grupo tratado con VEGF y TGF (VT) de amplias zona de matriz ósea sin mineralizar (osteóide) en la ROI, indicativas de una intensa actividad osteoblástica. e,f,g) Imágenes de detalle que muestran excelente compatibilidad del material con el tejido hospedador. Obsérvese en la figuras e y f la estrecha interacción entre el hueso mineral recién sintetizado y el implante (flechas). En la figura g, obsérvese la presencia de células mesenquimales (puntas de flecha) y vasos sanguíneos (V) en el interior del implante, lo que refleja su buena capacidad para ser invadido. Barra de escala: (a-d) 60 μ m, e,f,g) 35 μ m. HM: Hueso mineral; MO: Médula ósea; Sc: Scaffold (Implante); OB: Osteoblastos; OC: Osteoclastos; Ost: Osteóide; V: Vasos sanguíneos.

En el grupo tratado con los tres factores (VPT) se observó un mayor grado de respuesta tisular, tanto en relación a los grupos C y B como en relación a los grupos con VEGF (V) o TGF (T) por separado o con la combinación de ambos (VT). La neoformación ósea fue significativamente mayor que en los demás grupos (Fig. 4.39). Se observaron en general, áreas más extensas de hueso mineral neoformado en la zona adyacente al implante y mayor invasión del mismo (Fig. 4.38 a). En este grupo el grado de osteointegración fue máximo, detectándose la presencia de fragmentos de material entre las trabéculas ósea neoformadas (Fig. 4.38 b), sin signos aparentes de fibrosis.

En los diferentes grupos se pudo observar fagocitosis de fragmentos del implante (Fig. 4.38 c) y de otros restos celulares (Fig. 4.38 d). En algunos de los grupos experimentales se visualizaron células osteoprogenitoras en división (Fig. 4.38 d). En general, se observó escasa actividad de remodelado en la mayoría de los grupos (Fig. 4.38 e).

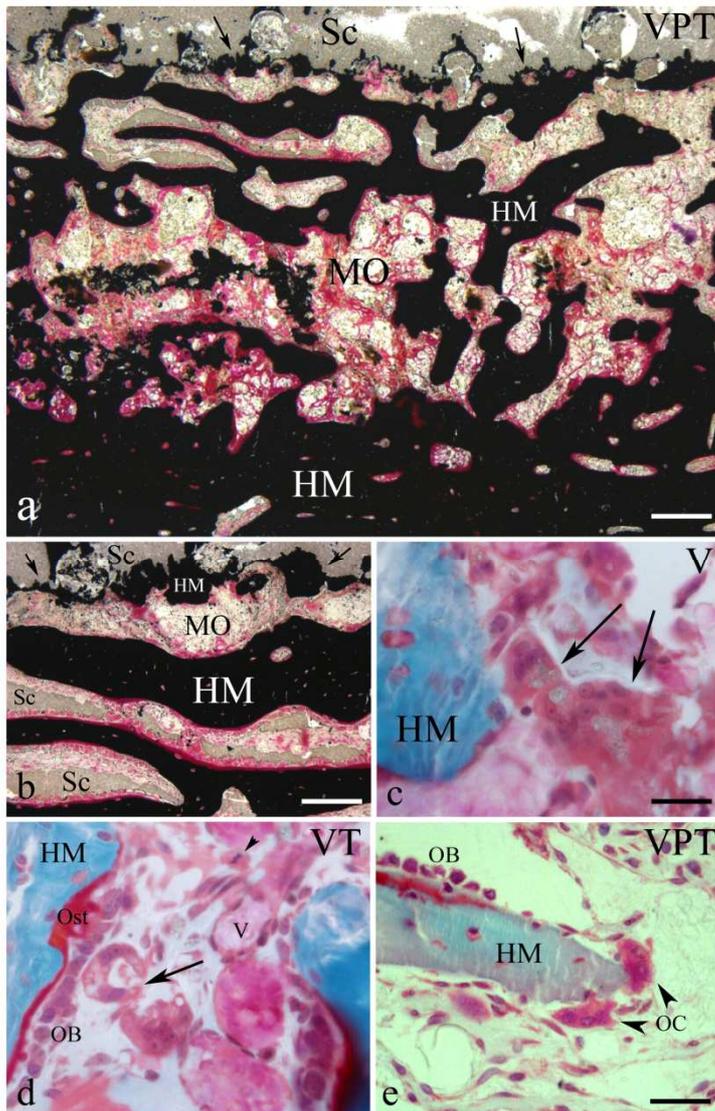


Figura 4.38.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes al grupo tratado con la combinación de los tres factores (VPT) y a los grupos con VEGF (V) y con la combinación de VEGF y TGF (VT). a) Imagen panorámica que muestra la presencia de una amplia zona de hueso mineral neoformado en la región adyacente al implante y hacia el interior del mismo (flechas). Obsérvese la presencia de restos del implante (Sc) entre las trabéculas neoformadas, indicando una perfecta y completa integración del material en la estructura tisular (b). c,d) Imágenes en las que se muestra la

existencia de fenómenos de fagocitosis de restos del material del implante (flechas) (c) así como de otros restos celulares (flecha) en la ROI. Obsérvese en esta imagen la presencia de una célula osteoprogenitora en división (punta de flecha). e) Imagen de detalle que muestra la presencia de resorción y síntesis en diferentes regiones de una misma trabécula ósea indicando la existencia de fenómenos de remodelado. Barra de escala: a) 120 μm , b) 50 μm ; c,d) 20 μm , e) 15 μm . HM: Hueso mineral; MO: Médula ósea; OB: Osteoblastos; OC: Osteoclastos; Ost: Osteoide; Sc: Scaffold (Implante).

La evaluación histomorfométrica en la ROI reveló diferencias significativas en la neoformación ósea entre los grupos C y B, con áreas de hueso neoformado de $0,12 \pm 0,008 \text{ mm}^2$ y $0,13 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ respectivamente, con respecto a los grupos T, V y VT con áreas de $0,904 \pm 0,322 \text{ mm}^2$, $0,979 \pm 0,231 \text{ mm}^2$ y $1,068 \pm 0,209 \text{ mm}^2$ respectivamente y el grupo VPT con $2,007 \pm 0,561 \text{ mm}^2$ (Fig. 4.39).

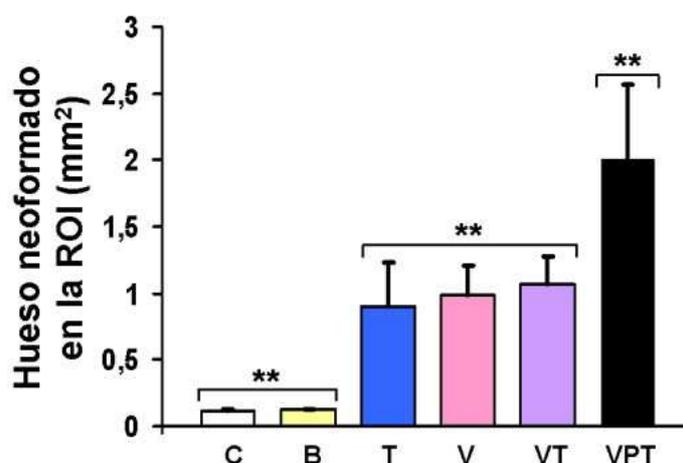


Figura 4.39.- Superficie de hueso neoformado en mm^2 en la ROI en los grupos C y B y en los grupos tratados (T, V, VT y VPT). Los histogramas representan el valor medio \pm desviación estándar. ** $p < 0.001$.

En resumen, el análisis del sistema brushita-microesferas de PLGA mostró diferencias significativas en la neoformación de hueso entre los grupos C y B y los grupos tratados tanto con implantes conteniendo cada factor de forma individual, bien TGF (T) o VEGF (V) como con las combinaciones de dos, VEGF y TGF (VT) o tres factores, VEGF, PDGF y TGF (VPT). Se observaron igualmente diferencias significativas entre los grupos T, V y VT y el grupo VPT.

Para evaluar el proceso de mineralización del hueso neoformado, se midió la tasa de aposición mineral (MAR), limitada por los dos fluorocromos administrados. El análisis mostró claramente doble marcaje con ambos fluorocromos, demostrando así neoformación y mineralización ósea a las cuatro semanas después de practicado el defecto (Fig. 4.40).

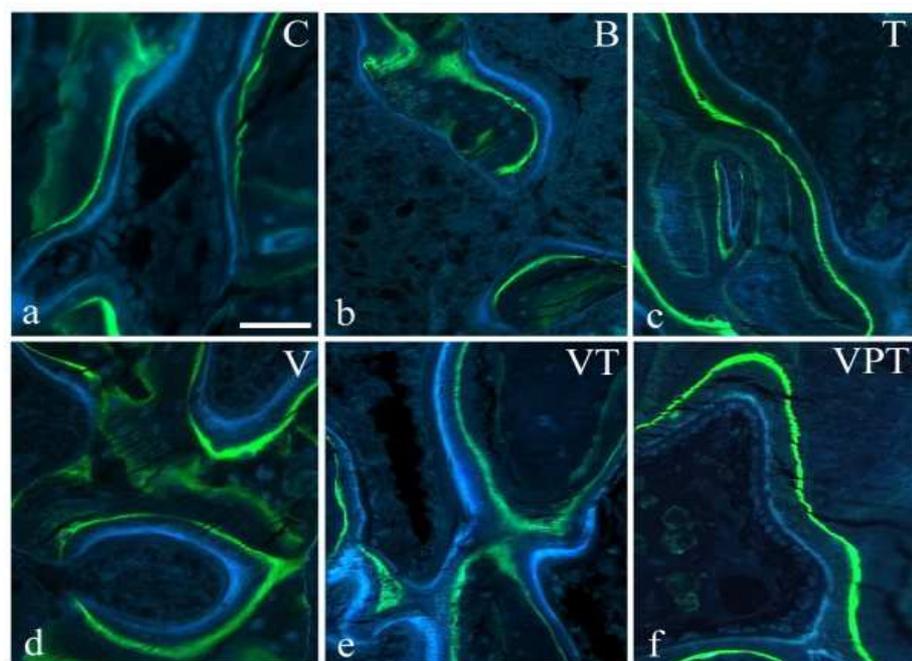


Figura 4.40.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes a los grupos C y B y a los grupos tratados (T, V, VT y VPT) que muestran los frentes de mineralización correspondientes a la oxitetraciclina y a la calceína. Barra de escala: 50 μm .

Aunque todos los grupos experimentales mostraron un aumento en la MAR con respecto a los grupos C y B, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 4.41). Sin embargo, mientras que en

éstos grupos el marcaje se visualizó únicamente en la periferia del defecto, en los grupos tratados con GFs se detectó en zonas más alejadas del mismo, indicando que el proceso de reparación y regeneración se produjo a mayor escala.

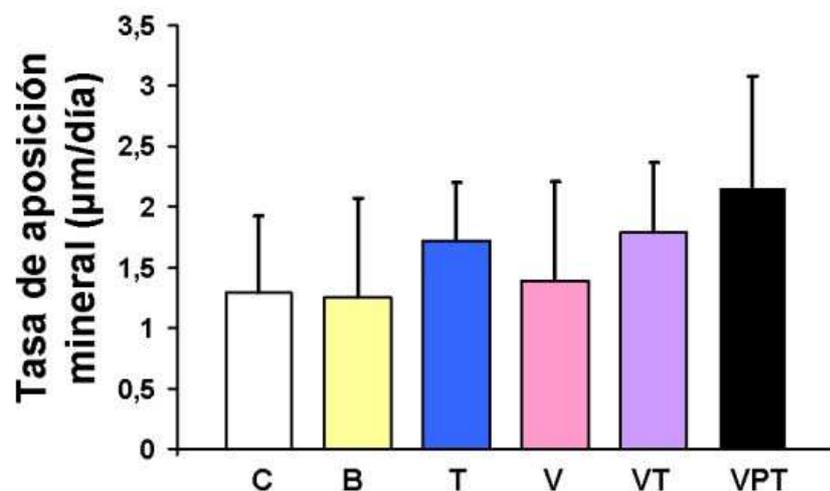


Figura 4.41.- Tasa de aposición mineral en µm/día en la ROI en los grupos control (C y B) y en los grupos tratados (T, V, VT y VPT). Los histogramas representan el valor medio ± desviación estándar. No se observaron diferencias significativas para $p < 0.05$.

En cuanto a la vascularización, en general, se observaron numerosos vasos sanguíneos de tamaño variable entre las trabéculas óseas neoformadas en los grupos V, VT y VPT (Fig. 4.42 b,d) con respecto al grupo T y a los grupos C y B (Fig. 4.42 a,c).

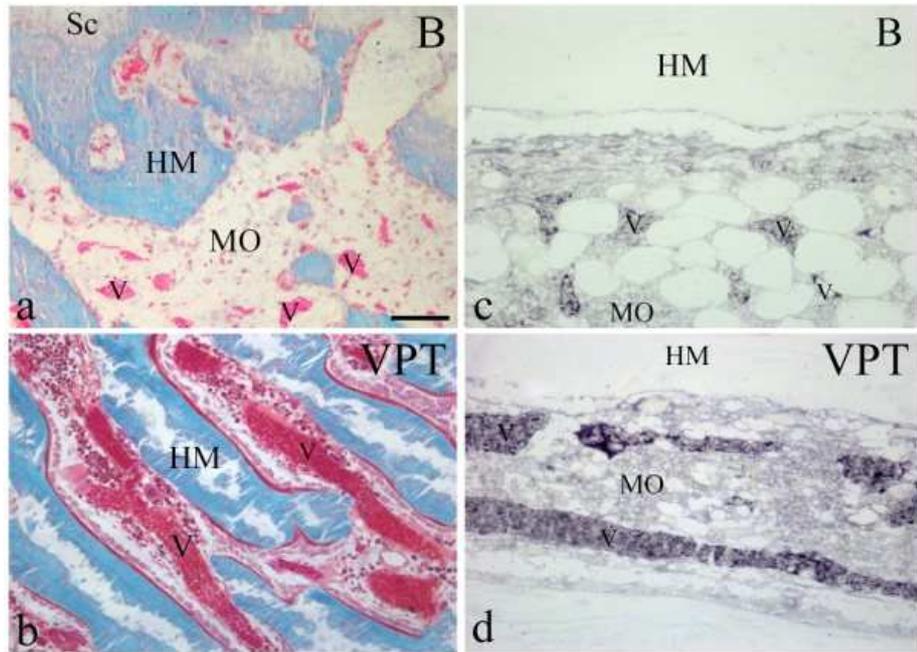


Figura 4.42.- Imágenes representativas en sección horizontal de fémur de conejo pertenecientes al grupo B (a,c) y al grupo experimental VPT (b,d) en las que se observa la presencia de vasos sanguíneos en la ROI. (a,b) Técnica de Masson-Goldner. (c,d) Inmunohistoquímica con anti-Factor de von Willebrand. Barra de escala: 70 μ m. HM: Hueso mineral; MO: Médula ósea; Sc: Scaffold (Implante); V: Vasos sanguíneos.

Para evaluar el proceso de neovascularización, se cuantificó el número de vasos sanguíneos y se midió el área relativa que ocupaban. La presencia de vasos sanguíneos se identificó tanto en secciones de Masson-Goldner como en secciones tratadas con antisuero anti-Factor de von-Willebrand, un marcador de vasos sanguíneos. En estas últimas se cuantificó el número de vasos sanguíneos (densidad) y se midió la superficie vascular. El análisis de la densidad de vasos sanguíneos (Fig. 4.43 a) y la superficie vascular (Fig. 4.43 b) reveló que no existían diferencias significativas entre los grupos C y B, y el grupo con implantes conteniendo únicamente TGF- β_1 . Por el contrario, sí existían diferencias significativas para ambos parámetros entre

estos grupos (C, B y T) y los grupos con implantes conteniendo VEGF (V, VT y VPT).

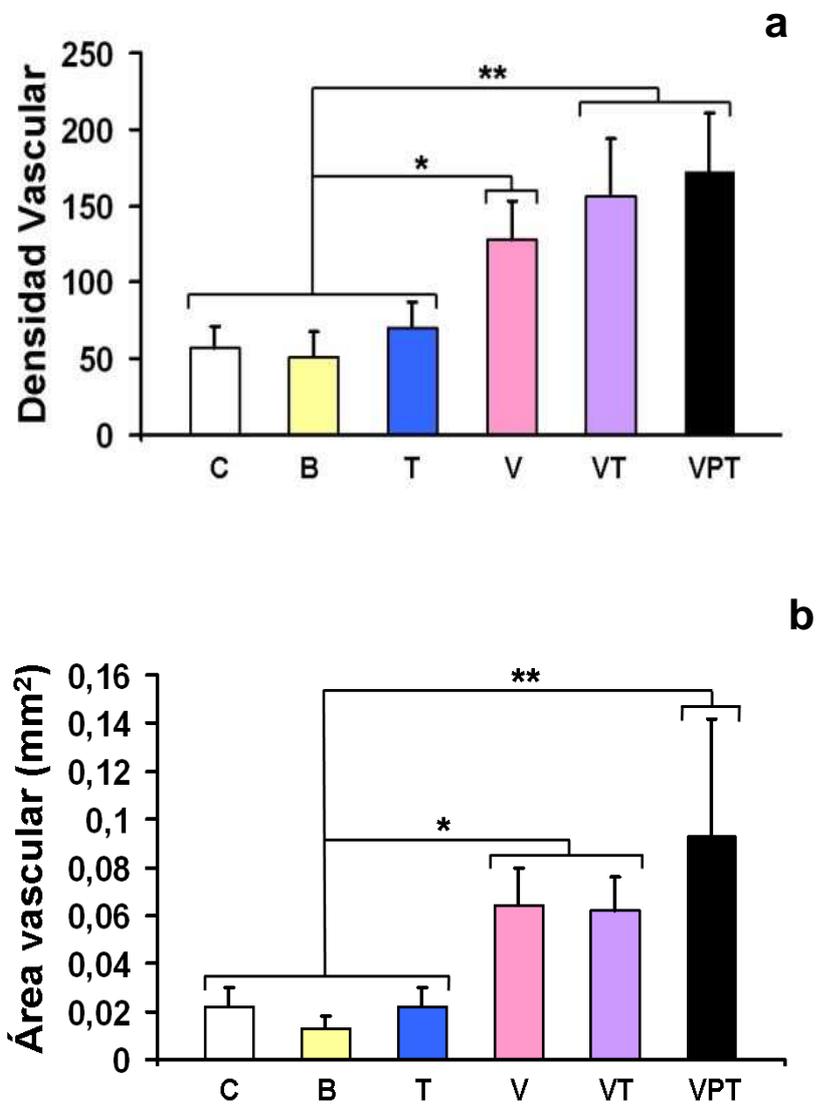


Figura 4.43.- Densidad vascular (a) y el área vascular (b) en la ROI en los grupos C y B y en los grupos tratados con T, V, VT y VPT. Los histogramas representan el valor medio \pm desviación estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

5.- DISCUSIÓN

Las terapias orientadas a reemplazar hueso enfermo ó dañado intentan imitar la compleja cascada de reacciones que tienen lugar en el proceso de regeneración ósea. En este proceso los factores de crecimiento juegan un papel fundamental, específicamente el PDGF, TGF- β_1 y el VEGF y parece que deben estar presentes si se pretende la reparación de tejido óseo. Sin embargo, la eficacia de estas terapias está condicionada tanto por la liberación de cantidades específicas de los distintos factores en el tejido diana como por el tiempo de permanencia en el mismo. Aún hoy en día, a pesar de los esfuerzos realizados, no se conoce la dosis ni la cinética específica con la que deben presentarse los factores exógenos administrados para conseguir una respuesta óptima. En este estudio se han elaborado diferentes sistemas de liberación controlada para un único factor (VEGF), para dos factores combinados (PDGF y VEGF) y para una combinación de tres factores (PDGF VEGF, TGF- β_1) y se muestra que se pueden obtener distintas cinéticas de cesión modificando las características de la matriz que los contiene y consecuentemente diferentes efectos tisulares.

5.1.- Matrices de alginato y chitosano conteniendo VEGF

El control de la cinética de cesión de los factores parece imprescindible para alcanzar una respuesta adecuada. Si bien, otro aspecto fundamental a tener en cuenta es preservar su estabilidad en el sistema de liberación. De acuerdo con Sheridan et al., (2000), Peters et al., (1998) Kawada et al., (1999) y Gu et al., (2004) tanto el alginato como la presencia de albúmina en la formulación es importante para mantener la bioactividad del VEGF. Por ello, el VEGF disuelto en una disolución de albúmina fue

previamente encapsulado en microesferas de alginato. De hecho, hemos puesto de manifiesto que más del 90% del VEGF cedido desde las microesferas es bioactivo. Nuestros resultados, por tanto, coinciden con los de los autores previamente mencionados. El rendimiento de encapsulación del VEGF en las microesferas de alginato fue de aproximadamente el 50% (Tabla 4.1) sin embargo, la liberación del VEGF no se consigue controlar, liberándose el VEGF excesivamente rápido (Fig. 4.6). Según la bibliografía consultada, tanto la eficacia de encapsulación como la cinética de cesión pueden verse condicionadas por la atracción electrostática que se puede producir entre el VEGF y los grupos carboxílicos del alginato (Gu et al., 2004). La cesión rápida del VEGF desde las microesferas puede ser debida a varios factores. En primer lugar, la gran capacidad de captación de agua que facilitaría la difusión del VEGF presente en la superficie de las microesferas. Por otro lado, los factores tecnológicos tales como el método de gelación interna utilizado en la elaboración de las mismas y la alta concentración de albúmina, empleada para proteger a la proteína, también podrían actuar disminuyendo la probabilidad de interacción entre el VEGF y el alginato. Además hay que tener en cuenta que la presencia de albúmina puede por un lado, competir con el VEGF durante el proceso de encapsulación, lo que explicaría el relativo bajo rendimiento de encapsulación del VEGF. Y por otro lado, la presencia de albúmina en la formulación podría aumentar la porosidad de las microesferas tanto durante el proceso de maduración como en el ensayo de cesión. El incremento de porosidad se produce por la pérdida de albúmina durante la elaboración y por la formación de poros y canales en las microesferas como consecuencia de la cesión de esta proteína de tan alto peso molecular. Otro aspecto a tener en cuenta en los ensayos de cesión desde sistemas elaborados con alginato, es el medio de cesión empleado. De acuerdo con estudios previos (Gu et al., 2004 y Wells et al., 2007), la cinética de cesión de proteínas desde microesferas de alginato puede verse

modificada en función de la composición del medio en el que se realice el ensayo. Por lo que para imitar las condiciones *in vivo*, se utilizó como medio de cesión α -MEM enriquecido con FBS, que es un medio rico en electrolitos, glucosa, aminoácidos, vitaminas, etc.

Para controlar la cinética de liberación del VEGF desde las microesferas, (el 80% del VEGF se cede en los primeros días del ensayo), las microesferas de alginato fueron incluidas en matrices de alginato o de quitosano. Hay que indicar que no hubo pérdida apreciable de VEGF durante el proceso de elaboración de las matrices y la cinética de cesión mejoró considerablemente, reduciéndose de forma importante el efecto burst con las formulaciones A-2, CH-1 y CH-2 (Figura 4.6). Los perfiles de cesión obtenidos *in vitro* hacen pensar que estas tres formulaciones podrían ser potencialmente útiles como soportes del VEGF en regeneración ósea. Por este motivo fueron ensayadas *in vivo*. Los resultados obtenidos en los primeros tiempos de muestreo con las matrices A-2 mostraron una elevada liberación por lo que no se continuó el experimento. Por el contrario los perfiles de cesión *in vivo* tras la implantación de las formulaciones CH-1 y CH-2 en fémur de rata, se completaron como se muestra en la figura 4.12. Los perfiles de liberación *in vivo*, presentan un mayor efecto burst y una velocidad de cesión más rápida que *in vitro*, probablemente debido al flujo sanguíneo en la zona. Como se puede apreciar en la Tabla 4.1 y figura 4.9 tanto las microesferas de alginato como las matrices de quitosano tienen una gran capacidad para captar agua e hincharse *in vitro*. Este mismo comportamiento debe tener lugar *in vivo*, pero en este caso el VEGF es rápidamente disuelto y retirado de forma continua por el flujo sanguíneo, lo que explicaría la rápida y continúa liberación de la proteína. Este efecto es probablemente más acusado durante la intervención y el post-operatorio inmediato lo que produce una liberación inicial mucho más elevada que *in vitro*.

Por el contrario, la película de PLA-H de la formulación CH-1-PLA, reduce el efecto burst y controla la cesión tanto *in vitro* como *in vivo* prolongándose durante 5 semanas. Este efecto se puede apreciar claramente al comparar los perfiles de liberación obtenidos con CH-1, la misma formulación sin recubrir. El VEGF se cede *in vitro* desde la formulación CH-1-PLA, de acuerdo con una cinética de orden cero. Hay que poner de manifiesto que los perfiles de liberación de proteínas en general y de factores de crecimiento en particular, suelen presentar un elevado efecto burst seguido de una cesión tremendamente lenta e incompleta (Lee et al., 2004 y Norton et al., 2005). Los resultados obtenidos con la matriz CH-1-PLA indican que el film de PLA reduce la captación de agua, la pérdida de masa y como consecuencia controla la velocidad de cesión del VEGF. La película de PLA permite la entrada de agua de forma lenta y progresiva (Fig. 4.9). La formulación CH-1-PLA pierde masa de forma moderada, alrededor del 20% durante la primera semana, no observándose pérdida posterior (Fig. 4.9). Por el contrario la formulación CH-1, capta gran cantidad de agua, la matriz se hincha y se aprecia un aumento del tamaño de poro. La estructura de la formulación CH-1 se mantiene durante las dos primeras semanas no apreciándose una pérdida importante de masa, sin embargo, a partir de este tiempo se produce la destrucción de la matriz (Fig 4.10). En el caso de la formulación CH-1-PLA, la película de PLA protege la estructura interna de la matriz permitiendo una degradación lenta y progresiva del implante (Fig 4.10). Estos resultados, nos indican que la cesión del VEGF desde la formulación CH-1-PLA tiene lugar por difusión a través de la película de PLA, la cual va degradándose y aumentando su porosidad lentamente y en definitiva controlando la velocidad de liberación de dicho factor a lo largo del tiempo, resultando que el mecanismo de cesión es un proceso combinado de difusión-erosión.

Además, la bioactividad del VEGF cedido *in vitro* desde las microesferas de alginato y desde las matrices fue confirmada en cultivos de HUVECs (Fig 4.8). Estos resultados ponen de manifiesto que el proceso de elaboración de los sistemas preparados en este trabajo no altera la actividad de la proteína.

In vivo y de acuerdo con la buena correlación *in vitro* -*in vivo* obtenida, (Fig. 4.13), se propone el mismo mecanismo de cesión que *in vitro*. El film de PLA, en este caso, evita el elevado efecto burst observado con la formulación sin recubrir porque controla el flujo de entrada de sangre lo que permite una liberación de VEGF sostenida. El 80% del factor contenido en el sistema es liberado a lo largo de 5 semanas a una velocidad ligeramente más elevada que *in vitro*.

La utilización de ¹²⁵I-VEGF nos permite conocer los niveles de VEGF en los distintos tejidos muestreados. La curva de concentraciones de VEGF en los tejidos analizados (Fig 4.14), muestra que la proteína permanece localizada en las proximidades del implante, pasando muy poca cantidad a circulación sistémica durante todo el ensayo. De hecho, excepto en tiroides, la radiactividad fuera del fémur no se puede considerar significativamente diferente al background del contador. La radiactividad medida en tiroides corresponde al ¹²⁵I que se libera en la metabolización del VEGF. Por tanto, el VEGF se encuentra concentrado en el defecto óseo practicado en el fémur y debe inducir neovascularización y favorecer la formación de nuevo tejido óseo.

Las diferencias observadas en los perfiles de liberación del VEGF desde CH-1 y CH-1-PLA tras su implantación en el fémur de rata (Fig 4.12), se reflejan en la distribución del VEGF en el hueso (Fig 4.14). La

concentración máxima de VEGF obtenida con CH-1, se detecta a los 5 días post-implantación en la zona próxima al implante (metáfisis distal) manteniéndose por encima de 10 ng/g durante 2 semanas. Por el contrario, debido al continuo aporte de VEGF por parte de la formulación CH-1-PLA, el pico se detecta a las 3 semanas y la concentración se mantiene por encima de 15 ng/g durante al menos 5 semanas. Estos resultados muestran que el VEGF cedido desaparece rápidamente del defecto óseo por el flujo sanguíneo y su intenso metabolismo. Por tanto, para mantener niveles se requiere un aporte continuo de dicho factor y esto se consigue con un sistema de liberación sostenida de VEGF. De acuerdo con la cinética de liberación y los resultados de concentración in situ, la formulación CH-1-PLA es capaz de mantener concentraciones eficaces de VEGF durante un periodo más prolongado que las matrices CH-1.

5.2.- Sistemas elaborados con brushita

En esta segunda parte, la brushita se utilizó como material para elaborar un sistema de liberación conteniendo dos o tres factores de crecimiento, concretamente PDGF y VEGF o la combinación con el TGF- β_1 como tercer factor.

En el sistema doble el PDGF se encuentra disperso en la brushita para que se libere en un corto periodo de tiempo ya que debe estar disponible en los primeros tres días del proceso de reparación (Dimitriou et al., 2005). Por el contrario, el VEGF debe actuar más tarde alrededor de la tercera semana (Dimitriou et al., 2005). Por ello, el VEGF se pre-encapsuló en microesferas de alginato que fueron incluidas en una esponja de quitosano y así retrasar su liberación en el defecto óseo. La regeneración ósea es un proceso

perfectamente coordinado, en el que se producen una serie de reacciones en cadena en las que juegan un papel muy importante una serie de factores de crecimiento. En este trabajo se ha intentado desarrollar un sistema que permita la concurrencia de dos factores de crecimiento en el defecto en cantidad y tiempo de permanencia que simule parcialmente el proceso fisiológico reparador. Evidentemente la eficacia del sistema depende de la velocidad de cesión, de las cantidades liberadas y del tiempo de permanencia de los factores en el defecto. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que las estrategias tecnológicas empleadas para la elaboración del sistema brushita-chitosano han permitido que los dos factores estudiados, PDGF y VEGF, se liberen con distinta cinética de cesión.

Teniendo en cuenta la buena correlación obtenida entre los perfiles de cesión *in vitro-in vivo*, (Fig 4.19), la discusión se ha centrado en los resultados *in vivo*. Aproximadamente el 70% del PDGF disperso en el implante de brushita se liberó durante la primera semana, alcanzando el 80% al final de la segunda semana, que fue el tiempo de experimentación. Por lo tanto, el perfil de cesión del PDGF se corresponde bien con la expresión temporal del GF durante la regeneración de una fractura ósea tal y como describen Dimitriou et al., (2005). Por otro lado y de acuerdo también con estos autores, el VEGF que se expresa tres semanas después de producirse el daño óseo, se liberó más rápidamente de lo deseado desde el sistema de brushita-chitosano, cediéndose aproximadamente el 60% durante las dos primeras 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 implantes 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. Por lo tanto, para facilitar la formación de tejido, es necesaria una matriz porosa. Sin embargo, como algunos autores han

publicado, para controlar la velocidad de liberación de la sustancia activa desde sistemas elaborados con cementos, es necesario disminuir su porosidad (Bohner et al., 2000 y Hoffman et al., 2009). En este estudio, se intentó alcanzar una situación de compromiso que contemplara ambos requisitos. Por un lado, se logró mantener la porosidad de los implantes lo más elevada posible (53%) para un material como la brushita (Hofmann et al., 2009), lo que en principio podría favorecer la formación de hueso nuevo (Cama et al., 2009). 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 que la expresión normal del VEGF después de una fractura ósea ocurre durante los primeros 10 días (Fig 4.18), con un pico entre el quinto y el décimo día en ratas (Pufe et., al 2002, Uchida et al., 2003 y Kempen et al., 2009). En el presente estudio, más del 50% del VEGF se liberó durante los 10 primeros días, coincidiendo con el modelo de expresión de este GF durante el proceso fisiológico de reparación ósea en ratas propuesto por dichos autores (Pufe et., al 2002, Uchida et al., 2003 y Kempen et al., 2009).

De acuerdo con los niveles de VEGF y de PDGF obtenidos en los distintos tejidos analizados, los factores cedidos se encuentran localizados en las proximidades del defecto y, su distribución sistémica es inapreciable (Fig. 4.20). La cinética de liberación de los GFs se refleja perfectamente en los niveles obtenidos en tejido óseo. Los picos de concentración de ambos factores en hueso se detectaron durante la primera semana. Sin embargo, el pico del PDGF fue más agudo que el del VEGF, debido a la diferencia en los perfiles de cesión de cada uno de los factores así como a la vida media más corta del PDGF, 2 minutos, frente a los 50 minutos del VEGF (Chen y Mooney, 2003). La velocidad de cesión del PDGF durante los primeros 4 días fue lo suficientemente rápida para alcanzar la máxima concentración a un

tiempo corto, tal y como se esperaba. Después, la velocidad de eliminación del PDGF desde el defecto fue mayor que la de liberación desde el implante, por lo que la concentración en el defecto disminuyó. Por tanto, el PDGF se mantuvo en el lugar del defecto el tiempo necesario de acuerdo con los patrones de expresión para la regeneración ósea (Dimitriou et al., 2005).

Por el contrario, la liberación más lenta y sostenida del VEGF junto con una dosis mayor en el sistema y la vida media más larga de este factor hizo que éste se mantuviera en el defecto durante un tiempo más prolongado. Los niveles de VEGF en tejido óseo se mantuvieron alrededor de 3 ng/g a lo largo de las cuatro semanas del ensayo (Fig 4.20). Estos resultados apoyan que la única forma de mantener concentraciones efectivas de VEGF es usar un sistema de liberación sostenida que controle eficazmente la cesión del factor durante el tiempo deseado.

Los efectos sobre la regeneración ósea del PDGF y de la combinación de PDGF/VEGF encapsulados en los sistemas de brushita/chitosano fueron evaluados histológicamente. El tiempo de sacrificio de los animales fue fijado en cuatro semanas de acuerdo con varios autores (Boo et al., 2002, Herron et al., 2003 y Tamimi et al., 2006) que lo consideran un período suficiente para observar angiogénesis y nueva formación de hueso en varias especies animales, incluyendo conejos, implantados con biomateriales. En nuestro trabajo, los cambios histológicos que ocurrieron en el hueso durante las cuatro semanas post-implantación permitieron la evaluación de la regeneración ósea y la diferente actuación de los dos factores estudiados.

En este trabajo, los resultados indican que los implantes blancos de brushita-chitosano (grupo B) no son capaces por si solos de promover de forma considerable la neoformación de hueso con respecto a los del grupo C

(defectos óseos sin rellenar) (Fig 4.31). El efecto sobre la regeneración ósea mejora notablemente tanto con los implantes cargados con PDGF como con los que contienen PDGF y VEGF. El PDGF por si sólo es capaz de promover la neoformación del hueso, sin embargo, la combinación de ambos factores PDGF y VEGF aumenta significativamente la formación de tejido óseo en comparación con la misma dosis de PDGF solo (Fig 4.31). Autores como Chen et al. (2007) y Hao et al. (2007) han demostrado que la combinación PDGF/VEGF induce una maduración más rápida de los vasos sanguíneos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que el VEGF participa de forma significativa en el proceso de neoformación ósea.

El perfil de cesión del VEGF desde los implantes brushita-chitosano aún a pesar de presentar un pico relativamente temprano, es capaz de mejorar la respuesta en el hueso. Finalmente, aunque los resultados obtenidos con los fluorocromos inyectados no fueron estadísticamente significativos entre los grupos estudiados, si se observa un aumento de la aposición mineral en los grupos tratados con GFs (Fig. 4.33).

Para aumentar la eficacia del sistema anterior se incorporó otro factor implicado en la regeneración ósea, el TGF- β_1 . En este caso para simplificar el sistema, tanto el PDGF como el TGF- β_1 se incluyeron dispersos en el cemento de brushita y el VEGF encapsulado en microesferas de PLGA.

El proceso de elaboración de estas microesferas fue más sencillo, se mejoraron los rendimientos de producción e incorporación del VEGF y la actividad se mantuvo. Además tanto la resistencia a la fractura como la porosidad de los sistemas de brushita fueron similares. Por tanto, el sistema brushita-microesferas de PLGA parece más adecuado como vehículo para la administración de una combinación de GFs.

Como se ha reflejado ya en el apartado de resultados, las cinéticas de cesión tanto *in vitro* como *in vivo* de PDGF y TGF- β_1 dispersos en la brushita son prácticamente iguales (Fig 4.21 y 4.25). De acuerdo con lo publicado por Dimitriou et al. (2005), el TGF- β_1 debería presentar una cinética de cesión más lenta y prolongada.

El planteamiento con respecto al VEGF fue intentar simplificar el sistema y si es posible retardar la liberación de dicho factor. De hecho la cesión *in vitro*, fundamentalmente durante las dos primeras semanas, fue más lenta que desde el sistema brushita-chitosano, a pesar de que el comportamiento del sistema en cuanto a captación de agua, pérdida de masa y porosidad fue similar. Sin embargo, *in vivo*, los perfiles de cesión fueron prácticamente superponibles. La cinética de liberación de los GFs, al igual que con los sistemas anteriores, se refleja en los niveles obtenidos en tejido óseo (Fig. 4.27). Las concentraciones máximas en hueso se alcanzan a los tres días para el PDGF y TGF- β_1 y como corresponde a una menor velocidad de cesión, a los 7 días en el caso del VEGF. La diferencia en velocidades de liberación, vidas medias y dosis, se corresponde bien con los valores de áreas bajo la curva. El PDGF y TGF- β_1 tienen una vida media de unos dos minutos (Bewen-Pope et al., 1984; Coffey et al., 1987), bastante más corta que el VEGF que es de aproximadamente de 50 minutos (Chen y Mooney 2003). Sin embargo, el TGF- β_1 , de acuerdo con otros autores (Zioncheck et al., 1994) podría presentar una distribución biexponencial, con una vida media corta de <11 min y otra terminal, de unos 163 min que representaría solamente el 2% del área bajo la curva, tras una administración única. Por tanto, niveles detectables de VEGF se mantienen prácticamente a lo largo del periodo de ensayo, mientras que los otros dos factores desaparecen del lugar de implantación en unos pocos días. En cuanto al TGF- β_1 , la curva es paralela a la de PDGF, si bien el área bajo la curva es menor debido a que la

dosis administrada fue 2.5 veces inferior. La elección de la dosis de este factor se hizo de acuerdo con las publicaciones consultadas, a pesar de las grandes diferencias de dosis empleadas en los distintos estudios. Concretamente dosis de 20 ng combinada con BMP-2 no fueron eficaces en ratas (Oest et al., 2007) mientras que dosis de 250 ng de TGF- β_1 mejoran el proceso de remodelación ósea en conejos (Link et al., 2008). Por otro lado, dosis 600 ng, producen crecimiento óseo en defectos practicados en perros (Lind et al., 1996) mientras que otros autores en estos mismos animales emplean dosis de 12 y 120 μ g (Sumner et al., 2001). Por tanto, teniendo en cuenta que dosis elevadas administradas por vía sistémica de TGF- β_1 produjeron lesiones graves en órganos vitales, hígado, riñón y páncreas en ratas (Terrell et al., 1993), que 250 ng de TGF- β_1 como único factor mejora la remodelación ósea en conejos (Link et al., 2008) y que en el presente trabajo se está estudiando la combinación de tres factores, la dosis empleada fue de 100 ng.

Los resultados histológicos obtenidos con los sistemas de brushita en el que se sustituye la esponja de quitosano por microesferas de PLGA confirman que los implantes blancos elaborados mayoritariamente con brushita no promueven neoformación de hueso (Fig. 4.39) en las condiciones en las que se ha llevado a cabo el presente trabajo. Estos resultados no coinciden con los de otros autores (Frayssinet et al., 1998; Trisi et al., 2003; Chow et al., 2003; Constantz et al., 1998 y Tamimi et al., 2007) que describen que la brushita es bien tolerada, aunque a tiempos cortos puede producir una ligera reacción a cuerpo extraño que no interfiere con la formación de hueso nuevo y la resorción del material se produce en pocas semanas. Estas diferencias son probablemente debidas a los distintos diseños experimentales y animales empleados en los trabajos con brushita.

El efecto sobre la regeneración ósea mejora notablemente con los implantes cargados con factores individuales (Fig. 5.1). El TGF- β_1 , PDGF o VEGF producen un incremento significativo de área de hueso neoformado con respecto a los grupos blanco o control. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre la magnitud del efecto producido por cada uno de ellos. Además, a diferencia del efecto sinérgico que se produce con la combinación PDGF+VEGF, el efecto del TGF- β_1 no se ve potenciado por la presencia de VEGF en el sistema. Así mismo la adición de estos dos factores con actividad angiogénica (VEGF y PDGF), potencia el efecto del TGF- β_1 , mostrando diferencias significativas en la neoformación ósea. Sin embargo, este efecto sinérgico probablemente sea debido únicamente al efecto combinado del PDGF y el VEGF puesto que, no existen diferencias significativas con respecto a la combinación de estos dos factores.

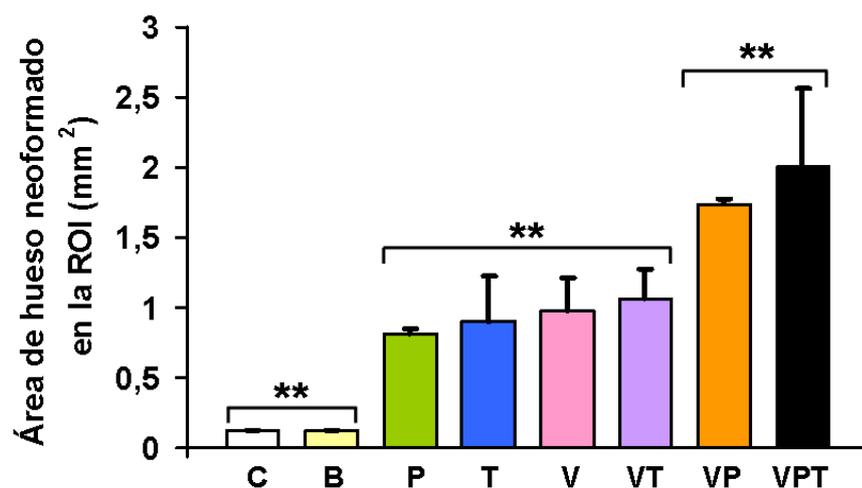


Figura 5.1.- Superficie de hueso neoformado en mm² en la ROI en los grupos C y B y en los grupos tratados con implantes de brushita conteniendo cada uno de los factores de crecimiento (P, T y V) o combinaciones de los mismos (VT, VP y VPT). ***p* < 0.001.

Por otro lado, los resultados obtenidos con relación a la tasa de aposición mineral no fueron estadísticamente significativos entre los grupos estudiados (Fig 5.2). Sin embargo, hemos de destacar que se observa una clara tendencia a incrementarse este efecto con la presencia de GFs. Al igual que en la valoración de la neoformación ósea, los grupos tratados con la combinación de los dos factores angiogénicos (VEGF y PDGF) muestran mayor tasa de mineralización.

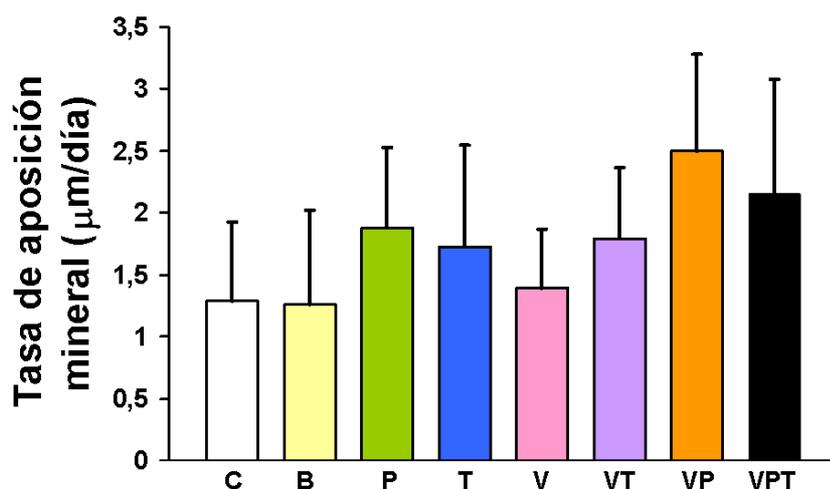


Fig. 4.33.- Tasa de aposición mineral en µm/día en la ROI en los grupos C y B y en los grupos tratados con implantes de brushita conteniendo cada uno de los factores de crecimiento (P, T y V) o combinaciones de los mismos (VT, VP y VPT). No se observaron diferencias significativas para $p < 0.05$.

Por último, el efecto angiogénico inducido por los GFs, valorado a través de la densidad de vasos sanguíneos y la superficie vascular, muestra dos comportamientos claramente diferenciados (Fig 5.3). El grupo constituido por los animales no tratados (defecto óseo), tratados con implante blanco así como los tratados con TGF- β_1 mostraron un efecto angiogénico mínimo y significativamente menor que el resto de los grupos. Los grupos que

presentaron un efecto significativamente mayor (P, V, VT, VP y VPT), aunque no mostraron diferencias significativas entre ellos con respecto a los parámetros evaluados, los resultados indican un aumento del efecto angiogénico con las combinaciones de factores de crecimiento.

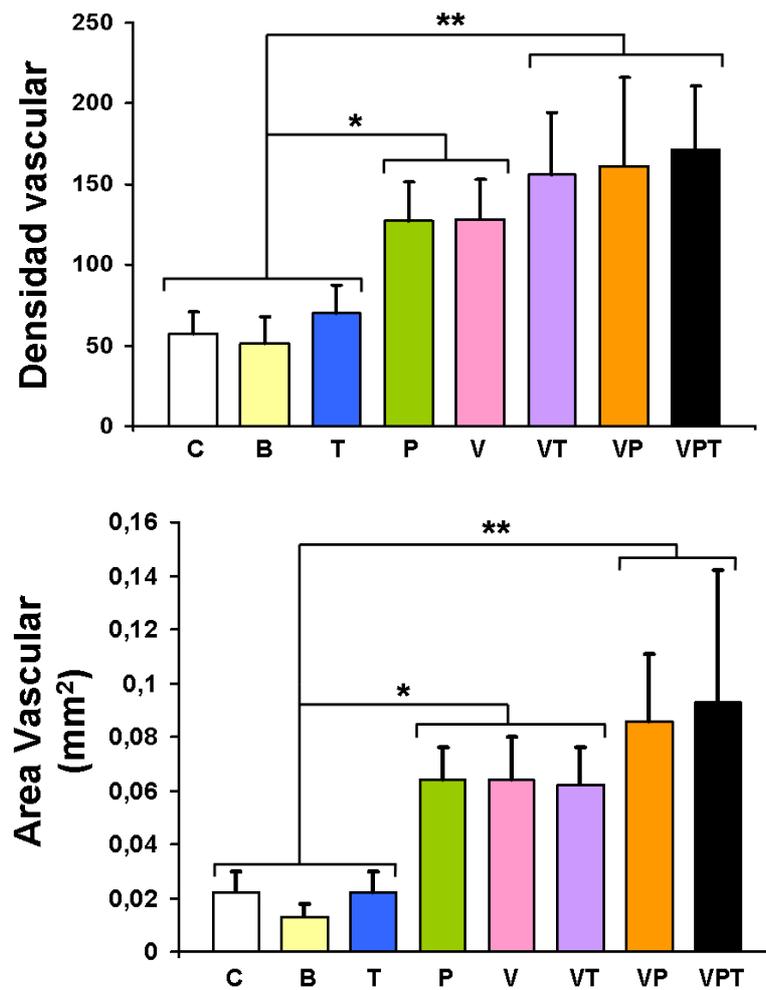


Figura 4.35.- Densidad vascular (a) y el área vascular (b) en la ROI en los grupos C y B y en los grupos tratados con implantes de brushita conteniendo cada uno de los factores de crecimiento (P, T y V) o combinaciones de los mismos (VT, VP y VPT). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos en este trabajo se justifican en parte, por el doble papel que juega el VEGF en la regeneración ósea, por un lado su principal acción es inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos pero además, se ha comprobado que ejerce una acción directa favoreciendo la formación y regeneración de tejido óseo (Street et al., 2002 y Eckardt et al., 2005). La vascularización inducida por el VEGF sólo o combinado con otros factores, particularmente con PDGF, formulados en distintos sistemas de cesión ha sido puesta de manifiesto por algunos autores (Yen-Chen Huang et al., 2005, Hao et al., 2007, Chen et al., 2007, Ennett et al., 2006 y Siddhesh et al., 2007). Sin embargo, la no sinergia observada con el TGF- β_1 no era de esperar ya que, a pesar de que la dosis utilizada de TGF- β_1 fue inferior a la de los otros dos GFs, no parece muy probable que éste sea el motivo puesto que cuando fue administrado individualmente produjo un efecto significativo sobre la neoformación ósea del mismo orden de magnitud que la administración individual del VEGF o PDGF. Resultados parcialmente similares han sido observados por otros autores (Kempen et al., 2009), que indican que el VEGF (2 μ g) sólo o en combinación con BMP-2 (9.2 μ g), no es capaz de incrementar el efecto obtenido con BMP-2 en un defecto femoral en ratas. Los autores concluyeron que este resultado podría ser debido a que el pico de concentración de VEGF aparecía demasiado temprano. Desde nuestro punto de vista, la falta de efecto podría ser fundamentalmente debido al elevado efecto burst (>80%) que se produce desde el sistema de cesión usado en el mencionado trabajo. Ésta, evidentemente, no sería la causa en el presente estudio, el efecto burst del VEGF está totalmente controlado, sin embargo no lo está la cesión inicial del TGF- β_1 y por tanto podría ser necesario que la presencia de dicho factor en el defecto fuera más prolongada.

Los resultados presentados en este estudio ponen de manifiesto la necesidad de establecer la cinética óptima de cesión de los GFs, no sólo con respecto a la concentración a alcanzar localmente sino también en relación al tiempo de permanencia del factor en el defecto a reparar. Sin embargo, hemos de resaltar que de acuerdo con la bibliografía consultada, no se ha estudiado hasta ahora la cinética de cesión del TGF- β_1 desde sistemas de liberación ni las concentraciones alcanzadas en un defecto óseo. Aparte de artículos publicados por este grupo de investigación cuyos resultados han sido discutidos en el presente trabajo (de la Riva et al., 2009, 2010), 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., (2005) realizados con un sistema de liberación de VEGF elaborado con PLGA implantado en tejido subcutáneo y el anteriormente mencionado de Kempen et al., (2009).

Por tanto, y como conclusión a partir de los resultados obtenidos en este estudio, el sistema potencialmente útil parece ser la combinación de VEGF con PDGF. La inclusión del TGF- β_1 como tercer factor no estaría justificada, al menos con la dosis y/o cinética evaluada en este trabajo.

- 1.- Las microesferas de alginato no controlan la liberación del VEGF, mientras que las microesferas de PLGA muestran una cesión más sostenida del mismo.
- 2.- La velocidad de cesión del VEGF, desde las microesferas de alginato, se controla y se ajusta a una cinética orden cero incluyéndolas en matrices de quitosano recubiertas con una película de PLA
- 3.- El VEGF encapsulado tanto en las microesferas de alginato como en las de PLGA mantiene su bioactividad.
- 4.- La brushita permite elaborar sistemas conteniendo tres factores de crecimiento que se liberan con distinta cinética en función de la forma en la que sean incorporen en la matriz cálcica.
- 5.- Existe buena correlación entre las cinéticas de cesión *in vitro-in vivo* de los distintos factores administrados localmente en el defecto óseo practicado.
- 6.- La cinética de cesión *in vivo* de los factores de crecimiento y sus características farmacocinéticas se refleja en las curvas de concentración de los factores en el defecto óseo a lo largo del tiempo.
- 7.- 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.
- 8.- Según el modelo de defecto óseo presentado en esta memoria, la brushita mostró ser un material que no produce reacción a cuerpo extraño y es bien

tolerado por el tejido hospedador integrándose totalmente en la estructura tisular, si bien no induce la formación de tejido óseo.

9.- Cada uno de los factores incorporados en los implantes de brushita, PDGF, VEGF o TGF β_1 , por si solos producen un incremento estadísticamente significativo en la formación ósea.

10.- La combinación de PDGF con VEGF potencia la formación ósea de manera significativa con respecto a la acción de los factores por separado, observándose además, un efecto positivo sobre la mineralización y la vascularización.

11.- La adición de TGF β_1 como tercer factor, a la dosis empleada y con la cinética de liberación obtenida, no aporta ningún beneficio adicional sobre la combinación de PDGF/VEGF.

12.- De acuerdo con nuestros resultados el VEGF debe estar presente en cualquier combinación de factores empleados para la regeneración ósea.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Akman A.C., Seda Tiğli R., Gümüsderelioğlu M. y Nohutcu R.M. "Bone morphogenetic protein-6-loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells". *Artif. Organs.* 2010; 34(1):65-74.
- 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; 7:34-39;
- Arnold U., Lindenhayn K. y Perka C. "*In vitro*-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites". *Biomaterials* 2002; 23:2303-2310.
- 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 osteotransductivity in rat calvarial bone defects". *Clin. Oral Impl. Res.* 2001; 12:609-616.
- 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; 89:1262-1270.
- 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; 86:565-572.
- Boo J.S., Yamada Y., Okazaki Y., Hibino Y., Okada K., Hata K., Yoshikawa T., Sugiura Y. y Ueda M. "Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold". *J. Craniofac. Surg.* 2002; 132:231-239.

- Bowen-Pope D.F., Malpass, T.W., Foster, D.M. y Ross R. "Platelet-derived growth factor *in vivo*: levels, activity, and rate of clearance". *Blood* 1984; 64: 458-469.
- Cama G., Barberis F., Botter R., Cirillo P., Capurro M., Quarto R., Scaglione S., Finocchio E., Mussi V. y Valbusa U. "Preparation and properties of macroporous brushite bone cements". *Acta Biomaterialia* 2009; 5:2161-2168.
- Carstens M.H., Chin M. y Li X.J. "In situ osteogenesis: regeneration of 10-cm mandibular defect in porcine model using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and Helistat absorbable collagen sponge". *J. Craniofac. Surg.* 2005; 16:1033–1042.
- Chen R.R. y Mooney D.J., "Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering". *Pharm. Res.* 2003; 20:1103-1112.
- Chen R.R., Silva, E.A., Yuen W.W. y Mooney D.J. "Spatio-temporal VEGF and PDGF Delivery patterns blood vessel formation and maturation". *Pharmaceutical Research* 2007; 24(2):258-264.
- 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:245-251.
- [Coffey R.J. Jr](#), [Kost L.J.](#), [Lyons R.M.](#), [Moses H.L.](#) y [LaRusso N.F.](#) "Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. Uptake, metabolism, and biliary excretion". [J. Clin Invest.](#) 1987; 80(3):750-757.
- Constantino P.D. y Freidman C.D., "Synthetic bone graft substitutes". *Otolaryngol Clin North Am.* 1997; 27:1037-1073.
- 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; 43:451-461.
- Cooke J.W., Sarmant 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; 12:1441-1450.
 - Cypher T.J. y Grossman J.P. "Biological principles of bone graft healing". *J. Foot Ankle Surg.* 1996; 35:413-417.
 - De la Riva B., Nowak C., Sánchez E., Hernández A., Shulz-Siegmund M., Pec M.K., Delgado A., Évora C. "VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 73(1):50-58.
 - De la Riva B., Sánchez E., Hernández A., Reyes R., Tamimi F., López-Cabarcos E., Delgado A. y Évora C. "Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration". *Journal of Controlled Release* 2010; 143:45-52.
 - Delgado J.J., 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" *Journal of Controlled Release.* 2009; 114: 223-229.
 - Devescovi V., Leonardi E., Ciapetti G. y Cenni E. "Growth factors in bone repair". *Chir. Organi.* 2008; 92:161-168.
 - Dimitriou R., Tsiridis, E. y Giannoudis P.V. "Current concepts of molecular aspects of bone healing". *Injury, Int. J. Care Injured* 2005; 36:1392-1404.
 - Edelman E.R., Nugent M.A. y Karnovsky, M.J., "Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:1513-1517.

- Ennett A.B, Kaigler D. y Mooney D.J. "Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo". *J Biomed Mater Res*. 2006; 79A:176-184.
- Eckardt H., Ding M., Lind M., Hansen E.S., Christensen K.S. y 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.
- Fiedler J., Etzel N. y Brenner R.E. "To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF". *J. Cell Biochem*. 2004; 93:990-998.
- Fiedler J., Roderer G., Gunther K.P. y Brenner R.E. "BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells". *J Cell Biochem*. 2002; 87:305-312.
- 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; 19:971-977.
- Freeman I. y Cohen S. "The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity binding alginate scaffolds on vascularization". *Biomaterials* 2009; 30:2122-2131.
- [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". *Journal of Bone & Joint Surgery, Am. Volume.*, 2001; 83:S151-158.

- Friess W., Uludag H., Foskett S., Biron R. y Sargeant C. "Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers". *Int.J.Pharm.* 1999; 187:91-99.
- Ginebra M.P., Traykova T. y Planell J.A., "Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review", *J. Control. Rel.* 2006; 113:102-110.
- Gu F., Amsden B. y Neufeld R.M., "Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads". *J. Control. Rel.* 2004; 96:463-472.
- Hao X., Silva E.A., Månsson-Broberg, Grinnemo K.H., Siddiqui A.J., Dellgren G., Wårdell E., Brodin L.Å., Mooney D.J. y Sylvén C. "Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction". *Cardiovasc. Res.* 2007; 75:178-185.
- Herron S., Thordarson D.B., Winet H., Luk A. y Bao J.Y. "Ingrowth of bone into absorbable bone cement: an in vivo microscopic evaluation". *Am. J. Orthop.* 2003; 12:581-584.
- 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; 5:43-49.
- Hosack L.W., Firpo M.A., Scott A., Prestwich G.D., Peattie R.A. "Microvascular maturity elicited in tissue treated with cytokine-loaded hyaluronan-based hydrogels". *Biomaterials*, 2008; 29:2336-2347.
- Hsieh C.Y., Hsieh H.J., Liu H.C., Wang D.M. and Hou L.T. "Fabrication and release behavior of a novel freeze-gelled chitosan/gamma-PGA scaffold as a carrier for rhBMP-2". *Dent. Mater.* 2006; 22:622–629.
- Huang Y.C., Kaigler D., Rice K.G., Krebsbach P.H. and Mooney D.J. "Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone

marrow stromal cell-driven bone regeneration". *J. Bone Miner. Res.* 2005; 20:848-857.

- Ikenaga M., Hardouin P., Lemaitre J., Andrianjatovo H., Flautre B. "Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics". *J Biomed Mater Res* 1998; 40:139-144.
- 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.
- [Jiang T.](#), [Khan Y.](#), [Nair L.S.](#), [Abdel-Fattah W.I.](#) y [Laurencin C.T.](#) "Functionalization of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds via surface heparinization for bone tissue engineering". *J Biomed Mater Res A*. 2010; 1;93(3):1193-1208.
- Jiang T., Nukavarapu S.P., Deng M., Jabbarzadeh E., Kofron M.D., Doty S.B., Abdel-Fattah W.I. y Laurencin C.T., "Chitosan–poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies". *Acta Biomaterialia* 2010 b, doi:10.1016/j.actbio.2010.03.023.
- Jiang T., Abdel-Fattah W.I. y Laurencin C.T. "In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials* 2006; 27:4894-4903.
- Kaigler D., Wang Z., Horger K., Mooney D.J. y Krebsbach P.H. "VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects". *J. Bone Miner. Res.* 2006; 21:735-744.
- Kawada A., Hiura N., Tajima S. y Takahara, H., "Alginate oligosaccharides stimulate VEGF-mediated growth and migration of human endothelial cells", *Arch. Dermatol. Res.* 1999; 291:542-547.

- Kempen D.H.R., Lu L., Heijink A., Hefferan T.E., Creemers L.B., Maran A., Yaszemski M.J. y Dhert W.J.A., “Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration”, *Biomaterials* 2009; 30:2816-2825.
- Kim H.D. y Valentini R.F., “Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro”. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59: 573–584.
- 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:245-253.
- 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)/hydroxyapatite composite scaffolds”. *Biomaterials* 2008; 29:1043-1053.
- 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; 6:189-192.
- Lazarous D.F., Shou M., Scheinowitz M., Hodge E., Thirumurti V., Kitsiou A.N., Stiber J.A., [Lobo A.D.](#), [Hunsberger S.](#), [Guetta E.](#), [Epstein S.E.](#), y [Unger E.F.](#) “Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury”. *Circulation* 1996; 94:1074-1082.
- Leach J.K., Kaigler D., Wang Z., Krebsbach P.H. y Mooney D.J. “Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for

angiogenesis and bone regeneration". *Biomaterials* 2006; 27:3249-3255.

- Lee K.W., Yoon J.J., Lee J.H., Kim S.Y., Jung H.J., Kim S.J., Joh J.W., Lee D.S. y Lee S.K. "Sustained release of vascular endothelial growth factor from calcium-induced alginate hydrogels reinforced by heparin and chitosan". *Transplant. Proc.* 2004; 36:2464-2465.
- Lemaitre J. "Injectable calcium phosphate hydraulic cements: new developments and potential applications". *Innovations in Tech. Biol. Med.* 1995; 16:109-120.
- 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 β -tricalcium phosphate in mice" *Biomaterials* 2005; 26:4265-4271.
- Lieb E., Milz S., Vogel T., Hacker M., Dauner M., y Schulz M.B. "Effects of transforming growth factor beta1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. I. Culture conditions and tissue formation". *Tissue Eng* 2004; 10:1399-1413.
- Lieb E., Vogel T., Milz S., Dauner M. y Schulz M.B. "Effects of transforming growth factor beta1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. II: Osteoblastic differentiation". *Tissue Eng.*, 2004; 10:1414-1425.
- Lieberman H., Togawa D. y Kayanja M.M. "Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials". *Spine J.* 2005; 5:305S-316S.
- Lilli C., Marinucci L., Stabellini G., Belcastro S., Becchetti E., Balducci C., Staffolani N. y Locci P. "Biomembranes enriched with TGFbeta1 favor bone matrix protein expression by human osteoblasts in vitro". *J.Biomed.Mater.Res.* 2002; 63:577-582.

- Lind M., Overgaard S., Ongpipattanakul B., Nguyen T., Bünger C. y Søballe K. "Transforming growth factor- β 1 stimulates bone ongrowth to weightloaded tricalcium phosphate coated implants. An experimental study in dogs". *J. Bone Joint Surg. [Br]* 1996; 78-B:377-382.
- Lind M., "Growth factors, possible new clinical tools. A review". *Acta Orthop. Scand.* 1996; 67(4):407-417.
- Lind M., Schumacker B., Soballe K., Keller J., Melsen F. y Bunger C. "Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae". *Acta Orthop Scand* 1993; 64:553-556.
- 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):675-682.
- Martino A., Michael S. y Risbud M. V. "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering" *Biomaterials* 2005; 26:5983-5990.
- 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; 29:3253-3259.
- 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; 61:600-607.
- [Niu X.](#), [Feng Q.](#), [Wang M.](#), [Guo X.](#) y [Zheng Q.](#) "Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2". *J Control Release.* 2009 4; 134(2):111-117.
- Norton L.W., Tegnell E. y Toporek W.M. "In vitro characterization of vascular endothelial growth factor and dexamethasone releasing

hydrogels for implantable probe coatings”, *Biomaterials* 2005; 26:3285-3297.

- 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(7):941-950.
- Patel Z.S., Ueda H., Yamamoto M., Tabata Y. y Mikos A.G., “In vitro and in vivo release of vascular endothelial growth factor from gelatin microparticles and biodegradable composite scaffolds”, *Pharm. Res.* 2008; 25(10): 2370-2378.
- 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.
- Peniche C. , Fernández M., Rodríguez G., Parra J., Jimenez J., López Bravo A., Gómez D. y San Román J. “Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. Morphology and biological behaviour”. *J. Mater. Sci.Mater. Med.* 2007; 18:1719-1726.
- Peters M.C., Isenberg B.C., Rowley J.A. y Mooney D.J., “Release from alginate enhances the biological activity of vascular endothelial growth factor”. *J. Biomater Sci. Polym.* 1998; 9:1267-1278
- Pufe T. Wildemann, Petersen W., Mentlein R., Raschke M. y Schmidmaier G. “Quantitative measurement of 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.

- Richardson T.P., Peters M.C., Ennett A.B. y Mooney D.J. "Polymeric system for dual growth factor delivery". *Nat Biotechnol* 2001; 19:1029-1034.
- Rose F.R. y Oreffo R.O. "Bone tissue engineering: hope vs hype". *Biochem.Biophys.Res.Commun* 2002; 292:1-7.
- 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; 25:3963-3972.
- Schmidmaier G., Wildemann B., Heeger J., Gäbelein T., Flyvbjerg A., Bail H. J. y Raschke M. "Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of Insulin-like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor- β_1 ". *Bone*, 2002; 31(1):165-172.
- Sheridan M.H., Shea L.D., Peters M.C. y Mooney D.J. "Bioadsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery". *J. Control. Rel.* 2000; 64:91-102.
- Siddhesh P., Fotios Papadimitrakopoulos B.C. y Burgess D.J. "Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis". *Journal of Controlled Release* 2007; 117:68–79.
- 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; 31:30-39.
- Street J., Bao M., deGuzman L., Bunting S., Franklin V. Peale, Jr., Ferrara N., Steinmetz H., Hoeffel J., Cleland J.L., Daugherty A, van Bruggen N., Redmond H.P., Carano R.A.D. y Filvaroff E.H. "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting

angiogenesis and bone turnover". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 23; 99(15):9656-9661.

- [Sumner D.R.](#), [Turner T.M.](#), [Urban R.M.](#), [Leven R.M.](#), [Hawkins M.](#), [Nichols E.H.](#), [McPherson J.M.](#) y [Galante J.O.](#) "Locally delivered rhTGF-beta2 enhances bone ingrowth and bone regeneration at local and remote sites of skeletal injury". *J. Orthop. Res.* 2001; 19(1):85-94.
- Sun Q., Silva E., Wang A., Fritton J.C., Mooney D.J., Schaffler M.B., Grossman P.M. y Rajagopalan S., "Sustained release of multiple growth factors from injectable polymeric system as a novel therapeutic approach towards angiogenesis". *Pharm. Res.* 2010; 27, 2: 264-271.
- 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):1315-1321.
- 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 F., Torres J., Tresguerres I., Clemente C., López-Cabarcos E. y Blanco L.J. "Bone augmentation in rabbit calvarie: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulated". *J. Clin. Periodontol.* 2006; 34:922-928.
- Tamimi F., Torres J., Tresguerres I., Blanco Jerez L. y López Cabarcos E. "Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid". *J. Biomed. Mater. Res.* 2007; 81:93-102.
- Tamimi F., Torres J., Bettini R., Ruggera F., Rueda C., López Ponce M. y López-Cabarcos E., "Doxycycline sustained released from brushite cements for the treatment of periodontal diseases". *J. Biomed. Mater. Res.* 2008; 85A:707-714.

- [Terrell T.G.](#), [Working P.K.](#), [Chow C.P.](#) y [Green J.D.](#) "Pathology of recombinant human transforming growth factor-beta 1 in rats and rabbits". *Int Rev Exp Pathol.* 1993; 34PtB:43-67.
- 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; 26:4383-4394.
- 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.
- Uludag H., Gao T., Porter T. J., Friess W., y Wozney J. M. "Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site". *J.Bone Joint Surg.Am.* 2001:83-A Suppl 1,S128-S135.
- Wells L.A. y Sheardown H., "Extended release of high pl proteins from alginate microspheres via a novel encapsulation technique". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 65:329-335.
- Yamamoto M., Takahashi Y. y Tabata Y. "Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein". *Biomaterials* 2003; 24:4375-4383.

- 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; 407:242-248.
- [Yilgor P.](#), [Tuzlakoglu K.](#), [Reis R.L.](#), [Hasirci N.](#) y [Hasirci V.](#), "Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*. 2009 30(21):3551-3559.
- Yu X., Hsieh S.C., Bao W. y Graves D. T. "Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures". *Am.J.Physiol.* 1997;272: C1709-C1716.
- Zioncheck T.F., Chen S.A., Richardson L., Mora-Worms M., Lucas C., Lewis D., Green J.D. y Mordenti J. "Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human transforming growth factor beta 1 after tropical and intravenous administration in male rats". *Pharm. Res.* 1994; 11(2):213-220.

ANEXO 1



Research paper

VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds

Beatriz De la Riva^a, Christian Nowak^b, Esther Sánchez^a, Antonio Hernández^c, Michaela Schulz-Siegmund^b, Martina K. Pec^a, Araceli Delgado^{a,*}, Carmen Évora^{a,*}

^a Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, University of La Laguna, La Laguna, Spain

^b University of Leipzig, Pharmaceutical Technology, Leipzig, Germany

^c Traumatology Service, Hospitén Rambla, Santa Cruz de Tenerife, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2008

Accepted in revised form 28 April 2009

Available online 12 May 2009

Keywords:

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Alginate

Chitosan

Poly(lactide)

Bone regeneration

ABSTRACT

VEGF and its receptors constitute the key signaling system for angiogenic activity in tissue formation, but a direct implication of the growth factor in the recruitment, survival and activity of bone forming cells has also emerged. For this reason, we developed a composite (alginate/chitosan/PLA-H) system that controls the release kinetics of incorporated VEGF to enhance neovascularization in bone healing. VEGF release kinetics and tissue distribution were determined using iodinated (¹²⁵I) growth factor. VEGF was firstly encapsulated in alginate microspheres. To reduce the high *in vitro* burst release, the microspheres were included in scaffolds. Matrices were prepared with alginate (A-1, A-2), chitosan (CH-1, CH-2) or by coating the CH-1 matrix with a PLA-H (30 kDa) film (CH-1-PLA), the latter one optimally reducing the *in vitro* and *in vivo* burst effect. The VEGF *in vitro* release profile from CH-1-PLA was characterized by a 13% release within the first 24 h followed by a constant release rate throughout 5 weeks. For VEGF released from composite scaffolds *in vitro*, bioactivity was maintained above 90% of the expected value. Despite the fact that the *in vivo* release rate was slightly faster, a good *in vitro*–*in vivo* correlation was found. The VEGF released from CH-1 and CH-1-PLA matrices implanted into the femurs of rats remained located around the implantation site with a negligible systemic exposure. These scaffolds provided a bone local GF concentration above 10 ng/g during 2 and 5 weeks, respectively, in accordance to the *in vivo* release kinetics. Our data show that the incorporation of VEGF into the present scaffolds allows for a controlled release rate and localization of the GF within the bone defect.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neovascularization is an essential factor for the successful integration of bioengineered tissues. In this context, several approaches have been used to improve or induce the formation of vasculature at the target site. Angiogenesis, the growth of new capillary blood vessels from pre-existing host vasculature, is also involved in the initiation of fracture healing [1]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates proliferation and migration of endothelial cells that mediate vessel sprouting and, together with their endothelial progenitors, neovascularization, essentially necessary for the transport of metabolic products, oxygen and nutrients. Preclinical and clinical investigations have shown that therapeutic administration of angiogenic factors to the sites of ischemia can improve regional blood flow [9]. Thus, an appropriate transient delivery of VEGF *in situ* is indicated to activate a cellular response leading to successful vascularization [10,11]. Although

VEGF is predominantly known for its role in vessel formation, it is also implicated in the promotion of endochondral and intramembranous ossification in bone growth [2,3], playing an important role in the recruitment, survival and activity of bone forming cells [4–6]. Evidences that VEGF directly stimulates migration and differentiation of primary human osteoblasts have been recently reported [7,8].

However, when angiogenic factors are released too rapidly or in an uncontrolled manner, an increase of adverse effects can be expected, such as severe vasculature leakage leading to edema and hypotension [12,13]. In addition, owing to the potent mitogenic nature of VEGF, systemic exposure may promote undesired vascularization in non-target sites as well as enhance pathological conditions like tumor growth and retinopathies in distant areas.

These potential risks could be avoided by using controlled release formulations of recombinant growth factors (GFs), which would not only deliver precisely restricted quantities but also localize the GF in the ischemic tissue region. Delivery systems of different materials as carriers for VEGF have been investigated. VEGF alone has been incorporated into poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) systems that allow for sustained delivery of biologically active VEGF *in vitro* and enhanced neovascularization *in vivo* [14–17].

* Corresponding authors. Av. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, Facultad de Farmacia, 38200 La Laguna, Tenerife, Spain. Tel.: +34 922 318507; fax: +34 922 318506.

E-mail addresses: adelgado@ull.es (A. Delgado), cevora@ull.es (C. Évora).

Combined angiogenic (VEGF) and osteogenic factors (BMP-4) with human bone marrow stromal cells in a scaffold system were shown to promote bone formation at an ectopic site [18]. VEGF and platelet-derived growth factor (PDGF) in a PLGA scaffold [19] or in alginate hydrogels [20] stimulated vessel formation.

Many of these approaches are based on incorporating GFs in appropriate biomaterials. Such combinations can provide controlled release into the local microenvironment and yield desirable concentrations over periods ranging from days to months.

The delivery of multiple factors involved in tissue formation could mimic the conditions of the tissue regeneration. However, it may be necessary to develop systems capable of controlling the kinetics of every single GF, taking into account that GF activities take place in an orchestrated, time-controlled manner.

In this regard, we developed a composite (alginate/chitosan/PLA-H) system capable of controlling VEGF release kinetics within the bone to enhance neovascularization in bone healing. Our combination of polymers and VEGF provides controlled release into the local microenvironment of the implantation site, avoiding the systemic exposure to the growth factor.

2. Materials and methods

VEGF and ^{125}I -VEGF were purchased from Chemicon and PerkinElmer, respectively. Chitosan (Protasan[®] UP CL 213) and alginate (Pronova[®] UP MVG) were purchased from Novamatrix Biopolymer (Norway), end-group uncapped poly(lactide) (Resomer[®] R203 H; PLA-H 30 kDa) was from Boehringer Ingelheim KG (Germany).

2.1. Formulation of VEGF-alginate microspheres

Alginate microspheres were prepared by an emulsification/internal gelation method. Briefly, microspheres were prepared by adding heat sterilized CaCO_3 (0.375%, w/w) to 5 ml of an aqueous alginate solution (3%, w/v) and stirring the mixture at 60 rpm for 30 min (AGV-8 Brunson with R1002 screw-type paddle, IKA). Then, 300 μl of a solution of 1% BSA in PBS containing 7.5 μg VEGF/ ^{125}I -VEGF (0.5–2 μCi) was added, and the mixture was stirred at 60 rpm for another 30 min. Each fraction of 1 ml of the resulting alginate dispersion was injected via syringe into 5 ml of heat sterilized medium-chain triglycerides (Miglyol-812[®]), the latter being stirred at 1150 rpm. After 5 min of emulsification, 0.5 ml of glacial acetic acid in Miglyol-812[®] (1:100) was added, followed by stirring for another 5 min to permit CaCO_3 dissolution. Oil-dispersed microspheres were recovered by washing with 2.5 ml of sterile CaCl_2 solution (50 mM). The oil phase was removed and the micro-particles were washed again two times with CaCl_2 solution and then with water and *n*-hexan. Finally, the particles were freeze-dried and kept at 4 °C until use.

2.2. Scaffold fabrication

Alginate or chitosan scaffolds were fabricated by freeze-drying a dispersion of VEGF/ ^{125}I -VEGF-loaded alginate microspheres (7 mg) in 150 μl of 1% alginate or 1.5% chitosan aqueous solution. For cross-linking, the obtained alginate or chitosan cylindrical shaped matrices were incubated for 30 s in 50 mM CaCl_2 and 1 M NaOH, respectively. After two wash steps with deionized water, the scaffolds were frozen in liquid nitrogen and again lyophilized. These scaffolds were named A-1 for alginate and CH-1 for chitosan preparations.

A modification of these two groups of scaffolds was elaborated by immersion of the previously obtained alginate or chitosan matrices in another 150 μl of 1% alginate or 1.5% chitosan aqueous solution. Subsequently, these matrices were freeze-dried, cross-

linked, washed and again freeze-dried, as mentioned earlier. These scaffolds were named A-2 and CH-2, respectively.

A third type of scaffolds was prepared by immersion of the CH-1 scaffolds in a 50% PLA-H 30 kDa methylene chloride solution (CH-1-PLA) for 1 min and by subsequent overnight desiccation at room temperature.

All the scaffolds were stored at 4 °C until use.

2.3. Physical and morphological characterization

Non-radioactive particles or scaffolds were used for physical and morphological characterization.

2.3.1. Particle size and size distribution

Particle size of freshly produced, freeze-dried and swollen alginate microspheres were determined using a zoom stereo microscope (Hund Wetzlar SM33) combined with a CD camera (Nikon DS-2 M) and an imaging software (Nikon NIS-Element AR 2.30). The freshly produced and swollen alginate microspheres were treated with 100 μl of a methylene blue solution for 2 min. The methylene blue solution was removed, and 2 ml of sterile water was added to the microspheres. The size distribution of each batch was calculated from a sample of 300 microspheres.

2.3.2. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM images of scaffolds and their cross-sections were analyzed by scanning electron microscopy (Jeol JSM-6300). SEM photomicrographs were used for morphology, microstructure and porosity evaluation of the constructs before and during the *in vitro* release assays.

2.3.3. Mercury porosimetry

Pore diameter distribution, total pore volume and the porosity of the freeze-dried scaffolds, were measured at the beginning and during the *in vitro* assays, using a mercury intrusion porosimeter (Autopore IV 9500, Micromeritics Instrument Co.). Determination of the porosity was based on the relationship between the applied pressure and the diameter of the pores into which mercury intrudes. According to the Washburn equation:

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

where P is the applied pressure (runner from 0.5 to 58000 psia), D is the pore diameter, γ is the surface tension of the mercury (484 dynes/cm), and θ is the contact angle between mercury and the pore wall (taken as 141°).

2.3.4. Gel permeation chromatography (GPC)

GPC (Waters[®] chromatograph) relative to polystyrene standards (Tokyo Soda Ltd.) was used to determine the average molecular weights of the PLA-H before and during the *in vitro* release experiments. Four columns in a series with different pore sizes (Ultrastrygel) were used. Tetrahydrofuran was used as solvent (1 ml/min).

2.4. Encapsulation efficiency and ^{125}I -VEGF distribution

VEGF encapsulation efficiency was determined by the measurement of radioactivity levels in three aliquots of microspheres using a gamma counter (Cobra[®] II, Packard). The obtained radioactivity levels per weight of microspheres were related with the initial amount of ^{125}I -VEGF. The total radioactivity of each scaffold was counted to determine VEGF loading. The spatial distribution of ^{125}I -VEGF in the systems was assessed by cutting the scaffolds into three sections (upper, medium and low) and measuring the radioactivity of each section in the gamma counter.

2.5. ^{125}I -VEGF *In vitro* release experiments

^{125}I -VEGF *in vitro* release assays were carried out in polypropylene tubes (Sarstedt) containing α -MEM medium, supplemented with 2% FBS (Gibco) and 0.02% sodium azide at 37 °C, in a 5% CO_2 atmosphere and relative humidity of 95%, under slow orbital shaking at 75 rpm (Orbital shaking platform POS-300, Grant-bio). Briefly, 7 mg of VEGF/ ^{125}I -VEGF alginate microspheres or each of the fabricated scaffolds was incubated in 2 ml of release medium. At specific time intervals, 0.25 ml of medium were withdrawn and replaced by fresh solution. The radioactivity of the samples was measured using a gamma counter (Cobra® II, Packard). The cumulative ^{125}I -VEGF released from the formulations (microspheres and scaffolds) was calculated as percentage of the total encapsulated ^{125}I -VEGF.

In parallel, the radiolabeling stability of ^{125}I -VEGF in the release medium was checked by thin-layer chromatography (TLC). A solution of ^{125}I -VEGF (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) in release medium was incubated in the above-mentioned conditions. At specific time intervals, an aliquot (7 μl) was spotted on a plastic silica gel (60 F₂₅₄, Merck) (0.9 \times 8 cm) stripe, and the chromatography was carried out with 85% methanol in water along 5 cm. Once finished, the band was cut into three parts (starting point, medium and front) that were measured for radioactivity in a gamma counter (Cobra® II, Packard). With this chromatographic system, the free ^{125}I -reaches the front ($R_f = 1$), and the ^{125}I -VEGF is retained at the starting point ($R_f = 0$).

2.6. VEGF bioactivity

To determine the biological activity of the VEGF released from the composite scaffolds, a cell-based *in vitro* activity assay was carried out.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), kindly donated by Dr. Federico Díaz-González, were expanded on gelatine-coated cell culture plastic in complete culture medium containing Medium 199 with Hanks' BSS, 100 mg/l L-glutamine, 25 mM HEPES and 1.4 g/l NaHCO_3 (BioWhittaker), supplemented with 20% of the defined fetal bovine serum Gold (PAA), 50 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS from Becton Dickinson), 3,33 UI/ml porcine heparin (Sigma), 50 UI/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin.

During the activity assay, HUVECs were cultured in basal culture medium that is culture medium as described above except for omitting ECGS and heparin supplementation. 5×10^3 cells per well were seeded in 150 μl of basal medium in gelatine-coated 96-well plates. Then, 150 μl of adequately diluted media directly obtained from alginate microspheres or CH-1-PLA matrices after a release period of 1 and 7 days or of defined VEGF standard solutions, prepared in basal medium at 0–4 ng/ml, were added. The VEGF concentrations in the collected media were calculated using the release kinetics obtained from the *in vitro* release study described above. Additional amounts of these media were stored at 4 °C and used to change the assay medium on day 3 after seeding.

On day 5, cells were quantified using the colorimetric XTT tetrazolium assay (Roche Molecular Biochemicals) following the manufacturer's instructions. Briefly, the tetrazolium salt XTT is metabolized by mitochondrial dehydrogenases of viable cells to formazan dye. Numerical values of color densities are obtained in an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (BioRad) at a wavelength of 490 nm/reference 690 nm.

Bioactivity of the released VEGF from the scaffolds was determined by comparing the induced cell duplication with standard VEGF (cell proliferation due to equivalent amounts of VEGF added directly to the culture medium). Untreated control cells served to verify the growth stimulatory effect of VEGF on HUVECs.

2.7. *In vitro* behavior

2.7.1. Microsphere swelling behavior

Swelling behavior of the freeze-dried microspheres over periods of up to 9 days was assessed after incubation in the release medium. Swelling capacity was determined by sizing freeze-dried and swollen particles as described earlier (Section 2.3.1).

2.7.2. Scaffold water uptake and mass loss

Scaffolds were incubated in 2 ml of release medium under the same conditions as in the release assays. Water uptake and weight loss were determined gravimetrically. At specific time points, three samples of each formulation were withdrawn, blotting away excess water and weighted. The scaffolds were freeze-dried and the final weight recorded. The percentages of water uptake and mass loss were calculated from 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.

2.8. Animal experiments

All the experiments were carried out in conformity with the EC Guideline (86/609/CEE) on care and use of animals in experimental procedures. Furthermore, the animal experiments were previously approved by the local committee for animal studies of the University of La Laguna.

2.8.1. Surgical procedure: bone defect

The surgery to produce the bone defect was performed as previously described [21]. Briefly, male Wistar rats (250–280 g) were anaesthetized intramuscularly with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and their right hind legs were shaved and disinfected. 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 in the intercondylar space was made with a 1.8 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, and an IM injection of magnesium metamizol was administered to reduce post-surgical pain. After recovery from the operation, the animals were allowed for free movement, food and water uptake.

2.8.2. *In vivo* release assays

The VEGF release kinetics from the scaffolds inserted in the femur of the rats was followed up by two measurement methods:

- a) Non-invasive method: The ^{125}I -VEGF remaining at the defect site was monitored periodically by measuring the radioactivity at the femur defect using an external probe-type gamma counter (Captus®, Nuclear Iberica), as previously described and validated [22]. Briefly, a collimator of 2 cm in diameter was positioned at the end of the detector to focus on the femur area of the anaesthetized rat, where the scaffold was implanted. At each sampling time point, five readings were taken, and the ^{125}I emission peak (maximum 27 keV) was integrated for the cumulative events registered over 1 min. The highest and the lowest values were excluded, and the mean of the others were taken as the remaining radioactivity at each specific time point. After recovering from anaesthesia, the animal was allowed for free movement in its cage. These experiments were carried out

on five rats. Measurement of the total administered dose was considered at time point 0 (100%).

- b) Invasive method: radioactivity measurements were carried out using a well-type gamma counter (Cobra® II, Packard). For each sampling time point, three rats were sacrificed, the femur extracted and the implants removed. The femurs freed of soft tissues were divided into three pieces: distal metaphysis (DM), proximal metaphysis (PM) and diaphysis (D). In order to determine VEGF bio-distribution, muscles around the femur, thyroid and blood samples were also collected. The radioactivities of all samples were measured in the ^{125}I energy range (15–75 KeV) for 30 s.

3. Results

3.1. Scaffold characteristics

VEGF-alginate microspheres were prepared with a fixed VEGF/alginate loading of 50 ng/mg. VEGF encapsulation efficiency of alginate microspheres was $50.7 \pm 9.5\%$.

The prepared scaffolds were cylindrical in shape, the weight range 8.3 ± 0.55 mg for A-1 to 13.7 ± 1.21 mg for CH-1-PLA, and the resulting size was between 2.5×4 mm for A-1 and 3.8×5.2 mm for CH-1-PLA.

The radioactivity measured in the three sections (upper, medium and low) of the different scaffolds was around 30–35% each, indicating a homogeneous distribution of the ^{125}I -VEGF-loaded microspheres throughout the scaffolds.

3.2. Particle size and swelling behavior

Particle size is an important parameter as it can directly affect drug release. The volume diameters corresponding to cumulative 50% and 90% of particles for freshly produced, freeze-dried and swollen alginate microspheres are reflected in Fig. 1. During the freeze drying process, the microspheres lost almost 50% of their size. After 1 day of incubation in release medium, the diameter of the freeze-dried microspheres regained the size of their original, freshly produced status. Until day 9, no further significant changes in size were observed.

3.3. In vitro release

The release kinetics of the growth factor encapsulated within the microspheres and incorporated in the differently prepared

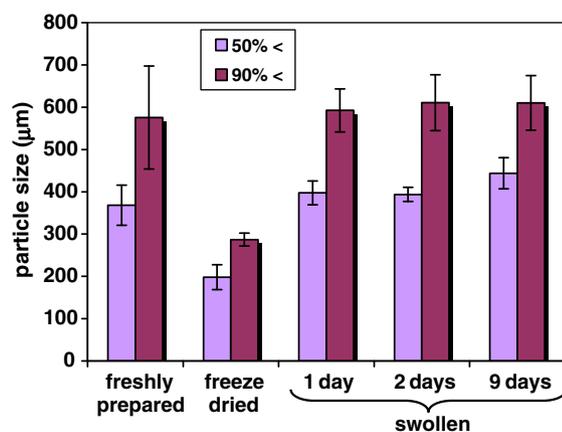


Fig. 1. Diameters corresponding to the cumulative 50% and 90% of alginate microsphere size distribution. Determinations were done with freshly prepared and freeze-dried microspheres and after incubation of the latter ones for 1, 2 or 9 days in aqueous medium ($n = 3$).

scaffolds was subsequently analyzed using ^{125}I -VEGF. The resulting data of radiolabeling stability exhibited an increase of free ^{125}I -VEGF of around 15% in the 5 weeks that the assay lasted.

The release kinetics of VEGF pre-encapsulated in alginate microspheres before scaffold preparation was studied. The VEGF was released with an initial rapid rate of approximately 75% during the first 3 days, followed by a slower release rate for the remaining duration of the experiment until more than 90% was released (after 2 weeks) (Fig. 2).

The growth factor release kinetics from alginate microspheres incorporated into alginate or chitosan matrices was assessed to determine whether this approach would allow for a delayed release. The alginate scaffold (A-1) VEGF release profile was similar to that obtained from alginate microspheres (Fig. 2), the percent released during the first three days was reduced to around 65%, and approximately 90% was released within the first two weeks. The analysis of the VEGF delivered from chitosan sponges, CH-1 and CH-2 as well as from the alginate scaffolds A-2 showed that the burst portion of the release profile was similar to all three formulations. The initial release rate was notably reduced to around 25% in the first 24 h, and only a slight difference was noted in the sustained portion of CH-1 and A-2. Around 70% of the GF was released within 2 weeks. On the contrary, during the sustained phase, VEGF release from CH-2 was slower compared to the other two scaffolds, A-2 and CH-1 (Fig. 2), due to the higher amount of chitosan in the CH-2 composition.

The VEGF release rate from alginate microspheres included into PLA-H 30 kDa-coated CH-1 scaffolds (CH-1-PLA) was lower compared to the other preparations (Fig. 2). The burst release was reduced to approximately 13% in the first 24 h, and around 65% was delivered in the following 5 weeks of the experiment. The cumulative drug release was fitted to a zero-order model (Eq. (3)), maintaining a release rate of 1.58%/day.

$$\% \text{ released} = 14.78 + 1.58 \text{ days}, R^2 = 0.9788 \quad (3)$$

3.4. VEGF bioactivity

A cell-based assay was used to evaluate the biological activity of VEGF released from the scaffolds. Controls included untreated cells and HUVECs treated with media containing known amounts of VEGF (standards). Experimental wells were exposed to the media collected after incubation with VEGF-loaded alginate micro-

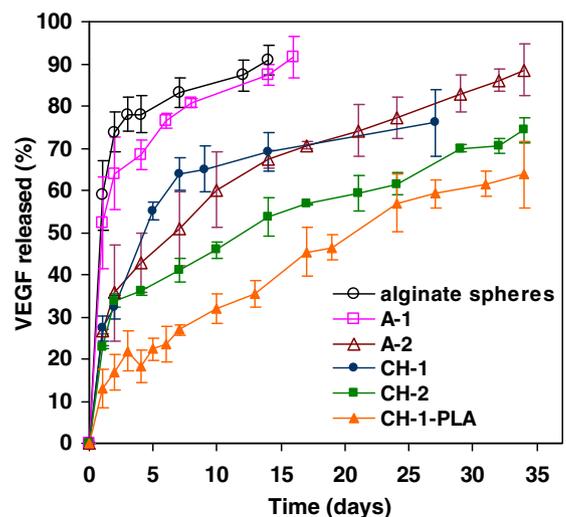


Fig. 2. In vitro release profiles of ^{125}I -VEGF-loaded alginate microspheres alone or incorporated in different scaffold preparations.

spheres, which constitute the first step in manufacturing any of the formulations, or to release media from CH-1-PLA scaffolds, as an example for the most complex elaboration process. A linear, dose-dependent response of endothelial cell proliferation was obtained from the VEGF standards (Fig. 3a). As in the study by Patel et al. [23], growth factor bioactivity was expressed as the percentage of the observed cell growth upon exposure to the release media with respect to the expected cell proliferation (calculated from the dose-dependent response to the standard VEGF dilutions). The biological activity of VEGF was maintained above 90% of the expected bioactivity at all times (Fig. 3b). Hence, no significant loss of VEGF bioactivity through the preparation processes of the scaffolds could be observed.

3.5. Scaffold water uptake, mass loss and porosity

The high water adsorption capacity of chitosan was very evident in the formulations of CH-1 and CH-1-PLA (Fig. 4). The PLA-H coating modulated both water uptake and mass loss throughout the release assays. The results demonstrate the influence of these parameters on the release profile of VEGF from chitosan formulations.

Despite the higher mass loss of CH-1 matrix during the release experiment, the homogenous VEGF distribution remained unchanged. The radioactivity measured in the three sections (upper,

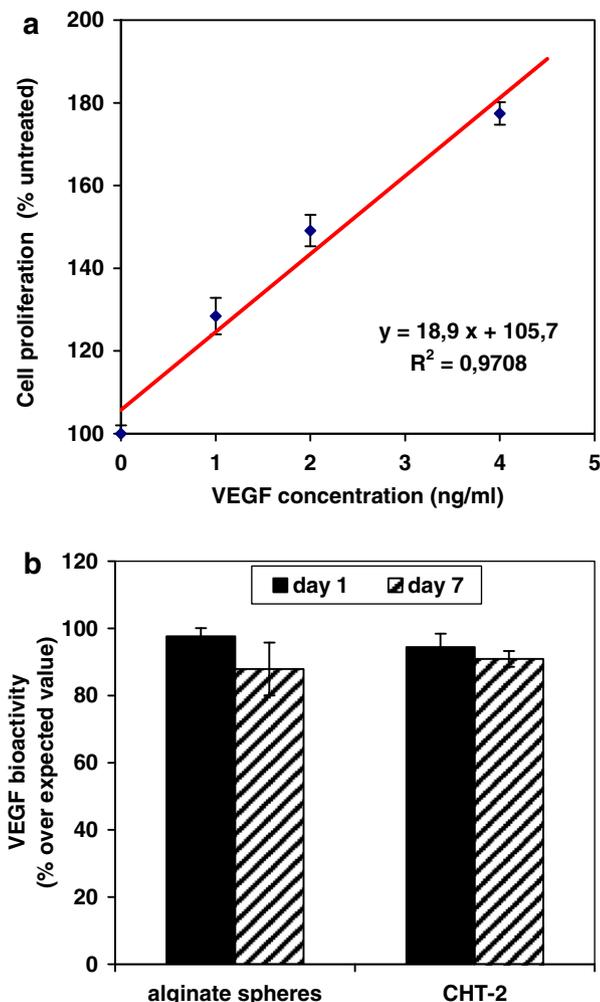


Fig. 3. VEGF bioactivity after release from composite scaffolds. (a) Dose-dependent response on cell growth for samples receiving standard VEGF concentrations. (b) VEGF bioactivity from release media expressed as percentage of the observed cell growth with respect to the expected standard activities ($n = 3$).

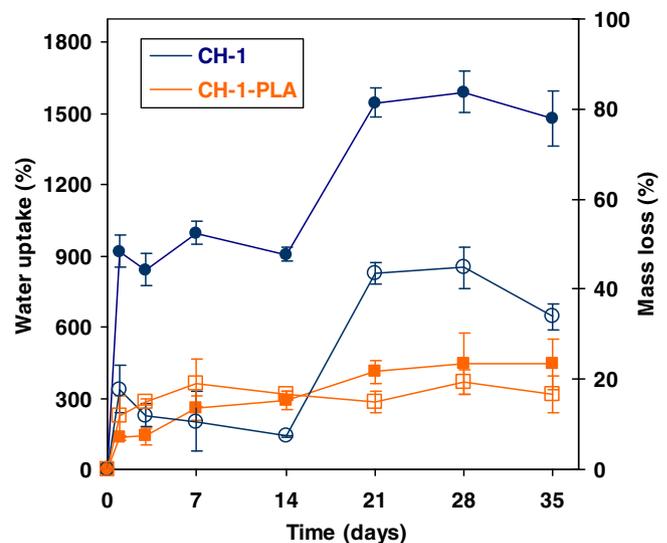


Fig. 4. Water uptake (solid symbol) and mass loss (open symbol) profiles from CH-1 (circles) and CH-1-PLA (squares) scaffolds.

medium and low) after incubation in release medium during 3 and 5 weeks was in the range of 30–35% of the ^{125}I -VEGF remaining in the scaffolds.

SEM pictures show the increase of porosity of CH-1 and CH-1-PLA during the release experiment (Fig. 5). The porosity of the PLA-H coating increased slowly and constantly during the release experiment, whereas the inner structure remained practically unchanged. These results fit well with the decrease in the average molecular weight (Mw) detected by GPC. The Mw of PLA-H was reduced from 25 kDa to 20 kDa within 3 weeks, and to 17 kDa at the end of the release assay. By contrast, CH-1 exhibited a fast and profound increase in porosity as shown in Fig. 5.

The above mass loss, SEM pictures and PLA-H degradation results correspond with the initial and subsequent evolution in porosity and pore size distribution in both CH-1 and CH-1-PLA matrices, as determined by mercury porosimetry (Fig. 6). The originally high porosity of the CH-1 matrix (85.9%) was reduced to 53.1% by the PLA-H film. Additionally, a smaller pore size and narrower pore size distribution were determined in the CH-1-PLA scaffolds. In the release medium, porosity and pore size distribution increased for both CH-1 and CH-1-PLA but in different modes. The total porosity of the CH-1 matrix increased to 93.3% within 3 weeks and then stayed stable until week five. However, a slight shift of pore size distribution to bigger sizes was detected. Similarly, the porosity of CH-1-PLA matrix increased to 81.5% during the first 3 weeks, and pore distribution also shifted towards a bigger size. After 5 weeks, a dramatic increase of small pores in the PLA-H coating was found, which was reflected in the increase in porosity which reached 86.6% (Fig. 6). This can also be observed in the SEM pictures (Fig. 5).

3.6. In vivo release

VEGF release kinetics from three formulations was monitored by the non-invasive method after scaffold implantations in femurs of rats. Three formulations CH-1, CH-2 and CH-1-PLA were selected; the criteria used to select a formulation for *in vivo* assessment were based on the *in vitro* release profile, mainly the small burst release.

The ^{125}I -VEGF remaining in the matrix was measured externally during 2–5 weeks, depending on the release rate. VEGF pre-encapsulated in alginate microspheres and incorporated in the chitosan

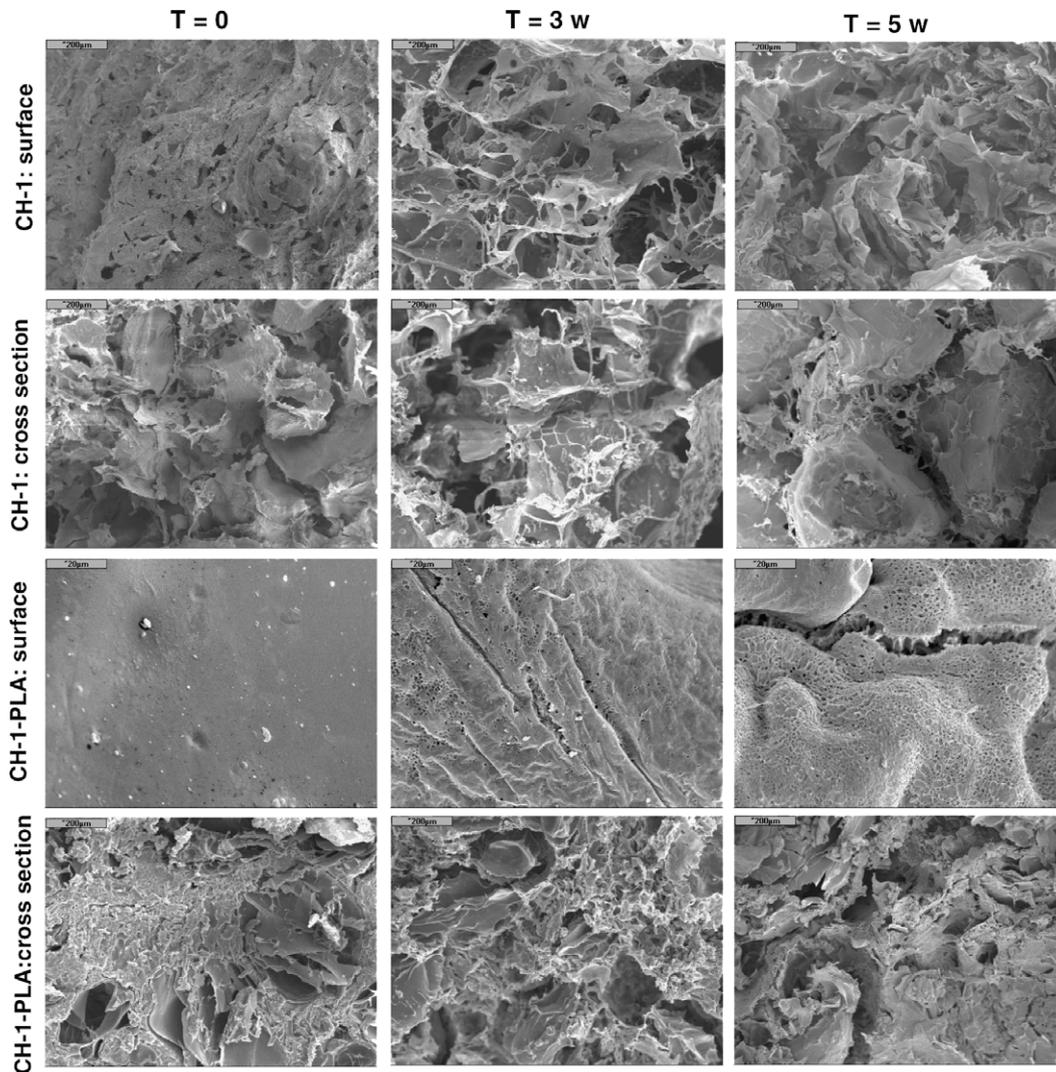


Fig. 5. Scanning electron micrographs of surfaces and cross-sections of CH-1 and CH-1-PLA implants before ($T = 0$) and after 3 ($T = 3w$) and 5 ($T = 5w$) weeks of *in vitro* release. All magnifications are 100 \times , except for CH-1-PLA surface pictures which are 1000 \times .

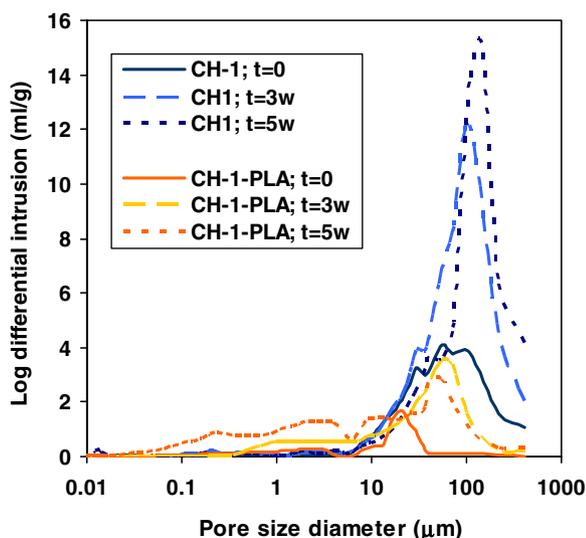


Fig. 6. Evolution of the porosity and pore size distribution in CH-1 and CH-1-PLA scaffolds during *in vitro* release. Data were obtained before ($t = 0$), after 3 ($t = 3w$) and 5 weeks ($t = 5w$) of the assay.

matrices, CH-1 and CH-2, but not coated with PLA-H coating led to a rapid burst release of approximately 50% of the GF within the first 24 h (Fig. 7), which was notably greater than that measured *in vitro* (Fig. 2). After the first day, CH-1 and CH-2 revealed different *in vivo* release profiles (Fig. 7). The VEGF in the CH-1 scaffolds was rapidly delivered; around 80% was released in less than 1 week. Afterwards, no more GF loss from the implantation site was detected. After the burst release, VEGF in CH-2 showed a very slow release phase during the first week, followed by a faster release of 1.7% per day during the last two weeks. A release of approximately 80% of the matrix-encapsulated VEGF was achieved.

With respect to the CH-1-PLA formulations, the PLA-H coating reduced the release rate similarly as *in vitro*. The burst release declined; around 20% was delivered within the first 24 h, with a subsequent sustained release rate of 15% per week during the first 3 weeks. VEGF was released slowly during the last 2 weeks; approximately 7% per week was released to give rise to almost 80% of total release by the end of the experiment at week 5 (Fig. 7).

The invasive method was used to analyze the distribution of the VEGF released from CH-1 and CH-1-PLA in femur, surrounding muscle, thyroid glands and blood (Fig. 8). VEGF concentration was higher at the site of the implant and then declined with distance from the implantation site.

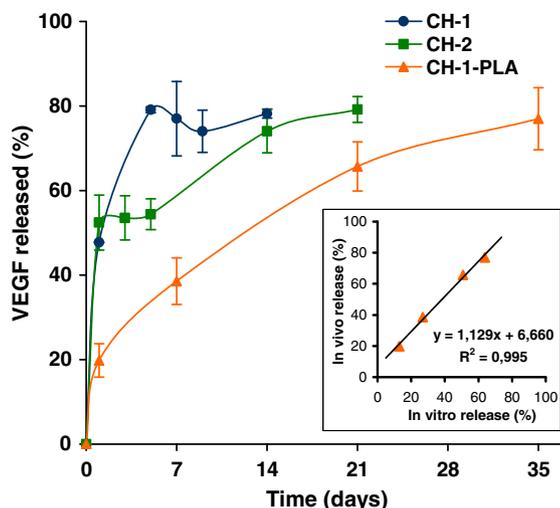


Fig. 7. ^{125}I -VEGF release profiles from femur-implanted CH-1, CH-2 and CH-1-PLA scaffolds. Inset: *in vitro*–*in vivo* VEGF correlation obtained from CH-1-PLA implants.

With CH-1 sponges maximum VEGF concentrations were achieved at day 5 in the distal metaphysis, the area next to implantation site. From there on, the levels decreased. The concentrations found in diaphysis and proximal metaphysis were lower. Twenty-four hours following implantation, VEGF levels in diaphyses were around 20 ng/g and then declined with time. VEGF concentrations in proximal metaphyses stayed around 3 ng/g during the two weeks of assay duration (Fig. 8). On the contrary, the results obtained with CH-1-PLA implantations revealed that the maximum VEGF concentrations in distal metaphysis and diaphysis (the zones closest to the scaffold) were achieved 3 weeks after implantation. The VEGF levels were higher than 7–10 ng/g of bone tissue throughout the 5 weeks of the experiment. On the other hand, VEGF concentrations in muscle, blood and thyroids obtained with both scaffolds were very low and did not differ significantly from the background of the gamma counter.

4. Discussion

Therapeutic approaches to replace diseased or damaged bone tissue depend on complex tissue regeneration processes directed

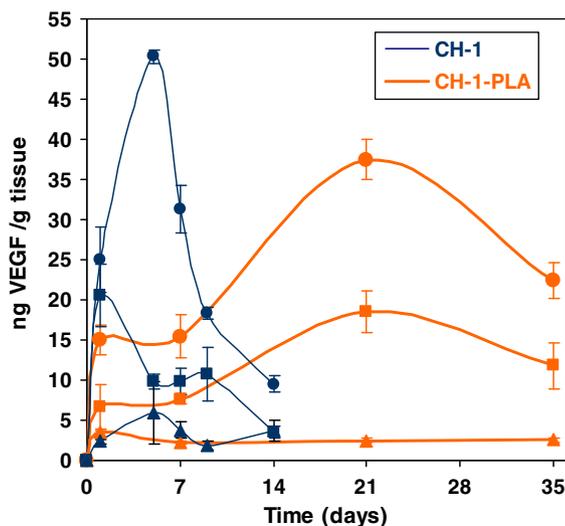


Fig. 8. ^{125}I -VEGF concentrations achieved in the different areas of rat femurs after CH-1 and CH-1-PLA implantation. Distal metaphysis (●), diaphysis (■) and proximal metaphysis (▲) zones were analyzed.

by the spatially and temporally synchronized presentation of growth factors. To date, it is known that bone regeneration is a highly coordinated process. The development of new bone tissue significantly benefits from the strategies that mimic concomitant interactions among various factors involved in this process. The efficacy of these approaches will highly depend on the delivery of defined quantities of growth factor to the target tissue and on the duration of a sustained release of the GFs. However, the specific, exogenous GF presentation kinetics to the remaining cells to stimulate a bone regeneration process is not well fixed yet. The results presented in this study demonstrate that different VEGF release kinetics can be achieved by scaffold material manipulations.

It has been reported that alginates as well as BSA and salts have a stabilizing effect on VEGF [24–28]. Our results are in accordance with the results of these authors. More than 90% of the VEGF released from calcium alginate microspheres proved to be bioactive. The encapsulation yield of VEGF within the microspheres was around 50%. An electrostatic attraction is expected between VEGF and alginate carboxylate groups which could affect encapsulation efficacy and VEGF release kinetics. This alginate-VEGF interaction has been studied in detail and modified by Gu et al. [28], shielding the charges of alginate and consequently manipulating the encapsulation yield and release kinetics. In the present study, VEGF was released from alginate microspheres in a non-controlled manner (Fig. 2). Possible explanations for the observed burst release involve factors related to the preparation process such as a high BSA content, relatively short cross-linking time as well as a porosity induced by gas foaming during the cross-linking. On the other hand, the high water uptake capacity of alginate microspheres, the rapid desorption–diffusion of VEGF associated with the surface of the microspheres and the increase of porosity created by the release of BSA could also favor a burst release. According to the previous research reports [28,29], variations in the kinetics of protein release from alginate microspheres into different release media indicate the importance of media choice. For this reason, FBS-supplemented cell culture medium was used as release medium in this study.

With the objective of improving VEGF release, reducing the burst effect and extending the release period, VEGF alginate microspheres were included within alginate or chitosan matrices. VEGF loss during the matrix preparation process was neglected. The results exhibited a strong modification of the VEGF release profile with both materials, characterized by an important reduction of the burst effect with A-2, CH-1 and CH-2 (Fig. 2). As the VEGF *in vitro* release profiles from all three formulations could be potentially useful in bone regeneration, they were tested *in vivo*. Because of the high burst release detected in the first two determinations with A-2 (data not shown), experiments were abandoned. Conversely, the release profiles for CH-1 and CH-2 were completed as shown in Fig. 7. The differences in release rates observed *in vitro* versus *in vivo*, a higher burst and a faster release rate *in vivo* may be related to blood flow rates. In the *in vitro* experiments, alginate microspheres as well as chitosan matrices showed high swelling capacity (Figs. 1 and 4) that could affect the VEGF release kinetics. *In vivo*, the same swelling behavior was expected in a dynamic environment. The dissolved and easily available VEGF could be rapidly removed, and consequently fresh protein continuously washed away by the blood flow. In addition, the described process might be more pronounced during the surgery and post-surgery period explaining the notable increase of the burst portion *in vivo* (Fig. 7).

The CH-1-PLA scaffolds successfully released VEGF *in vitro* and *in vivo*. In comparison with the non-coated formulation (CH-1), burst effect was strongly reduced and VEGF constantly delivered during 5 weeks. The zero-order *in vitro* release kinetics (Fig. 2) ob-

tained in this study is not frequently found in the related literature for proteins and specifically for growth factors. The typical *in vitro* curves are characterized by an initial release [30–31] followed by a negligible, sustained and incomplete growth factor release. Recently, *in vitro* VEGF linear sustained release for a short time (8 days) [32] or long post-burst period has also been reported [17].

The PLA-H coating reduced the swelling rate, mass loss and the porosity of the scaffold, and consequently diminished the VEGF release rate. The PLA-H allowed for water entry, with a progressively and slowly increasing water uptake to reach around 300% by the end of the experiment (Fig. 4). The mass loss behavior was similar to the water adsorption. Within the first week, a loss of around 20% was detected. Then, a plateau was achieved and maintained throughout 5 weeks (Fig. 4). The *in vitro* behavior of the same formulation (CH-1) without the PLA-H coating was totally different: the chitosan gave way to a huge water uptake, the structure swelled, and the pore size increased without important mass loss from the third week on. According to the mass loss results and SEM pictures, the swelling process did not damage the scaffold structure during the first two weeks (Figs. 4 and 5). However, an important loss of the CH-1 structure occurred after the second week but did not affect VEGF release kinetics as most of the GF had already been released (Fig. 2). The CH-1-PLA scaffolds were protected by the PLA-H coating that prevented scaffold damage and allowed for slow scaffold degradation (Figs. 4 and 5). Thus, to achieve a modulation of the VEGF release from the chitosan scaffold, it was mandatory to reduce the high water uptake. Our data suggest that the VEGF release mechanism from this scaffold is likely to be governed by diffusion through the film that progressively increases its porosity (Fig. 6), resulting in a combined diffusion–erosion release mechanism.

We expected the VEGF *in vivo* release kinetics from CH-1-PLA to be controlled by the PLA-H coating the same way as *in vitro*. The PLA-H prevented the high initial release of VEGF observed with the non-coated formulation, because the entrance of the blood flow was also controlled by the polymer film. VEGF was continuously delivered throughout the 5 weeks at a release rate slightly faster than *in vitro*. Eighty percentage of the total VEGF contents in the scaffold was released during this period. The *in vitro*–*in vivo* correlation was very good with a slope close to 1 (Fig. 7), a fact which also supports a shared *in vitro*–*in vivo* release mechanism.

Additionally, the bioactivity of the *in vitro* released VEGF was also assessed. For VEGF released from CH-1-PLA, as well as from alginate microspheres, the bioactivity was maintained over 90% of the expected value (Fig. 3b). Consequently, the bioactivity was not affected by the process of scaffold preparation. These results confirm the protective effect of alginate and BSA on growth factor bioactivity [24–28].

The VEGF levels obtained from different tissue samples showed that the GF remained located around the implantation site with a negligible systemic exposure (Fig. 8). The quantity of VEGF available in the bone defect should induce neovascularization and bone formation. Outside the bone tissue, VEGF concentrations did not differ from the background. The VEGF release kinetics was found to be perfectly reflected on the tissue level (Figs. 7 and 8). The bone peak VEGF concentration obtained from implantation of the fast formulation (CH-1) was achieved on the 5th day. Moreover, VEGF levels above 10 ng/g tissue were maintained throughout the 2 weeks of the assay. By contrast, due to the continuous VEGF supply from the CH-1-PLA scaffold, sustained VEGF concentrations were maintained for a longer time period, i.e. during at least 5 weeks, in the bone defect. In general, GF levels that can be achieved in a target defect diminish rapidly because of the short half-life of the GF. Therefore, the way to maintain effective concentrations of VEGF is the release of the GF in a controlled manner from a delivery system.

Vascularization of tissues has been reported by several authors with VEGF only or VEGF combined with other GFs using a variety of delivery systems and doses [16–20]. However, it is important to highlight the dual capacity of VEGF as its primary action is the formation of new blood vessels but it also exerts a direct influence on bone formation and remodeling [4,5]. Neither of the cited studies provided a quantitative analysis of the *in vivo* VEGF release kinetics in a bone defect. However, the work of Ennett et al. [16] which was carried out in subcutaneous tissue, needs to be mentioned in this context. The results obtained with VEGF incorporated into a PLGA system by these authors are comparable with those obtained in the present study; protein concentration was maintained above 10 ng/ml during 3 weeks at a distance of 2 cm from the implantation site. However, the VEGF dose used by these authors was substantially higher (3 µg) than the dose used in the present study (175 ng). This explains why the concentrations achieved in the subcutaneous tissue were higher mainly during the first hours.

Therefore, as our understanding of the bone forming process evolves, it is necessary to establish the optimal *in vivo* VEGF release kinetics not only with respect to local concentrations but also with respect to the duration of action of VEGF to be maintained in the damaged tissue. In the present work, we suggest formulations that may be useful to achieve physiologically relevant VEGF profiles in bone repair.

5. Conclusions

In summary, VEGF pre-encapsulated in alginate microspheres was embedded in alginate sponges, chitosan sponges and in chitosan sponges coated with a PLA-H coating to control the release of the GF. The active VEGF, released from chitosan uncoated sponges, diffused directly in the aqueous medium, whereas the one released from the matrix of the coated scaffold was concentrated in the matrix/film interface, abandoning the system in two ways: diffusion through the pores and diffusion through the polymer coating film itself. VEGF was released *in vitro* from the chitosan PLA-H-coated scaffolds at zero-order kinetics with a minimal initial burst. Importantly, a good *in vitro*–*in vivo* correlation with a slope very close to 1 was also achieved. The uncoated and coated scaffolds provided a bone local GF concentration above 10 ng/g during 2 and 5 weeks, respectively, in accordance with the *in vivo* release kinetics. This study demonstrates that the VEGF levels in bone created by a loaded implant at the site of the defect depend on the release kinetics provided by that delivery system.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science and Technology (Project SAF 2005-02753 and MAT2008-02632/MAT) and Accion Integrada (HU 2005-0009). We gratefully acknowledge Ada María Herrera García and Dr. Federico Díaz-González for HU-VEC preparation and donation.

References

- [1] M.R. Hausman, M.B. Schaffler, R.J. Majeska, Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis, *Bone* 29 (2001) 560–564.
- [2] H.P. Gerber, N. Ferrara, Angiogenesis and bone growth, *Trends Cardiovasc. Med.* 10 (2000) 223–228.
- [3] N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 581–611.
- [4] J. Street, M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F.V. Peale Jr., N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoefel, J.L. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H.P. Redmond, R.A.D. Carano, E.H. Filvaroff, Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 9656–9661.
- [5] H. Eckardt, M. Ding, M. Lind, E.S. Hansen, K.S. Christensen, I. Hvid, Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model, *J. Bone Joint Surg. Br.* 87 (2005) 1434–1438.

- [6] S.X. Hsiong, D.J. Mooney, Regeneration of vascularized bone, *Periodontology* 41 (2006) 109–122.
- [7] U. Mayr-Wohlfart, J. Waltenberger, H. Hausser, S. Kessler, K.P. Gunther, C. Dehio, W. Puhl, R.E. Brenner, Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts, *Bone* 30 (2002) 472–477.
- [8] M. Orlandini, A. Spreafico, M. Bardelli, M. Rocchigiani, A. Salameh, S. Nucciotti, C. Capperucci, B. Frediani, S. Oliviero, Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 17961–17967.
- [9] A.H. Zisch, M.P. Lutolf, J.A. Hubbell, Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors, *Cardiovasc. Pathol.* 12 (2003) 295–310.
- [10] T.W. King, C.W. Patrick, Development and *in vitro* characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 383–390.
- [11] A.H. Zisch, U. Schenk, J.C. Schense, S.E. Sakiyama-Elbert, J.A. Hubbell, Covalently conjugated VEGF-fibrin matrices for endothelialization, *J. Control. Rel.* 72 (2001) 101–113.
- [12] M.D. Hariawala, J.R. Horowitz, D. Esakof, D.D. Sheriff, D.H. Walter, B. Keyt, J.M. Isner, J.F. Symes, VEGF improves myocardial blood flow but procedures EDRF-mediated hypotension in porcine hearts, *J. Surg. Res.* 63 (1996) 77–82.
- [13] I. Vajanto, T.T. Rissanen, J. Rutanen, M.O. Hiltunen, T.T. Tuomisto, K. Arve, O. Närvi, H. Manninen, H. Räsänen, M. Hippeläinen, E. Alhava, S. Ylä-Herttua, Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ, *J. Gene. Med.* 4 (2002) 371–380.
- [14] T.P. Richardson, M.C. Peters, A.B. Ennett, D.J. Mooney, Polymeric system for dual growth factor delivery, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 029–1034.
- [15] M.C. Peters, P.J. Polverini, D.J. Mooney, Engineering vascular networks in porous polymer matrices, *J. Biomed. Mater. Res.* 60 (2002) 668–678.
- [16] A.B. Ennett, D. Kaigler, D.J. Mooney, Temporally regulated delivery of VEGF *in vitro* and *in vivo*, *J. Biomed. Mater. Res. A* 79 (2006) 176–184.
- [17] S.D. Patil, F. Papadimitrakopoulos, D.J. Burgess, Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis, *J. Control. Rel.* 117 (2007) 68–79.
- [18] Y.C. Huang, D. Kaigler, K.G. Rice, P.H. Krebsbach, D.J. Mooney, Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration, *J. Bone Miner. Res.* 20 (2005) 848–857.
- [19] R.R. Chen, E.A. Silva, W.W. Yuen, D.J. Mooney, Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation, *Pharm. Res.* 24 (2007) 258–264.
- [20] X. Hao, E.A. Silva, A. Månsson-Broberg, K.H. Grinnemo, A.J. Siddiqui, G. Dellgren, E. Wärde, L.Å. Brodin, D.J. Mooney, C. Sylvén, Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction, *Cardiovasc. Res.* 75 (2007) 178–185.
- [21] E. Sánchez, M. Baro, I. Soriano, A. Perera, C. Evora, *In vivo-in vitro* study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 151–158.
- [22] J.J. Delgado, C. Evora, E. Sánchez, M. Baro, A. Delgado, Validation of a method for non-invasive *in vivo* measurement of growth factor release from a local delivery system in bone, *J. Control. Rel.* 114 (2006) 223–229.
- [23] Z.S. Patel, H. Ueda, M. Yamamoto, Y. Tabata, A.G. Mikos, *In vitro* and *In vivo* release of vascular endothelial growth factor from gelatin microparticles and biodegradable composite scaffolds, *Pharm. Res.* 25 (2008) 2370–2378.
- [24] K.P. Claffey, W.O. Wilkison, B.M. Spiegelman, Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16317–16322.
- [25] M.C. Peters, B.C. Isenberg, J.A. Rowley, D.J. Mooney, Release from alginate enhances the biological activity of vascular endothelial growth factor, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9 (1998) 1267–1278.
- [26] A. Kawada, N. Hiura, S. Tajima, H. Takahara, Alginate oligosaccharides stimulate VEGF-mediated growth and migration of human endothelial cells, *Arch. Dermatol. Res.* 291 (1999) 542–547.
- [27] M.H. Sheridan, L.D. Shea, M.C. Peters, D.J. Mooney, Bioadsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery, *J. Control. Rel.* 64 (2000) 91–102.
- [28] F. Gu, B. Amsden, R. Neufeld, Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads, *J. Control. Rel.* 96 (2004) 463–472.
- [29] L.A. Wells, H. Sheardown, Extended release of high pl proteins from alginate microspheres via a novel encapsulation technique, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (2007) 329–335.
- [30] K.W. Lee, J.J. Yoon, J.H. Lee, S.Y. Kim, H.J. Jung, S.J. Kim, J.W. Joh, D.S. Lee, S.K. Lee, Sustained release of vascular endothelial growth factor from calcium-induced alginate hydrogels reinforced by heparin and chitosan, *Transplant. Proc.* 36 (2004) 2464–2465.
- [31] L.W. Norton, E. Tegnell, W.M. Toporek, *In vitro* characterization of vascular endothelial growth factor and dexamethasone releasing hydrogels for implantable probe coatings, *Biomaterials* 26 (2005) 3285–3297.
- [32] F. Gu, R. Neufeld, B. Amsden, Sustained release of bioactive therapeutic proteins from a biodegradable elastomeric device, *J. Control. Rel.* 117 (2007) 80–89.

ANEXO 2



Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration

Beatriz De la Riva ^a, Esther Sánchez ^a, Antonio Hernández ^b, Ricardo Reyes ^a, Faleh Tamimi ^c, Enrique López-Cabarcos ^c, Araceli Delgado ^{a,*}, Carmen Évora ^{a,*}

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

^b Traumatology Service, Hospitén Rambla, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^c Dpto. Química-Física II, UCM, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2009

Accepted 30 November 2009

Available online 4 December 2009

Keywords:

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Platelet derived growth factor (PDGF)

Brushite

Chitosan

Bone regeneration

ABSTRACT

The two growth factors VEGF and PDGF are involved in the process of bone regeneration. For this reason, we developed a brushite–chitosan system which controls the release kinetics of incorporated VEGF and PDGF to enhance bone healing. PDGF (250 ng) was incorporated in the liquid phase. Alginate microsphere-encapsulated VEGF (350 ng) was pre-included in small cylindrical chitosan sponges. VEGF and PDGF release kinetics and tissue distribution were determined using iodinated (¹²⁵I) growth factor. *In vivo*, PDGF was more rapidly delivered from these systems implanted in rabbit femurs than VEGF. 80% of PDGF was released by the end of two weeks while only 70% of VEGF was delivered after a period of three weeks. Both GFs released from the brushite–chitosan constructs remained located around the implantation site (5 cm) with negligible systemic exposure. A PDGF bone peak concentration of approximately 5 ng/g was achieved on the 4th day. Thereafter, PDGF concentrations stayed higher than 2 ng/g during the first week. These scaffolds also provided a local VEGF bone concentration above 3 ng/g during a total of 4 weeks, with a peak concentration of 5.5 ng/g on the 7th day. The present work demonstrates that our brushite–chitosan system is capable of controlling the release rate and localization of both GFs within a bone defect. The effect on bone formation was considerably enhanced with PDGF loaded brushite–chitosan scaffolds as well as with the PDGF/VEGF combination.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biomaterials for stimulating osseous regeneration should combine osteogenic, osteoinductive and osteoconductive properties. Besides, they should be resorbed and gradually replaced by newly formed bone. Calcium phosphate compounds (CPCs) are already well established as bone substitute materials in clinical applications, with tricalcium phosphate (TCP) and hydroxyapatite (HA) being among the mostly investigated ones. Both compounds are considered biocompatible, bioactive in terms of osteoconduction and bioresorbable, though it should be noted that HA degrades considerably slower than TCP [1].

The ability to be remodeled depends on the resorption of the material by osteoclasts and subsequently the replacement by newly formed bone through osteoblastic activity. Biomaterials with a slow resorption rate interfere with bone growth [2], while biomaterials with a fast resorption rate compromise the stability of the site of surgery during the healing process [3,4]. Synthetic materials, such as

β -tricalcium phosphate (β -TCP) and brushite exhibit a higher resorption rate *in vivo* than HA materials, allowing simultaneous material resorption and bone formation [5,6]. In physiological conditions, brushite is more soluble than HA and consequently has been shown to be resorbed to a higher degree following implantation in animals [7]. Despite of the low pH of brushite cements immediately after implantation, various *in vivo* studies report favorable host responses [8,9] mainly due to the buffering capacity of the *in vivo* milieu.

CPCs, mainly HA or β -TCP have been proposed as delivery devices for bone formation stimulators such as growth factors (GF) [10]. Among them Bone Morphogenic Proteins (BMPs) are widely used in combination with CPCs to promote healing of critical-sized bone defects [11–13], but other bioactive molecules as the Transforming growth factor beta (TGF- β) [14,15] or PDGF in β -TCP [16] are also applied. However, only a few studies have been dedicated to brushite as a drug delivery system and they were mainly focused on antibiotics [17–20]. It needs to be highlighted that brushite has been recently studied to develop a biomaterial capable of releasing the cytokine RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), a key stimulator for the bone remodeling process [21]. However, according to the literature none of the GFs has been formulated in a brushite system with the purpose of stimulating bone regeneration.

* Corresponding authors. Av. Astrofísico Francisco Sánchez s/n. Facultad de Farmacia, 38200, La Laguna, Tenerife, Spain. Tel.: +34 922 318507; fax: +34 922 318506.

E-mail addresses: adelgado@ull.es (A. Delgado), cevora@ull.es (C. Évora).

Formation of new tissue vasculature has been reported by several authors upon the release of different doses of the Vascular endothelial growth factor (VEGF) alone or in combination with other GFs from a variety of delivery systems [22–26]. Although VEGF is predominantly known for its role in vessel formation, it is also implicated in the promotion of endochondral and intramembranous ossification in bone growth [27,28].

The platelet derived growth factor (PDGF), a potent chemoattractant and mitogen, also promotes angiogenesis, fact which positions it as a key mediator in wound and bone healing [29].

The objective of the present study was to examine the biological efficiency of a brushite–chitosan composite scaffold loaded with PDGF or a combination of PDGF and VEGF, in a bone defect created in rabbit femurs.

Taking into account that the delivery of multiple factors involved in tissue regeneration could mimic the conditions of natural tissue formation, we elaborated a system capable of controlling the kinetics of the two GFs. For that purpose, the *in vivo* release kinetics of each single GF in the system was modulated. Finally, the bone repair process in defect femurs with PDGF or PDGF–VEGF loaded brushite–chitosan implants was evaluated histologically.

2. Materials and methods

Calcium carbonate (CC), dicalcium phosphate dihydrate (DCPD), monocalcium phosphate (MCP), and sodium pyrophosphate were purchased from Sigma-Aldrich and citric acid was from Panreac. VEGF and PDGF were supplied by Chemicon. ^{125}I -PDGF and ^{125}I -VEGF were purchased from Amersham and PerkinElmer, respectively. Chitosan (Protasan® UP CL 213) and alginate (Pronova® UP MVG) were supplied by Novamatrix Biopolymer (Norway).

2.1. Preparation of brushite implants

First, β -TCP in form of fine powder was prepared, according to Tamimi et al., 2007 [30], by heating a stoichiometric mixture of CC and DCPD at 900 °C for 14 h.

The product of this reaction was analyzed by X-ray diffraction to assure the purity of the β -TCP formed. The cement solid phase was made as described [19], by mixing the reactants, β -TCP (1.428 g) and MCP (0.8 g), with the chemical retardant sodium pyrophosphate (0.012 g), using a pestle and mortar for approximately 15 min until a homogeneous mixture was obtained. The liquid phase was made up of a 0.5 M citric acid solution. Cement was prepared by mixing the solid phase (200 mg) with the liquid phase in a powder to liquid ratio (P/L) of 2 g/mL using a mixer (Headolph Reax) for 30 s. The cement paste was used to fill one-face-open polyethylene cylinders with an internal diameter of 5 mm. The mixture was left to harden in the moulds at room temperature during 1 h obtaining cylindrical implants. The setting temperature was measured with a probe and determined to be 20.23 ± 1.17 °C. The resulting implants were kept at 4 °C during 12 h before use.

PDGF (250 ng) and ^{125}I -PDGF (0.5–2 μCi), reconstituted in 4 mM HCl and 0.1% BSA solution, were incorporated in the liquid phase, while VEGF (350 ng) was reconstituted in 1% albumin aqueous solution and included in small cylindrical chitosan sponges (described in Section 2.1.1). One chitosan sponge was added to the cement paste in the mould before setting. All the formulations contained a chitosan sponge with or without VEGF, depending on the experimental group.

The materials used to prepare the implant were previously sterilized by γ -irradiation following the USP recommendations, with a dose of 25 kGy from a ^{60}Co source (Gamma Sterilization Unit of Aragogamma, Barcelona, Spain). Thermometric control confirmed that the sample temperature during irradiation did not rise appreciably above room temperature. Except for GFs, the liquid components and lab instruments were sterilized by autoclaving at 121 °C for

30 min. The implants preparation process was carried out under aseptic conditions.

2.1.1. Chitosan sponge fabrication

First, alginate microspheres of VEGF were prepared, as previously described [31] by an emulsification/internal gelation method. To prepare the chitosan sponges, 7 mg of alginate microspheres, containing 320 ng of VEGF were dispersed in 150 μl of 1.5% chitosan aqueous solution and freeze dried. These sponges were immersed in another 150 μl of chitosan solution, freeze dried, cross-linked, washed with deionized water and again freeze dried. For cross-linking, the sponges were incubated for 30 s in 1 M NaOH [31]. All the sponges were stored at 4 °C until use.

2.2. Mercury porosimetry

Pore diameter distribution, total pore volume and the porosity of the prepared systems were measured using a mercury intrusion porosimeter (Autopore IV 9500, Micromeritics Instrument Co.). Determination of the porosity was based on the relationship between the applied pressure and the diameter of the pores into which mercury intrudes, according to the Washburn equation:

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

where P is the applied pressure (ranger from 0.5 to 58000 psia), D is the pore diameter, γ is the surface tension of the mercury (484 dyn/cm) and θ is the contact angle between mercury and the pore wall (taken as 141°).

2.3. Scaffold loading

First encapsulation efficiency of VEGF microspheres was determined by measuring of radioactivity levels in three aliquots of microspheres using a gamma counter (Cobra® II, Packard).

To determine the PDGF or VEGF loading the total radioactivity of each implant was counted. These determinations were assumed to be valid for calculating the dose of PDGF and VEGF included in the dual scaffolds. The spatial distribution of ^{125}I -PDGF and ^{125}I -VEGF in the brushite–chitosan systems was assessed by cutting them into three sections (upper–medium–low) and measuring the radioactivity of each section in the gamma counter [31].

2.4. In vitro release experiments

The *in vitro* release assays were carried out in DMEM medium, supplemented with 2% FBS (Gibco) and 0.02% sodium azide at 37 °C, in a 5% CO₂ atmosphere and relative humidity of 95%, under slow orbital shaking at 75 rpm (Orbital shaking platform POS-300, Grant-bio). Briefly, one implant was incubated in 2 ml of release medium. At specific time intervals, the amount of the released GF was calculated by measuring the radioactivity of the samples with the gamma counter. The release of each GF was studied separately. At the same time intervals, the radiolabeling stability of ^{125}I -GF in the release medium was checked by thin layer chromatography (TLC). An aliquot (5 μl) was spotted on a plastic silica gel stripe (60 F₂₅₄, Merck) (0.9 × 8 cm) and the chromatography carried out with 85% methanol in water along 5 cm. The radioactivity of the band (starting point, medium and front section) was measured in the gamma counter. The free $^{125}\text{I}^-$ reaches the front ($R_f = 1$) and the ^{125}I -GF is retained at the starting point ($R_f = 0$).

2.5. Animal experiments

All the experiments were carried out in conformity with the E.C. Guideline (86/609/CEE) on care and use of animals in experimental

procedures. Furthermore, the animal experiments were previously approved by the local committee for animal studies of the University of La Laguna. All experiments were performed in aseptic conditions.

2.5.1. Surgical procedure: bone defect

The surgery to produce the bone defect was performed as previously described [32]. 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 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 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 then the patella and the patellar tendon were reduced. The surgical wound was closed with stitches, disinfected and buprenorphine (25 µg/kg, Buprex®) and ketoprofen (2 mg/kg, Ketofen®, 1%) were injected SC every 12 h, the first one during 36 h and the latter during 24 h, to reduce post-surgical pain. After recovery from the surgery (20–30 min), the animals were allowed for free movement, food and water uptake.

2.5.2. In vivo release and bio-distribution of PDGF and VEGF

These experiments were carried out with two groups of rabbits. One group (12 animals) received the scaffolds containing dispersed ¹²⁵I-PDGF/PDGF and an empty chitosan sponge. The other group (18 rabbits) was implanted only with the ¹²⁵I-VEGF/VEGF chitosan sponge incorporated in the brushite scaffold.

For each sampling time point three rabbits were sacrificed, the femurs extracted and the implants removed. The PDGF and VEGF release kinetics were followed up by radioactivity measurements of the extracted implants using the well-type gamma counter in the ¹²⁵I energy range (15 to 75 keV) for 30 s.

The femurs freed of soft tissues were divided into 2 pieces: implant area (the implant including piece of bone of 5 cm of length) and the remaining bone. Additionally, muscle around the femur, thyroid and blood samples were also collected for the determination of GF bio-distribution. The radioactivity of all samples was assessed as mentioned above.

2.5.3. Histological analysis

To investigate the effect of PDGF released from the systems and the effects of dual delivery of PDGF and VEGF on bone regeneration in rabbit femur defects, four groups of 6 animals each were prepared for histological examination as follows:

Group C non-treated bone defect

Group B blank scaffold

Group P scaffold containing 250 ng of PDGF

Group VP scaffold containing 250 ng of PDGF and 320 ng of VEGF

To label the mineralization front, the animals were injected oxytetracycline-HCl (40 mg/kg, IM) and calcein blue (15 mg/kg, SC) twelve and four days before sacrifice, respectively.

The rabbits were sacrificed 4 weeks after implantation. The scaffold bearing femurs (six specimens of each experimental group) were prepared for histological evaluation. The femurs were fixed in 10% formalin solution (pH = 7.4), dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in methyl methacrylate. Following polymerization, 10 µm thick longitudinal sections were prepared throughout the scaffold, using a sawing microtome technique (LEICA SM 2500). The sections were stained with Goldner's Trichrome to identify new bone formation, or left unstained for detection of fluorochrome labels. The specimen were inspected by light microscopy (LEICA DM 4000B). For histomorphometrical analysis, all sections per specimen were evaluated using computer based image analysis software (Leica Q-win

V3 Pro-image analysis system, Barcelona, Spain). The quantitative evaluation of newly formed bone was done by determining a region of interest (ROI), defined as the tissue within the defect site and the transition zone to the host bone. The ROI was set using a square of 5 × 5.5 mm positioned in the upper half of the defect, the region corresponding to the epiphysis (see Fig. 1). Within this ROI, new bone formation was distinguished from the scaffold through structure and colour differences. New bone tissue was quantified from four neighbored sections from the central zone of the scaffold by selecting a fixed threshold for positive stain (green for Goldner's Trichrome). Bone formation was expressed in mm² based on the quantitative evaluation of the ROI. The distance between tetracycline and calcein blue labels was measured in ultraviolet light for calculation of mineral appositional rate (MAR).

Statistical analysis was performed with SPSS software using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Turkey multiple comparison post-test. Significance was set at $p < 0.001$.

3. Results

3.1. System characteristics

VEGF–alginate microspheres were prepared with a fixed VEGF/alginate loading of 100 ng/mg. VEGF encapsulation efficiency of alginate microspheres was $55.8 \pm 7.4\%$.

The chitosan sponges weighting 12.7 ± 0.81 mg, were cylindrical in shape (3.2 × 4 mm). Radioactivity levels measured in the three sections (upper–medium–low) of the sponges were very much alike, indicating a homogeneous distribution of the microspheres throughout the scaffolds.

The brushite–chitosan implants were also shaped cylindrically (4.8 × 10 mm) with an average weight of 296.7 ± 9.35 mg.

The three sections of the PDGF containing scaffolds revealed to contain 30–35% of the total radioactivity each, indicating a uniform distribution of the GF within the system. On the contrary, the radioactivity within the scaffolds containing both GFs was concentrated in their medium section because of the VEGF included in the chitosan sponge. The results revealed about 15–18% in the upper and low sections and approximately 65–70% in the middle area. Accordingly, the VEGF was distributed evenly in the chitosan sponge and concentrated in the center of the brushite–chitosan system whereas the distribution of PDGF was homogeneous throughout the brushite matrix.

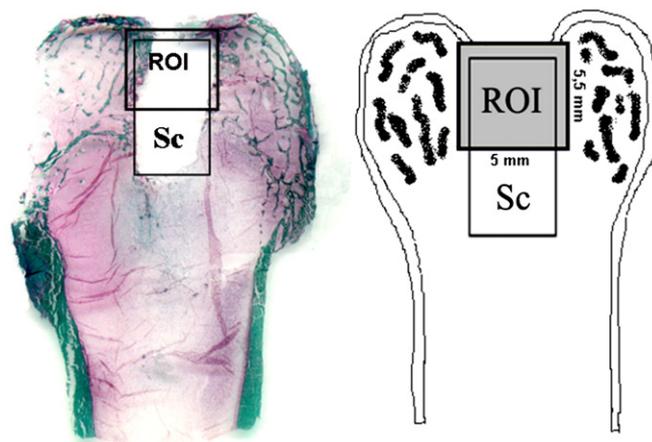


Fig. 1. Horizontal section of a rabbit femur implanted with a brushite scaffold in the regions of the epiphysis and metaphysis. Black rectangle indicates scaffold location and black square indicates the region of interest (ROI) wherein new bone formation was measured.

3.2. Implant porosity

Total porosity of the brushite–chitosan implants was 53.1%. The originally low porosity of the brushite (39%) was increased through the contribution of the high porosity of the chitosan sponge (80%). Additionally, a bimodal pore size distribution was observed in the brushite–chitosan system due to presence of both structures (Fig. 2).

3.3. *In vitro* release

Release kinetics for the growth factors encapsulated within the brushite–chitosan implants were subsequently analyzed using ^{125}I -VEGF or ^{125}I -PDGF separately. The resulting data of radiolabeling stability exhibited an increase of free $^{125}\text{I}^-$ of about 12–15% during the experiments.

To determine whether this approach would allow for an adequate release profile for PDGF, its release kinetics from the brushite–chitosan scaffolds was assessed *in vitro*. During the first day the initial release rate was a rapid one of approximately 45% while during the second phase PDGF release was slower to end up with approximately 70% of released GF at the end of the next 2 weeks (Fig. 3).

The release kinetics of pre-encapsulated VEGF in alginate microspheres were also studied before scaffold preparation. VEGF was rapidly released: approximately 75% was delivered during the first 3 days. As had been studied previously [31], the chitosan matrix notably reduces the initial release rate, about 25% are liberated within the first 24 h, and approximately 60% of the GF are released within three weeks. The inclusion of the chitosan sponges into brushite implants reduced the VEGF release rate even more (Fig. 3). Primarily, the burst release (within the first 24 h) was reduced to approximately 13%. Then, 64% of VEGF was delivered throughout the following three weeks.

3.4. *In vivo* release

VEGF and PDGF release kinetics from the implants were monitored separately after implantation surgery in rabbits.

The remaining ^{125}I -PDGF in the matrix was measured during 2 weeks. PDGF was delivered rapidly from these scaffolds; approximately 37% of the GF was liberated within the first 24 h (Fig. 3). Thereafter, PDGF was delivered at a release rate of 4.3% per day during the next 6 days, followed by a slower release of approximately 2% per day during the last week. A total release of approximately 80% of the loaded PDGF was achieved. The differences between the *in vitro* and *in vivo* release profiles are reflected in the slope of the obtained linear relation, with a value of 1.46. The burst effect *in vitro* was a little

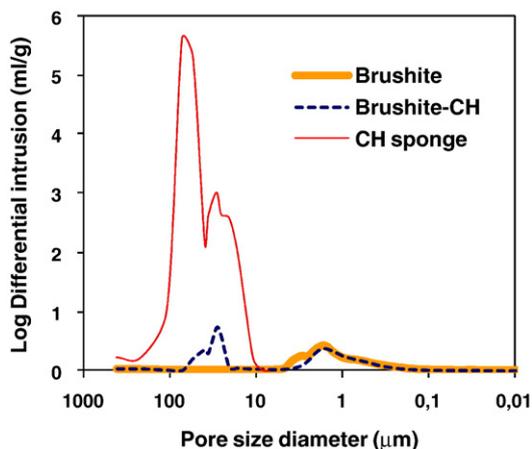


Fig. 2. Porosity and pore size distribution in pure brushite implants, brushite–chitosan (brushite–CH) scaffolds and chitosan (CH) sponges.

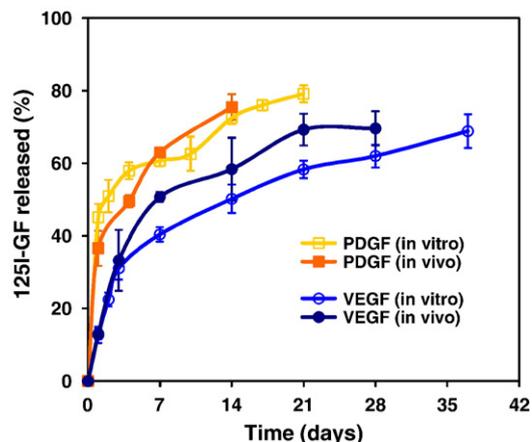


Fig. 3. *In vitro* and *in vivo* release profiles of ^{125}I -VEGF and ^{125}I -PDGF incorporated in brushite–chitosan scaffolds.

more pronounced than *in vivo*. Then, during the second phase, (until to the end of the first week) the *in vitro* release rate was slower, approximately 2.5% per day versus 4.3% per day *in vivo*. Finally, during the last week, the release rates became very much alike.

Furthermore, the release of VEGF showed a controlled initial release of approximately 13% during the first 24 h. However, the first phase as a whole lasted for three days, with a delivery rate of 11% per day. Afterwards, the release rate declined to 4% until the end of the first week. During the following two weeks, the release rate dropped to approximately 1.3%. From then on there was no more VEGF delivered. Consequently, a release of approximately 70% of the implant-encapsulated VEGF was achieved within three weeks (Fig. 3). In this case the *in vitro* and *in vivo* release profiles were very similar with a good correlation; a slope equal 1 was obtained.

3.5. GFs bio-distribution

The distribution of PDGF or VEGF released from the brushite scaffolds implanted in rabbit femurs was analyzed in surrounding muscle, thyroid glands, and blood. The PDGF and VEGF levels obtained from different tissue samples showed that the GFs remained located around the implantation site. GF concentrations were highest at the defect site. Then, the levels declined with distance from the implantation site, exhibiting a negligible systemic exposure (Fig. 4).

The highest PDGF levels were obtained in the implant area (5 cm). From there on the levels decreased, the concentrations found in the rest of the femur were lower. 24 h following implantation, PDGF levels

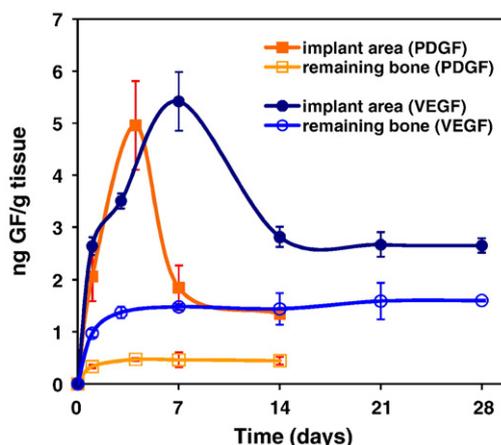


Fig. 4. ^{125}I -VEGF and ^{125}I -PDGF concentrations achieved in the different areas of rabbit femurs after brushite–chitosan implantation.

in the implant area increased to reach a bone peak concentration of approximately 5 ng/g on the 4th day. PDGF concentrations remained higher than 2 ng/g during the first week and then declined to stay at a constant level below 2 ng/g until to the end of the experiment. On the other hand, the levels in the remaining bone maintained a level of about 0.5 ng/g throughout all the experimental time (Fig. 4).

The VEGF bone peak concentration was achieved on the 7th day, again in the area where the scaffold had been set. During the first two weeks, VEGF levels stayed above 3 ng/g tissue, with a maximum of approximately 5.5 ng/g. Finally, VEGF concentrations were maintained close to 3 ng/g in the implantation zone throughout the rest of the experiment. However, lower concentrations were observed in the remaining area, with values of about 1.5 ng/g (Fig. 4). On the other hand, GF concentrations outside the bone tissue, in muscle, blood and thyroids were very low and did not differ significantly from the background of the gamma counter. The highest levels were observed in thyroids during the last three weeks, the cumulative uptake was in the range of 2.5–3.3% of the released radioactivity.

3.6. Histological and histomorphometrical evaluation

Histological evaluation was performed in the upper half of the defect site, the area corresponding to the epiphysis, exhibiting significant differences among groups B (blank), P (PDGF) and VP (VEGF–PDGF). No significant differences in new bone formation (Fig. 5a, a', i) and mineral apposition rate (Fig. 6a, b, e) between animals with empty defects (group C) and animals from group B (Fig. 5b, b', i) were observed.

After 4 weeks post-implantation, the experimental period studied in this work, limited bone formation adjacent to the scaffold and bone ingrowth into peripheral zones of the implant were detected. Areas of fibrosis of diverse extension with many fibroblasts positioned among the collagen fibres were observed around the scaffolds of group B (Fig. 5b, b'). Osteoblastic differentiation with new bone formation directed to the scaffold was found (Fig. 5b), indicating a good compatibility between the scaffold and the host tissue. In several animals a perfect integration of the scaffold with the host tissue had occurred. Some areas displayed osteoblastic differentiation and newly formed bone with only few signs of fibrosis (Fig. 5b). In group P, a higher degree of tissue response was observed. The repair response resembled the one of group B, although some variability between animals was found. New bone formation was detected adjacent to and partially beginning to invade the scaffolds (Fig. 5c), with more extensive areas of mineralized bone matrix in group P than in group B. Mineralized bone trabeculae of major diameter, with zones of non-mineralized bone matrix (osteoid) (Fig. 5c), result of a high osteoblastic activity, had formed. Moreover, hypertrophic osteoblasts adhered to the surface of the bone trabeculae as well as osteocytes immersed in the bone matrix were also found (Fig. 5d). Group VP was characterized by a higher degree of tissue response than groups B and P. In this group, although a repair response with fibrous areas was observed, it was significantly minor at the time point of sacrifice (4th week) than in groups B and P. There was a higher degree of new bone formation adjacent and invading the scaffolds than in the other groups. Trabeculae were more prominent in diameter, generating in some cases confluent areas (Fig. 5e). Osteoblastic activity and differentiation were highest in this group, being reflected in a high density and multilayers of osteoblasts on the surface of some bone trabeculae (Fig. 5f, g) and a great extension of non-mineralized bone matrix (osteoid) (Fig. 5e). In addition, mitotic osteoprogenitor cells were found on the surface of growth trabeculae (Fig. 5h). Little activity of bone resorption in the regions of newly formed bone, reflected by the absence of osteoclasts, was observed in all of the groups. Histomorphometrical evaluation of the ROI revealed significant differences in new bone formation among the groups C and B with areas of $0.12 \pm 0.008 \text{ mm}^2$ and $0.13 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ of newly formed

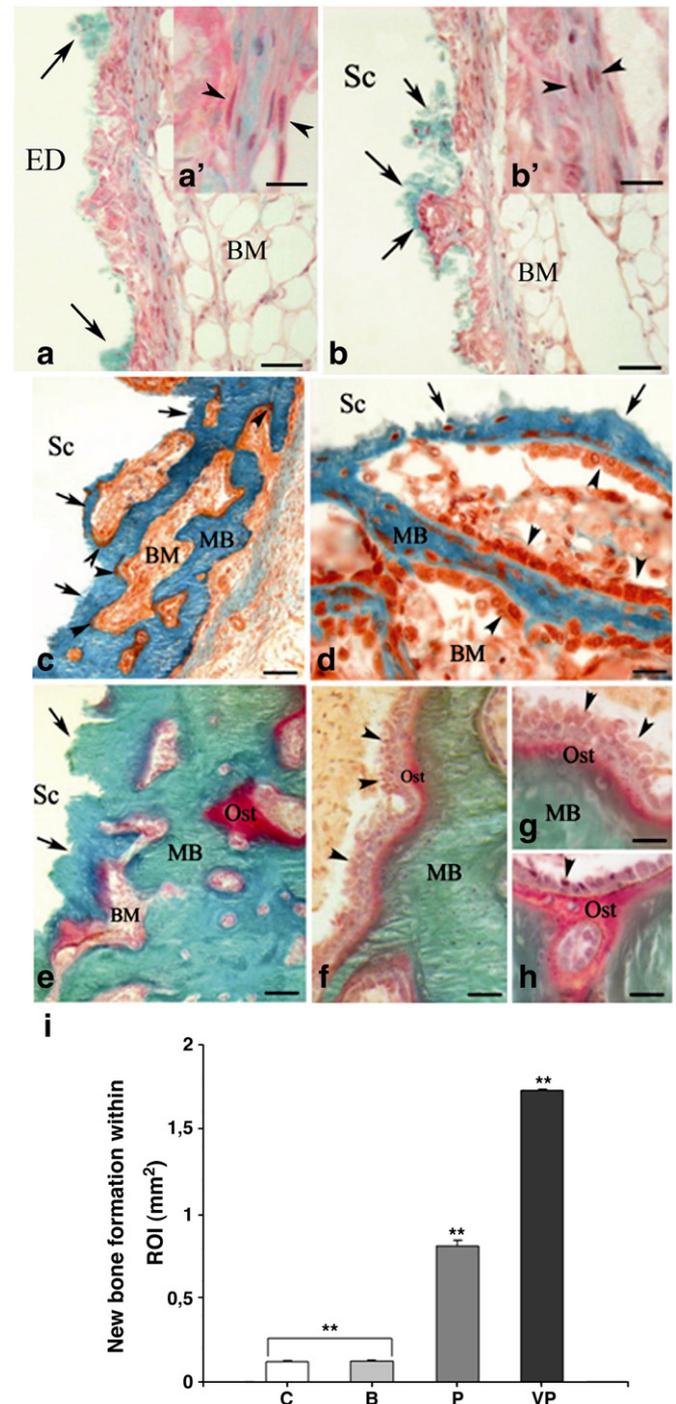


Fig. 5. Histological specimens of rabbit femurs with empty defects (C) (a), implanted with brushite scaffolds (B) (b), brushite PDGF loaded scaffolds (P) (c) and VEGF/PDGF containing brushite scaffolds (VP) (e). Horizontal sections demonstrate bone neoformation (arrows) in the area around the empty defect in group C (a) and around the scaffold in other three groups (b), (c) and (e). Detail at high magnification pointing out the presence of fibroblasts (arrowheads) and collagen fibres in the area around the empty defect (a') in group C and around the scaffold (b') in group B. Details at high magnification showing the size of newly formed bone trabeculae in groups P (d) and VP (f) (arrows) and the presence of hypertrophic osteoblasts on the trabecular surface (arrowheads) (d, f, g). Detail in group VP (h) with mitotic osteoprogenitor cells on a bone trabecule in formation (arrowhead). Scale bars: a,b) 100 μm ; a',b') 20 μm ; c, e) 250 μm ; d, g, h) 25 μm ; f) 50 μm . BM: bone marrow. ED: empty defect. MB: mineral bone. Ost: osteoid. Sc: scaffold area. (i) Area [mm^2] of new bone formation within the ROI. Histograms represent means \pm SD in groups C, B, P and VP. Asterisks indicate significant differences at $p < 0.001$.

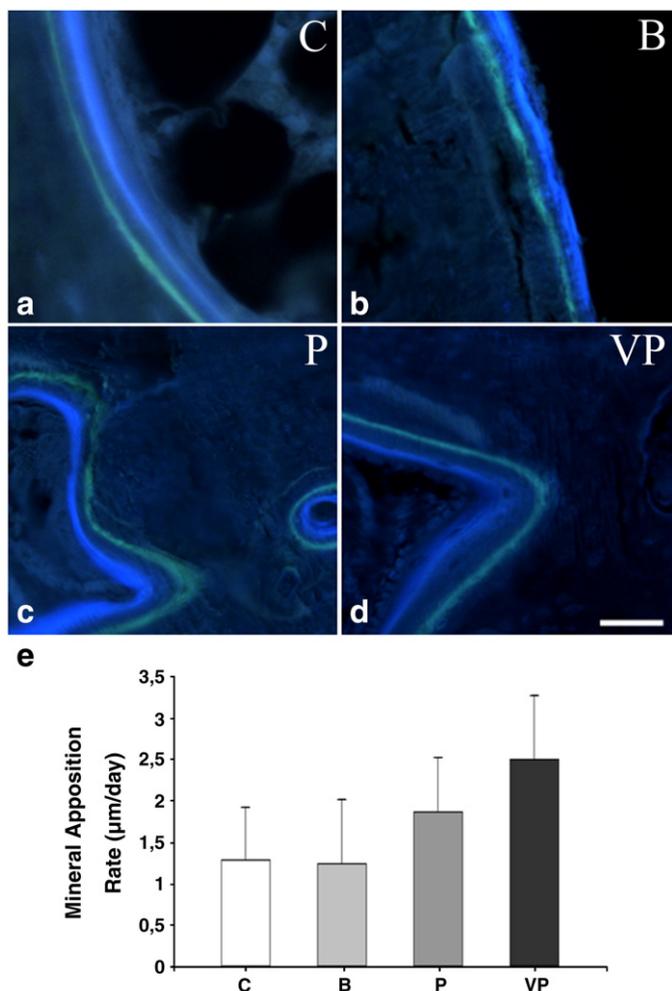


Fig. 6. Mineral apposition rates determined in histological specimens of rabbit femurs of all groups (a, b, c, and d). Fluorochrome labelling of the mineralization front (green = tetracycline, blue = calcein). Doses were given 12 and 4 days prior to euthanasia (after 4 experimental weeks) and inter-label thickness was determined by image analysis to calculate the mineral apposition rate. Scale bar: 40 µm. (d). The histograms represent mean \pm SD in groups C, B, P and VP. No significant differences were detected ($p < 0.05$).

bone, respectively, and the groups P with $0.82 \pm 0.033 \text{ mm}^2$ in and VP with $1.74 \pm 0.036 \text{ mm}^2$ (Fig. 5i).

In order to evaluate the mineral apposition rate, fluorochrome labels were administered to rabbits at successive intervals of twelve and four days prior to euthanasia at 4 weeks. Clear double labels of tetracycline and calcein can be seen in (Fig. 6a,b,c and d), demonstrating new bone formation at 4 weeks post-surgery. Although, at this time point the mineralization rate differed among groups C and B with respect to groups P and VP, they were not statistically significant (Fig. 6e). Extensive fluorochrome labels were found throughout the specimen of the groups treated with PDGF (P) and PDGF/VEGF (VP), whereas the scaffolds alone (group B) and the empty defects (group C) only stimulated bone repair in the periphery of the defect (data not shown).

4. Discussion

In this study, brushite was used as a carrier for the delivery of two GFs, VEGF and/or PDGF. Bearing in mind that PDGF acts during the first step, that is the first three days, of bone repair [33], this GF was dispersed in the brushite for fast release. By contrast, VEGF comes in later than PDGF [33]. Consequently, VEGF was pre-encapsulated in alginate microspheres included in the chitosan sponge to reduce the

release rate and thus prolong the presence of the GF at the damage site. Bone regeneration is a highly coordinated procedure. The formulation developed in this work was intended as an approach to mimic the concomitant interactions among various factors involved in this process. The efficacy of such approaches will highly depend on the GFs release rate with the concomitant quantities of delivered GFs as well as the time period during which release continues at the target tissue. The present results demonstrate that different release kinetics for PDGF and VEGF can be achieved by technologic manipulations.

Taking into account the good *in vivo-in vitro* correlations, the discussion is focused on the *in vivo* results. About 70% of the PDGF enclosed in the implant was released during the first week, reaching 80% at the end of the second week, the time period the experiment lasted. Therefore, the release profile of PDGF fitted well with the temporal expression patterns of the signaling molecules during fracture healing as described [33]. According to these authors, tissue VEGF expression in bone healing takes place during the third week after fracturing. However, the achieved VEGF release profile from the brushite–chitosan system was faster than desired. During the first two weeks approximately 60% of VEGF were already released. The optimum VEGF release profile is supposed to display a pattern avoiding GF release during the first 2 weeks. In case of tissue regeneration, the implant must serve as a delivery system as well as a scaffold for bone ingrowth. Consequently, a porous matrix is necessary for the promotion of tissue formation. However, drug release rates can be controlled by minimizing the relative porosity of the cement system [18,20]. In the present study, complementary conditions for both requisites were chosen. The porosity of the matrix, approximately 53%, was kept as high as possible for brushite [20]. Despite of not using any porogen, the inclusion of chitosan sponges increased the overall porosity and thus may favor bone formation [34]. Clearly, the matrix structure could not prevent VEGF release during the first two weeks. However, other authors report that normal VEGF expression is up-regulated within the first 10 days with a peak between the 5th and the 10th day in rats [35–37]. In the current study, more than 50% of VEGF were released during the first 10 days. From this point of view, the VEGF release profile obtained in our study coincides well with its expression pattern during physiological bone healing in rats [35–37].

The VEGF and PDGF levels obtained from different tissue samples showed that the GFs remained located around the implantation site with a negligible systemic exposure (Fig. 4). The GF release kinetics was found to be perfectly well reflected on the tissue level (Figs. 3 and 4). The bone peak of PDGF and VEGF concentrations was achieved on the first week. However, the PDGF peak was sharper than the one of VEGF due to the different release profile as well as the shorter half-life of PDGF, 2 min, compared to 50 min in case of VEGF [38]. The fast release rate of PDGF during the first four days was high enough to achieve an early maximum concentration as expected. Afterwards, the PDGF elimination rate was higher than the release rate. Consequently, the concentration in the defect decreased. Therefore, PDGF was maintained within the target site the desired period of time according to tissue expression patterns for fracture healing [33].

By contrast, due to the higher dose and longer half-life of VEGF together with the slower and continuous release from the system, sustained VEGF concentrations were maintained in the bone defect for a longer period of time. VEGF bone levels were held close to 3 ng/g tissue throughout the 4 weeks of the assay. Generally, in case of an insufficient release rate, GF levels in a target defect diminish rapidly because of the short half-life of the GFs. So, the only way to maintain effective concentrations of VEGF is a delivery system which effectively controls GF release during the required time.

The effects of PDGF and a PDGF/VEGF combination encapsulated in brushite–chitosan systems on bone regeneration were evaluated histologically. Several authors consider that a post-implantation period of 4 weeks with experimental biomaterials grafted into bone

defects is enough time to observe angiogenesis and new bone formation in various animal models, including rabbits [39–41]. In our experiments, the histological changes that occurred during the 4 weeks of implantation, allowed for evaluation of differences in bone regeneration upon actuation of both of the assayed GFs.

In the present study, the results indicate that blank brushite–chitosan scaffolds (group B) are not capable of significantly enhancing bone formation compared to the unfilled defects (group C). Nonetheless, several authors report that brushite is well tolerated, inducing only a mild foreign-body reaction, which does not impair its replacement by newly formed bone within a few weeks thus, permitting simultaneous bone formation and material resorption [5,6,8,9,30,41]. The different results obtained in the present study may probably be due to the use of a different experimental setup.

In contrast, a considerably enhancing effect was observed with the PDGF loaded brushite–chitosan scaffolds as well as with the PDGF/VEGF combination. PDGF alone increased bone formation. The combination of the two GFs significantly augmented the appearance of new bone tissue compared to the same dose of PDGF alone. It has been reported that PDGF/VEGF combinations induce faster vessel maturation [25,26]. The current results suggest that VEGF participates in the process of new bone formation.

Our VEGF release profile with the relatively early peak was capable of improving bone response. In contrast, Kempen et al. [37], using 2 µg of VEGF, did not observe any significant effect on a femoral defect in rats. Not even an additive effect by combining VEGF (2 µg) and BMP-2 (9.2 µg) could be obtained in that study. The authors concluded that the lack of effect may be explained by the very early release peak they had achieved. From our point of view, the initial burst release they had obtained was exceptionally large (more than 80%) whereas in the present study burst release was less than 20%.

Finally, although the results obtained with the injected fluorochrome were not significantly different between the studied groups, an increase in mineral apposition could be observed.

5. Conclusions

The results of the present work suggest that the application of GFs for bone regeneration could improve tissue response. It needs to be highlighted that the effect could be amplified by combining GFs. However, as our understanding of the bone forming process evolves, it is necessary to establish the optimal *in vivo* GFs release kinetics, not only with respect to local concentrations but also to the duration of action of GFs in the damaged tissue. Herein, we suggest a formulation which may be useful to achieve physiologically relevant PDGF/VEGF profiles for bone 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 Motiva Project of ACIISI and thanks FUNCIS for continuous support.

References

- [1] M. Nilsson, E. Fernandez, S. Sarda, L. Lidgren, J.A. Planell, Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement, *J. Biomed. Mater. Res.* 61 (2002) 600–607.
- [2] F.A. Schilling, W. Linhart, S. Filke, M. Gebauer, T. Schinke, J.M. Rueger, M. Amling, Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts, *Biomaterials* 25 (2004) 3963–3972.
- [3] A. Stavropoulos, L. Kostopoulos, J.R. Nyengaard, T. Karting, 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.* 31 (2004) 30–39.
- [4] I.H. Lieberman, D. Togawa, M.M. Kayanja, Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials, *Spine J.* 5 (2005) 305S–316S.
- [5] L.C. Chow, M. Markovic, S.A. Takagi, Dual constant–composition titration system as an *in vitro* resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res.* 65B (2003) 245–251.
- [6] P. Trisi, W. Rao, A. Rebaudi, P. Fiore, Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects, *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* 23 (2003) 69–77.
- [7] C.P. Klein, K. de Groot, A.A. Driessen, H.B. van der Lubbe, Interaction of biodegradable beta-whitlockite ceramics with bone tissue: an *in vivo* study, *Biomaterials* 6 (1985) 189–192.
- [8] P. Frayssinet, L. Ginebra, P. Conte, J. Fages, N. Rouquet, Short-term implantation effects of DCPD-based calcium phosphate cement, *Biomaterials* 19 (1998) 971–977.
- [9] B.R. Constantz, B.M. Barr, I.C. Ison, M.T. Fulmer, J. Baker, L. McKinney, S.B. Goodman, S. Gunasekaran, D.C. Delaney, J. Ross, R.D. Poser, Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites, *J. Biomed. Mater. Res.* 43 (1998) 451–461.
- [10] M.P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review, *J. Control. Release* 113 (2006) 102–110.
- [11] Ge Liang, Yunzhi Yang, Sunho Oh, Joo L. Ong, Changqiong Zheng, Junguo Ran, Guangfu Yin, Dali Zhou, Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous β -tricalcium phosphate in mice, *Biomaterials* 26 (2005) 4265–4271.
- [12] Sang-Soo Kim, So-Jung Gwak, Byung-Soo Kim, Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2, *J. Biomed. Mater. Res.* 87A (2008) 245–253.
- [13] Sinae Kim, Sang-Soo Kim, Soo-Hong Lee, Seong Eun Ahn, So-Jung Gwak, Joon-Ho Song, Byung-Soo Kim, Hyung-Min Chung, *In vivo* bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds, *Biomaterials* 29 (2008) 1043–1053.
- [14] E.J. Blom, J. Klein-Nulend, L. Yin, M.A.J. van Waas, E.H. Burger, Transforming growth factor- β 1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteoconductivity in rat calvarial bone defects, *Clin. Oral Impl. Res.* 12 (2001) 609–616.
- [15] D.P. Link, J. van den Dolder, J.J. van den Beucken, J.G. Wolke, A.G. Mikos, J.A. Jansen, Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF- β 1 loaded gelatin microparticles, *Biomaterials* 29 (2008) 675–682.
- [16] J.W. Cooke, D.P. Sarment, L.A. Whitesman, S.E. Miller, Q. Jin, S.E. Lynch, W.V. Giannobile, Effect of rhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair, *Tissue Eng.* 12 (2006) 1441–1450.
- [17] M. Bohner, J. Lemaître, P. van Landuyt, P.Y. Zambelli, H.P. Merkle, B. Gander, Gentamicin-loaded calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 565–572.
- [18] M. Bohner, J. Lemaître, H.P. Merkle, B. Gander, Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid), *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 1262–1270.
- [19] F. Tamimi, J. Torres, R. Bettini, F. Ruggera, C. Rueda, M. López-Ponce, E. Lopez-Cabarcos, Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases, *J. Biomed. Mater. Res.* 85A (2008) 707–714.
- [20] M.P. Hofmann, A.R. Mohammed, Y. Perrie, U. Gbureck, J.E. Barralet, High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities, *Acta Biomater.* 5 (2009) 43–49.
- [21] D. Le Nihouannen, S.A. Hacking, U. Gbureck, S.V. Komarova, J.E. Barralet, The use of RANKL-coated brushite cement to stimulate bone remodeling, *Biomaterials* 29 (2008) 3253–3259.
- [22] Y.C. Huang, D. Kaigler, K.G. Rice, P.H. Krebsbach, D.J. Mooney, Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration, *J. Bone Miner. Res.* 20 (2005) 848–857.
- [23] A.B. Ennett, D. Kaigler, D.J. Mooney, Temporally regulated delivery of VEGF *in vitro* and *in vivo*, *J. Biomed. Mater. Res.* 79A (2006) 176–184.
- [24] S.D. Patil, F. Papadimitrakopoulos, D.J. Burgess, Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis, *J. Control. Release* 117 (2007) 68–79.
- [25] R.R. Chen, E.A. Silva, W.W. Yuen, D.J. Mooney, Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation, *Pharm. Res.* 24 (2007) 258–264.
- [26] X. Hao, E.A. Silva, A. Månsson-Broberg, K.H. Grinnemo, A.J. Siddiqui, G. Dellgren, E. Wärde, L.A. Brodin, D.J. Mooney, C. Sylvén, Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction, *Cardiovasc. Res.* 75 (2007) 178–185.
- [27] H.P. Gerber, N. Ferrara, Angiogenesis and bone growth, *Trends Cardiovasc. Med.* 10 (2000) 223–228.
- [28] N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 581–611.
- [29] J.O. Hollinger, C.E. Hart, S.N. Hirsch, S. Lynch, G.E. Friedlaender, Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications, *J. Bone Joint Surg. Am.* 90 (2008) 48–54.
- [30] F. Tamimi Mariño, J. Torres, I. Tresguerres, L. Blanco Jerez, E. López Cabarcos, Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid, *J. Biomed. Mater. Res.* 81A (2007) 93–102.
- [31] B. De la Riva, C. Nowak, E. Sánchez, A. Hernández, M. Schulz-Siegmund, M.K. Pec, A. Delgado, C. Évora, VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 50–58.
- [32] M. Baro, E. Sánchez, A. Delgado, A. Perera, C. Évora, *In vitro–in vivo* characterization of gentamicin bone implants, *J. Control. Release* 83 (2002) 353–364.
- [33] R. Dimitriou, E. Tsiroidis, P.V. Giannoudis, Current concepts of molecular aspects of bone healing injury, *Int. J. Care Inj.* 36 (2005) 1392–1404.

- [34] G. Cama, F. Barberis, R. Botter, P. Cirillo, M. Capurro, R. Quarto, S. Scaglione, E. Finocchio, V. Mussi, U. Valbusa, Preparation and properties of macroporous brushite bone cements, *Acta Biomater* (2009), doi:10.1016/j.actbio.2009.02.012.
- [35] T. Pufe, B. Wildemann, W. Petersen, R. Mentlein, M. Raschke, G. Schmidmaier, 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.* 309 (2002) 387–392.
- [36] S. Uchida, A. Sakai, H. Kudo, H. Otomo, M. Watanuki, M. Tanaka, M. Nagashima, T. Nakamura, 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* 32 (2003) 491–501.
- [37] D.H.R. Kempen, L. Lu, A. Heijink, T.E. Hefferan, L.B. Creemers, A. Maran, M.J. Yaszemski, W.J.A. Dhert, Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration, *Biomaterials* 30 (2009) 2816–2825.
- [38] R.R. Chen, D.J. Mooney, Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1103–1112.
- [39] J.S. Boo, Y. Yamada, Y. Okazaki, Y. Hibino, K. Okada, K. Hata, T. Yoshikawa, Y. Sugiura, M. Ueda, Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold, *J. Craniofac. Surg.* 132 (2002) 231–239.
- [40] S. Herron, D.B. Thordarson, H. Winet, A. Luk, J.Y. Bao, Ingrowth of bone into absorbable bone cement: an in vivo microscopic evaluation, *Am. J. Orthop.* 12 (2003) 581–584.
- [41] F.M. Tamimi, J. Torres, I. Tresguerres, C. Clemente, E. López-Cabarcos, L.J. Blanco, Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulate, *J. Clin. Periodontol.* 33 (2006) 922–928.



De izquierda a derecha, de arriba a abajo: Beatriz de la Riva, Araceli Delgado, Antonio Hernández Lecuona, M^a Isabel Soriano, Konny Flamig, David Rentería, Arístides de León, Martina K.Pec, Esther Sánchez, Manuel Baro, Julia Pérez-Godiño, Ricardo Reyes, María Rodríguez, Javier González, Carmen M^a Évora y Mónica Jarabo.