

ACTUALIZACIONES / *Reviews*

IMPORTANCIA DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL DISEÑO DE *SCAFFOLDS* PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

Juan Manuel Fernández

Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata - Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina.

Resumen

Hematoma, inflamación, angiogénesis y osteogénesis son distintas etapas que se superponen durante el proceso de reparación de una fractura ósea. Durante las primeras etapas se liberan distintos factores de crecimiento quimioattractantes que producen el reclutamiento de diversas células para generar la formación de un hueso funcional con su respectiva vasculatura. Debido a la importancia que posee la angiogénesis en el desarrollo de una adecuada red vascular, tanto para la formación ósea como en su reparación, en los últimos años los especialistas en ingeniería de tejido óseo han estudiado la manera de fomentar tanto la osteogénesis como la angiogénesis durante la reparación ósea. En este trabajo de revisión, se recopilan y discuten los principales conceptos sobre distintas estrategias a fin de lograr un implante sintético con funcionalidad dual promoviendo los procesos que garanticen la angiogénesis y la osteogé-

nesis en forma acoplada utilizando distintos tipos de *scaffolds* y sistemas de liberación de drogas osteoinductoras y angiointductoras. La liberación dual de factores osteoinductores y angiointductores debe producirse en forma témporo-espacial controlada para garantizar los efectos deseados sin producir efectos adversos como tumores o hueso ectópico. Se deben tener en cuenta varios factores como el tipo y la arquitectura de hueso, tipo de daño, edad, sexo y condiciones patológicas del paciente. En cuanto a los materiales se debe considerar el tipo de material para usar como *scaffold*, los factores inductores seleccionados, su combinación y sistemas de liberación. El avance en estos estudios hará que la Ingeniería de Tejido Óseo sea una alternativa terapéutica en el futuro.

Palabras clave: Ingeniería de Tejido Óseo, angiogénesis, sistema de liberación de drogas, factores de crecimiento, andamios.



Abstract

IMPORTANCE OF ANGIOGENESIS IN THE DESIGN OF SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Hematoma, inflammation, angiogenesis, and osteogenesis are different stages that overlap during the healing process of a bone fracture. During the first stages, different chemoattractant growth factors are released which produce the recruitment of various cells that will induce the formation of a functional bone with its respective vasculature. Due to the importance of angiogenesis for the development of an adequate vascular network in both bone formation and repair, in recent years specialists in bone tissue engineering have studied how to promote both osteogenesis and angiogenesis during bone repair. In this review, the main concepts on different strategies developed to achieve a synthetic implant with dual functionality, promoting processes that guarantee angiogenesis and

osteogenesis in a coupled way using different types of scaffolds and osteo-drug delivery systems and angiointducers, are collected and discussed.

The dual release for osteoinductive and angiogenic factors must ensure the release of them in a controlled time-space manner to guarantee the desired effects without producing adverse effects such as tumors or ectopic bone. Several factors must be taken into account, such as bone type and architecture, type of damage to be repaired, age, sex, and pathological conditions of the patient. Regarding the materials, the type of material to be used as scaffolds, selected inducing factors and drug release system must be considered. Advances in these studies will make Bone Tissue Engineering a therapeutic alternative in the future.

Keywords: bone tissue engineering, angiogenesis, drug delivery system, growth factors, scaffolds.

Introducción

El hueso posee una capacidad única de repararse a sí mismo frente a una fractura sin dejar cicatrices, recuperando su función y forma anatómica al final del proceso.¹ Luego de una fractura ósea se produce la reparación del tejido por una serie de sucesos que pueden ser divididos en etapas a pesar de que se encuentran parcialmente solapados. Si bien la secuencia de eventos que conducen a la reparación depende del tipo de hueso y de fractura, la secuencia se puede describir básicamente de la siguiente manera. En la primera etapa, debido a la fractura ósea, se produce un hematoma en la zona causado por la ruptura de vasos sanguíneos. Las células provenientes de estos vasos desencadenan una cascada inflamatoria gracias

a la acción de células como macrófagos y linfocitos, entre otras. Esta respuesta inflamatoria recluta células madre mesenquimales de distintos nichos, principalmente del periostio y médula ósea. Las células progenitoras que llegan al sitio se diferencian en osteoblastos para facilitar la formación de hueso intramembranoso en aquellos lugares donde aún se conserva un suministro de sangre intacto, pero en el espacio de la fractura, donde la presión de oxígeno es baja, las células progenitoras se diferencian a condrocitos para formar un tejido cartilaginoso. Luego, los condrocitos comienzan a sufrir apoptosis mientras se calcifica la matriz extracelular formando un hueso desorganizado con invasión de vasos sanguíneos. Por último, gracias al proceso de remodelación, se

logra la conversión del tejido desorganizado en hueso laminar y, finalmente, recrea la forma anatómica del hueso.²⁻⁵ La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por una masa ósea disminuida con alteración de la estructura ósea que conlleva un compromiso en la resistencia ósea con un aumento de riesgo de fracturas.⁶ Afecta mayoritariamente a las mujeres posmenopáusicas, pero también afecta al hombre, estimándose que más de 200 millones de personas sufren este trastorno a nivel global.^{6,7} Además, el riesgo de fracturas puede aumentar su incidencia cuando los pacientes presentan otros problemas metabólicos como, por ejemplo, diabetes mellitus.^{8,9} A pesar de los mecanismos biológicos, existen situaciones en que las fracturas no pueden repararse por sí mismas y para poder lograr la reparación se necesitan intervenciones médicas utilizando injer-

tos, placas de osteosíntesis, tornillos y clavos o reemplazo mediante el uso de prótesis metálicas.¹⁰⁻¹⁴ Las fracturas y traumatismos causados al tejido óseo producen altos costos en la sociedad debido a sus tratamientos y pérdida de años de vida productiva debido a jubilaciones anticipadas. A nivel mundial, en el año 2013 hubo más de 50 millones de fracturas con más de 8 millones de procedimientos quirúrgicos.¹⁵ En ese mismo año, los gastos médicos asociados a la utilización de distintos tipos de injertos en la reparación ósea alrededor del mundo superaron los USD 2,5 mil estimando un crecimiento anual del 8%.¹⁶ Las distintas limitaciones de los tratamientos actuales utilizados (Tabla 1), costos, aumento de la expectativa de vida y envejecimiento de la población hace que la Ingeniería de Tejido Óseo sea una alternativa a los tratamientos convencionales.

Tabla 1. Limitaciones de los tratamientos actuales.

Tratamiento	Limitaciones
Autoinjerto	Si bien es considerada como la técnica de oro pues posee los mecanismos de acción osteogénesis ¹ osteoinducción ² y osteoconducción, ³ y ausencia de rechazo, se puede obtener limitada disponibilidad de tejido y morbilidad en el sitio de extracción.
Aloinjerto	Debido a que son injertos cadavéricos de la misma especie, son acelulares, lo que hace que no presenten capacidad de osteogénesis y, a pesar de los tratamientos que reciben, pueden causar transmisión de enfermedades y reacciones inmunológicas.
Xenoinjerto	Los xenoinjertos son básicamente huesos desproteinizados de otras especies y, por ende, solo poseen el mecanismo de osteoconducción. También pueden ocasionar rechazo y transmisión de enfermedades.
Placas de osteosíntesis y tornillos	No son reabsorbibles y se requieren segundas cirugías para extraerlos.
Prótesis	Se busca el reemplazo y no la regeneración. No contribuyen a la fisiología ósea. Sufren desgastes, fatigas, corrosión y pueden aflojarse y requerir un nuevo reemplazo.

1, 2 y 3 serán definidas más adelante.



Consideraciones básicas en Ingeniería de Tejido Óseo

El término Ingeniería de Tejido fue definido formalmente por primera vez en 1988 en un *workshop* de la *National Science Foundation*.¹⁷ Actualmente la definición más utilizada es la proporcionada por Langer y Vacanti en 1993, quienes definieron que la “Ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de los tejidos”.¹⁸ Si bien esta definición es la más popular y aceptada, ha quedado desactualizada no en cuanto a sus objetivos, sino a las ciencias implicadas. Principios de química, física, matemática e informática hoy resultan fundamentales en la Ingeniería de Tejido Óseo haciendo que este sea un campo interdisciplinario cada vez más amplio. Así, se podría decir que su objetivo final es desarrollar estrategias para regenerar hueso dañado o enfermo. Los autoinjertos son considerados como la técnica de referencia (estándar de oro) entre los tratamientos con injertos, pues cumplen con los tres mecanismos de acción necesarios para la regeneración ósea, definidos a continuación:¹⁹⁻²¹

-*Osteoconducción*: es un proceso pasivo donde las células osteoblásticas y sus progenitores pueden migrar a través de una red estructural, también llamada *scaffold* (en inglés: andamio), unirse a él y proliferar al tiempo que otorga soporte mecánico.

-*Osteoinducción*: es el proceso de reclutamiento de las células del linaje osteoblástico y su diferenciación hacia osteoblastos a fin de poder generar hueso. Este proceso se produce por distintas señales biológicas como factores de crecimiento que se encuentran en el injerto.

-*Osteogénesis*: es la propiedad de generar hueso, es decir, células del linaje osteoblástico vivas que se encuentran contenidas dentro de él al momento de ser implantado.

De esta forma, inspirada en los autoinjertos, la Ingeniería de Tejido Óseo utiliza una matriz tridimensional (*scaffold*), células y señales biológicas como factores de crecimiento para generar un biomaterial o injerto sintético el cual, una vez implantado en el sitio de lesión, ayudará o guiará la reparación ósea (Figura 1).^{10,15,17,22} Así, los injertos sintéticos actuarán mediante los tres mecanismos antes descritos.^{15,23}

En la Figura 2 se puede ver cómo los tres componentes de la Ingeniería de Tejido Óseo interactúan con el fin de cumplir distintas misiones. Los *scaffolds* no solo sirven de soporte para que las células tengan un lugar donde adherirse, proliferar, diferenciarse y generar hueso, sino también como sistema liberador de los factores de crecimiento que serán los encargados de direccionar las funciones celulares.

Desde el punto de vista de su composición, los *scaffolds* pueden ser muy variables: polímeros (sintéticos, naturales o mezclas de ambos), cerámicas, vidrios bioactivos o materiales compuestos, es decir, mezcla de distintos componentes. En la literatura se puede encontrar un gran número de trabajos que evalúan la posibilidad de diversos materiales para ser utilizados como *scaffolds*. Si bien una revisión detallada de ellos escapa a este trabajo, en la Tabla 2 se pueden encontrar algunos de ellos. A pesar de la gran diferencia que hay en su composición, todos deben cumplir una serie de requisitos como por ejemplo: capacidad de degradarse; no ser tóxico ni inmunogénico (ni el material ni sus productos de degradación); ser biocompatible, poroso, con buenas propiedades mecánicas para que no colapse y garantice un espacio para que se genere hueso; topografía superficial, capaz de darle arquitectura deseada, es decir, poder diseñarlos a la medida de un hueso dado de cada paciente, sin olvidar que deben ser de bajo costo y poder esterilizarse sin que cambien sus propiedades.^{15,17,24}

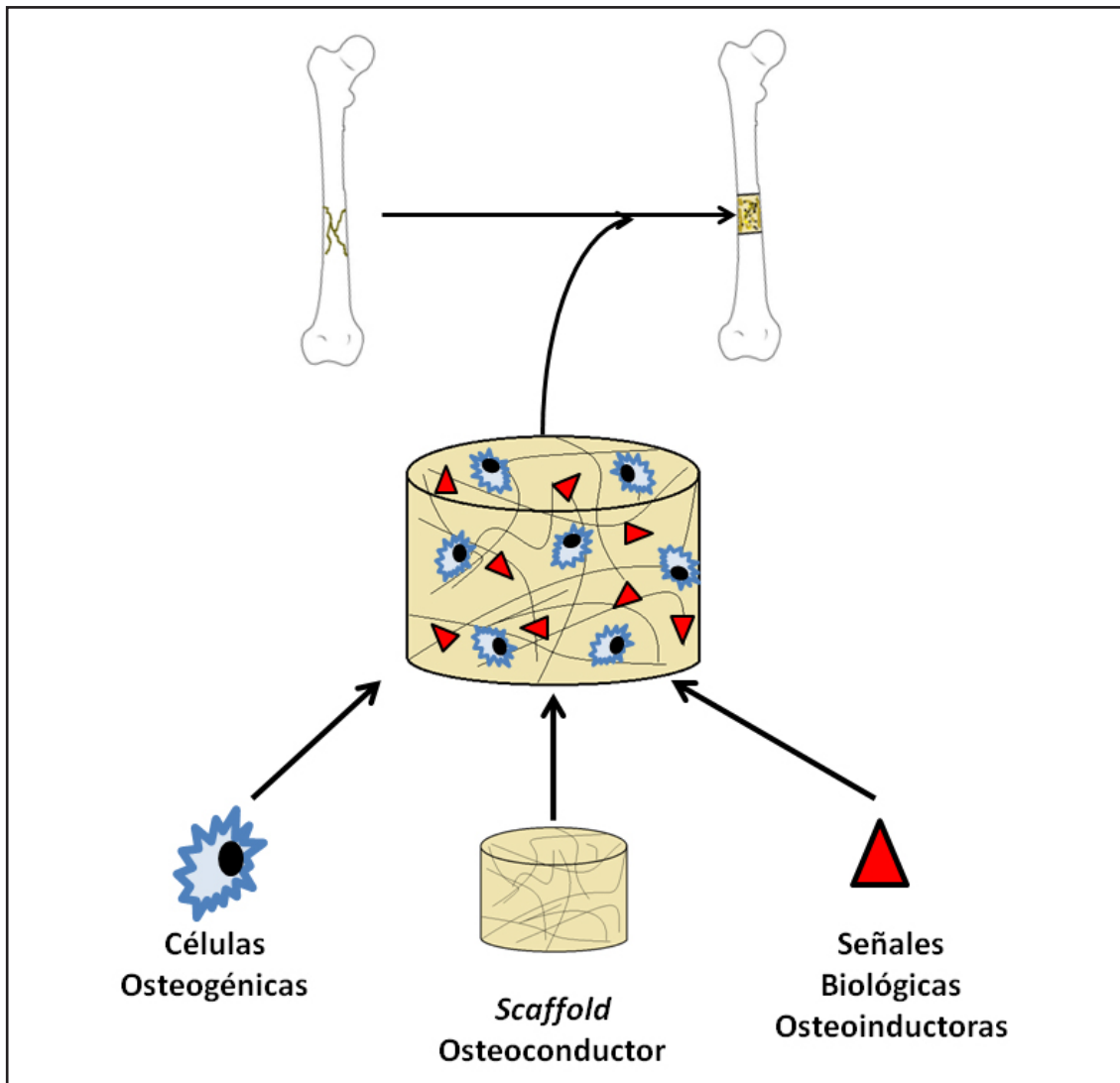


Figura 1. La Ingeniería de Tejido Óseo posee como componente: un implante formado por una matriz tridimensional osteoconductor (*scaffold*), células osteogénicas y moléculas osteoinductoras para ayudar a la reparación ósea.

Desde que se ha comenzado el desarrollo de los biomateriales, sus objetivos han ido evolucionando. Los de primera generación, aquellos desarrollados durante la década 1960-1970, se buscaba que fueran no tóxicos (también llamados bioinertes) y con buenas propiedades mecánicas: estos eran las prótesis. Los de segunda generación, a partir de la década de 80, además de ser biocompatibles, debían

cumplir buenas propiedades mecánicas, con requisitos tales como ser reabsorbibles o bioactivos. Así nacen términos como bioactividad, osteoconducción, biodegradación (y sus distintos mecanismos de degradación), lo cual hace que con el tiempo fueran reemplazados por el tejido del paciente. Actualmente existen los de tercera generación, también llamados inteligentes. Se los llama así pues se espera de

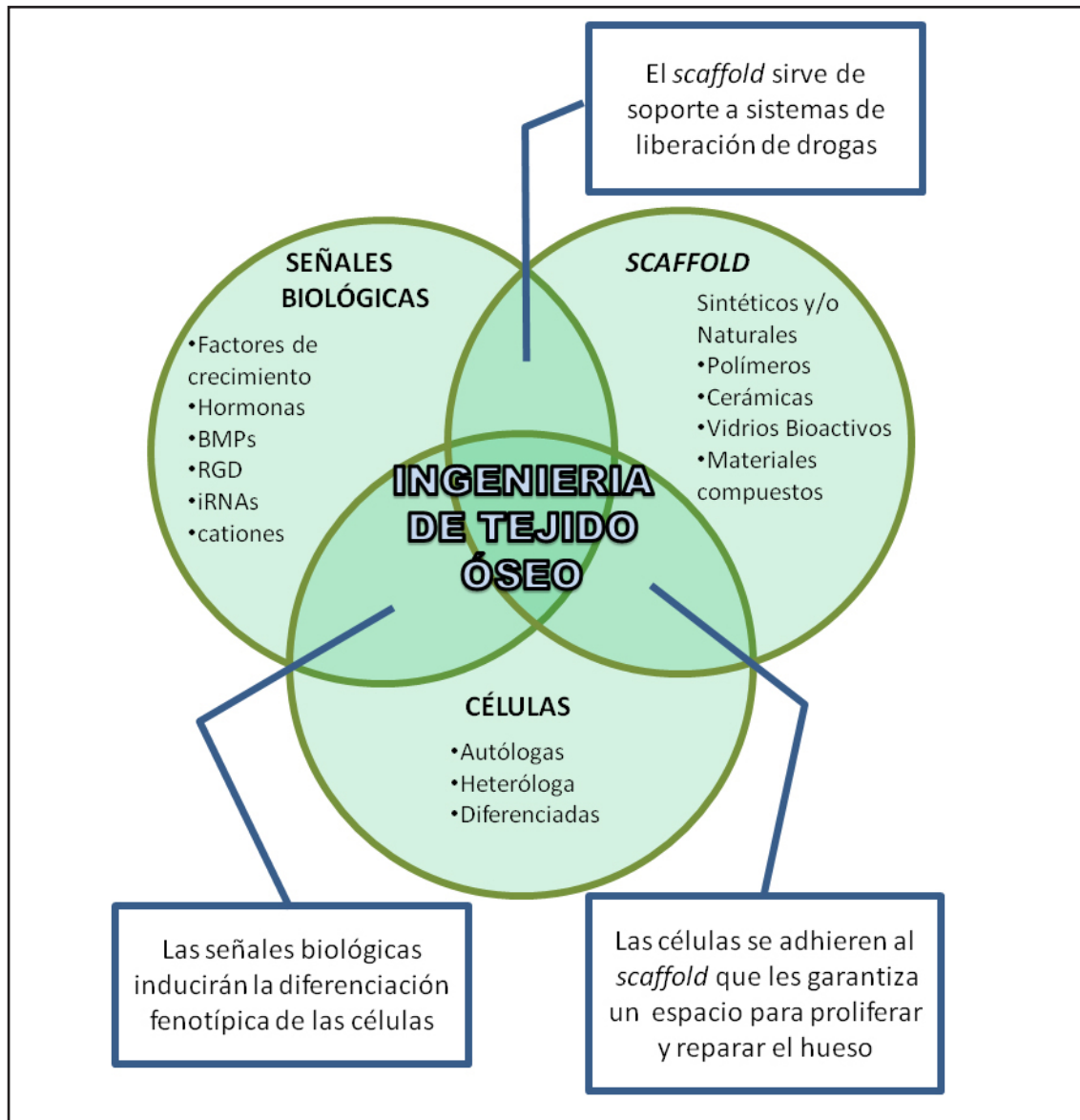


Figura 2. La Ingeniería de Tejido Óseo lleva a cabo su objetivo gracias a la interacción de sus tres componentes. Las moléculas osteoinductoras soportadas en el *scaffold* conducen la proliferación y diferenciación fenotípica de las células que se encuentran adheridas al soporte estructural brindado por el *scaffold*.

ellos que, además de las funciones anteriores, cumplan otras funciones no de sustitución sino de regeneración. Con los cambios de objetivo y técnicas de estudio, se comenzaron a utilizar términos como *scaffolds*, osteoinducción, sistemas de liberación de drogas, porosidad,

tailor (capacidad de diseño a medida del cada paciente según sus necesidades), etc., al momento de diseñar biomateriales inteligentes que estimulen diversas respuestas de células del linaje osteoblástico a nivel molecular para que se logre la reparación ósea.^{10,16,39-41}

Tabla 2. Breve revisión bibliográfica de tipos de materiales utilizados en el desarrollo de *scaffolds*.

Tipo de material	Material	Detalles del <i>scaffold</i>
1- Polímeros sintéticos y/o naturales	1.1- Poli ϵ caprolactona y polifumarato ²⁵	1.1- Compatibilización de mezclas de polímeros mediante ultrasonido.
	1.2- Poli ϵ caprolactona y polifumarato ²⁶	1.2- Obtención de <i>scaffolds</i> porosos mediante electrospray.
	1.3- Colágeno ²⁷	1.3- Obtención de un <i>scaffold</i> con superficie en forma de lomas y ordenamiento de las fibras del colágeno.
	1.4- Quitosano, polifumarato y poliácetato de vinilo ²⁸	1.4- Uso de moldes para la obtención de <i>scaffolds</i> con una superficie nanoestructurada.
	1.5- Matriz extracelular y poli ϵ caprolactona ²⁹	1.5- Obtención de <i>scaffolds</i> porosos mediante <i>electrospinning</i> .
2- Cerámicas	2.1- Carburo de silicio y carbono pirolizado ³⁰	2.1- Síntesis de cerámica porosa como <i>scaffolds</i> utilizando madera y algas.
	2.2- Alúmina ³¹	2.2- <i>Scaffolds</i> con poros alineados para mejorar sus propiedades mecánicas.
3- Vidrios bioactivos	3.1- <i>Bioglass</i> ® ³²	3.1- Estudios de cambios estructurales de los <i>Bio-glass</i> luego de ser implantados.
	3.2- <i>Bioglass</i> ³³	3.2- Mejora de unión al hueso del <i>Bioglass</i> luego de ser modificado por radiación gamma.
4- Materiales compuestos	4.1- Poli ϵ caprolactona y polifumarato e hidroxiapatita ³⁴	4.1- Mejora de las propiedades del <i>scaffold</i> gracias a la incorporación de hidroxiapatita obtenida a bajos costos.
	4.2- Poli ϵ caprolactona y polifumarato conteniendo estroncio ³⁵	4.2- Incorporación de Sr a la matriz polimérica para mejorar osteoinducción del <i>scaffold</i> .
	4.3- Gelatina y vidrio fosfato ³⁶	4.3- Refuerzo mecánico y propiedades biológicas de un <i>scaffold</i> poroso de gelatina.
	4.4- Alginato y nanohidroxiapatita ³⁷	4.4- Obtención <i>scaffolds</i> a partir de alginato e hidroxiapatita con actividad antibacterial.
	4.5 -Quitosano, hidroxiapatita y alginato ³⁸	4.5- Obtención de microesferas para <i>drug delivery</i> en Ingeniería de Tejido Óseo.

Curiosamente, Bongio y col. denominan esta evolución “desde la biocompatibilidad hacia las instrucciones”.³⁹ Volviendo a las Figuras 1 y 2, se observa que las células progenitoras se siembran en andamios reabsorbibles; estos

contienen moléculas que inducen la osteogénesis de las *stem cells* en un reactor fuera del cuerpo donde las células crecen y se diferencian e imitan los procesos de reparación ósea. Tales injertos sintéticos/vivos de Ingeniería de Tejido



luego se implantan en los pacientes para reemplazar los tejidos enfermos o dañados. Con el tiempo, los andamios serán reabsorbidos y reemplazados por tejidos del huésped que idealmente incluyen un suministro de sangre y nervios viables. Tratando de obtener biomateriales cada vez más “inteligentes” o con diversas funciones, la evolución de estos biomateriales no se detiene. La curación de las fracturas óseas, en forma resumida, es un proceso de inflamación, angiogénesis y osteogénesis. Se inicia con la inflamación, liberando diversas citoquinas y factores de crecimiento. Estas conducen el reclutamiento de células madre y la formación de vasculatura que deriva en la formación de hueso funcional, como se mencionó anteriormente.

Los biomateriales diseñados y estudiados hasta el momento buscaban cumplir o favorecer la osteogénesis del proceso (Figura 3, línea punteada A). Claro que, entre los requerimientos del material, había un espacio para la angiogénesis, sobre todo a la hora de pensar la porosidad y tamaño de poro, pero la idea central siempre ha sido favorecer la osteogénesis. Debido al rol crítico de la vasculatura para lograr una reparación ósea exitosa, demostrado hace décadas, en los últimos años se ha abordado el problema en el diseño de *scaffolds* con una funcionalidad dual, es decir, pensar, diseñar y lograr biomateriales que promuevan tanto la diferenciación vascular (Figura 3 línea punteada B) como la osteogénica durante la regeneración ósea.

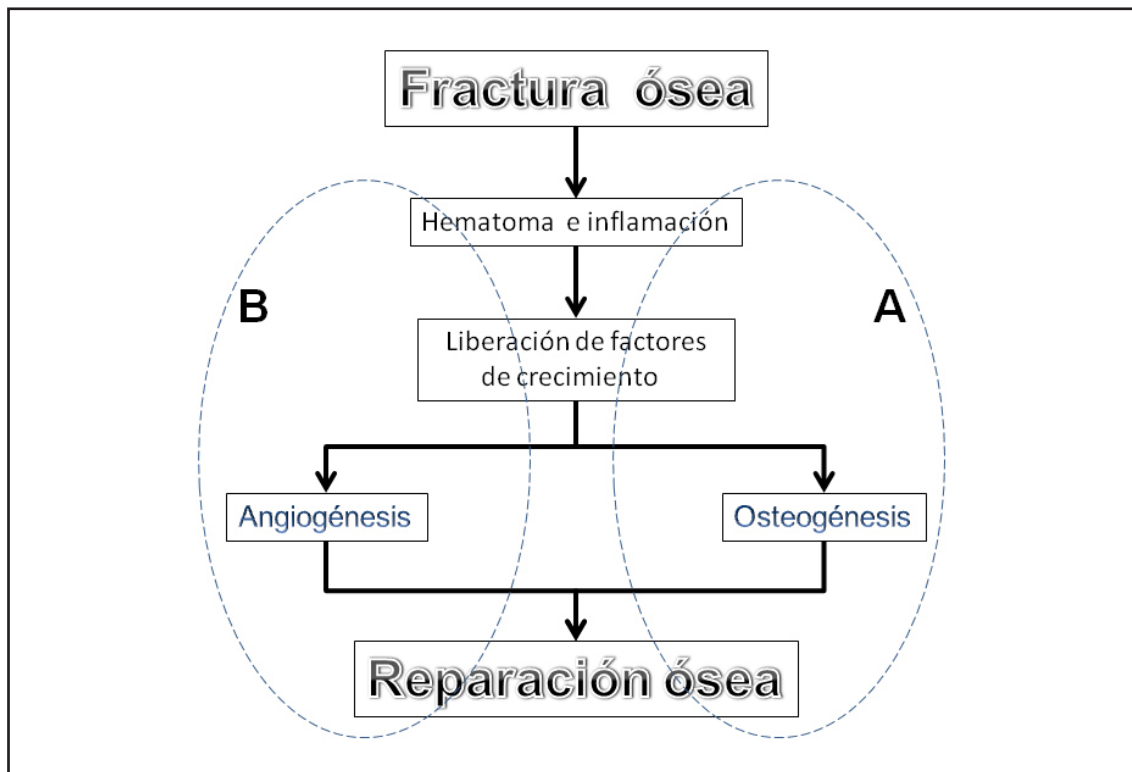


Figura 3. La fractura ósea conduce al desencadenamiento de señales químicas que promueven procesos de angiogénesis y osteogénesis para, en conjunto, llevar a cabo la reparación de la fractura. Tradicionalmente, el diseño de los estudios de los biomateriales apuntaban a fomentar la osteogénesis (línea punteada A). Últimamente, se busca que tengan actividad dual, es decir, que favorezcan también la angiogénesis (línea punteada B).

Breve resumen del rol de la angiogénesis en el proceso de reparación de fracturas óseas

Desde el siglo XVIII se conoce la importancia que posee la correcta angiogénesis no solo en el desarrollo y crecimiento del hueso, sino también en su reparación.⁴² Hoy en día se conoce en forma más detallada el rol que la vasculatura posee en el desarrollo esquelético embrionario, el crecimiento y la remodelación ósea.⁴³ Por otro lado, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes, es decir la angiogénesis, es un proceso sumamente raro en adultos y se limita a procesos de reparación de lesiones y crecimiento de tumores.⁴⁴ La red vascular actúa como un sistema de transporte de hormonas, productos de desecho, sustancias tóxicas y oxígeno, nutrientes y células; además libera factores de crecimiento producidos localmente por las células endoteliales (CE), incluidos factores angiogénicos, factores morfogénicos, sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras, haciendo que al endotelio vascular se lo considere también como un órgano endocrino. De esta forma, las CE pueden comunicarse con células del hueso como osteoblastos, células estromales, macrófagos y osteoclastos.^{42,43,45}

La angiogénesis resulta ser clave durante el proceso de reparación ósea pues la formación de nuevos vasos sanguíneos en el callo de la fractura aporta nutrientes, oxígeno, citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, además de los precursores celulares involucrados en el proceso de reparación. Esta asociación tiempo-espacial de la vasculatura con el proceso de formación ósea se denomina “acoplamiento angiogénico-osteogénico”.⁴³

Durante el traumatismo, debido a la interrupción del suministro sanguíneo, se crea un entorno hipoxémico causado por la baja presión de oxígeno alrededor del espacio lesionado, desencadenando señales en los osteoblastos que influyen sobre la proliferación y diferenciación de las CE, las cuales luego secretarán factores osteogénicos; esta fase será

crucial para la reparación de la fractura ósea. Las plaquetas son las primeras en actuar, formando un trombo en el sitio de exposición de colágeno, estabilizado luego por un coágulo de fibrina. Este coágulo plaquetario secreta factores que activan la migración de células inflamatorias y las demás células implicadas en la reparación ósea. Las CE quiescentes de los vasos sanguíneos existentes son activadas por el aumento de factores angiogénicos producidos por el coágulo plaquetario, las células inflamatorias y el estado de hipoxia, llevando a un alargamiento de los nuevos vasos gracias a la proliferación y migración de las CE. A medida que se forma el endotelio vascular, las CE secretan moléculas atrayentes de células perivasculares (como pericitos y células de músculo liso) para recubrir el endotelio proporcionando no solo estabilidad, sino también permeabilidad a los nuevos vasos formados. La angiogénesis resulta ser un proceso tan importante en la reparación ósea que una ausencia o inhibición de esta es una de las principales razones de falla en la reparación de la herida, como se ha demostrado en gran número de trabajos.⁴⁶⁻⁴⁸

De esta forma, para una correcta reparación ósea, la capacidad de estimular la osteogénesis debe estar correctamente acoplada con la angiogénesis pues ambos procesos se hallan estrechamente relacionados y la osteogénesis no se daría en ausencia de la angiogénesis.^{42-45,49} Esta relación estrecha entre ambos procesos es controlada por diversos factores de crecimiento que actúan en forma autocrina y paracrina, producidos por los osteoblastos y las CE y sus respectivos precursores. Además, se ha demostrado que existe comunicación en forma directa entre las células mediante contacto directo utilizando, por ejemplo, uniones del tipo “gap”. Entre los principales factores angiogénicos se encuentra el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), producido por las células osteoblásticas. Su importancia en el proceso de reparación de fractura se demostró mediante



varios estudios donde se observa una pobre o ausente reparación cuando se bloquea el VEGF (mediante anti-VEGF o silenciamiento de gen).^{42,43} Activadas las CE mediante VEGF, producen moléculas osteoinductoras como BMPs-2, 4 y 7 (proteínas morfogénicas óseas 2, 4 y 7) e IGF (factor de crecimiento similar a la insulina). De esta manera, se regula la migración, proliferación, y diferenciación de ambos tipos celulares. Además, se ha demostrado que el agregado de VEGF en forma exógena estimula la diferenciación de células osteoblásticas. En la Figura 4 se puede ver el *cross talk* entre las CE y los osteoblastos (Ob) donde se encuentran involucrados además otros factores de crecimiento. Por ejemplo, bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) estimula la angiogénesis y osteogénesis activando la proliferación y diferenciación de CE y Ob. Otro factor de crecimiento con un importante

rol en la reparación ósea es PDGF (factor de crecimiento derivado de plaqueta). Este factor estimula la proliferación de las células de origen mesenquimático como osteoblastos y condrocitos, siendo además un importante factor mitogénico que promueve la expresión de VEGF.⁴²

No solamente existe comunicación entre osteoblastos y CE. Se ha demostrado que VEGF interviene en el reclutamiento de osteoclastos (Oc), los cuales degradan la matriz extracelular liberando TGF- β (factor de crecimiento transformante β), que entonces promueve la actividad osteoblástica. Por último, los osteoblastos pueden favorecer la diferenciación osteoclástica gracias a la interacción de RANK y RANKL (receptor activador para el factor nuclear κ B y ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B, respectivamente).^{42,43,45,50-53}

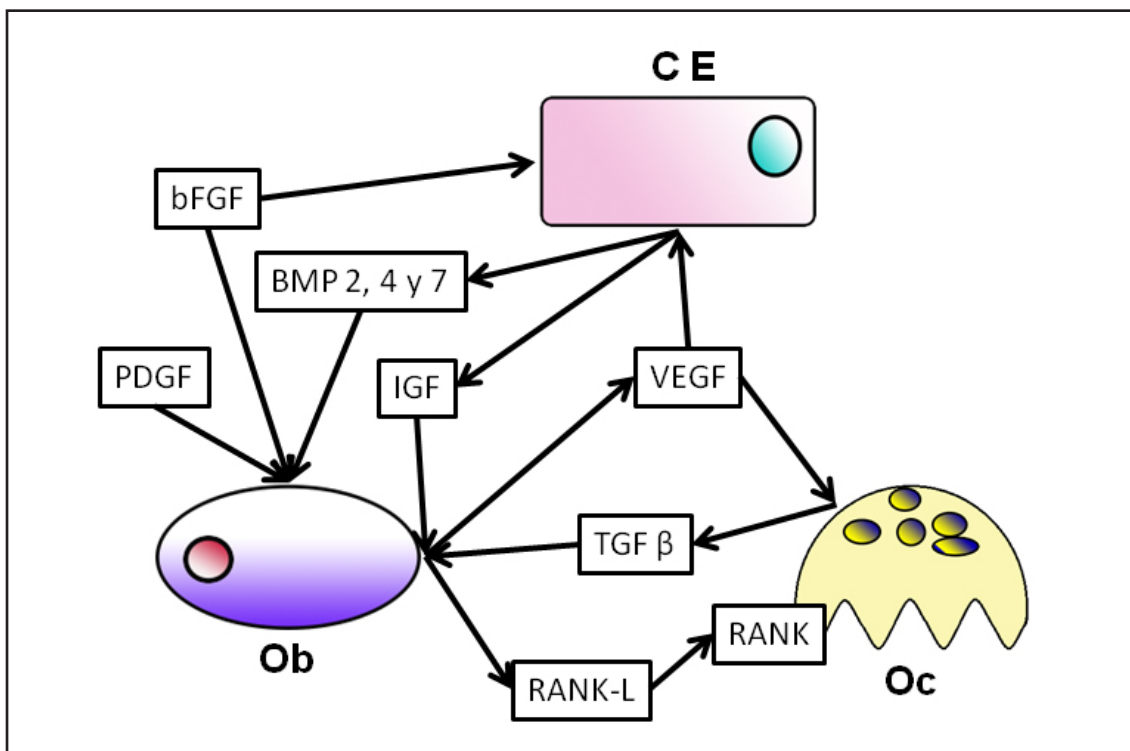


Figura 4. Comunicación o *cross talk* entre las células endoteliales (CE), los osteoblastos (Ob) y los osteoclastos (Oc) a través de la liberación de distintos factores de crecimientos regulatorios.

Diseño de *scaffolds* con función dual: promover la osteogénesis tanto como la angiogénesis

Debido a la importancia de obtener una buena vasculatura con el fin de lograr exitosamente la reparación ósea tras una fractura, resulta crítico diseñar *scaffolds* con funcionalidad dual, es decir, lograr la osteogénesis garantizando también la angiogénesis. Como mencionamos anteriormente, los osteoblastos y las CE producen señales recíprocas con el fin de mantener acoplados ambos procesos. Los osteoblastos producen VEGF que estimulan y activan a las CE mientras que estas producen BMP-2 que estimula y activa a los osteoblastos. Sin embargo, algunos trabajos demuestran que la osteogénesis no es suficiente para favorecer la angiogénesis, sino que la supervivencia de las células que se encuentran en el interior de los grandes *scaffolds* se ve comprometida por la falta de oxígeno y nutrientes a causa del tiempo que toma formar los nuevos vasos sanguíneos.¹⁵ Por lo tanto, en los últimos años, se han estudiado distintas estrategias a fin de lograr *scaffolds* que promuevan ambos eventos en forma acoplada.

Como se puede ver en la Figura 2, los *scaffolds* cuentan con dos principales misiones: funcionar como soporte estructural emulando una matriz extracelular que garantiza un espacio para migración, adhesión, proliferación y diferenciación celular, al tiempo que también sirve de soporte para sistemas de liberación de drogas. De esta forma, las consideraciones importantes para tener en cuenta en el diseño de *scaffolds* resultan ser la técnica de fabricación, forma y estructura del hueso dañado, los factores osteogénicos y angiogénicos para utilizar y un sistema de liberación que provea la cinética deseada. Lograr este último objetivo resulta ser importante pues una cinética de liberación adecuada es necesaria para una obtener una correcta angiogénesis sin que se produzca limitación de oxígeno ni nutrientes.^{15,42,44,49,50}

De esta forma, se profundiza la utilización de términos como:

-*Angioconducción*: es la capacidad que posee una matriz tridimensional porosa para sostener el crecimiento de vasos sanguíneos. Así, los materiales angioconductores podrán proporcionar los medios para que el suministro de sangre del paciente llegue al sitio para reparar y se promueva la integración del *scaffold* durante el proceso de reparación ósea.

-*Angioinducción*: consiste en la diferenciación de las células progenitoras endoteliales a células endoteliales mediada por la liberación de distintas moléculas proangiogénicas que se encuentran inmersas en la matriz tridimensional. De esta forma, las moléculas proangiogénicas van a permitir la correcta vascularización en el seno del *scaffold*.

Por lo tanto, para la obtención de una buena vasculatura y osteogénesis en Ingeniería de Tejido Óseo, es necesario desarrollar distintas estrategias que incorporen sistemas de liberación de drogas osteoinductoras y angioinductoras en los *scaffolds*. Por ello, se ha puesto el foco en el desarrollo de sistemas que contengan factores de crecimiento, seguidos de oligoelementos y otros tipos de drogas y materiales angioconductores con capacidad angioinductora. En la Figura 5 se pueden observar distintas estrategias que se describen en estudios a fin de lograr una matriz ideal. A continuación, se analizarán algunos ejemplos de las diversas estrategias.

Una de las estrategias más utilizadas es la liberación de los factores de crecimiento VEGF y BMP-2, aunque también existen estudios con otros factores como bFGF, BMP-7, PDGF y TGF- β en distintos sistemas de liberación.¹⁵

El atrapamiento físico del factor de crecimiento es probablemente el método más simple para un sistema de liberación de droga.

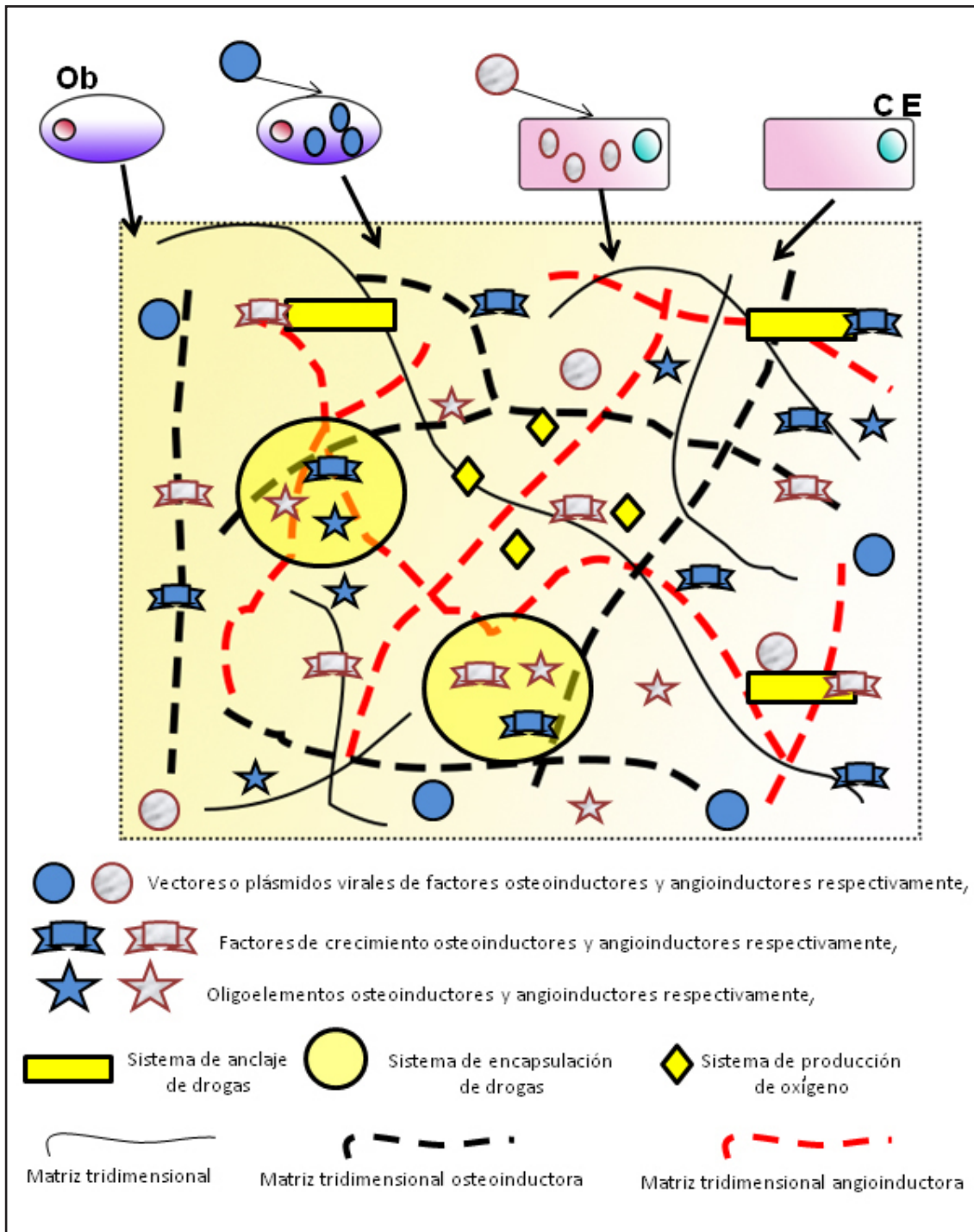


Figura 5. Distintas estrategias para favorecer la angiogénesis y la osteogénesis. Algunas de ellas incluyen genes en plásmidos virales dentro del *scaffold* o transfectados dentro de las células para que produzcan diversos factores de crecimiento, los cuales, a su vez, pueden estar incorporados dentro del *scaffold* asociados a la matriz tridimensional, a sistemas de anclajes o un sistema de encapsulación. Además, los *scaffolds* pueden estar compuestos por materiales que aportan las capacidades angioconductoras y osteoconductoras y que posean propiedades angiogénicas y osteogénicas.

Este método consiste en agregar el factor de crecimiento durante la síntesis del *scaffold*. A pesar de su simplicidad, la principal desventaja de este sistema es que puede no ser eficaz a la hora de necesitarse un sistema de liberación sostenida en el tiempo pues, en muchos casos, el perfil de liberación que se obtiene resulta ser discontinuo por liberar un alto porcentaje de la droga a tiempos iniciales, o contrariamente por quedar esta fuertemente retenida en la matriz polimérica. No obstante, los perfiles de liberación se pueden modificar variando parámetros estructurales y/o fisicoquímicos del *scaffold*.⁵¹ King y Krebsbach demostraron que la interacción del material y los BMPs, retenido en forma no covalente dentro de distintos tipos y formatos de *scaffolds*, producía cambios en la liberación de BMPs tanto *in vitro* como *in vivo*.⁵⁴ Existen otros sistemas de atrapamiento físico de factores de crecimiento además de las matrices poliméricas: Wernike y col. lograron desarrollar un sistema de liberación de VEGF utilizando TCP- β (fosfato tricálcico β) poroso, y encontraron que, en estudios *in vivo*, promovió la angiogénesis y reparación ósea con distinta cinética de liberación según la forma de retención del factor de crecimiento.⁵⁵ Otros estudios han enfocado la producción de sistemas de liberación de dos factores de crecimiento, siendo una estrategia común que uno de ellos sea osteoinductor y otro angiinductor, comparando luego sus efectos con liberación de uno solo de ellos. Patterson y col. utilizaron un hidrogel realizado con ácido hialurónico y metacrilato de glicidilo, reteniendo en su interior BMP-2 y VEGF. Ellos observaron en un modelo de reparación de herida de calota de rata, que la coliberación de ambos factores de crecimiento producía una mayor reparación del daño que cada uno por separado.⁵⁶ Interessantemente, Farokhi y col. lograron mejorar la reparación ósea en estudios *in vivo* utilizando un *scaffold* poroso que contenía los factores VEGF y PDGF.⁵⁷ Clásicamente, los sistemas de liberación es-

tán enfocados en contener factores de crecimiento proteicos; sin embargo, también se pueden incluir distintos iones metálicos pues muchos de ellos poseen capacidad osteoinductora y/o angiinductora.⁴⁹ Nuestro grupo de trabajo ha incorporado estroncio (Sr^{+2}) a una mezcla polimérica compatibilizada de poli ϵ caprolactona y polifumarato de diisopropilo, la cual fue previamente caracterizada.^{25,26} Este catión fue seleccionado debido a que posee actividad osteoinductora.^{8,59,60} Se prepararon *scaffolds* con dos concentraciones distintas de este catión, 1 y 5% p/p, encontrando una baja liberación del catión hacia el medio de cultivo, lo cual es un efecto benéfico pues el Sr^{+2} sistémico está asociado a eventos cardiovasculares.⁶¹ Encontramos que el agregado de 1% de Sr^{+2} promueve la capacidad osteoinductora tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que el agregado de 5% del catión conlleva efectos adversos, demostrando que al agregar una droga osteoinductora a los materiales hay que tener en cuenta tanto concentraciones mínimas como máximas de ellos.³⁵ Otro ejemplo muy interesante es el estudio realizado por Xia y col., quienes estudiaron cómo influyen distintos extractos de akermanita en el comportamiento celular. Utilizando un modelo de herida de tamaño crítico en calota de rata ovariectomizada, encontraron que este mineral (que contiene en su composición Ca, Mg y Si) promueve tanto la osteogénesis como la angiogénesis *in vivo*.⁶²

Otra forma de retener factores de crecimiento en una matriz tridimensional es mediante enlaces covalentes. Este tipo de uniones posee la ventaja de asegurar la entrega de factor de crecimiento a nivel local dentro del *scaffold* sin que se desaprovechen los factores por procesos de difusión, permitiendo así que se utilicen concentraciones menores de estos. No obstante, el riesgo de desnaturalización de los factores de crecimiento proteicos durante el proceso químico para lograr el atrapamiento covalente es la



principal limitación de esta estrategia. Zisch y col. desarrollaron un sistema utilizando polietilenglicol en el cual incorporaron, a la matriz, VEGF unido a una secuencia proteica con capacidad de ser clivada por metaloproteinasas de matriz. Este hidrogel produjo un aumento en la migración y proliferación de las células endoteliales crecidas sobre ellos, generando un tejido vascularizado cuando fue implantado en forma subcutánea en ratas.⁶³ Leslie-Barbick y col. unieron polietilenglicol a VEGF y a la secuencia de aminoácidos RGDS (arginina-glicina-asparagina-serina), la cual es una secuencia peptídica que aumenta la adhesión celular vía receptores integrinas. VEGF y RGDS pegilados fueron unidos a un hidrogel elaborado con diacrilato de polietilenglicol, agregándole previamente una secuencia de péptido sensible a colagenasa. La incorporación de VEGF al *scaffold* produjo un aumento en la migración celular, contacto célula-célula y tubulogénesis cuando en ellas crecieron células HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), respecto de hidrogeles que solo contenían secuencias de adhesión.⁶⁴ Se encuentra en pleno desarrollo la unión de factores de crecimiento a *scaffolds* mediante uniones covalentes sensibles a radiación UV e IR cercano.⁴⁴ La aplicación de distintas longitudes de onda en forma exógena permitirá la liberación, en el cuerpo, de distintos factores de crecimiento unidos a secuencias moleculares sensibles a longitudes de ondas particulares, controlando en forma extracorpórea su liberación.

Los factores de crecimiento no solo pueden quedar retenidos en el *scaffold* por atrapamiento físico o mediante unión covalente, también pueden unirse mediante uniones electrostáticas. Esta estrategia permite retener factores de crecimiento agregados en forma exógena, con distintas afinidades por el sistema, sin el riesgo de la desnaturalización proteica, aunque puede derivar en un *scaffold* con distribución no homogénea de los factores de crecimiento. Una forma de

diseñar este tipo de sistema de liberación de drogas es la utilización de polisacáridos sulfatados cargados negativamente; el más usado resulta ser la heparina debido a que se pueden realizar modificaciones sobre ella variando su afinidad por distintos factores de crecimiento.^{65,66}

La utilización de nanopartículas que contienen factores de crecimiento resulta ser una estrategia muy interesante, pues –variando la relación superficie-volumen de estas– se puede controlar la velocidad de difusión de los factores que se encuentren en su interior, además de otorgarles a dichos factores una coraza que los protege del entorno. Recientemente, Kim y col. han utilizado un copolímero de ácido láctico y glicólico y polialcohol vinílico para generar nanopartículas que en su interior contenían BMP-2. Estas partículas fueron incorporadas en una matriz de poli ϵ caprolactona encontrando un aumento en la proliferación y marcadores de actividad osteoblástica cuando crecen células mesenquimales humanas sobre ellas.⁶⁷ Una forma de encapsular moléculas es mediante un sistema de vesículas y micelas poliméricas: recientemente, Besada y col. diseñaron un polimerosoma autoensamblable utilizando un polímero *triblock* de polibenzoato de vinilo y polietilenglicol, y encontraron que dicho polimerosoma no posee efectos tóxicos en estudios *in vitro*.⁶⁸

La liberación de factores de crecimiento proteicos a través de sistemas de liberación de droga posee algunas limitaciones o desventajas. Por ejemplo, una cinética de liberación inadecuada puede producir concentraciones proteicas indeseadas en el sitio para reparar. Concentraciones elevadas de BMPs y escape del sitio de dañado puede producir osificaciones ectópicas, al igual que fallas en la vasculatura o riesgo de desarrollo de tumores en el caso de liberación excesiva de VEGF. En el otro extremo, bajas concentraciones de los factores de crecimiento debido a una cinética de liberación demasiado lenta

pueden no producir el efecto deseado. Además, se lograrían efectos transitorios debido a que muchos de los factores proteicos poseen una baja vida media una vez implantados en el cuerpo, como es el caso del VEGF, el cual posee una vida media de 7 a 8 horas. Por ello, una estrategia en pleno desarrollo resulta ser la terapia génica agregando vectores virales de factores de crecimiento que produzcan la transfección de las células que proliferen en el *scaffold*, o modificación genética *ex vivo* de células, las cuales serán luego cultivadas en el *scaffold*.^{43,65} Recientemente, Hsieh y col. han transfectado células estromales de médula ósea con plásmidos de BMP-2 implantándolas luego en un defecto óseo crítico en calota de rata usando Matrigel® como *scaffold*. Encontraron un aumento en la reparación ósea con una buena vascularización, respecto de cuando implantaban células sin transfectar.⁶⁹ Otro interesante trabajo es el realizado por Khor sand y col., quienes implantaron en lesiones de tibia de conejos diabéticos, un *scaffold* a base de colágeno que contenía plásmidos de BMP-2 y FGF-2, y encontraron un efecto sinérgico en la reparación ósea en comparación con la implantación de *scaffolds* con un solo plásmido.⁷⁰

Además de los factores de crecimiento u oligoelementos, en la bibliografía se pueden encontrar referencias a otras drogas con capacidad osteoinductora o angiointductora. Una de ellas resulta ser la simvastatina, pues se ha demostrado que esta droga *in vitro* produce aumento de la migración y proliferación de células mesenquimales derivadas de médula ósea, así como la formación de tubos cuando crecen estas células en Matrigel. También se observó un aumento del factor de Von Willebrand y α actina de músculo liso cuando se administró simvastatina a un modelo de isquemia en ratones C57NL/6J.⁷¹ Se ha demostrado que, cuando se aplica localmente, la simvastatina aumenta la reparación de fracturas en ratones Balb-C.⁷²

Una estrategia muy interesante es la utilización de una matriz tridimensional constituida por materiales que además de ser osteoconductores y angioconductores, sean osteoinductores y angiointductores, lo cual evita la necesidad de utilización de sistemas de liberación de drogas. Kim y col. desarrollaron un *scaffold* poroso utilizando polvo de hueso bovino comercial y distintas concentraciones de fibrinógeno como aglutinante. Sus ensayos *in vivo* demostraron que estos materiales poseen una gran capacidad de reparación ósea.⁷³ Un *scaffold* de colágeno silificado fue desarrollado por Sun y col., quienes encontraron en ensayos *in vivo* un aumento en la reparación ósea que promovió tanto la osteogénesis como la angiogénesis.⁷⁴ Murphy y col. estudiaron cómo distintas proporciones de ClNa y fibrina producen distintos hidrogeles que permiten a las células mesenquimales encapsuladas en ellos diferenciarse a un fenotipo osteogénico o angiogénico. Observaron que, según el hidrogel formado, aumenta la reparación en estudios *in vivo*.⁷⁵

Todas estas y otras estrategias no son mutuamente excluyentes. Se puede utilizar una, o combinaciones de varias, para obtener *scaffolds* que liberen en diferentes momentos distintos factores de crecimiento, cada uno con una cinética de liberación acorde con la etapa del proceso de reparación en que interviene, controlando así la variable temporal. Además, pueden no ser homogéneos y estar formados por capas, en cada una de las cuales haya distintos factores de crecimiento controlando la variable espacial. Controlar las variables temporales y espaciales resulta clave pues, durante el proceso de reparación de la herida, no todos los factores de crecimiento se liberan al mismo tiempo ni todos en el mismo lugar, ya que existen distintos gradientes de concentración témporo-espaciales.⁴⁴ Barati y col. utilizaron diversos materiales para generar de manera separada nanocápsulas con



VEGF y BMP-2, cada una con distinta tasa de liberación. Luego diseñaron un *scaffold* con canales formado por un hidrogel que contenía células madres mesenquimales humanas con BMP-2 nanoencapsulados, y rellenaron los canales con otro hidrogel a base de gelatina que contenía células formadoras de colonia de células endoteliales y VEGF nanoencapsulados. Este sistema demostró que la velocidad de liberación de los factores de crecimiento puede ajustarse según la composición de los polímeros utilizados para las encapsulaciones, favoreciendo el acoplamiento témporo-espacial de la angiogénesis y osteogénesis en comparación con la administración directa de BMP-2 y VEGF.⁷⁶ En forma más simple que el anterior, Eğri y Eczacıoğlu generaron una matriz porosa de un polímero triblock de poliácido láctico y polietilenglicol para inmovilizar en forma física BMP-2 y VEGF logrando una liberación secuencial de estos.⁷⁷

Precauciones y perspectivas futuras

En esta revisión se han resumido algunos conceptos y estrategias para diseñar sistemas que, una vez implantados en el hueso dañado, puedan llevar a cabo la reparación ósea acoplada a una adecuada angiogénesis. Conocer la relación entre factores de crecimiento (u otras sustancias angio/osteoinductoras) *scaffolds*-células resulta crucial para el desarrollo de sistemas osteogénicos y angiogénicos (Figura 6). La cinética de liberación de los factores dependerá de su interacción con el conjunto, así como del método de preparación, química y geometría del *scaffold*/sistema de liberación de droga. Gran cantidad de trabajos muestran que los efectos producidos por los factores utilizados están en relación con varios aspectos donde se destacan su concentración y su combinación con otros factores de crecimiento. Además, la dosis requerida dependerá del modo de administración; por ello, concentraciones mínimas y máximas deben

ser determinadas en cada sistema para garantizar el efecto deseado sin el riesgo de desarrollar efectos adversos, reacciones tóxicas, formación de hueso ectópico, tumorigénesis, aterosclerosis o incluso retinopatía proliferativa. Debido a que tanto la angiogénesis como la osteogénesis en el organismo surgen de la acción coordinada de distintos factores de crecimiento y no de uno solo, el diseño de *scaffolds* con combinación de distintos factores de crecimiento ha demostrado en muchos casos un efecto sinérgico entre los factores utilizados permitiendo disminuir la dosis necesaria de estos, hecho que llama la atención de numerosos grupos de investigación alrededor del mundo. Dado que, en muchos casos, los mecanismos moleculares que producen el sinergismo no se conocen, su elección al momento debe realizarse con cuidado pues se ha descrito que pueden producirse resultados inhibitorios entre ellos. Un tema importante para tener en cuenta es la liberación secuencial o no de los factores seleccionados. Por otro lado, se debe considerar el tipo de hueso que se va a reparar (cortical o trabecular), pues los factores de crecimiento y sus combinaciones pueden poseer distintos efectos dependiendo del tejido óseo, sin descuidar asimismo consideraciones respecto de la variabilidad genética, edad y condiciones patológicas de los pacientes. La baja vida media de los factores de crecimiento, una vez que se implanta el *scaffold* en el organismo, ha impulsado a estudiar sistemas que utilicen herramientas de terapia génica; sin embargo, siempre existe un riesgo oncogénico asociado. Asimismo, muchos de los factores de crecimiento actúan no solo en forma paracrina y autocrina, sino también en forma intracrina, por lo que es necesario profundizar los estudios sobre las herramientas de terapias génicas para asegurar la bioseguridad de estos sistemas. Por otro lado, no solo existen interacciones de células endoteliales y osteoblastos, sino son estas las únicas cé-

lulas en intervenir sobre la reparación ósea. Otras células como las perivasculares, macrófagos, neutrófilos y osteoclastos desempeñan distintos roles en este proceso. Por ello, es necesario conocer cómo afectan a estas distintas células los factores de crecimiento que se liberarán, y cómo intervienen en su *cross talk* original. Naturalmente, las

células se encuentran adheridas a la matriz extracelular e interaccionan con ella; conocer este tipo de comunicación entre células y matriz extracelular resulta de interés a fin de diseñar *scaffolds* biomiméticos, teniendo en cuenta propiedades mecánicas, promoción de la adhesión celular y difusión de sustancias.^{15,42-45,50,65}

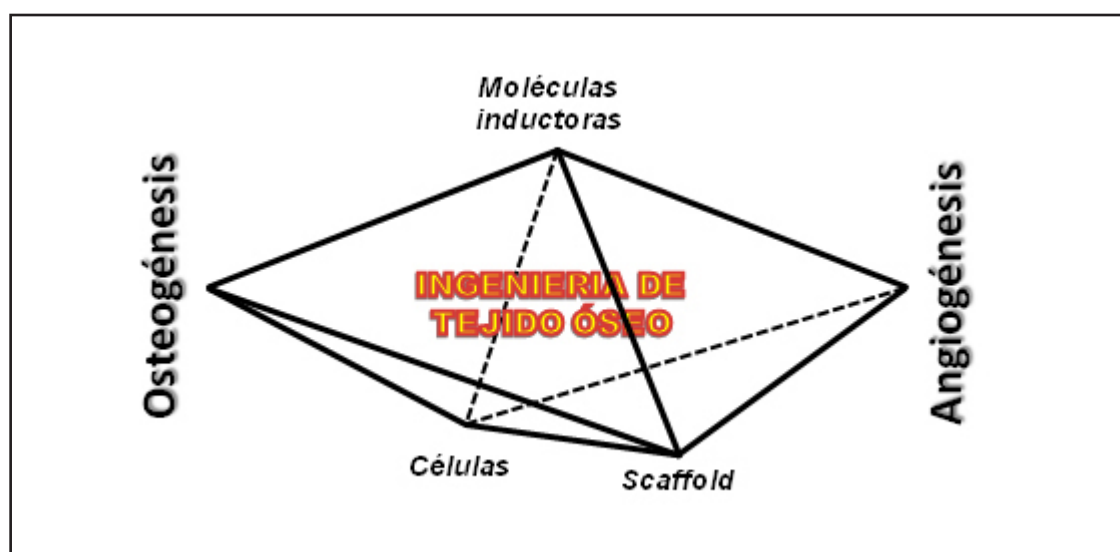


Figura 6. Los nuevos direccionamientos en Ingeniería de Tejido Óseo son favorecer tanto la formación de una nueva vasculatura como la formación ósea a fin de poder llevar a cabo la reparación del hueso dañado.

Conclusiones

La administración exitosa de factores de crecimiento para la angiogénesis y la osteogénesis se ve afectada por el sistema de liberación localizado, la cinética de liberación témporo-espacial, la concentración apropiada de cada uno de ellos y las combinaciones de factores de crecimiento seleccionados; claro que, sin dejar de prestar atención a la seguridad, la eficacia de su administración, la geometría ósea y de su lesión y el estado general del paciente. Por lo tanto, la matriz tridimensional o *scaffold* no solo debe ofre-

cer una matriz para el crecimiento de células osteoprogenitoras y vasos sanguíneos, sino también un sistema de liberación de droga que proporcionen los factores de crecimiento en la dosis y cinética correctas. Los avances científicos proporcionarán conocimientos para diseñar biomateriales no solo bioinspirados sino también biomiméticos, los cuales ayudarán a que la Ingeniería de Tejido sea una alternativa terapéutica real en el futuro para el tejido óseo dañado, garantizando que la osteogénesis y la angiogénesis se logren en forma coordinada.



Agradecimientos

FJM es miembro de la Carrera del Investigador de CONICET y Docente de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. El autor agradece las sugerencias y correcciones del Dr. Prof. Antonio D. McCarthy realizadas durante la redacción del presente artículo.

Conflicto de intereses: el autor declara no tener conflicto de intereses.

Recibido: noviembre 2020

Aceptado: enero 2021

Referencias

1. Lieberman JR, Friedlaender GE. Bone Regeneration and Repair, Biological and Clinical Application. Totowa, New Jersey: Human Press; 2005. p. 21.
2. Burr DB, Allen MR (2nd eds). Basic and Applied Bone Biology. Cambridge, MA: Academic Press; 2019. pp. 235-53.
3. Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int* 2011; 22: 2003-6.
4. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: Mechanisms and Interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11:45-54.
5. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T-H, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 2016; 86:119-30.
6. Sözen T, Özisik L, Basaean NC. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol* 2017; 40:46-56.
7. Sánchez A. El caballero y la dama con osteoporosis. *Actual Osteol* 2010; 6:81-9.
8. Lino AB, Fernández JM, Molinuevo MS, Cortizo AM, McCarthy AD. Efecto *in vitro* del ranelato de estroncio sobre células progenitoras óseas de ratas diabéticas. *Actual Osteol* 2016; 12:78-86.
9. McCarthy AD, Molinuevo MS, Cortizo AM. AGEs and Bone ageing in Diabetes mellitus. *J Diabetes Metab* 2013; 4:276.
10. Salgado AJ, Coutinho O, Reis RL. Bone Tissue Engineering: State of art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4:743-65.
11. Majidinia M, Sedeghpour A, Yousefi B. The role of signaling pathways in bone and regeneration. *J Cell Physiol* 2018; 233:2937-48.
12. Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-size bone defect: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2017; 28:351-62.
13. Rupp M, Biehl C, Budak M, Thormann U, Heiss C, Alt V. Diaphyseal long bone nonunions-types, aetiology, economics and treatment recommendations. *Int Orthop* 2017; 42:247-58.
14. Augat P, von Rüden C. Evolution of fracture treatment with bone plates. *Injury, Int J Care Injured* 2018; 49S1:S2-S7.
15. Rather HA, Jhala D, Vasita R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 2019; 103:109761.
16. Henkel J, Woodruff MA, et al. Bone regeneration based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st century perspective. *Bone Research* 2013; 3:216-48.
17. Bagde AD, Kuthe AM, et al. State of the art technology for bone tissue engineering and drug delivery. *Innovation and Research in BioMedical engineering* 2019; 40:133-44.
18. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260:920-6.
19. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft

- Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma* 2019; 33:201-13.
20. Klifto CS, Gandhi SD, Sapienza A. Bone graft options in upper-extremity surgery. *J Han Surg Am* 2018; 43:755-61.
 21. Alonzo M, Álvarez Primo F, et al. Bone tissue engineering technique, advances and scaffolds for treatment of bone defects. *Curr Opin Biomed Eng* 2021; 17:100248.
 22. Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *J Bone Joint Surg Aim* 2011; 93:2227-36.
 23. Querido W, Falcon JM, Kandel S, Pleshko N. Vibrational spectroscopy and imaging: applications for tissue engineering. *The Analyst* 2017; 142:1005-17.
 24. Fillingham Y, Jacobs J. Bone graft and their substitute. *Bone Join J* 2016; 98B (suppl A):6-9.
 25. Fernández JM, Molinuevo MS, Cortizo AM, McCarthy AD, Cortizo MS. Characterization of poly- ϵ -caprolactone/polyfumarate blends as scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polymer* 2010; 21:1297-312.
 26. Fernández JM, Cortizo MS, Cortizo AM, Abraham GA. Osteoblast behavior on novel porous polymeric scaffolds. *J Biomater Tissue Eng* 2011; 1:86-92.
 27. Cortizo AM, Ruderman G, Correa G, Mogilner IG, Tolosa EJ. Effects of surface topography of collagen scaffolds on cytotoxicity and osteoblast differentiation. *J Biomater Tissue Eng* 2012; 2:125-32.
 28. Lastra ML, Molinuevo MS, Lezak IB, Mijangos C, Cortizo MS. Nanostructured fumarate copolymer-chitosan crosslinked scaffold: An In vitro osteochondrogenesis regeneration study. *J Biomed Mater Res Part A* 2018; 106A:570-9.
 29. Carvalho MS, Silva JC. Co-culture cell-derived extracellular matrix loaded electrospun microfibrillar scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 2019; 99:479-90.
 30. López Álvarez M, Rodríguez Valencia C, Serra J, González P. Bio-Inspired ceramics: promising scaffolds for bone tissue engineering. *Procedia Eng* 2013; 59:51-8.
 31. Yoon BH, Choi WY, Kim HE, Kim JH, K JH. Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering. *Scr Mater* 2008; 58:537-40.
 32. Lin Q, Zhang X, et al. The structural evolution of Bioglass after implantation in femoral defects. *J Non-Cryst Solids* 2021; 552:120439.
 33. Okasha A, Abdelghany AM, Wassel AR, Menazea AA. Bone bonding augmentation and synergetic attitude of gamma-irradiated modified borate bioglass. *Radiat Phys Chem* 2020; 17:109018.
 34. Fernández JM, Molinuevo MS, Cortizo MS, Cortizo AM. Development of an osteoconductive PCL-PDIPF-Hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5: e126-35.
 35. Lino AB, McCarthy AD, Fernández JM. Evaluation of Strontium-containing PCL-PDIPF scaffolds for bone tissue engineering: In vitro and in vivo studies. *Ann Biomed Eng* 2019; 47:902-12.
 36. Govindan R, Gu FL, Karthi S, Girija EK. Effect of phosphate glass reinforcement on the mechanical and biological properties of freeze-dried gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Mater Today Commun* 2020; 22:100765.
 37. Benedini L, Laiuppa J, Santillán G, Baldini M, Messina P. Antibacterial alginate/nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering: Assessment of their bioactivity, biocompatibility, and antibacterial activity. *Mater Sci Eng C* 2020; 115: 111101.
 38. Bi YG, Lin ZT, Deng ST. Fabrication and characterization of hydroxyapatite/sodium alginate/chitosan composite microspheres for drug delivery and bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 2019; 100:576-83.
 39. Bongio M, van den Beucken JJJP, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA. Development of bone substitute materials: from “biocompatible” to “instructive”. *J Mater Chem* 2010; 20: 8747-59.
 40. Hench LL, Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J R Soc Interface* 2010; 7:S379-S91.



41. Huang YZ, Xie HQ, Li X. Scaffolds in bone tissue engineering; research progress and current application. *Encyclopedia of Bone Biology*. Cambridge, MA: Academic Press; 2020. pp. 201-15.
42. Yin G, et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *Int Immunopharmacol* 2013; 16:214-23.
43. Saran U, Piperni SG, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys* 2014; 561:102-17.
44. Mastrullo V, Cathery W, Velliou E, Madeddu P, Campagnolo P. Angiogenesis in Tissue Engineering: as Nature Intended? *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: doi:10.3389/fbioe.2020.00188.
45. Collin-Osdoby P. Role of vascular endothelial cells in bone biology. *J Cell Biochem* 1994; 55:304-9.
46. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 2001; 29:560-4.
47. Holstein JH, Klein M, et al. Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Brit J Pharmacol* 2008; 154:1055-62.
48. Seebach C, Henrich D, et al. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell Transplant* 2012; 21:1667-77.
49. Bose S, Fielding G, Tarafder S, Banyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends Biotechnol* 2013; 31:594-603.
50. Almubarak S, Nethercott H, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. *Bone* 2016; 83:197-209.
51. Deckers MM, van Bezooijen RL, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002; 143:1545-53.
52. Götz W, Reichert C, Canullo L, Jäger A, Heinemann F. Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing - A brief overview. *Ann Anat* 2012; 194:171-3.
53. Maruotti N, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. *J Cell Physiol* 2017; 232: 2957-63.
54. King WJ, Krebsbach PH. Growth factor delivery: How surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64:1239-56.
55. Wernike E, Montjovent MO, et al. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater* 2010; 19:30-40.
56. Patterson J, Siew R, Herring SW, Lin ASP, Guldberg R, Stayton PS. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterial* 2010; 31:6772-81.
57. Farokhi M, Mottaghitalab F, Ai J, Shokrgozar MA. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *Int J Pharm* 2013; 454:216-25.
58. Fernández JM, Molinuevo MS, McCarthy AD, Cortizo AM. Strontium Ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with ZN^{+2} and Mg^{+2} . *Biometals* 2014; 27:601-7.
59. Fernández JM, Molinuevo MS, Sedlinsky C, Schurman L, Cortizo AM, McCarthy AD. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblast cells via calcium channel activation. *Eur J Pharmacol* 2013; 706:41-7.
60. Álvarez-Lloret P, Fernández JM, et al. Multi-scale approach for the evaluation of bone mineralization in strontium ranelate-treated diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 2018; 186:457-66.
61. Molinuevo MS, Fernández JM, Cortizo AM, McCarthy AD, Schurman L, Sedlinsky C. Advanced glycation end products and strontium ranelate promote osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in vitro: Preventive role of vitamin D. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 450:94-104.

62. Xia L, Yin Z, et al. Akernamite bioceramics promote osteogénesis, angiogénesis and suppress osteoclastogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Sci Rep* 2016; 6: 22005.
63. Zisch AH, Lutolf MP, et al. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell-ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J* 2003; 17:2260-2.
64. Leslie-Barbick JE, Moon JJ, West JL. Covalently-Immobilized Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Endothelial Cell Tubulogenesis in Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogels. *J Biomater Sci* 2009; 20:1763-79.
65. García JR, García AJ. Biomaterial-mediated strategies targeting vascularization for bone repair. *Drug Deliv and Transl Res* 2015; 6:77-95.
66. Liang Y, Kiick KL. (2014). Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. *Acta Biomater* 2014; 10:1588-600.
67. Kim BS, Yang SS, Kim CS. Incorporation of BMP-2 nanoparticles on the surface of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold using an ϵ -polycaprolactone polymer emulsion coating method for bone tissue engineering. *Colloids Surf. B* 2018; 170:421-9.
68. Besada L, Peruzzo P, Cortizo AM, Cortizo MS. Preparation, characterization and in vitro activity evaluation of triblock copolymer-based polymerosomes for drugs delivery. *J Nanopart Res* 2018; 20: 67.
69. Hsieh MK, Wu CJ, et al. BMP-2 gene transfection of bone marrow stromal cells to induce osteoblastic differentiation in a rat calvarial defect model. *Mater Sci Eng C* 2018; 91: 806-16.
70. Khorsand B, Nicholson N, et al. Regeneration of bone using nanoplex delivery of FGF-2 and BMP-2 genes in diaphyseal long bone radial defects in a diabetic rabbit model. *J Control Release* 2017; 248:53-9.
71. Zhang Y, Zhang R, Li Y, He G, Zhang D, Zhang F. Simvastatin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of hindlimb ischemia. *Mol Biol Rep* 2012; 39:285-93.
72. Skoglund B, Aspenberg P. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:98-103.
73. Kim BS, Sung HM, You HK, Lee J. Effects of fibrinogen concentration on fibrin glue and bone powder scaffolds in bone regeneration. *J Biosci Bioeng* 2014; 118:469-75.
74. Sun J, Jiao K, et al. Intrafibrillar silicified collagen scaffold modulates monocyte to promote cell homing, angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 2017; 113:203-16.
75. Murphy KC, Hughbanks ML, Binder BYK, Vissers CB, Leach JK. Engineered Fibrin Gels for Parallel Stimulation of Mesenchymal Stem Cell Proangiogenic and Osteogenic Potential. *Ann Biomed Eng* 2015; 43:2010-21.
76. Barati D, Shariati SRP, Moeinzadeh S, Meleiro-Martin JM, Khademhosseini A, Jabbari E. Spatiotemporal release of BMP-2 and VEGF enhances osteogenic and vasculogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and endothelial colony-forming cells co-encapsulated in a patterned hydrogel. *J Control Release* 2016; 223:126-36.
77. Eğri S, Eczacıoğlu N. Sequential VEGF and BMP-2 releasing PLA-PEG-PLA scaffolds for bone tissue engineering: I. Design and in vitro tests. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017; 45:321-9.