



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS EN IMPLANTES ÓSEOS.**

Autor: Verónica Rodríguez López

D.N.I.: 47309445D

Tutor: Paloma M. de la Torre Iglesias

Convocatoria: Julio 2019

INDICE

- 1- Resumen.

- 2- Introducción y Antecedentes.
 - 2.1- Anatomía básica, estructura y composición del hueso.
 - 2.2- Enfermedades óseas: osteoporosis, osteomalacia, enfermedad de Paget, fracturas óseas.
 - 2.3- Ingeniería del tejido óseo (Bone tissue engineering (BTE)).

- 3- Objetivos.

- 4- Metodología.

- 5- Resultados y Discusión.
 - 5.1- Scaffolds (Andamios).
 - 5.2- Técnicas para la construcción de los scaffolds.
 - 5.3- Materiales utilizados en los scaffolds.
 - 5.4- Hidrogeles.
 - 5.5- Hidrogeles: sistemas de liberación de factores de crecimiento.

- 6- Conclusiones.

- 7- Bibliografía.

1- **Resumen.**

El tejido óseo puede presentar un desequilibrio entre su formación y su destrucción o exclusivamente en su formación, surgiendo enfermedades como la osteoporosis, la enfermedad de Paget y la osteomalacia; y como resultado de éstas, pueden tener lugar las fracturas patológicas. Debido a la aparición de estas enfermedades, se desarrollaron los injertos autólogos, pero dadas sus limitaciones se ha apostado por considerar la ingeniería de tejidos como una potencial estrategia en la restauración de tejidos óseos, mediante el uso de células, materiales y factores de crecimiento. La base de este campo se cimenta en los scaffolds (andamios), elementos que deben tener unas propiedades estructurales, mecánicas y biológicas bien definidas. Para conseguir su creación, se llevan empleando numerosas técnicas y actualmente está en auge la impresión 3D. Los materiales empleados en la fabricación de los andamios pueden ser orgánicos e inorgánicos, procurando mimetizar al hueso que sustituyen. Un tipo especial de andamio polimérico son los hidrogeles y en ellos se pueden incluir factores de crecimiento y ciertos fármacos, de los cuales se consigue una liberación controlada.

Abstract.

Bone tissue may present an imbalance between its formation and its destruction or exclusively in its formation, producing diseases such as osteoporosis, Paget's disease and osteomalacia; and as a result of them, pathological fractures could occur. Due to the appearance of these diseases, autologous grafts were developed, but as they have limitations, it has opted to consider Bone Tissue Engineering as a potential strategy in the restoration of bone tissues, through the use of cells, materials and growth factors. The basis of this field is based on scaffolds, elements that must have well-defined structural, mechanical and biological properties. In order to achieve their creation, numerous techniques are being used and currently 3D printing is booming. The materials which are used in the manufacture of the scaffolds can be organic and inorganic; and they try to mimic the replaced bone. Hydrogels are a special type of polymeric scaffold and they can include growth factors and certain drugs, from which a controlled release is achieved.

2- **Introducción y antecedentes.**

2.1- Anatomía básica, estructura y composición del hueso.

Anatomía básica y estructura del hueso.

Los huesos y el cartílago forman conjuntamente el aparato óseo. Dentro de los huesos largos podemos diferenciar los extremos: “epífisis”, la parte central: “diáfisis” y la zona dispuesta entre los 2: “metáfisis”. El interior está compuesto por la cavidad medular, con médula ósea. El “periostio” es un elemento formado por tejido conjuntivo constituido por 2 capas: una externa rica en fibro-colágeno y pobre en actividad y otra interna rica en osteoblastos y muy activa. Dado su papel osteogénico, interviene en la formación en anchura de los huesos y tiene un papel en la consolidación de las fracturas (1).

En el hueso existe una zona dura superficial denominada cortical que tiene función mecánica, y otra más interna con función metabólica llamada esponjosa/trabecular. La unidad funcional del hueso cortical es la “osteona” y sobre las láminas de las osteonas se depositan los osteocitos. El hueso cortical supone el 80% del esqueleto adulto, y el porcentaje restante corresponde al hueso esponjoso, teniendo este último menor densidad,

pero más porosidad, y posee trabéculas óseas dispuestas como una red 3D y entrecruzadas, y en los huecos que quedan se encuentra médula ósea y grasa. (1)

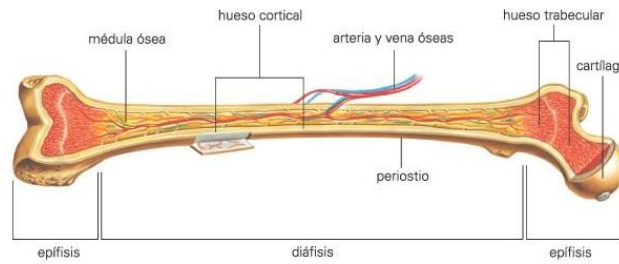


Figura 1- Esquema de hueso (2).

Composición del hueso.

El tejido óseo consta de los elementos celulares y la matriz ósea. Dentro de los elementos celulares se distinguen tres tipos: osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Los osteoblastos son células formadoras de hueso que se crean a partir de una célula madre mesenquimal, proceso mediado por factores de crecimiento; los osteoclastos son células destructoras del hueso que derivan de precursores hematopoyéticos y que se sitúan a lo largo del tejido óseo a destruir (posteriormente se forman las cavidades de resorción); los osteocitos son células maduras del tejido óseo que derivan de los osteoblastos. La destrucción del tejido óseo (resorción ósea), en principio está en equilibrio con la formación ósea, procesos modulados por factores reguladores locales y moléculas de transmisión de señales circulantes (hormona paratiroidea, vitamina D3 y calcio) (3).

El componente proteico más importante del hueso es el colágeno tipo I, que le aporta resistencia a la tracción. Dentro de las proteínas no colágenas destacamos la osteocalcina y los “factores de crecimiento”, siendo estos últimos principales reguladores del metabolismo de las células óseas, que actúan como diferenciadores celulares. En cuanto a la BMP (Proteína Morfogénica Ósea), ésta es conocida por ejercer acción sobre la formación ósea, la consolidación y la curación de las fracturas. Dentro de los factores de crecimiento, destacar que algunos estimulan la formación ósea (BMP 2, 4, 6, 7; IGF-I y II; TGF- β ; FGF; PDGF; VEGF) y otros estimulan la resorción ósea (TNF, EGF, PDGF, FGF, M-CSF, GM-CSF). Los osteoblastos responden a TGF I y II, FGF, PDGF, IGF I y II; mientras que los osteoclastos responden a TNF, IFN- α y GM-CSF. (3)

Además, la mayor parte del componente mineral es muy parecido al mineral natural hidroxiapatita, formado por fosfato tricálcico, carbonato cálcico e impurezas. La unión del colágeno con la hidroxiapatita proporciona al hueso unas buenas propiedades mecánicas. (1)

2.2- Enfermedades óseas: osteoporosis, osteomalacia, enfermedad de Paget, fracturas óseas.

La enfermedad ósea es más frecuente en pacientes adultos mayores que en jóvenes. (4) La osteoporosis, trastorno esquelético sistémico y progresivo, se desencadena cuando el equilibrio entre la formación de hueso y la resorción ósea se declina hacia la resorción, teniendo lugar en las trabéculas, que adelgazan y pueden desaparecer. Tiene como consecuencia la fragilidad ósea y la posible fractura (fractura de cadera, de muñeca o colapso vertebral) (5).

En la osteomalacia la sustancia osteoide no llega a mineralizarse en su totalidad y se acumula. Generalmente está causada por un déficit de vitamina D3. El hueso se vuelve blando y surgen deformidades esqueléticas y dolor óseo. (5)

La enfermedad de Paget se manifiesta por un aumento de la resorción ósea seguido de un aumento de la formación ósea, sintetizándose sustancia osteoide de forma tan rápida que las fibras de colágeno se disponen irregularmente, y el hueso es más susceptible a la fractura. (5)

Las fracturas óseas de origen traumático suelen ocurrir en la infancia y en la vejez (6). Las fracturas patológicas no están relacionadas con traumatismos, sino que se producen en huesos con alteración previa. Se suelen presentar secundarias a osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. Las enfermedades que ocasionan un aumento o disminución de la densidad ósea (metástasis u osteoporosis) tienden a debilitar la estructura del hueso y por tanto pueden ocasionar fracturas patológicas (7).

2.3- Ingeniería del tejido óseo (Bone tissue engineering (BTE)).

El tratamiento de referencia para la reparación ósea es el autoinjerto, pero este método presenta numerosas restricciones como la limitada donación ósea, la posible morbilidad del sitio de donde se obtiene el injerto, la posible necesidad de una segunda cirugía y las altas tasas de fallo. Diversas estrategias novedosas han incluido la combinación de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa para reparar y reconstruir defectos óseos.

La ingeniería de tejidos (IT) tiene como objetivo restaurar determinados tejidos mediante el uso conjunto de células, materiales y factores bioactivos/factores de crecimiento (la “triada de la ingeniería de tejidos”), consiguiéndose así una reparación y mejora de la estructura y la función de dicho tejido en cuestión (8). La creación de tejido que mimetice al hueso tanto en estructura como en función ha constituido todo un reto. La estructura creada deberá mimetizar la base y las propiedades de la matriz extracelular del hueso (ECM), proporcionar el ambiente necesario para la formación de nuevo tejido o hueso y degradarse cuando el hueso nuevo se genere (9).

Dentro de las células que se suelen utilizar en la IT, destacaremos las células madre somáticas. Dichas células o bien se utilizan de manera aislada para reemplazar tejidos perdidos, degenerados o lesionados, obteniéndose por expansión *ex vivo* antes del trasplante; o bien se emplean de manera combinada con materiales que actúan como matriz, en una especie de “scaffolds” (andamios) para asemejarse a un órgano o tejido; o bien se utilizan materiales acelulares con capacidad de inducir la autorregeneración del tejido a través de la liberación de factores bioactivos. Los tratamientos con células madre buscan potenciar la reparación tisular y tratar las enfermedades degenerativas (8).

Dichas células son capaces de crecer en un soporte y por eso se crea una estructura que simula un tejido y posteriormente se implanta. Los materiales pueden ser naturales o sintéticos y son generalmente biomiméticos (capaces de imitar el ambiente fisiológico de las células madre para crear nichos favorables con el fin de que proliferen). Entre los materiales naturales destacamos a la hidroxiapatita, el carbonato cálcico, el alginato y las proteínas de la matriz extracelular purificadas (colágeno, fibronectina y laminina), siendo muy importantes estas últimas dado que cumplen una función destacada dentro de la organización tridimensional del tejido y tienen factores de crecimiento locales que quedan dispuestos en la matriz, promoviéndose así la infiltración y proliferación de células y su

diferenciación. Estos materiales favorecen la adherencia a las células, pero tienen mayor tasa de degradación y las propiedades mecánicas y la porosidad de la matriz creada son más difícilmente controladas frente a los materiales sintéticos. Entre los materiales sintéticos destacamos los hidrogeles de polímeros de colágeno, ácido láctico, ácido glicólico, ácido poliláctico-glicólico, y polietilenglicol (8).

El tercer elemento integrante, los factores bioactivos/factores de crecimiento son elementos capaces de inducir el desarrollo y la diferenciación celular dentro del tejido artificial (como lo haría la ECM en los tejidos nativos), mediante señalizaciones intracelulares que inhiben o inducen funciones celulares específicas. Estos factores se secretan de forma endógena por las células o son resultado de señales paracrinas con células vecinas. Los factores de crecimiento que podemos destacar son: ácido ascórbico, ácido retinoico, dexametasona, factores de crecimiento de fibroblastos, proteínas morfogénicas óseas y factores de crecimiento transformantes. Muchos sistemas de liberación de fármacos son diseñados basados en la liberación de un solo factor de crecimiento con propiedades de liberación controladas, pero se ha visto que usando la liberación de múltiples factores de crecimiento de una manera espaciotemporal se podría mimetizar en gran parte el proceso de curación del hueso (10).

Los sistemas formados pueden ser abiertos o cerrados: en el sistema abierto, las células se anclan en la matriz correspondiente y el sistema se implanta e integra en el cuerpo, pero se presenta como problema la respuesta inmunitaria del paciente frente a las células; en el sistema cerrado, las células se mantienen en la matriz gracias al uso de polímeros que las mantienen dentro e impiden su contacto directo con las células del sistema inmunitario, pero los nutrientes y los residuos sí pasan (10).

La ingeniería de tejidos presenta como limitaciones en el campo de la biología, la biocompatibilidad de materiales y la respuesta inmunitaria del huésped frente a antígenos de las células implantadas; y en el campo de la ingeniería, el control de las propiedades de los polímeros a largo plazo, el tamaño de poro de los andamios, etc (8).

3- **Objetivos.**

Se ha tenido como finalidad conocer el potencial de la ingeniería de tejidos para conseguir la regeneración ósea, adentrándose en su base: los andamios, detallando para ello las técnicas de fabricación y los materiales que los componen. Además, se ha buscado describir los hidrogeles, un novedoso sistema de liberación de fármacos, en el caso de este trabajo, sistema de liberación de BMP-2.

4- **Metodología.**

En este trabajo de fin de grado se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica utilizando bases de datos como PubMed, ScienceDirect, Google Scholar y diversos libros electrónicos (gracias al acceso que brinda la Universidad Complutense de Madrid mediante su biblioteca virtual). Se han usado palabras clave en español y en inglés tales como: osteoporosis, osteomalacia, bone fractures, bone tissue engineering, scaffolds, hidrogels, drug delivery, BMP-2. Se seleccionaron artículos de los últimos 5 años y en concreto aquellos clasificados como “review”.

5- Resultados y discusión.

5.1- Scaffolds (Andamios).

Un scaffold (andamio) es una estructura artificial utilizada para soportar la formación de tejido tridimensional. Los andamios pueden ser utilizados como sistemas que llevan o no células (o combinación de diferentes tipos de ellas) y/o fármacos. (12)

El injerto óseo artificial se basa en la utilización de biomateriales para fabricar andamios óseos, de células madre y de técnicas específicas para su fabricación, con el objetivo de crear un andamio óseo artificial que consiga, tras su implantación en el lugar del defecto óseo, la regeneración ósea. El andamio ideal para la regeneración de tejido óseo debe tener dentro de las propiedades estructurales: una gran porosidad (más del 90%), un tamaño de poro entre 10 nm y 500 μm y una gran interconexión entre sus poros para la supervivencia celular y el crecimiento de tejido óseo; dentro de las propiedades mecánicas: una fuerza de 100-200 MPa, una dureza de 2-12 MPam^{1/2} y un módulo de 15-20 GPa, todo ello para proporcionar soporte estructural; y dentro de las propiedades biológicas debe tener una buena biocompatibilidad (así es capaz de aportar un microambiente adecuado para la adhesión, proliferación y diferenciación funcional de las células), una biodegradabilidad controlable (la tasa de degradación debe coincidir con la tasa de formación de tejido nuevo) y una osteoconducción suficiente (así se conseguirá una unión ósea con suficiente fuerza), todo ello para garantizar la seguridad en el cuerpo (13).

5.2- Técnicas para la construcción de los scaffolds.

Numerosas técnicas se han utilizado para la fabricación de los andamiajes, en algunas ocasiones solas y en otras en combinación. A continuación, se describe brevemente cada método (14) indicando sus beneficios y limitaciones (15):

- 1) Gel casting: El polímero se disuelve en un solvente orgánico. Los porógenos (como el cloruro sódico o la gelatina), son incluidos en la solución polimérica y el polímero se curte cuando el solvente se evapora. Se crea un andamio polimérico con una red porosa. Presenta como ventaja que los scaffolds obtenidos tienen porosidad regular y tamaño de poro y composición controladas; y como limitaciones el uso de solventes orgánicos no permite que células y biomoléculas sean incluidas en los scaffolds, la dificultad para controlar la forma de poro y la interconectividad y el espesor limitado de los andamios.

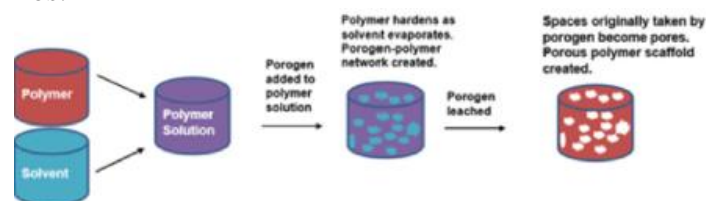


Figura 2- Gel casting- Pasos (15).

- 2) Espuma de gas: Se mezcla el sustrato, un agente espumante y un aglutinante en una consistencia gelatinosa/amorfa. La mezcla se moldea con la forma deseada para el andamio y se deja solidificar parcialmente. Se incluye en una solución que reacciona con el espumante, creando burbujas de gas que erosionan y originan poros. Presenta como beneficio la eliminación del uso de solventes químicos y como limitaciones el

impedimento de incluir células y moléculas bioactivas en los andamios porque se usan altas presiones, los materiales termolábiles se pueden desnaturalizar tras el moldeo por compresión y la dificultad para controlar el tamaño de poro y asegurar la interconectividad.

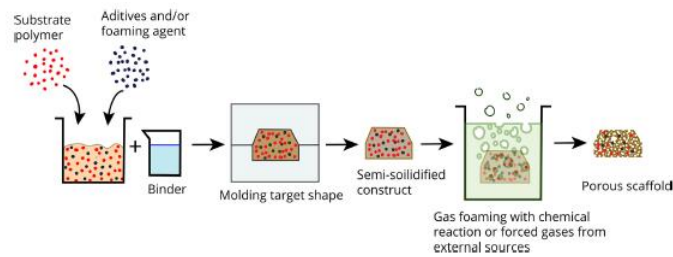


Figura 3- Espuma de gas- Pasos (14).

- 3) **Gelificación criotrópica:** Una solución polimérica suspendida en agua es vertida en la forma deseada del andamio y refrigerada de manera controlada para inducir que se separen las fases entre el solvente y la solución precursora. Los cristales de agua que están dentro del cuerpo del gel polimerizado se descongelan y se crea la estructura porosa. Presenta como potenciales ventajas que no requiere el uso de porógenos sólidos y que se puede combinar con otras técnicas y como limitaciones que requiere el uso de solventes orgánicos, impidiendo el uso de moléculas bioactivas o células durante la fabricación del andamio, el pequeño tamaño de poro y porosidad a menudo irregular y el gran empleo de tiempo para el procesamiento.

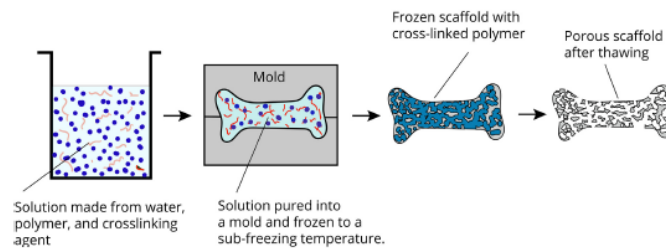


Figura 4- Gelificación criotrópica- Pasos (14).

- 4) **Electrospinning (electrohilado):** Se conecta la fuente del material (hilera) y la plataforma del colector de fibra a los terminales de potencial eléctrico opuestos. La diferencia de potencial produce la reducción del diámetro original del material y lo deposita en el suelo del colector. El polímero se hila en un compartimento presurizado. Como consecuencia, el material líquido se exprime en forma de gota y se expone al campo electrostático entre la hilera y el colector. El campo electrostático actúa sobre las partículas de material cargado en la capa exterior de la gota, acercándolas a un punto más cerca de la placa colector (formación del cono de Taylor). Esta acumulación de material se convierte en una espiga que apunta hacia el suelo del colector. A medida que el material se acelera hacia el colector, se obtiene una mayor reducción del diámetro. Se obtendrán fibras a nivel de nano/microescala. Tiene como beneficios que se crea un andamio con una gran superficie para la adhesión celular y que es una técnica simple y barata; y como limitaciones que se requieren solventes orgánicos, algunos perjudiciales para las células, las propiedades mecánicas son limitadas y existe dificultad para incorporar microarquitectura precisa en los andamios.

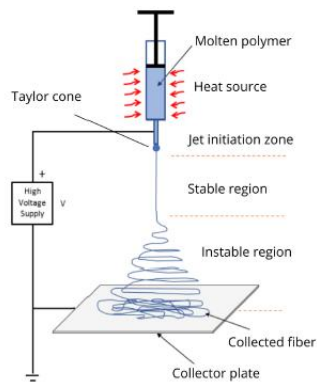


Figura 5- Electrospinning- Pasos (14).

5) **Impresión 3D:** Los andamios se obtienen a través de una impresora de inyección de tinta con tinta de polímero. Se fabrican piezas utilizando una variedad de materiales (cerámicas, metales y polímeros con diversas geometrías). La impresión 3D presenta como ventajas la obtención de formas 3D con alta resolución, complejas, con tamaño y morfología de poro controladas y estructuras internas controladas, mejorando la capacidad para incorporar estructuras vasculares en los andamios; dependiendo de la técnica utilizada, las células pueden ser incluidas en altas concentraciones directamente en los andamios. Muestran como limitaciones que algunas técnicas están limitadas por los materiales imprimibles y que el coste de instalación puede ser elevado. Dentro de los métodos de bioimpresión más destacados se tienen (16):

- **SLA (Stereolithography; Estereolitografía):** Se trata de una de las primeras técnicas de impresión 3D utilizada en ingeniería de tejidos. Algunos de los materiales que se pueden utilizar son PCL (policaprolactona), PLA (ácido poliláctico), PPF (polipropileno fumarato). Permite la obtención de estructuras a nivel micro y nanométrico y se pueden crear scaffolds con alta resolución y geometrías adecuadas. Sin embargo, es difícil conseguir scaffolds de tamaño micrométrico debido a las restricciones en el espesor de la capa y sobrecurado, que puede ocasionar que la resina polimerice parcialmente en las capas inferiores; solamente un número limitado de materiales pueden ser utilizados en esta técnica debido a restricciones en viscosidad, estabilidad e índice de refracción; y también cuando se trabaja con células encapsuladas pueden tener lugar efectos citotóxicos al usar la luz ultravioleta.
- **SLS (Selective Laser Sintering; Sinterización selectiva por láser):** Es una técnica que utiliza un láser para sinterizar el polvo, uniéndose el material para obtener una estructura sólida. Se pueden utilizar materiales metálicos o poliméricos para crear scaffolds, con aplicación en huesos con o sin carga respectivamente. La principal desventaja del uso de esta técnica es el empleo de altas temperaturas, ya que limita la inclusión de células y biomateriales durante el proceso. Además, el tamaño de poro se basa en la capacidad de esparcimiento del polvo, que viene determinado por el tamaño de partícula.
- **FDM (Fused Deposition Modeling; Modelado por deposición fundida):** Consiste en la extrusión de pequeñas perlas o de filamentos de polímero en forma de termoplástico fundido de una boquilla pequeña, y posteriormente se endurece tras la impresión, para obtener una estructura sólida. Con esta técnica se pueden tener

scaffolds con tamaño de poro, morfología e interconectividad adecuadas, además de correctas propiedades mecánicas y bioquímicas. Mediante este método, se obtienen estructuras 3D de gran complejidad, superando a otros métodos. Los materiales adecuados a emplear son PCL, PLA y PLGA junto a biomateriales como vidrio bioactivo. Como limitaciones, se tiene que esta técnica solo genera scaffolds con una forma limitada y estructuras regulares, dada la viscosidad de los polímeros que se funden; además el uso de altas temperaturas limita el uso de células u otros agentes.

- Inkjet-based bioprinting (Bioimpresión a base de inyección de tinta): Se utilizan fuerzas térmicas o piezoeléctricas para expulsar gotas de biotinta desde una boquilla de cabezal de impresión a un sustrato de hidrogel o placa de cultivo. Es una técnica de alto rendimiento, bajo coste y muestra buena inclusión y compatibilidad con biomateriales con baja viscosidad. Sin embargo, en el modo térmico, las gotas tienen un tamaño no uniforme, la boquilla frecuentemente se obstruye y es complicado que la impresión sea suave, y la viabilidad celular puede verse perjudicada al usar alta temperatura; en el modo piezoeléctrico, la obstrucción de la boquilla es menor, teniendo gotas de tamaño y forma más regulares, pero se puede ocasionar el daño en la membrana celular y la lisis celular al utilizar dichas fuerzas.
- Laser-assisted bioprinting (Bioimpresión asistida por láser): Se trata de una técnica que utiliza un rayo láser pulsado para originar una perturbación de la presión, transfiriéndose los materiales que contienen células de una cinta de material de impresión inicial a un sustrato receptor. Sus ventajas son la compatibilidad con biomateriales con distintas viscosidades y la alta resolución. Presenta como inconvenientes el alto coste, la alta complejidad, la baja velocidad, el daño a las células originado por el calor, los rayos UV y la toxicidad de fotoiniciadores.
- Extrusion-based bioprinting (Bioimpresión a base de extrusión): En esta técnica se aplica presión a una jeringa que contiene una tinta para provocar la extrusión de la biotinta a través de una microboquilla. En ella se tiene una gran compatibilidad con numerosos materiales; la velocidad de impresión que se obtiene es rápida; se pueden incorporar células y agentes bioactivos sin problema porque no interviene el calentamiento; y, además, las biotintas que se tienen disponibles para esta técnica son numerosas. Es una técnica muy utilizada para la fabricación de hidrogeles. Presenta como desventajas la resolución limitada y los posibles efectos de la tensión de corte en las células.

5.3- Materiales utilizados en los scaffolds.

Los andamios creados deben tener la capacidad de mimetizar al hueso que sustituyen, y debido a que éste se compone tanto de componentes orgánicos como de componentes inorgánicos, los materiales constituyentes de estos scaffolds pueden ser orgánicos y/o inorgánicos. Existe una gran diversidad de materiales que pueden formar los andamios y su eficacia se basa en tres conceptos: osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. La osteoconducción es la capacidad del injerto óseo para actuar como plantilla para la adherencia, el crecimiento y la diferenciación de las células necesarias para la formación

ósea; la osteoinducción es el proceso que estimula la diferenciación de las células madre mesenquimales del tejido circundante a células madre osteoprogenitoras que dan como resultado la formación de osteoblastos; la osteogénesis es la capacidad para formar hueso nuevo, mediante las células osteoprogenitoras en el microambiente (17).

A continuación, se describirán cada uno de ellos, incluyendo para cada uno, ejemplos de grupos de investigación que los han utilizado:

- 1) **Metales** (cobalto-cromo, titanio y acero inoxidable): generalmente tienen una buena biocompatibilidad y fuerza, pero mala biodegradabilidad (menos adecuados para BTE. Normalmente se requiere cirugía adicional para quitar los implantes metálicos). Chen et al (18) crearon unos andamios con titanio con una precisa macro y microporosidad que logró la adhesión y el crecimiento de las células madre mesenquimales.
- 2) **Biocerámicas**: cuentan con gran fuerza mecánica y una buena bioactividad. La degradación celular *in vivo* produce iones calcio y fosfato, promoviendo la formación de hueso nuevo.
 - a) **Hidroxiapatita**: es un componente inorgánico biocompatible, osteoconductor y con capacidad de unión ósea, además de presentar una degradación controlada y una ausencia de citotoxicidad. La apatita puede formar enlaces químicos directos con el tejido óseo del huésped. Estimula la expresión endógena de factores de crecimiento osteogénicos (BMP) y fosfatasa alcalina. Es frágil y su tasa de degradación *in vivo* puede ocasionar fallo mecánico (19). Calabrese et al (20) crearon scaffolds de colágeno e hidroxiapatita en los cuales sembraron células madre mesenquimales humanas procedentes del tejido adiposo. Estos eran aptos para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales a osteocitos incluso en aquellos casos en los que no se contaba con la presencia de factores inductores de la formación ósea.
 - b) **Fosfato tricálcico**: presenta similitud en estructura y composición química con el hueso, mostrando buena biocompatibilidad, osteoconductividad y biodegradabilidad. Mejora la adhesión celular, acelera la capacidad de diferenciación y proliferación. A diferencia de la hidroxiapatita, el fosfato tricálcico presenta una tasa de degradación más rápida y puede ser reemplazado por tejidos óseos formados recientemente (19). Murakami et al (21) crearon andamios cuya composición constaba de colágeno y β -fosfato tricálcico. Comprobaron que la presencia de dosis elevadas de β -fosfato tricálcico provocaba una mayor rigidez mecánica, una mayor liberación de calcio y una mejor vascularización de la zona. Sin embargo, se dieron cuenta que la dosis era importante, dado que dosis muy altas de dichos iones podría ocasionar una nula proliferación celular y restringir la formación de hueso, situando la dosis óptima de β -fosfato tricálcico entre el 5-10%.
- 3) **Vidrios bioactivos**: tras su implantación y posterior disolución, se forma una capa de hidroxiapatita en la zona superficial del material, interacciona con las fibras de colágeno en el hueso y consecuentemente crea un enlace fuerte. Presentan como potencial su bioactividad y osteoconductividad pero como inconveniente su fragilidad. Vallet-Regi et al (22) remarcaron el potencial de éstos, puesto que muchos fármacos pueden incluirse en estructuras de vidrios bioactivos mesoporosos consiguiendo una liberación adecuada.

- 4) Polímeros naturales: tienen como gran ventaja el reconocimiento biológico que permite la señalización biológica y apoya la adhesión celular, además de su ductilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, pero presentan como inconvenientes la inadecuada resistencia mecánica, el bajo suministro y el alto precio. Se puede adaptar la porosidad, la tasa de degradación y la fuerza mecánica. Los polímeros, cuando se utilizan solos tienen un módulo de elasticidad y capacidad de carga bajas en comparación con los metales y las cerámicas. Ha surgido la combinación de polímeros + biocerámicas, resultando scaffolds compuestos. El uso combinado de porógenos e impresión 3D puede ayudar a una correcta porosidad, así como el uso de impresión 3D y electrohilado. El rendimiento del andamio puede mejorar con la inclusión de factores de crecimiento y ligandos de superficie para realzar la adhesión y la proliferación celular (17).
- a) Colágeno tipo I: es biocompatible, biodegradable y estimula la proliferación y diferenciación celular. Su resistencia mecánica es insuficiente, por lo que se suelen combinar con algunos tipos de biocerámicas, compuestos que se asemejan a la parte inorgánica del hueso natural y así además pueden mejorar la capacidad osteoconductora, la estabilidad dimensional y aumentar el área de superficie para la unión celular en los andamios. (19).
 - b) Seda: es biocompatible, biodegradable, con baja inmunogenicidad e integridad mecánica correcta. McNamara et al (23) crearon scaffolds porosos de hidroxiapatita y seda, consiguiendo con ellos la adhesión de células madre mesenquimales derivadas de medula ósea y la proliferación celular.
 - c) Alginato: se trata de un material biocompatible, con una tasa de biodegradación controlada, pero presenta unas malas propiedades mecánicas y una gran hidrofilia.
 - d) Chitosan: se trata de un material biocompatible, biodegradable y osteoconductor. Wu et al (24) crearon un andamio compuesto por PLA y nanohidroxiapatita y además con microesferas de chitosan, que permitía la liberación de ácido alendrónico (fármaco con propiedades osteoinductivas y antiresortivas). Estos fueron implantados en ratones con defectos óseos. Los scaffolds con un 10% de sus componentes, mostraban adecuadas propiedades mecánicas, una buena degradación, y una buena liberación de fármaco, consiguiendo su liberación continuada durante 30 días. Se comprobó que la proliferación celular era rápida y se presentaba crecimiento de la matriz extracelular, además de un aumento en la actividad del alendrónico y la deposición de calcio. Se curaron los defectos óseos, denotándose crecimiento óseo tras 4-8 semanas.
 - e) Ácido hialurónico: es biodegradable, biocompatible, viscoelástico y contribuye a la proliferación y migración celular (es uno de los componentes de la matriz extracelular). Rajan et al (25) diseñaron scaffolds combinando el óxido de grafeno, el chitosan y el ácido hialurónico. En ellos incluyeron simvastatina, fármaco que promueve la osteogénesis y cuya bioactividad es más elevada en estos scaffolds.
- 5) Polímeros sintéticos: son biodegradables, biocompatibles y no tóxicos.

- a) PLA (ácido poliláctico): Yang et al (26) crearon scaffolds formados por PLA, PCL y óxido de silicio utilizando para ello la impresión 3D como técnica y consiguiendo diversos tamaños en los poros. Estos andamios favorecían la adhesión y proliferación de las células madre mesenquimales.
- b) PCL (policaprolactona): Kim et al (27) construyeron scaffolds formados por PCL y alginato, también con la exitosa técnica de impresión 3D. Utilizaron estos materiales para obtener las propiedades de ambos y que se consiguiese equilibrar, dado que la PCL, a diferencia del alginato, muestra una buena fuerza mecánica y una baja tasa de degradación, pero como inconvenientes una baja adhesión celular. Al compararlos frente a los scaffolds con solo PCL, se vio que a los 7 días la viabilidad de los osteoblastos y a los 14 días la actividad de la fosfatasa alcalina y el depósito de iones calcio, eran mejores.
- c) PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico)): es pobremente tóxico y tiene una cinética de liberación de fármacos sintonizable, liberando proteínas y hormonas relacionadas con el hueso (hormona paratiroidea y BMP-2). Reduce los efectos adversos sistémicos relacionados con drogas antiresortivas (alendronato) a través de la liberación controlada de pequeñas dosis en el sitio de administración, pudiéndose regular mediante el control del cociente de polimerización entre el láctico y el glicólico, y el peso molecular del polímero resultante (28). Quinlan et al (29) crearon un andamio de colágeno junto con hidroxiapatita que incluía microesferas de PLGA. En dichas microesferas se encontraba contenida la BMP-2 en dosis elevadas. Se logró la liberación de dicha BMP-2 de forma sostenida durante 28 días y con ello, se consiguió una buena regeneración ósea.

5.4- Hidrogeles.

Los hidrogeles son un tipo de andamio polimérico, geles formados mediante la constitución de redes tridimensionales de cadenas poliméricas hidrófilas y reticuladas, por lo tanto, están constituidos por los polímeros naturales y sintéticos vistos en el apartado anterior. Estos son capaces de absorber grandes cantidades de agua (un contenido $\geq 90\%$ en peso) y tienen la capacidad de permitir el intercambio de oxígeno y nutrientes. Presentan una gran similitud estructural y compositiva con la matriz extracelular natural.

Son materiales osteoconductivos, facilitan la adhesión celular, la integración matricial y la angiogénesis. Además, son reabsorbibles y han mostrado una gran integración con los tejidos circundantes, evitándose la posterior intervención quirúrgica para su extracción. Estas cadenas poliméricas pueden ser de polímeros naturales (colágeno, ácido hialurónico, gelatina, alginato, chitosan...) o de materiales sintéticos (polietilenglicol, PLA, PLGA...). Para conseguir buenas propiedades biológicas y mecánicas, se han desarrollado combinaciones de hidrogeles naturales y sintéticos.

Con el objetivo de brindar una regeneración ósea de calidad, estos andamios pueden contener factores de crecimiento y ciertos fármacos, quedando atrapados en su interior y liberándose de forma controlada. El perfil de liberación y la tasa de degradación se puede controlar modificando el método y el grado de entrecruzamiento (16).

Los hidrogeles deben presentar una serie de requerimientos para que sean aptos para la regeneración:

- 1) No citotóxicos y no inmunogénicos.
- 2) Osteoinductivos, osteoconductivos, osteogénicos y osteocompatibles.
- 3) Mimetizar la matriz extracelular para conseguir la adhesión celular, la propagación y diferenciación osteogénica en el lugar donde se implante.
- 4) Degradables o hidrolizables por las enzimas endógenas.
- 5) Estables estructuralmente y con fuerza mecánica.
- 6) Con porosidad adecuada (con el objetivo de la interacción celular, el control de la liberación de factores bioactivos y el intercambio nutricional y de oxígeno) (30).

Dentro de las propiedades a modular en los hidrogeles tenemos (31):

- Propiedades mecánicas: cuando la densidad de la red del hidrogel se vuelve demasiado alta, la velocidad de difusión disminuye, por lo que se puede modular incorporando varios nanomateriales (fosfatos de calcio y silicatos). Además, se ha visto que manejando la rigidez y la organización espacial de los hidrogeles se controla el crecimiento dinámico de los tejidos nativos y el progreso de la curación de heridas.
- Porosidad: factor muy importante para facilitar el transporte de nutrientes y oxígeno para la supervivencia celular. Para diseñar microarquitecturas porosas complejas en hidrogeles se utilizan la bioimpresión y la microfluídica. Existe una relación inversamente proporcional entre la porosidad y la rigidez, por lo que aquí se deberá encontrar el equilibrio entre una buena resistencia mecánica y una porosidad adecuada para aportar nutrientes y oxígeno.
- Estabilidad: factor destacado para mantener la función y estructura originales hasta que se consigue la regeneración tisular. Los materiales con un alto grado de encogimiento (colágeno) están muy relacionados con causar un desajuste entre el implante y los tejidos.
- Adhesión celular: es clave para que las células se diseminen, proliferen y se diferencien para generar la arquitectura del tejido. Por ejemplo, los hidrogeles de PEG no modificados son inertes, pueden adsorber una cantidad limitada de proteínas y como muchas células no se pueden unir a ellos y tienen una baja viabilidad, cuando se introducen en estos andamiajes, se han unido péptidos RGD a dichos hidrogeles.
- pH y temperatura: se utilizan para entregar muy eficientemente biomoléculas a una región concreta. Los hidrogeles sensibles al pH pueden hincharse dependiendo de los cambios de pH, pueden entregar biomoléculas selectivamente a los sitios de defectos donde el pH es ácido (isquemia, inflamación).
- Degradación: en cuanto a la degradación física, puede suponer espacio para que las células migren y para que los vasos sanguíneos infiltren, lo que conlleva una buena regeneración tisular; pero la degradación de los hidrogeles también puede actuar como regulador independiente del destino de las células madre. La degradabilidad de los hidrogeles depende de varios factores físicos como las propiedades del material de los hidrogeles (densidad de reticulación, difusividad del líquido...) y las condiciones del microentorno (pH, temperatura...). En cuanto a la degradación química, la velocidad de degradación de los hidrogeles debe ser controlada debido a que se espera que la velocidad de degradación de los tejidos modificados

genéticamente sea igual a la regeneración de los tejidos en el sitio del defecto. Dicha velocidad se puede modular mediante la densidad de reticulación controlada de la red o la degradación enzimática por proteasas (en los hidrogeles se incluyen péptidos sensibles a la enzima y posteriormente ésta los escinde).

El diseño de estos hidrogeles mediante diversas técnicas de fabricación (entre las que destacamos la bioimpresión y la microfluídica) dará lugar a diversas estructuras como son las microperlas, las nanopartículas y las fibras.

- Las microperlas de hidrogel son fabricadas por tecnología de microfluidos no equilibrada, para obtener un tamaño menor de $10\ \mu\text{m}$ dado que con un tamaño pequeño se ha visto que poseen mayor capacidad de transferencia de masa, afectando beneficiosamente a la liberación de fármacos y células a las zonas con defectos óseos.
- Las nanopartículas de hidrogel (nanogeles) se sintetizan a partir de polimerización en emulsión inversa que da lugar a dispersiones estables. Presentan buena biocompatibilidad, correctas propiedades mecánicas y a diferencia de otros compuestos, en relación a su superficie y tamaño, estos nanogeles cuentan con las propiedades de las nanopartículas. Se presentan como potenciales transportadores de fármacos, proteínas y factores de crecimiento, para su posterior liberación ya que tienen una gran capacidad de carga y una buena estabilidad de encapsulamiento. Como desventaja tienen su cinética de liberación, porque se presentan problemas a la hora de ajustar el punto de entrecruzamiento, la estructura no es homogénea y los fármacos se liberan rápidamente.
- Las fibras pueden presentar un diámetro que oscila desde nanómetros hasta micras. Se sintetizan mediante diversos tipos de hilado y tecnología de impresión 3D seguido de entrecruzamiento de las fibras en presencia de calor, luz UV, glutaraldehído o enzimas. Éstas pueden quedar en el lugar del implante durante mucho tiempo. Se considera un producto clave para la formación de fibras de la gelatina, debido a que ésta se une de forma natural al péptido arginina-glicina-aspartato (RGD), teniendo sitios para la unión celular. Presentan como desventajas el alto índice de hinchamiento y la pobre fuerza mecánica. Al tener un gran hinchamiento puede ocasionar que la liberación sea de golpe, por lo que se ha visto que modificando la superficie se puede conseguir disminuir dicho estallido inicial y aumentar el tiempo de liberación (30).

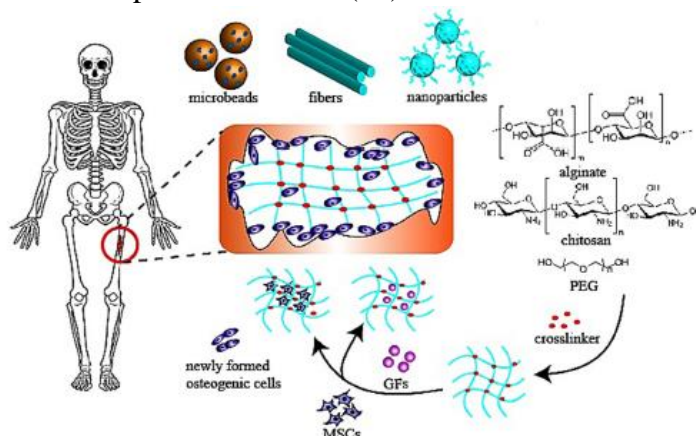


Figura 6- Estructuras posibles de los hidrogeles, su composición e inclusión de factores de crecimiento y células madre mesenquimales (30).

5.5- Hidrogeles: sistemas de liberación de factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son proteínas de señalización nativas secretadas por las células para promover la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Se trata de un componente integral en la promoción de la reparación ósea y la osteogénesis. La curación ósea de origen natural es un proceso que involucra citoquinas, factores de crecimiento y factores proinflamatorios y posteriormente reclutan células osteoprogenitoras circundantes para migrar, proliferar y diferenciarse en osteoblastos. Actualmente son explorados en el área de la regeneración ósea para ser incluidos y que se liberen paulatinamente: BMP, IGF (factores de crecimiento similares a la insulina), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) (30). Dichos factores al ser proteínas pueden sufrir una degradación enzimática en la matriz extracelular y, además, al ser administrados, se pueden extender a otros sitios, lo que conlleva una retención limitada en el sitio local y a efectos adversos no deseados (respuestas inflamatorias o inducción adipogénica). Los hidrogeles suponen un buen medio para mantener la actividad de dichos factores y proporcionar concentraciones efectivas prolongadas en el sitio de tratamiento a una velocidad de liberación controlada; estos como ya se ha mencionado, absorben agua, se hinchan e imitan la matriz extracelular natural y proporcionan un ambiente hidrofílico para mantener la actividad de los factores. (30)

A continuación, se describirán brevemente algunos estudios interesantes en los que han desarrollado hidrogeles como sistemas de liberación de fármacos, en concreto con liberación de BMP-2:

Holloway et al (32) desarrollaron un hidrogel sensible a la metaloproteinasa formado a partir de dominios de péptidos de adhesión celular (RGD) y péptidos sensibles a la metaloproteinasa con el fin de demostrar la influencia de la tasa de degradación del hidrogel y de la liberación de BMP-2 en la formación y organización de nuevos tejidos. Seleccionaron dos formulaciones con distintos perfiles de liberación de BMP-2: 2 o 3% en peso de macrómeros de ácido hialurónico modificados con maleimida (MaHA), 2 mM de RGD, con o sin μg de BMP-2.

In vitro demostraron que influía en la degradación del hidrogel la concentración de colagenasa (metaloproteinasa no específica), la funcionalización de los macrómeros de ácido hialurónico modificados con maleimida y la concentración de dichos macrómeros. Vieron que una mayor densidad de reticulación requería la escisión de un mayor número de reticulaciones para liberar cadenas de ácido hialurónico y degradar completamente el hidrogel, pudiendo controlar la degradación de los hidrogeles implantados y la liberación de la terapia. Al comparar la pérdida de masa de ácido hialurónico modificado con maleimida y la liberación de BMP-2 de las dos formulaciones, cargadas con 100 ng de BMP-2 con y sin colagenasa presente, vieron que hubo una pequeña liberación de BMP-2 en un estallido inicial que coincidió con la degradación del hidrogel, existiendo una liberación sostenida durante 6 y 10 días después de la incubación con la enzima. La similitud entre la degradación del hidrogel y la liberación de BMP-2 indica que la BMP-2 está atrapada adecuadamente dentro de la red inicial y que la liberación se produce a través de la degradación. Esto permitió comprobar que se podía adaptar la liberación del factor de crecimiento a través de la densidad de reticulación del hidrogel.

In vivo, se estudió implantándose estas formulaciones en defectos craneales de rata. Observaron aumentos estadísticamente significativos en la radiopacidad para ambas

formulaciones de hidrogel cargadas con 1 μg de BMP-2 en comparación con los defectos que quedaron vacíos. Además, vieron una gran importancia de los hidrogeles con un 2% en peso de MaHA cargados con BMP-2 en comparación con los hidrogeles sin BMP-2 para el volumen óseo; y al evaluar volumen óseo/volumen total, se observó un aumento para los hidrogeles con un 2% en peso de MaHA cargados con BMP-2 más rápidos y degradantes en comparación con los controles y llenaron mejor el sitio del defecto con hueso en comparación con los más lentos. Se observó un aumento de la invasión celular para los hidrogeles con un 2% en peso de MaHA en comparación con los del 3%. En definitiva, los hidrogeles con un 2% en peso de MaHA se degradan más rápido, permiten una mayor invasión celular y una formación de hueso dentro del volumen del defecto original.

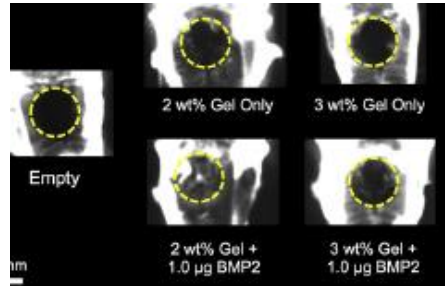


Figura 7- Radiografías con círculos que indican el área del defecto y donde se ven diferencias en radiopacidad entre las distintas formulaciones (32).

Shekaran et al (33) diseñaron un hidrogel de PEG degradable por proteasa y funcionalizado con un péptido específico de la integrina $\alpha 2\beta 1$ de triple hélice (GFOGER), siendo este hidrogel un vehículo de la BMP-2 humana recombinante. Lo hicieron reaccionar con un péptido de reticulación de bi-cisteína, que tenía un sitio de escisión de la enzima y se incluyó BMP-2 mediante atrapamiento físico durante la reticulación de la red. La interacción de dicha integrina con el colágeno I es fundamental para la diferenciación y mineralización osteoblástica, por lo que el residuo que incluyeron, residuo de la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo I, es el principal lugar de reconocimiento para la unión de la integrina con alta afinidad y especificidad. Dichos scaffolds se implantaron en defectos óseos radiales murinos de tamaño crítico.

En relación a la diferenciación osteoblástica en células madre mesenquimales (CMM), mostraron una alta viabilidad a los 3 días de cultivo y un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (en comparación con hidrogeles con RGD). Por lo tanto, promovían la diferenciación osteogénica de las CMM. En cuanto a la reparación ósea, los pacientes con hidrogeles funcionalizados con GFOGER frente a los no tratados con hidrogel y los que habían sido tratados con hidrogel funcionalizado con RGD, mostraron un aumento óseo 140 y 150% frente a ellos a las 8 semanas del implante y además a dicho tiempo ya mostraban varios defectos cerca del puente completo.

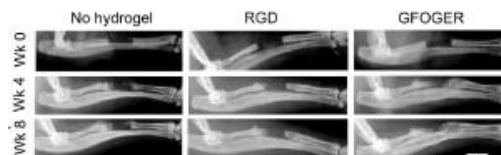


Figura 8- Radiografías de defectos radiales sin tratar con hidrogel, tratados con hidrogel+RGD y tratados con hidrogel+GFOGER (33).

En cuanto a la reparación ósea comparando los pacientes no tratados con hidrogel, los tratados con hidrogel + GFOGER, los tratados con hidrogel + GFOGER + dosis

crecientes de BMP-2, vieron que los primeros presentaban una cicatrización ósea mínima, los segundos tenían una mayor formación ósea y casi puente completo y los terceros mostraban un aumento del volumen óseo y puente completo a la semana 8. Dentro de estos terceros, los tratados con BMP-2 a dosis bajas, tenían como ventaja, la formación un puente en el defecto óseo sin cambio estructural en el cúbito adyacente, en comparación con los tratados con dosis medias y altas que sí presentaban alteraciones. Por lo tanto, dosis excesivas de BMP-2 podían ocasionar efectos adversos.

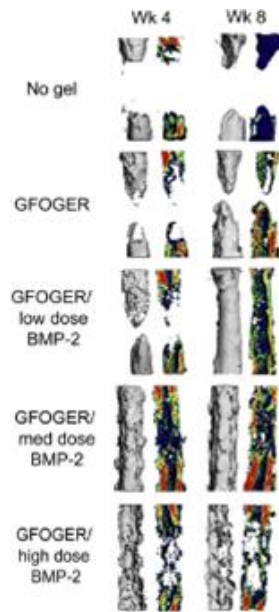


Figura 8- Imágenes obtenidas por microtomografía computarizada del radio en vista sagital (izda) con mapeo de densidad mineral (dcha) (32).

En cuanto a la retención del péptido GFOGER y BMP-2 en dichos hidrogeles dentro del sitio del defecto radial, vieron que la BMP-2 se encontró en el sitio del defecto durante un periodo de tiempo prolongado, con una vida media de 5,65 días y más del 20% de la dosis inicial se mantuvo 14 días postimplante, teniendo entonces una liberación sostenida; y el péptido tuvo una vida media más larga, 11 días. La tasa de degradación del hidrogel dirigida fue de 1-2 semanas de vida media gracias al uso del reticulador escindible por la metaloproteinasa. Vieron además que GFOGER es crítico para la reparación ósea y BMP-2 mejora las propiedades osteorreparativas de estos hidrogeles.

En resumen, lo correcto era usar hidrogeles funcionalizados con GFOGER que incluían dosis bajas de BMP-2 dado que proporcionaban una liberación sostenida de BMP-2, un reclutamiento de células madre osteoprogenitoras en el sitio del defecto, una formación ósea localizada y un puente fuerte en los defectos óseos a las 8 semanas, sin impulsar modificaciones en el cúbito adyacente. El tejido reparado poseía una resistencia mecánica semejante al hueso nativo.

6- Conclusiones.

- La ingeniería de tejidos se presenta como una estrategia con gran potencial para restaurar tejidos óseos, mediante la combinación de materiales, células y factores bioactivos.
- Los scaffolds (andamios) han mostrado una gran capacidad como sistemas de liberación de células y/o fármacos con el objetivo de conseguir la regeneración ósea.

- La mejor técnica disponible actualmente para la obtención de los scaffolds es la impresión 3D, aunque hay que tener en cuenta que podría ser un inconveniente su alto coste y en ciertas ocasiones el material que se utilice, pudiendo comprometer la impresión.
- Se utilizan una gran diversidad de materiales para crear los andamios, siendo en algunas ocasiones necesaria su combinación para la mejora de sus propiedades, destacando los polímeros naturales con las biocerámicas.
- El reto basado en crear estructuras que mimeticen la base y las propiedades de la matriz extracelular del hueso se ha conseguido con bastante precisión con el diseño de los hidrogeles, mostrando además buena integración con los tejidos circundantes.
- Gracias a la incorporación de factores de crecimiento, como BMP-2, se ha promovido la reparación ósea y la osteogénesis en modelos animales, siendo necesario su extrapolación al ser humano para comprobar si su implantación supone verdaderamente un éxito.

7- Bibliografía.

1. Fernández Portal L, Gómez-Castresana Bachiller F. El hueso y el cartílago de crecimiento. En: Forriol Campos F, coordinador. Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Segunda edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 71-76.
2. <https://www.partesdel.com/hueso.html>
3. Garrido Gómez J, Delgado Martínez AD, Forriol Campos F. Fisiología del tejido óseo. En: Delgado Martínez AD, director. Cirugía Ortopédica y Traumatología. Cuarta edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2018. p. 111-117.
4. Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DSJ. Bioquímica en los adultos mayores. Bioquímica clínica. Quinta edición. Barcelona: Editorial Elsevier; 2015. p. 148-149.
5. Laso Guzmán FJ. Patología ósea. Introducción a la medicina clínica. Fisiopatología y semiología. Tercera edición. Madrid: Editorial Elsevier Masson; 2015. p. 310-316.
6. Kierszenbaum AL, Tres LL. Osteogenia. Histología y biología celular. Cuarta edición. Barcelona: Editorial Elsevier; 2016. p. 161-179.
7. Herring W. Identificación de las alteraciones de la densidad ósea. Radiología básica. Tercera edición. Barcelona: Editorial Elsevier; 2016. p. 246-257.
8. Pelacho Samper B, Gutiérrez Pérez M, Prósper Cardoso F. Células madre e ingeniería de tejidos. En: Calvo González A, Esteban Ruiz FJ, Montuenga Badía L. Técnicas en histología y biología celular. Segunda edición. Barcelona: Editorial Elsevier; 2014. p. 303-327.
9. Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S, Selvamurugan N. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. International Journal of Biological Macromolecules. 1 de noviembre de 2018;119:1228-39.
10. Ochoa DS, Aguilar RN, Méndez AA. Ingeniería de tejidos: Una nueva disciplina regenerativa. Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2015;(64):61-9.
11. Chocholata P, Kulda V, Babuska V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. Materials. enero de 2019;12(4):568.

12. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*. septiembre de 2017;78:1246-62.
13. Feng P, He J, Peng S, Gao C, Zhao Z, Xiong S, et al. Characterizations and interfacial reinforcement mechanisms of multicomponent biopolymer based scaffold. *Materials Science and Engineering: C*. 1 de julio de 2019;100:809-25.
14. Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 15 de octubre de 2018;80:1-30.
15. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*. 1 de septiembre de 2018;3(3):278-314.
16. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia*. enero de 2019; 84:16-33.
17. Mohammadi M, Mousavi Shaegh SA, Alibolandi M, Ebrahimzadeh MH, Tamayol A, Jaafari MR, et al. Micro and nanotechnologies for bone regeneration: Recent advances and emerging designs. *Journal of Controlled Release*. marzo de 2018;274:35-55.
18. Chen H, Wang C, Zhu X, Zhang K, Fan Y, Zhang X. Fabrication of porous titanium scaffolds by stack sintering of microporous titanium spheres produced with centrifugal granulation technology. *Materials Science and Engineering: C*. octubre de 2014;43:182-8.
19. Zhang D, Wu X, Chen J, Lin K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioactive Materials*. 1 de marzo de 2018;3(1):129-38.
20. Calabrese G, Giuffrida R, Fabbi C, Figallo E, Lo Furno D, Gulino R, et al. Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro. Vanella L, editor. *PLOS ONE*. 16 de marzo de 2016;11(3):e0151181.
21. Murakami S, Miyaji H, Nishida E, Kawamoto K, Miyata S, Takita H, et al. Dose effects of beta-tricalcium phosphate nanoparticles on biocompatibility and bone conductive ability of three-dimensional collagen scaffolds. *Dental Materials Journal*. 2017;36(5):573-83.
22. Arcos D, Vallet-Regí M. Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia*. febrero de 2013;61(3):890-911.
23. McNamara SL, Rnjak-Kovacina J, Schmidt DF, Lo TJ, Kaplan DL. Silk as a bioadhesive sacrificial binder in the fabrication of hydroxyapatite load bearing scaffolds. *Biomaterials*. agosto de 2014;35(25):6941-53.
24. Wu H, Lei P, Liu G, Zhang YS, Yang J, Zhang L, et al. Reconstruction of Large-scale Defects with a Novel Hybrid Scaffold Made from Poly(L-lactic acid)/Nanohydroxyapatite/Alendronate-loaded Chitosan Microsphere: in vitro and in vivo Studies. *Scientific Reports*. 23 de marzo de 2017;7(1):359.
25. Rajan A, Ramachandra A, Hee C, Cheol. A unique scaffold for bone tissue engineering: an osteogenic combination of graphene oxide-hyaluronic acid-chitosan with simvastatin, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017; 46: 182-191.
26. Yang T, Hu Y, Wang C, Binks BP. Fabrication of Hierarchical Macroporous Biocompatible Scaffolds by Combining Pickering High Internal Phase Emulsion Templates with Three-Dimensional Printing. *ACS Appl Mater Interfaces*. 12 de julio de 2017;9(27):22950-8.

27. Kim Y, Kim G. PCL/Alginate composite scaffolds for hard tissue engineering: fabrication, characterization, and cellular activities, ACS Comb. Sci.2015; 17 (2): 87-99.
28. Cheng H, Chawla A, Yang Y, Li Y, Zhang J, Jang HL, et al. Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery. Drug Discovery Today. septiembre de 2017;22(9):1336-50.
29. Quinlan E, López-Noriega A, Thompson E, Kelly HM, Cryan SA, O'Brien FJ. Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering. Journal of Controlled Release. enero de 2015;198:71-9
30. Bai X, Gao M, Syed S, Zhuang J, Xu X, Zhang X-Q. Bioactive hydrogels for bone regeneration. Bioact Mater. 26 de mayo de 2018;3(4):401-17.
31. Guan X, Avci-Adali M, Alarçin E, Cheng H, Kashaf SS, Li Y, et al. Development of hydrogels for regenerative engineering. Biotechnol J. mayo de 2017;12(5).
32. Holloway JL, Ma H, Rai R, Burdick JA. Modulating hydrogel crosslink density and degradation to control bone morphogenetic protein delivery and in vivo bone formation. Journal of Controlled Release. octubre de 2014;191:63-70.
33. Shekaran A, García JR, Clark AY, Kavanaugh TE, Lin AS, Guldberg RE, et al. Bone regeneration using an alpha 2 beta 1 integrin-specific hydrogel as a BMP-2 delivery vehicle. Biomaterials. julio de 2014;35(21):5453-61.