

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS
FACULTAD DE VETERINARIA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA
GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO
SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES.

Tesis presentada por la licenciada
Natalia Miño Fariña, para optar al
Grado de Doctor en Veterinaria

Natalia Miño Fariña
Lugo, Marzo 2006



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS

FACULTADE DE VETERINARIA

CAMPUS UNIVERSITARIO S/N

27002 LUGO SPAIN

TEL. + 34 982 28 59 28

FAX. + 34 982 28 59 37

D. José Luis Pereira Espinel y D. Antonio González Cantalapiedra, Profesores Titulares de Cirugía y Patología Quirúrgica, y D. Fernando Muñoz Guzón, Profesor Asociado de Ciencias de la Salud, del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación titulado "Estudio comparativo de la respuesta ósea generada por dos cementos y un biovidrio basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales", presentado por Dña. Natalia Miño Fariña para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Cirugía y Patología Quirúrgica del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela. Revisado el presente estudio, quedamos conformes con su presentación para ser juzgado.

A los efectos oportunos firmamos el presente informe

En Lugo, Marzo de 2006

Fdo. José L. Pereira Espinel

Fdo. Antonio González Cantalapiedra

Fdo. Fernando Muñoz Guzón

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**

Agradecimientos

No sé qué extraña razón me condujo a que este fuera el último apartado escrito de mi Tesis Doctoral, cuando en realidad ocupa una de las primeras hojas de este trabajo. Quizás fue la incertidumbre de que no llegara a tomar forma, o quizás el temor a no saber agradecer todo lo que debo a tanta gente. Hemos recorrido un largo camino hasta llegar aquí, salpicado de gratos momentos personales y otros muchos muy tristes; y todo ello empapa aún más el mérito de conseguir llevar a cabo este proyecto, porque puedo decir con toda seguridad que nunca se habría realizado sin el apoyo moral, la comprensión, y la amistad que todos vosotros me habéis mostrado tanto en los buenos como en los malos momentos.

Quiero agradecer de forma particular a mis directores de Tesis, los profesores D. José Luis Pereira Espinel, D. Antonio González Cantalapiedra y D. Fernando Muñoz Guzón el apoyo que cada uno me ha sabido brindar de una manera especial. José Luis Pereira me ha demostrado de forma constante toda su valentía, voluntad y entrega al trabajo, siendo él el “responsable” directo de mi gran motivación como investigadora, en concreto en el campo en que se lleva a cabo esta Tesis Doctoral, sin olvidar su ayuda a mi desarrollo como cirujana y veterinaria clínica de pequeños animales. Antonio siempre ha sido para mí un modelo a seguir como profesional y como persona; su capacidad de trabajo supera lo imaginable y su inquebrantable buen humor rompe todas las fronteras de la desesperación y el abatimiento, ilusionándonos con que todo es posible si uno se esfuerza. Fernando es el motor que mueve toda mi labor profesional, el punto de apoyo a todas aquellas inquietudes que me van surgiendo en el día a día y una fuente constante de ánimos, nuevas ilusiones y gran amistad. También quiero agradecer a Mónica López Peña el haber puesto a mi disposición todos sus conocimientos, su tiempo y su paciencia, porque gracias a su permanente ayuda

durante todo el tiempo en que se desarrolló este trabajo ha llegado a hacerse realidad, y a Rocío, que realizó todo el procesado de muestras y siempre estuvo preocupada de que las cosas fueran perfectas y a tiempo.

No puedo dejar de mencionar al resto de profesores integrantes de la Unidad de Cirugía y Patología Quirúrgica y Radiología: Andrés Barreiro, que fue mi tutor durante la etapa de formación de los estudio de doctorado y me sigue cuidando como entonces, Ana López Beceiro y Mónica Vila Pastor, que me han apoyado incondicionalmente en mis buenos y malos momentos y Blanca L. Villanueva, que siempre está dispuesta a hacerme sonreír; igualmente quiero expresar toda mi gratitud a mis compañeros del día a día, desde nuestros primeros pasos en esta Facultad. Eva y yo podríamos escribir un libro de aventuras llenas de surrealismo, ciencia-ficción y momentos cómicos, y en numerosos capítulos del mismo tendríamos que contar con otra pareja de actores de excepción, Osquítar y Mariano.

Del mismo modo, no me puedo olvidar de todos los integrantes de la Unidad de Patología Médica y de la Nutrición, porque me han adoptado como una más, y siempre me he sentido entre ellos como en casa. Entre los profesores integrantes de esta Unidad, Luis E. Fidalgo me ha respaldado continuamente y Ana Goicoa siempre me ha dado los mejores y más cariñosos consejos, ilusionándose con mis logros y consolándome en mis fracasos. Germán Santamarina y Maruska Suárez han sido un referente constante para mí, y gracias a su sincera amistad y a todos esos momentos de risas, consejos y ayuda que me brindan han conseguido que muchas veces recupere la ilusión con lo que estoy haciendo. A Marus le debo agradecer de un modo muy especial todo el tiempo que dedicó a que esta Tesis Doctoral cogiera su forma y formato definitivos. Sin su buen gusto, paciencia y cariño nunca sería lo que es. También he

contado con el respaldo de Marta Miranda, que siempre llena de alegría y optimismo todo lo que la rodea y Lucas Rigueira, que nos aporta tranquilidad, confianza y afecto. De la misma forma guardo todo mi agradecimiento hacia Juanillo, que siempre tiene una palabra de ánimo y sus conocimientos informáticos nos han sacado de más de un apuro, e Isa, que es un soplo de aire fresco cada día, e irradia afecto y amistad por donde va. Gracias por el gran apoyo, tanto humano como profesional, y el cariño que siempre he recibido de cada uno de vosotros.

También quiero dar las gracias al Hospital Clínico Veterinario Rof Codina de la Facultad de Veterinaria de Lugo, en la persona de su Director Gerente D. Luis Felipe de la Cruz Palomino, porque han puesto a mi disposición toda la infraestructura que he necesitado. Por otro lado, todo el personal que forma parte de él, desde el servicio de administración, pasando por el servicio de limpieza, cuidadores y mantenimiento, siempre han estado para lo que he necesitado. Debo agradecer de forma muy especial a Merche y a Cris, que siempre me han alentado y me han ayudado en todo lo que podían y más, y, como no, a todos los residentes (Marta, Luz, María, Yoli, Ana...), internos y facultativos, que son la esencia real de este Hospital. Gracias por estar siempre al pie del cañón, y por compartir guardias, cirugías, reuniones, fiestas, despedidas... tantas cosas. Aunque muchos ya siguieron otro camino, seguimos manteniendo una gran amistad, que sobrepasa las fronteras del espacio, lugar y tiempo.

De la misma forma, debo agradecer a la Consellería de Innovación e Industria que durante estos años ha financiado mi formación brindándome la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral, tanto en la Facultad de Veterinaria de Lugo como durante mi estancia en el Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la

Universidad Autónoma de Barcelona, al lado del profesor D. Félix García Arnas y todo el Servicio de Cirugía y Anestesiología, que me han tratado estupendamente.

Por otro lado, también deben estar presentes en estas líneas los miembros del Departament de Ciència del Materials i Tecnologia Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, en especial la profesora Dña. María Pau Ginebra y Sergio del Valle, por haberme acogido tan bien durante el tiempo que estuve con ellos, y haberme puesto al día en el mundo de los biomateriales, y los miembros del Departament de Llenguatges i Sistemes Informàtics de la Universitat Politècnica de Catalunya, en la persona de la profesora Dolores Ayala Vallespi, por haberme descubierto el campo de la microtomografía computerizada y sus múltiples aplicaciones.

Un lugar muy especial en esta interminable lista de personas gracias a las cuales todo esto cobra sentido lo ocupan mis amigos de Coruña, de Lugo, de la facultad, del instituto, del colegio y, paradojas de la vida, de la guardería: María, Amparo, Tomás, Ana, Carmen, M^a José, Carlos, José Luis, Diego, Santi, Suso, Ledi,... Cuántas veces una llamada, un café o un mensaje de ánimo han sido suficientes para volver a empezar, evitar el desánimo o llenarme de alegría. Me gustaría que estas palabras expresaran con sinceridad todo lo que significáis para mí.

Y por último sólo me queda respirar profundamente para coger aire y así poder agradecer con toda mi energía a mis padres todos los sacrificios que han pasado en esta vida para darnos mucho más de lo que nos hacía falta y enseñarnos con su ejemplo a crecer como personas y a permanecer siempre unidos, a mis hermanas, porque juntas formamos ese explosivo trío de ases que lucha contra todo y gana todas las batallas (aunque a veces la misión lleve a papá y mamá a la locura), a mis abuelos y padrinos,

que siempre nos han cuidado, querido y protegido, y a mis tíos y primos, porque sin ellos faltaría la alegría en los momentos buenos y la unión en las malas pasadas con que nos sorprende la vida; de la misma forma, a la familia de Luciano, que es mi familia, le debo innumerables momentos de diversión, ilusión y apoyo constante y a Luciano el estar a mi lado cada día, entenderme, cuidarme y quererme.

*A madrina,
por querernos tanto.*

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**

*Abreviaturas
y
Fórmulas*

Listado de abreviaturas:

ABNR: área de biomaterial no reabsorbido.

AI: área del implante.

AMO: amplitud media de osteoide.

ATT: área trabecular total.

Å: amstrongs.

AENOR: Asociación Española de Normalización.

AFNOR: Association Française de Normalisation.

Aos / ATT: relación área de osteoide / área trabecular total.

Aos: área de osteoide.

BMP: proteína morfogenética ósea.

BPO: peróxido de benzoilo.

Ca: calcio.

CDHA: hidroxapatita deficiente en calcio.

CEN: Comité Europeo de Normalización.

cm: centímetros.

CPC: fosfato monocálcico.

DCP: fosfato dicálcico.

DCPD: fosfato dicálcico dihidratado.

DDS: drug delivery system.

DIN: Deutsche Internationale Normalisierung.

DRX: Difracción de Rayos X.

Ds: Desviación estándar.

EDX: sistema de microanálisis del microscopio de barrido.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico.

g: gramos.

Gpa: gigapascales.

IP: índice de penetración.

IGF: factor de crecimiento insulínico.

ISO: International Standard Organization.

kg: kilogramos.

L.T.O.: longitud total de osteoide.

L/P: relación líquido/polvo.

MCPM: fosfato monocálcico monohidratado.

ml: mililitros.

mm: milímetros.

Mpa: megapascales.

° C: grados centígrados.

P: fósforo.

PC: profundidad de crecimiento.

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PHA: hidroxapatita precipitada.

pQCT: microtomografía computerizada periférica.

RCS: superficie de la cavidad residual.

RER: retículo endoplasmático rugoso.

rpm: revoluciones por minuto.

SBH: crecimiento óseo espontáneo.

SEM: microscopio óptico de barrido.

Sv: superficie porcentual de hueso neoformado.

TCP: fosfato tricálcico.

TEM: microscopio óptico de transmisión.

TGF: factor de crecimiento transformante.

TTCP: fosfato tetracálcico.

UEO: unidad estructural ósea.

UMB: unidad multicelular básica.

W: watios.

μm: micras.

μTC: microtomografía computerizada.

Listado de fórmulas:

Ag NO₃: nitrato de plata.

Al₂O₃: óxido de aluminio.

B₂O₃: óxido de boro.

BaO: óxido de bario.

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂: hidroxiapatita.

Ca₃(PO₄)₂: fosfato tricálcico.

CaCO₃: carbonato cálcico.

CaHPO₄: fosfato cálcico.

CaKPO₄: fosfato cálcico potásico.

CaO: óxido de calcio.

CaSO₄.1/2H₂O: sulfato de calcio hemihidratado.

CaSO₄.2H₂O: sulfato de calcio dihidratado.

CH₃COOH: ácido acético.

Cl⁻: ion cloro.

(CO₃)₂: ion carbonato.

Fe₂O₃: óxido férrico.

FeO₂: dióxido férrico.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

K⁺: ion potasio.

K₂O: óxido de potasio.

Mg²⁺: ion magnesio.

MgO: óxido de magnesio.

Na⁺: ion sodio.

Na₂CO₃: carbonato sódico.

Na₂HPO₄: fosfato sódico.

Na₂O: óxido de sodio.

NaH₂PO₄·2H₂O: fosfato sódico dihidratado.

NH₄H₂PO₄: fosfato nítrico.

P₂O₅: pentaóxido de fósforo, anhídrido fosfórico.

SiO₂: dióxido de silicio.

SO₄²⁻: ion azufre.

Sr²⁺: ion estroncio.

Ti⁴⁺: ion titanio.

TiO₂: dióxido de titanio.

Zn²⁺: ion cinc.

ZnO: óxido de cinc.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**



Indices

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA: AVANCES EN IMPLANTOLOGIA. NECESIDAD DEL USO DE SUSTITUTIVOS DEL HUESO	39
2. OBJETIVOS A DESARROLLAR.....	49
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	50
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	53
3.1. NOMENCLATURA	53
3.2. MODELO ANIMAL PARA INVESTIGACIÓN.....	59
3.2.1. Particularidades anatómicas de los conejos.....	60
3.2.1.1. Anatomía ósea	61
3.2.1.2. Sistema muscular.....	62
3.2.1.3. Inervación del fémur distal.....	65
3.2.1.4. Irrigación del fémur distal	65
3.3. CARACTERÍSTICAS DEL HUESO.....	66
3.3.1. Histología del tejido óseo.....	67
3.3.1.1. Matriz ósea	68
3.3.1.1.1. Matriz orgánica	68
3.3.1.1.2. Matriz inorgánica.....	68
3.3.1.2. Células óseas	69
3.3.1.2.1. Células osteoprogenitoras.....	71
3.3.1.2.2. Linaje osteoblástico.....	72
3.3.1.2.3. Linaje osteoclástico.....	76
3.3.2. Organización del tejido óseo	79
3.3.2.1. Según su grado de madurez	79
3.3.2.1.1. Hueso inmaduro (primario, fibroso o entretejido).	79
3.3.2.1.2. Hueso maduro (secundario o laminar).....	79
3.3.2.2. Según su forma.....	80
3.3.2.2.1. Huesos planos	80
3.3.2.2.2. Huesos cortos	80
3.3.2.2.3. Huesos largos	80
3.3.2.3. Según su estructura macroscópica.....	80
3.3.2.3.1. Hueso compacto o cortical	81
3.3.2.3.2. Hueso esponjoso	81
3.3.3. Estructura microscópica general de los huesos	81
3.3.3.1. Laminillas óseas.....	81

3.3.3.2. Periostio.....	82
3.3.3.3. Endostio.....	82
3.3.4. Estructura del hueso compacto	83
3.3.4.1. Estructura de la diáfisis de un hueso largo.....	83
3.3.4.1.1. Sistema de Havers u osteonas	83
3.3.4.1.2. Sistemas intersticiales de laminillas.....	84
3.3.4.1.3. Sistema externo e interno de laminillas	84
3.3.4.1.4. Conductos vasculares.....	85
3.3.4.2. Estructura de la epífisis de un hueso largo	86
3.3.4.3. Estructura del hueso esponjoso.....	86
3.3.5. Dinámica del hueso.....	86
3.3.5.1. Osteogénesis	86
3.3.5.1.1. Osificación intermembranosa	87
3.3.5.1.2. Osificación endocondral	89
3.3.5.2. Crecimiento óseo	91
3.3.5.2.1. Crecimiento en longitud.....	91
3.3.5.2.2. Crecimiento en espesor	95
3.3.5.3. Remodelado óseo	95
3.3.5.4. Reparación ósea (Reparación de las fracturas)	98
3.3.6. Biomecánica del hueso.	100
3.4. BIOMATERIALES	102
3.4.1. Respuesta del organismo a los implantes.....	103
3.4.1.1. Fibroosteointegración.....	103
3.4.1.2. Fibrointegración	104
3.4.1.3. Osteointegración	105
3.4.1.4. Biointegración	107
3.4.1.4.1. Retención mecánica.....	108
3.4.1.4.2. Retención biológica.....	108
3.4.2. Estudios preclínicos y de biocompatibilidad	108
3.4.2.1. Pruebas de toxicidad.....	113
3.4.2.2. Pruebas de funcionalidad	114
3.4.2.2.1. Ensayos de laboratorio.....	114
3.4.2.2.2. Ensayos clínicos.	114
3.4.3. Biomateriales como sustitutivos óseos	115
3.4.3.1. Biomateriales biológicos.....	118
3.4.3.1.1. Moléculas bioactivas	118
3.4.3.2. Biomateriales biomédicos.....	124

3.4.3.2.2. Biocerámicas	127
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	179
4.1. MATERIAL.....	179
4.1.1. Material vivo. Animales de experimentación	179
4.1.2. Material implantable. Tipos de biomateriales	179
4.1.3. Material y equipamiento utilizados	180
4.2. MÉTODO	181
4.2.1. Manejo de los animales.....	181
4.2.2. Estabulación de los animales	181
4.2.3. Elaboración y síntesis de los implantes	182
4.2.4. Grupos de trabajo.....	185
4.2.5. Protocolo anestésico	186
4.2.6. Técnica quirúrgica.....	187
4.2.7. Evaluación postoperatoria, profilaxis y control	191
4.2.8. Protocolo de eutanasia.....	192
4.2.9. Preparación histológica de las muestras.....	192
4.2.9.1. Fijación	192
4.2.9.2. Deshidratación	192
4.2.9.3. Infiltración	193
4.2.9.4. Inclusión y polimerización.....	193
4.2.9.5. Preparación del bloque para obtener una superficie paralela.....	194
4.2.9.6. Preparación de la superficie de interés.....	195
4.2.9.7. Tinciones	195
4.2.10. Técnicas de análisis de los implantes.....	197
4.2.10.1. Análisis semicuantitativo de los implantes mediante microscopía de barrido.....	197
4.2.10.2. Análisis histomorfométrico.....	201
4.2.10.2.1. Medidas histomorfométricas.....	202
4.2.10.2.2. Parámetros histomorfométricos	203
4.2.10.3. Análisis histológico de la interfase hueso-implante.....	204
4.2.10.4. Microtomografía computerizada	205
4.2.10.4.1. Microtomografía computerizada cuantitativa (QCT)	206
4.2.10.5. Estudio radiológico	207
4.2.11. Estudio estadístico de los datos.....	208
5. RESULTADOS.....	211
5.1. ESTUDIO RADIOLÓGICO	211
5.1.1. Vidrio	211

5.1.2. Control	212
5.1.3. Cemento denso.....	213
5.1.4. Cemento poroso.....	214
5.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	215
5.2.1. Vidrio	215
5.2.1.1. Primera semana.....	215
5.2.1.1.1. Análisis cualitativo.....	215
5.2.1.1.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	215
5.2.1.2. Cuarta semana	216
5.2.1.2.1. Análisis cualitativo.....	216
5.2.1.2.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	217
5.2.1.3. Duodécima semana	218
5.2.1.3.1. Análisis cualitativo.....	218
5.2.1.3.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	219
5.2.1.3.3. Comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio y del ratio calcio/fósforo	219
5.2.2. Control	222
5.2.2.1. Primera semana.....	222
5.2.2.1.1. Análisis cualitativo.....	222
5.2.2.2. Cuarta semana	222
5.2.2.2.1. Análisis cualitativo.....	222
5.2.2.3. Duodécima semana	222
5.2.2.3.1. Análisis cualitativo.....	222
5.2.3. Cemento denso.....	223
5.2.3.1. Primera semana.....	223
5.2.3.1.1. Análisis cualitativo.....	223
5.2.3.1.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	224
5.2.3.2. Cuarta semana	225
5.2.3.2.1. Análisis cualitativo.....	225
5.2.3.2.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	225
5.2.3.3. Duodécima semana	226
5.2.3.3.1. Análisis cualitativo.....	226
5.2.3.3.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	227
5.2.3.3.3. Comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio y del ratio calcio/fósforo	227
5.2.4. Cemento poroso.....	230
5.2.4.1. Primera semana.....	230

5.2.4.1.1. Análisis cualitativo.....	230
5.2.4.1.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	230
5.2.4.2. Cuarta semana.....	231
5.2.4.2.1. Análisis cualitativo.....	231
5.2.4.2.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	232
5.2.4.3. Duodécima semana	233
5.2.4.3.1. Análisis cualitativo.....	233
5.2.4.3.2. Análisis semicuantitativo (EDX).....	233
5.2.4.3.3. Comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio y del ratio calcio/fósforo	234
5.3. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO	238
5.3.1. Comparativa en el tiempo de los diferentes materiales y control	238
5.3.1.1. Vidrio	238
5.3.1.2. Control	238
5.3.1.3. Cemento denso.....	239
5.3.1.4. Cemento poroso.....	240
5.3.2. Comparativa de la evolución en el tiempo entre los distintos materiales.....	244
5.4. ESTUDIO CUALITATIVO	252
5.4.1. Vidrio	252
5.4.1.1.: Primera semana.....	252
5.4.1.2. Cuarta semana.....	253
5.4.1.3. Duodécima semana	254
5.4.2. Control	256
5.4.2.1. Primera semana.....	256
5.4.2.2. Cuarta semana.....	257
5.4.2.3. Duodécima semana	258
5.4.3. Cemento denso.....	259
5.4.3.1. Primera semana.....	259
5.4.3.2. Cuarta semana.....	260
5.4.3.3. Duodécima semana	261
5.4.4. Cemento poroso.....	263
5.4.4.1. Primera semana.....	263
5.4.4.3. Duodécima semana	265
6. DISCUSIÓN.....	271
6.1. MODELO EXPERIMENTAL.....	271
6.2. ESTUDIO RADIOLÓGICO	276
6.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	277

6.4. MICROTOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA	286
6.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	288
6.6. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO	297
7. CONCLUSIONES	305
8. BIBLIOGRAFÍA	309
9. RESÚMENES	349
9.1. RESUMEN.....	349
9.2. SUMMARY.....	352
9.3. RÉSUMÉ	355

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: particularidades anatómicas fémur distal del conejo.....	61
Figura 2: sistema muscular asociado al fémur (vista lateral)	64
Figura 3: irrigación sanguínea de las extremidades posteriores de los conejos	66
Figura 4: estructura del tejido óseo de un hueso largo ilustrando los tipos celulares, su morfología y localización.....	70
Figura 5: representación de los distintos tipos celulares y su proceso de formación.....	71
Figura 6: morfología de las células osteoprogenitoras (aumentos originales x100).....	71
Figura 7: imagen izquierda: morfología de los osteoblastos mediante microscopía electrónica de transmisión (aumentos originales x 6100); imagen derecha: formación de los osteoblastos (aumentos originales x 400).....	74
Figura 8: imagen izquierda: osteocito en el interior de una laguna (imagen de TEM. Aumentos originales x 5700); imagen derecha: formación de los osteocitos a partir de los osteoblastos (aumentos originales x 200) ^d	76
Figura 9: imagen izquierda: osteoclasto. (imagen de TEM; aumentos originales x3400)e; imagen derecha: osteoclasto (aumentos originales x100) ^c	78
Figura 10: imagen de hueso compacto (aumentos originales x100).....	81
Figura 11: imagen de hueso esponjoso (aumentos originales x400).....	81
Figura 12: detalle de una osteona rodeada de las lagunas óseas en que se sitúan los osteocitos (aumentos originales x400).....	84
Figura 13: figura izquierda: estructura del hueso compacto; figura derecha: estructura del sistema de Havers ^c	85
Figura 14: representación de los distintos pasos que tienen lugar durante la osificación intermembranosa (aumentos originales x100) ^d	88
Figura 15: representación de la acción de los osteoclastos en la remodelación ósea (aumentos originales x200) ^d	89
Figura 16: representación del proceso de osificación endocondral (aumentos originales x200) ^d	90
Figura 17: crecimiento de un hueso largo ^d	91
Figura 18: placa de crecimiento ^d	92
Figura 19: unidad multicelular básica ^a	97
Figura 20: preparación paciente.....	187
Figura 21: implantación vidrio.....	187
Figura 22: muestras tras la polimerización.....	194

Figura 23: montaje sobre una lámina acrílica.....	194
Figura 24: volumen de interacción del haz electrónico y señales electrónicas emitidas por la muestra	198
Figura 25: puntos de realización del análisis cuantitativo (EDX).....	200
Figura 26: evolución radiológica del vidrio bioactivo implantado a las semanas 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F).....	211
Figura 27: evolución radiológica del control a la semana 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F)	212
Figura 28: evolución radiológica del cemento denso a las semanas 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F)	213
Figura 29: evolución radiológica del cemento poroso implantado a las semanas 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F).....	214
Figura 30: implante de vidrio tras una semana de la implantación.....	215
Figura 31: implante de vidrio a las cuatro semanas de la implantación	216
Figura 32: implante de vidrio a las doce semanas de la implantación.....	218
Figura 33: detalle de la zona de interfase entre el implante y el hueso.....	218
Figura 34: control a la semana de implantación	223
Figura 35: control a las 4 semanas de implantación.....	223
Figura 36: control a las doce semanas de implantación	223
Figura 37: cemento denso a la semana de implantación.....	224
Figura 38: cemento denso a las 4 semanas de implantación	225
Figura 39: implante de cemento denso a las doce semanas de la implantación	226
Figura 40: detalle de la zona de unión entre el implante y el hueso.....	226
Figura 41: detalle de la zona de unión entre el implante y el hueso.....	226
Figura 42: cemento poroso a la semana de la implantación.....	230
Figura 43: cemento poroso a las cuatro semanas de la implantación.....	231
Figura 44: cemento poroso a las doce semanas de la implantación	233
Figura 45: detalle de la unión íntima entre cemento poroso y hueso	233
Figura 46: estudio cualitativo del vidrio a 1 semana de la implantación	252
Figura 47: estudio cualitativo del vidrio a 4 semanas de la implantación	253
Figura 48: estudio cualitativo del vidrio a 12 semanas de la implantación	254
Figura 49: estudio cualitativo del control a 1 semana de la implantación.....	256
Figura 50: estudio cualitativo del control a 4 semanas de la implantación	257
Figura 51: estudio cualitativo del control a 12 semanas de la implantación	258
Figura 52: estudio cualitativo del cemento denso a 1 semana de la implantación.....	259

Figura 53: estudio cualitativo del cemento denso a 4 semanas de la implantación.....	260
Figura 54: estudio cualitativo del cemento denso a 12 semanas de la implantación	261
Figura 55: estudio cualitativo del cemento poroso a 1 semana de la implantación.....	263
Figura 56: estudio cualitativo del cemento poroso a 4 semanas de la implantación.....	264
Figura 57: estudio cualitativo del cemento poroso a 12 semanas de la implantación.....	265

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: propiedades de los biomateriales.....	109
Tabla 2: respuesta nociva provocada por un biomaterial.....	112
Tabla 3: pruebas de toxicidad.....	115
Tabla 4: clasificación de los biomateriales	118
Tabla 5: clasificación de las biocerámicas en función de sus componentes químicos principales	128
Tabla 6: tipos de biocerámicas para aplicaciones médicas	129
Tabla 7: ejemplos de composiciones de algunos vidrios y vitrocerámicas	130
Tabla 8: estructura básica de los vidrios a base de silicio e interconexión mediante un átomo de oxígeno.....	131
Tabla 9: tipos de vidrios de fosfato y sus principales características	138
Tabla 10: esquema del comportamiento de un sistema cementante	153
Tabla 11: variables que afectan a un sistema cementante	159
Tabla 12: fosfatos de calcio que precipitan a temperatura ambiente o corporal	160
Tabla 13: otros compuestos a base de fosfato adecuados para utilizar como componentes de la fase en polvo de los cementos de fosfatos de calcio.....	161
Tabla 14: material y equipamiento utilizados.....	180
Tabla 15: temporalización y diseño del experimento.....	185
Tabla 16: tinción de Lévai Laczcó.....	196
Tabla 17: tinción de Kossa	197
Tabla 18: criterios de Lane y Sandhu para la valoración radiológica	207
Tabla 19: valoración radiológica del vidrio bioactivo implantado a las semanas 1, 4 y 12	211
Tabla 20: valoración radiológica del control a las semanas 1, 4 y 12.....	212
Tabla 21: valoración radiológica del cemento denso a las semanas 1, 4 y 12	213
Tabla 22: valoración radiológica del cemento poroso a las semanas 1, 4 y 12	214
Tabla 23: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	216
Tabla 24: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	217
Tabla 25: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	219

Tabla 26: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	224
Tabla 27: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	225
Tabla 28: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	227
Tabla 29: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	231
Tabla 30: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	232
Tabla 31: porcentaje atómico (media \pm desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas	234
Tabla 32: resultados histomorfométricos obtenidos en el implante de vidrio a la semana 1, 4 y 12 de la implantación	238
Tabla 33: resultados histomorfométricos obtenidos en el control a la semana 1, 4 y 12 de la implantación	239
Tabla 34: resultados histomorfométricos obtenidos en el cemento denso a la semana 1, 4 y 12 de la implantación	240
Tabla 35: resultados histomorfométricos obtenidos en el cemento poroso a la semana 1, 4 y 12 de la implantación	242

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio en el vidrio.....	220
Gráfico 2: comparativa de la evolución en el tiempo del ratio calcio-fósforo en el vidrio.....	221
Gráfico 3: comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio en el cemento denso	228
Gráfico 4: comparativa de la evolución en el tiempo del ratio calcio-fósforo en el cemento denso	229
Gráfico 5: comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio en el cemento poroso	235
Gráfico 6: comparativa de la evolución en el tiempo del ratio calcio-fósforo en el cemento poroso	236
Gráfico 7: comparativa de la evolución en el tiempo del área trabecular total	244
Gráfico 8: comparativa de la evolución en el tiempo de la profundidad de crecimiento	245
Gráfico 9: comparativa de la evolución en el tiempo de la longitud total de osteoide	246
Gráfico 10: comparativa de la evolución en el tiempo de la amplitud media de osteoide.....	247
Gráfico 11: comparativa de la evolución en el tiempo de la superficie porcentual de hueso neoformado.....	248
Gráfico 12: comparativa de la evolución en el tiempo del ABNR	249
Gráfico 13: comparativa de la evolución en el tiempo del área de osteoide	250
Gráfico 14: comparativa de la evolución en el tiempo del área de osteoide/ATT	251

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**

*Introducción
y
Justificación del Tema*

NATALIA MIÑO FARIÑA

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA: AVANCES EN IMPLANTOLOGIA. NECESIDAD DEL USO DE SUSTITUTIVOS DEL HUESO

El área que se ocupa del desarrollo biotecnológico está despuntando como uno de los campos más prometedores en materia de investigación clínica debido en parte a la mayor implicación de los distintos sectores que colaboran en cada nuevo proyecto y al gran despliegue de medios tecnológicos que existen en la actualidad. Paralelamente, también existe una clara tendencia al desarrollo de nuevas áreas de experimentación. En este sentido, la implantología es un campo de investigación interesante por su proyección clínica debido a sus numerosas aplicaciones biomédicas, entre las que podemos destacar la creación de sustitutivos del hueso. Esta ciencia se desarrolla mayoritariamente en los países avanzados debido al aumento en la esperanza de vida y a la obligación social de proveer una buena calidad de vida a la población. Esto lleva a la aplicación de modernos procedimientos en cirugías reconstructivas o en la resolución de pérdidas iatrogénicas de hueso secundarias a resecciones óseas provocadas por tumores, infecciones o pseudo artrosis^{1,2}. Por otro lado, el incremento de pacientes jóvenes con diversas patologías sistémicas o grandes dificultades relacionadas a procesos de curación ósea tras sufrir accidentes de circulación también requiere el uso de sustitutivos óseos como terapia adyuvante o su asociación con implantes protésicos con el objetivo de

¹ Fini M., Giavaresi G., Aldini N. N., Torricelli P., Botter R., Beruto D., Giardino R. (2002): A bone substitute composed of polymethacrylate and β -tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. *Biomaterials* **23**, pps: 4523-4531.

² Hench L.L., Wilson J. (1993): An introduction to bioceramics. *Advanced Series in Ceramics* 1. Singapore: World Scientific Publishing Co, pps. 1-24.

mejorar la fijación biológica y el proceso de osteointegración¹. Esta búsqueda de soluciones potenciales a los problemas del tejido óseo justifica la gran demanda de materiales apropiados para la reconstrucción de defectos óseos y nos ofrece a su vez un importante campo para su desarrollo. Prueba del creciente interés que suscita este área, y de la utilidad clínica que presenta, es que el relleno de defectos óseos es actualmente un protocolo de rutina en un amplio número de procedimientos quirúrgicos como la realización de artoplastias, relleno de quistes óseos o tumores, pérdidas traumáticas de hueso, exodoncias, osteotomías y reabsorciones periodontales intraóseas, entre otros^{2,3}.

Los sustitutos óseos pueden ser autoinjertos, aloinjertos (también llamados xenoinjertos), o aloplásticos. El autoinjerto siempre ha sido considerado como el sustituto óseo más eficaz debido a sus propiedades osteoconductoras y osteointegradoras y, por ello, el uso de hueso autólogo, recogido de lugares seleccionados del esqueleto como la cresta ilíaca, continúa siendo el referente para este tipo de cirugías⁴. Pero, a pesar de su gran eficacia, presenta una capacidad limitada en cuanto a la cantidad que se puede obtener de cada paciente y a la necesidad de someter a los mismos a un segundo lugar de intervención para su colocación; todo esto incrementa la morbilidad entre un 8-10%, la duración de la estancia hospitalaria, la recuperación y, en definitiva, el coste total de la intervención⁵. También aumenta el riesgo de infección de la herida y de sangrado profuso, lo que conlleva una recuperación más lenta⁴.

³ **Sepulveda P., Bressiani A.H., Bressiani J.C., Meseguer L., König B. (2002):** In vivo evaluation of hidroxiapatite foams. *Journal of Biomedical Material Research* **62**, pps.: 587-592.

⁴ **Bauer T.W., Muschler G.F. (2000):** Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **371**, pps.: 10-27.

⁵ **Yunger E.M., Chapman M.W. (1989):** Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of Orthopedic Trauma* **3**, pps.: 192-197.

Estas limitaciones favorecen el empleo de otros sustitutivos óseos¹. Las principales alternativas a los autoinjertos incluyen:

- Aloinjertos: son la alternativa más habitual al autoinjerto. Antes de surgir la encefalopatía espongiiforme bobina (EEB) se usaba de forma rutinaria el hueso bovino desproteínizado⁶, pero en la actualidad suele utilizarse hueso desmineralizado seco y congelado. Poseen la ventaja de poder disponer de una cantidad, tamaño y forma más similar al defecto óseo que en el autoinjerto⁷, pero ofrecen el riesgo potencial de transmisión de enfermedades, rechazo o reabsorción⁶. Otra desventaja es que no pueden ser implantados inmediatamente y que es necesario realizar una serie de procedimientos para prepararlos antes de su uso. Por otro lado, tampoco admiten carga, de forma que sólo pueden ser utilizados como relleno.

- La otra alternativa son los biomateriales, que comprenden una gama de materiales cuyas principales características se basan en su gran pureza, de forma que evitan problemas de antigenicidad y morbilidad en el lugar de colocación. Dentro de los biomateriales de origen sintético distinguimos los metales, polímeros y cerámicas⁸. En general, las cerámicas tienen una ventaja sobre los metales para reparar y reconstituir partes dañadas del esqueleto, al carecer de toxicidad en el medio fisiológico^{2,9}. Las primeras cerámicas estaban compuestas de alúmina y circona y se consideraban inertes, pero, día a día, se

⁶ **Moghadam H.G., Sándor G.K.B., Holmes H.H.I., Clokie C.M.L. (2004):** Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic substitutes. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **62 (2)**, pps.: 202-213.

⁷ **Clokie C.M., Moghadam H.G., Jackson M.T. y cols. (2002):** Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *Journal of Craniofacial Surgery* **13 (1)**, pps.: 111-121.

⁸ **Orsini G., Ricci J., Scarano A., Pecora G., Petrone G., Leéis G., Piatelli A. (2004):** Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: An experimental study in rabbit. *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials* **66 B**, pps.: 199-208.

⁹ **Ravaglioli A., Krajewski A., Biasini V., Martinetti R., Mangano C., Venini G. (1992):** Interface between hydroxyapatite and mandibular human bone tissue. *Biomaterials* **13(3)**, pps.:162-7.

incorporan nuevos avances en este campo con el objetivo de obtener implantes más seguros, completamente reabsorbibles y asequibles económicamente¹. En este sentido, los biomateriales compuestos de fosfatos de calcio son muy utilizados debido a que no provocan toxicidad, por su gran semejanza a la fase mineral del hueso, además de manifestar una gran biocompatibilidad, bioactividad y excelentes propiedades osteoconductoras¹⁰. Por ello, se han desarrollado diferentes cerámicas bioactivas entre las que destacamos los vidrios y vitrocerámicos bioactivos y las cerámicas de fosfatos de calcio, que se caracterizan por formar un enlace directo con el hueso¹¹. Para establecer su aplicabilidad clínica es primordial caracterizar la respuesta ósea que producen. En referencia a este punto, diversos autores¹² han propuesto dos tipos de bioactividad¹³. Así, hablamos de implantes bioactivos de la clase A (Ej. Vidrios bioactivos a base de silicio) como aquellos que simplemente forman una unión directa con el hueso hospedador, y de implantes bioactivos de la clase B (Ej. Fosfatos de calcio) como los que tras la implantación van siendo reabsorbidos. Esta clasificación tiene gran importancia pues una de las propiedades principales que se busca actualmente en el diseño de estos biomateriales es su reabsorción controlada, y el estudio de la misma será un punto clave en nuestro trabajo de investigación. La limitación práctica que presentan las

¹⁰ **Gauthier O., Khairoun I., Bosco J., Obadia L., Bourges X., Rau C., Magne D., Bouler J.M., Aguado E., Daculsi G., Weiss P. (2003):** Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *Journal of Biomedical Material Research* **66 A**, pps.: 47-54.

¹¹ **Shinzato S., Kobayashi M., Moussa W.F., Kamimura M., Neo M., Kitamura Y., Kokubo T., Nakamura T. (2000):** Bioactive polymethyl methacrylate-based bone cement: Comparison of glass beads, apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic, and hydroxyapatite fillers on mechanical and biological properties. *Journal of Biomedical Material Research* **51**, pps.: 258-272.

¹² **Niedhart C., Maus U., Piroth W., Miltner O., Schmidt-Rohlfing B., Siebert C.H. (2004):** Evaluation of reabsorbable, in situ setting bone substitute in a sheep model. *Journal of Biomedical Material Research. Part B: Applied Biomaterial* **71 B**, pps.: 123-129.

¹³ **Hench L.L. (1998):** Bioactive glass: Present and future. En *Bioceramics* 11. LeGeros R.Z., LeGeros J. (Eds.), *World Scientific Publishing, Singapore*, pps. 31-36.

cerámicas es que no se amoldan perfectamente a la forma del defecto óseo en que son implantadas debido a su proceso de obtención, que generalmente se realiza por sinterización a altas temperaturas; esto implica que deben ser preformadas, pudiendo presentar problemas de mala adaptación a la cavidad ósea que deben rellenar, con la consiguiente falta de fijación. Esta desventaja fue corregida con el empleo de gránulos¹⁴ pero, en este caso, es frecuente que se produzca la migración de los mismos fuera del lugar de implantación. Por otro lado, sus propiedades mecánicas son muy malas y no soportan la presión de carga inicial sin instrumentos de estabilización, de forma que los pacientes deben mantener la zona intervenida ausente de cargas hasta que el hueso hospedador se incorpore dentro de la cerámica. De esta manera, la función que desarrollan las cerámicas bioactivas es similar a un implante óseo pero son mucho más lentas a la hora de adquirir forma y poseer unas apropiadas cualidades mecánicas^{15,16}; este tiempo de espera supone una gran desventaja en su aplicación. Una alternativa a los compuestos cerámicos prefabricados son los cementos de fosfatos de calcio, ya que el fraguado de estos materiales aporta unas propiedades mecánicas primarias añadidas a las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad¹⁷, lo que debe sumarse a la posibilidad de encontrar cementos de este tipo preparados comercialmente³. Se basan en una mezcla de compuestos minerales de fosfatos de calcio que reaccionan

¹⁴ **Oonishi H., Hench L.L., Wilson J., Sugihara F., Tsuji E., Matsuura M., Kin S., Yamamoto T., Mizokawa S. (2000):** Quantitative comparison of bone growth behaviour in granules of Bioglass®, A-W glass-ceramic, and hydroxiapatite. *Journal of Biomedical Material Research* **51**, pps.: 37-46.

¹⁵ **Bucholz R.W. (2002):** Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **395**, pps.: 44-52.

¹⁶ **Voor M.J., Arts J.J.C., Klein S.A., Walschot L.H.B., Verdonshot N., Buma P. (2004):** Is Hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *Journal of Biomedical Material Research. Part B: Applied Biomaterials* **71 B**, pps.: 398-407.

¹⁷ **Ohgushi H., Okumura M., Yoshikawa T., Inoue K., Senpuku N., Tamai S., Shors E.C. (1992):** Bone formation process in porous calcium carbonate and *hydroxyapatite*. *Biomaterials* **26(7)**, pps.: 885-95.

juntos para dar lugar a un material que solidifica *in situ* tras la inyección¹⁸. Estos cementos tienen distintos tiempos de fraguado y solidificación dependiendo de su formulación, pero nunca son formas preparadas ya para su uso, sino que requieren la realización de una mezcla extemporánea¹⁹. De este modo tienen el potencial de ofrecer las mismas ventajas que los compuestos de cerámica, pero proveen una estabilidad más rápida debido a la adherencia que crean al hueso nuevo con un ajuste excepcional al lugar del defecto óseo gracias a su moldeabilidad²⁰. Por otro lado, la posibilidad de modificar distintos factores en su composición y elaboración proporciona diferentes cementos con aplicaciones clínicas muy distintas^{10,12}. Tras su solidificación, estos cementos dan lugar a biomateriales densos con distintas porosidades; esta formación de poros, según numerosos autores, es necesaria para la osteoconducción ósea^{3,21,22}. El estudio de la influencia del tamaño de poro en estos cementos de fosfatos de calcio es otra de las razones que han llevado al desarrollo de este trabajo, pues diferentes estudios indican que cuando el material es muy denso proporciona la máxima firmeza, pero sufre una lenta incorporación^{17,22}, y cuando se hace poroso para facilitar la incorporación su firmeza o dureza es

¹⁸ **Xu H.H.K., Quinn J.B., Takagi S., Chow L.C., Eichmiller F.C. (2001):** Strong and macroporous calcium phosphate cement: Effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties. *Journal of Biomedical Material Research* **57**, pps.: 457-466.

¹⁹ **Constantz B., Ison I., Fulmer M., Poser R., Smith S., VanWagoner M., Ross J., Goldstein S.A. (1995):** Skeletal repair by in situ formation of mineral phase of bone. *Science* **267**, pps.: 1796-1799.

²⁰ **Lemaitre J., Munting E., Mirtchi A. (1992):** Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements. *Révue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale* **93**, pps.: 163-165.

²¹ **De Groot K. (1980):** Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* **1**, pps.: 47-50.

²² **Weiss P., Obadia L., Magne D., Bourges X., Rau C., Weitkamp T., Khairoun I., Bouler J.M., Chappardi D., Gauthier O., Daculsi G. (2003):** Synchrotron X-ray microtomography (on micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials* **24**, pps.: 4591-4601.

significativamente más débil^{22,23,24,25}. Un problema que presentan este tipo de biomateriales para su aplicación en el campo de la cirugía ortopédica es que en estos procedimientos es inevitable el sangrado profuso de la médula ósea; esto imprime una gran fuerza de empuje del cemento hacia el exterior, que no puede ser controlada debido al largo tiempo de fraguado del biomaterial y a su deterioro en contacto con la sangre^{25,26,27}. Este es otro punto clave del desarrollo de este estudio, pues con el objetivo de corregir este defecto se están diseñado distintos materiales y reactivos que acortan el tiempo de fraguado.

Este trabajo de tesis nos permitirá obtener una valiosa información relativa al comportamiento como potenciales sustitutivos óseos de un vidrio bioactivo y relacionarlo con dos cementos basados en fosfatos de calcio que pertenecen a un grupo de materiales que ostenta numerosos estudios *in vivo* y algunas series clínicas preliminares, que han validado su condición de moldes osteoconductores^{28,29}.

²³ **Togawa D., Bauer T.W., Woolf S.K., Hawkins M., Edwards B., An J.A. (2002):** Evaluation of resorption rates of five injectable bone cement using a rabbit femoral defect model. *Proceedings of the Orthopaedic Research Society Annual Meeting Dallas 27*, póster 738

²⁴ **del Real R.P., Wolke J.G., Vallet-Regi M., Jansen J.A. (2002):** A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials* **23**, pps.: 3673-3680.

²⁵ **del Real R.P., Ooms E., Wolke J.G., Vallet-Regi M., Jansen J.A. (2003):** In vivo response to porous calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Material Research* **65A**, pps.: 30-36.

²⁶ **Hoshiwaka A., Fukui N., Fukuda A., Sawamura T., Hattori M., Nakamura K., Oda H. (2003):** Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials* **24**, pps.: 4967-4975.

²⁷ **Miyamoto Y., Ishikawa K., Fukao H., Sawada M., Nagayama M., Kon M., Asakoa K. (1995):** In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement in bone. *Biomaterials* **16**, pps.: 855-860.

²⁸ **Navarro M., del Valle S., Ginebra M.P., Martínez S., Planell J.A. (2004):** Development of a new calcium phosphate glass ceramic porous scaffold for guided bone regeneration. *Key Engineering Materials* **254-256**, pps.: 945-948.

²⁹ **Kurashina K., Kurita H., Kotani A. et al. (1998):** Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an α -tricalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: A preliminary short term experiment in rabbits. *Biomaterials* **19 (7-9)** pps.:701-706.

La obtención final de estos materiales podrá ser de gran utilidad por sus futuras aplicaciones en medicina humana y por la posibilidad de extrapolar su uso a la clínica y cirugía veterinarias, donde su empleo está en las primeras fases de desarrollo, ofreciendo grandes ventajas a nivel económico gracias a su asequible coste en relación con los aloinjertos de hueso, y al ahorro que supone realizar una única intervención quirúrgica, de forma que consiguen minimizar el tiempo de recuperación y por lo tanto de hospitalización de nuestros pacientes.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**



Objetivos

2. OBJETIVOS A DESARROLLAR

Tras realizar un breve pero exhaustivo recorrido por los avances que en la actualidad aparecen en el terreno de la implantología, y comprender la necesidad de crear nuevos tipos de biomateriales, hemos diseñado un trabajo experimental, prospectivo, comparativo y controlado, que evalúa la actividad biológica de tres implantes de fosfatos de calcio. Somos conscientes de que nuestras contribuciones no responderán a los múltiples interrogantes que en este campo se están desarrollando, pero sí aportarán una nueva experiencia al tan presente y discutido terreno de los sustitutivos óseos, proporcionando información, resultados y conclusiones de interés para contribuir al desarrollo de los biomateriales cerámicos de fosfatos de calcio.

Por todo lo expuesto con anterioridad, hemos de indicar que esta memoria de tesis doctoral ha sido diseñada con el propósito de alcanzar el siguiente objetivo general:

“Estudiar in vivo la regeneración del tejido óseo frente a distintos biomateriales cerámicos, dos cementos y un vidrio, con el objetivo de su futura aplicación al campo de la cirugía ortopédica”.

Para alcanzar este objetivo general hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la respuesta biológica de dos tipos de cementos compuestos de fosfatos de calcio, uno denso y otro poroso, y de un vidrio bioactivo en animales de experimentación mediante su estudio histológico y radiológico.
- Analizar cuantitativamente la tasa de reabsorción *in vivo* y neoformación ósea mediante el estudio histomorfométrico de los biomateriales para

determinar sus características osteointegradoras y demostrar la capacidad osteoconductiva de los mismos.

- Evaluar cualitativamente la respuesta celular del hueso a los biomateriales en estudio para demostrar su comportamiento como sustitutivos óseos mediante imágenes obtenidas por microscopía de barrido y determinar su composición elemental con el fin de valorar su modificación en el tiempo usando el sistema semicuantitativo EDX.

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Para conseguir los objetivos definidos en la presente tesis doctoral, intentaremos demostrar la siguiente hipótesis de trabajo:

“La implantación de cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio promueve la regeneración ósea en defectos cavitarios experimentales en los que no aparece curación ósea espontánea, de forma comparable, cualitativa y cuantitativamente, a la que se obtiene por el propio mecanismo de reparación del tejido óseo”.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**

Revisión Bibliográfica

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. NOMENCLATURA

En este apartado vamos a definir distintos términos que serán ampliamente utilizados durante este trabajo y cuyo concepto será necesario para la correcta comprensión del mismo:

Bioabsorbible

Condición que presentan ciertos biomateriales que experimentan fenómenos de disolución en los fluidos corporales tras su implantación en un tejido del organismo¹.

Bioactividad

Capacidad de un material para inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor, dando lugar a una respuesta biológica específica en la interfase con los tejidos favoreciendo el enlace de ambos².

Biocompatibilidad

Tolerancia biológica local de cualquier biomaterial, que se caracteriza por la ausencia de respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como la carencia de efectos nocivos sobre tejidos distantes. En realidad, no existe ningún material totalmente biocompatible, por lo que

¹ Rokkanen P.U., Böstman O., Hirvensalo E., Mäkelä E.A., Partio E.K., Päätiälä H., Vainionpää S., Vihtonen K., Törmälä P. (2000): Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials* 21, pps.: 2607-2613.

² Bauer T.W., Smith S.T. (2002): Bioactive materials in orthopaedic surgery. Overview and regulatory considerations. *Clinical Orthopaedics* 395, pps.: 11-22.

sería más correcto usar el término aceptabilidad biológica, que corresponde a la interacción de los biomateriales con los tejidos susceptibles de estar en contacto con ellos³.

Biodegradación

Descomposición, rotura o lisis de un material mediada por un sistema biológico, producido por la actividad celular, enzimática, bacteriana o viral, llevando a su desaparición⁴.

Bioinercia

Ausencia de reacción de los tejidos vivos frente a cualquier material biocompatible tras su implantación, aunque puede suceder una mínima respuesta inmunológica⁵.

Biomaterial

Sustancia natural o sintética, o combinación de sustancias, que puede implantarse en el organismo para tratar, restituir, sustituir o aumentar un tejido, órgano o función⁶.

³ **Böstman O., Pihlajamäki H. (2000):** Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* **21**, pps.: 2615-2621.

⁴ **Temenoff J.S., Mikos A.G. (2000):** Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* **21**, pps.: 2405-2412.

⁵ **Strong D.M., Friedlaender G.E., Tomford W.W., Springfield D.S., Shives T.C., Burchardt H., Enneking W.F., Mankin H.J. (1996):** Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clinical Orthopedics* **326**, pps.: 107-114.

⁶ **Vallet-Regí M., Munuera L. (2000):** *Biomateriales: Aquí y ahora*. Vallet-Regí M., Munuera L. (Eds.), Ed. Dykinson, España.

Biorreabsorbible

Condición que poseen algunos biomateriales de degradarse en componentes de menor peso molecular, bien a través de las vías metabólicas u otras rutas alternativas del organismo⁷.

Implante

Material o tejido no viable, aunque no sea biológicamente inerte. Así, todo tejido capaz de ser almacenado sin bioprotección debería ser denominado implante⁸.

Injerto

Tejido u órgano que tras ser separado de su origen se inserta en un lugar del organismo, ya sea en el propio, en el de otro o en el de otra especie. Se caracteriza porque una vez implantado se puede rehabitar y se mantiene vital gracias a los tejidos vivos del receptor⁹.

Osteoconducción

Propiedad pasiva de un material o tejido de recibir y guiar el crecimiento óseo, por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor¹⁰.

⁷ **Roether J.A., Gough J.E., Bocaccini A.R., Hench L.L., Maquet V., Jérôme R. (2002):** Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polyglactide foams for bone tissue engineering. *Journal of Material Science. Materials in Medicine* **13**, pps.: 1207-1214.

⁸ **Greenspan D.C. (1999):** Bioactive ceramic implant materials. *Science* **4**, pps.: 389-393.

⁹ **Burchardt H. (1983):** The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **174**, pps.: 28-42.

¹⁰ **Bucholz R.W. (2002):** Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clinics Orthopaedics* **395**, pps.: 44-52.

Osteogénesis

Desarrollo y formación de tejido óseo a partir de células osteoformadoras como los osteoblastos¹¹.

Osteoinducción

Capacidad de un material para promover la diferenciación celular hacia la síntesis de matriz ósea mineralizada, mediada por los factores locales de crecimiento¹².

Osteointegración

Establecimiento de una continuidad fisicoquímica entre un implante y la matriz ósea sin interposición de tejido fibroso. También corresponde a la condición en que un injerto colabora en la neoformación ósea en base a la presencia de células mesenquimales. Este tipo de aporte celular es máximo con el autoinjerto óseo¹³.

Osteotransducción

Función que combina las propiedades de biodegradabilidad selectiva activa y de osteoconducción. De esta forma se produce una transformación real del material que, al tiempo que es degradado, entra a formar parte del proceso de neoformación ósea¹⁴.

¹¹ **Toth J.M., Lynch K.L., Hackbarth D.A. (1993):** Ceramic-induced osteogenesis following subcutaneous implantation of calcium phosphates. *Bioceramis* **6**, pps.: 9-13.

¹² **Yoon S.T., Boden S.D. (2002):** Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clinics Orthopaedics* **395**, pps.: 33-43.

¹³ **Albrektsson T., Johansson C. (2001):** Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* **10 (Suppl)**, pps.: S96-S101.

¹⁴ **Driessens F.C.M., Planell J.A., Boltong M.G., Khairoun I, Ginebra M.P. (1998):** Osteotransductive bone cements. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers (H) **212**, pps.: 427-435.

Sinterización

Procedimiento de producción de biomateriales cerámicos a partir de conglomerados de polvos previamente modelados, que posteriormente son sometidos a calentamiento en hornos especiales, en el rango de los 1000 a 1500° C, lo que provoca la fusión parcial de los componentes que, de esta manera, quedan soldados por presión¹⁵.

Soporte biomecánico

Función física de mantenimiento y de sostén, otorgado por una estructura anatómica¹⁶.

Sustitutivo

Material o segmento tisular capaz de desempeñar funciones de otro tejido del organismo. De acuerdo con esto, solamente los biomateriales con propiedades de osteoconducción y osteointegración pueden considerarse verdaderos sustitutivos óseos¹⁷.

¹⁵ Lin F.H., Lin C.C., Liu H.C., Huang Y.Y., Wang C.Y., Lu C.M. (1994): Sintered porous DP-bioactive glass and hydroxyapatite as bone substitute. *Biomaterials* **15**, pps.: 1087-1098.

¹⁶ Pelker R.R., Friaender G.E. (1987): Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *The Orthopedic Clinics of North America* **18**, pps.: 235-239.

¹⁷ Delloye C., Cnockaert N., Cornu O. (2003): Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthopaedica Belgica* **69**, pps.: 1-8.

Transplante

Implante de un tejido u órgano que requiere de una anastomosis vascular para mantener su viabilidad celular. El ejemplo más característico para la reparación ósea es el hueso autólogo vascularizado, que se denomina comúnmente injerto óseo vascularizado¹⁸.

¹⁸ **Taylor G.L., Millar G.D., Ham F.J. (1975):** The free vascularized bone graft: A clinical extension of microvascular techniques. *Plastic and Reconstructive Surgery* **55**, pps.: 533-544.

3.2. MODELO ANIMAL PARA INVESTIGACIÓN

Los estudios realizados sobre implantes se han basado en modelos animales. El Comité Europeo de Normalización (CEN) aprobó la Norma Europea (ISO10993-6:1994) en la cual se especifican los métodos de ensayo aplicables a la evaluación de los efectos locales de un implante sobre tejidos vivos¹⁹. Dentro de esta norma se recoge el cuidado de los animales y los requisitos reglamentarios nacionales que se deben cumplir con respecto a los animales de laboratorio. En ella se menciona que la **selección de la especie animal** debe hacerse en función del tamaño de las muestras del implante objeto de ensayo, de la duración prevista del ensayo en relación a la esperanza de vida de los animales y de las diferencias reconocidas entre las respuestas biológicas de los tejidos tanto duros como blandos de cada especie. Determina que para los ensayos a largo plazo con tejidos, huesos y músculos son adecuados animales tales como ratas, cobayas, conejos, perros, ovejas, cabras, cerdos y otros animales cuya esperanza de vida sea relativamente larga¹⁹. En este sentido, algunos autores han discutido sobre las especies animales que potencialmente podrían utilizarse para la implantación y el **lugar de colocación de los implantes** y han concluido que la anatomía de los huesos largos del conejo y la espina dorsal es muy similar a la humana²⁰. También el CEN propone como un lugar óptimo de colocación el fémur y tibia de conejo¹⁹. Las muestras de ensayo y los materiales de control deben implantarse en las mismas condiciones, sobre las mismas especies animales

¹⁹ **CEN (Comité Europeo de Normalización): Norma Española UNE-en 30993-6. (1995).** Evaluación biológica de los productos sanitarios. Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación (ISO 10993-6:1994). AENOR, Madrid.

²⁰ **Liebschner M.A.K. (2004):** Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* **25**, pps.: 1697-1714.

de igual sexo, edad y raza y los lugares anatómicos correspondientes. El número y tamaño de los implantes varía en función del tamaño de la especie y la localización anatómica²¹. Respecto al **tamaño**, el CEN propone considerar que para los conejos los implantes cilíndricos deben tener 2 mm de diámetro y 6 mm de longitud.

Por otro lado, los **períodos de ensayo** se dividen en: estudios a corto plazo (menos de 12 semanas) y a largo plazo (más de 12 semanas), en función de la respuesta biológica esperada al final del estudio, la cual depende de los materiales y del traumatismo quirúrgico. Los períodos mínimos de implantación requeridos para la observación en tejidos óseos suelen ser superiores a 12 semanas, llegando hasta las 104 semanas¹⁹.

3.2.1. Particularidades anatómicas de los conejos

Los lepóridos poseen ciertas particularidades anatómicas que los diferencian de otras especies y que tienen su interés en la realización del abordaje para la colocación de los implantes. En este sentido, sus huesos son relativamente delicados comparados con su masa muscular, de forma que el esqueleto representa sólo el 7-8% de su peso, mientras que el músculo comprende más del 50% del peso del cuerpo. Por ello, las fracturas, especialmente de tibia, son un problema potencial²². En comparación, el esqueleto de los gatos constituye

²¹ **Vidal A.R. (2001):** *Fases de un experimento y elección del modelo experimental*. Zúñiga J.M., Tur M.J.A., Milocco S.N., Piñeiro R. (Eds.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 587-605.

²² **Wingerd B.D. (1985):** The skeletal system. En *Rabbit dissection manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 1-11.

el 12-13% del peso corporal, pero el porcentaje de calcio es mayor en los huesos de conejos que en los de gatos²³.

Respecto al fémur distal, que es la región anatómica de nuestro interés, posee gran aportación sanguínea con abundante tejido óseo trabecular, lo que le da un gran poder osteogénico y buena respuesta a la osificación^{22,24}.

3.2.1.1. Anatomía ósea

El fémur, en su porción distal, articula sólo con la tibia. Las particularidades anatómicas que presenta son (**Figura 1**):

- Cóndilos medial y lateral: son los procesos articulares que presenta en la parte distal.
- Fosa intercondilar: es una depresión entre los cóndilos en la cara dorsal.
- Superficie patelar: es una depresión superficial en la región ventral y distal del hueso.
- Epicóndilos lateral y medial: son los procesos distales que se sitúan sobre los cóndilos²².

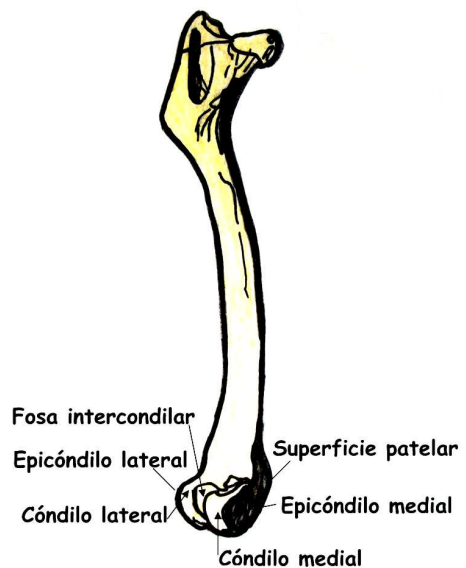


Figura 1: particularidades anatómicas fémur distal del conejo

²³ **Donnelly T.M. (2004):** Basic Anatomy, Physiology, and Husbandry. En *Ferrets, Rabbits, and Rodents. Clinical Medicine and Surgery*. Quesenberry K.E., Carpenter J.W. (Eds.), 2ª edición Saunders, Missouri, pps.: 136-147.

²⁴ **Kozma C., Macklin W., Cummins L.M., Mauer R. (1974):** Anatomy, Physiology and Biochemistry of the rabbit. En *The biology of the laboratory rabbit*. Weisbroth R.H., Flatt R.E., Kraus A.L. (Eds.), Academic Press, New York, pps.: 50-69.

El peroné se presenta como un hueso delgado que discurre por la cara lateral de la tibia, con la que se fusiona en su tercio distal. Proximalmente se une al cóndilo lateral de la tibia y su porción libre se une a ella por el ligamento interóseo²⁵, sin articular proximalmente con el fémur.

3.2.1.2. Sistema muscular

El sistema muscular está compuesto por el esqueleto muscular y su tejido conectivo asociado. Típicamente, una unidad muscular está formada por una región central llamada vientre muscular y las extensiones de tejido conectivo en sus extremos, que forman la llamada fascia profunda, con las que se unen al hueso. La estrecha banda de fascia profunda, que se extiende desde el músculo al hueso, se llama tendón, y la ancha y fina lámina de fascia que une un músculo al hueso se llama aponeurosis²². Durante la contracción de un músculo un extremo permanece prácticamente estacionario y el otro extremo mueve el hueso al cual está unido²⁵.

Encontramos varios músculos asociados al fémur distal (**Figura 2**); entre ellos está el tensor de la fascia lata, que tiene una implicación indirecta en la articulación de la rodilla. Consiste en una delgada lámina de músculo en la superficie craneolateral de la cadera que se eleva desde el borde ventral del ilion y sus fibras gradualmente desaparecen dentro de la banda iliotibial de la fascia lata, una dura y blanca aponeurosis que se apoya en la superficie craneolateral del muslo y se inserta en la tibia. La contracción de este músculo tensa la fascia lata y ayuda a la flexión, rotación y abducción de la extremidad. Tras desplazar el tensor de la fascia lata se localizan otros músculos implicados en la articulación de la cadera y, de forma indirecta, en la

²⁵ **Sánchez-Valverde M.A. (1997):** Fracturas de fémur. En *Traumatología y ortopedia de pequeños animales*. Sánchez-Valverde M.A. (Ed.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 153-169.

articulación de la rodilla. Comenzando por la cara dorsal se encuentra el bíceps femoral, que es un músculo largo que posee dos cabezas. La porción craneal se eleva desde los procesos espinosos de las vértebras lumbares y la porción caudal desde la tuberosidad isquiática. Las fibras de las dos se extienden para insertarse por medio de una ancha aponeurosis en la rótula y tuberosidad de la tibia. La contracción abduce el muslo y flexiona la extremidad. Medial al bíceps femoral se encuentran otros dos músculos que no son de nuestro interés, pues no forman parte de nuestro abordaje quirúrgico, y por ello sólo los mencionaremos: el músculo semimembranoso, que se divide en dos porciones, una superficial y otra profunda; y, al desinsertar la porción profunda del semimembranoso, se accede al músculo semitendinoso²⁶. La mayor parte de la superficie dorsal del muslo está ocupada por el músculo cuádriceps femoral, que es un músculo extensor largo y que está formado por un grupo de cuatro músculos que comparten su punto de inserción, un largo tendón que se prolonga hasta la rótula, se une a ella, y continúa como ligamento rotuliano hasta insertarse en la tuberosidad de la tibia. Los músculos que lo componen son, por un lado, el recto femoral, que se localiza en la superficie craneolateral del muslo, y tiene dos cabezas: una porción superficial, que parte de la espina ilíaca craneal y una porción profunda, que parte del ilion inmediatamente craneal del acetábulo. Ambas porciones están bordeadas por otros dos músculos que conforman el cuádriceps femoral; lateral se encuentra el vasto lateral, y medial el vasto medial. El vasto lateral es un músculo largo y delgado que parte del trocánter mayor del fémur y es visible en la superficie lateral del muslo parcialmente profundo al músculo tensor de la fascia lata. El vasto medial es un músculo grueso y largo que se encuentra inmediatamente medial al recto femoral y lateral al sartorio. Parte del cuello y discurre por la porción proximal del tercio distal del fémur. El último músculo que compone el

cuadríceps femoral es el vasto intermedio, que es un músculo largo y delgado que se sitúa dorsal al vasto lateral y profundo al bíceps femoral. Parte del trocánter mayor y de la superficie ventral del fémur. En la superficie ventral del muslo aparecen otros músculos que tampoco se encuentran en nuestra zona de abordaje quirúrgico, de forma que sólo los nombraremos; son, por un lado, el músculo sartorio, gracilis y pectíneo y, por otro, el abductor breve, el abductor largo y el abductor magno²⁶.

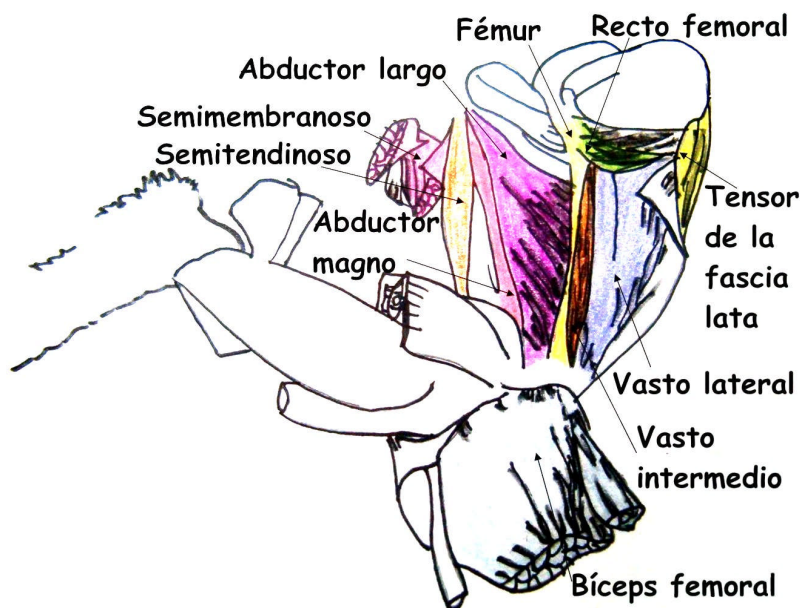


Figura 2: sistema muscular asociado al fémur (vista lateral)

²⁶ Wingerd B.D. (1985): The muscular system. En *Rabbit dissection manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 15-33.

3.2.1.3. Inervación del fémur distal

Proviene del nervio isquiático, que es una continuación del tronco lumbosacro que recibe los nervios lumbares 6º y 7º y el 1º y 2º sacros. Continúa bajo la superficie lateral del muslo y se divide en los nervios tibial y peroneo común²⁷.

3.2.1.4. Irrigación del fémur distal

Todas las arterias caudales al corazón son tributarias de la aorta descendente, que en su extremo caudal se ramifica en las arterias ilíacas comunes derecha e izquierda y la arteria caudal, que irriga la cola²⁸ (**Figura 3**). Las arterias ilíacas comunes son los vasos que irrigan las extremidades posteriores. Antes de continuar dentro de la región del muslo, se ramifican en tres arterias tributarias. La rama más craneal es la arteria iliolumbar (par), que atraviesa lateralmente la pared abdominal. La siguiente rama es la arteria ilíaca interna (par), también llamada hipogástrica, y que atraviesa caudalmente la cavidad abdominal a lo largo de la pelvis para irrigar las vísceras pélvicas y región glútea. La rama más caudal, que es a la vez la más grande de las formadas por la división de las ilíacas comunes, es la arteria ilíaca externa, que a su vez se ramifica en la arteria abdominal caudal y la arteria femoral profunda antes de seguir su recorrido como arteria femoral. La arteria femoral (par) es la rama que irriga el muslo y pasa a lo largo de la cara medial dando lugar a la arteria safena, que continúa distal por la cara medial del muslo²⁸.

Con respecto a las venas, todas las caudales al corazón drenan dentro de la vena cava caudal, que viaja paralela a la aorta descendente antes de unirse a

²⁷ **Wingerd B.D. (1985):** The nervous system. En *Rabbit dissection manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 34-40.

²⁸ **Wingerd B.D. (1985):** The circulatory system. En *Rabbit dissection manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 54-63.

la aurícula derecha. La vena femoral (par) se localiza en la región del muslo y continúa craneal como vena ilíaca externa al recoger la vena abdominal caudal tras su paso a través de la pared pélvica. Su mayor tributaria, la vena safena mayor (par), realiza su recorrido por la cara medial de la pata. La vena femoral viaja paralela a la arteria femoral²⁸.

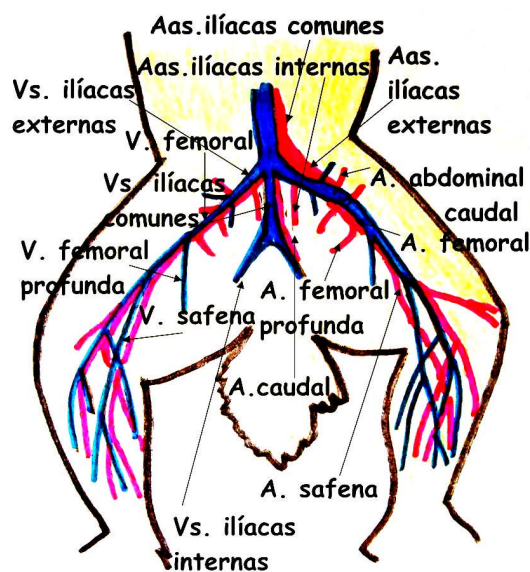


Figura 3: irrigación sanguínea de las extremidades posteriores de los conejos

3.3. CARACTERÍSTICAS DEL HUESO

El tejido óseo, junto con el cartilaginoso, constituye el esqueleto de los mamíferos. Posee una serie de características que podrían parecer contradictorias, pues tiene una resistencia a la tensión similar a la del hierro, pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible; estas propiedades son

fundamentales para desempeñar sus funciones básicas²⁹. En este sentido, podemos destacar que es el principal componente del esqueleto adulto por lo que permite la acción mecánica de la musculatura, protege órganos vitales y alberga la médula ósea hematopoyética. El hueso sirve además de reservorio de calcio, fósforo y otros iones, regulando el metabolismo del calcio y del fósforo en la sangre, lo que posibilita la regulación de su homeostasis, el crecimiento óseo y la reparación de fracturas³⁰. Por todo ello, podemos decir que, además de su función de sostén y de actuar como una cubierta protectora, el hueso desempeña acciones metabólicas muy importantes. Una vez formado, los minerales presentes en este tejido no son secuestrados de forma irreversible, si no que pueden ser movilizados por diferentes mecanismos. Así, el hueso constituye el depósito orgánico más importante de calcio (99% del total) y de fósforo (85% del total)³¹.

3.3.1. Histología del tejido óseo

Histológicamente, el tejido óseo consta de células y fibras inmersas en una sustancia fundamental amorfa mineralizada³¹. Podemos dividir a los componentes del hueso en dos grandes grupos:

²⁹ **Gómez Gordo L., Moya Jiménez L., Vidal Rubial S. (2004):** *Tratado de Histología Veterinaria*. Gázquez Ortiz A., Blanco Rodríguez A. (Eds), Masson, Barcelona (España), pps. 105-125.

³⁰ **Paniagua Gómez-Álvarez R., Nistal Martín de Serrano M., Sesma Egozcue M. P., Álvarez-Uría Rico-Valdemoro M., Anadón Álvarez R., Fraile Laíz B., Sáez Crespo F. J., de Miguel González M. P. (1998):** Tejidos de sostén: Cartilaginoso y óseo. En *Citología e histología vegetal y animal: Biología de las células y tejidos animales y vegetales*. Paniagua R. (Ed), 2ª edición Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., Madrid (España), pps.: 513-552.

³¹ **Fawcett D. W., Jenhs R. P. (1999):** Hueso. En *Compendio de Histología*. Fawcett D. W., Jenhs R. P. (Eds), Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid (España), pps.: 73-86.

3.3.1.1. Matriz ósea

Más de un 99% del volumen de la matriz ósea se halla mineralizado (hueso cortical: 99,9%; hueso esponjoso: 99,2%), por lo que posee un componente orgánico y otro inorgánico.

3.3.1.1.1. Matriz orgánica

Constituye aproximadamente el 35% del peso seco del hueso³². Este componente orgánico se halla integrado por colágeno tipo I (85-90%) y una pequeña proporción de otras proteínas (10-15%): proteoglicanos (biglicano, decorina), glucosaminoglicanos, glucoproteínas, proteínas implicadas en la adhesión celular (trombospondina, osteonectina, sialoproteína ósea) y osteocalcina (proteína que fija el calcio a la matriz ósea)^{29,33}.

Hasta que la matriz orgánica del hueso se calcifica, el tejido presente se denomina tejido osteoide o prehueso. El osteoide puede observarse en forma de finos ribetes de unas 10 micras de espesor (**Figura 4**) que revisten la superficie de algunas trabéculas y tapizan algunas cavidades intracorticales²⁹. Está formado por sustancia fundamental y colágeno no calcificado, que tarda unos diez días en mineralizarse³⁰.

3.3.1.1.2. Matriz inorgánica

Constituye cerca del 65% del peso seco del hueso. Está compuesta principalmente por calcio y fósforo, junto con otros componentes como

³² **Banks W.J. (1986):** Supportive Tissues-Bone. En *Applied Veterinary Histology*. Banks W.J. (Ed), 2ª edición Williams and Wilkins, Baltimore (USA), pps.: 119-145.

³³ **Young B. y Heath J.W. (2000):** Skeletal tissues. En *Wheather's functional histology. A text and colour atlas*. Young, B. y Heath J.W. (Eds.), Churchill Livingstone, London, pp. 172-192.

bicarbonato, citrato, magnesio, sodio y potasio^{32,34}. También muestra gran afinidad por metales pesados y ciertos contaminantes radioactivos presentes en el ambiente³⁵.

El calcio y fósforo se encuentran, primordialmente, en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$; sin embargo, también hay cristales amorfos de fosfatos de calcio²⁹. Los iones más superficiales de estos cristales atraen agua y forman una capa de hidratación que permite el intercambio de los mismos con el líquido extracelular³¹.

La matriz ósea es la responsable de las extraordinarias propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión. De hecho, esta estructura es muy similar a la que se trató de conseguir cuando se desarrolló el hormigón armado. En este material de construcción el entramado de hierro realiza un papel funcional similar al que en el hueso llevan a cabo las fibras colágenas y el hormigón realiza el papel funcional que en el hueso lleva a cabo el mineral. Así, si el hueso se descalcifica conserva su forma original pero se vuelve tan flexible que se puede doblar como una pieza de caucho compacto. Si se extrae el componente orgánico del hueso, el esqueleto mineralizado conservará su forma original, pero se volverá muy frágil y podrá fracturarse con facilidad³³.

3.3.1.2. Células óseas

El tejido óseo está formado por múltiples células que desempeñan funciones muy diferenciadas, lo que hace que su morfología y localización sea muy

³⁴ **Gartner L.P., Hiatt J.L. (1997):** Cartílago y hueso. En *Histología: Texto y Atlas*. Gartner L.P., Hiatt J.L. (Ed). Mc Graw-Hill-Interamericana. México, pps.: 114-136.

³⁵ **Dellmann H.D. (1993):** Tejidos conjuntivos y de sostén. En *Histología veterinaria*. Dellmann (Ed), Acribia, S.A., Zaragoza (España), pps.: 31-58.

diferente. El siguiente esquema ilustra de forma clara el proceso de formación y localización celular:

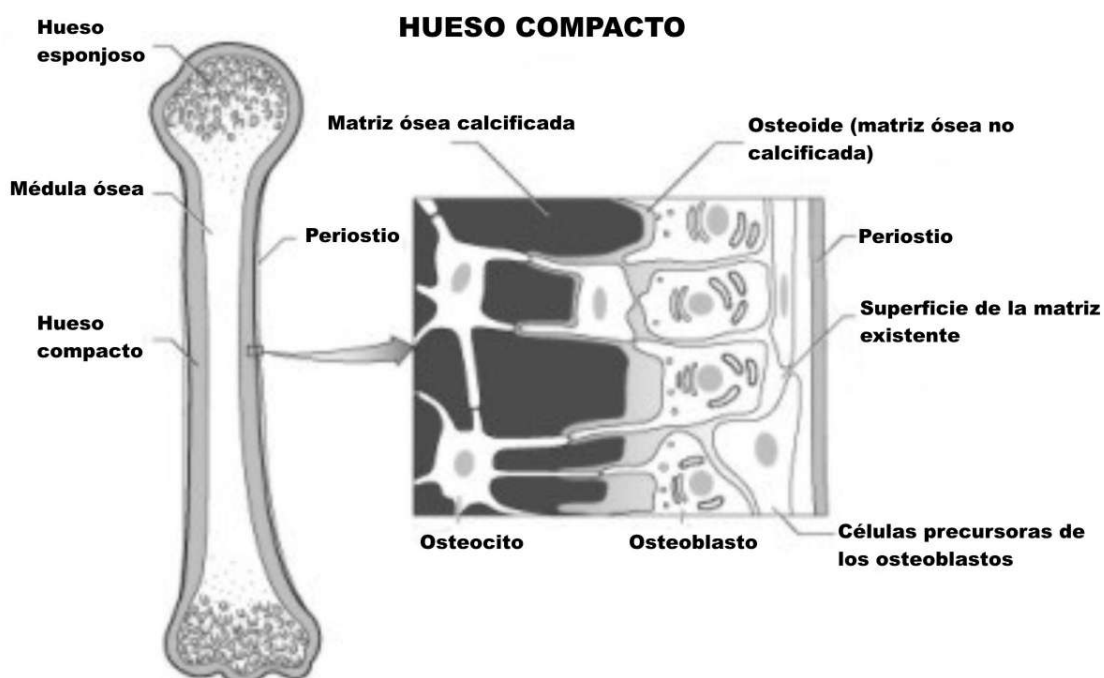


Figura 4: estructura del tejido óseo de un hueso largo ilustrando los tipos celulares, su morfología y localizaciónⁱ

A continuación, nos referiremos a los diferentes tipos celulares que aparecen en el tejido óseo y que aparecen representados en la **figura 5**:

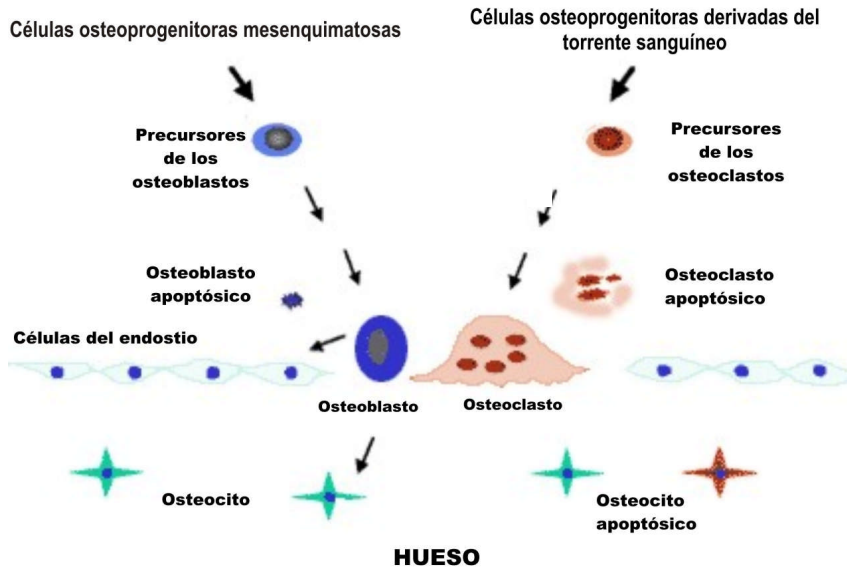


Figura 5: representación de los distintos tipos celulares y su proceso de formaciónⁱⁱ

3.3.1.2.1. Células osteoprogenitoras

Se originan de células mesenquimatosas primitivas. Morfológicamente son células fusiformes y se localizan en superficies óseas que no están sufriendo el proceso de reabsorción (**Figura 6**). Están localizadas en la capa más profunda del periostio, revistiendo los conductos de Havers, y también en el endostio²⁹.

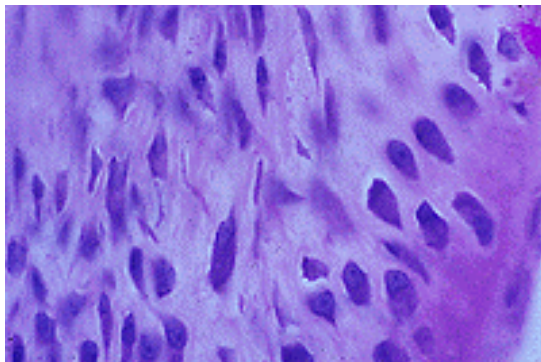


Figura 6: morfología de las células osteoprogenitoras (aumentos originales x100)ⁱⁱⁱ

Estas células pueden experimentar división mitótica y tienen el potencial de diferenciarse en osteoblastos³⁴. La presencia de las células osteoprogenitoras asegura la existencia de un número adecuado de osteoblastos para el crecimiento, mantenimiento, remodelación y reparación del hueso³².

3.3.1.2.2. *Linaje osteoblástico*

Forman parte de este linaje los preosteoblastos, los osteoblastos y los osteocitos.

Los **preosteoblastos**: son células de aspecto fibroblástico y morfológicamente iguales a los osteoblastos, pero ocupan un lugar más externo en la superficie del hueso. Así, se sitúan cercanas a las superficies óseas pero separadas de éstas por otros tipos celulares (células del endostio, osteoblastos)³⁰. Los preosteoblastos son difíciles de identificar en condiciones normales, pero pueden observarse con facilidad cuando existe alguna patología, como una hiperplasia secundaria a un hiperparatiroidismo. Los preosteoblastos derivan, según consideran algunos autores, directamente de las células osteoprogenitoras y, en condiciones normales, constituyen el compartimento proliferativo del linaje osteoblástico³⁰.

Los **osteoblastos**: derivan de los preosteoblastos y suelen considerarse células con diferenciación terminal, y por tanto incapaces de dividirse; no obstante, existen datos que sugieren que, al menos en parte, conservan la capacidad de proliferar³². Los osteoblastos se hallan en contacto directo con las superficies óseas en crecimiento formando grupos compactos de una sola capa de espesor. Morfológicamente son células grandes con forma redonda a poligonal, citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina²⁹. De manera característica, el núcleo de estas células se sitúa en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. Se encuentran en contacto entre ellos mediante cortas

prolongaciones, las cuales están conectadas por uniones tiponexo. El estudio ultraestructural por microscopía electrónica permite comprobar que entre el núcleo y la superficie de contacto con el hueso se sitúan, de manera sucesiva: el aparato de Golgi, numerosos ribosomas y un marcado desarrollo del retículo endoplásmico rugoso³⁰. Estas características ultraestructurales son típicas de las células con capacidad para segregar grandes cantidades de proteínas (**Figura 7**).

Los osteoblastos participan en la producción de los componentes orgánicos de la matriz ósea y, al mismo tiempo, sintetizan distintas citocinas y factores de crecimiento con importante efecto local en los procesos de formación y reabsorción del hueso; en este sentido, podemos destacar la síntesis de:

- Distintas interleukinas, que participan fundamentalmente en los procesos de reabsorción ósea al estimular la formación de los osteoclastos.
- Las proteínas modeladoras óseas, que estimulan la maduración final de los osteoblastos y tienen como efecto un aumento en la formación del hueso.
- Las prostaglandinas.
- Diversos factores de crecimiento (IGF-I, factor de crecimiento insulínico-I, o el β -TGF, β -factor de crecimiento transformante).

También actúan como células de almacén del calcio utilizado en la mineralización del hueso, el cual puede ser liberado cuando existe una demanda de este mineral; para ello, existen una serie de hormonas circulantes, entre las que debemos mencionar la paratohormona u hormona paratiroidea y el metabolito activo de la vitamina D (1,25 dihidroxicolecalciferol)²⁹.

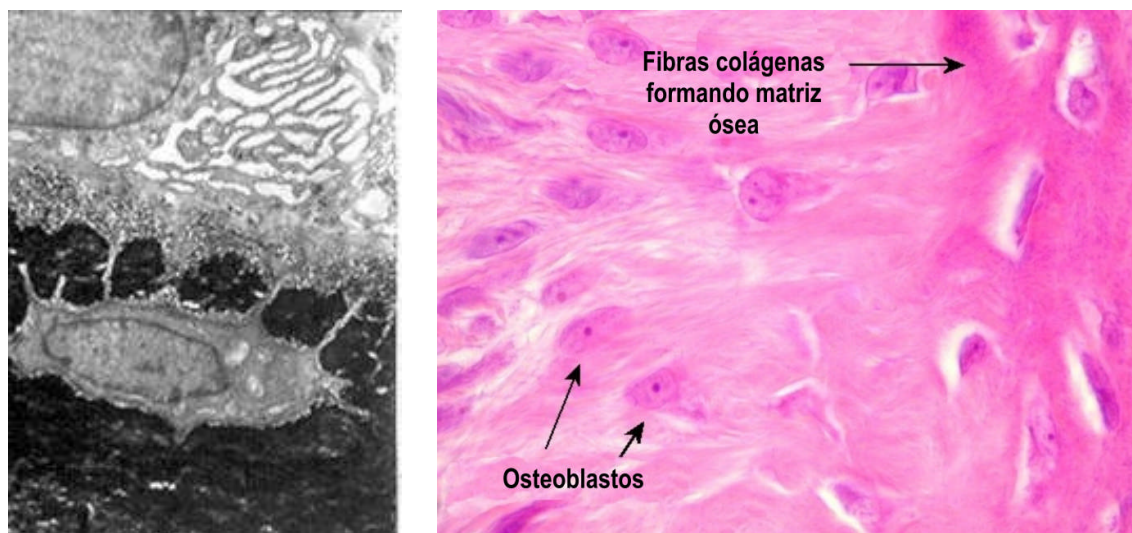


Figura 7^{iv}: imagen izquierda: morfología de los osteoblastos mediante microscopía electrónica de transmisión (aumentos originales x 6100); **imagen derecha:** formación de los osteoblastos (aumentos originales x 400)

Los osteoblastos pasan sucesivamente por tres estados funcionales³²:

- a) Proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea, que en conjunto se denomina osteoide.
- b) Maduración de la matriz ósea (cambios en la composición y organización de la matriz que la hacen competente para ser mineralizada).
- c) Depósito de mineral: esta fase supone la mineralización del osteoide. Para ello, se van a emplear los iones de calcio almacenados en los osteoblastos.

Cuando cesa la neoformación ósea, los osteoblastos pueden quedar englobados en la matriz osteoide o bien permanecer en las superficies óseas³⁴. Cuando los osteoblastos que han permanecido en la superficie finalizan la síntesis de matriz, se aplanan y se convierten en osteoblastos inactivos o células de revestimiento (células del endostio o "lining cells"). Estas células, a

través de la producción de factores locales (Interleukina-6, Interleukina-11), parecen desarrollar un importante papel en el control del remodelado óseo. Los osteoblastos que quedan en el espesor de la matriz adquieren aspecto estrellado y pasan a denominarse osteocitos³⁰.

Los **osteocitos**: Presentan un aspecto fusiforme y se hallan en contacto entre sí y con las células de la superficie (células de revestimiento, osteoblastos) mediante finas prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones³⁰. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina laguna osteocitaria y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplásmicas reciben el nombre de conductos calcóforos. El estudio ultraestructural de los osteocitos revela que presentan un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso menos desarrollado que los osteoblastos. Estas organelas se concentran en el cuerpo celular donde se disponen alrededor del núcleo. El núcleo es ovalado y el nucleolo pequeño³⁰. En los puntos de contacto entre las prolongaciones citoplásmicas se observan uniones tipo "gap" (gap junctions). A través de estas uniones comunicantes o de intersticio ocurre el paso directo de una a otra célula de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles (aminoácidos, azúcares, nucleótidos y vitaminas) por lo que posibilitan una comunicación química y eléctrica³⁴. Los osteocitos son células con una escasa actividad metabólica pero su preservación parece necesaria para que el tejido óseo mantenga sus propiedades biomecánicas (**Figura 8**).

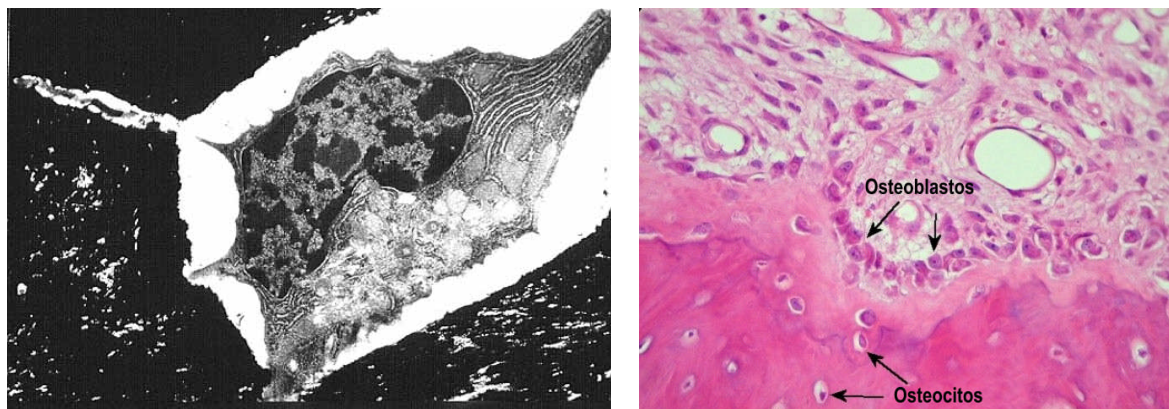


Figura 8: imagen izquierda: osteocito en el interior de una laguna (imagen de TEM. Aumentos originales x 5700)^y; imagen derecha: formación de los osteocitos a partir de los osteoblastos (aumentos originales x 200)^d

3.3.1.2.3. Linaje osteoclástico

Los **preosteoclastos**: son las células progenitoras. Pertenecen a la línea de los monocitos y los macrófagos y llegan al tejido óseo mediante un proceso de migración desde el torrente sanguíneo. Son células mononucleadas con capacidad de división. Mediante una fase de diferenciación se fusionan entre ellos y dan lugar a los osteoclastos multinucleados maduros²⁹.

Los **osteoclastos**: estas células se observan adosadas a la superficie de reabsorción ósea en unas cavidades poco profundas, llamadas lagunas de Howship³⁰ o bahías de reabsorción²⁹, que se producen por la degradación del hueso por parte de los osteoclastos presentes en las lagunas adyacentes³¹. Colaboran en la reabsorción ósea y poseen los mecanismos necesarios para la destrucción ósea mediante la disolución del hueso calcificado y la digestión de la matriz orgánica. Además, en el proceso de degradación del tejido óseo, los osteoclastos son capaces de fagocitar los restos de osteocitos, colágeno y mineral²⁹. Son células móviles, redondeadas, multinucleadas (hasta 50 núcleos) con un par de centriolos en cada núcleo y un citoplasma acidófilo.

Debido a su gran especialización han perdido su capacidad de división²⁹. Son de mayor tamaño que los osteoblastos y se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos. Al igual que los osteoblastos son células polarizadas, en las que los núcleos se sitúan en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. El osteoclasto activo en la reabsorción ósea se subdivide en cuatro regiones reconocibles desde el punto de vista morfológico (**Figura 9**):

- La **zona basal** se localiza en el sitio más alejado de la laguna de Howship y alberga el núcleo y casi todas las organelas. De esta forma, podemos encontrar en el citoplasma perinuclear abundantes complejos de Golgi y los centríolos asociados. En el resto del citoplasma se observan abundantes mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso (RER) y polisomas, pero son más numerosos cerca del borde rugoso³⁴.
- La **zona vesicular** se encuentra entre la zona basal y el compartimento rugoso y contiene numerosas vesículas endocitósicas y exocitósicas que transportan las enzimas lisosómicas hacia el compartimento subosteoclástico y los productos de degradación del hueso hacia el interior de la célula³⁴.
- El **borde rugoso** es la porción de la célula que participa directamente en la reabsorción ósea. Sus salientes digitiformes son activos y dinámicos, y cambian continuamente su configuración a medida que se proyectan al compartimento de reabsorción, conocido como compartimento subosteoclástico, el cual es aplanado y se corresponde a un rodete que adhiere el osteoclasto a la superficie ósea de manera parecida a como lo haría el borde de una ventosa. Así, el espacio comprendido entre la membrana fruncida y la matriz ósea queda convertido en un microambiente que se halla aislado del intersticio medular³⁴.

- La **zona clara** es la región de la célula que rodea a la periferia interna y externamente al borde rugoso. Está libre de organelas, pero contiene abundantes microfilamentos de actina que ayudan a las integrinas del plasmalema de la zona clara a conservar el contacto con la periferia ósea de la laguna de Howship³⁴. El citoplasma de esta región se adhiere de manera tan estrecha al hueso que se llama zona selladora del compartimento subosteoclástico³¹.

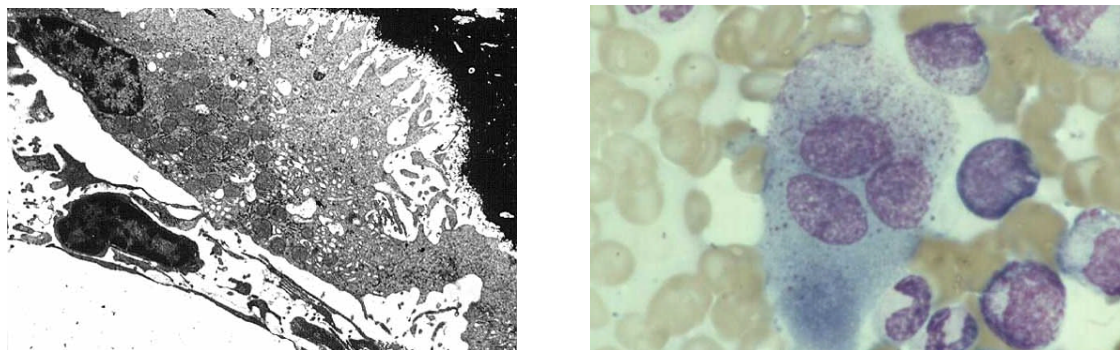


Figura 9: imagen izquierda: osteoclasto. (imagen de TEM; aumentos originales x3400)^e;
imagen derecha: osteoclasto (aumentos originales x100)^c

Los osteoclastos pueden liberar una cantidad importante de ácidos orgánicos (lactato, citrato) que disminuyen el pH en el entorno de la célula. Estos ácidos disuelven la porción mineralizada del tejido óseo e incrementan la actividad de las enzimas lisosomales que participan en la degradación de la matriz orgánica del hueso³².

Durante mucho tiempo, los osteoclastos fueron considerados los únicos responsables de la reabsorción ósea. Sin embargo, sólo son eficaces si están en contacto directo con la matriz ósea mineralizada; por ello, precisan la actividad previa de los osteoblastos que se encargan de eliminar la capa superficial de osteoide que suele recubrir la porción mineralizada de la matriz ósea³¹.

3.3.2. Organización del tejido óseo

3.3.2.1. Según su grado de madurez

El tejido óseo se puede clasificar en dos grupos en función de su grado de madurez:

3.3.2.1.1. Hueso inmaduro (*primario, fibroso o entretejido*)

Presenta una elevada celularidad y las lagunas son muy grandes y redondas. Tanto las fibras de colágeno como las células se distribuyen al azar³². La matriz orgánica está menos mineralizada que en el hueso maduro y tiene predilección por los colorantes básicos³⁶.

El hueso inmaduro se forma cuando los osteoblastos producen osteoide de manera rápida, como ocurre en el desarrollo fetal y en los adultos cuando existen procesos que se acompañan de una elevada remodelación o reparación ósea³³. Bajo condiciones normales, este tejido es temporal y va a ser reemplazado por el hueso maduro.

3.3.2.1.2. Hueso maduro (*secundario o laminar*)

Muestra una menor celularidad, las lagunas son de menor tamaño y tienen una forma lenticular. La distribución de las células y fibras de colágeno sigue un patrón predeterminado, y la matriz orgánica se tiñe con colorantes ácidos³². Teóricamente, la práctica totalidad del hueso en un animal adulto sano debería ser tejido óseo maduro.

³⁶ **Bacha W.J., Bacha L. M. (2001):** Hueso. En *Atlas Color de Histología Veterinaria*. Bacha W.J., Bacha L. M (Eds.), 2ª edición Inter-Médica, Buenos Aires (Argentina), pps.: 21-27.

3.3.2.2. Según su forma

En la mayoría de los vertebrados se distinguen tres tipos de hueso:

3.3.2.2.1. Huesos planos

Formados por dos finas capas de hueso compacto entre las que se encuentra una capa de hueso esponjoso en el que hay tejido hematopoyético (médula ósea roja)³⁰. Un ejemplo es la bóveda craneana.

3.3.2.2.2. Huesos cortos

La capa externa o cortical es de hueso compacto y la zona interna o medular de hueso esponjoso³⁰. Como ejemplo podemos hablar de los cuerpos vertebrales.

3.3.2.2.3. Huesos largos

Tienen ambos extremos, denominados epífisis, con formas variables y una zona central, diáfisis, de forma cilíndrica. La transición entre las dos se denomina metáfisis y es de forma cónica. Las epífisis están constituidas por una fina capa de hueso compacto, siendo el interior hueso esponjoso con médula ósea roja. La diáfisis consiste en una gruesa capa de hueso compacto en cuyo interior hay inicialmente hueso esponjoso que desaparece con la remodelación, durante el desarrollo del hueso, quedando tejido adiposo que constituye la médula amarilla o tuétano del hueso³⁰. El ejemplo típico son los huesos principales de las extremidades.

3.3.2.3. Según su estructura macroscópica

En el tejido óseo maduro, las dos configuraciones más comunes son las siguientes:

3.3.2.3.1. Hueso compacto o cortical

También llamado hueso laminar, forma una masa sólida, con espacios sólo perceptibles al microscopio óptico³⁴ (**Figura 10**).

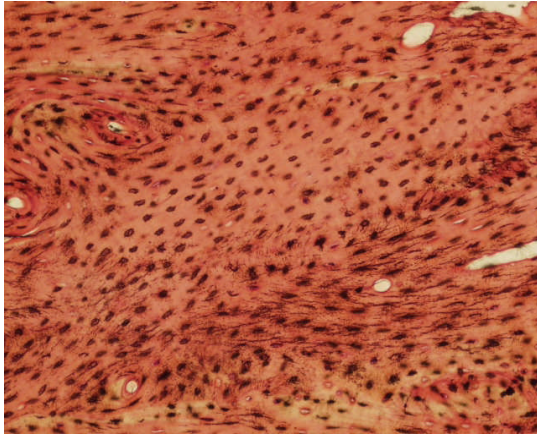


Figura 10: imagen de hueso compacto (aumentos originales x100)

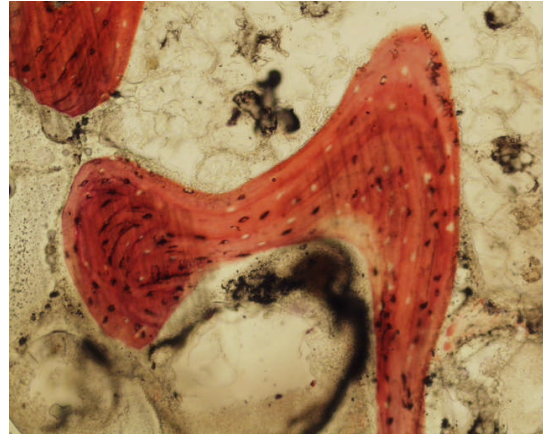


Figura 11: imagen de hueso esponjoso (aumentos originales x400)

3.3.2.3.2. Hueso esponjoso

También conocido como hueso trabecular, está constituido por trabéculas y espículas óseas ramificadas con una distribución irregular. El espacio entre las laminillas está relleno de médula ósea. Esta variante del tejido óseo posee una gran superficie e irrigación sanguínea, por lo que se considera muy importante en el mantenimiento de la homeostasis mineral³⁴ (**Figura 11**).

3.3.3. Estructura microscópica general de los huesos

3.3.3.1. Laminillas óseas

En el hueso maduro, la matriz ósea no calcificada se deposita en capas o laminillas paralelas, dispuestas en la proximidad de un vaso sanguíneo.

Posteriormente, esta matriz se calcifica. En la matriz laminar existen cavidades lenticulares espaciadas regularmente. Se denominan lagunas u osteoplastos y en ellas se encuentran los osteocitos. De ellas parten radialmente los conductos calcóforos que, como ya se comentó con anterioridad, aseguran la nutrición de los osteocitos debido a que la matriz calcificada no permite la difusión de nutrientes. Esta red contiene líquido tisular, llamado líquido intersticial³⁰.

3.3.3.2. Periostio

Recubre todo el hueso, excepto las epífisis (superficies articulares). Es una envoltura fibrosa que proporciona protección y sirve de guía de entrada de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios al hueso. Por otro lado, contribuye a la expansión del tejido óseo. De esta forma, donde no hay periostio no hay potencialidad osteógena³⁰. El periostio consta de dos capas:

1. Externa o fibrosa: formada por tejido conjuntivo denso con gruesos haces de fibras colágenas, algunas fibras elásticas y abundantes vasos sanguíneos. Algunos de los haces de fibras colágenas, junto con algunas fibras elásticas, penetran en el interior del hueso compacto asegurando la sujeción del periostio al hueso²⁹. Son las fibras de Sharpey.
2. Interna u osteogénica: tejido conjuntivo laxo con numerosas células formadoras de hueso, que pueden ser osteoblastos activos o células del endostio en reposo²⁹.

3.3.3.3. Endostio

Suele ser una única capa de células osteoprogenitoras planas sin fibras de tejido conectivo que tapiza todas las cavidades vascularizadas del tejido óseo,

como la cavidad medular de la diáfisis, los conductos de Havers y de Volkman y espacios medulares del hueso esponjoso²⁹.

3.3.4. Estructura del hueso compacto

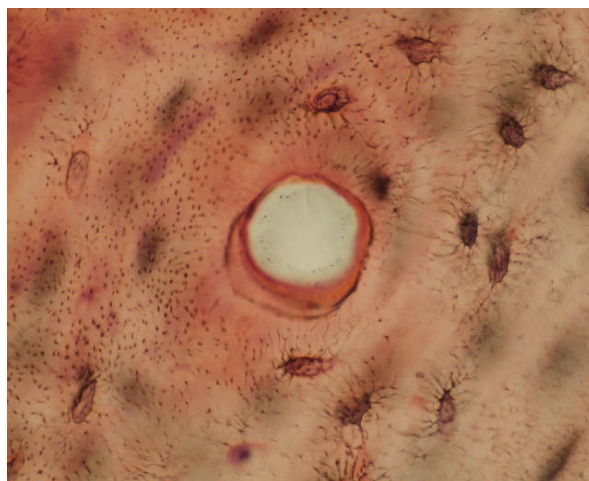
3.3.4.1. Estructura de la diáfisis de un hueso largo

3.3.4.1.1. Sistema de Havers u osteonas

El componente estructural básico del tejido óseo compacto es la osteona⁶. Estas unidades cilíndricas, que también se conocen como sistemas de Havers, se disponen de forma paralela al eje largo del hueso³³.

Una osteona está compuesta de entre 4 a 15 laminillas de matriz ósea calcificada, compuestas por fibras colágenas y osteocitos, dispuestas, concéntricamente, alrededor de un conducto central que contiene capilares, vasos linfáticos y fibras nerviosas amielínicas sustentadas por tejido conjuntivo reticular³¹. Los sistemas de Havers comienzan como un tubo ancho en cuya periferia se sitúan osteoblastos que se encargan de la síntesis de las laminillas óseas³⁶. A medida que se depositan más capas de hueso, el diámetro del canal central disminuye y los osteoblastos quedan atrapados como osteocitos en lagunas de la matriz ósea, permitiendo la comunicación con los más próximos, a través de prolongaciones citoplasmáticas que se conocen como canalículos³³. Las fibras colágenas están muy ordenadas de forma que en cada laminilla todas las fibras colágenas son paralelas, pero su orientación cambia de una laminilla a la siguiente. Como resultado, podemos observar una refringencia de las laminillas al microscopio óptico, debida por un lado a la orientación de las fibras de colágeno y, por el otro, a la alternancia de laminillas muy ricas en colágeno con otras más pobres³⁰ (**Figura 12**).

Figura 12: detalle de una osteona rodeada de las lagunas óseas en que se sitúan los osteocitos (aumentos originales x400)



3.3.4.1.2. Sistemas intersticiales de laminillas

Corresponden a restos de antiguas osteonas pues, como consecuencia de la continua reabsorción y deposición de hueso, las osteonas más jóvenes que están en crecimiento fagocitan a las más viejas adyacentes, que son menos activas, de forma que algunos sistemas de Havers pierden su estructura y aparecen laminillas que no rodean a un canal central³⁰.

Los límites entre los sistemas de Havers y los sistemas intersticiales están muy bien definidos por una fina capa, denominada **línea de cemento**, que está compuesta principalmente por sustancia básica calcificada y una cantidad escasa de fibras de colágeno y de calcio y fósforo. La proporción de calcio/fósforo es mayor que en las laminillas, lo que sugiere que la mineralización en estos sistemas intersticiales no es en forma de hidroxapatita³⁰. No están atravesadas por los conductos calcóforos.

3.3.4.1.3. Sistema externo e interno de laminillas

Bajo el periostio y el endostio se encuentran las laminillas circunferenciales externas e internas. Son similares a los sistemas intersticiales pero ocupan

zonas limitantes del hueso. Su origen se debe a la actividad osteógena del periostio y endostio.

3.3.4.1.4. Conductos vasculares

Hay dos tipos de conductos que contienen vasos y nervios para nutrir a los osteocitos:

Conductos de Havers: son longitudinales y tienen un diámetro de 20 a 40 μm . Pasan por el centro de los sistemas de Havers y nutren a los osteocitos de la osteona. Cuando las osteonas se ramifican para comunicarse unas con otras, los conductos de Havers también lo hacen. De esta forma, en estas ramificaciones los conductos de Havers son oblicuos y conectan conductos rectos entre sí³⁰.

Conductos de Volkmann: son transversales y comunican los conductos centrales de los sistemas de Havers entre sí y con los vasos del periostio y, en menor medida, con la cavidad medular limitada por el endostio²⁹.

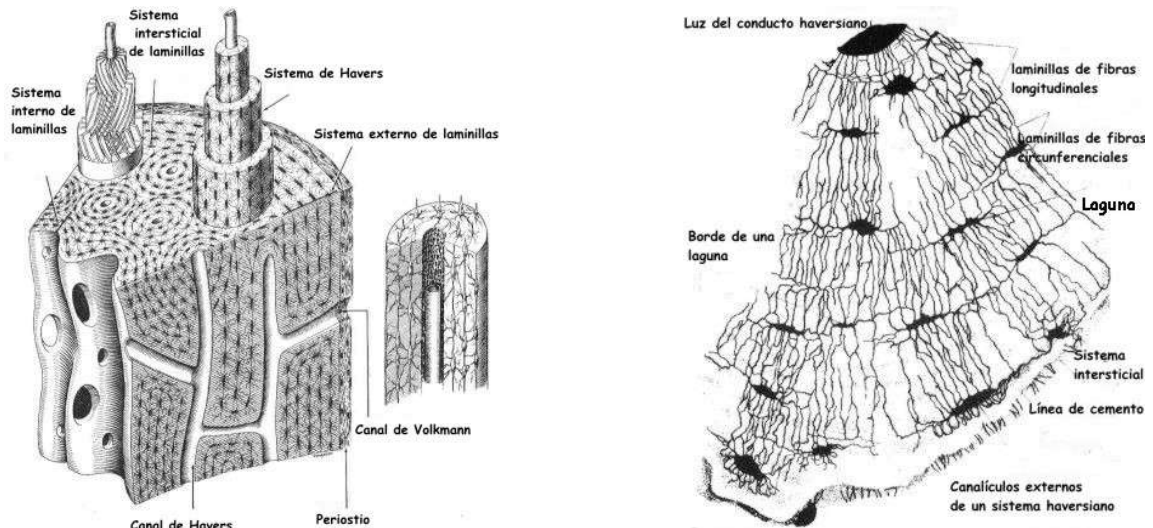


Figura 13: figura izquierda: estructura del hueso compacto^c; figura derecha: estructura del sistema de Havers^c

3.3.4.2. Estructura de la epífisis de un hueso largo

El hueso compacto que encontramos en la epífisis de los huesos largos, así como en las tablas de los huesos planos o de los huesos cortos, también se forma por sistemas, más o menos circunferenciales, de laminillas dispuestas alrededor de los vasos sanguíneos que han quedado atrapados en la matriz ósea. En sentido amplio, podemos considerarlos sistemas de Havers u osteonas aunque, al tener estos huesos estructuras aplanadas, las osteonas no forman cilindros como los descritos en la diáfisis³⁰.

3.3.4.3. Estructura del hueso esponjoso

También tiene laminillas con lagunas ocupadas por osteocitos. La diferencia reside en que, al ser delgadas las trabéculas óseas, los vasos no penetran en ellas y no hay verdaderos sistemas de Havers. Los osteocitos se nutren de los vasos próximos del conjuntivo hematopoyético a través de canalículos³⁰.

3.3.5. Dinámica del hueso

El esqueleto, a pesar de estar constituido en su mayor parte por matriz extracelular, es uno de los sistemas más dinámicos del organismo y presenta fenómenos de osteogénesis, crecimiento, remodelado y reparación.

3.3.5.1. Osteogénesis

El proceso de formación de hueso se conoce como osteogénesis u osificación. Puede tener lugar directamente a partir de tejido conjuntivo, osificación intermembranosa, o a partir de cartílago, osificación endocondral²⁹. En ambos tipos el tejido óseo que se deposita en primer lugar es del tipo inmaduro o no laminar y, posteriormente, se irá organizando a laminar. Por otro lado, primero

se forma hueso esponjoso y con el tiempo todo o parte del mismo se convierte en hueso compacto al rellenarse los huecos. El proceso de osificación implica la calcificación de la matriz extracelular mediante la secreción de las vesículas de osificación, que son sintetizadas y segregadas por los osteoblastos y condrocitos hipertrofiados³⁰.

3.3.5.1.1. Osificación intermembranosa

Es propia de los huesos planos, especialmente el cráneo. En un primer momento, las células mesenquimatosas presentan una disposición laxa, constituyendo una estructura membranosa. Su citoplasma se tiñe pálidamente con la técnica de hematoxilina-eosina, y las células muestran largas y delgadas proyecciones citoplasmáticas³¹. En la siguiente fase, la membrana mesenquimatososa es invadida en determinados puntos de su longitud por capilares encargados de transportar nutrientes y oxígeno hacia dicho tejido. A partir de las porciones irrigadas del mesénquima comenzarán a formarse los centros de osificación, en los que las células mesenquimatosas se transformarán primeramente en células osteogénicas y posteriormente en osteoblastos que dan lugar a los osteocitos al quedarse embebidos en la matriz que generan, como ya ha sido descrito con anterioridad. Posteriormente se calcifica, por lo que los osteocitos sólo recibirán oxígeno y nutrientes a través de los conductos calcóforos³⁰. La fase final de este tipo de osificación está determinada cuando los centros de osificación aparecen como pequeñas espículas de tejido óseo con forma irregular que crecerán de forma expansiva y se anastomosarán con otras espículas, dando lugar a trabéculas. Tras formarse las trabéculas, crecerán radialmente a partir de sus centros de osificación³⁶.

Los osteoblastos dispuestos en la periferia del centro de osificación secretan, junto con los proteoglicanos, fibras de colágeno que se integran dentro de la

matriz ósea trabecular, dando lugar a hueso reticular, donde los osteocitos se disponen sin seguir una dirección preestablecida (**Figura 14**). En una segunda fase, las trabéculas soportan una remodelación en la que intervienen los osteoclastos y los osteoblastos, y se desarrolla una nueva estructura ósea o hueso laminar, donde los osteocitos están orientados en la dirección de las laminillas óseas, integrada esencialmente por fibras de colágeno, calcio y proteoglicanos²⁹ (**Figura 15**).

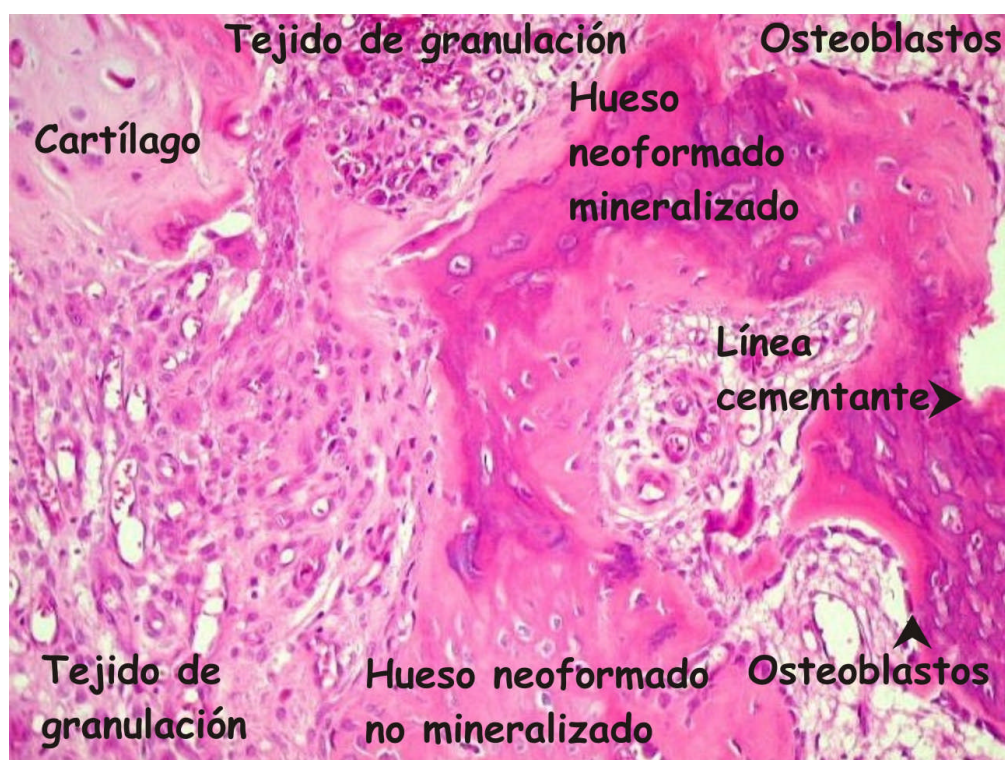


Figura 14: representación de los distintos pasos que tienen lugar durante la osificación intermembranosa (aumentos originales x100)^d

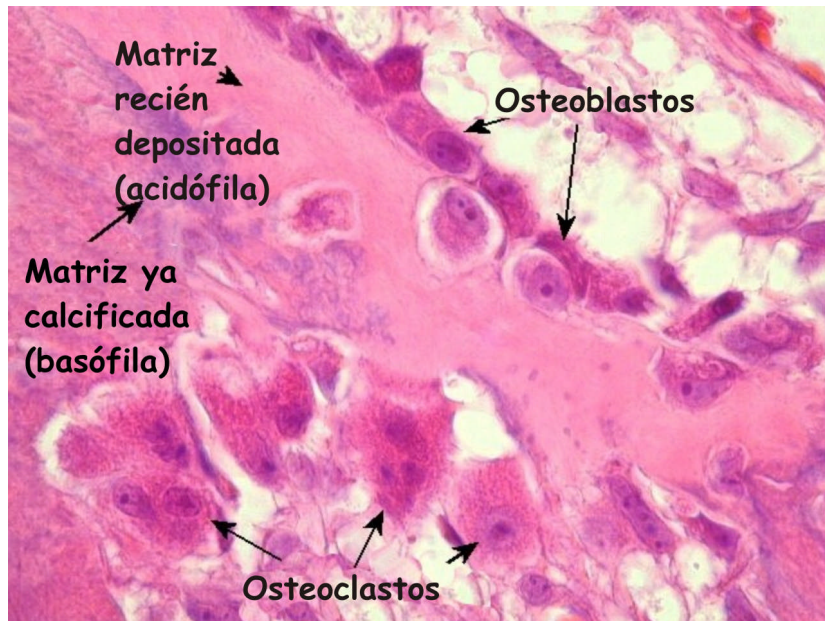


Figura 15: representación de la acción de los osteoclastos en la remodelación ósea (aumentos originales x200)^d

3.3.5.1.2. Osificación endocondral

Se produce fundamentalmente en los huesos largos (**Figura 16**). En una primera fase, la estructura del futuro hueso está integrada por tejido cartilaginoso a partir de células mesenquimatosas embrionarias diferenciadas a condroblastos y que constituyen la primera matriz cartilaginosa, la cual conforma el molde óseo primario y el pericondrio, que es el tejido que lo rodea y del cual se originará el periostio. Este molde crece en longitud, gracias a la capacidad de crecimiento intersticial del cartílago, que se divide formando células hijas que producen mayor cantidad de matriz, y en grosor, debido a la adición periférica de matriz cartilaginosa producida por nuevos condroblastos diferenciados a partir del pericondrio²⁹. En la siguiente fase, en la región media del molde óseo se produce un aumento de tamaño y maduración de los condrocitos, que conlleva una calcificación de éstos debido al depósito de sales

de hidroxapatita. En este estado tiene lugar un crecimiento, hacia la zona calcificada del molde óseo, de numerosos capilares que se desarrollan a partir del pericondrio, con el fin de proporcionar oxígeno y nutrientes a las células situadas en el medio calcificado. Estas células comienzan a diferenciarse a células osteogénicas, que posteriormente originarán los osteoblastos para producir matriz ósea sobre los restos de cartílago modificado. Estos cambios tienen lugar dentro del borde óseo, provocando que la membrana conectiva envolvente de esta porción ósea se transforme en periostio³⁰. Todo el conjunto de estructuras situadas en la región central del molde óseo se denominan centro de osificación primario y, a partir de él, se produce la osificación del molde óseo. El tejido óseo que se forma es de tipo esponjoso y se caracteriza por presentar restos de cartílago calcificado en sus trabéculas, que son fácilmente distinguibles al utilizar la técnica de hematoxilina-eosina, pues aparecen teñidos de azul pálido en contraste con el color rosáceo brillante de la matriz ósea. Entre las trabéculas de tejido óseo esponjoso recién formado aparecen unos espacios huecos que constituirán la cavidad medular del hueso, la cual será poblada por tejido mieloide³⁶.

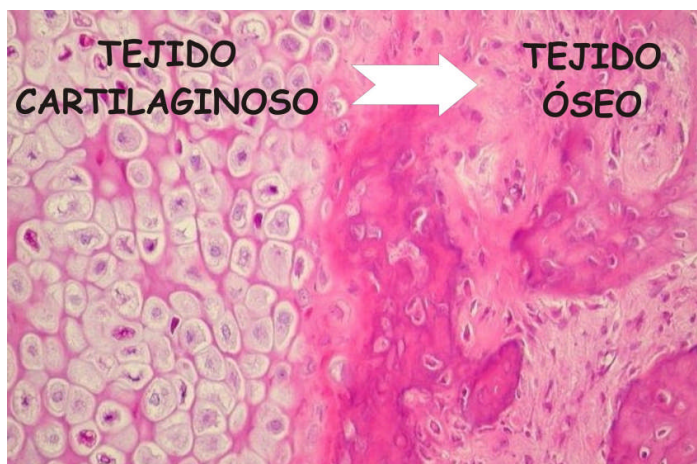


Figura 16: representación del proceso de osificación endocondral (aumentos originales x200)^d

3.3.5.2. Crecimiento óseo

El crecimiento óseo se inicia en la vida embrionaria y sigue hasta la pubertad.

3.3.5.2.1. Crecimiento en longitud

Se efectúa mediante la adición de hueso nuevo a la cara diafisaria de la **placa de crecimiento o fisis**³⁰ (Figura 17).

3.3.5.2.1.1. Placa de crecimiento o fisis

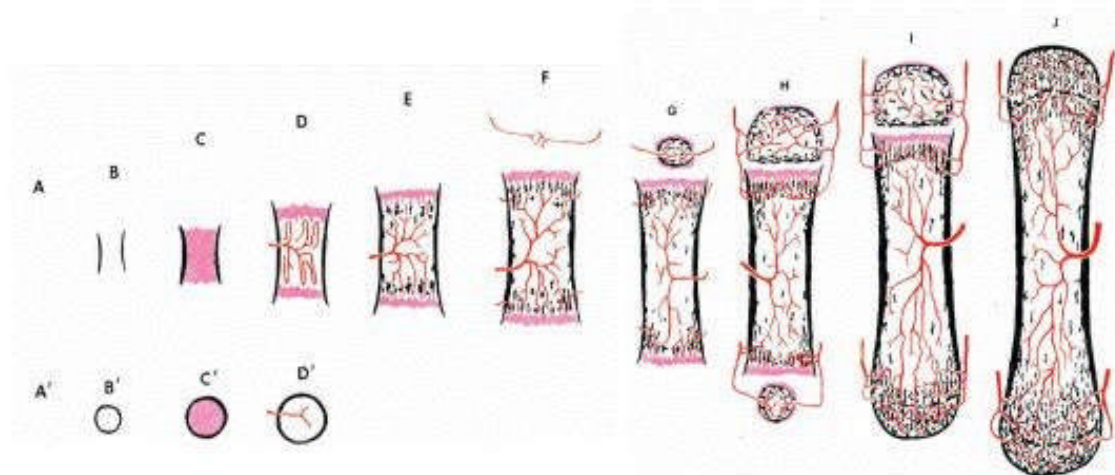


Figura 17: crecimiento de un hueso largo^d

La placa de crecimiento es una estructura con forma de disco que se halla intercalada entre la epífisis y la diáfisis. En la placa de crecimiento se distinguen dos regiones, una central y otra periférica. La región central está constituida por cartílago hialino en el que se distinguen, desde la epífisis a la diáfisis, cuatro zonas: zona germinal, zona proliferativa, zona de cartílago hipertrófico y zona de cartílago calcificado (Figura 18).

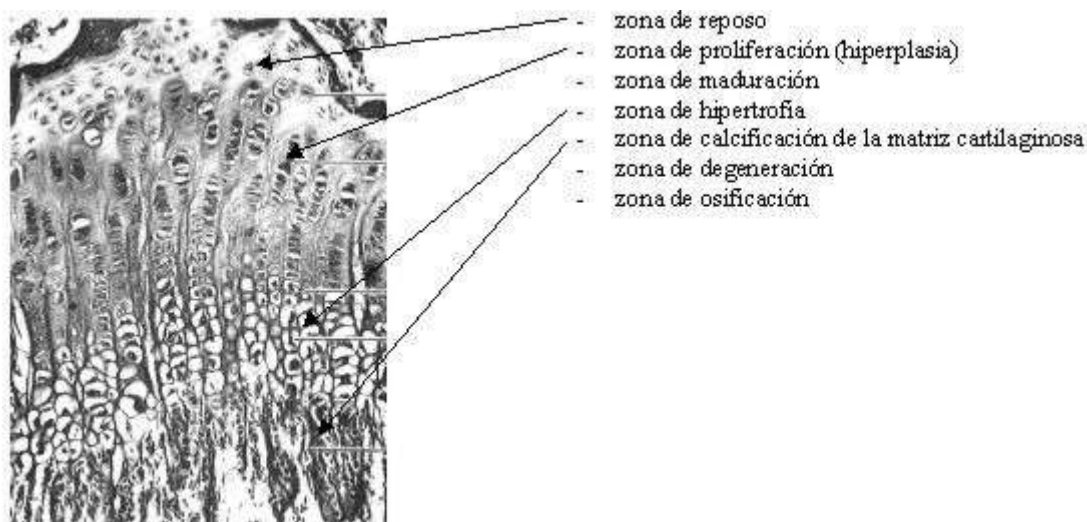


Figura 18: placa de crecimiento^d

- **Zona de reposo (capa de reserva o germinal):** es la zona más cercana a la epífisis. Está constituida por condrocitos pequeños que poseen abundante retículo endoplasmático rugoso, lo que sugiere una activa síntesis proteica, aunque su dotación enzimática es inferior a las otras células de la placa. Se disponen al azar sin formar columnas, de forma aislada o en grupos y son activos desde el punto de vista mitótico³⁴. Se considera que el cartílago está en reposo ya que no contribuye activamente a la síntesis de hueso y su función principal será servir de estructura de anclaje de la placa epifisaria y del hueso epifisario¹.
- **Zona de proliferación (hiperplasia):** se halla constituida por células cartilaginosa en forma de cuña cuyo eje mayor es perpendicular al del hueso. Estas células se disponen en columnas paralelas al eje longitudinal del hueso. En esta zona también se observan mitosis y existe una síntesis intensa de matriz extracelular. Por ello, la función de esta zona es tanto la producción celular como la síntesis de matriz. Las

células de cada columna parecen dividirse al mismo tiempo pero de manera asincrónica con respecto a las de las columnas restantes²⁹.

- **Zona de hipertrofia o de cartílago maduro:** los condrocitos de esta zona maduran, adquieren forma redondeada y su tamaño aumenta (hipertrofia) a medida que se alejan de la epífisis y presentan acúmulos de lípidos y glucógeno. Su función es segregar la matriz y las vesículas de calcificación³⁰. Por otro lado, producen la enzima fosfatasa alcalina, que parece intervenir de forma decisiva facilitando la calcificación de la matriz extracelular²⁹.
- **Zona de calcificación de la matriz cartilaginosa:** en esta zona, la matriz cartilaginosa se mineraliza. Al microscopio óptico puede parecer que las lagunas están vacías, pero al microscopio electrónico se confirma que los condrocitos mantienen su estructura intacta²⁹. En el curso del modelado óseo, este hueso inmaduro será sustituido por hueso laminar. En esta zona se produce el crecimiento de los capilares sanguíneos, los cuales presentan células osteogénicas asociadas para posteriormente diferenciarse en osteoblastos, que forman la matriz ósea y que sustituyen al cartílago calcificado²⁹.

Rodeando externamente a la placa de crecimiento se encuentra el **anillo pericondral**.

3.3.5.2.1.2. *Anillo pericondral*

Posee tres componentes, de dentro hacia fuera:

- **Región ósea:** es un hueso membranoso que forma un cilindro alrededor de la placa de crecimiento. Por fuera posee una capa de osteoblastos que generan dicho hueso. Este cilindro óseo no mantiene continuidad con el hueso cortical de la diáfisis, pues en su extremo diafisario posee osteoclastos que lo van reabsorbiendo³⁰.

- **Región celular:** dentro de ella, la zona más alejada de la diáfisis está constituida por células de aspecto mesenquimatoso o fibroblástico dispuestas laxamente en una matriz abundante. El resto de la región posee mayor densidad de células, que son más indiferenciadas en la zona media mientras que en la zona proximal son similares a osteoblastos³⁰.
- **Región fibrosa:** constituida por haces paralelos de fibras colágenas entre los que se disponen fibroblastos de manera ordenada. Se continúa con el revestimiento fibroso de la diáfisis y epífisis³⁰.

La función de este anillo es, por un lado, mecánica, pues ejerce de soporte lateral de la placa de crecimiento y, por otro lado, de crecimiento de la placa y de la metáfisis mediante la transformación de células mesenquimatosas en condroblastos y osteoblastos.

3.3.5.2.1.3. Centros secundarios (epifisarios) de osificación

Los vasos sanguíneos invaden también el pericondrio de ambas epífisis y, en la parte central, forman los centros secundarios de osificación. En ellos no hay disposición en columnas de los condrocitos y no se distinguen las mismas zonas que en los centros primarios³⁰. Su desarrollo se realiza como en el centro primario, excepto porque no hay depósito de hueso en la zona subyacente al pericondrio³¹. En la expansión de los centros secundarios todo el cartílago epifisario es sustituido finalmente por hueso, excepto una capa que persiste como cartílago articular en la superficie articular del hueso y el delgado disco transversal entre la epífisis y la diáfisis, la placa epifisaria³¹, que es una estructura discoidea de naturaleza hialina.

El crecimiento en longitud es atribuible a la proliferación de condrocitos en la placa epifisaria y a su sustitución por hueso. Al final del período de crecimiento, la proliferación de las células cartilaginosas se hace más lenta, hasta

desaparecer. La sustitución continuada de cartílago por hueso hace que se oblitere la placa epifisaria³¹.

3.3.5.2.2. *Crecimiento en espesor*

Se logra mediante la aposición concéntrica subperióstica de tejido óseo. Las células de la capa más interna del periostio se diferencian en osteoblastos que depositan hueso directamente sobre la superficie externa de la cortical diafisaria (osificación de tipo intramembranoso)³⁰.

3.3.5.3. **Remodelado óseo**

En el adulto, cerca de un 8% del tejido óseo es renovado anualmente. Esta sustitución ocurre de forma continua, pero no afecta a la estructura ósea³⁵ debido a que el remodelado óseo se lleva a cabo mediante la acción sucesiva (**acoplamiento**) de osteoclastos y osteoblastos sobre una misma superficie ósea. Esto se ha demostrado con la administración de un radioisótopo osteotrope a una rata, tras lo cual se tomaron radiografías de cortes longitudinales de la tibia³⁵. Al realizar cortes de los huesos se vieron distintas bandas fluorescentes formándose de fuera hacia dentro y rellenando así lo que era una cavidad de reabsorción y que posteriormente se convertiría en una osteona³⁰. Cada ciclo de remodelado consta de tres fases: reabsorción, reposo o inversión y formación³².

En la fase de reabsorción, un grupo de osteoclastos se diferencia a partir de sus precursores y erosiona una superficie ósea dando lugar a imágenes en sacabocados conocidas como lagunas de Howship²⁹. Una vez finalizada la reabsorción, los osteoclastos son eliminados por apoptosis. La fase de reposo o inversión es un período de aparente inactividad. Durante la fase de formación, un grupo de osteoblastos se diferencia a partir de sus precursores y

rellena con hueso nuevo la zona excavada por los osteoclastos. En primer lugar, los osteoblastos depositan matriz ósea no mineralizada que forma una capa de unas 10 micras de espesor denominada ribete de osteoide³². Entre el depósito de osteoide y su mineralización existe un tiempo de demora, de unos 10 a 20 días, durante el cual la matriz ósea sufre cambios en su composición y estructura que la hacen apta para el depósito de mineral (maduración de la matriz)³¹. La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina frente de mineralización³⁷. A medida que este frente se desplaza va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada en forma de cristales de hidroxapatita³⁰. Una vez completado el depósito de hueso, los osteoblastos que no se han incorporado a la matriz se aplanan y pasan a formar parte del endostio.

El conjunto de osteoclastos y osteoblastos que, de manera coordinada, actúan en una superficie ósea durante un ciclo de remodelado recibe el nombre de **Unidad Multicelular Básica (UMB) (Figura 19)**. Las UMB se activan de manera asincrónica, por lo que mientras unos ciclos de remodelado se hallan en fase de reabsorción, otros se encuentran en fase de reposo o de formación. El nuevo segmento de tejido óseo que resulta de la acción de cada UMB se denomina **Unidad Estructural Ósea (UEO)**. El límite entre el hueso preexistente y la nueva UEO es identificable morfológicamente como una línea ondulada y recibe el nombre de superficie de inversión o de cemento²⁹. En general, el hueso compacto posee una actividad de remodelación de cinco a diez veces mayor que el hueso esponjoso³⁷. En la remodelación del hueso

³⁷ **Steiniche Torben S., Hauge E.M. (2003):** Normal structure and function of bone. En *Handbook of Histology methods for bone and cartilage*. Yuehuei H., Kylie L. M. (Eds.), Humana Press, New Jersey (USA), pps.: 59-73.

compacto, las UMB forman una estructura compleja y única, en la que los osteoclastos, partiendo de un canal de Havers o de Volkmann, excavan un túnel de sección circular. Por esta razón, las UEO corticales, llamadas también osteonas, tienen forma cilíndrica. En la remodelación del hueso esponjoso, los osteoclastos labran, en la superficie de las trabéculas, excavaciones poco profundas y de base ancha. Por ello las UEO trabeculares, llamadas también paquetes trabeculares, tienen forma de lente plano-convexa³⁷.

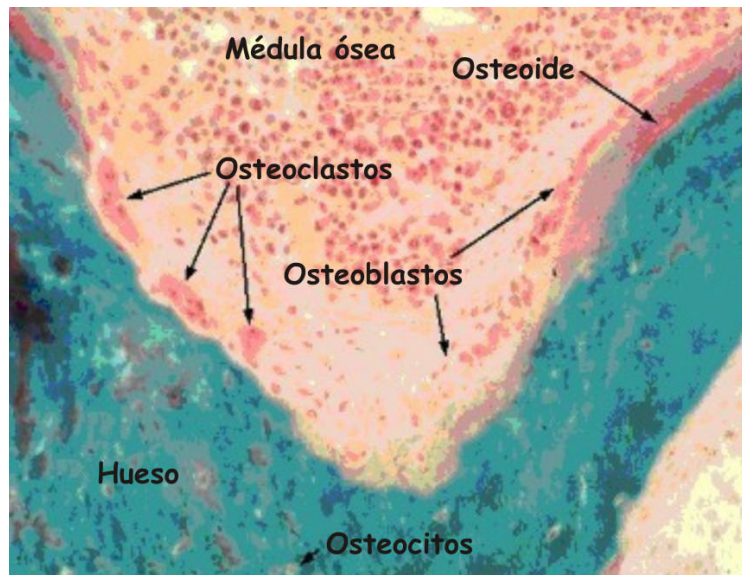


Figura 19: unidad multicelular básica^a

Se denomina **recambio óseo** al volumen total de hueso que es renovado por unidad de tiempo mediante el remodelado³⁷. El recambio óseo es directamente proporcional al número de ciclos de remodelado en curso o, lo que es lo mismo, al número de UMB activas. La diferencia entre el volumen de hueso formado y el de hueso reabsorbido por unidad de tiempo se denomina **balance óseo**³⁷. Si la reabsorción y la formación son idénticas, el balance es igual a cero y el volumen total de hueso (masa ósea) no variará en función del tiempo. Si la formación y la reabsorción no son iguales, la masa ósea se modificará en

sentido positivo o negativo. El balance óseo corresponde a la suma aritmética del hueso ganado o perdido en cada ciclo de remodelado. Así pues, una vez instaurado un balance positivo o negativo la velocidad a la que se perderá o ganará masa ósea será directamente proporcional al número de UMB activas³⁷.

3.3.5.4. Reparación ósea (Reparación de las fracturas)

El tejido óseo es el único capaz de repararse a sí mismo de manera completa a través de reactivar los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis. Cuando, de manera brusca, un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica, aparece una línea de fractura. Esto produce una lesión y destrucción de la matriz ósea, desgarros en el periostio y posible desplazamiento de los extremos del hueso fracturado. Los vasos sanguíneos cercanos a la fractura se seccionan y ocurre una hemorragia localizada que llena la zona de rotura dando lugar a la formación de un coágulo de sangre. El riego sanguíneo se desvía de forma retrógrada desde la zona de la lesión hacia las zonas de anastomosis de los vasos, pudiendo reestablecerse una nueva vía circulatoria. Esto origina una ampliación de la zona lesionada debido a que la falta de riego sanguíneo hacia muchos sistemas de Havers incrementa la zona de osteocitos muertos³⁴. Estas células se vuelven picnóticas y experimentan lisis, dejando lagunas vacías. Por otro lado, el sitio inicial de la lesión en la médula ósea y periostio no crece de forma notable debido a que son zonas de gran irrigación. El coágulo que llena el lugar de la fractura resulta invadido de pequeños capilares y fibroblastos procedentes del tejido conectivo cercano, produciendo un tejido de granulación³⁰. Este proceso ocurre de forma similar en la médula ósea, donde se forma un coágulo que pronto queda invadido por células osteogénicas del endostio y células pluripotenciales de la médula ósea, formándose un callo interno de trabéculas óseas en un plazo de una semana³⁴.

En las 48 horas siguientes a la fractura se acumulan células osteogénicas debido a la actividad mitótica incrementada de la capa osteogénica del periostio y del endostio, y a partir de células indiferenciadas de la médula ósea. La capa más profunda de células osteogénicas del periostio, que se encuentran en la vecindad de los capilares, se diferencia a osteoblastos y comienzan a formar un callo óseo, que sirve para cimentar el hueso muerto a nivel del sitio de la lesión. Cuando se inicia la proliferación de células osteogénicas, la tasa de proliferación de capilares es más lenta y por ello las células de la parte media se encuentran sin una red capilar difusa, dando como resultado un descenso de la tensión de oxígeno transformando estas células en condrogénicas, las cuales originan los condroblastos que forman el cartílago en las partes externas del callo óseo. Las capas de células osteogénicas adyacentes al periostio poseen capilares en su parte intermedia y, por ello, siguen proliferando como células osteogénicas. De esta forma, el callo óseo manifiesta tres zonas que se entremezclan: una capa de hueso nuevo cementado sobre el hueso del fragmento, una capa intermedia de cartílago y una capa superficial osteogénica proliferativa. Al mismo tiempo, los callos formados sobre los extremos de cada fragmento se unen en uno denominado callo externo³⁵. El crecimiento sostenido del collar deriva de la proliferación de las células osteogénicas y del crecimiento intersticial del cartílago en su zona intermedia. La matriz de cartílago adyacente al nuevo hueso, que se encuentra en la región más profunda del collar, se calcifica y queda sustituida por hueso esponjoso. Una vez que los fragmentos de hueso están unidos por la formación de puentes de tejido fibroso, es necesario remodelar el sitio de la lesión mediante restitución del tejido primario por hueso secundario y resolución del callo³⁴.

El primer hueso elaborado sobre la superficie del hueso lesionado se desarrolla por formación intermembranosa de hueso, y las nuevas trabéculas quedan

firmemente cimentadas sobre el hueso lesionado o muerto. Se reabsorben las matrices del hueso muerto localizadas en los espacios vacíos entre las nuevas trabéculas óseas en desarrollo y se llenan los espacios con hueso nuevo. Por último, se reabsorbe todo el hueso muerto y queda restituido por hueso nuevo formado por los osteoblastos que invaden la región. Estos sucesos ocurren al tiempo, dando lugar a la reparación de la fractura.

Durante la remodelación, el hueso primario proveniente de la formación intermembranosa queda sustituido por hueso secundario, lo que refuerza la zona de fractura reparada y la reabsorción del callo. Los fenómenos de cicatrización y remodelación ósea en la fractura son una reacción directa a las tensiones aplicadas en este sitio. La última fase consiste en la restauración de la forma y resistencia originales de la zona reparada.

Como conclusión puede verse que la recuperación ósea consiste en la formación de cartílago y en la osificación tanto intermembranosa como endocondral de hueso.

3.3.6. Biomecánica del hueso

Conocer la biomecánica del hueso es importante en el diseño de un biomaterial, debido a que éste va a asumir temporal o permanentemente la función mecánica del hueso.

Las fatigas que actúan sobre el tejido óseo son tensión, compresión y torsión. Además pueden ser aplicadas de forma perpendicular a la superficie ósea, como fuerza normal, o de forma oblicua, como fuerza de cizallamiento. El hueso esponjoso trabaja principalmente a compresión; en cambio, el hueso cortical debe soportar fuerzas de compresión, tracción y cizalladura. En líneas generales, la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión

y cizalladura, mientras que el colágeno le proporciona su resistencia a la tracción.

El hueso responde con un patrón característico a las fuerzas aplicadas sobre su superficie, el cual depende del tipo de fuerza, densidad, arquitectura y composición del tejido. La primera fase es elástica y genera una deformación temporal que se mantiene mientras actúa la fuerza, para luego recuperar su forma original. Si la fuerza aumenta, se entra en una fase plástica y el hueso, aunque se recupera parcialmente, queda deformado. Por último, cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido, se produce la fractura.

Los huesos largos, formados fundamentalmente por tejido cortical, son elásticos y poco plásticos, por lo que su resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica de manera vertical al sentido de la carga. Cuando la fuerza actúa de forma oblicua la fase plástica se acorta y el hueso se fractura con mayor rapidez. En los huesos constituidos por tejido esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica a lo largo de su eje vertical. Estos huesos, al ser menos densos, son más plásticos y menos elásticos, por lo que pueden resistir deformaciones mayores.

Las propiedades biomecánicas del hueso esponjoso dependen de su densidad aparente, por lo que los valores del módulo elástico y resistencia varían con el cubo o el cuadrado de ésta. Así, la densidad del hueso esponjoso oscila entre 0,1 y 1 g/cm³, mientras que la del hueso cortical es de aproximadamente 1,8 g/cm³. Las trabéculas de hueso esponjoso tienen una densidad que fluctúa entre 1,6 y 1,9 g/cm³, muy similar a la del hueso cortical. La magnitud de las propiedades del hueso esponjoso son muy variables, pero los valores medios de su resistencia son de 5 a 10 MPa y su módulo de Young oscila entre 50 a 100 Mpa.

El hueso cortical es altamente anisotrópico, por lo que su resistencia depende fundamentalmente de la orientación de la carga respecto a la dirección de las osteonas. Para una dirección de aplicación de la fuerza paralela a la dirección de las osteonas, la resistencia a la tracción oscila entre 78.8 y 151 MPa, la resistencia a la compresión entre 131 y 224 MPa y el módulo de Young entre 17 a 20 GPa. Los valores de referencia para las fuerzas transversales corresponden a una resistencia a la tracción entre 51 y 56 MPa, una resistencia a la compresión entre 106 y 133 MPa y un módulo de Young entre 6 y 13 GPa. Los valores de resistencia a la cizalladura oscilan entre 51.1 y 70 MPa y el módulo de cizalladura es de 3.3 GPa³⁸.

3.4. BIOMATERIALES

Los biomateriales se corresponden con todo aquel material destinado a estar en contacto con los sistemas biológicos con el objetivo de tratar, aumentar o sustituir un tejido, órgano o función del organismo. La implantación de un biomaterial genera la reacción de los tejidos vivos receptores, produciéndose un proceso inflamatorio de diferente intensidad que finaliza con la cicatrización del mismo. Por otro lado, en la reacción de los tejidos también desempeñan un papel importante los productos de corrosión, degradación o abrasión del material implantado^{39,40}.

El organismo siempre responde a la agresión que supone el biomaterial; existen casos de biocompatibilidad, en que el material es bien tolerado por el

³⁸ Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (1999): *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (Eds.), Ergon, Madrid.

³⁹ Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F. (2000): Biomaterials developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21, pps.: 2347-59.

⁴⁰ Graig R.G. (1999): Review: Advances in biomaterials from 1957 to 1997. *Journal of Oral Rehabilitation* 26, pps.: 841-846.

organismo, y casos en que existe una bioincompatibilidad y la respuesta será patológica⁴¹. A continuación describiremos cada tipo:

3.4.1. Respuesta del organismo a los implantes

La respuesta del hueso ante el implante da lugar a diferentes tipos de interfases entre el implante y el tejido hospedador. Así, desde el punto de vista conceptual, la osteointegración supone la curación de la herida quirúrgica que completa su contacto con el biomaterial implantado, sin residuos cicatriciales o reacciones de cuerpo extraño. Como ya citamos con anterioridad, tras reponer el aporte sanguíneo aparecerán nuevas células que se encargarán de transformar el coágulo formado y el hueso dañado en matriz ósea, que posteriormente será calcificada y finalmente reestructurada hasta alcanzar la disposición de hueso lamelar maduro. Esto significa que la interfase está formada por una gran variedad de moléculas y diferentes tipos de estructuras que contienen elementos celulares y cristalinos, lo que da lugar a diferentes tipos de interfases:

3.4.1.1. Fibroosteointegración

Se refiere a la encapsulación del implante por tejido conectivo, con osteogénesis a cierta distancia^{42,43}. Esta retención fibro-ósea, concepto emitido

⁴¹ **Planas A. (2003):** Comportamiento de los materiales en el medio biológico. Biocompatibilidad de los BMO. En *Arte y ciencia de los materiales odontológicos*. Eds. Toledano Pérez M., Osorio Ruiz R., Sánchez Aguilera F., Osorio Ruiz E. Ediciones Avances Medico-Dentales, España, pps. 13-37.

⁴² **Donado A., Guisado B., Ortega R. y Sanz J. V. (2003):** Respuesta ósea en implantología. Osteointegración. Anatomía implantológica. En *Bases morfológicas y su aplicación clínica en implantología dental*. Eds. Donado M. Ars Medica, España, pps. 42-47.

⁴³ **Donado A., Guisado B., Ortega R. y Sanz J. V. (2003):** Respuesta de la mucosa periimplantaria. En *Anatomía implantológica. Bases morfológicas y su aplicación clínica en implantología dental*. Ed. Donado M. Ars Medica, España, pps. 49-59.

por Weiss en 1986⁴⁴, se efectúa a expensas de la interposición de una capa de tejido conjuntivo rico en fibras de colágeno de tipo denso y de características no patológicas⁴⁵ que atraviesan la lámina y conectan las superficies óseas distantes. Esta respuesta se busca en implantes dentales que vayan a ser sometidos a carga pues, al colocar el implante, las fibras conectivas producirán un estímulo osteogénico en dichas superficies. Se produce con implantes de material biotolerado como el acero inoxidable, metales nobles y aleaciones de cromo-cobalto-molibdeno. El mismo efecto se obtiene con el micromovimiento y carga durante la fase de integración de implantes de titanio. Un ejemplo son los implantes de titanio tipo lámina, cuya carga al cabo de uno o dos meses produce la encapsulación en tejido conectivo⁴⁶.

3.4.1.2. Fibrointegración

Describe la existencia de tejido fibroso no diferenciado, a modo de cápsula o cuerpo extraño, que rodea a la fijación. Conduce al fracaso para la mayoría de los autores⁴².

Los primeros estudios publicados sobre los implantes de tipo hoja de titanio mostraban una separación entre el implante y el hueso compuesta por una o varias capas de tejido fibroso de origen conjuntivo. Este tejido era descrito

⁴⁴ Weiss A., von der Mark K., Silbermann M. (1986): A tissue culture system supporting cartilage cell differentiation, extracellular mineralization, and subsequent bone formation, using mouse condylar progenitor cells. *Cell Differentiation* **19**(2), pps.: 103-113.

⁴⁵ Gutiérrez J., García M. (2002): Fundamentos de la Implantología actual. Concepto de osteointegración. Aspectos estructurales y biológicos de los implantes. En *Integración de la implantología en la práctica odontológica*. Eds. Gutiérrez Pérez J. L., García Calderón M. Ediciones Ergon, España, pps. 1-9.

⁴⁶ Herrero M., Herrero F. (1995): Interfases osteoimplantarias. En *Atlas de procedimientos clínicos en implantología oral*. Eds. Herrero Climent M., Herrero Climent F. TRP Ediciones, España, pps. 5-6.

como altamente organizado^{47,48,49,50,51}; pero, como ya se indicó anteriormente, los estudios publicados sobre fibrointegración por Bert en 1981 mostraron que los resultados no son estables a medio y largo plazo⁵². Según indicó Bert en 1996, los resultados demostraban claramente que el mantenimiento de los implantes a largo plazo, colocados según el concepto de la interposición de tejido fibroso, es aleatorio y esta concepción de la interfase hueso-implante sólo entraña fracaso a corto, medio o largo plazo⁵³.

Como conclusión, la interposición de tejido fibroso entre hueso e implante, que es el concepto clásico de implantología tradicional, no permite asegurar anclajes de larga duración por los elementos protésicos⁵⁴.

3.4.1.3. Osteointegración

Se define como la conexión directa, estructural y funcional, entre el hueso vivo y la superficie de un implante endoóseo cargado funcionalmente; se produce una unión mecánica directa y estable sin interposición de tejido conectivo, identificable con microscopio óptico, y por tanto no hay movilidad. El estudio

⁴⁷ **Babbush C. A. (1972):** Endosseous blade-vent implants: a research review. *Journal of Oral Surgery Marine* **30(3)**, pps.:168-75.

⁴⁸ **Manderson R. D. (1972):** Experimental intra-osseous implantation in the jaws of pigs. *The Dental Practitioner and Dental Record* **22(6)**, pps.:225-231.

⁴⁹ **James R. A. (1974):** Training programs in Oral Implantology at Loma Linda University. *Oral Implantology* **5(1)**, pps.:80-84.

⁵⁰ **Doms R.C. (1974):** The tissue response to endosteal blade implants-microradiographic and tetracycline marking. I. *Oral Implantology* **4(4)**, pps.:470-474.

⁵¹ **Meenaghan M.A., Natiella J.R., Armitage J.E., Wood R.H. (1974):** Evaluation of the crypt surface adjacent to metal endosseous implants: an electron microscopic study in clinically successful implants. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **31(5)**, pps.:574-581.

⁵² **Bert J.D. (1981):** Differential diagnosis and treatment of root angulation problems. *Dental Clinics of North America* **25(1)**, pps.:85-93.

⁵³ **Bert J.D. (1996):** Custom total hip arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* **11(8)**, pps.:905-915.

⁵⁴ **Bert M., Missika P. (1997):** Osteointegración. En *Implantología Quirúrgica y Protésica*. Bert M., Missika P. (Eds.) Masson, España, pps. 3-10.

por microscopía electrónica permite comprobar la existencia de una interfase no mineralizada de 100 a 200 Å, compuesta por el óxido del material y glucosaminoglicanos⁴². Es la respuesta más eficaz y exige, una vez conseguida la osteointegración, su mantenimiento⁴⁶. Bränemark definió ya el término oseointegración en el año 1977 como “un contacto directo entre el hueso y el implante sin interposición de tejido fibroso en la interfase”⁵⁵. Esta definición no persistió con los años y surgieron preguntas como cuál era el nivel de resolución de ese contacto directo. Los estudios llevados a cabo en el ámbito odontológico han mostrado que el contacto directo era menor a lo imaginado. Por ello, en 1984 Bränemark redefinió la oseointegración como “una unión estructural y funcional entre el hueso vivo y ordenado y un implante sometido a carga funcional”⁵⁶. La definición aún está incompleta pues es necesario saber la cantidad mínima necesaria para asegurar un éxito del 85% a los diez años. En la actualidad no existe una definición científica aceptable pero sí es seguro que el contacto aumenta con el tiempo hasta alcanzar un máximo que oscila entre el 25% y el 85% de la superficie total del implante⁵⁷. Además, se sabe que un implante completamente rodeado de hueso cortical alcanza un 90% de superficie de contacto óseo frente al 50% si está rodeado de hueso esponjoso. Con esto se estima que el tiempo que debe permanecer un implante rodeado de hueso esponjoso libre de carga para conseguir una osteointegración completa es de seis meses, mientras que en hueso de mejor calidad podría acortarse este tiempo uno o dos meses⁴⁶. En la práctica, la osteointegración en

⁵⁵ Bränemark P.I., Hansson B.O., Adell R., Breine U., Lindstrom J., Hallen O., Ohman A. (1977): Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10 year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. Supplementum* 16, pps.: 1-132.

⁵⁶ Bränemark P.I., Adell R., Albrektsson T., Lekholm U., Lindstrom J., Rockler B. (1984): An experimental and clinical study of osseointegrated implants penetrating the nasal cavity and maxillary sinus. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 42(8), pps.:497-505.

⁵⁷ López F., López H. (1994): Oseointegración. En *Bases para una Implantología segura*. López Rubín F., López Rubín H. (Eds.) Offser color, España, pps. 8-21.

los implantes orales puede valorarse de forma precisa mediante una serie de factores predefinidos, como son⁵⁸:

- 1- La inmovilidad del implante tras someterlo a carga y la ausencia de síntomas sensitivos o infecciosos.
- 2- Criterios clínicos.
- 3- La ausencia de un espacio radiotransparente periimplantario.
- 4- Pérdida ósea inferior a 0,2 mm. por año después del primer año.
- 5- Criterios radiológicos.

La osteointegración se consigue con implantes de material bioinerte como el titanio y aleaciones de titanio y cerámicas de óxido de aluminio.

3.4.1.4. Biointegración

Es la producida a través de la unión bioquímica entre el hueso y un material bioactivo (hidroxiapatita y biocristales), con intercambio iónico entre ambas superficies⁴⁶. Este término parte de las investigaciones publicadas en los últimos veinticinco años, fundamentalmente por Meffert (1985)⁵⁹, que insiste en modificar la terminología consagrada por Brånemark⁵⁵ para definir la retención estable y predecible del implante en el hueso como “biointegración”; En sus estudios recoge el criterio de DePuter y sus colaboradores (citado en Meffert, 1985)⁵⁹, que llamaron la atención sobre la existencia de dos formas de anclaje de los implantes en función de su composición. Reciben el nombre de retención mecánica y bioactiva:

⁵⁸ **Siegel M.A. (1999):** Osseointegration?. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **88**: pp. 113.

⁵⁹ **Meffert R. (1985):** The soft Tissue-Implant Interface. En *The Dental Implant. Clinical and Biological Response of Oral Tissues*. McKinney R., Lemons J. (Eds.) PSG Publishing Company, Massachusetts, pps. 95-113.

3.4.1.4.1. Retención mecánica

Se logra en los implantes con superficie metálica, como el titanio y aleaciones, y se establece en base a la morfología de esta superficie (irregular, con ranuras...). Implica la existencia de un contacto directo, íntimo, pero neutro entre la base metálica y el hueso sin intermediación de ningún otro tipo de conexión. De acuerdo con este criterio, la osteointegración definida por Brånemark⁵⁵ sería un exponente de retención mecánica.

3.4.1.4.2. Retención biológica

Requiere la presencia de materiales bioactivos en la superficie periférica del implante, responsables de una interacción química con el hueso, de forma similar a la fijación observada de forma natural, sin necesidad de retención mecánica⁵⁴. Esta unión directa hueso-implante es identificable al microscopio electrónico y, a diferencia de los implantes osteointegrados, no existe interfase sin calcificar. Su mejor exponente son los materiales conocidos como cerámicas cristalinas, hidroxiapatita y fosfato tricálcico⁴⁶.

3.4.2. Estudios preclínicos y de biocompatibilidad

Los biomateriales deben cumplir una serie de propiedades para asegurar el éxito en la implantación. Por ello, previo a la colocación, debemos valorar las distintas propiedades de los biomateriales⁶⁰, que aparecen resumidas en el siguiente cuadro (**Tabla 1**).

⁶⁰ Bert M., Missika P. (1997): Anestesia, incisiones, colgajos, suturas. En *Implantología Quirúrgica y Protésica*. Bert M., Missika P. (Eds.) Masson, España, pps. 45-52.

PROPIEDADES MECÁNICAS	Tensión-deformación	PROPIEDADES TÉRMICAS	Conducción del calor Conductividad térmica Difusividad térmica Coeficiente de dilatación térmica
	Gráfica tensión-deformación		PROPIEDADES SUPERFICIALES
	Módulo de elasticidad		
	Límite proporcional o límite elástico. Resistencia a la flexión		
	Tensión de fractura. Límite de fractura. Resistencia a la fractura		
	Ductilidad y maleabilidad		
	Coeficiente de Poisson		
	Resistencia y tenacidad	PROPIEDADES REOLÓGICAS	Viscosidad Tipos de fluido
	Resistencia al impacto		
	Resistencia a la fatiga	PROPIEDADES FÍSICAS	Composición Densidad Microestructura
Dureza	PROPIEDADES QUÍMICAS	Solubilidad Corrosión Lixiviación de los componentes	
Dureza Brinell			
Dureza Rockwell			
Dureza Vickers			
Dureza Knoop			
Microdureza y nanodureza	PROPIEDADES ELÉCTRICAS	Galvanismo Resistividad eléctrica	
Resistencia a la abrasión			
Elasticidad y viscoelasticidad	PROPIEDADES ÓPTICAS	Color Opacidad y translucidez Pigmentación Fluorescencia Metamerismo Índice de refracción	
Escurrecimiento			

Tabla 1: propiedades de los biomateriales

Otro aspecto fundamental es valorar su biocompatibilidad; éste término hace referencia al grado de aceptación de un material por parte del organismo y se denomina más precisamente “aceptabilidad biológica”⁶¹.

A pesar del uso tan extendido que tiene en ciencias de la salud el término biomateriales, su definición está recién aceptada en el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española de la edición 2001. Donde sí aparece recogida desde hace tiempo es en la **European Society for Biomaterials** (1986), que los define como “materiales que empleados en los dispositivos médicos, tienen como fin interactuar con sistemas biológicos”. De esta manera, la definición original de material biocompatible como “material inerte en el entorno fisiológico” se ha modificado, ya que actualmente se incluyen como biocompatibles a materiales que pueden reaccionar con el entorno. El carácter inerte de un material es relativo, dado que siempre quedan productos residuales, defectos de fraguado, productos de solubilización o de corrosión o de la misma dinámica de la reacción de fraguado, que poseen la capacidad de difundir y reaccionar químicamente con las moléculas biológicas. La existencia de un material absolutamente inerte no es factible, pero un material puede ser considerado biocompatible siempre que la respuesta biológica se mantenga dentro de unos límites aceptables⁶².

Sin embargo, la biocompatibilidad es algo más que la ausencia de toxicidad. El término biocompatible aparece cuando la medicina, junto con toda la tecnología que le da soporte, evoluciona lo suficiente como para conseguir sustituir la totalidad o parte de un tejido, en nuestro caso tejido óseo, por un material, para lo cual es condición imprescindible que el material sea biocompatible. Las

⁶¹ Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (1999): *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (Eds.), Ergon, Madrid.

⁶² López F., López H. (1994): La interfase hueso-implante. En *Bases para una Implantología segura*. López Rubín F., López Rubín H (Eds.). TRP Ediciones, España, pps. 22-27.

características de un tejido se basan en su hidratación, su celularidad, su complejidad estructural, los cambios que sufren con la edad y con diferentes estímulos, su actividad metabólica y, por último, su anisotropía, es decir, la variación de su comportamiento en función de la dirección del estímulo. Por el contrario, los biomateriales son acelulares, generalmente anhidros, con una microestructura más o menos compleja pero siempre estándar, no responden a estímulos ni participan en la actividad metabólica del organismo y son isotrópicos. A todo esto hay que añadir que nuestro cuerpo está diseñado para reconocer lo que le es propio y rechazar lo que le es ajeno a fin de defenderse de agresiones exteriores. Por ello, cuanto más inerte sea un material más probabilidad tendrá que el organismo no lo rechace.

Otro factor fundamental es que la mayoría de los biomateriales que se utilizan tienen que fraguar, por lo que necesitan ser químicamente activos.

Como consecuencia de todo esto, se puede considerar la biocompatibilidad de un material como “el estado en el cual un material se encuentra en íntimo contacto con un organismo vivo, ejerciendo su función, sin dañarlo ni ser dañado por él”. Por lo tanto, la biocompatibilidad es bidireccional entre el organismo y el material y se debe tener en cuenta cómo puede dañar el material al organismo y cómo éste puede, a su vez, dañar al material⁶³.

El objetivo principal de los estudios de biocompatibilidad es analizar las posibles respuestas adversas que pueden generar los biomateriales⁴¹ (**Tabla 2**). En este sentido, la etiología fundamentalmente relacionada con la toxicidad de los biomateriales son los agentes químicos, que pueden actuar de forma aislada o, en ocasiones, asociados a reacciones inmunológicas, vehiculizando agentes infecciosos o condicionando agentes físicos. Estos agentes llevan al

⁶³ López F., López H. (1994): Mantenimiento de los implantes endoóseos. En *Bases para una Implantología segura*. Eds. López Rubín F., López Rubín H. TRP Ediciones, España, pps. 220-226.

desarrollo de distintos mecanismos celulares o sistémicos que actúan como sistemas de defensa, como son la inflamación, la respuesta inmune, la carcinogénesis y la estrogenicidad. Pero independientemente del mecanismo de actuación, el estímulo nocivo produce una alteración en la estructura de la célula, que puede ser de diversos tipos. Podemos hablar así de necrosis, acúmulo intracelular de sustancias, alteraciones subcelulares u otras alteraciones como calcificaciones, distróficas o metastásicas, o degeneración hialina. Todos estos tipos de alteraciones celulares pueden tener una repercusión clínica prácticamente nula o llegar a ser letales, según el tipo, intensidad y órgano afectado⁶⁴.

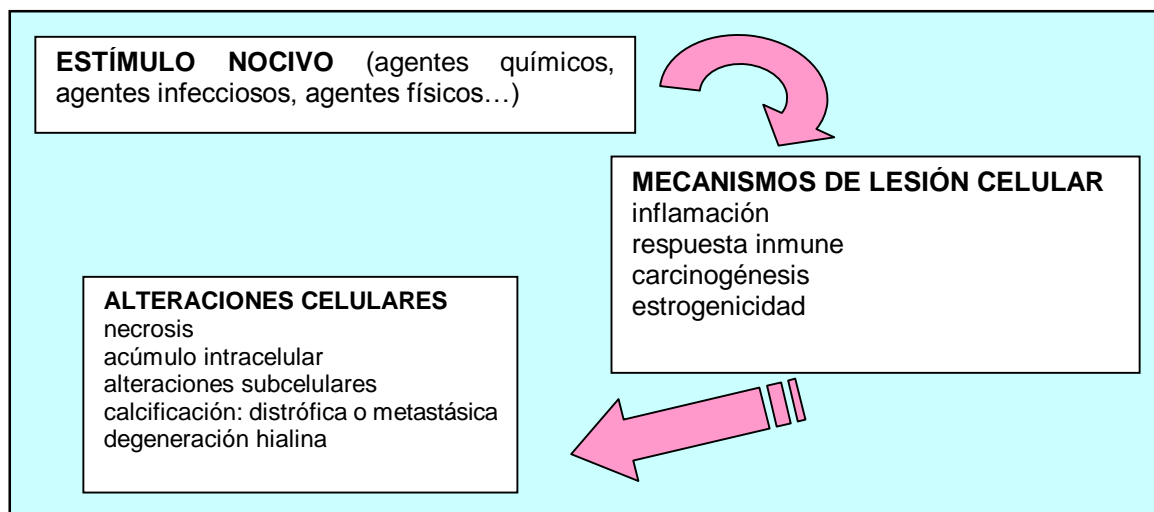


Tabla 2: respuesta nociva provocada por un biomaterial

Es necesario, por lo tanto, ejercer un gran control sobre la utilización de los biomateriales. Existen organismos encargados de estandarizar las pruebas destinadas a estudios de biocompatibilidad y publicar las normas para controlar su proliferación. En Francia existe **AFNOR** (Association Francaise de

⁶⁴ **Asián E., Conde M. D. (2002):** Complicaciones y fracasos en implantología. En *Integración de la Implantología en la Práctica Odontológica*. Gutiérrez Pérez J. L., García Calderón M (Eds.). Ediciones Ergon, España, pps. 251-260.

Normalisation), en el Reino Unido la **BS** (British Standard), en Alemania la **DIN** (Deutsche Internationale Normalisierung) y en España la **AENOR** (Asociación Española de Normalización). Se han creado también organismos comunitarios, entre los que destaca **ISO** (International Standard Organization). El comité técnico ISO TC-194, constituido por 12 grupos de trabajo, es el encargado de la evaluación biológica de los biomateriales y el expediente que los nombra se denomina ISO 10993. En Estados Unidos funciona la **American Society for Testing and Materials**, que se ocupa del desarrollo y regulación de materiales, productos, sistemas y servicios. Uno de sus subcomités se ha encargado de la publicación de la primera estandarización de pruebas para estudios de biocompatibilidad (Recommended Practice for Experimental Testing for Biological Compatibility of Metals for Surgical Implants).

La tendencia actual es la realización de una serie de pruebas biológicas, que serán descritas a continuación:

3.4.2.1. Pruebas de toxicidad

Para determinar la biocompatibilidad de un biomaterial, en primer lugar es necesario investigar su posible reacción tóxica en el organismo. Para ello, existen múltiples pruebas que se pueden clasificar en tres categorías: Nivel I, que son ensayos *in vitro* sobre toxicidad, nivel II, que son ensayos *in vivo* con animales de experimentación y nivel III, que son ensayos en humanos⁴¹. Las pruebas recomendadas por algunos organismos internacionales (ISO) respecto a los niveles I, II y III son las indicadas en la **tabla 3**. Este tipo de experimentación debe estar muy bien controlada y cumplir todos los requisitos éticos y legales.

3.4.2.2. Pruebas de funcionalidad

Una vez demostrado que un material no es tóxico, es necesario hacer múltiples pruebas para analizar su comportamiento y determinar su función. Al hablar de biocompatibilidad estas pruebas se denominan *in vitro* e *in vivo*. Pero como pruebas de funcionalidad se utilizan más los términos de ensayos de laboratorio y ensayos clínicos, que son los que se realizan sobre pacientes⁶⁴.

3.4.2.2.1. Ensayos de laboratorio

Las pruebas de laboratorio son los clásicos ensayos de materiales. Se realizan sobre pequeñas muestras de material y se miden propiedades de los materiales mecánicas, térmicas,... en condiciones basales y bajo diversas condiciones, como variables de manipulación, tensión, tiempos de fraguado, cohesión... También entre estas pruebas se incluyen: estudios morfológicos, fundamentalmente la microscopía electrónica de barrido, los de microfiltración marginal con análisis de las interfases, ensayos mecánicos de flexión, de tracción, de microtensión, además de los análisis de estructura.

Si el material da buena respuesta de forma experimental, se comienza a utilizar en clínica para ver su comportamiento real⁴¹.

3.4.2.2.2. Ensayos clínicos

Todos los estudios de laboratorio se tienen que valorar posteriormente en clínica, pues es imposible hacer una correlación adecuada del comportamiento de un material en clínica y en laboratorio. Para ello se utiliza el biomaterial en el sitio indicado y de la forma correcta, y se evalúa su comportamiento y evolución a lo largo de un período de tiempo. Para poder valorar los cambios se utilizan mediciones histomorfométricas precisas, radiografías y microscopía de barrido⁴¹, entre otras técnicas.

<p>NIVEL I</p>	<p>PRUEBAS INICIALES Objetivo: conocer el comportamiento general de los biomateriales en relación con tejidos o fluidos biológicos. Fundamento: poner en contacto el material de estudio con cultivos celulares de distintos tejidos o con fluidos orales y ver si existe citotoxicidad.</p>	<p>Citotoxicidad Hemólisis Test de Ames Test de transformación celular de Styles Dominancia letal D150 por vía oral D150 por vía intraperitoneal Inhalación aguda</p>
<p>NIVEL II</p>	<p>PRUEBAS INTERMEDIAS Se realizan, no sólo con tejido, sino con un organismo completo, animales de experimentación, bajo condiciones que se parezcan al futuro uso clínico.</p>	<p>Irritación de mucosa Toxicidad dérmica por exposición repetida Implantación subcutánea en cobaya Sensibilidad en cobaya</p>
	<p>PRUEBAS ESPECÍFICAS Son ensayos sobre los animales pero localizando los biomateriales en el lugar donde se prevé su uso clínico.</p>	<p>Colocación de implantes (...)</p>
<p>NIVEL III</p>	<p>ENSAYOS EN HUMANOS</p>	<p>Colocación de implantes (...)</p>

Tabla 3: pruebas de toxicidad (nivel I, nivel II y nivel III)

3.4.3. Biomateriales como sustitutos óseos

Los biomateriales que tienen utilidad como sustitutos óseos son aquellos que al ser implantados son capaces de favorecer la regeneración o reparación ósea, por lo que pueden ser empleados con éxito en distintos tratamientos como fracturas conminutas con pérdida de tejido óseo, en el relleno de cavidades generadas por la resección de tumores óseos o para rellenar defectos óseos secundarios a endoprótesis, pseudoartrosis y artrodesis. En

este sentido, los biomateriales ideales son aquellos que progresivamente son sustituidos por tejido óseo neoformado del hueso receptor^{65,66}.

El fenómeno de regeneración ósea, como ya hemos visto, requiere por un lado la presencia de células que produzcan matriz ósea, como un andamiaje sobre el cual pueda crecer el hueso neoformado, y por otro la presencia de moléculas bioactivas, como la proteína morfogenética, que dirigan el proceso. Para ello, el tejido óseo debe cumplir con la revascularización y el consiguiente aporte de nutrientes. Además, el material implantado, sea un injerto o un biomaterial, debe proporcionar las propiedades mecánicas adecuadas a la región dañada, según la funcionalidad de la zona reconstruida.

Por todo ello, la investigación encaminada al diseño de biomateriales como sustitutivos de hueso debería seguir unos fundamentos básicos:

1. El material diseñado debería poseer las propiedades mecánicas adecuadas para restablecer de forma inicial la resistencia mecánica del esqueleto dañado.
2. El biomaterial debería permanecer sólo temporalmente en el organismo, de forma que permita la formación de hueso nuevo, y que el hueso neoformado soporte gradualmente requerimientos mecánicos, haciendo posible la remodelación como respuesta a estos requerimientos. Esto implica que el material debe degradarse o reabsorberse de forma controlada, liberando productos de degradación no tóxicos que puedan ser metabolizados o excretados por mecanismos fisiológicos.

⁶⁵ **Bauer T.W., Smith S.T. (2002):** Bioactive materials in orthopaedic surgery. Overview and regulatory considerations. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 11-22.

⁶⁶ **Delloye C., Cnockaert N., Cornu O. (2003):** Bone substitutes in 2003: An overview. *Acta Orthopaedica Belgica* **69**, pps.: 1-8.

3. La revascularización en la zona reconstruida es muy importante para permitir la llegada de nutrientes, precursores celulares y moléculas bioactivas.
4. El material debe ser fácil de manipular y de aplicar, sin necesidad de técnicas quirúrgicas demasiado complicadas.

Han sido muchos los biomateriales usados para la regeneración ósea hasta la actualidad, pero ninguno de ellos cumple todos los requisitos definidos anteriormente. Para ello, hay diferentes líneas de investigación, que pueden ser resumidas en cuatro: polímeros, moléculas bioactivas, transplantes de células y cerámicas. En numerosas ocasiones, estas líneas contactan creándose materiales compuestos o composites que reúnen las mejores características biológicas y mecánicas de los materiales de origen para su empleo como sustitutivos óseos. Así, el empleo de reconocidos biomateriales que pueden aportar un andamiaje seguro para diversos factores bioactivos se une a la capacidad de osteoinducción de los segundos. Por otro lado, podemos agregar a esto la posibilidad de asociar biomateriales con células osteoformadoras cultivadas, que pueden ser capaces de otorgar un verdadero aporte osteogénico para la reparación de defectos óseos.

A continuación expondremos de forma esquematizada los tipos de biomateriales que existen (**Tabla 4**), comenzando la división por los dos grupos principales:

- Biomateriales biológicos, que tienen un origen natural.
- Biomateriales biomédicos o de origen artificial.

Posteriormente describiremos lo más representativo de cada campo, para adentrarnos finalmente en las cerámicas, que son las que realmente motivan la realización de este estudio.

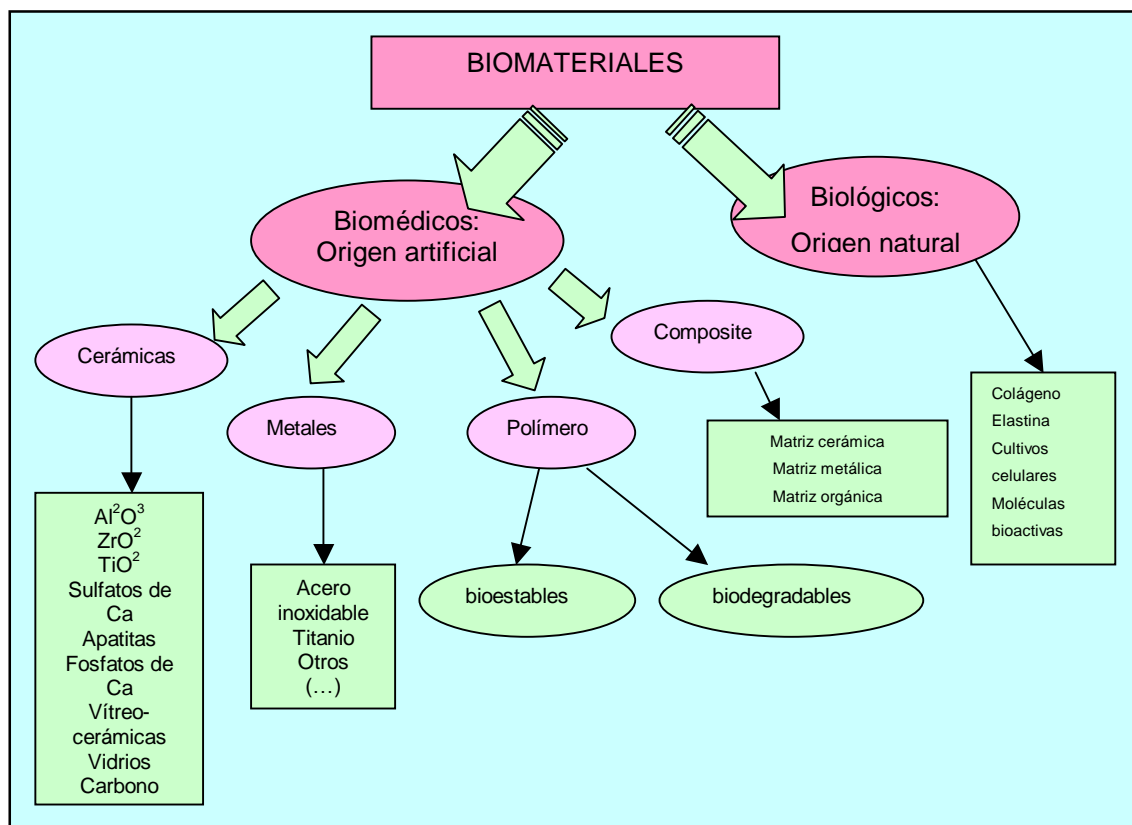


Tabla 4: clasificación de los biomateriales (Modificada de Vallet- Regí., 2001)⁶⁷

3.4.3.1. Biomateriales biológicos

3.4.3.1.1. Moléculas bioactivas

La implantación de biomateriales capaces de liberar moléculas bioactivas parte del hecho de que estos factores osteoinductivos pueden provocar la migración de células mesenquimales hacia el defecto óseo y su posterior diferenciación, que permite la neoformación ósea.

⁶⁷ Vallet-Regí M. (2001): Ceramics for medical applications. *Journal of the Royal Society of Chemistry, Dalton Trans.*, pps.: 97-108.

3.4.3.1.1.1. *Proteína morfogenética ósea*

Los primeros estudios sobre este tipo de moléculas datan del año 1965, en el que Urist publicó un trabajo que describía como la fracción proteica contenida en la matriz ósea descalcificada, a la que denominó proteína morfogenética ósea (BMP), al ser implantada en defectos cavitarios actuaba sobre las células mesenquimatosas, provocando una migración de las mismas hacia la zona del defecto óseo y su posterior diferenciación a osteoblastos, conduciendo a la formación de tejido óseo⁶⁸. Posteriormente, nuevas investigaciones han permitido identificar y purificar estas proteínas.

Las **BMP** son proteínas básicas de bajo peso molecular que se pueden aislar desde el hueso cortical, la dentina y algunos tumores óseos. Desde que a mediados de los años ochenta se obtuvieron las primeras proteínas se han identificado seis, denominadas desde la BMP-2 hasta la BMP-7. Estas proteínas forman parte de una superfamilia del factor de crecimiento-b (TGF-b). A través de diferentes investigaciones se ha comprobado que la BMP-2 induce la diferenciación de los osteoblastos, la BMP-3 (osteogenina) estimula preferentemente la formación de cartílago antes que la formación ósea, y las BMP-5, BMP-6 y BMP-7 actúan sobre la BMP-2, potenciando la formación ósea *in vivo*. Actualmente se describen alrededor de 12, entre las que destacan la BMP-2, BMP-3, BMP-4 y BMP-6, obtenidas a partir de tecnologías de recombinación de DNA.

Asociación con biomateriales

Resulta sumamente difícil rellenar un defecto óseo con dicha proteína, ya que debido a su solubilidad se dispersa inmediatamente, y como resultado obtendremos una escasa inducción ósea. Por ello, existen estudios en los

⁶⁸ Urist M.R. (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, pps.: 893-899.

cuales se asocian con otros materiales. Los biomateriales utilizados como vehículos para moléculas bioactivas son cerámicas de fosfatos de calcio, sulfatos cálcicos, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol y otros biomateriales compuestos; su función consiste en retener las moléculas bioactivas en el lugar de implantación^{69,70,71,72}.

Los estudios han demostrado que la cantidad de tejido óseo formado es mayor en presencia de BMP, siendo esta relación dosis-dependiente. Los ensayos actuales se centran en determinar la dosis mínima de BMP necesaria para inducir osteogénesis, pero que limite los riesgos de su acción sistémica^{73,74,75,76}.

3.4.3.1.1.2. Factores de crecimiento óseo

La matriz ósea extracelular constituye una importante reserva de factores de crecimiento, especialmente los sintetizados por las células óseas como IGF,

⁶⁹ **Yoon S.T., Boden S.D. (2002):** Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 33-43.

⁷⁰ **Ruhé P.Q., Kroese Dedutman H.C., Wolke J.G.C., Spauwen P.H.M., Jansen J.A. (2004):** Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* **21**, pps.: 2130-2132.

⁷¹ **Ohura K., Hamanishi C., Tanaka S., Matsuda N. (1999):** Healing of segmental bone defects in rats induced by a β -TCP-MCPM cement combined with rhBMP-2. *Journal of Biomedical Materials Research* **44**, pps.: 168-175.

⁷² **Laffargue P., Hildebrand H.F., Rtaimate M., Frayssinet P., Amoureux J.P., Marchandise X. (1999):** Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits bone defects. *Bone* **25** (suppl 2), pps.: 55-58.

⁷³ **Valentin-Opran A., Wozney J., Csimma C., Lilly L., Riedel G.E. (2002):** Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 110-120.

⁷⁴ **Reddi A.H. (2001):** Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* **83 A (Suppl)**, pps.: 1-6

⁷⁵ **Bostrom M.P., Camacho N.P. (1998):** Potencial role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clinical Orthopaedics* **355 (Suppl)**, pps.: 274-282.

⁷⁶ **Romero N., Vallecillo M. (2003):** Injertos óseos, materiales aloplásticos y membranas para regeneración tisular guiada. En *Arte y ciencia de los materiales odontológicos*. Toledano Pérez M., Osorio Ruiz R., Sánchez Aguilera F., Osorio Ruiz E. (Eds.), Ediciones Avances Medico-Dentales, España, pps. 13-37.

TGF- β , FGF y PDGF^{76,77}. Son proteínas que desempeñan un papel fundamental en la migración, diferenciación y proliferación celular. Hablaremos de forma resumida de sus funciones:

- **IGF (Factores de crecimiento insulínicos):** estos factores regulan el crecimiento celular y determinan la calcificación de la matriz ósea. La síntesis de los IGF I e IGF II depende de la acción de la hormona de crecimiento sobre el tejido óseo; existen otros factores que pueden controlar la acción de los IGF, como los glucocorticoides, los estrógenos y los análogos de la vitamina D.
- **TGF- β (Factor de crecimiento transformante- β):** tiene un papel importante en los procesos de formación y mineralización de la matriz ósea. Su acción se regula por otro factor de crecimiento, el FGF, los estrógenos y la calcitonina.
- **FGF (Factor de crecimiento fibroblástico):** da lugar a la proliferación de células indiferenciadas en el proceso de reparación ósea y también es capaz de estimular la neoangiogénesis.
- **PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas):** estimula la proliferación de fibroblastos y osteoblastos considerándose, junto con la IGF-I, uno de los más importantes en el proceso de regeneración del tejido óseo.

Las investigaciones que se desarrollan en la actualidad tienen como objetivo conseguir biomateriales que actúen como portadores de factores de crecimiento, de forma que puedan mejorar la velocidad, cantidad y calidad de la regeneración ósea en el lugar de la implantación^{78,79}. Ejemplos de estos estudios son el uso de hidroxapatita como vector de FGF, fosfato tricálcico

⁷⁷ Khan S.N., Bostrom M.P., Lane J.M. (2000): Bone growth factors. *The Orthopedic Clinics of North America* 31, pps.: 375-388.

⁷⁸ Mundy G.R., Boyce B., Hughes D., Wrigth K., Bonewald L., Dallas S., Harris S., Ghosh C.N., Chen D., Dunstan C. (1995): The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone* 17 (Suppl 2), pps.: 71-75.

⁷⁹ Bostrom M.P., Saleh K.J., Einhorn T.A. (1999): Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *The Orthopedic Clinics of North America* 30, pps.: 647-658.

como portador de IGF-I y compuestos de colágeno-hidroxiapatita / TCP como vector de TGF- β_1 ⁸⁰.

El problema planteado con el uso de estos factores de crecimiento es el desconocimiento de sus efectos secundarios.

3.4.3.1.1.3. Ingeniería de tejidos: transplantes de células

Otra línea de investigación abierta se basa en la implantación de células osteoformadoras ya diferenciadas, tras su cultivo sobre un sustrato adecuado, que habitualmente es un polímero o una cerámica. El objetivo es la obtención de un tejido artificial híbrido que posea las características del tejido óseo.

Los osteoblastos son las células principalmente usadas en el proceso de regeneración ósea y pueden obtenerse ya diferenciados desde el hueso esponjoso o como precursores osteoblásticos extraídos del estroma medular. Las desventajas del uso de osteoblastos diferenciados son: el largo tiempo de duplicación y la disminución de su potencial osteogénico de forma rápida a medida que avanzan las generaciones en el cultivo. Por ello, se ha iniciado el estudio de los cultivos de estroma medular como fuente de células osteogénicas, pues contienen fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, precursores osteoblásticos y células reticulares no macrofágicas que poseen una alta capacidad de proliferación y un elevado poder osteoformador^{81,82}.

⁸⁰ Sun J.S., Lin F.H., Wang Y.J., Huang Y.C., Chueh S.C., Hsu F.Y. (2003): Collagen-Hydroxyapatite/Tricalcium phosphate microspheres as a delivery system for recombinant human transforming growth factor- β 1. *Artificial Organs* **27 (7)**, pps.: 605-612.

⁸¹ Harris C.T., Cooper L.F. (2004): Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research* **68 A**, pps.: 747-755.

⁸² Vats A., Tolley N.S., Buttery L.D.K., Polak J.M. (2004): The stem cell in orthopaedic surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **86 B**, pps.: 159-164.

Asociación con biomateriales

La obtención de materiales compuestos con las propiedades aquí descritas requiere que el componente celular pueda sintetizar osteoide rápidamente y que el sustitutivo óseo aloje las células, permitiéndoles conservar sus funciones específicas^{83,84}.

Para la asociación de los osteoblastos con el biomaterial se han descrito tres posibilidades:

1. Por un lado, se pueden crear cultivos de células de médula ósea en presencia del biomaterial⁸⁵. De este modo, se cultivan sincrónicamente células precursoras osteogénicas y no osteogénicas, obteniéndose un hueso híbrido policlonal con propiedades funcionales heterogéneas.
2. Por otro lado, también está descrita la asociación de una población clonal de células progenitoras osteogénicas con las mejores propiedades, seleccionando los clones en función de su expresión fenotípica. Esto permitiría desarrollar un hueso híbrido con capacidad osteoformadora óptima, capaz de generar osteoide de forma rápida.
3. Actualmente, también se considera la asociación de biomateriales con médula ósea, ya que ésta cuenta con células hematopoyéticas y estromales. En cultivos celulares de médula ósea han demostrado que se pueden mantener viables las células madre hematopoyéticas, los precursores osteoblásticos y los predecesores de células estromales

⁸³ Livingston T.L., Gordon S., Archambault M., Kadiyala S., Mc Intosh K., Smith A., Peter S.J. (2003): Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, pps.: 211-218.

⁸⁴ Triffitt J.T. (2002): Osteogenic stem cells and orthopedic engineering: summary and update. *Journal of Biomedical Materials Research* **63**, pps.: 384-389.

⁸⁵ Anselme K., Noel B., Flautre B., Blary M.C., Delecourt C., Descamps M., Hardouin P. (1999): Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. *Bone* **25 (Suppl)**, pps.: 51-54.

durante más de dos meses⁸⁵. Estos cultivos deberían permitir el desarrollo de un hueso híbrido constituido por el conjunto de células implicadas en la formación de tejido óseo.

El desarrollo de un hueso híbrido parece ser la línea de investigación más prometedora, pues permitiría extender su uso clínico en el campo de los biomateriales al mejorar sus propiedades mecánicas y aumentar el volumen implantable⁸⁶.

3.4.3.2. Biomateriales biomédicos

3.4.3.2.1. Biomateriales poliméricos

Los polímeros sintéticos bioabsorbibles son macromoléculas compuestas por la unión de numerosas unidades repetidas, los monómeros, cuya variada composición permite obtener materiales con diferentes presentaciones, texturas, porosidades y grados de reabsorción. Pueden ser reabsorbibles o no. Dentro de los primeros, los copolímeros de ácido láctico y poliglicólico (que se comentarán más adelante) suelen utilizarse en asociación con otras sustancias. Los no reabsorbibles (fundamentalmente el polimetacrilato y el hidroxietilmetacrilato) suelen usarse en reconstrucción ósea no asociada a implantes⁸⁷.

Las ventajas de los primeros son, por un lado, que estas sustancias absorben el agua en su contorno orgánico, sufriendo hidrólisis y biodegradándose en productos no tóxicos, que son eliminados y metabolizados en el organismo. Esta característica es óptima en aquellos casos en que tras la curación ya no

⁸⁶ Hench L.L., Polak J.M. (2002): Third-generation biomedical materials. *Science* **295**, pps.: 1014-1017.

⁸⁷ Valiente A., Montes J., Feinberg S. E. (2002): Injertos y sustitutivos óseos en implantología. *Integración de la Implantología en la Práctica Odontológica*. Gutiérrez Pérez J. L., García Calderón M. (Eds.), Ediciones Ergon, España, pps. 59-68.

es necesaria la presencia del implante, por lo que se evita la realización de una segunda intervención. Por otro lado, poseen una gran flexibilidad en su diseño, pudiendo ajustar su composición y estructura a las necesidades requeridas en cada momento además de presentar una importante similitud con diversos componentes de los tejidos orgánicos, como el colágeno. Del mismo modo, los polímeros biodegradables permiten la transferencia gradual de la carga mecánica desde el implante sintético al tejido natural, con el objetivo de optimizar la regeneración y remodelación tisular^{88,89}.

En diversas aplicaciones para sustitución ósea actúan como un molde tridimensional sobre el que pueden proliferar osteoblastos, depositando matriz ósea extracelular al mismo tiempo que se produce la degradación del polímero. En este campo, están siendo estudiados los poli- α -hidroxiésteres, la polidioxanona, el polipropilénfumarato, el polietilenglicol, los polioritoésteres, los polianhídridos y los poliuretanos⁹⁰.

Como ejemplos destacables podemos hablar del ácido poliglicólico, con el que se confeccionó la primera sutura reabsorbible para uso en clínica y que posteriormente se utilizó en la fabricación de implantes para el tratamiento de fracturas. Otro ejemplo es el ácido poliláctico, también utilizado como material de sutura⁹¹.

⁸⁸ Rokkanen P.U., Böstman O., Hirvensalo E., Mäkelä E.A., Partio E.K., Pättiälä H., Vainionpää S., Vihtonen K., Törmälä P. (2000): Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials* 21, pps.: 2607-2613.

⁸⁹ Burg J.L., Burg, Porter S., Kellam F. (2000): Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21, pps.: 2347-2359.

⁹⁰ An Y.H., Wolf S.K., Friedman R.J. (2000): Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 21, pps.: 2635-52.

⁹¹ Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Mauli Agrawal C. (1996): Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17 pps.: 93-102.

Asociación de biomateriales

Uno de los materiales poliméricos naturales que más se ha empleado en la formación de biomateriales compuestos en asociación con otros es el colágeno. En esta línea, distintos trabajos han combinado colágeno liofilizado que puede conformar una red de aldehídos como soporte para hidroxiapatita granulada. Tras su implantación, este compuesto se comporta como un biomaterial osteoconductor⁹². Sin embargo, hasta el día de hoy no se ha podido demostrar la capacidad para promover neoformación ósea por acción exclusiva del colágeno.

Asimismo se han desarrollado biomateriales compuestos que asocian cerámicas con polímeros sintéticos^{93,94,95,96,97,98}.

⁹² Wang Y.J., Lin F.H., Sun J.S., Huang Y.C., Chueh S.C., Hsu F.Y. (2003): Collagen-Hydroxyapatite microspheres as carriers for bone morphogenetic protein-4. *Artificial Organs* **27(2)**, pps.: 162-168.

⁹³ Wang M., Joseph R., Bonfield W. (1998): Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials* **19**, pps.: 2357-2366.

⁹⁴ Mickiewicz R.A., Mayes A.M., Knaack D. (2002): Polymer-calcium phosphate cement composites for bone substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research* **61**, pps.: 581-592.

⁹⁵ Lewandrowski K-U., Bondre S.P., Wise D.L., Trantolo D.J. (2002): Healing of osteochondral osteotomies after fixation with a hydroxyapatite-buffered polylactide. A histomorphometric and radiographic study in rabbits. *Biomedical Materials and Engineering* **12**, pps.: 259-270.

⁹⁶ Lewandrowski K-U., Bondre S.P., Shea M., Untch C.M., Hayes W.C., Hile D.D., Wise D.L., Trantolo D.J. (2002): Composite resorbable polymer/hydroxylapatite composite screws for fixation of osteochondral osteotomies. *Bio-Medical Materials and Engineering* **12**, pps.: 423-438.

⁹⁷ Lin F.H., Chen T.M., Lin C.P., Lee C.J. (1999): The merit of sintered PDLLA/TCP Composites in management of bone fracture internal fixation. *Artificial Organs* **23 (2)**, pps.: 186-194.

⁹⁸ Navarro M., Ginebra M.P., Planell J.A., Zeppetelli S., Ambrosio L. (2004): Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **15**, pps.: 419-422.

3.4.3.2.2. Biocerámicas

La utilización de cerámicas para la reconstrucción ósea comienza a ser estudiada hace poco más de 20 años. El interés que generan los biomateriales cerámicos se debe a que en su mayoría corresponden a óxidos metálicos, por lo que no presentan oxidación ni corrosión en el medio biológico y poseen gran dureza, la cual los hace resistentes a la fricción y al desgaste^{99,100,101,102}.

Por otro lado, estructuralmente son muy similares al componente mineral del tejido óseo, por lo que son totalmente biocompatibles y osteoconductores¹⁰³. La desventaja que presentan es su rigidez y fragilidad, de forma que no están indicados para la aplicación en áreas que deben soportar cargas^{67,104}. En la **tabla 5** aparece representada una posible clasificación de las biocerámicas empleadas actualmente, teniendo en cuenta su composición química.

⁹⁹ **Zarb G., Schmitt A. (1989):** Implant materials. En *Dental materials: Properties and selection*. O'Brien W (Ed.), Quintessence books, Chicago, pps. 449-461.

¹⁰⁰ **LeGeros R.Z. (2002):** Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 81-98.

¹⁰¹ **Hamadouche M., Sedel L. (2000):** Ceramics in orthopaedics. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **82 B**, pps.: 1095-1099.

¹⁰² **Hench L.L. (1998):** Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* **81**, pps.: 1705-1728.

¹⁰³ **Greenspan D.C. (1999):** Bioactive ceramic implant materials. *Science* **4**, pps.: 389-393.

¹⁰⁴ **Daculsi G. (1998):** Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* **19**, pps.: 1473-1478.

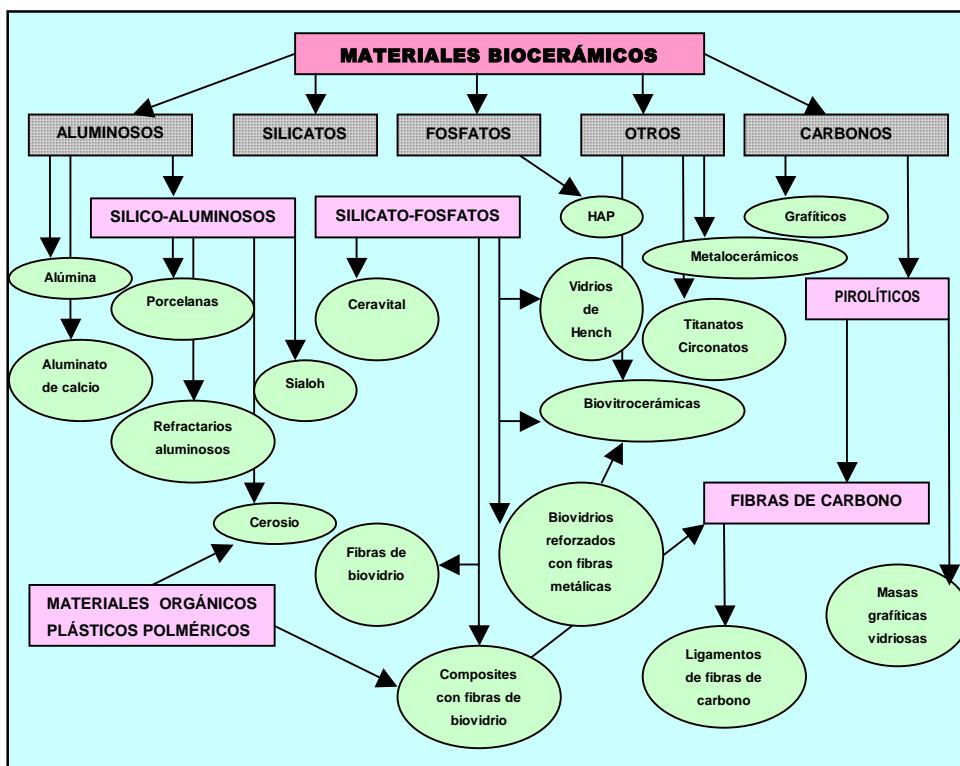


Tabla 5: clasificación de las biocerámicas en función de sus componentes químicos principales (Modificada de Vallet- Regí., 2001)⁶⁷

Otra posible clasificación de los materiales biocerámicos se refiere al tipo de respuesta que generan en el tejido circundante. Considerando así el tipo de respuesta inducida y las características de adhesión¹⁰⁵, dichos materiales son clasificados por Hench^{100,106} en tres categorías (**Tabla 6**):

1. Cerámicas cristalinas o porosas inertes.
2. Cerámicas cristalinas bioactivas, densas o porosas.
3. Cerámicas porosas bioactivas.

¹⁰⁵ **Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (1999):** *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (Eds.), Ergon, España.

¹⁰⁶ **Hench L.L. (1991):** Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* **74**, pps.: 1487-1510.

Actualmente, los dos últimos grupos conforman el núcleo principal de la investigación en cuanto a las biocerámicas, y en ellas se incluyen también nuestros ensayos, por lo que las veremos detenidamente.

TIPO DE BIOCERÁMICA	TIPO DE RESPUESTA INDUCIDA	EJEMPLOS		
1	<p>CERÁMICAS CASI INERTES Provocan la formación de una cápsula fibrosa entre el tejido circundante y la superficie del implante. Pueden utilizarse en forma:</p> <table border="1"> <tr> <td>Densa: el crecimiento del hueso ocurre en las irregularidades de la superficie del material: FIJACIÓN MORFOLÓGICA</td> </tr> <tr> <td>Porosa: el material se coloniza por el crecimiento del hueso dentro de los poros del material: FIJACIÓN BIOLÓGICA</td> </tr> </table> <p>Poseen una alta estabilidad <i>in vivo</i>, gran resistencia mecánica y óptima biocompatibilidad.</p>	Densa: el crecimiento del hueso ocurre en las irregularidades de la superficie del material: FIJACIÓN MORFOLÓGICA	Porosa: el material se coloniza por el crecimiento del hueso dentro de los poros del material: FIJACIÓN BIOLÓGICA	<p>Alúmina (Al₂O₃) Zircona (ZrO₂) Ti O₂ HA coralina</p>
Densa: el crecimiento del hueso ocurre en las irregularidades de la superficie del material: FIJACIÓN MORFOLÓGICA				
Porosa: el material se coloniza por el crecimiento del hueso dentro de los poros del material: FIJACIÓN BIOLÓGICA				
2	<p>CERÁMICAS BIOACTIVAS Tienen propiedades osteoconductoras y generan una respuesta biológica específica (mediante la formación de enlaces químicos) en la interfase, enlazándose directamente con el hueso vivo: FIJACIÓN BIOACTIVA Sus propiedades mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes.</p>	<p>Vidrios bioactivos Vitrocerámicas</p>		
3	<p>CERÁMICAS REABSORBIBLES O POROSAS BIOACTIVAS Tras su implantación se reemplazan progresivamente por tejido óseo neoformado: FIJACIÓN SUSTITUTIVA Para ello debe existir una adecuada correlación entre las velocidades de reabsorción del biomaterial y de regeneración del hueso.</p>	<p>Cerámicas de fosfato de calcio: □-TCP, β-TCP Cerámicas de sulfato de calcio</p>		

Tabla 6: tipos de biocerámicas para aplicaciones médicas (Modificada de Hench⁹⁵ y Vallet- Regi⁵⁷)

3.4.3.2.2.1. Cerámicas cristalinas o porosas inertes

3.4.3.2.2.2. Cerámicas cristalinas bioactivas, densas o porosas

Estos biomateriales se unen directamente al tejido óseo por fijación bioactiva, enlazando directamente con el hueso sin interposición de tejido fibroso en su unión. A este grupo pertenecen los vidrios bioactivos y las vitrocerámicas¹⁰⁷.

¹⁰⁷ **Bohner M. (2000):** Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31, Suppl4, pps.: 37-47.

A. Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos son materiales cerámicos que ostentan la capacidad de enlazar iónicamente con algunos tejidos, entre los que se encuentra el hueso, intercambiando iones o grupos moleculares con el medio fisiológico en el que son implantados. Desde el punto de vista microestructural, los vidrios bioactivos corresponden a sólidos amorfos, es decir, a materiales que poseen un alto desorden estructural determinado por la carencia de una periodicidad atómica tridimensional¹⁰⁸. Los principales representantes de este grupo de materiales son los vidrios a base de silicio y a base de fosfato (**Tabla 7**).

Component	45S5 Bioglass®	45S5.4F Bioglass®	45B15S5 Bioglass®	52S4.6 Bioglass®	55S4.3 Bioglass®	KGC Ceravital®	KGS Ceravital®	KGy213 Ceravital®	A/W glass-ceramic	MB glass-ceramic	S45P7
SiO ₂	45	45	30	52	55	46.2	46	38	34.2	19-52	45
P ₂ O ₅	6	6	6	6	6				16.3	4-24	7
CaO	24.5	14.7	24.5	21	19.5	20.2	33	31	44.9	9-3	22
Ca(PO ₃) ₂						25.5	16	13.5			
CaF ₂		9.8							0.5		
MgO						2.9			4.6	5-15	
MgF ₂											
Na ₂ O	24.5	24.5	24.5	21	19.5	4.8	5	4		3-5	24
K ₂ O						0.4				3-5	
Al ₂ O ₃								7		12-33	
B ₂ O ₃			15								2
Ta ₂ O ₅ /TiO ₂								6.5			
Structure	Glass and glass- ceramic	Glass	Glass	Glass		Glass- ceramic	Glass- ceramic	Glass- ceramic	Glass- ceramic	Glass- ceramic	
Reference	14	14, 56	57, 58	44	44	5	5	5	36	32	54

Tabla 7: ejemplos de composiciones de algunos vidrios y vitrocerámicas⁹⁵

¹⁰⁸ Kokubo T. (1991): Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 12, pps.: 155-163.

A.1. Vidrios bioactivos de base silicio

Los vidrios a base de silicio fueron desarrollados por Hench y colaboradores¹⁰⁹ en la década de los 70 y su estudio evidenció el establecimiento del enlace directo de un biomaterial con el tejido óseo. Estos materiales son sólidos, duros y transparentes, y se encuentran constituidos por dióxido de silicio (SiO₂), óxido disódico (Na₂O), óxido de calcio (CaO) y pentaóxido de fósforo (P₂O₅). Por ejemplo, el P₂O₅, modelo clásico descrito de vidrio de silicio conocido como Bioglass[®], está basado en la formulación 45S5, es decir, está compuesto por un 45% molar de SiO₂, 24,5% de CaO, 24,5% Na₂O, un 6% de P₂O₅ y una relación de 5 a 1 molar de Ca a P¹⁰⁹. La unidad estructural básica de los vidrios a base de silicio se corresponde con un tetraedro, en el cual el silicio ocupa el átomo central. Los tetraedros se organizan en unidades tridimensionales e interconectan unos con otros compartiendo un oxígeno (**Tabla 8**).

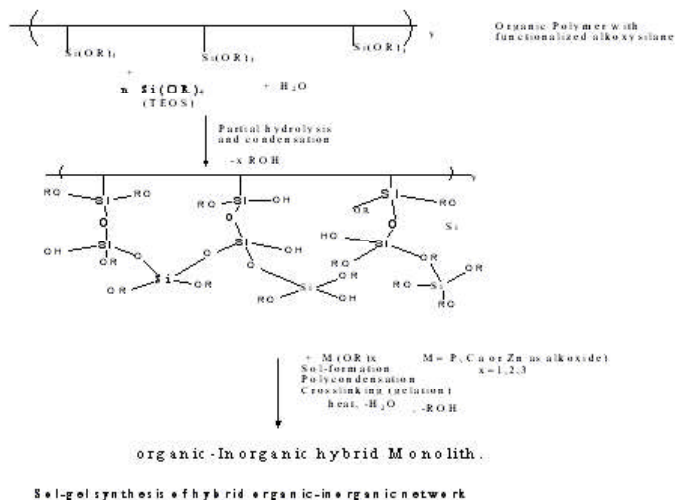


Tabla 8: estructura básica de los vidrios a base de silicio e interconexión mediante un átomo de oxígeno¹¹⁰

¹⁰⁹ **Fernández N.J. (1991): "El vidrio".** Fernández N.J. (Ed). Textos Universitarios. CSIC Fundación Centro Nacional del vidrio. Real Fábrica de cristales de la granja, 2ª Edición, Madrid, pps.: 47-51.

¹¹⁰ **Oki A.R., Parveen B., Hossain S., Adeniji S., Donahue H. (2004):** Preparation and in vitro studies on bone cells of sol gel derived bioglass incorporating zinc. *Journal of Biomedical Materials Research* **69A**, pps.: 216-221.

Existen otros átomos que pueden formar parte de los vidrios bioactivos, conjuntamente con los de silicio. Los óxidos metálicos que pueden conformar un vidrio bioactivo corresponden a cationes de carga electrónica elevada y de radio iónico pequeño, que coordinados en tetraedros con el oxígeno son los denominados formadores de red. Estos son principalmente dióxido de silicio (SiO_2), como ya vimos, anhídrido fosfórico (P_2O_5), dióxido férrico (FeO_2) y óxido de boro (B_2O_3). Por otra parte, los cationes de radio iónico elevado, coordinados en forma octoédrica con el oxígeno, se denominan modificadores de red y corresponden a óxido de sodio (Na_2O), óxido de potasio (K_2O), óxido de calcio (CaO) u óxido de bario (BaO). Todos ellos tienen una influencia importante en las propiedades de los vidrios bioactivos.

En este sentido, debe indicarse que existe una relación entre las diferentes composiciones de los vidrios y su capacidad para enlazarse químicamente con el hueso, condicionando además su bioactividad, bioabsorción y su comportamiento más o menos inerte. De esta manera, el enlace sólo se establece con materiales que poseen SiO_2 , P_2O_5 , Na_2O y CaO , pues la sola presencia de un 3% de óxido de aluminio (Al_2O_3) impide la adhesión al tejido óseo.

Estos biomateriales se unen al tejido óseo por fijación bioactiva, experimentando una modificación cinética en la superficie al entrar en contacto con los fluidos biológicos, formando una capa de hidroxycarbonatoapatita que es equivalente, química y estructuralmente, a la fase mineral del hueso¹¹¹. Esta capa se forma como consecuencia de la alta reactividad de los vidrios en el medio acuoso, que da lugar a un rápido intercambio iónico y reacciones de disolución y precipitación, lo que genera una variación en la concentración

¹¹¹ **Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee Jr. T.K. (1971):** Bonding mechanism at the interface of the ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 2, pps.: 117-141.

iónica del fluido y la formación de una capa de gel de sílice en la superficie vítrea, hechos que favorecen la cristalización de la apatita hidroxycarbonatada creándose una fuerte unión con el tejido óseo que posibilita su osteointegración^{112,113,114}.

El período de incubación varía en función de la composición del implante, pues este es el factor que controla la cinética de las reacciones que se generan en su superficie. Por ello, si las reacciones superficiales son rápidas el implante es reabsorbible, pero si son más lentas hablamos de un implante bioinerte con una fijación de tipo morfológico. Por otro lado, la concentración inicial de células óseas en la interfase depende del ajuste del implante al defecto óseo y, al mismo tiempo, del tipo de defecto óseo¹¹⁵.

Tras la implantación sus propiedades mecánicas, tanto la resistencia a la flexión como el módulo de elasticidad, permanecen estables durante el período de disolución, por lo que son buenos candidatos para la reparación de defectos del tejido óseo¹¹⁶.

Uso clínico

La utilidad clínica de estas cerámicas se debe a sus propiedades bioactivas. En este sentido, pueden utilizarse diversas formulaciones como sustitutivos óseos, como recubrimiento superficial de diferentes implantes para facilitar su

¹¹² **Hench L.L., Paschall H.A. (1973):** Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of Biomedical Materials Research* **7**, pps.: 25-42.

¹¹³ **Hench L.L., Paschall H.A. (1974):** Histochemical responses at a biomaterial's interface. *Journal of Biomedical Materials Research* **8**, pps.: 49-64.

¹¹⁴ **Hench L.L., Wilson J. (1984):** Surface-active biomaterials. *Science* **226**, pps.: 630-636.

¹¹⁵ **Silver I., Deas J., Erecinska M. (2001):** Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* **22**, pps.: 175-185.

¹¹⁶ **Kokubo T., Kim H., Kawashita M. (2003):** Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* **24**, pps.: 2161-2175.

osteointegración¹¹⁷, como vehículos para la liberación sostenida de diferentes sustancias o fármacos y como andamiajes para la ingeniería de tejidos^{118,119,120}. En relación a su uso clínico, debemos resaltar que los estudios de biocompatibilidad han mostrado que carecen de toxicidad general o local, aunque alguna composición puede dar lugar a reacciones inflamatorias¹²¹.

A.2. Vidrios bioactivos de base fosfato

Los vidrios de base fosfato fueron desarrollados por Schott y colaboradores hace 100 años al descubrir sus interesantes propiedades ópticas, como su alta transparencia a la luz ultravioleta, su alto índice de refracción y su bajo grado de dispersión, pero el inconveniente principal de los mismos fue su baja estabilidad química y esto frenó mucho su desarrollo¹²². Posteriormente, Van Wazer desarrolló un estudio donde estableció los fundamentos de la química del fósforo y sus compuestos, que permitió llegar a comprender actualmente la naturaleza de los vidrios de fosfato¹²³.

¹¹⁷ **Lopes M.A., Santos J.D., Monteiro F.J., Ohtsuki C., Osaka A., Kaneko S., Inoue H. (2001):** Push-out testing and histological evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composites implanted in the tibia of rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* **54**, pps.: 463-469.

¹¹⁸ **Domínguez Z.R., Cortés M.E., Gomes T.A., Diniz H.F., Freitas C.S., Gomes J.B., Faria A.M.C., Sinisterra R.D. (2004):** Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with β -Cyclodextrin. *Biomaterials* **25**, pps.: 327-333.

¹¹⁹ **Oonishi H., Hench L.L., Wilson J., Sugihara F., Tsuji E., Matsuura M., Kin S., Yamamoto T. (2000):** Quantitative comparison of bone growth behaviour in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* **51**, pps.: 37-46.

¹²⁰ **Wang C.X., Chen Z.Q., Wang M. (2002):** Fabrication and characterization of bioactive glass coating produced by the ion beam sputter deposition technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **13**, pps.: 247-251.

¹²¹ **Gil-Albarova J., Salinas A.J., Bueno-Lozano A.L., Román J., Aldini-Nicolo N., García-Barea A., Giavaresi G., Fini M., Giardino R., Vallet-Regí M. (2005):** The in vivo behaviour of a sol-gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials* **26**, pps.: 4374-4382.

¹²² **Brow R.K. (2000):** Review: the structure of simple phosphate glasses. *Journal of Non-Crystallographic Solids* **263-264**, pps.: 1-28.

¹²³ **Van Wazer J.R. (1958):** Phosphorous and its compounds, Vol I. En *Chemistry*. Van Wazer J.R. (Ed.), Interscience Publisher, Inc, New York.

El siguiente paso fue el desarrollo de los vidrios de fosfato para aplicaciones biomédicas en manos de Burnie y Gilchrist en los años 80, quienes analizaron distintos materiales con contenidos variables de pentaóxido de fósforo (P_2O_5) entre 35.0 y 60.0% molar como formador de red y distintas proporciones de óxido de calcio (CaO) y óxido disódico (Na_2O) como modificadores de red, obteniendo vidrios con un amplio rango de propiedades bioactivas y velocidades de disolución, que pueden variar entre días y meses¹²⁴.

Actualmente, este estudio se está llevando a cabo en el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metallúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, que ha desarrollado diversas formulaciones de vidrios de base fosfato, como el vidrio de base fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 , que será estudiado en este trabajo^{125,126,127}.

Composición de los vidrios de fosfato

Los vidrios de fosfato son materiales isotrópicos, orgánicos o inorgánicos, que carecen de periodicidad atómica tridimensional y que poseen una viscosidad superior a los 10^{14} poises.

Su unidad estructural básica se corresponde con un tetraedro en el cual el fósforo ocupa el átomo central, ya que por definición los fosfatos son compuestos en los cuales cada átomo de fósforo se encuentra rodeado de cuatro átomos de oxígeno en las esquinas de un tetraedro. Un átomo de

¹²⁴ Burnie J., Gilchrist T., Duff S.R.I., Drake C.F., Harding N.G.L., Malcolm A.J. (1981): Controlled release glasses (C.R.G.) for biomedical uses. *Biomaterials* 2, pps.: 244-246.

¹²⁵ Navarro M., del Valle S., Martínez S., Zeppetelli S., Ambrosio L., Planell J.A., Ginebra M.P. (2004): New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. *Biomaterials* 25, pps.: 4233-4241.

¹²⁶ Navarro M., Ginebra M.P., Planell J.A. (2003): Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility *Journal of Biomedical Materials Research* 67A, pps.: 1009-1015.

¹²⁷ Clément J., Ekeberg L., Martínez S., Ginebra M.P., Gil F.J., Planell J.A. (1998): Influence of the chemical composition on the mechanical properties and in vitro solubility of phosphate glasses in the system P_2O_5 -CaO- Na_2O . *Bioceramics* 11, pps.: 141-144.

oxígeno forma un doble enlace con el fósforo y los otros tres corresponden a átomos de oxígeno puentes, pudiendo ser compartidos por varios tetraedros. Se crean así cadenas, anillos y polímeros ramificados constituidos por tetraedros de PO_4 interconectados. El óxido formador de la estructura vítrea es el pentaóxido de fósforo (P_2O_5). Poseen, por otro lado, un alto porcentaje de óxidos modificadores de red¹²⁸.

Uso clínico

La utilidad clínica de estos vidrios es cada vez mayor y tienen gran cantidad de aplicaciones como la fabricación de lentes y otros dispositivos ópticos y su asociación con biomateriales poliméricos u otras cerámicas para constituir materiales compuestos.

Otros usos que pueden tener son como medios de almacenamiento de residuos nucleares, el sellado entre vidrios y metales, la fabricación de fibras ópticas para las comunicaciones, la elaboración de láseres y colectores de energía solar y las aplicaciones biomédicas, entre las que destacan su posible empleo como sustitutivos óseos¹²⁹. Junto con estas aplicaciones, el desarrollo de vidrios bioactivos de base fosfato como implantes solubles para el relleno de defectos óseos tiene gran interés por su capacidad de actuar de puente entre dos áreas de hueso dañado y ser sustituidos por hueso neoformado al tiempo que se van reabsorbiendo. La capacidad de enlazarse químicamente al tejido óseo (fijación bioactiva) ocurre en los vidrios con una composición cercana a la fase mineral del hueso, entre los que destacan los de tipo metafosfato y

¹²⁸ **Martin A.W. (1997):** Review of the structures of phosphates glasses. *European Journal of Solid State Inorganic Chemistry* **28**, pps.: 163-205.

¹²⁹ **Vogel J., Wange P., Hartmann P. (1997):** Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. *Glass Technique versus Glass Science Technique* **70**, pps.: 220-223.

pirofosfato^{130,131,132}. Esta característica es fundamental para evitar o reducir los riesgos de alergia, inflamación, debilidad, pérdida, rechazo o corrosión del implante y representa una ventaja respecto de los vidrios de silicio, ya que éstos, a largo plazo, tienen efectos desconocidos y diferentes estudios indican que pueden poseer cierto grado de toxicidad¹³³.

La diferencia entre los distintos tipos de vidrios bioactivos de fosfato se basa en las proporciones relativas de la unidad estructural que los compone, lo que condiciona su elaboración, así como sus posibles aplicaciones en el campo tecnológico y biomédico^{134,135,136,137}.

El vidrio bioactivo estudiado en este trabajo presenta una estructura de tipo metafosfato, con una cantidad de P_2O_5 de 44,5% molar. Debe indicarse que la cantidad estricta de P_2O_5 de los vidrios de metafosfato es de un 50,0% molar, pero debido a la dificultad que estriba el obtener vidrios con una composición estequiométrica exacta se considera que los que tienen un contenido de P_2O_5 de 40,0 a 55,0% tienen una estructura de tipo metafosfato (**Tabla 9**).

¹³⁰ **Georgiou G., Knowles J.C. (2001):** Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery. Part I: mechanical properties. *Biomaterials* **22**, pps.: 2811-2815.

¹³¹ **Salih V., Georgiou G., Knowles J.C., Olsen I. (2001):** Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery. Part II: in vitro evaluation of bone cell growth and function. *Biomaterials* **22**, pps.: 2817-2824.

¹³² **Kokubo T., Ito S., Huang Z.T., Hayashi T., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T. (1990):** Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research* **24**, pps.: 721-734.

¹³³ **Nagase M., Abe Y., Chigira M., Udagawa F. (1992):** Toxicity of silica-containing calcium phosphate glasses demonstrated in mice. *Biomaterials* **13**, pps.: 172-175.

¹³⁴ **Brow R.K., Tallant D.R., Hiddgens J.J., Martin S.W., Irwin A.D. (1994):** The short range structure of sodium ultraphosphate glasses. *Journal of Non-Crystallographic Solids* **177**, pps.: 221-228.

¹³⁵ **Delahaye F., Montagne L., Palavit G., Touray J.C., Baillif P. (1998):** Acid dissolution of sodium-calcium metaphosphate glasses. *Journal of Non-Crystallographic Solids* **242**, pps.: 25-32.

¹³⁶ **Kasuga T., Sawada M., Nogami M., Abe Y. (1999):** Bioactive ceramics prepared by sintering and crystallization of calcium phosphate invert glasses. *Biomaterials* **20**, pps.: 1415-20.

¹³⁷ **Navarro M., Sanzana E.S., Planell J.A., Ginebra M.P., Torres P.A. (2005):** In vivo behavior of calcium phosphate glasses with controlled solubility. *Key Engineering Materials* **284-286**, pps.: 893-896.

Tipos de estructuras	% P ₂ O ₅	Características principales	Propiedades y uso clínico
Vidrios de ultrafosfato	> 50% molar	Bajo nº de modificadores de red Muy reactivos Rápida disolución en agua	Difícil elaboración Difícil aplicación tecnológica (por su escasa estabilidad)
Vidrios de metafosfato	40-55% molar	Mayor nº de modificadores de red Menos reactivos Más resistentes al agua	Fácil elaboración Gran interés para aplicaciones biomédicas y tecnológicas
Vidrios de pirofosfato (vidrios inversos)	< 30% molar	Alto % de modificadores de red: Tendencia a la cristalización espontánea Constituidos por sistemas complejos con adición de óxidos metálicos: MgO, ZnO o TiO ₂	Difícil elaboración Gran interés en aplicaciones tecnológicas (debido a su gran estabilidad) Características de vidrios bioactivos (permite elaborar vidrios con una relación Ca/P similar al hueso)

Tabla 9: tipos de vidrios de fosfato y sus principales características

Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas dependen de su condición de sólidos amorfos, de los componentes específicos que conforman el material, de su estructura particular (binaria, ternaria o cuaternaria), además de la incorporación de óxidos metálicos en su composición, de su solubilidad, su temperatura de transición vítrea y sus características mecánicas¹³⁷.

Las características principales de los vidrios de base fosfato se deben a que son materiales bioabsorbibles y biodegradables, particularidades que aparecen muy unidas a la solubilidad. En este sentido, el factor que interviene mayoritariamente en el control de la velocidad de disolución de estos materiales es la relación CaO/Na₂O, pues al aumentar el contenido de CaO de los vidrios de fosfato disminuye su solubilidad y al aumentar el contenido de

Na₂O se incrementa la velocidad de disolución¹³⁸. Esto permite la elaboración de vidrios con tiempos de solubilidad muy variables y la adaptación a la función que deban desempeñar los mismos en los ambientes fisiológicos de implantación.

Esta capacidad de variar la relación CaO/Na₂O es limitada, por lo que diferentes estudios se han centrado en la posibilidad de incorporar óxidos metálicos en la estructura vítrea, tales como TiO₂ (óxido de titanio), Fe₂O₃ (óxido férrico) o ZnO (óxido de cinc), para disminuir la solubilidad y aumentar la durabilidad, mejorando al mismo tiempo la resistencia mecánica^{139,140,141}. El inconveniente principal es que pueden generar ciertas reacciones inflamatorias leves.

Propiedades biológicas

El gran interés que despiertan los vidrios se debe a su posible aplicación como soporte temporal para el hueso, debido a la similitud en sus propiedades biológicas y mecánicas. En realidad, aunque bajo condiciones *in vitro* estos materiales no presentan toxicidad, sus reacciones *in vivo* no se conocen con exactitud¹⁴² y por ello constituirán uno de los objetivos de nuestro estudio. En

¹³⁸ Clément J., Bjelkemyr A., Martínez S., Fernández E., Ginebra M.P., Planell J.A. (1999): Analysis of the kinetics of dissolution and the evolution of the mechanical properties of a phosphate glasses stored in simulated body fluid. *Bioceramics* **12**, pps.: 375-378.

¹³⁹ Clément J., Ávila G., Navarro M., Martínez S., Ginebra M.P., Planell J.A. (2000): Chemical durability and mechanical properties of calcium phosphate glasses with the addition of Fe₂O₃, TiO₂ and ZnO. *Bioceramics* **13**, pps.: 621-624.

¹⁴⁰ Franks K., Abrahams I., Georgiou G., Knowles J.C. (2001): Investigation of thermal parameters and crystallization in a ternary CaO-Na₂O-P₂O₅-based glass system. *Biomaterials* **22**, pps.: 497-501.

¹⁴¹ Navarro M., Clément J., Ginebra M.P., Martínez S., Avila G., Planell J.A. (2002): Improvement of the stability and mechanical properties of reabsorbable phosphate glasses by the addition of TiO₂. *Key Engineering Materials* **218-220**, pps.: 275-278.

¹⁴² Gil-Albarova J., Montón I., Clément J., Castiella T., Esteva F., Planell J.A., Herrera A. (2002): Desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea. Implantación subcutánea en conejos. *Mapfre Medicina* **13**, pps.: 252-257.

este sentido, la biocompatibilidad de estos materiales depende fundamentalmente de su composición, proporción relativa de sus componentes y solubilidad. De esta forma, aunque generalmente los ensayos realizados muestran que estos materiales son citocompatibles y su reacción *in vivo* es muy limitada, cuando se utilizan vidrios muy solubles se ha observado la existencia de reacciones inflamatorias pudiendo producirse necrosis de los tejidos circundantes. Esto conlleva la necesidad de evaluar la respuesta biológica realizando ensayos de citotoxicidad^{64,143}.

A.2.1. Vidrios bioactivos de base fosfato del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O-TiO₂

La elaboración de estos vidrios se consigue con la mezcla y fusión a altas temperaturas de fosfato monoamónico ($NH_4H_2PO_4$), carbonato de calcio ($CaCO_3$) y carbonato de sodio (Na_2CO_3), a los que se agrega dióxido de titanio (TiO_2) consiguiendo una composición molar de 44,5% de P_2O_5 , 44,5% de CaO, 6% de Na_2O y 5% de TiO_2 .

La adición de óxidos metálicos a los vidrios de base fosfato induce a la depolimerización de la red de átomos de oxígeno, rompiendo las uniones P-O-P y dando lugar a oxígenos no puenteados. Sin embargo, la introducción de iones modificados puede crear uniones iónicas cruzadas entre los oxígenos no puenteados y dos cadenas diferentes de fosfatos, aumentando la fuerza de unión de los enlaces iónicos, lo que mejora las propiedades mecánicas y durabilidad química de los vidrios^{141,144}.

¹⁴³ Cartmell S.H., Doherty P.J., Rhodes N.P., Hunt J.A., Healy D.M., Gilchrist T. (1998): Haemocompatibility of controlled release glass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **9**, pps.: 1-7.

¹⁴⁴ Navarro M., Ginebra M.P., Clément J., Martínez S., Ávila G., Planell J.A. (2003): Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications. *Journal of the American Ceramic Society* **86**, pps.: 1345-52.

La variación de la relación $\text{Na}_2\text{O}/\text{CaO}$ permite el control de la solubilidad y de las propiedades mecánicas de los vidrios de base fosfato, pero para las aplicaciones que precisan una estabilidad a largo plazo esta solubilidad continúa siendo alta. Este inconveniente puede superarse con la adición de iones metálicos de pequeño radio iónico y mayores cargas eléctricas como el Fe^{3+} , Al^{3+} y Ti^{4+} , que permiten la obtención de biomateriales con mejores condiciones estructurales para su uso como sustitutivos óseos¹⁴¹.

Las características de tener un pequeño radio iónico y una alta carga eléctrica que posee el ion titanio (Ti^{4+}), le otorgan la capacidad de incorporarse de manera intersticial dentro de la red vítrea, dando lugar a nuevos enlaces entre las cadenas formadoras del material. Por ello, la adición de TiO_2 genera un mayor número de reticulaciones dentro de la estructura vítrea y debido a ello el vidrio se vuelve más rígido y menos soluble. De esta forma, la pérdida de peso de este material a los ochenta días es solamente de un 1%, siendo de un 11% en el vidrio que no posee TiO_2 ¹⁴¹.

Respecto a las propiedades mecánicas, se ven aumentadas por la incorporación de TiO_2 a los vidrios de base fosfato, ya que mejora la estabilidad química de los biomateriales. Se han determinado valores de $431,1 \pm 7.80 \text{ kg/mm}^2$ para la dureza de Vickers y $71,10 \pm 1,70 \text{ GPa}$ para el módulo de Young¹⁴¹.

Referente a sus propiedades biológicas, se ha valorado la respuesta *in vitro* de las células fibroblásticas en contacto directo con los vidrios presentando un menor nivel de absorbancia que con el control¹⁴¹. Los ensayos de citotoxicidad, tanto con extractos puros como con sus diluciones, no resultan ser tóxicos, ya que los resultados de absorbancia tienen valores similares a los obtenidos para los controles⁴¹.

Las experiencias obtenidas por todos estos estudios previos que determinan tanto las propiedades mecánicas como biológicas de los vidrios bioactivos, así como sus posibles aplicaciones, indican que tanto los vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O como los del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 , tienen en común su condición de materiales bioactivos, bioabsorbibles y biodegradables. Los estudios realizados *in vitro* han demostrado que su solubilidad es el factor condicionante de la adhesión y proliferación celular, así como también de su toxicidad potencial^{140,141,142,143,144}.

Debemos concluir este apartado indicando que, aunque los estudios actuales de los vidrios de base fosfato corresponden principalmente a ensayos de su biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*, la valoración de su papel como sustitutos óseos en animales de experimentación aún no está demostrada¹⁴⁵. Por ello, este trabajo de tesis nos permitirá obtener una valiosa información relativa al comportamiento como potenciales sustitutos óseos de este vidrio bioactivo¹⁰⁷ y relacionarlo con dos cementos basados en fosfatos de calcio que pertenecen a un grupo de materiales que, como ya comentamos, ostenta numerosos estudios *in vivo* y algunas series clínicas preliminares, que han validado su condición de moldes osteoconductores.

B. Vitrocerámicas

Son cerámicas policristalinas que se obtienen mediante la cristalización controlada de vidrios en los que existen fases amorfas y cristalinas. Su obtención se realiza mediante tratamiento térmico, el cual permite cristalizar el 90% de la masa vítrea para obtener cristales de un tamaño comprendido entre 0,1 y 1 μm . Además, para facilitar su síntesis se suelen añadir precipitados

¹⁴⁵ Navarro M., Del Valle S., Ginebra M.P., Martínez S., Planell J.A. (2004): Development of a new calcium phosphate glass ceramic porous scaffold for guided bone regeneration. *Key Engineering Materials* 254-256, pps.: 945-948.

metálicos, que favorecen la enucleación y cristalización de fases con tamaño inferior a 1 μm .

La ventaja que poseen las vitrocerámicas respecto a los vidrios bioactivos radica en que sus propiedades biomecánicas son mejores y, por otro lado, el tratamiento térmico o la adición de precipitados metálicos no influyen en su bioactividad¹⁴⁶.

En 1973 fue diseñada una vitrocerámica bioactiva en Alemania, conocida con el nombre de Ceravital^{®147}. Su composición está representada en la **tabla 7** y podemos destacar, por un lado, su bajo contenido en Na_2O (0-5% molar) y, por otro lado, sus propiedades bioactivas, que son similares a las del Bioglass[®]. Posteriormente, Kokubo y sus colaboradores desarrollaron una vitrocerámica compuesta por cristales de apatita y wollastonita en una matriz vítrea de SiO_2 , llamada vitrocerámica A/W, que se caracteriza por poseer mejores propiedades biomecánicas debido a su mayor resistencia¹⁴⁷. Esto permitió su uso en zonas donde fuese necesario aplicar una carga¹⁴⁸.

3.4.3.2.2.3. Cerámicas porosas bioactivas

Las características de este grupo es que son cerámicas no cristalinas que pueden actuar como sustitutivos óseos, para lo cual el material debe ser degradado y reemplazado por tejido óseo neoformado. A este grupo

¹⁴⁶ Vitale-Brovarone C., Di Nunzio S., Bretcanu O., Verné E. (2004): Macroporous glass-ceramic materials with bioactive properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **15**, pps.: 209-217.

¹⁴⁷ Bromer H., Pfeil E., Kas H.H. (1973). *Patente alemana* **2**, 326, pp: 100.

¹⁴⁸ Kokubo T., Ito S., Sakka S., Yamamuro T. (1986): Formation of a high-strength bioactive glass-ceramic in the system $\text{MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **21**, pps.: 536-542.

pertenecen dos materiales basados en sales de calcio, las cerámicas de sulfatos de calcio y las de fosfatos de calcio^{107,149}.

A. Cerámicas de sulfatos de calcio

La formación de estos materiales se realiza a partir de sulfato cálcico hemihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$), conocido comúnmente como yeso, que al ser mezclado con agua forma una pasta moldeable, la cual mediante una reacción exotérmica da lugar a un compuesto sólido microcristalino de sulfato de calcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Las cerámicas de sulfatos de calcio corresponden a los primeros biomateriales utilizados en clínica como sustitutos óseos, pues fueron empleados por Dressman en 1892 para rellenar defectos cavitarios en huesos largos¹⁵⁰.

Su principal inconveniente es la escasa resistencia mecánica que presentan a la compresión y la tendencia a formar grumos en medios acuosos, que desencadena en una pérdida de sus propiedades estructurales. Esto lleva a que su aplicación biomédica sea limitada, aunque actualmente se han publicado distintas experiencias clínicas que evalúan positivamente su empleo en cirugía ortopédica y traumatología¹⁵⁰.

B. Cerámicas de fosfatos de calcio

El estudio de estos materiales ha estado centrado en los compuestos del sistema ternario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$, especialmente la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico. La diferencia entre estos dos compuestos estriba en que la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es el componente principal de la fase mineral

¹⁴⁹ **Hench L.L. (1995):** Ceramics, glasses and glass-ceramics. En *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*. Henc L.L. (Eds.), Academic Press, New York.

¹⁵⁰ **Kelly C.M., Wilkins R.M., Gitelis S., Hartjen C., Watson J.T., Kim P.T. (2001):** The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute. Results of a multicenter trial. *Clinical Orthopaedics* **382**, pps.: 42-50.

del hueso, y el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) no es un constituyente natural del mismo.

El empleo de estos biomateriales se remonta a 1920, año en el que Albee publicó un trabajo en el cual reflejaba el uso satisfactorio de un fosfato cálcico en restauración ósea¹⁴⁹. Posteriormente, en 1969, Levitt y colaboradores realizaron una publicación en la que afirmaban que, a pesar de que las apatitas habían sido objeto de numerosos estudios, la dificultad de conseguir métodos efectivos para obtener hidroxiapatita en forma sólida había impedido el estudio de las aplicaciones potenciales de esta biocerámica¹⁵¹. Pocos años después, Jarcho y colaboradores (1976) descubrieron un proceso de producción de implantes de hidroxiapatita densa con valores de resistencia aceptablemente elevados, que supuso un importante paso adelante en el desarrollo de las cerámicas de fosfatos de calcio¹⁵². En el mismo año, Aoki y sus colaboradores (1976) utilizaron la hidroxiapatita densa para la sustitución de raíces dentales en animales, y pronto se llevaron a cabo diferentes aplicaciones clínicas empleando hidroxiapatita¹⁵³.

Respecto a las propiedades de las cerámicas de fosfatos de calcio, debemos comentar que a temperatura corporal y en medio acuoso existen dos fosfatos de calcio estables, la brushita o fosfato dicálcico y la hidroxiapatita¹⁵⁴. Por otro lado, a temperaturas superiores, también son estables los fosfatos tricálcico y

¹⁵¹ **Levitt S.R., Crayton P.H., Monroe E.A., Condrate R.A. (1969):** Forming method for apatite prosthesis. *Journal of Biomedical Material Research* **3**, pps.: 683-687.

¹⁵² **Jarcho M., Bolen C.H., Thomas M.B., Bobick J., Kay J.F., Doremus R.H. (1976):** Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **11**, pps.: 2027-2035.

¹⁵³ **Aoki H., Kato K., Ebihara M, Inoue M. (1976):** Studies on the application of apatite to dental materials. *The journal of Dental Engeering* **17**, pps.: 200-207.

¹⁵⁴ **Rangavittal N., Landa-Canovas A.R., González-Calbet J.M., Vallet-Regí M. (2000):** Structural study and stability of hydroxyapatite and α -tricalcium phosphate: Two important bioceramics. *Journal of Biomedical Material Research* **51**, pps.: 660-668.

tetracálcico que se transforman en hidroxiapatita al interactuar con los fluidos fisiológicos¹⁵⁵.

Propiedades y aplicaciones clínicas de la hidroxiapatita

La hidroxiapatita es el componente principal del hueso de los vertebrados y del esmalte dentario, constituyendo el 60% del esqueleto humano calcificado y el 90% de la matriz ósea orgánica. Su utilización en la práctica clínica comenzó en 1981, debido a que es la cerámica fosfocálcica químicamente más cercana a los cristales de las apatitas biológicas y que presenta una proporción Ca/P de 1:67, que es el valor estequiométrico que corresponde a la hidroxiapatita pura. Sus propiedades biológicas se deben al hecho de ser un material biocompatible, inmunocompatible y bioactivo¹⁵⁶. En este sentido, aunque esta cerámica se comporta fundamentalmente como material osteoconductor, estudios recientes han comprobado que el comportamiento de una cerámica de fosfatos de calcio implantada en un tejido óseo es más bioactiva cuanto más se asemeje a la composición de las fases minerales del hueso, que está formado por una hidroxiapatita que no es estequiométrica sino pobremente cristalizada, deficiente en calcio y con una relación molar Ca/P que varía entre 1,67 y 1,5. Además, la hidroxiapatita ósea incorpora iones carbonato y sodio en su estructura. La tendencia actual, que está potenciando un gran interés en el campo de las cerámicas de hidroxiapatita, es la búsqueda de hidroxiapatitas más parecidas a las apatitas biológicas, y por ello con mayor capacidad

¹⁵⁵ Flautre B., Maynou C., Lemaitre J., Van Landuyt P., Hardouin P. (2002): Bone colonization of β -TCP granules incorporated in brushite cements. *Journal of Biomedical Material Research* **63**, pps.: 413-417.

¹⁵⁶ Winter M., Griss P., De Groot K., Tagai H., Heimke G., Van Dijk H.J.A., Sawai K. (1981): Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **2**, pps.: 159-160.

osteoinductiva¹⁵⁷. Por otro lado, la hidroxiapatita corresponde a la cerámica de fosfato de calcio menos soluble y de más lenta reabsorción¹⁵⁸. También se caracteriza por ser un material rígido, frágil y difícil de adaptar a los defectos óseos, por lo que para su utilización en clínica se dispone de presentaciones en forma de gránulos y bloques¹⁵⁹.

Propiedades y aplicaciones del fosfato tricálcico

El fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ no es un componente natural del tejido óseo. Se caracteriza por ser una cerámica más soluble en los fluidos corporales que la hidroxiapatita, por lo que su reabsorción es entre 10 y 20 veces más rápida¹⁶⁰. El problema radica en que, biológicamente, el volumen de hueso neoformado que se encarga de sustituir el fosfato tricálcico degradado es menor que el suyo propio. Su alta capacidad de remodelación debilita precozmente su resistencia mecánica por lo que, para su utilización, se le debe asociar con otros materiales menos reabsorbibles o que posean potencial osteoinductivo. Al igual que la hidroxiapatita es preparado por medio de un proceso de sinterización y la proporción Ca/P que presenta es de 1,5¹⁶⁰.

La principal limitación en el uso de las cerámicas de fosfatos de calcio deriva de sus propiedades mecánicas debido a que, como la mayoría de las cerámicas, son frágiles, manifestando una baja resistencia al impacto y una resistencia a la tracción relativamente pequeña. En general, tanto la solubilidad

¹⁵⁷ Yuan H., Yang Z., Li Y., Zhang X., De Bruijn J.D., De Groot K. (1998): Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **9**, pps.: 723-726.

¹⁵⁸ Groot K. de, Klein C.P.A.T., Wolke J.G.C., de Blicck-Hogervorst J.M.A. (1990): Chemistry of calcium phosphate bioceramics. En *Handbook of Bioactive Ceramics*, vol. II. Yamamuro T., Hench L.L., Wilson J. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón (Fl), Florida, pps.: 3-15.

¹⁵⁹ Koerten H.K., Van der Meulen J. (1999): Degradation of calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Material Research* **44**, pps.: 78-86.

¹⁶⁰ Tuck C., Evans J.R.G. (1999): Porous ceramics prepared from aqueous foams. *Journal of Materials Science* **18**, pps.: 1003-1005.

como la tendencia a la reabsorción y las propiedades mecánicas de las cerámicas de fosfatos de calcio dependen de la relación Ca/P y de su microestructura, es decir, de la porosidad del material¹⁵⁸. Los poros pueden clasificarse como microporos cuando poseen un tamaño menor de 100 μm , o macroporos cuando tienen un diámetro entre 100 y 500 μm , tamaño a partir del cual se produce el crecimiento óseo en los intersticios del implante¹⁶¹. Las variaciones en la microporosidad tienen mayor influencia en la resistencia a la tracción que a la compresión; debido a ello, las cerámicas de fosfatos de calcio son bastantes frágiles y por ello estos biomateriales no pueden emplearse como sustitutivos óseos en áreas sometidas a fuerzas de torsión, flexión y cizallamiento si estas fatigas no son neutralizadas mediante osteosíntesis asociada o descarga del segmento hasta que la neoformación ósea incremente su resistencia a niveles similares a los del hueso contiguo.

Tanto la hidroxiapatita pura como el fosfato tricálcico puro son difíciles de sintetizar, siendo la principal impureza de la primera el propio fosfato tricálcico, en una proporción que varía de un 1,0 a un 10,0%¹⁶⁰. Por lo demás, muchas cerámicas son sintetizadas expresamente mezclando hidroxiapatita y fosfato tricálcico para obtener compuestos bifásicos que presenten las mejores propiedades de sus componentes. De esta manera, se busca conseguir un equilibrio óptimo de las fases más estables de la hidroxiapatita y de las más solubles del fosfato tricálcico para que este biomaterial compuesto presente una cinética de reabsorción que se adapte al proceso de remodelación

¹⁶¹ **Klawiter J.J., Hulbert S.F. (1971):** Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopedic applications. *Journal of Biomedical Material Research* 2, pps:161-167.

ósea^{159,162}. Actualmente, las cerámicas de fosfatos de calcio se emplean como implantes porosos, gránulos o polvos para:

- 1- El relleno de cavidades óseas en áreas sin soporte de carga.
- 2- Como pequeños implantes densos en el oído medio.
- 3- Como recubrimiento sobre implantes metálicos.
- 4- Como fase bioactiva en materiales compuestos.

El mecanismo de enlace de la hidroxiapatita se establece directamente por el crecimiento de pequeños cristales de apatitas biológicas sobre el implante^{106,163}.

Diferentes propiedades de las cerámicas de fosfatos de calcio, como son la reabsorción o biodegradación, pueden ser originadas por disolución físico-química, que depende del tipo de material y del pH del medio, por desintegración física en forma de pequeñas partículas a causa de un ataque químico. Los factores que aumentan la tasa de biodegradación de estos materiales son el aumento del área superficial, la disminución de la cristalinidad y homogeneidad de los cristales, la disminución del tamaño del grano y las sustituciones iónicas con $(\text{CO}_3)_2$, Mg^{2+} o Sr^{2+} . Los factores que disminuyen la biodegradación son la existencia de hierro en la hidroxiapatita, la presencia de magnesio en el fosfato tricálcico y la disminución de la relación fosfato tricálcico/hidroxiapatita en los compuestos bifásicos. Todo lo anterior hace necesario controlar la microestructura, el estado de las fases y la composición

¹⁶² **Driessens F.C.M., Ramselaar M.M.A., Schaeken H.U., Stols L.H., Van Mullem P.J. (1992):** Chemical reactions of calcium phosphate implants after implantation in vivo. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **3**, pps.: 413-417.

¹⁶³ **De Bruijn J.D., Van Blitterswijk C.A., Davies J.E. (1995):** Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *Journal of Biomedical Material Research* **29**, pps.: 89-99.

química de las cerámicas de fosfatos de calcio para obtener una determinada tasa de reabsorción^{100,159,164}.

Respecto a la elaboración de las cerámicas de fosfatos de calcio, tienen lugar mediante el proceso de sinterización, que consiste en la obtención de un material sólido a partir de polvos. Este proceso se realiza en dos fases. En primer lugar, ocurre una fase de compactación del polvo de partida, obtenido comercialmente o en el laboratorio por precipitación, dándole la forma deseada y, posteriormente, es sometido a un tratamiento de alta temperatura, en el rango de los 1000 a 1500° C. De esta manera, se produce la fusión parcial de las partículas de polvo y la aglomeración de los microcristales con el enfriamiento, los cuales quedan soldados por presión. Los cambios térmicos pueden fisurar el material, motivo que genera la fragilidad de las cerámicas de fosfatos de calcio. La obtención de presentaciones densas (menos de 5% en volumen de porosidad) o macroporosas¹⁶⁵, depende de distintas variables, como son la temperatura y el tiempo de sinterización, la distribución del tamaño de partícula del polvo inicial o la mezcla de aditivos orgánicos^{166,167}.

Las cerámicas de fosfatos de calcio se obtienen preformadas, por lo que pueden presentar problemas de adaptación a los defectos óseos generando una falta de fijación. Para mejorar su capacidad de relleno se puede utilizar la formulación en gránulos, pero éstos pueden migrar desde el sitio de

¹⁶⁴ **Serre C.M., Papillard M., Chavassieux P., Voegel J.C., Boivin G. (1998):** Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. *Journal of Biomedical Material Research* **42**, pps: 626-633.

¹⁶⁵ **Sepulveda P., Bressiani A.H., Bressiani J.C., Meseguer L., König B. (2002):** In vivo evaluation of hidroxiapatite foams. *Journal of Biomedical Material Research* **62**, pps.: 587-592.

¹⁶⁶ **Mochales C., El Briak-Ben Abdeslam H., Ginebra M.P., Perol A., Planell J.A., Boudeville P. (2004):** Dry mechanochemical synthesis of hydroxyapatites from DCPD and CaO: influence of instrumental parameters on the reaction kinetics. *Biomaterials* **25**, pps.: 1151-1158.

¹⁶⁷ **El Briak-Ben Abdeslam H., Mochales C., Ginebra M.P., Nurit J., Planell J.A., Boudeville P. (2003):** Dry mechanochemical synthesis of hidroxiapatites from dicalcium phosphate dihydrate and calcium oxide: A kinetic study. *Journal of Biomedical Material Research* **67 A**, pps.: 927-937.

implantación¹⁶⁸. Estos problemas de adaptación y fijación han llevado a la elaboración de biomateriales cerámicos capaces de fraguar a temperatura ambiente, a partir de la reacción de una fase sólida en polvo y una fase líquida, consiguiéndose la formulación de los cementos óseos de fosfatos de calcio^{169, 170}.

B.1. Cementos óseos

El objetivo principal del desarrollo y caracterización de cerámicas de fosfatos de calcio formuladas como cementos es conseguir biomateriales que tengan utilidad como sustitutivos óseos y que entre sus características principales estén su moldeabilidad antes de la implantación –para adaptarlos correctamente a los defectos óseos–, la capacidad de fijarse al hueso en forma óptima –con el fin de mejorar su estabilidad inicial y alcanzar una apropiada resistencia mecánica– y su inyectabilidad –que permite implantar el cemento con técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas–^{171,172,173,174}.

¹⁶⁸ Liu D (1996): Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials* **17**, pps.: 1955-1957.

¹⁶⁹ Kenny S.M., Buggy M. (2003): Bone cements and fillers: A review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, pps.: 923-938.

¹⁷⁰ Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. (1999): Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10**, pps.: 169-176.

¹⁷¹ Kenny S.M., Buggy M. (2003): Bone cements and fillers: a review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, pps.: 923-938.

¹⁷² Larsson S., Bauer T.W. (2002): Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.:23-32.

¹⁷³ Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. (1999): Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10**, pps.: 177-183.

¹⁷⁴ Wong C. T., Lu W. W., Chan W. K., Cheung K. M. C., Luk K. D. K., Lu D. S., Rabie A. B.,M., Deng L. F., Leong J. C. Y. (2003): In vivo cancellous bone remodeling on a Strontiumcontaining hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **68A**, pps.: 513-521.

Dentro de este grupo de biomateriales se encuentran los cementos basados en compuestos orgánicos, como el cemento de polimetilmetacrilato¹⁷⁵, y aquellos basados en compuestos inorgánicos, dentro de los cuales se incluyen los cementos de fosfatos de calcio.

Los cementos inorgánicos, que pueden emplearse como sustitutivos óseos, están constituidos por una fase en polvo que, al ser mezclada con una cierta cantidad de una solución acuosa, da lugar a la formación de una pasta con características plásticas. La transformación de la pasta inicial del cemento óseo en un cuerpo sólido se obtiene en dos etapas. Primero, se produce el proceso de fraguado, en que la pasta plástica se transforma en rígida, perdiendo su plasticidad, de manera que si se moldea nuevamente o se mezcla con más solución líquida la plasticidad no se recupera, o sólo parcialmente. En la segunda etapa tiene lugar la consolidación o proceso de endurecimiento, en el que la pasta rígida aumenta su resistencia mecánica hasta transformarse en un cuerpo sólido^{175,176,177}. El siguiente esquema representa este proceso (**Tabla 10**).

El cemento óseo inorgánico, tras su proceso de fraguado, puede describirse como un entramado de finos cristales interconectados que se bloquean mutuamente conformando una estructura rígida. Estas características permiten conseguir interesantes aplicaciones médicas de las que hasta ahora sólo formaban parte los cementos óseos orgánicos, principalmente la sustitución

¹⁷⁵ **Bohner M. (2004):** New hydraulic cement based on α -tricalcium phosphate-calcium sulfate dihydrate mixtures. *Biomaterials* **25**, pps.:741-749.

¹⁷⁶ **Ginebra M.P., Fernández E., Boltong M.G., Bermúdez O., Planell J.A., Driessens F.C.M. (1994):** Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clinical Materials* **17**, pps: 99-104.

¹⁷⁷ **Gbureck U., Grolms O., Barralet J.E., Grover L.M., Thull R. (2003):** Mechanical activation and cement formation of α -tricalcium phosphate. *Biomaterials* **24**, pps.: 4123-4131.

ósea en cavidades o defectos, la mejoría de la osteosíntesis de fracturas y la facilitación de la fijación de endoprótesis articulares^{178,179}.

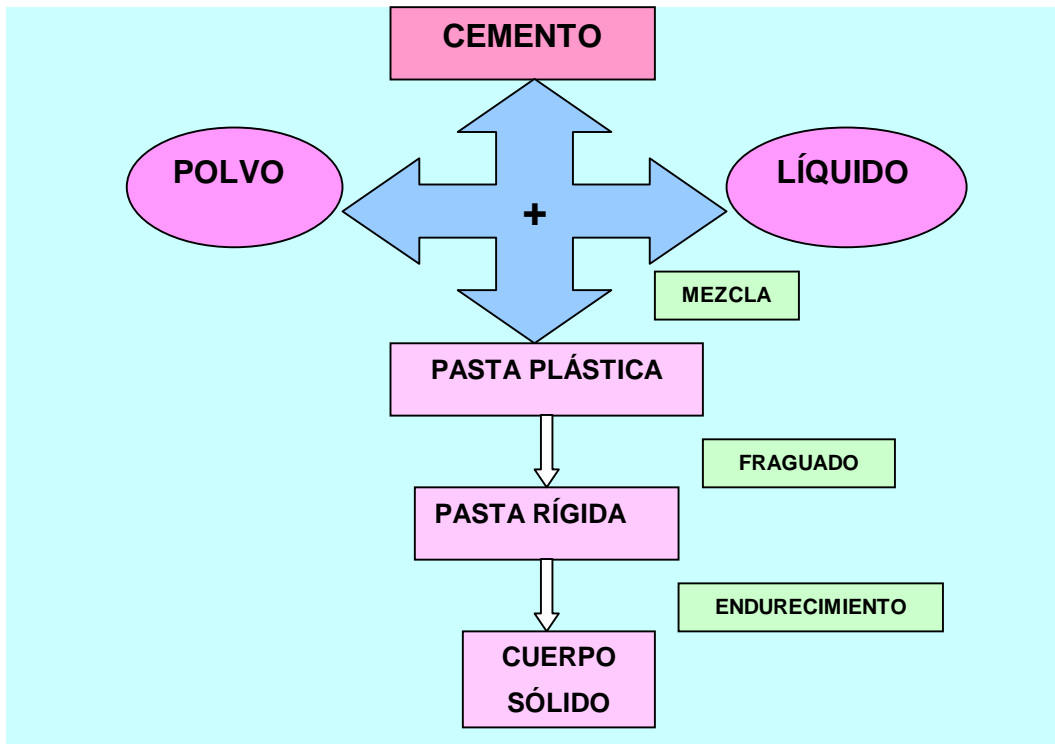


Tabla 10: esquema del comportamiento de un sistema cementante

El gran desarrollo clínico que actualmente tienen los cementos de fosfatos en el terreno de la regeneración ósea se debe a que el producto de su proceso de reacción es, en la mayoría de los casos, una hidroxapatita muy similar a la biológica, es decir, nanocristalina, no estequiométrica, deficiente en calcio y

¹⁷⁸ Bohner M. (2001): Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal* **10**, pps.: 114-121.

¹⁷⁹ Driessens F.C.M., Boltong M.G., Bermúdez O., Planell J.A., Ginebra M.P., Fernández E. (1994): Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **5**, pps.: 164-170.

capaz de incorporar diferentes iones en función de la composición de los reactivos y el medio¹⁸⁰.

La concepción del desarrollo de los cementos basados en fosfatos de calcio fue postulada por LeGeros¹⁸¹ en 1982, y concretada por Brown y Chow¹⁸² en 1983. Estos últimos autores publicaron el primer estudio sobre un cemento de fosfato de calcio que fraguaba a temperatura ambiente o corporal tras la mezcla de una fase en polvo, formada por dos sales de fosfatos de calcio, una ácida, correspondiente a fosfato tetracálcico, y una básica, constituida por fosfato dicálcico dihidratado o hidrógenofosfato de calcio, con una fase líquida dada por una solución acuosa. El fraguado de esta combinación daba origen a un cuerpo sólido, que se obtenía como resultado de un proceso de disolución de los reactivos y la precipitación de una nueva fase. Este cuerpo sólido se caracterizaba por ser una hidroxiapatita monolítica, con una estructura muy similar a la del tejido óseo.

Existen diversas formulaciones de cementos de fosfatos de calcio, gran parte de las cuales son desarrolladas por el grupo de investigadores del Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica y el Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica de la Universitat Politècnica de Catalunya.

¹⁸⁰ **Planell J.A., Ginebra M.P., Fernández E. (2002):** Cementos óseos basados en fosfatos de calcio. *Cursos de actualización del 39 Congreso Nacional SECOT*, pps.: 39-43.

¹⁸¹ **LeGeros R.Z., Chohayeb A., Shulman A. (1982):** Apatitic calcium phosphate: possible restorative materials. *Journal of Dental Research* **61**, pps.: 343.

¹⁸² **Brown W.E., Chow L.C. (1983):** A new calcium phosphate setting cement. *Journal of Dental Research* **62**, pps.: 672.

El cemento denominado por ellos cemento H, que corresponde a fosfato \square tricálcico será objeto de estudio en la presente tesis doctoral^{183,184,185,186}.

La gran ventaja que presentan los cementos de fosfatos de calcio es su versatilidad debido a que con el control de variables como la composición química de las fases líquida y sólida, el tamaño de las partículas, la relación líquido/polvo y la incorporación de aditivos orgánicos pueden ajustarse sus propiedades a las necesidades específicas de cada aplicación, especialmente las de fraguado y endurecimiento. Esto es fundamental para su adaptación en una gran variedad de requerimientos clínicos^{187,188,189,190,191,192}.

¹⁸³ **Driessens F.C.M., Planell J.A., Boltong M.G., Khairoun I., Ginebra M.P. (1998):** Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine* **212**, pps.: 427-435.

¹⁸⁴ **Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Bermúdez O., Ginebra M.P., Fernández E. (1993):** A new apatitic calcium phosphate bone cement: preliminary results. *Bioceramics* **6**, pps.: 469-473.

¹⁸⁵ **Ginebra M.P., Fernández E., De Maeyer E.A.P., Verbeek R.M.H., Boltong M.G., Ginebra J., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1997):** Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research* **76**, pps.: 905-912.

¹⁸⁶ **Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1999):** Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the $\text{CaHPO}_4\text{-}\square\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10**, pps.: 223-30.

¹⁸⁷ **Gisep A., Wieling R., Bohner M., Matter S., Schneider E., Rahn (2002):** Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone. *Journal of Biomedical Materials Research* **66 A**, pps.: 532-540.

¹⁸⁸ **Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger R., Bohner M., Matter S., Auer J.A., Von Rechenberg B. (2004):** In vivo behavior of the different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* **25**, pps.: 1439-1451.

¹⁸⁹ **Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. (2004):** Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cements: a kinetic analysis. *Biomaterials* **25**, pps.: 3453-3462.

¹⁹⁰ **Khairoun I., Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Wenz R. (1999):** Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* **20**, pps.: 393-398.

¹⁹¹ **Dammaschkea T., Gerth H. U.V., Züchnerb H., Scha"fera E. (2005):** Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dental Materials* **21**, pps.: 731-738.

¹⁹² **LeGeros R.Z., Lin S., Rohanizadeh R., Mijares D., LeGeros J.P. (2003):** Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, pps.: 201-209.

Los cementos de fosfatos de calcio se caracterizan por ser materiales biocompatibles, osteoconductores y osteoinductores. El inconveniente principal es que la mayoría manifiesta una lenta bioabsorción, lo que supone una desventaja importante debido a la fragilidad del material implantado respecto al tejido óseo circundante. El cemento ideal debería ser capaz de reabsorberse a la misma velocidad que se desarrolla el tejido óseo neoformado encargado de su reemplazo y gran parte de las investigaciones que se desarrollan actualmente pretenden alcanzar este objetivo¹⁹³. Entre los parámetros que más influyen en la biorreabsorción están la macroporosidad, la composición química y la cristalinidad. En los cementos apatíticos que tienen reabsorción activa mediada por la actividad celular es importante la macroporosidad, ya que los osteoclastos van degradando el material por capas de forma centrípeta, penetrando en su interior. Para que se produzca el proceso de colonización por tejido óseo neoformado es necesario que los poros tengan entre 100 y 400 μm ¹⁹⁴.

Existen distintos métodos cuya finalidad es obtener esta porosidad en los cementos. Algunos de ellos son:

- El uso de microondas, soluciones de peróxido de hidrógeno y emulsiones; el inconveniente es que ninguno de estos métodos pueden emplearse en la fabricación de materiales inyectables a temperatura corporal¹⁹⁵.

¹⁹³ **Theiss F., Apelt D., Brand B., Kutter A., Zlinszky K., Böhner M., Matter S., Frei C., Auer J.A., Von Rechenberg B. (2005):** Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* **26**, pps.: 4383-4394.

¹⁹⁴ **Almirall A., Larrecq G., Delgado J.A., Martínez S., Planell J.A., Ginebra M.P. (2004):** Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials* **25**, pps.: 3671-3680.

¹⁹⁵ **Almirall A., Delgado J.A., Ginebra M.P., Planell J.A. (2004):** Effect of albumen as protein-based foaming agent in a calcium phosphate bone cement. *Key Engineering Materials* **254-256**, pps.: 253-256.

- La incorporación de cristales solubles de azúcar o manitol; su inconveniente es que la disolución de éstos es muy rápida, lo que hace perder estabilidad mecánica durante las fases iniciales de la implantación.
- La adición de sulfato de calcio al cemento de fosfato tricálcico, consiguiendo un material bifásico, con una fase estable dada por la hidroxiapatita y otra más reabsorbible conferida por el sulfato dicálcico.
- El uso de moléculas surfactantes, como el dodecil sulfato de sodio, que también son eficaces como agentes porogénicos en la matriz del cemento^{196,197}.

Podemos concluir que la consolidación de los cementos óseos como materiales de gran utilidad en el campo de la regeneración ósea se debe a que son materiales moldeables e inyectables, lo que supone una ventaja en las aplicaciones quirúrgicas de mínima invasión. Por otro lado, su proceso de reacción da lugar a una hidroxiapatita deficiente en calcio, de rango nanométrico muy similar a la hidroxiapatita biológica, lo que constituye una ventaja importante en el proceso de reabsorción. Junto a ello, el control de distintas variables en su procesado permite optimizar las propiedades de los cementos a los requerimientos clínicos de cada aplicación específica. Un ejemplo son los múltiples métodos, ya comentados, que actualmente se están desarrollando para añadir macroporosidad y optimizar así su velocidad de reabsorción¹⁸⁰.

¹⁹⁶ Nilsson M., Fernández E., Sarda S., Lidgren L., Planell J.A. (2002): Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **61**, pps.: 600-607.

¹⁹⁷ Sarda S., Fernández E., Nilsson M., Planell J.A. (2003): Influence of surfactant molecules as airetraining agent of bone cement macroporosity. *Journal of Biomedical Materials Research* **65 A**, pps.: 215-221.

Entre las características que suponen una ventaja en el uso de los cementos basados en fosfatos de calcio para la regeneración o reconstrucción ósea destacan:

- Moldeabilidad: no es necesario dar forma al biomaterial previo a su implantación, sino que el propio cirujano moldea el material *in situ* introduciéndolo en estado pastoso en la cavidad o defecto a rellenar. Esto genera una buena adaptación del implante al área que se requiere reconstruir, ya que el fraguado *in situ* permite conseguir una correcta fijación, evitando los problemas de migración que tienen las formulaciones de las cerámicas de fosfatos de calcio convencionales.
- Fluidez: por medio de la modificación de las variables de procesado es posible obtener materiales que fluyan adecuadamente para que puedan ser aplicados en forma inyectable. Esto supone una gran ventaja de aplicación del material en relación a la técnica quirúrgica.
- Aposición: corresponde a la propiedad derivada de la moldeabilidad y adaptación del material a una cavidad, pues la existencia de un buen contacto entre el cemento y el tejido óseo circundante permite la formación de un enlace íntimo entre ambos, favoreciendo la sustitución ósea. En este sentido, está demostrado que la existencia de una interfase superior a 10 μm entre el implante y el tejido óseo impide el crecimiento óseo¹⁹⁸.
- Manipulación: estos biomateriales son fácilmente manejables durante su preparación e implantación. Este hecho contrasta con la fragilidad de los biovidrios y las cerámicas, que precisan una manipulación muy

¹⁹⁸ **Brown P.W., Fulmer M. (1991):** Kinetics of hydroxyapatite formation at low temperature. *Journal of the American Ceramic Society* **74**, pps.: 934-940.

cuidadosa por parte del cirujano, pues cualquier daño en su superficie durante la implantación puede modificar todas sus propiedades.

Por otro lado, hay una serie de requisitos generales que deben cumplir los cementos óseos para poder ser empleados en la reconstrucción y regeneración ósea. Algunos de los más importantes son: probada bioactividad, carencia de toxicidad local o general, capacidad de fraguar en contacto con los fluidos fisiológicos sin presentar falta de cohesión, ausencia de efectos exotérmicos, tiempos de fraguado y endurecimiento razonables, ausencia de contracción de volumen y adquisición de una resistencia mecánica apropiada^{170,173}.

La optimización de los cementos para conseguir un diseño que se ajuste a estas características se lleva a cabo mediante la modificación de una serie de variables de procesado, que ahora vemos detalladas en la **Tabla 11**.

El producto final debe ser un biomaterial capaz de conservar su solidez en contacto con los fluidos corporales^{187,188,190}.

Variables de la fase en polvo	Naturaleza de los constituyentes sólidos principales Proporción relativa de los constituyentes sólidos Uso de aditivos tales como semillas, aceleradores o retardantes Tamaño de las partículas
Variables de la fase líquida	Aditivos (acelerantes, retardadores...) pH
Variable de la mezcla	Relación líquido / polvo
Ambiente fisiológico del lugar de implantación	Temperatura Humedad ambiental pH ambiental

Tabla 11: variables que afectan a un sistema cementante

Formulación química

Un cemento de fosfato de calcio está constituido por una fase sólida en polvo formada por uno o más fosfatos de calcio, que al ser mezclada con una fase líquida reacciona dando origen a la precipitación de una o más fases producto. Dentro de los fosfatos de calcio se pueden distinguir los metafosfatos, los

pirofosfatos y los ortofosfatos. Los dos primeros se hidrolizan en contacto con los fluidos y pueden generar calcificaciones extraóseas, por lo que sólo los ortofosfatos son útiles para ser formulados como cementos¹⁹⁹. Los fosfatos de calcio que se pueden obtener por precipitación a temperatura ambiente o corporal²⁰⁰ se presentan en la **Tabla 12**.

Fosfato de calcio	Ca/P	Fórmula	pH precipitación
Fosfato de calcio amorfo (ACP)	1.35		4.0-9.0
Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	0.50	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0-2.0
Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	1.00	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.0 y 6.0
Fosfato octocálcico (OCP)	1.33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)4.5\text{H}_2\text{O}$	5.5-7.0
Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)	1.5	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)5(\text{OH})$	6.5-9.5
Hidroxiapatita precipitada (PHA)	1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)6(\text{OH})_2$	9.5-12.0

Tabla 12: fosfatos de calcio que precipitan a temperatura ambiente o corporal

Composición de la fase sólida

La composición de la fase sólida varía en función de la reacción de fraguado que se quiera conseguir. Dentro de los compuestos basados en fosfatos de calcio que pueden utilizarse como componentes de la fase sólida en polvo de los cementos óseos tenemos los mencionados en la **tabla 12**, aquellos que se obtienen a altas temperaturas y otros fosfatos de calcio que contienen

¹⁹⁹ **Driessens F.C.M., De Maeyer E.A.P., Fernández E., Boltong M.G., Berger G., Verbeeck R.M.H., Ginebra M.P., Planell J.A. (1996):** Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite. *Bioceramics* **9**, pps.: 231-234.

²⁰⁰ **Ginebra M.P. (1997):** Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico- □ para aplicaciones quirúrgicas. *Tesis Doctoral*; Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metallúrgica. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.

componentes biocompatibles, como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co_3^{2-} , SO_4^{2-} o Cl^- . En la tabla siguiente aparecen representados (**Tabla 13**)¹⁹⁹.

Compuesto	Fórmula	Ca/P
Fosfato dicálcico (DCP)	CaHPO_4	1.00
Fosfato β tricálcico (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Fosfato α tricálcico (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Fosfato tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.00
Hidroxiapatita sinterizada (SHA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Whitlockita sódica (SWH)	$\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$	1.42
Rhenanita (RH)	CaNaPO_4	1.00
Fosfato cálcico potásico (CPP)	CaKPO_4	1.00
Fosfato cálcico sódico potásico (CSPP)	$\text{Ca}_2\text{NaK}(\text{PO}_4)_2$	1.00
Fosfato tricálcico de magnesio (MTCP)	$\text{MgCa}_8(\text{PO}_4)_6$	1.33
Whitlockita de magnesio (MWH)	$\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	1.28
Fosfato de calcio y zinc (CZP)	$\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2$	0.50
Espodiosita (SP)	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	2.00
Cloroapatita (CLA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	1.67
Fluorapatita (FA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1.67
Carbonato cálcico (calcita o dragonita)	CaCO_3	
Dolomita (DOL)	$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$	

Tabla 13: otros compuestos a base de fosfato adecuados para utilizar como componentes de la fase en polvo de los cementos de fosfatos de calcio

Aditivos de la fase sólida

Para satisfacer los requisitos clínicos de los cementos de fosfatos de calcio con tiempos de fraguado excesivamente prolongados, se pueden agregar a la fase sólida pequeñas cantidades de materiales que actúan como gérmenes o semillas para la cristalización de la fase producto. Las partículas más utilizadas son la hidroxiapatita precipitada (PHA) o hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA). La tendencia general de esta adición es la reducción del tiempo de fraguado que fue observada por Brown y Chow en el cemento formado por

fosfato tetracálcico (TTCP) y fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)²⁰¹. En el caso de los cementos de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) se produce la situación inversa, ya que su fraguado es excesivamente rápido y en este caso se adiciona sulfato cálcico hemihidratado, sulfato cálcico dihidratado y pirofosfato cálcico para retardar esta reacción^{202,203,204}.

Composición de la fase líquida

La función principal de la fase líquida de los cementos fosfocálcicos es actuar como vehículo para la disolución de los reactivos y la precipitación de los productos. Los compuestos que pueden cumplir esta función son el agua bidestilada y las soluciones acuosas de sales inorgánicas o compuestos orgánicos, que tienen efectos aceleradores o retardantes sobre el fraguado del cemento.

El efecto acelerador, dado por la presencia de iones fosfato en la solución de la fase líquida, ha sido probado en diferentes formulaciones. Brown y Chow verificaron que el empleo de una solución diluida de ácido fosfórico aceleraba el fraguado del cemento formado por fosfato tetracálcico (TTCP) y fosfato dicálcico (DCP) o fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)¹⁸². Posteriormente, Driessens y sus colaboradores han demostrado un comportamiento similar en formulaciones basadas en fosfato □ tricálcico, empleando como fase líquida

²⁰¹ **Chow L.C. (1992):** Development of self-setting calcium phosphate cements. *Journal of the Ceramic Society of Japan* **99**, pps.: 927-936.

²⁰² **Mirtchi A.A., Lemaitre J., Munting E. (1989):** Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of the □-tricalcium phosphate – monocalcium phosphate cements. *Biomaterials* **10**, pps.: 634-638.

²⁰³ **Yang Q., Troczynski T., Liu D. (2002):** Influence of apatite seeds on the synthesis of calcium phosphate cement. *Biomaterials* **23**, pps.: 2751-2760.

²⁰⁴ **Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C., Planell J.A. (1997):** Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **38**, pps.: 356-360.

una solución de Na_2HPO_4 ó $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que justificaron en base al efecto del ion común^{183,205}.

Cabe destacar que la gran versatilidad y facilidad de manipulación de los cementos de fosfatos de calcio hace que exista un gran número de aditivos que pueden ser incluidos en su formulación con distinta finalidad. Se incluyen aditivos inorgánicos, compuestos orgánicos e incluso factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas óseas que mejoran la bioactividad de estos materiales sumando a su comprobada condición osteoconductora propiedades osteoinductivas^{206,207}.

Relación líquido/polvo

La relación de la fase líquida con la fase sólida en polvo es un factor que influye en la plasticidad inicial de la pasta y, por ello, en los tiempos de fraguado, inyectabilidad y en la resistencia final de los cementos de fosfatos de calcio, debido a que la porosidad del cemento fraguado está directamente relacionada con la relación líquido/polvo empleada²⁰⁸.

²⁰⁵ **Fernández E., Boltong M.G., Ginebra M.P., Bermúdez O., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1994):** Common ion effect on some phosphate cements. *Clinical Materials* **16**, pps.: 99-103.

²⁰⁶ **Blom E.J., Klein-Nulend J., Wolke J.G., Van Waas M.A., Driessens F.C.M., Burger E.H. (2002):** Transforming growth factor-1 incorporation in a calcium phosphate bone cement: material properties and release characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research* **59**, pps.: 265-272.

²⁰⁷ **Li R.H., Bouxsein M.L., Blake C.A., Augusta D., Kim H., Li X.J., Wozney J.M., Seeherman H.J. (2003):** rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (\square -BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research* **21**, pps.: 997-1004.

²⁰⁸ **Nilsson M., Wielanek L., Wang J.S., Tanner K.E., Lidgren L. (2003):** Factors influencing the compressive strength of an injectable calcium sulfate-hydroxyapatite cement *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, pps.: 399-404.

Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas más importantes que deben poseer los cementos de fosfatos de calcio son²⁰⁹:

- Un tiempo de fraguado razonablemente reducido.
- Mantenimiento de la dureza obtenida en contacto con el ambiente del sitio de implantación.
- Ausencia de variación de su volumen.
- Reacción exotérmica limitada.
- Resistencia mecánica adecuada.

Tiempo de fraguado

Esta medida permite verificar si tiene lugar alguna reacción de fraguado tras mezclar la fase líquida y la sólida. No se ha determinado un criterio general consensuado respecto al tiempo óptimo de fraguado de estos biomateriales para su aplicación clínica, pues las necesidades pueden variar en función de su utilización. Lo que sí se ha establecido es que al mezclar las fases sólida y líquida es conveniente que el cemento fragüe en un período de tiempo reducido, pero teniendo en cuenta que debe ser suficiente como para facilitar al cirujano la preparación e implantación de la pasta obtenida. Driessens et al.¹⁶², siguiendo el procedimiento de medida del tiempo de fraguado de las agujas de Gillmore, sitúan como valores orientativos un tiempo inicial de fraguado I, que es el tiempo disponible para moldear la pasta, comprendido entre 4 y 8 minutos

²⁰⁹ Liu C., Huang Y., Chen J. (2004): The physicochemical properties of the solidification of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **69 B**, pps.: 73-78.

y un tiempo final de fraguado, después del cual el cemento ha alcanzado un nivel de resistencia apropiado, de entre 10 y 15 minutos²¹⁰.

Los procedimientos para modificar los tiempos de fraguado del cemento son la adición de semillas, la variación de la relación líquido/polvo y la utilización de soluciones acelerantes o retardadoras²¹¹. El producto resultante es una hidroxiapatita monolítica, ya sea deficiente en calcio o precipitada, que desde el punto de vista microestructural está constituida por cristales aciculares y algunas formaciones de placas²¹².

Comportamiento del cemento en el medio fisiológico

El cemento óseo debe poseer la capacidad de fraguar y endurecer inmerso en condiciones fisiológicas, que corresponden a tejidos que tienen un elevado grado de humedad. Por lo tanto, no es suficiente que el biomaterial fragüe en condiciones atmosféricas, sino que debe hacerlo en contacto con la sangre y otros fluidos corporales, sin que la pasta presente falta de cohesión.

Aunque esta propiedad no se tuvo en cuenta en las fases iniciales de estudio sobre cementos óseos, actualmente distintos autores investigan técnicas para poder evaluarla²¹³. De esta manera, se ha definido el tiempo de cohesión como el período que transcurre desde que se mezclan los componentes sólido y líquido hasta que se puede sumergir la pasta en los fluidos fisiológicos sin que se produzca disgregación o desintegración. La situación óptima para que una

²¹⁰ **Fernández E., Ginebra M.P., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Ginebra J., De Maeyer E.A., Verbeeck R.M., Planell J.A. (1996):** Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **32**, pps.: 367-374.

²¹¹ **Yap A. U. J., Pek Y. S., Cheang P. (2003):** Physico-mechanical properties of a fast-set highly viscous GIC restorative. *Journal of Oral Rehabilitation* **30**, pps.: 1-8.

²¹² **Driessens F.C.M., Boltong M.G., De Maeyer E.A., Wenz R., Nies B., Planell J.A. (2002):** The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. *Biomaterials* **23**, pps.: 4011-4017.

²¹³ **Fernández E., Boltong M.G., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Bermúdez O., Planell J.A. (1996):** Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements. *Journal of Materials Science* **15**, pps.: 1004-1005.

formulación de cemento sea estable es que el tiempo de cohesión tienda a cero^{191, 214}.

Variación de volumen

Una propiedad que debe ser considerada es la variación de volumen que pueden experimentar los cementos óseos durante la reacción de fraguado, ya que la contracción puede dificultar la fijación y bioactividad del material y su expansión puede lesionar la estructura ósea circundante. El estudio de la contracción lineal de volumen en tres formulaciones distintas de cementos de fosfato \square tricálcico fueron muy positivos pues han mostrado una variación de sólo un $0,10\pm 0,05\%$ ²¹⁵. Este mismo resultado ha sido obtenido para un cemento de fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) y óxido de magnesio (MgO), mientras que en una formulación compuesta de fosfato tetracálcico (TTCP) y fosfato dicálcico (DCP) se encontró una expansión lineal de $0.06\pm 0.01\%$ ²¹¹. Estos valores son lo suficientemente pequeños para que no planteen problemas en el comportamiento *in vivo* de estos biomateriales²¹⁵.

Liberación de calor durante el fraguado

Los estudios calorimétricos llevados a cabo con diferentes formulaciones de cementos basados en fosfatos de calcio concluyen que durante el fraguado se produce, en general, una reacción isotérmica, especialmente con el cemento de fosfato \square tricálcico, mientras que con las formulaciones compuestas por fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) y fosfato cálcico potásico (CaKPO_4) la temperatura máxima registrada es de 33°C y con las conformadas

²¹⁴ **Khairoun I., Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Wenz R. (1999):** Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* **20**, pps.:393-398.

²¹⁵ **Fernández E., Ginebra M.P., Bermúdez O., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1995):** Dimensional and thermal behavior of calcium phosphate cements during setting compared to PMMA bone cements. *Journal of Materials Science* **1**, pps.: 4-5.

por fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) y óxido de magnesio (MgO) es de 44° C. Esto es de vital importancia debido a que el elevado aumento de temperatura durante el fraguado de los cementos óseos, como el que ocurre con el polimetilmetacrilato, que presenta aumentos de hasta 133° C, puede llegar a producir pérdida de vascularización e, incluso, necrosis ósea^{215,216}.

Resistencia mecánica

Los parámetros de mayor interés para valorar las propiedades mecánicas de los cementos de fosfatos de calcio son la resistencia a la compresión y a la tracción diametral. Bermúdez et al. realizaron un estudio comparativo de estas propiedades en varias formulaciones de cementos de fosfatos de calcio encontrando valores de resistencia a la compresión de hasta 60 MPa y a la tracción de 5 MPa²¹⁷. Debemos tener en cuenta que existen numerosos factores que influyen en el comportamiento mecánico de un cemento, como son la relación líquido/polvo empleada, el tamaño de partícula de polvo o el uso de distintos aditivos. Uno de los factores que más influye en las propiedades mecánicas de estos biomateriales es la porosidad, dado que un tamaño de poro grande determina una resistencia inferior a la de las cerámicas de fosfatos de calcio convencionales. En esta línea, distintos estudios han determinado que para los cementos basados en fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico se cumple la misma relación logarítmica inversa entre porosidad y resistencia a la compresión encontrada para las cerámicas, lo que implica que la obtención de hidroxiapatita monolítica a baja temperatura por medio de una reacción

²¹⁶ Ginebra M.P., Fernández E., Driessens F.C.M., Boltong M., Muntasell J., Font J., Planell J.A. (1995): The effects of temperature on the behavior of an apatitic calcium phosphate cement. *J Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 6, pps.: 857-60.

²¹⁷ Bermúdez O., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1993): Compressive strength and diametral tensile strength of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 4, pps.: 389-393.

cementante genera un comportamiento mecánico comparable con el que posee una cerámica de hidroxiapatita con porosidad equivalente. Para la resistencia a la tracción diametral y porosidad de un cemento de fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico se ha encontrado la misma relación exponencial, de tal manera que, si el material es denso, el valor es de 103 MPa; en cambio, si el cemento es poroso, es de alrededor de 10 MPa^{186,201,218}.

Debido a la íntima relación que manifiesta la resistencia mecánica de los cementos de fosfatos de calcio con su porosidad es prácticamente inviable que ocurra una mejoría sustancial en su comportamiento mecánico sin variar este otro factor. Para reducir los poros se puede disminuir la relación líquido/polvo; sin embargo, esta opción se encuentra limitada por la necesidad de contar con una pasta moldeable. Otra opción sería la preparación del cemento a altas presiones pero, además de dificultar la aplicabilidad del material, no consigue reducir la porosidad por debajo de un 26 a un 28%, lo que implica un aumento de la resistencia de escasa cuantía²⁰⁰. Por otra parte, también debemos tener en cuenta que la porosidad actúa como factor positivo en el comportamiento biológico del material. Para mejorar las propiedades mecánicas se han diseñado biomateriales compuestos que incorporan una matriz polimérica, pero esto perjudica las características bioactivas del implante. Otros autores defienden la alternativa de buscar una optimización en las formulaciones de los cementos óseos de forma que estos materiales sean sustituidos en un período de tiempo reducido, de manera que las propiedades mecánicas sean aportadas por el tejido óseo neoformado^{186,201}.

²¹⁸ **Ishikawa K., Asaoka K. (1995):** Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **29**, pps.: 1537-1543.

Propiedades biológicas

Los cementos de fosfatos de calcio se comportan como sustitutivos óseos debido a que son capaces de conducir la **neoformación ósea**. Además, son materiales biocompatibles que no sufren fenómenos de encapsulación fibrosa, no provocan ningún tipo de reacción tóxica ni inflamatoria en los sitios de implantación ni a nivel general y carecen de potencial mutagénico, observándose la formación de hueso nuevo en aposición con el implante¹⁷¹.

Respecto a su posible **reabsorción**, existen dos tipos de bio-reabsorción dentro de los cementos de fosfatos de calcio^{213,214}:

- Un material puede ser reabsorbido porque no es estable en fluidos orgánicos, sin implicación de actividad celular; este caso se describe como **biorreabsorción pasiva** y es el que ocurre con los cementos de sulfato cálcico y en aquellos que dan como producto fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), debido a que su solubilidad ocurre en ambientes cercanos a la neutralidad.

- Por otro lado, los cementos que dan como producto hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) presentan una **biorreabsorción activa**, mediada por la acción de los osteoclastos.

Acerca de la **osteointegración** de los cementos de fosfatos de calcio, debemos señalar que estos materiales tienen propiedades biológicas particulares, ya que su osteointegración se produce por medio del mecanismo de **osteotransducción**, lo que significa que el material sólido poroso resultante del fraguado entra a formar parte directamente del proceso de neoformación ósea, por lo que su degradación es activa, es decir, con la participación efectiva

de las células osteoclásticas²¹⁹. Así, el concepto de osteotransducción se puede definir como la fijación biológica y bioactiva de un material con biodegradabilidad selectiva activa y biotransformación^{184,220}.

El mecanismo de osteotransducción comienza tras la implantación del cemento basado en fosfatos de calcio, con el desencadenamiento de fenómenos de cicatrización del área ósea intervenida, la que se acompaña de la eliminación de partículas residuales y células muertas desde la superficie del material por parte de los macrófagos. Posteriormente, se inicia la biodegradación del implante por fagocitosis y disolución extracelular mediada por la acción de macrófagos y células afines. También existe una pseudofagocitosis efectuada por fibroblastos que penetran en el interior de la cerámica. Simultáneamente, la solución presente entre los cristales del implante se enriquece con iones calcio y fósforo, liberados por su disolución. En este momento se genera una precipitación cristalina, tanto en la superficie, como en el interior del implante, que tiene lugar en un medio rico en proteínas y conduce a la formación de cristales de apatita idénticos a los del hueso. De esta manera, se produce la calcificación sobre una matriz extracelular todavía indiferenciada, fenómeno que modifica las propiedades mecánicas del cemento^{184,220,221}.

La osteointegración continúa con la invasión celular al interior de los poros del implante, conformándose un tejido óseo neoformado con osteocitos y matriz extracelular mineralizada. Este proceso es seguido por la remodelación del tejido óseo recién establecido, que es similar a la desarrollada por el hueso

²¹⁹ **Driessens F.C.M., Planell J.A., Boltong M.G., Khairoun I., Ginebra M.P. (1998):** Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine* **212**, pps.: 427-435.

²²⁰ **Jansen J.A., De Ruijter J.E., Schaeken H.G., Van der Waerden J.P.C..M, Planell J.A., Driessens F.C.M. (1995):** Evaluation of tricalciumphosphate / hydroxiapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **6**, pps.: 653-657.

²²¹ **De Bruijn J.D., Van Blitterswijk C.A., Davies J.E. (1995):** Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* **29**, pps.: 89-99.

normal. Los productos de degradación de los cementos basados en fosfatos de calcio son atóxicos y aportan elementos como calcio y fósforo, que son necesarios para la neoformación ósea. La combinación de las propiedades de osteoconducción y biodegradabilidad de estos materiales ha sido confirmada por diversos autores^{181,222,223}.

Los cementos de fosfatos de calcio implantados en los tejidos subcutáneo o muscular no experimentan fenómenos de degradación. También se ha podido determinar que estos materiales no se disuelven al entrar en contacto con sustancias similares al plasma sanguíneo, hecho que corrobora su estabilidad en los fluidos fisiológicos²²⁴. Se ha observado un aumento de la diferenciación de las células osteoprogenitoras de la médula ósea en presencia de los cementos fosfocálcicos; sin embargo, algunos estudios sugieren la posibilidad de que un elevado número de partículas del biomaterial podrían inducir reacciones osteolíticas o que las partículas de cemento menores de 10 µm de diámetro disminuirían la proliferación de osteoblastos^{225,226}.

²²² **Ishikawa K., Takagi S., Chow L.C., Ishikawa Y, Eanes E.D., Asaoka K. (1994):** Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dental materials*, **10**, pps.: 26-32.

²²³ **Ooms E.M., Egglezos E.A., Wolke J.G.C., Jansen J.A. (2003):** Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements. *Biomaterials* **24**, pps.: 749-757.

²²⁴ **Klein C.P.A.T., Driessen A.A., de Groot K., van den Hooff (1981):** Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *Journal of Biomedical Materials Research* **17**, pps.: 769-784.

²²⁵ **Winter M., Griss P., de Groot K., Tagai H., Heimke G., van Dijk H.J.A., Sawai K. (1981):** Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* **2**, pps.: 159-160.

²²⁶ **Pioletti D.P., Takei H., Lin T. et al.. (2000):** The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function. *Biomaterials* **21**, pps.: 1283-2000.

Uso clínico

Podemos subrayar que existen numerosos estudios realizados en animales de experimentación implantando cementos de fosfatos de calcio que destacan las propiedades de osteoconducción, osteointegración, biodegradabilidad y biocompatibilidad de estos materiales^{227,228,229,230,231}, lo que lleva a afirmar que son materiales muy prometedores en el campo de la sustitución y regeneración de hueso.

De manera inicial, Brown y Chow propusieron las distintas aplicaciones para estos materiales, entre las que cabe destacar, en el campo de la ortopedia, la sustitución de hueso perdido por un trauma o una cirugía, el uso como cemento adhesivo para cirugía ortopédica y para la promoción de crecimiento de hueso alrededor¹⁸². También establecieron numerosas aplicaciones en el campo de la odontología y la cirugía maxilofacial.

Asimismo, resulta interesante su utilidad como materiales liberadores de sustancias, también conocidos como sistemas DDS (Drug Delivery System), dado que su degradación progresiva permite el paso lento de diferentes

²²⁷ **Bohner M., Theiss F., Apelt D., Hirsiger W., Houriet R., Rizzoli G., Gnos E., Frei C., Auer J.A., Von Rechenberg B. (2003):** Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* **24**, pps.: 3463-3474.

²²⁸ **Hoshikawa A., Fukui N., Fukuda A., Sawamura T., Hattori M., Nakamura K., Oda H (2003):** Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials* **24**, pps.: 4967-4975.

²²⁹ **Ooms E.M., Wolke J.G.C., Van der Waerden J.P.C.M., Jansen J.A. (2003):** Use of injectable calcium-phosphate cement for the fixation of titanium implants: an experimental study in goats. *Journal of Biomedical Materials Research* **66 B**, pps.: 447-456.

²³⁰ **Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger R., Bohner M., Matter S., Auer J.A., Von Rechenberg B. (2004):** In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* **25**, pps.: 1439-1451.

²³¹ **Yuan H., Li Y., Bruijn J.D., Groot K., Zhang X (2000):** Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* **21**, pps.: 1283-1290.

fármacos al interior del hueso, entre ellos, la vancomicina, la gentamicina o la indometacina^{232,233}.

Diferentes estudios biomecánicos realizados en huesos han demostrado que los cementos de fosfatos de calcio son capaces de favorecer y facilitar la fijación de determinadas fracturas²³⁴.

Por último, ya se han publicado estudios clínicos en medicina humana que describen el empleo de estos biomateriales cerámicos para mejorar la consolidación de fracturas frecuentes como las de epífisis distal de radio, de platinillos tibiales, de cuello femoral y de calcáneo, entre otras, cuyos resultados preliminares en series limitadas de pacientes son bastante prometedores: esto permite hablar de un futuro muy interesante para el uso médico de los cementos basados en fosfatos de calcio^{235,236,237}, y posiblemente una aplicación clínica posterior en medicina veterinaria.

²³² **Bohner M., Lemaitre J., Van Landuyt P., Zambelli P.Y., Merkle H.P., Gander B. (1997):** Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **86**, pps.: 565-572.

²³³ **Sasaki S., Ishii Y. (1999):** Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Science* **4**, pps.:361-369.

²³⁴ **Higgins T.F., Dodds S.D., Wolfe S.W. (2002):** A biomechanical analysis of fixation of intraarticular distal radial fractures with calciumphosphate bone cement. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **84 A**, pps.: 1579-1586.

²³⁵ **Cassidy C., Jupiter J.B., Cohen M., Delli-Santi M., Fennell C., Leinberry C., Husband J., Ladd A., Seitz W.R., Constanz B. (2003):** Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **85 A**, pps.: 2127-2137.

²³⁶ **Keating J.F., Hajducka C.L., Harper J. (2003):** Minimal internal fixation and calciumphosphate cement in the treatment of fractures of the tibial plateau. A pilot study. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **85 B**, pps.: 68-73.

²³⁷ **Nishikawa S., Toh S., Tsukahara S., Takahashi I. (2003):** Endoscopic treatment of delayed unions and nonunions with calcium phosphate paste. *Arthroscopy* **19**, pps.: 436-439.

B.1.1. Cemento de fosfato α -tricálcico

Sobre las propiedades físico-químicas destacamos que la caracterización física del cemento de fosfato α -tricálcico (denominado cemento H en nuestro estudio) muestra que posee un tiempo de cohesión menor de 5 minutos, un tiempo inicial de fraguado que varía entre 7 y 9 minutos y un tiempo final de fraguado que oscila entre 15 y 22 minutos. Desde el punto de vista mecánico ostenta una resistencia a la compresión de 20 MPa a las 8 horas, de 33 MPa a las 24 horas y de 40 Mpa a las 40 horas, que corresponde a su resistencia máxima¹⁷⁹.

Respecto a sus propiedades biológicas, cabe destacar que su comportamiento *in vivo*, estudiado en cavidades realizadas quirúrgicamente en la tibia de cabras, reveló que la presencia del cemento estimulaba el crecimiento óseo, al compararlo histológicamente con cavidades vacías. También se observó la reabsorción y remodelación de las partículas de cemento. Estos resultados fueron identificados también tras su implantación durante 5 meses en la tibia de conejos, donde se detectó que grandes porciones del material habían sido reabsorbidas y reemplazadas por tejido óseo²³⁸.

²³⁸ Jackson D.W., Lalor P.A., Aberman H.M., Simon T.M. (2001): Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 83-A (1), pp. 53-64.

Bibliografía Web

ⁱ **National Institutes of Health Cells 1/STS-59.** *Página Web del National Institutes of Health Cells 1*, puesta al día el 9 de abril de 1994 [http://lifesci.arc.nasa.gov/lis2/Chapter4_Programs/NIH_C/NIH_C1.html] (Consultada el 12 de febrero de 2005).

ⁱⁱ **Educational resource materials by the American Society for Bone and Mineral Research.** *Página Web de la American Society for Bone and Mineral Research*, puesta al día el 28 de febrero de 2005 [<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/ASBMRed.>] (Consultada el 1 de abril de 2005).

ⁱⁱⁱ **Histología UC.** *Página Web de la Escuela de Medicina de la Universidad Católica de Chile*, puesta al día el 10 de noviembre de 2004 [<http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/indiceGeneral>] (Consultada el 7 de abril de 2005).

^{iv} **Aulas prácticas de Anatomía Patológica de la FCM de la UNICAMP.** *Página Web de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNICAMP*, puesta al día el 7 de diciembre de 2005 [<http://www.fcm.unicamp.br/>] (Consultada el 1 de abril de 2005).

^v **II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.** *Página Web del II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica*, puesta al día el 7 de noviembre de 1998 [<http://www.conganat.org/iicongreso/>] (Consultada el 2 de abril de 2005).

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**

Material y Métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material vivo. Animales de experimentación

Este estudio fue llevado a cabo en 36 conejas albinas adultas de la raza neozelandesa (*Oryctolagus cuniculus*), con una media de edad de 8 meses y 5,5 kilogramos de peso. Se establecieron varios grupos de trabajo:

- A 18 conejas se les implantó el cemento denso (**cemento H**) en un cóndilo femoral distal y el cemento poroso (**cemento P**) en el ipsilateral
- A las otras 18 conejas se les implantó el vidrio (**vidrio G5**) en un cóndilo femoral distal y en el cóndilo ipsilateral se dejó el defecto cavitario sin rellenar, estableciéndose como **grupo control**.

4.1.2. Material implantable. Tipos de biomateriales

Los materiales implantados en este estudio fueron elaborados en el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica y el Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica de la Universitat Politècnica de Catalunya, y son los siguientes:

- **Vidrio G5**: Vidrio bioactivo de base fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 .
- **Cemento H**: Cemento denso de fosfato \square -tricálcico.
- **Cemento P**: Cemento poroso de fosfato \square -tricálcico. La composición es igual al cemento H. La única variación que existe entre los dos es la adición de albumen de huevo en la preparación intraoperatoria del cemento P con el objetivo de conseguir macroporos de entre 200 y 400 micras en su estructura.

4.1.3. Material y equipamiento utilizados

Aparecen indicados en la tabla:

Obtención de los cementos	Reactivos	Fase sólida: CaHPO ₄ y CaCO ₃ Hidroxiapatita Precipitada
		Fase líquida: Na ₂ HPO ₄ Alginato de sodio Albumen de huevo (sólo en el cemento P).
	Equipamiento	Horno tubular Carbolite Molino centrífugo
Obtención vidrio	Reactivos	NH ₄ H ₂ PO ₄ , CaCO ₃ , Na ₂ CO ₃ y TiO ₂ Albumen de huevo
	Equipamiento	Horno industrial Desecador Estufa
Protocolo anestésico	Agentes	Medetomidina Ketamina Isoflurano
	Equipo	Circuito semiabierto: "T" de Ayre modificado
Intervención quirúrgica	Material	Material de disección general Material odontológico básico Sistema de aspiración Motor dental y fresas Material de sutura no reabsorbible (Nylon 3/0)
Preparación de las muestras histológicas	Reactivos:	Formol al 10% Alcohol Glicometacrilato (Technovit 7200 [®]) Peróxido de benzoilo (BPO [®]) Alcohol etílico Tinción de Lévai Lazcó Tinción de Kossa
	Equipamiento	Sistemas de fijación, deshidratación, infiltración, inclusión, polimerización y corte de Exakt
Sistemas de análisis	Equipamiento	Microscopio electrónico de barrido LEO-435VP Microscopio óptico Olympus CH30 Lupa Olympus SZX9 (óptica Olympus DF PLAPO 1x-2) Software Olympus Micro Image versión 1.0 para Windows Equipo de Rayos Philips Super 80 CP
Programa estadístico	Software	SPSS. 12.0 para Windows

Tabla 14: material y equipamiento utilizados

4.2. MÉTODO

4.2.1. Manejo de los animales

El manejo de los animales de experimentación se ajustó a la directiva 86/609/CE, relativa a la aproximación de disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para la experimentación. La mayor parte de esta directiva está recogida en el RD 223/1998, que ha sido traspuesto al RD 1201/05 el 21 de noviembre de 2005. Por otro lado, todos los conejos usados en este estudio fueron cuidados y manejados siguiendo las indicaciones marcadas por los manuales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio^{1,2,3}.

4.2.2. Estabulación de los animales

Los animales fueron cuidados y mantenidos en el animalario del Campus de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela desde la fase de aclimatación hasta el momento del sacrificio, bajo condiciones ambientales de temperatura de entre 18 y 25° C y una humedad relativa entre 50 y 70%. El régimen alimentario estándar fue un pienso seco, con un contenido de 16,5% de proteína bruta, 13,5% de fibra, 1,2% de calcio, 0,65% de fósforo, enriquecido con 10.000 UI de vitamina A y 2.000 UI de vitamina D₃ por kilo de

¹ **Flecknell P.A. (2002):** Manejo, sujeción y técnicas clínicas. En *Manual de Medicina y Cirugía del conejo*. Flecknell (Ed.), British Small Animal Veterinary Association, United Kingdom, pps.: 1-17.

² **Flecknell P.A. (1999):** Conejos. En *Manual de animales exóticos*. Beynon P.H., Cooper J.E. (Eds.), British Small Animal Veterinary Association, United Kingdom, pps.: 81-95.

³ **Gómez de S.I., Tendillo C.F.J. (2001):** Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. En *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Zúñiga J.M., Tur M.J.A., Milocco S.N., Piñeiro R. (Eds.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 385-419.

comida. El agua fue administrada *ad libitum*. Previo a la intervención quirúrgica, permanecieron 20 días en el animalario en cuarentena.

Las intervenciones quirúrgicas de los animales se realizaron en el área quirúrgica del Hospital Clínico Veterinario Rof Codina de la Facultad de Veterinaria de Lugo.

4.2.3. Elaboración y síntesis de los implantes

La síntesis química de los cementos de fosfatos de calcio y la elaboración del vidrio de base fosfato se realizó en el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica y el Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica de la Universitat Politècnica de Catalunya, bajo la dirección de los profesores Joseph Antón Planell Estany y María Pau Ginebra Molins.

Para la **obtención** de los **cementos** se utilizó como fase sólida α -TCP, que se obtuvo de una mezcla de los reactivos CaHPO_4 (Sigma, Ref. C-7263) y CaCO_3 (Sigma, Ref. C-4830). Tras homogeneizar la mezcla de los reactivos en un recipiente plástico, se colocó el polvo resultante en un recipiente de platino y se introdujo en un horno tubular Carbolite efectuando un calentamiento desde la temperatura ambiente hasta 1300°C durante 15 horas, tiempo suficiente para asegurar la transformación completa de los reactivos⁴. A continuación, se llevó a cabo un temple, con el fin de retener la estructura cristalina monocíclica correspondiente a la fase α a la temperatura ambiente, evitando la transformación a su forma alotrópica β ; es fundamental que este temple se realice rápidamente, pues el fosfato α tricálcico se corresponde con una fase metaestable, que puede transformarse a gran velocidad de α a β . Por otro

⁴ Ginebra M.P., Fernandez E., Maeyer E.A.P., Verbeeck R.M.H. (1997): Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research* **76** (4), pps.: 905-912.

lado, si el temple no es lo suficientemente rápido el material puede contener un cierto nivel de impurezas.

Una vez obtenido el β -TCP se procedió a su fragmentación mediante un proceso de molido en un molino centrífugo (Pulverisette 6, Fritsch GMBH) en mortero de ágata en dos fases:

1- En la primera fase estuvo 20 minutos a una velocidad de rotación de 605 rpm con 4 bolas grandes y 8 pequeñas, y en la segunda fase la velocidad de rotación fue de 650 rpm con el mismo número de bolas y en dos tiempos. El primer tiempo tuvo una duración de 180 minutos, y el segundo, de nuevo, 180 minutos.

2- Posteriormente se añadió al polvo de β -TCP un 2% en peso de Hidroxiapatita Precipitada (Merck, Ref. 2143) utilizada como semilla para favorecer la nucleación del producto final. Para homogenizar la mezcla de fosfato β tricálcico e hidroxiapatita precipitada se molió el polvo en remesas de 20 gramos durante 7 minutos.

Para la **obtención** del **vidrio** se mezcló $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, CaCO_3 y Na_2CO_3 , a los que se agregó dióxido de titanio (TiO_2) para obtener una composición molar de 44,5 P_2O_5 - 44,5 CaO - 6 Na_2O - 5 TiO_2 . Primeramente se sometió al CaCO_3 a un programa de calcinación (pasando de T^a ambiente a 600°C en una hora. Luego se mantuvo 30 minutos a 600°C , posteriormente pasó de 600 a 900°C en 1 hora y se mantuvo otra hora a esta temperatura. Tras esto, se dejó enfriar a temperatura ambiente). Posteriormente, se mezclaron homogéneamente todos los productos, se introdujeron en un crisol de platino y se sometieron a un programa de fusión cuya duración osciló entre las 8 y las 10 horas hasta alcanzar los 1350°C . A continuación se colaron y se recoció durante 20 minutos a su temperatura de transición, que para este material es de $532,90^\circ\text{C}$. Tras esto fueron guardados en un desecador hasta el momento de su

utilización en la siguiente fase. Para ello, el primer paso a seguir fue la rehidratación del polvo de albumen deshidratado, que fue disuelto en agua destilada en una proporción de 1:7 para dar una solución al 12.5%, que es la concentración natural de la clara de huevo fresca. Para la obtención de los cilindros vitrocerámicos con una relación del 25% en volumen de vidrio (teniendo en cuenta que la densidad del vidrio es de $2,9 \text{ g/cm}^3$) se mezclaron 3 ml de albumen con 1 ml de vidrio. Para conseguir espumar el albumen se introdujeron los 3 ml de albumen hidratado en un mortero cerámico de 80 mm de diámetro y se batió con una batidora doméstica con una potencia de 500W durante un tiempo de 3 minutos. Cuando se consiguió una mezcla homogénea, se introdujo en los moldes lo más rápidamente posible, llenándolos bien. Seguidamente se introdujeron los moldes en una estufa a 80° C durante 2 horas, se desmoldaron y, posteriormente, se sinterizaron a 540° C durante 3 horas.

Tanto la fase sólida de los cementos, compuesta por polvos de β -TCP, como los cilindros de vidrio G fueron envasados al vacío en bolsas que contenían 2,5 gramos de polvo de β -TCP o, en su caso, dos cilindros del vidrio G. Tras ser envasados, se procedió a su esterilización mediante rayos gamma a 25 grays.

4.2.4. Grupos de trabajo

Para realizar el protocolo experimental, se dividieron los conejos en dos grupos, cada uno compuesto por 18 animales; al primer grupo se le implantó en uno de los cóndilos del fémur el material vitrocerámico (G5) y el cóndilo ipsilateral se fijó como control (CO), permaneciendo el defecto cavitario vacío. En el segundo grupo, se colocó en un cóndilo distal femoral el cemento poroso (CP) y en el ipsilateral el cemento denso (CH). Los sacrificios se realizaron seriadamente:

- A la semana de la implantación se sacrificaron 6 conejas de cada grupo.
- A las 4 semanas se procedió al sacrificio de otras 6 conejas de cada grupo.
- A las 12 semanas se sacrificaron las 6 conejas restantes de cada grupo.

De este modo, obtuvimos seis muestras de cada material en los distintos momentos del estudio (**Tabla 15**).





Grupo (36 conejas) 	Tipo implante	Fechas sacrificio		
		1 semana (nº muestras obtenidas) 	4 semanas (nº muestras obtenidas) 	12 semanas (nº muestras obtenidas) 
I (18 conejas)	Control (CO)	6	6	6
	Vitrocerámico (G5)	6	6	6
II (18 conejas)	Cemento Denso (CH)	6	6	6
	Cemento Poroso (CP)	6	6	6

Tabla 15: temporalización y diseño del experimento

4.2.5. Protocolo anestésico

Los conejos son animales difíciles de anestésiar de forma segura y eficaz porque se estresan fácilmente durante la inducción y esto puede llevar a una parada cardíaca o respiratoria. La recuperación anestésica es lenta y la anorexia prolongada es una complicación postoperatoria frecuente^{1,2}. La frecuencia de estos problemas potencialmente serios se reduce seleccionando de forma cautelosa el anestésico, evitando el estrés y manteniendo un cuidado especial antes y después de la intervención quirúrgica³.

La primera fase de la técnica anestésica de elección coincidió con el ayuno de 12 horas tanto de agua como de comida, para evitar la aparición de vómitos que suelen ser frecuentes durante el procedimiento quirúrgico. La siguiente fase fue alcanzar un estado de anestesia. Para ello usamos una combinación de agentes; el primero de ellos fue un agente agonista α -2 adrenérgico, la medetomidina (50 μ g/kg IM), que además de sedación provoca relajación muscular y analgesia, y el otro agente utilizado fue la ketamina (25 mg/kg IM), que funciona como anestésico disociativo⁵. Con esta combinación logramos pérdida de conocimiento, relajación muscular y analgesia, es decir, una anestesia segura para realizar un buen procedimiento quirúrgico que redujera la ansiedad y el miedo de los animales ante un procedimiento al que no estaban habituados y que mejorara el manejo, además de conseguir la reducción de la dosis de anestésico inhalatorio³. La inducción se realizó con isoflurano a una concentración de 4% al igual que el mantenimiento, que se llevó a cabo con una concentración de isoflurano de entre 1,5-3% mediante

⁵ Hedenqvist P., Hellebrkers L.J. (2003): Laboratory animal analgesia, anesthesia and euthanasia. En *Handbook of Laboratory Animal Science*. Hau J., Van H.G.L.. (Eds.), 2ª edición CRC Press, USA, pps.: 413-457.

maskarilla a través de un circuito anestésico semiabierto (“T” de Ayre modificado).

4.2.6. Técnica quirúrgica

Tras lograr la anestesia general, se preparó el lugar de la incisión así como un amplio área alrededor de la misma. Para ello, se eliminó el pelo con una esquiladora y, a continuación, se lavó el área con una combinación de agentes antisépticos, en este caso alcohol 96° y povidona yodada (Betadine®). El exceso de antiséptico fue eliminado con una gasa estéril para evitar el enfriamiento excesivo del área quirúrgica y la consiguiente hipotermia del animal (**Figura 20**). El siguiente paso fue tallar la zona de interés con un paño adhesivo fenestrado para evitar las lesiones provocadas por las pinzas en la piel de los conejos y, por último, se procedió a iniciar el abordaje quirúrgico de la porción distal del fémur.

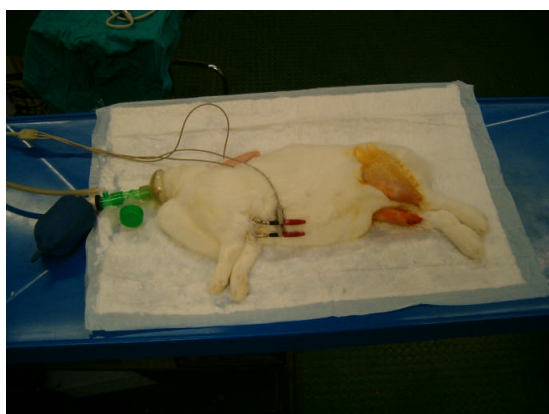


Figura 20: preparación paciente

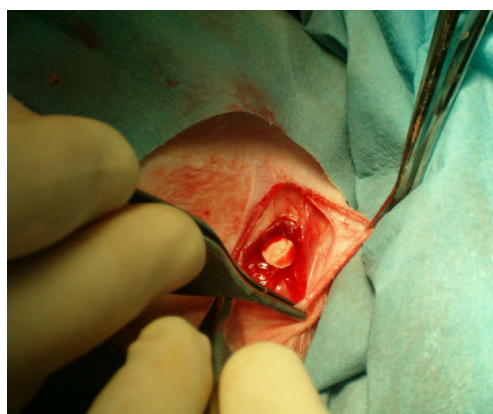


Figura 21: implantación vidrio

Primeramente, se realizó una incisión cutánea ligeramente curvada desde el tercio distal del fémur hasta la cresta tibial, lateral a la rótula, y se seccionó el tejido subcutáneo para exponer la facia lata^{6,7}. Seguidamente se cortó la cápsula articular fibrosa y la fascia comenzando en la meseta tibial justo lateral al tendón rotuliano y extendiéndose en sentido proximal, paralelo al tendón rotuliano y a la rótula. Se siguió el borde del músculo vasto lateral en sentido caudal hasta el tabique existente entre los músculos bíceps femoral y vasto lateral. Se separaron estos dos músculos, haciendo una ligadura doble sobre la rama muscular de la arteria femoral caudal que los une a nivel distal. Tras esto se elevó mediante disección roma el músculo cuádriceps desde la porción distal del fémur y se luxó la rótula en sentido medial para exponer la porción distal del fémur^{7,8}.

A continuación se procedió a realizar un defecto cavitario de 6 mm de diámetro, que en el caso de los cementos de fosfatos de calcio y del vidrio sirvió como lecho óseo de los mismos, y en el caso de los controles permaneció vacío. Se escogió un diámetro de 6 mm debido a que distintas investigaciones previas comprobaron que los defectos cavitarios de este tamaño no se rellenan de hueso de forma espontánea, es decir, no existe curación ósea⁹. La técnica de fresado debe ser lo más atraumática posible, realizada a baja velocidad y con buena irrigación para evitar el calentamiento del hueso, y bajo condiciones

⁶ **Sánchez-Valverde M.A. (1997):** Fracturas de fémur. En *Traumatología y ortopedia de pequeños animales*. Sánchez-Valverde M.A. (Ed.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 153-169.

⁷ **Shires P. (2000):** Fracturas del fémur. En *Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies*. Birchard S.J., Sherding R.G. (Eds.), 2ª edición McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 1333-1343.

⁸ **Piermattei D.L. (1993):** Approach to caudal limb. En *An Atlas of Surgical Approaches to the Bones of the Dog and Cat*. Piermattei D.L. (Ed.), 3ª edición WB Saunders Co., Philadelphia, pps.: 275.

⁹ **Jackson D.W.; Lalor P.A., Aberman H.M.; Simon T.M. (2001):** Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* **83(1)**, pps: 53-64.

rigurosas de asepsia^{10,11}. Es muy importante trabajar observando la velocidad de rotación del motor; la velocidad óptima es entre 700 y 1000 rpm. El diseño de las fresas también es muy importante pues de él depende el aumento de temperatura. Por otro lado, las fresas no deben usarse más de 20 veces, ya que la pérdida de filo ocasiona un aumento indeseado de la temperatura. La irrigación debe ser una combinación de irrigación interna y externa y sería recomendable mantenerla unos segundos tras terminar el corte. El suero debe estar refrigerado, aunque la temperatura no debe ser menor de 20 grados para prevenir la lisis celular por choque térmico¹⁰. Debería emplearse la técnica de hibernación descrita en el protocolo original de Bränemark, aunque no es un requisito fundamental¹¹.

El siguiente paso es la colocación de los implantes (**Figura 21**). Los cementos se forman con la mezcla de β -TCP y un reactivo en fase líquida para permitir formar una pasta que fragüe en un breve período de tiempo. Como fase líquida se utilizó una solución de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4) al 1% en peso –que sirve como acelerante de la reacción de fraguado–, a la que se añadió un 1% en peso de alginato de sodio. La esterilidad de la fase líquida se consiguió mediante filtración (con el filtro 0,22 μm Millex 6 P). La relación líquido/polvo (L/P) utilizada en el estudio fue de 0,4 ml/g⁴.

Como agente espumante se utilizó albumen deshidratado (Igreca, Francia) solamente en el cemento que resultó poroso (P); este agente es la característica diferenciadora de los dos tipos de cementos¹². El polvo de

¹⁰ **López Rubín F., López Rubín H. (1994):** Oseointegración. En *Bases para una Implantología segura*. López Rubín F., López Rubín H. (Eds.), Offser color, España, pps. 8-21.

¹¹ **Donado A., Guisado B., Ortega R. y Sanz J. V. (2003):** Respuesta ósea en implantología. Osteointegración. En *Anatomía implantológica. Bases morfológicas y su aplicación clínica en implantología dental*. Donado M. (Ed.), Ars Medica, España, pps. 42-47.

¹² **Markovic M., Takagi S., Chow L.C. (2001):** Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Bioceramics* 13, pps.: 773-778.

albumen deshidratado fue disuelto en agua destilada en una proporción de 1:7 para dar una solución al 12.5% de peso, que es la concentración natural de la clara de huevo fresca. Para conseguir esterilizar el albumen hidratado se utilizó un filtro (Stericup 6 P Filter Unit 150 ml). Se aplicó vacío con una bomba en un entorno estéril bajo una campana de flujo laminar. Para conseguir espumar el albumen se utilizó una cantidad de 4 ml de albumen hidratado introducido en un mortero cerámico de 80 mm de diámetro y se batió con una batidora doméstica con una potencia de 300W durante un tiempo de 2 minutos. La cantidad de espuma utilizada fue de un 14-15% en peso con respecto a la cantidad de polvo utilizada.

Después se preparó el cemento mezclando el polvo de α -TCP con la fase líquida, y, en el caso del cemento poroso, se mezcló con el albumen espumado de forma muy cuidadosa.

El tiempo de cohesión se había determinado previamente sumergiendo probetas de 6 mm de altura por 12 mm de diámetro en agua destilada a 37° C a diferentes tiempos de preparación de la pasta. También se estudió de forma previa el tiempo de fraguado de cada una de las dos mezclas de cemento y la resistencia a la compresión, que se determinó en probetas cilíndricas de 6 mm de diámetro y de altura 12 mm en una Máquina universal de Ensayos (MTS Bionix 858 Test System) a una velocidad de 1 mm/min. Se realizó también un estudio de las fases presentes en el cemento mediante Difracción de Rayos X (DRX), con el fin de evaluar las posibles interacciones de la adición del agente espumante (albumen) y el agente de cohesión (alginato de sodio) con la reacción de fraguado del cemento. Conociendo los resultados de estos experimentos podemos determinar que el momento óptimo de inyección de los dos cementos está entre los 5 y los 10 minutos. Para ello, se cargaron 5 ml en

una jeringuilla estéril y se inyectaron en la cavidad del defecto óseo creado hasta que ocurrió un rebasamiento del mismo.

En el caso del vidrio, se implantaron los cilindros de 6 mm de diámetro, que se adaptaban perfectamente al tamaño del lecho óseo realizado.

De esta forma, como ya detallamos previamente, se implantó en la mitad de los conejos un implante de cemento denso en un cóndilo distal femoral y de cemento poroso en el ipsilateral, y en la otra mitad el vidrio en un cóndilo distal femoral dejando la cavidad creada sin rellenar como control en el cóndilo ipsilateral. Posteriormente se procedió al cierre de la articulación con un material de sutura no reabsorbible, después de observar que los materiales reabsorbibles daban lugar a fenómenos inflamatorios, y se mantuvo al animal con oxígeno para obtener una óptima recuperación de la anestesia.

4.2.7. Evaluación postoperatoria, profilaxis y control

Tras la recuperación anestésica los animales fueron devueltos a sus habitáculos, donde se les administró comida y bebida. Aunque desde el inicio del estudio se controló su consumo de agua y comida y el aspecto de las heces, tras la implantación esta vigilancia se hizo aún más minuciosa. Por otro lado, se realizaron curas antisépticas en las heridas quirúrgicas observando el proceso de cicatrización de la herida y se inyectó enrofloxacina (15 mg/Kg) por vía subcutánea para establecer una antibioterapia preventiva. Todos los individuos completaron la fase experimental sin complicaciones derivadas de la cirugía.

4.2.8. Protocolo de eutanasia

El sacrificio se realizó de forma seriada mediante la inyección intravenosa de un agente barbitúrico –pentobarbital sódico– a altas dosis. Este procedimiento fue llevado a cabo siguiendo los protocolos detallados en los manuales de manejo y sacrificio de los animales de laboratorio⁵.

4.2.9. Preparación histológica de las muestras

Para la obtención de las muestras óseas se realizó un abordaje lateral longitudinal del muslo del conejo, seccionando el fémur en su tercio distal con ayuda de una sierra de autopsia.

A continuación, las muestras fueron procesadas para su estudio utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato descritas por Donath¹³, realizando los pasos que siguen:

4.2.9.1. Fijación

Se realizó mediante inmersión de los bloques en formol al 10% durante un mínimo de dos semanas debido al gran tamaño del fragmento óseo.

4.2.9.2. Deshidratación

Se realizó mediante pases sucesivos de los segmentos óseos por alcoholes de distinta concentración bajo agitación constante, como se indica a continuación:

- 70 % alcohol durante tres días.
- 80 % alcohol durante tres días.
- 96 % alcohol durante tres días.

¹³ Donath K. (1995): Preparation of histologic sections. Exakt-Kulzer-Publication, Norderstedt.

- 100 % alcohol durante tres días.
- 100 % alcohol durante tres días.

4.2.9.3. Infiltración

La infiltración plástica se hizo mezclando glicometacrilato (**Technovit 7200[®]**, VLC - Heraus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) y peróxido de benzoilo (**BPO[®]**, Heraus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) al 1% con alcohol etílico a distintas concentraciones, finalizando con dos infiltraciones de glicolmetacrilato puro, bajo agitación constante, según el siguiente procedimiento:

- Technovit 7200[®] + BPO: alcohol → **(30:70)** durante tres días.
- Technovit 7200[®] + BPO: alcohol → **(50:50)** durante tres días.
- Technovit 7200[®] + BPO: alcohol → **(70:30)** durante tres días.
- Technovit 7200[®] + BPO → **(100)** durante tres días.
- Technovit 7200[®] + BPO → **(100)** durante tres días en vacío.

4.2.9.4. Inclusión y polimerización

Para llevar a cabo la inclusión se introdujeron las muestras de tejido en unos moldes de polietileno que, posteriormente, se llenaron con resina (Technovit 7200[®]) bajo el efecto de vacío.

La polimerización tuvo lugar en dos pasos:

- **Paso 1:** usando una luz de baja intensidad (manteniendo los moldes a una temperatura por debajo de 40° C, para que la resina se polimerizara extensamente). Este paso dura 4 horas.
- **Paso 2:** usando una luz azul de gran intensidad, de forma que el metacrilato que ha sido incluido dentro del tejido también resulte completamente polimerizado. Este paso tiene una duración de doce horas o más, debido al gran grosor de nuestras muestras.

Por último, permanecieron en la estufa durante 24 horas para que el BPO terminara su proceso de polimerización (**Figura 22**).



Figura 22: muestras tras la polimerización



Figura 23: montaje sobre una lámina acrílica

4.2.9.5. Preparación del bloque para obtener una superficie paralela

Una vez polimerizado, se extrajo el bloque del molde. El siguiente paso fue realizar un corte preliminar para aproximar el área de interés más cerca de la superficie del bloque. Esto se realizó con la ayuda de una sierra circular, a baja velocidad, e irrigando para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, que deterioraría los tejidos que rodean al implante. A continuación, para preservar el paralelismo de los cortes a realizar, los bloques se montaron en una lámina acrílica con ayuda de una resina (**Technovit 4000[®]**, Heraeus Kulzer GmbH, Werheim, Alemania) mediante el empleo de una prensa de pegado y una bomba de vacío, que sujeta el porta a la parte superior de la prensa (**Figura 23**). La resina se extendió por la parte de atrás del bloque, de manera que la parte que va a ser examinada contacte con la parte de debajo de la prensa de pegado. Cuando la polimerización finalizó el bloque estuvo listo para ser pulido.

4.2.9.6. Preparación de la superficie de interés

El siguiente paso fue el pulido de la muestra por la superficie de interés con la ayuda de papeles abrasivos del número 1200. Tras realizar esta práctica, y con la ayuda de la prensa de fotopegado y una resina específica (**Technovit 7210**[®], Heraus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) la cara a estudiar se pegó en el porta definitivo. Posteriormente, utilizando una sierra de banda (Exakt 400, System, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) y un portamuestra de vacío, se realizó un corte preliminar obteniendo una sección fina de 200 micras aproximadamente. Esta sección fue sometida a un microdesgaste (Exakt-Micro Grinding System[®], Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) y pulimento con papeles de carburo de silicio de 1200 y 4000.

El resultado final fueron secciones longitudinales del cóndilo del fémur de aproximadamente 70 micras de espesor.

4.2.9.7. Tinciones

Cada uno de los cortes histológicos, correspondientes a un animal de experimentación, fue teñido con dos métodos diferentes (**Tablas 16 y 17**):

TINCIÓN DE LÉVAI LACZCÓ	
<p>Procedimiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sumergimiento en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% durante 5 minutos con movimiento constante. 2. Lavado con agua corriente dos veces. 3. Descalcificación de la superficie con ácido acético (CH₃COOH) durante 1 minuto. 4. Lavado con agua corriente dos veces. 5. Sumergimiento en la Solución A durante 20 minutos. 6. Lavado con agua corriente dos veces. 7. Sumergimiento en "Pararosanilina" durante 5 segundos. Los cortes se deben sumergir individualmente en esta tinción. 8. Lavado con agua corriente y secado. 	
<p>Solución A</p> <p>Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na₂CO₃ (1%).</p> <p>Las soluciones deben ser filtradas antes de su uso.</p>	<p>Materiales</p> <p>➤ Solución A: Azur II (Merck Art. No. 9211) al 1% en agua destilada. Azul de metileno (Merck Art. No. 1283) a 1% en agua destilada. Na₂CO₃ (Merck Art. No. 6392) a 1% en agua destilada.</p> <p>➤ Solución B: Pararosanilina (Sigma Art. No. 1528) a 1% en agua destilada.</p>

Tabla 16: tinción de LÉVAI LACZCÓ

TINCIÓN DE KOSSA
<p>Procedimiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sumergimiento en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% durante 30 segundos. 2. Lavado con agua destilada. 3. Sumergimiento en la solución de Nitrato de plata (Ag NO₃) al 3% durante 30 segundos. 4. Lavado con agua destilada. 5. Sumergimiento en la solución de sodaformol (Na₂ CO₃) realizando un control visual. 6. Lavado con agua destilada. 7. Sumergimiento en la solución de tiosulfato de sodio al 5% durante 5 segundos. 8. Lavado con agua destilada durante 30 segundos.
<p>Tinciones:</p> <p>Solución de Nitrato de plata → 6 g. de nitrato de plata + 200 ml. de agua destilada.</p> <p>Solución sodaformol → 10 g. de carbonato de sodio + 150 ml. de agua destilada.</p> <p>Solución de tiosulfato de sodio → 10 g. de tiosulfato de sodio + 200 ml. de agua destilada.</p>

Tabla 17: tinción de KOSSA

4.2.10. Técnicas de análisis de los implantes

La valoración del comportamiento de los implantes puede ser realizada desde técnicas muy dispares y por métodos tanto cualitativos como cuantitativos.

4.2.10.1. Análisis semicuantitativo de los implantes mediante microscopía de barrido

Las muestras obtenidas de la preparación histológica se montaron en el microscopio electrónico de barrido **LEO-435VP con Microanálisis (EDX, Oxford 300)**, LEICA Microsystems (Cambridge, U.K.) perteneciente a la “Rede de Infraestructuras de Apoyo á Investigación e ao Desenvolvimento Tecnológico da USC” y se cuantificaron distintos metales (calcio, fósforo, magnesio, azufre...).

El microscopio electrónico de barrido (**SEM**) permite obtener información estructural y analítica del hueso¹⁴. De esta forma, el examen mediante microscopía de barrido ha sido usado para estudiar la reabsorción ósea¹⁵ y examinar la interacción entre las células del hueso y distintos materiales^{16,17}. El funcionamiento se basa en la incidencia de un haz electrónico sobre una muestra conductora. El haz electrónico se enfoca en un punto y se escanea la

¹⁴ **Marshall D., Helfrich M.H., Aspden R.M. (2003):** Scanning Electron Microscopy of bone. En *Bone Research Protocols*. Helfrich M.H., Ralston S.H. (Eds.), Humana Press Inc, New Jersey, pps.: 311-323.

¹⁵ **Chena Q.Z., Wongb C.T., Lub W.W., Cheungb K.M.C., Leongb J.C.Y., Luk K.D.K. (2004):** Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo. *Biomaterials* **25**, pps.: 4243-4254.

¹⁶ **Boyde A. (1972):** Scanning electron microscope studies of bone. En *The biochemistry and Physiology of Bone*, Vol I. Bourne G.H. (Ed.), Academic Press, New York, pps.: 259-264.

¹⁷ **Tay F.R., Sano H., Tagami J., Hashimoto M., Moulding K.M., Yiu C., Pashley D.H. (2001):** Ultrastructural study of a glass ionomer-based, all-in-one adhesive. *Journal of dentistry* **29**, pps.: 489-498.

superficie. Como resultado de la interacción del haz electrónico con la muestra se produce la emisión de señales: electrones retrodispersados, electrones secundarios o rayos X entre otros. Estas señales son captadas por detectores que los procesan, son amplificadas y transformadas en señales eléctricas como píxeles a un monitor¹⁸. La **figura 24** muestra el volumen de interacción del haz electrónico en la muestra (en este caso de bajo número atómico) y la procedencia de cada una de las señales que emite la muestra.

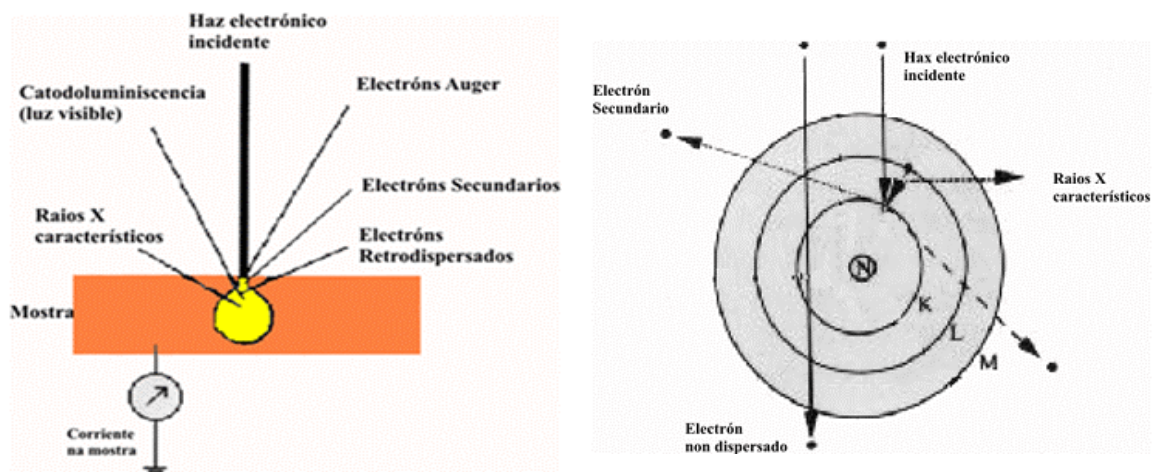


Figura 24: volumen de interacción del haz electrónico y señales electrónicas emitidas por la muestra

Partiendo de este funcionamiento básico, existen distintas aplicaciones del SEM que son útiles en el estudio del comportamiento del implante y el hueso:

- Los **electrones retrodispersados (BSE-backscattered electron)** se forman cuando un electrón del haz incidente de exploración impacta contra un átomo de la muestra y es desviado en la misma dirección pero en sentido contrario. El número de electrones retrodispersados varía directamente con el número atómico (Z) de la muestra. A mayor Z ,

¹⁸ **Boyde A., Maconnachie E., Reid S.A. (1986):** Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications. *Scanning electron microscopy* 4, pps.: 1537-1554.

aumenta la probabilidad de choque, obteniéndose más respuesta. Las imágenes de retrodispersados proporcionan información composicional y topográfica y es una herramienta muy útil para evaluar los patrones de distribución de la densidad mineral dentro del hueso¹⁹.

- Los **electrones secundarios (ES)** se forman cuando un electrón del haz incidente colisiona con un electrón de los átomos de la muestra, expulsando a este último de la capa. Cada electrón incidente puede producir muchos ES. Los electrones secundarios son muy poco energéticos (50eV) y proporcionan información de la capa más superficial de la muestra.
- **La formación de Rayos X (RX)** está vinculada a la vacante electrónica causada por el electrón secundario. Un electrón de la capa superficial del átomo pasa a ocupar ese vacío produciéndose una pérdida de energía que da lugar al Rayo X característico. La señal de Rayos X se utiliza en el Sistema de Microanálisis EDX, que permite detectar elementos químicos a partir del Berilio. Obtenemos con ello un microanálisis semicuantitativo muy exacto de la composición de la muestra.

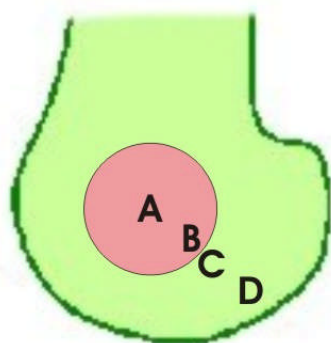
Las ventajas del SEM radican en que es una herramienta muy útil y exacta para valorar el comportamiento del material y el hueso a nivel microestructural en el tiempo, especialmente cuando se usa el sistema de microanálisis EDX^{20,21,22}. Además, otra gran ventaja de este método es su reproductibilidad,

¹⁹ Reid S.A., Boyde A. (1987): Changes in the mineral density distribution in human bone with age: Image analysis using backscattered electrons in the SEM. *Journal of Bone and Mineral Research* 2, pps.: 123-131.

²⁰ Hoshikawa A., Fukui N., Fukuda A., Sawamura T., Hattori M., Nakamura K., Oda H. (2003): Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials* 24, pps.: 4967-4975.

la facilidad de preparación de la muestra y la posibilidad de realizar muchos análisis con una sola muestra²³. La gran desventaja es la imposibilidad de ver células y tejidos blandos, que sí son vistos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)²⁴, por lo que no permite la observación de la reacción biológica alrededor del implante, como es la absorción celular (macrófagos, células mesenquimatosas y osteoblastos) y la formación de osteoide^{25,26}.

Las medidas se realizaron en cuatro zonas de la muestra, como se indica en la **figura 25**:



- A: Centro implante**
- B: Zona implante cerca de la interfase**
- C: Zona hueso cerca de la interfase**
- D: Zona hueso lejos de la interfase**

Figura 25: puntos de realización del análisis cuantitativo (EDX)

²¹ **Chen Q.Z., Wong C.T., Lu W.W., Cheung K.M.C., Leong J.C.Y., Luk K.D.K. (2004):** Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo. *Biomaterials* **25**, pps.: 4243–4254.

²² **Hashimoto M., De Munck J., Ito S., Sano H., Kaga M., Oguchi H., Van Meerbeek B., Pashley D.H. (2004):** In vitro effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. *Biomaterials* **25**, pps.: 5565-5574.

²³ **Tay F.R., Sano H., Tagami J., Hashimoto M., Moulding K.M., Yiu C., Pashley D.H. (2001):** Ultrastructural study of a glass ionomer-based, all-in-one adhesive. *Journal of Dentistry* **29**, pps.: 489-498.

²⁴ **Gruber H.E., Wiggins W.W. (2003):** Methods for Transmission and Scanning Electron Microscopy of Bone and Cartilage. En *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. An Y.H., Martin K.L. (Eds.), Humana Press Inc., New Jersey, pps.: 497-505.

²⁵ **Neo M., Nakamura T. (2003):** SEM Methods for observation of the bone-implant interface. En *Handbook of Histology Methods for bone and cartilage*. An Y.H., Martin K.L. (Eds.), Humana Press Inc., New Jersey, pps.: 505-513.

²⁶ **Nesbit S.A., Horton M.A. (2003):** Fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts by confocal microscopy. En *Bone Research protocols*, Helfrich M.H., Ralston S.H. (Eds.), Humana Press Inc, New Jersey, pps.:259-281.

Se realizó un análisis en cada punto de cada una de las seis muestras obtenidas para cada uno de los cuatro subgrupos a una, cuatro y doce semanas.

4.2.10.2. Análisis histomorfométrico

Por otro lado, para cuantificar la reabsorción de los distintos materiales y la formación de hueso, se realizó un estudio histomorfométrico de las seis muestras obtenidas de cada uno de los cuatro subgrupos en los tres momentos del sacrificio mediante la tinción de Lévai Laczcó. Cada una de ellas fue procesada mediante un equipo de digitalización de imágenes (Olympus DP12) acoplado al microscopio óptico Olympus CH30. El software Olympus Micro Image versión 1.0 para Windows permite la digitalización directa de las imágenes de microscopía y, de esta manera, las medidas se efectúan directamente sobre el monitor del ordenador. La histomorfometría ósea es el análisis histológico cuantitativo de los diferentes elementos que integran el tejido óseo. Este examen aporta gran información de la estructura, remodelación y reabsorción del implante, que no se podría obtener con otras técnicas, lo que conlleva que en los últimos años haya habido significativos avances en las técnicas histomorfométricas con el uso de análisis asistidos por ordenador y el desarrollo de sofisticados avances para evaluar la microestructura del hueso^{27,28}. Para realizar esta valoración cuantitativa hay que definir una serie de parámetros histomorfométricos, que se obtienen de la

²⁷ Parfit A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., Recker R.R. (1987): Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research* 2, pps.: 595-610.

²⁸ Lu J.X., Gallur A., Flautre B., Anselme K., Descamps M., Thierry B. y Hardouin P. (1998): Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* 42, pps.: 357-367.

realización de distintas medidas. Estas medidas son derivadas de la nomenclatura discutida por el Comité de Nomenclatura Histomorfométrica tras la petición hecha por la Sociedad Americana para el estudio del hueso²⁹.

4.2.10.2.1. Medidas histomorfométricas

- **Cavidad creada o área del implante (AI)**, que es la superficie del defecto óseo creado en la que se incluye el material o permanece vacía como control.
- **Superficie de la cavidad residual (RCS)**, que es la superficie sin tejido óseo mineral dentro de la cavidad en que se ha colocado el implante o que permanece como control.
- **Crecimiento óseo espontáneo (SBH)**, que se corresponde con el porcentaje de defecto parcialmente relleno por el tejido óseo. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$SBH (\%) = (1 - RCS/RCS \text{ inicial}) \times 100$$

- **Área trabecular total (ATT)**, que es el área que ocupan las trabéculas óseas en el defecto cavitario creado e indica la cantidad de tejido óseo presente en su interior. En nuestro caso se refiere tanto al hueso neoformado presente en dicho defecto como al hueso remodelado que aparece en la zona de hueso hospedador cercana a la interfase. Se cuantifica en mm².
- **Índice de penetración (IP)**, que indica el crecimiento medio de las trabéculas desde la periferia. Se expresa en mm. También se denomina profundidad de crecimiento (PC).
- **Longitud total de osteoide (LTO)**, que corresponde al borde de las trabéculas óseas que presenta frente de osteoide en el defecto cavitario. Indica

²⁹ Weiland A.J., Phillips T.W., Randolph M.A. (1984): Bone grafts: a radiologic, histologic and biomechanical model comparing autografts, allografts and free vascularized bone grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery* **74**, pps: 368-379.

la cantidad de reborde trabecular en que se produce neoformación ósea. Se cuantifica en μm .

- **Amplitud media de osteoide (AMO)**, que es el grosor promedio de los distintos ribetes de osteoide que se encuentran presentes en el defecto óseo estudiado. Es un indicador indirecto de la actividad osteoblástica y se expresa en μm .

- **Área de biomaterial no reabsorbido (ABNR)**, que corresponde al área ocupada por los restos de los materiales implantados que permanecen sin reabsorber en los periodos estudiados. Se cuantifica en mm^2 .

4.2.10.2.2. *Parámetros histomorfométricos*

Se obtienen relacionando entre sí las medidas histomorfométricas antes descritas y permiten definir cuantitativamente las características estructurales y funcionales del tejido óseo.

- **Superficie porcentual de hueso neoformado (Sv)**, que indica la relación entre el área trabecular total (ATT) y el área de implante (AI). Se utiliza para valorar cuantitativamente la neoformación ósea que tiene lugar en el defecto cavitario así como la remodelación ósea que aparece en la zona de hueso hospedador cercana a la interfase. Se expresa en %.

- **Área de osteoide (Aos)**, que se obtiene multiplicando la longitud total de osteoide (LTO) por la amplitud media de osteoide (AMO). Se cuantifica en μm^2 .

- **Relación área de osteoide / área trabecular total (Aos/ATT)**, que se obtiene relacionando el área de osteoide (Aos) con el área trabecular total (ATT) y aporta información respecto de la actividad de neoformación ósea. Se expresa en %.

Todas estas medidas son de gran utilidad para valorar los porcentajes de reabsorción del material y de formación ósea, como veremos a lo largo del estudio.

4.2.10.3. Análisis histológico de la interfase hueso-implante

Para valorar el progreso en la reabsorción del implante y la respuesta ósea al mismo, se realizó un estudio histológico de cada una de las seis muestras obtenidas de cada material y del control para cada momento del estudio. Hay que tener en cuenta que una sección histológica representa sólo un momento del proceso biológico, por lo que el método histológico usado debe proveer una información exacta sobre el progreso del material implantado y el estado, en ese momento, de la repuesta ocurrida en la interfase. En vista de todo ello, han sido desarrolladas diversas técnicas, todas ellas caracterizadas por su sencillez. En nuestro caso nosotros usamos la **microscopía óptica** mediante el uso del microscopio óptico Olympus CH30 y también nos valemos del aspecto macroscópico, obtenido con la ayuda de la lupa Olympus SZX9 (óptica Olympus DF PLAPO 1x-2).

Cada análisis histológico debe empezar con una descripción directa de la repuesta del tejido observada. Debe obtenerse información sobre: la posición del implante, la estructura ósea alrededor del implante, respuestas adversas del tejido (caracterizadas por la presencia de macrófagos, células inflamatorias, células gigantes e incluso tejido necrótico), la respuesta del tejido en la interfase y problemas relacionados con los implantes, como fracturas del implante o reabsorción de la capa de recubrimiento, en el caso de aquellos implantes que la lleven³⁰.

³⁰ **Rahn B.A. (1999):** Intra vitam staining techniques. En *Handbook of biomaterials evaluation*. Von Recum A.F. (Ed.), Taylor and Francis, Philadelphia, PA, pps.: 727-738.

4.2.10.4. Microtomografía computerizada

Otra técnica que realizamos en este estudio es el uso de imágenes obtenidas mediante microtomografía computerizada cuantitativa periférica.

La microtomografía computerizada es una técnica establecida para obtener una imagen representativa tridimensional del crecimiento óseo. Esta técnica se fundamenta en la producción de electrones de gran energía en un acelerador y en el desarrollo de un movimiento circular de los mismos en una batería circular. Cuando los electrones son desviados por fuertes campos magnéticos emiten ondas electromagnéticas enviadas como una radiación sincrotrónica. La luz, producida por la batería circular, adopta la forma de un intenso haz estrecho, similar al de un láser. La radiación sincrotrónica da lugar a un flujo monocromático de rayos X con un alto contenido de fotones. En una radiografía convencional, los rayos X pasan a través de un objeto y la intensidad transmitida es registrada como una imagen bidimensional. La información contenida en esta radiografía es una proyección de la densidad de absorción de la muestra en el plano perpendicular a la dirección del haz de rayos X. Si la muestra es entonces tomada varias veces en diferentes orientaciones, puede obtenerse información tridimensional (volumen) de la estructura de la muestra mediante la transmisión de información a un ordenador. La gran ventaja de este proceso radica en que permite la observación de láminas del objeto investigado sin realizar cortes físicos^{31,32}.

³¹ Ferretti J.L., Cappozza R.F., Zanchetta J.R. (1995): Mechanical validation of a non-invasive (pQCT) index of bending strength in rat femurs. *Bone* 18, pps.:97-102.

³² Weiss P., Obadia L., Magne D., Bourges X., Rau C., Weitkamp T., Khairoun I., Bouler J.M., Chappard D., Gauthier O., Daculsi G. (2003): Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials* 24, pps.: 4591-4601.

4.2.10.4.1. Microtomografía computerizada cuantitativa (QCT)

Mediante la microtomografía computerizada cuantitativa (QCT) puede determinarse la densidad mineral ósea. La ventaja que presenta esta técnica es que es la única entre los métodos de medida del hueso mineral que provee estimaciones separadas de la densidad mineral ósea de hueso cortical y trabecular como un valor de densidad mineral volumétrica real³³. Conjuntamente, la QCT puede medir las propiedades geométricas del hueso cortical con gran exactitud y predecir algunas propiedades mecánicas con gran precisión^{34,35}. La tomografía computerizada cuantitativa periférica (pQCT) es un tipo especial de QCT en la que el escaneo del esqueleto apendicular es realizado a una dosis baja de radiación. El desarrollo de hueso y músculo puede ser valorado, de forma no invasiva, mediante pQCT en lugares periféricos, para estudiar el desarrollo óseo, modelos experimentales de pérdida de hueso, y monitorizar la efectividad de intervenciones terapéuticas^{36,37}.

³³ Dapía R.S., Caeiro-Rey J.R., Blanco-Ramos M., Vaquero-Cervino E. (2005): Microtomografía computerizada (μ -TC): Nueva técnica para la evaluación de la microestructura ósea. *Acta Ortopédica Gallega* 1 (1), pps.: 34-38.

³⁴ Gasser J.A. (2003): Bone measurements by peripheral quantitative computed tomography in rodents. En *Bone Research protocols*, Helfrich M.H., Ralston S.H. (Eds.), Humana Press Inc, New Jersey, pps.:323-341.

³⁵ Caeiro-Rey J.R., Dapía R.S., Vaquero-Cervino E., Roca R.L., García D. C., Blanco-Ramos M. (2005): Determinantes de la resistencia ósea. *Educación médica Continuada en Traumatología*, pps.: 11-16.

³⁶ Rustichelli F., Romanzetti S., Dubini B., Girardin E., Raven C., Snigirev A., Rizzi G. (2004): Phase-contrast microtomography of thin biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15 (9), pps.: 1053-1057.

³⁷ Bryce R., Aspden R.M., Wytch R. (1995): Stiffening effects of cortical bone on vertebral cancellous bone in situ. *Spine* 20, pps.: 999-1003.

4.2.10.5. Estudio radiológico

También se realizó una valoración radiológica empleando los criterios descritos para la formación ósea por Lane y Sandhu³⁸.

Formación ósea	Puntuación
No hay formación ósea	0
Formación ósea en el 25 % del defecto	1
Formación ósea en el 50 % del defecto	2
Formación ósea en el 75 % del defecto	3
Formación ósea en todo el defecto	4

Remodelación	Puntuación
Sin remodelación	0
Remodelación apreciable	2
Remodelación completa	4

Tabla 18: criterios de Lane y Sandhu para la valoración radiológica

Para ello, las muestras óseas fueron procesadas en la Unidad de Diagnóstico por Imagen del Hospital Clínico Veterinario Rof Codina, donde se realizó el estudio radiológico del fémur con la ayuda de un generador trifásico Philips Super 80 CP, que alcanza una tensión máxima de 150 Kw y una intensidad máxima de 1000 mA. Este generador alimenta un tubo Philips SRO 33 100. La mesa de proyecciones es una mesa telemando Philips Diagnost 90S con intensificador de imagen. Los dos fémures correspondientes a cada animal de experimentación se sometieron a un estudio radiológico frontal y lateral.

La valoración radiológica permite evaluar el grado de regeneración ósea, constatado por la presencia de trabéculas óseas en los defectos cavitarios. Aunque aquí usamos la valoración de Lane y Sandhu, se han descrito diferentes escalas para valorar la incorporación de los injertos óseos que

³⁸ Lane J.M., Sandhu H.S. (1987): Current approaches to experimental bone grafting. *The Orthopedic Clinics of North America* 18, pps.: 213-225.

consideran principalmente el aspecto de su área central. La gran desventaja de esta técnica es que no existen baremos específicos de evaluación radiológica para el estudio de los defectos óseos cavitarios tratados con injertos óseos o biomateriales y que la implantación de biomateriales basados en fosfatos de calcio hace que las imágenes radiológicas presenten, desde el principio, un aumento de densidad que no debe ser confundido con regeneración ósea. También se debe tener presente que la mayoría de los estudios destacan la falta de correlación entre los resultados radiológicos e histomorfométricos^{38,39}.

4.2.11. Estudio estadístico de los datos

El estudio estadístico se realizó con ayuda del programa SPSS 12.0 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, USA). Se seleccionó el análisis de varianza múltiple de doble vía para estudiar los efectos del tipo de material y el tiempo de implantación y la interacción entre estas dos variables en el estudio histomorfométrico.

Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas, se eligió la prueba de Tukey para realizar las comparaciones múltiples entre grupos, realizando una valoración previa de la homogeneidad de varianzas con el estadístico de Levene.

³⁹ **Goldberg V.M., Powell A., Shaffer J.W., Zika J., Bos G.D., Heiple K.G. (1985):** Bone grafting: role of hiscompatibility in transplantation. *Journal of Orthopaedic Research* **3**, pps.: 389-404.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**



Resultados

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO RADIOLÓGICO

Como ya se ha descrito en el apartado de material y métodos, la valoración radiológica de la osteointegración de los biomateriales se ha efectuado aplicando los criterios propuestos por Lane y Sandhu, que describen la neoformación ósea porcentual y permiten evaluar la aparición de fracturas o la migración del material.

5.1.1. Vidrio

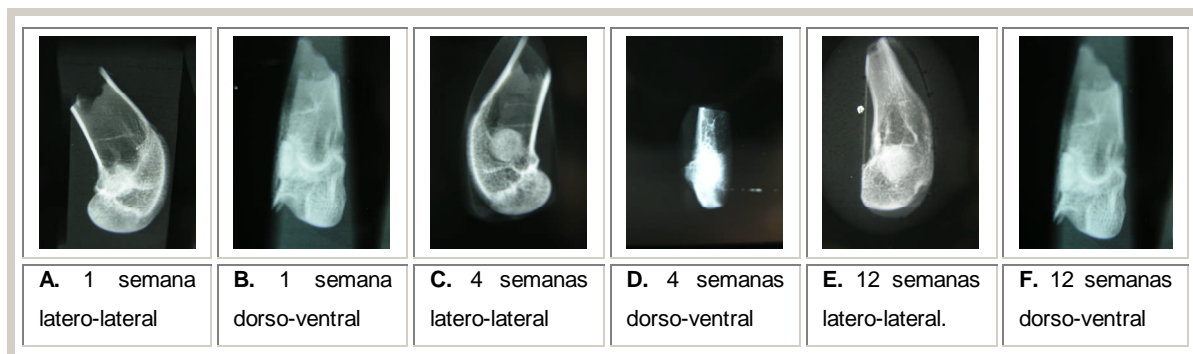


Figura 26: evolución radiológica del vidrio bioactivo implantado a las semanas 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F)

Vidrio	N (muestras)	Formación ósea	Remodelación
1 SEMANA	6	0	0
4 SEMANAS	6	0	0
12 SEMANAS	6	0	0

Tabla 19: valoración radiológica del vidrio bioactivo implantado a las semanas 1, 4 y 12

Siguiendo los criterios de Lane y Sandhu podemos constatar que en el caso del vidrio no existe ningún tipo de evolución radiológica, pues el cilindro del material aparece íntegro en todos los momentos del estudio y no se aprecia neoformación ósea alrededor de él. Otro dato importante que podemos obtener de este estudio es que no se aprecian fracturas ni fenómenos de migración del material.

5.1.2. Control

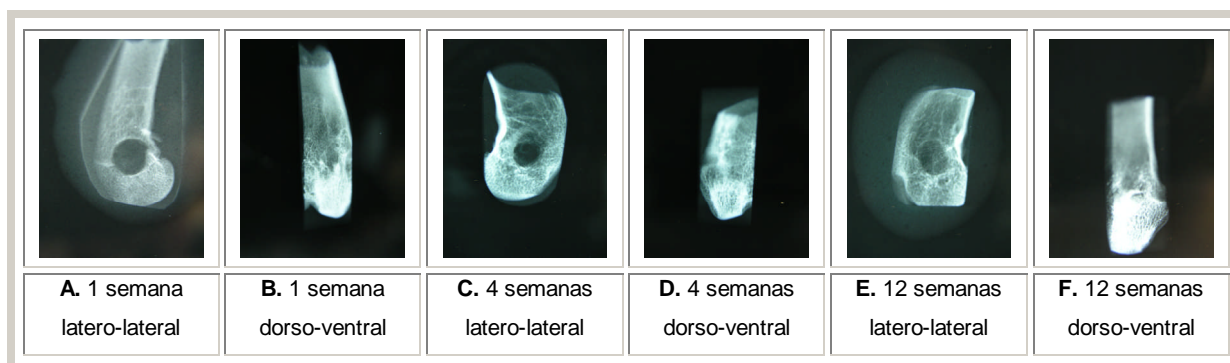


Figura 27: evolución radiológica del control a la semana 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F)

Control	N (muestras)	Formación ósea	Remodelación
1 SEMANA	6	0	0
4 SEMANAS	6	0	0
12 SEMANAS	6	0	0

Tabla 20: valoración radiológica del control a las semanas 1, 4 y 12

En el caso de control tampoco se aprecia evolución radiológica, de forma que no existe formación ósea espontánea. No se ven fenómenos de remodelación ni tampoco aparecen fracturas del hueso.

5.1.3. Cemento denso

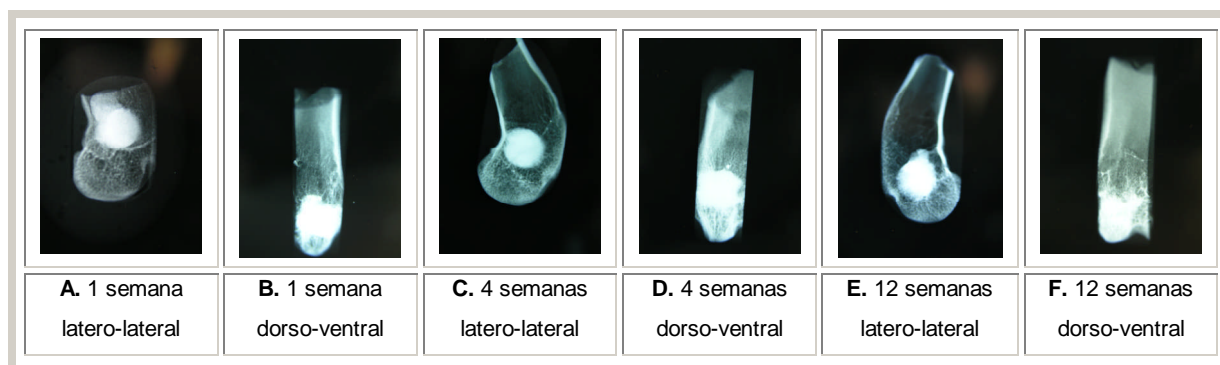


Figura 28: evolución radiológica del cemento denso a las semanas 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F)

Cemento denso	N (muestras)	Formación ósea	Remodelación
1 SEMANA	6	0	0
4 SEMANAS	6	0,16	0
12 SEMANAS	6	2	0,16

Tabla 21: valoración radiológica del cemento denso a las semanas 1, 4 y 12

Siguiendo los criterios de Lane y Sandhu constatamos que existe una neoformación ósea que comienza a las cuatro semanas y que progresa hacia las doce semanas, donde también encontramos cierta remodelación ósea. Por otro lado, es importante constatar que no existen fenómenos de osteolisis ni migración del material.

5.1.4. Cemento poroso

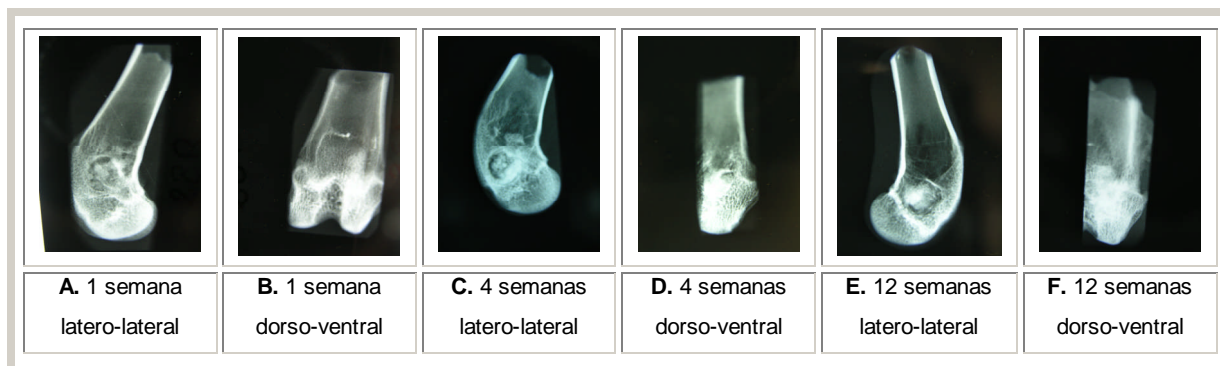


Figura 29: evolución radiológica del cemento poroso implantado a las semanas 1 (A y B), 4 (C y D) y 12 (E y F)

Cemento poroso	N (muestras)	Formación ósea	Remodelación
1 SEMANA	6	0	0
4 SEMANAS	6	1,16	0
12 SEMANAS	6	2,33	2

Tabla 22: valoración radiológica del cemento poroso a las semanas 1, 4 y 12

Respecto al cemento poroso, y siguiendo los criterios de Lane y Sandhu, podemos decir que la formación ósea comienza a las cuatro semanas, progresando hacia las doce semanas, donde también apreciamos cierta remodelación ósea. Tampoco existen fenómenos de osteolisis ni fracturas óseas.

5.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

5.2.1. Vidrio

5.2.1.1. Primera semana

5.2.1.1.1. Análisis cualitativo

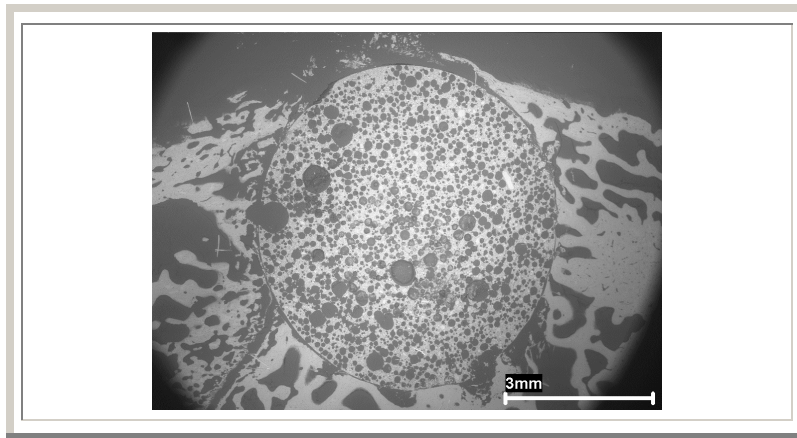


Figura 30: implante de vidrio tras una semana de la implantación

Observamos la estructura porosa del implante de vidrio y la nítida separación que existe respecto al tejido óseo que lo rodea, indicando la falta de una unión directa entre el biomaterial y el hueso.

5.2.1.1.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

En la tabla 23 se muestra el porcentaje de los principales elementos en las cuatro regiones objeto de estudio.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± ds)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	59,1 ± 0,76	58,79 ± 0,64	39,04 ± 0,34	37,78 ± 0,64
Calcio	6	30,57 ± 0,45	30,25 ± 0,37	54,57 ± 0,58	57,45 ± 1,29
Titanio	6	3,25 ± 0,04	3,22 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,00 ± 0
Magnesio	6	0	0	1,1 ± 0,03	1,21 ± 0,02
Ratio Calcio/Fósforo	6	0,52 ± 0,01	0,52 ± 0,01	1,4 ± 0,03	1,55 ± 0,05

Tabla 23: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Vidrio), B (Vidrio-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

En este momento, podemos destacar que el vidrio muestra un ratio calcio-fósforo muy inferior al del hueso. El titanio, un componente principal del mismo, aparece en una proporción elevada en el implante. Por último, otro dato importante es la ausencia de magnesio en el implante y su presencia en el hueso.

5.2.1.2. Cuarta semana

5.2.1.2.1. Análisis cualitativo

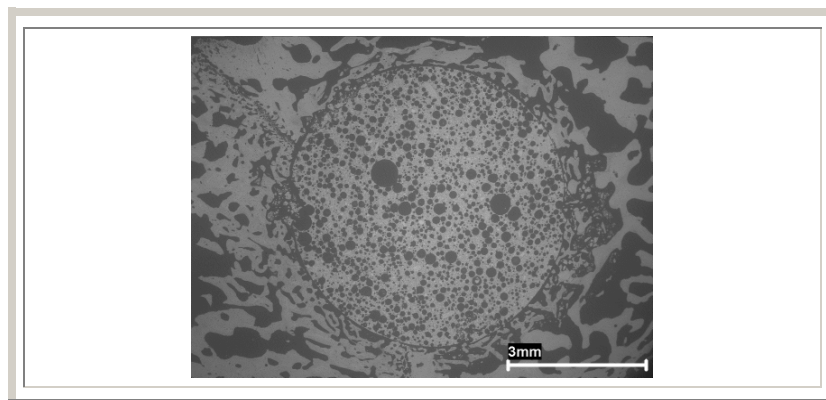


Figura 31: implante de vidrio a las cuatro semanas de la implantación

No apreciamos evolución con respecto al examen realizado en la primera semana. Se mantiene la misma porosidad y una marcada zona de interfase, sin existir unión directa entre el hueso y el implante. Podemos apreciar un aumento de densidad en la zona de hueso cerca de la interfase.

5.2.1.2.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

En la tabla 24 se indican los resultados obtenidos en los distintos lugares objeto de estudio a las cuatro semanas de la implantación.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± ds)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	59,2 ± 0,23	58,13 ± 0,62	38,68 ± 0,77	35,55 ± 2,97
Calcio	6	29,92 ± 0,1	30,5 ± 0,33	56,9 ± 1,12	60,23 ± 6,78
Titanio	6	3,23 ± 0,03	3,24 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0
Magnesio	6	0	0	0,82 ± 0,02	0,99 ± 0,06
Ratio Calcio/Fósforo	6	0,5 ± 0,01	0,52 ± 0,02	1,46 ± 0,02	1,65 ± 0,19

Tabla 24: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Vidrio), B (Vidrio-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

Apreciamos de nuevo la presencia de titanio dentro del implante, y de magnesio en el hueso. El ratio calcio/fósforo en el implante sigue manteniéndose alrededor de 0,5 y en el hueso, a medida que nos alejamos de la interfase, se multiplica su valor por tres, hasta alcanzar el valor normal en el hueso mineralizado (1,56-1,77).

5.2.1.3. Duodécima semana

5.2.1.3.1. Análisis cualitativo

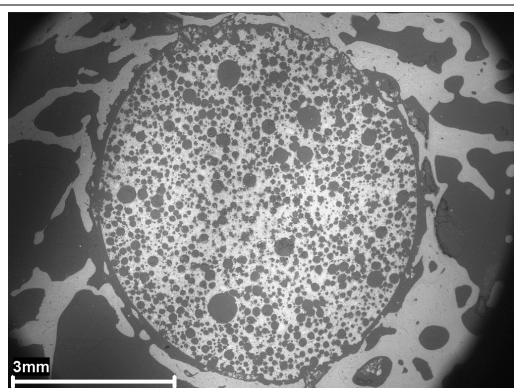


Figura 32: implante de vidrio a las doce semanas de la implantación

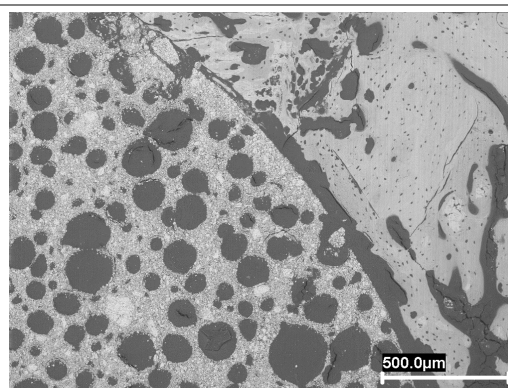


Figura 33: detalle de la zona de interfase entre el implante y el hueso

La imagen del implante obtenida mediante microscopía electrónica de barrido se mantiene muy similar respecto a la obtenida en la primera y cuarta semana. La diferencia fundamental que se observa es que hay zonas donde ya existe una unión directa. Otro dato importante es que se aprecia la remodelación ósea que ocurre en el hueso que rodea al vidrio.

5.2.1.3.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

En la tabla 25 aparecen reflejados los resultados obtenidos en los distintos lugares objeto de estudio a las doce semanas de la implantación.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± ds)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	58,49 ± 1,64	56,23 ± 0,35	37,64 ± 0,27	35,99 ± 0,93
Calcio	6	30,7 ± 0,79	31,92 ± 0,13	57,57 ± 0,79	59,89 ± 1,89
Titanio	6	3,32 ± 0,08	3,62 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0
Magnesio	6	0,08 ± 0,02	0,402 ± 0,01	0,96 ± 0,01	1,01 ± 0,04
Ratio Calcio/Fósforo	6	0,53 ± 0,01	0,57 ± 0,01	1,52 ± 0,06	1,66 ± 0,16

Tabla 25: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Vidrio), B (Vidrio-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

Se mantiene el ratio calcio/fósforo en la zona del implante y en el hueso con respecto a las semanas anteriores. El dato más significativo es la presencia de magnesio en el implante, aunque su proporción es muy inferior con respecto al valor medido en el hueso.

5.2.1.3.3. Comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio y del ratio calcio/fósforo

Los gráficos 1 y 2 muestran la evolución que sufren el magnesio y el ratio calcio/fósforo en el tiempo. Describimos estos dos parámetros porque son los que nos aportan una mayor información sobre la respuesta generada en el caso del vidrio.

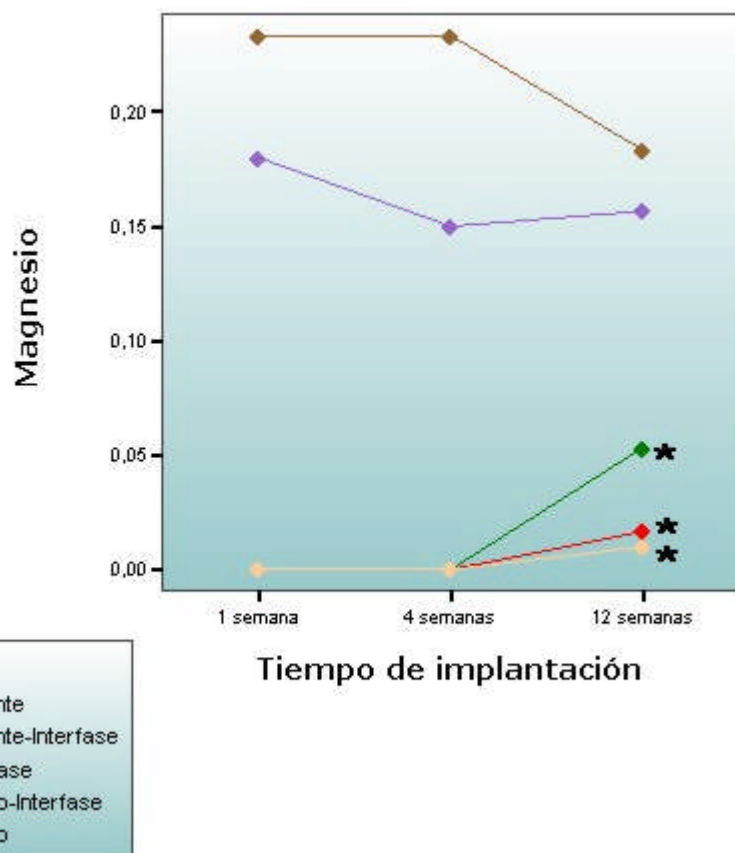


Gráfico 1: comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio en el vidrio

*: en estos tres puntos a las doce semanas encontramos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de magnesio ($p < 0,05$)

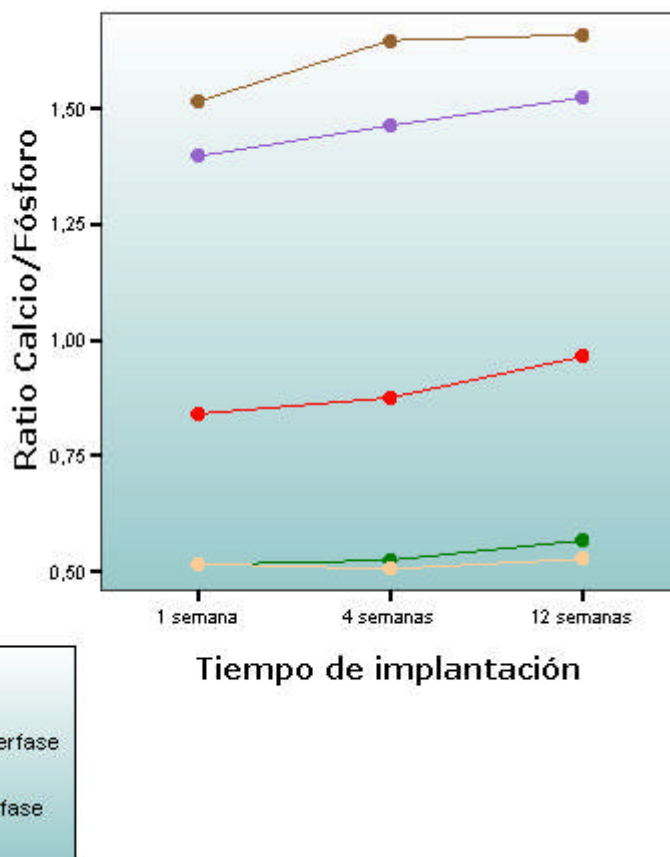


Gráfico 2: comparativa de la evolución en el tiempo del ratio calcio-fósforo en el vidrio

Estos gráficos ilustran la existencia de una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de magnesio a las doce semanas con respecto a la primera y cuarta semanas en:

- la zona central del defecto cavitario donde se encuentra el implante de vidrio.
- en la zona de implante cerca de la interfase.
- en la interfase.

Con respecto al ratio calcio/fósforo, vemos como va aumentando de manera progresiva, aunque sus valores no alcanzan diferencias estadísticamente significativas.

5.2.2. Control

5.2.2.1. Primera semana

5.2.2.1.1. Análisis cualitativo

Apreciamos el defecto cavitario creado y la aparición de pequeñas áreas trabeculares en el borde del mismo, que se corresponden con una pequeña proporción de hueso nuevo.

5.2.2.2. Cuarta semana

5.2.2.2.1. Análisis cualitativo

Seguimos apreciando el defecto cavitario y la remodelación ósea que han sufrido las áreas de tejido óseo inmaduro alrededor del mismo. Podemos observar dos zonas de crecimiento de tejido inmaduro, que en este caso se corresponden con las zonas de formación del cartílago, por lo que no son de nuestro interés.

5.2.2.3. Duodécima semana

5.2.2.3.1. Análisis cualitativo

Se mantiene el defecto cavitario vacío y, por otro lado, el hueso que se estaba remodelando alrededor del mismo muestra ya la apariencia de hueso maduro.

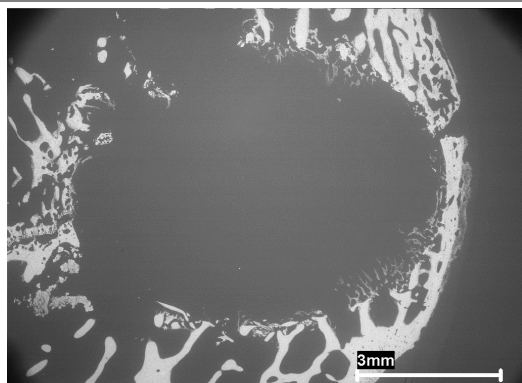


Figura 34: control a la semana de implantación

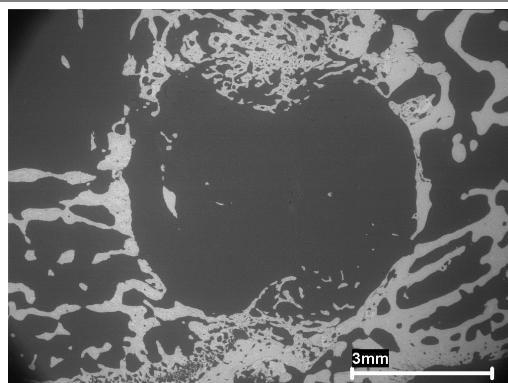


Figura 35: control a las 4 semanas de implantación

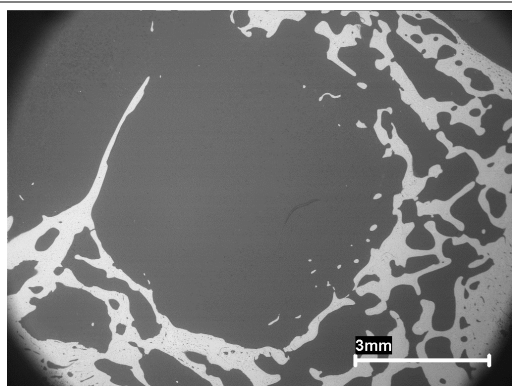


Figura 36: control a las doce semanas de implantación

5.2.3. Cemento denso

5.2.3.1. Primera semana

5.2.3.1.1. Análisis cualitativo

Podemos observar el implante de cemento denso, que rellena completamente el defecto cavitario e incluso fluye fuera del mismo. La zona de interfase se caracteriza por existir una clara respuesta del hueso que rodea al implante, indicando su claro potencial osteogénico.

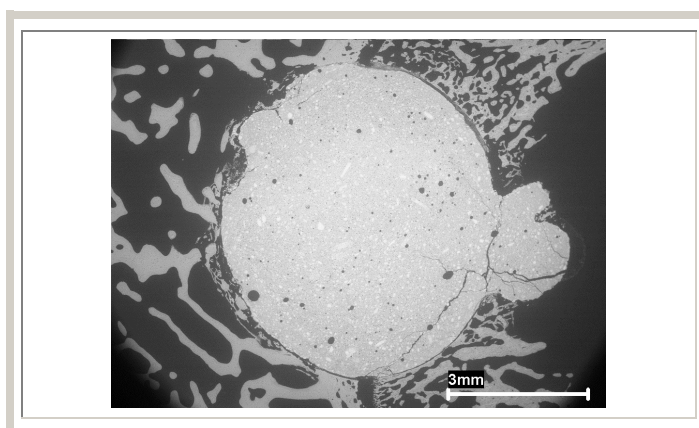


Figura 37: cemento denso a la semana de implantación

5.2.3.1.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

La tabla 26 muestra los resultados obtenidos en los distintos lugares objeto de estudio a la semana de la implantación.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± desviación estándar)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	40,55 ± 0,22	37,93 ± 1,14	37,76 ± 0,11	37,66 ± 0,87
Calcio	6	55,92 ± 0,47	57,98 ± 2,06	57,72 ± 0,38	57,03 ± 2,12
Titanio	6	0	0	0	0
Magnesio	6	0,51 ± 0,02	0,87 ± 0,02	1,01 ± 0,2	1,21 ± 0,01
Ratio Calcio/Fósforo	6	1,38 ± 0,51	1,52 ± 0,09	1,50 ± 0,06	1,59 ± 0,17

Tabla 26: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Vidrio), B (Vidrio-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

Podemos destacar la presencia de magnesio dentro del implante, cuya proporción aumenta a medida que nos aproximamos al hueso. El ratio calcio/fósforo del cemento denso aumenta a medida que nos acercamos a la zona de interfase, donde se iguala al valor obtenido en el hueso.

5.2.3.2. Cuarta semana

5.2.3.2.1. Análisis cualitativo

Apreciamos el crecimiento del hueso hacia el interior del implante, simultáneo a la reabsorción del cemento denso, y la unión directa que se establece entre el hueso y el implante, sin existir zona de interfase.

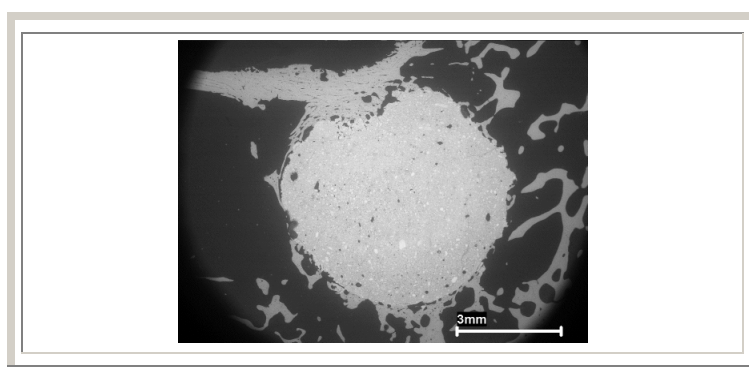


Figura 38: cemento denso a las 4 semanas de implantación

5.2.3.2.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

En la tabla 27 se muestran los resultados obtenidos en los distintos lugares objeto de estudio a las 4 semanas de la implantación.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± desviación estándar)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	39,95 ± 0,71	38,08 ± 0,33	37,36 ± 0,65	37,35 ± 1,19
Calcio	6	57,1 ± 1,00	58,21 ± 0,54	57,56 ± 0,86	58,43 ± 1,8
Titanio	6	0	0	0	0
Magnesio	6	0,41 ± 0,01	0,89 ± 0,01	1,038 ± 0,02	1,15 ± 0,01
Ratio Calcio/Fósforo	6	1,43 ± 0,01	1,53 ± 0,04	1,54 ± 0,03	1,56 ± 0,01

Tabla 27: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Vidrio), B (Vidrio-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

El ratio calcio/fósforo del implante se incrementa con relación a la primera semana, pero sigue manteniéndose ligeramente inferior al hueso, aumentando a medida que nos acercamos a él; del mismo modo, se conserva el porcentaje de magnesio en el centro del implante, que también aumenta al irnos acercando al hueso.

5.2.3.3. Duodécima semana

5.2.3.3.1. Análisis cualitativo

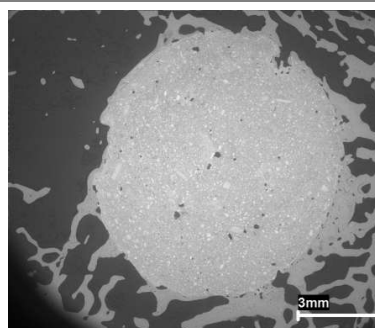


Figura 39: implante de cemento denso a las doce semanas de la implantación

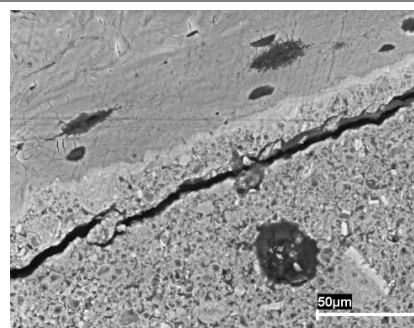


Figura 40: detalle de la zona de unión entre el implante y el hueso

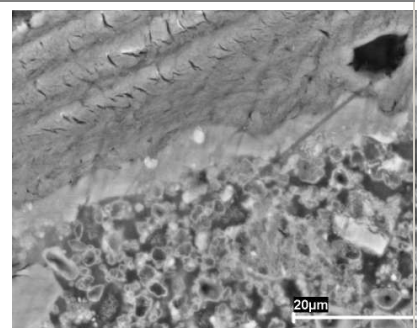


Figura 41: detalle de la zona de unión entre el implante y el hueso

La imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido muestra la unión directa del implante con el hueso, y el solapamiento entre el crecimiento de hueso y la reabsorción del implante, que va actuando de molde. A más aumentos podemos apreciar la estructura del cemento denso y la remodelación que tuvo lugar en el hueso inmaduro, dando lugar a un tejido óseo maduro; también apreciamos como la zona de unión entre hueso e implante (10 µm) es de un color más claro.

5.2.3.3.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

En la tabla 28 se recogen los resultados obtenidos en los lugares objeto de estudio a las 12 semanas de la implantación.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± desviación estándar)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	35,56 ± 0,59	38,02 ± 0,31	36,08 ± 0,68	35,72 ± 0,76
Calcio	6	57,29 ± 0,74	58,28 ± 0,67	60,12 ± 1,32	60,49 ± 1,7
Titanio	6	0	0	0	0
Magnesio	6	0,49 ± 0,02	0,89 ± 0,03	1,01 ± 0,01	1,05 ± 0,02
Ratio Calcio/Fósforo	6	1,45 ± 0,03	1,53 ± 0,06	1,66 ± 0,03	1,68 ± 0,07

Tabla 28: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Vidrio), B (Vidrio-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

Las proporciones de los diferentes minerales se mantienen con respecto a la primera y cuarta semana; el ratio calcio/fósforo del implante aumenta ligeramente, pero no se iguala al del hueso.

5.2.3.3.3. Comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio y del ratio calcio/fósforo

Los gráficos 3 y 4 muestran la evolución que sufren el magnesio y el ratio calcio/fósforo en el tiempo. Como anteriormente, estos dos parámetros nos aportan una gran información sobre la respuesta ósea generada por el cemento denso.

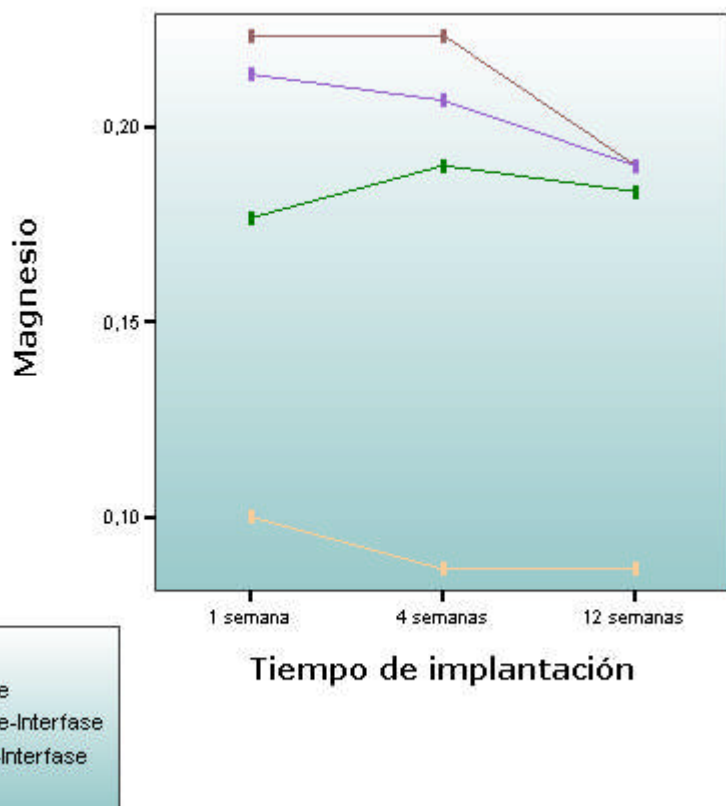
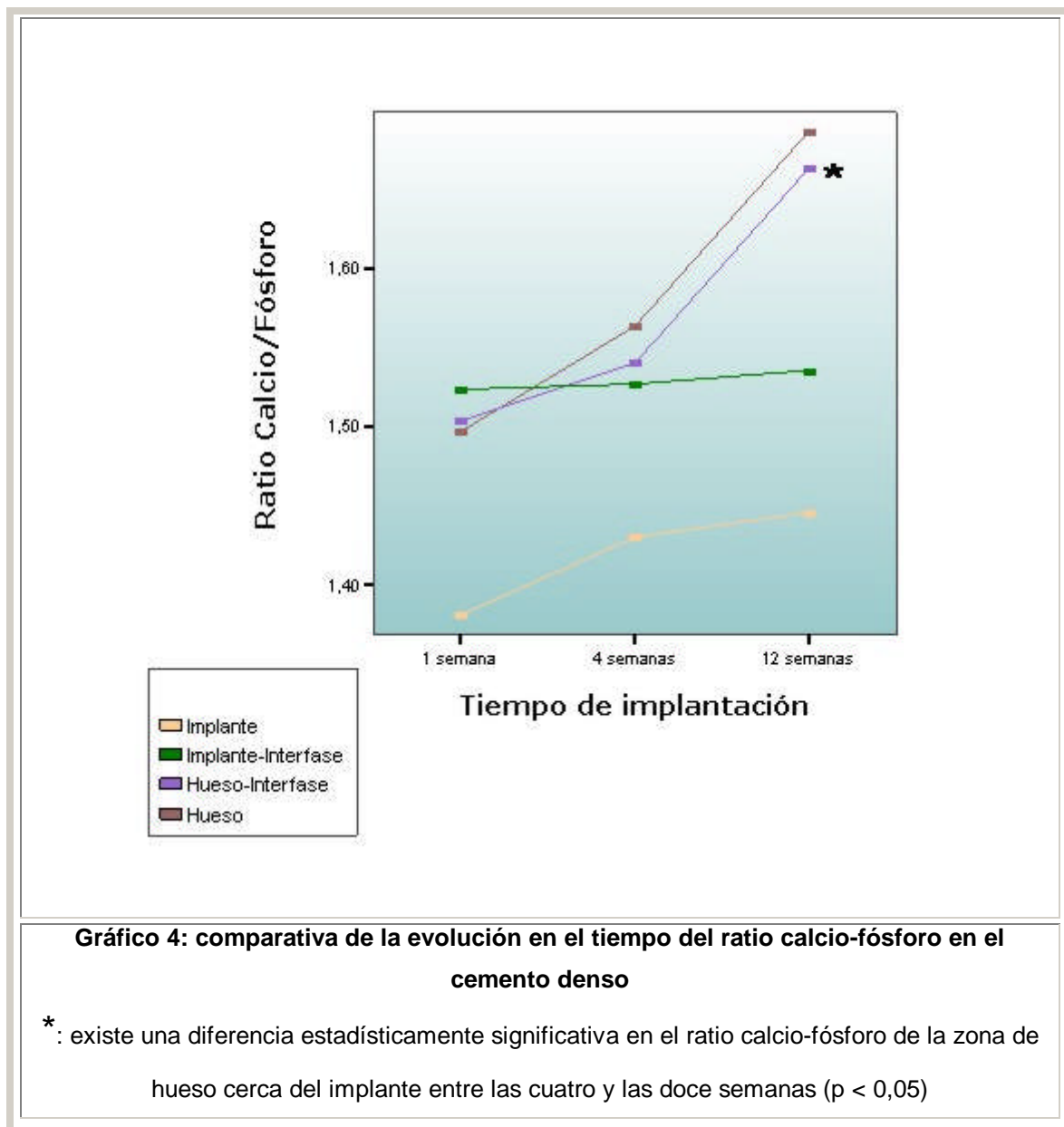


Gráfico 3: comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio en el cemento denso



Estos gráficos nos ayudan a mostrar la evolución del magnesio a lo largo del estudio, desde la primera hasta la duodécima semana. Vemos que, en el caso del cemento denso, este mineral se encuentra presente desde los primeros momentos del ensayo y se mantiene constante a lo largo del mismo. Respecto

al ratio calcio/fósforo, apreciamos un aumento progresivo en todas las zonas, que se hace estadísticamente significativo en la zona de hueso cercana al implante entre las cuatro y doce semanas.

5.2.4. Cemento poroso

5.2.4.1. Primera semana

5.2.4.1.1. Análisis cualitativo

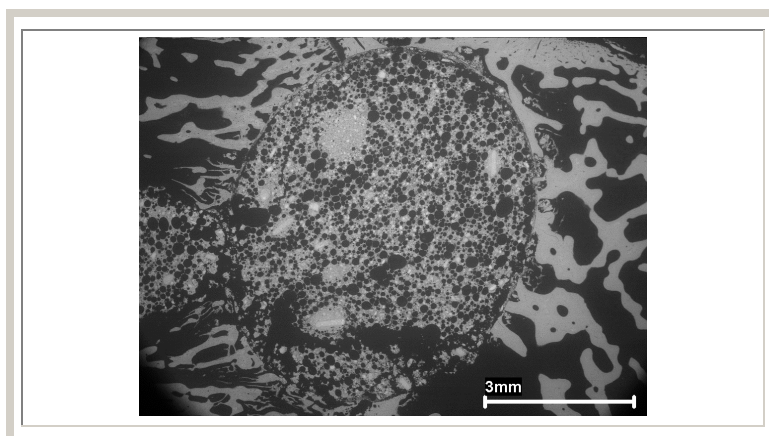


Figura 42: cemento poroso a la semana de la implantación

Apreciamos la estructura porosa del cemento, que ocupa totalmente el defecto cavitario. También podemos observar la capacidad osteogénica del implante, reflejada en la rápida respuesta que vemos en el tejido óseo que rodea al cemento.

5.2.4.1.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

La tabla 29 recoge los resultados obtenidos en los lugares objeto de estudio a la semana de la implantación.

Elementos	N (n° muestras)	% Atómico (Media ± desviación estándar)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	39,73 ± 0,62	40,03 ± 1,13	37,8 ± 0,37	38,36 ± 0,44
Calcio	6	54,96 ± 0,79	54,19 ± 1,66	57,56 ± 0,41	57,3 ± 0,41
Titanio	6	0	0	0	0
Magnesio	6	0,68 ± 0,01	1,16 ± 0,04	0,92 ± 0,01	1,16 ± 0,03
Ratio Calcio/Fósforo	6	1,38 ± 0,01	1,35 ± 0,05	1,52 ± 0,06	1,49 ± 0,04

Tabla 29: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Cemento poroso), B (Cemento poroso-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

Observamos el ratio calcio/fósforo, ligeramente inferior al del hueso pero superior al del cemento denso, y la presencia de magnesio, cuyo porcentaje aumenta a medida que nos acercamos al hueso.

5.2.4.2. Cuarta semana

5.2.4.2.1. Análisis cualitativo

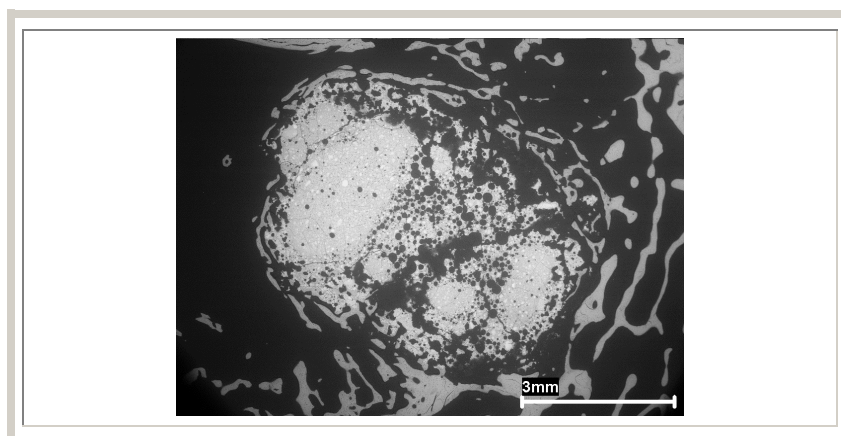


Figura 43: cemento poroso a las cuatro semanas de la implantación

Apreciamos la reabsorción del implante y la formación de hueso nuevo inmaduro. El implante se va reabsorbiendo de forma centrípeta, manteniéndose dos núcleos, llamados semillas, donde la densidad del material no varía. Debemos destacar que la reabsorción del implante es muy rápida, de forma que el espacio que deja libre no es ocupado totalmente por hueso. Por otro lado, la unión entre material y hueso es directa, sin existencia de interfase.

5.2.4.2.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

En la tabla 30 vemos los resultados obtenidos en los lugares objeto de estudio a las 4 semanas de la implantación.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± desviación estándar)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	39,65 ± 0,2	38,63 ± 0,84	37,14 ± 1,06	37,21 ± 0,72
Calcio	6	56,69 ± 0,33	57,97 ± 1,33	58,79 ± 2,17	58,87 ± 1,67
Titanio	6	0	0	0	0
Magnesio	6	0,62 ± 0,01	0,88 ± 0,01	1,06 ± 0,4	1,13 ± 0,02
Ratio Calcio/Fósforo	6	1,43 ± 0,01	1,52 ± 0,05	1,57 ± 0,07	1,57 ± 0,08

Tabla 30: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Cemento poroso), B (Cemento poroso-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

Observamos que el ratio calcio/fósforo es ligeramente superior al de la primera semana, aunque no se iguala al hueso, y la presencia de magnesio, que, como en los casos anteriores, aparece en mayor cantidad en el tejido óseo.

5.2.4.3. Duodécima semana

5.2.4.3.1. Análisis cualitativo

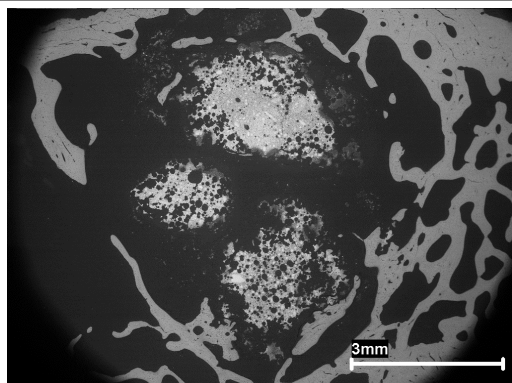


Figura 44: cemento poroso a las doce semanas de la implantación

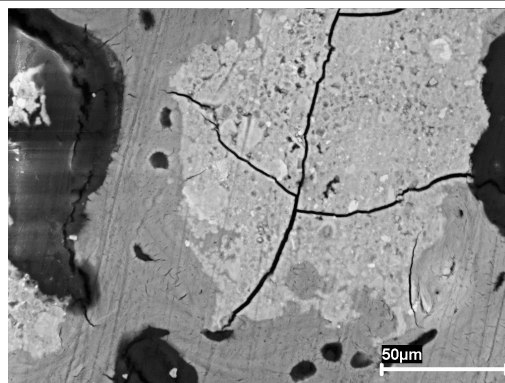


Figura 45: detalle de la unión íntima entre cemento poroso y hueso

Podemos constatar la rápida reabsorción que tiene lugar en el cemento poroso, y la formación y remodelación de hueso que ocurre de forma centrípeta, aunque a una velocidad más lenta que la reabsorción. También es importante destacar la unión directa que ocurre entre implante y hueso.

5.2.4.3.2. Análisis semicuantitativo (EDX)

La tabla 31 muestra los resultados obtenidos en los lugares objeto de estudio a las 12 semanas de la implantación.

Elementos	N (nº muestras)	% Atómico (Media ± desviación estándar)			
		A	B	C	D
Fósforo	6	39,18 ± 0,98	37,72 ± 0,32	37,87 ± 0,03	37,68 ± 0,15
Calcio	6	57,42 ± 1,33	58,4 ± 0,77	59,58 ± 0,11	57,56 ± 0,5
Titanio	6	0	0	0	0
Magnesio	6	0,6 ± 0,02	0,88 ± 0,03	1,1 ± 0,01	1,28 ± 0,03
Ratio Calcio/Fósforo	6	1,46 ± 0,03	1,54 ± 0,05	1,57 ± 0,02	1,52 ± 0,05

Tabla 31: porcentaje atómico (media ± desviación estándar) de los diferentes elementos que aparecen en las zonas: A (Cemento poroso), B (Cemento poroso-interfase), C (Hueso-interfase) y D (Hueso)

En este momento del estudio el dato más destacable es el ratio calcio/fósforo, que continúa incrementándose aunque todavía se mantiene ligeramente inferior al del hueso.

5.2.4.3.3. Comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio y del ratio calcio/fósforo

Los gráficos 5 y 6 muestran la evolución del magnesio y del ratio calcio/fósforo a lo largo del tiempo. Estos dos parámetros, como en los casos anteriores, nos aportan una gran información sobre la respuesta generada, en este caso, en el cemento poroso.

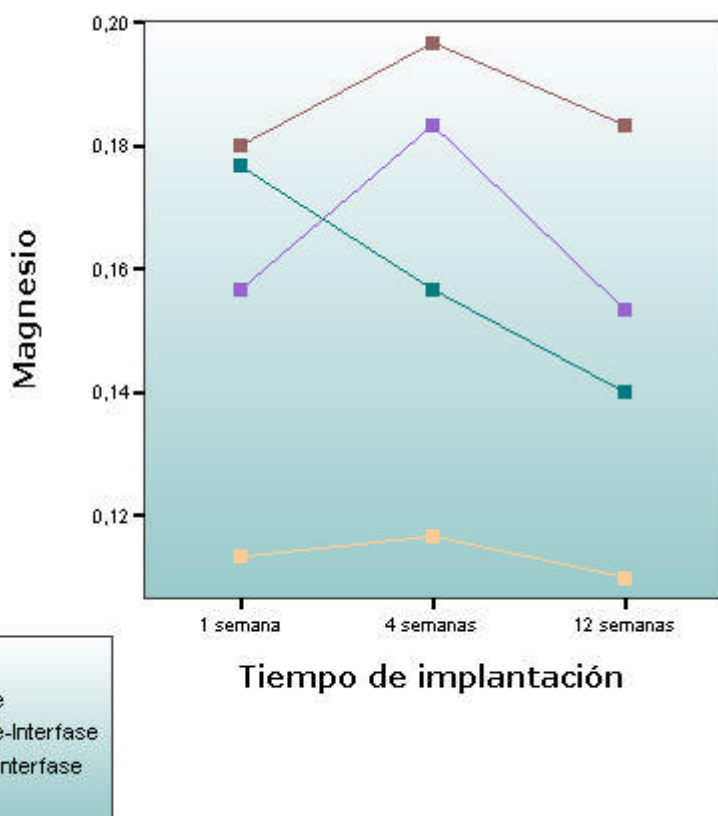


Gráfico 5: comparativa de la evolución en el tiempo de la concentración de magnesio en el cemento poroso

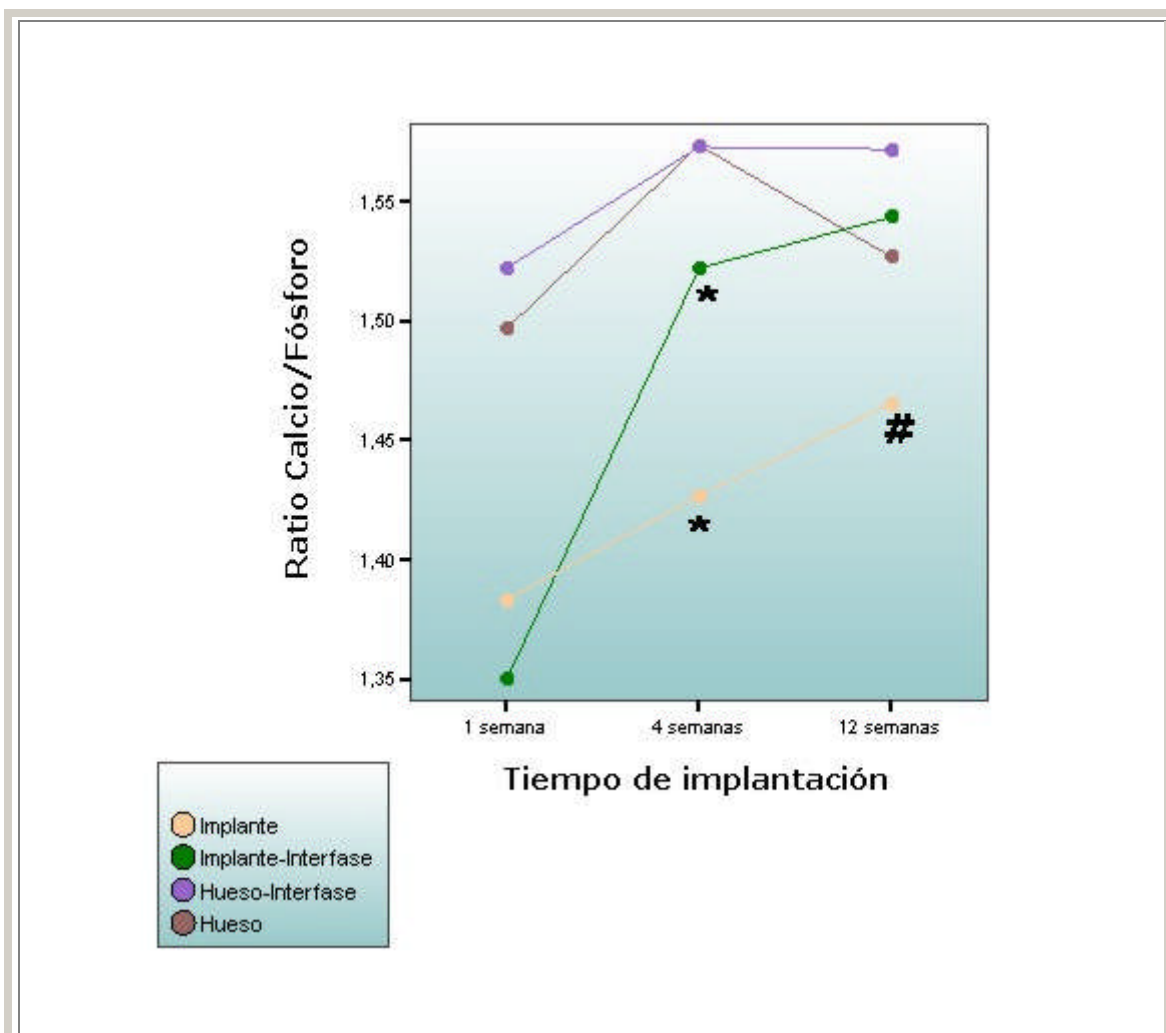


Gráfico 6: comparativa de la evolución en el tiempo del ratio calcio-fósforo en el cemento poroso

*: existe una diferencia estadísticamente significativa en el ratio calcio-fósforo de la zona del implante y del implante cerca de la interfase entre la semana y las cuatro semanas ($p < 0,05$).

#: existe una diferencia estadísticamente significativa en el ratio calcio-fósforo medido en la zona del implante entre las cuatro y doce semanas

Los dos gráficos anteriores muestran la evolución del magnesio y del ratio calcio/fósforo a lo largo del estudio. En el gráfico 5 vemos como el magnesio

está presente en todas las zonas desde el comienzo del estudio y sus valores se mantienen más o menos constantes. En el gráfico 6 apreciamos el aumento del ratio calcio/fósforo en el tiempo, que se hace estadísticamente significativo en la zona del implante y del implante cerca de la interfase entre la primera y cuarta semana, y en el implante entre la cuarta y duodécima semana.

5.3. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO

5.3.1. Comparativa en el tiempo de los diferentes materiales y control

5.3.1.1. Vidrio

Vidrio	N (nº muestras)	Media ± desviación estándar		
		1 semana	4 semanas	12 semanas
Área implante (mm ²)	6	28,27 ± 0,00	28,27 ± 0,00	28,27 ± 0
Área trabecular total (mm ²)	6	11,31 ± 1,38	12,87 ± 0,99	15,13* ± 0,91
Profundidad de crecimiento (mm)	6	0	0	0
Longitud total de osteoide (µm)	6	0	0	0
Amplitud media de osteoide (µm)	6	0	0	0
Área de biomaterial no reabsorbido (mm ²)	6	28,27	28,27	28,27
Superficie porcentual de hueso neoformado (%)	6	0	0	0
Área de osteoide (µm ²)	6	0	0	0
Relación área de osteoide/área trabecular total (%)	6	0	0	0

Tabla 32: resultados histomorfométricos obtenidos en el implante de vidrio a la semana 1, 4 y 12 de la implantación. (* = p < 0,05)

En la tabla anterior podemos observar un aumento progresivo en el área trabecular total del hueso que rodea al implante, siendo este incremento estadísticamente significativo a las doce semanas; esto demuestra la existencia

de una adecuada remodelación ósea en esa zona; sin embargo, no se aprecia reabsorción del implante ni crecimiento del hueso dentro del mismo indicando la pobre o nula capacidad osteoconductora del implante.

5.3.1.2. Control

Control	N (nº muestras)	Media ± desviación estándar		
		1 semana	4 semanas	12 semanas
Área implante (mm ²)	6	28,27 ± 0,00	28,27 ± 0,00	28,27 ± 0,00
Área trabecular total (mm ²)	6	9,39 ± 0,92	11,65 ± 0,75	14,37 ± 0,59
Profundidad de crecimiento (mm)	6	0	0	0
Longitud total de osteoide (µm)	6	0	0	0
Amplitud media de osteoide (µm)	6	0	0	0
Área de biomaterial no reabsorbido (mm ²)	6	0	0	0
Superficie porcentual de hueso neoformado (%)	6	0	0	0
Área de osteoide (µm ²)	6	0	0	0
Relación área de osteoide/área trabecular total (%)	6	0	0	0

Tabla 33: resultados histomorfométricos obtenidos en el control a la semana 1, 4 y 12 de la implantación

Como en el caso anterior, apreciamos un aumento de densidad del hueso que rodea al defecto cavitario, que en este caso no es estadísticamente significativo en ningún momento, debido a la remodelación que tiene lugar en él; la profundidad de crecimiento del hueso dentro del control es nula, lo que revela que no existe una curación ósea espontánea.

5.3.1.3. Cemento denso

Cemento denso	N (nº muestras)	Media ± desviación estándar		
		1 semana	4 semanas	12 semanas
Área implante (mm ²)	6	28,27 ± 0,0	28,27 ± 0,00	28,27 ± 0,00
Área trabecular total (mm ²)	6	13,72 ± 0,61	13,76 ± 1,42	14,15 ± 1,5
Profundidad de crecimiento (mm)	6	0	0,53 ± 0,26	0,67 ± 0,23
Longitud total de osteoide (µm)	6	0	7835,67* ± 1276,58	11437,5* ± 1097,36
Amplitud media de osteoide (µm)	6	0	5,17 ± 1,26	5,97 ± 1,59
Área de biomaterial no reabsorbido (mm ²)	6	28,27	27,67* ± 2,95	27,23* ± 3,05
Superficie porcentual de hueso neoformado (%)	6	0	48,6515 ± 5,03	50,03 ± 5,3
Área de osteoide (µm ²)	6	0	41793,83 ± 16155,5	51319,75 ± 28907,3
Relación área de osteoide/área trabecular total (%)	6	0	0,31* ± 0,12	0,49* ± 0,16

Tabla 34: resultados histomorfométricos obtenidos en el cemento denso a la semana 1, 4 y 12 de la implantación (* = p < 0,05)

Podemos señalar que, aunque a la primera semana no existe aún actividad osteoblástica, a las cuatro semanas ya observamos un crecimiento

estadísticamente significativo del hueso dentro del implante, y a las doce semanas continúa aumentando este índice aunque la diferencia carece de significación estadística con respecto a la cuarta semana. En relación a la reabsorción del implante, tanto a las cuatro como a las doce semanas, el área de biomaterial no reabsorbido disminuye progresivamente, y la superficie total de hueso neoformado aumenta significativamente a las cuatro y a las doce semanas en relación a la primera semana de la implantación, lo que indica la capacidad osteogénica y osteoconductora del implante. También es significativo el aumento de la longitud total de osteoide en cada momento del estudio, y la amplitud media de osteoide, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre la primera semana y los otros dos momentos en que se desarrolló este trabajo. El incremento de la relación entre el área de osteoide y el área trabecular total adquiere significación estadística entre la primera semana y los otros dos momentos del estudio respectivamente, lo que indica un incremento en la calcificación del hueso en relación a la neoformación ósea que tiene lugar.

5.3.1.4. Cemento poroso

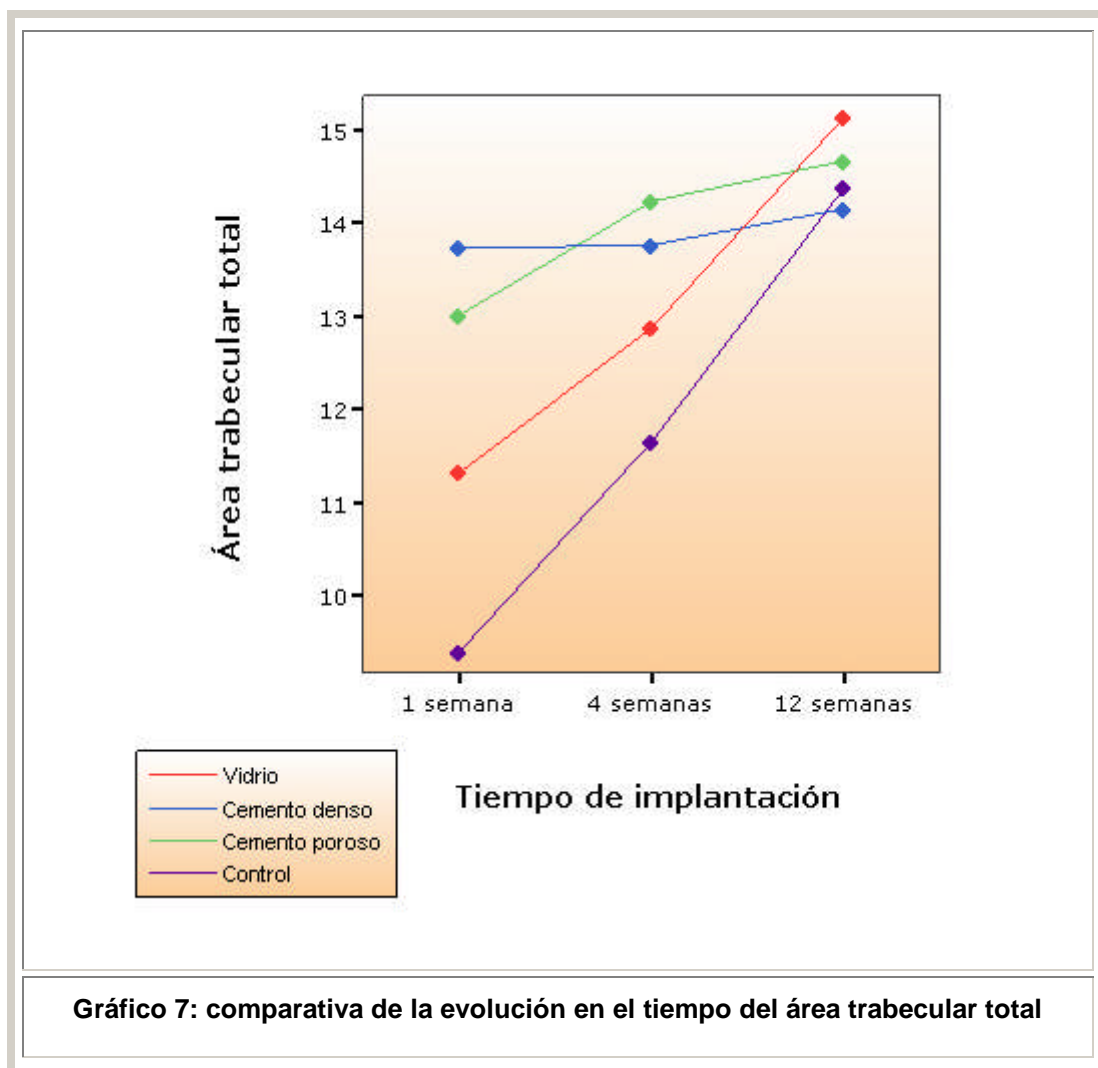
La tabla 35 muestra los resultados histomorfométricos obtenidos para el cemento poroso en cada momento del estudio.

Cemento poroso	N (nº muestras)	Media ± desviación estándar		
		1 semana	4 semanas	12 semanas
Área implante (mm ²)	6	28,2740 ± 0	28,27 ± 0,00	28,27 ± 0
Área trabecular total (mm ²)	6	13,0063 ± 0,26	14,23 ± 1,49	14,66 ± 1,7
Profundidad de crecimiento (mm)	6	0*	0,91* ± 0,75	1,22* ± 0,09
Longitud total de osteoide (µm)	6	0	9214,83* ± 1135,9	12050,5* ± 1352,4
Amplitud media de osteoide (µm)	6	0	5,33* ± 0,6	6,31* ± 1,53
Área de biomaterial no reabsorbido (mm ²)	6	28,27	12,49* ± 2,39	9,04* ± 1,34
Superficie porcentual de hueso neoformado (%)	6	0	50,31 ± 5,27	56,84 ± 6,02
Área de osteoide (µm ²)	6	0	496,9* ± 10579,1	76748,67* ± 24612,3
Relación área de osteoide/área trabecular total (%)	6	0	0,35* ± 0,08	0,5150* ± 0,1

Tabla 35: resultados histomorfométricos obtenidos en el cemento poroso a la semana 1, 4 y 12 de la implantación (* = p < 0,05)

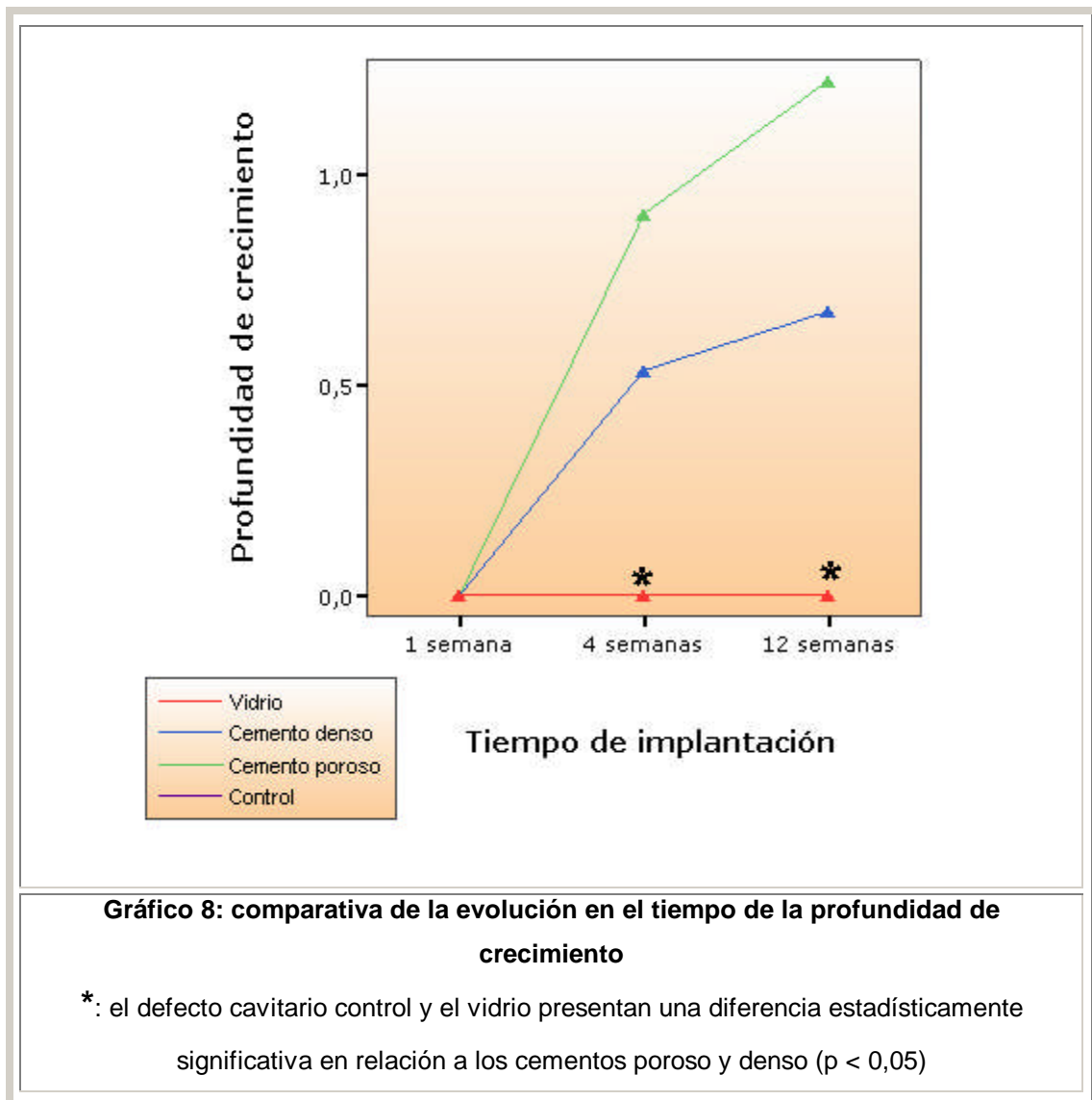
Podemos destacar un aumento progresivo y sin significación estadística en el área trabecular total desde la primera semana hasta el final del estudio. Por otro lado, la cantidad de cemento, expresado como área de biomaterial no reabsorbido, mostró un descenso estadísticamente significativo durante todo el desarrollo del trabajo, lo que muestra la capacidad de reabsorción del implante de cemento poroso, mientras que la superficie porcentual de hueso neoformado aumentó de forma estadísticamente significativa entre la primera y la cuarta semana, mostrando un ligero aumento a las doce semanas sin significación estadística con respecto a la cuarta semana. La profundidad de crecimiento aumentó de forma significativa en todos los tiempos en que se desarrolló este estudio. Esto revela el efecto osteotransductivo del cemento poroso. Respecto a la amplitud media de osteoide, existe un aumento estadísticamente significativo entre la primera semana y la cuarta y duodécima, y la longitud total de osteoide aumenta de forma significativa durante todo el estudio, al igual que el área de osteoide y la relación entre el área de osteoide y el área trabecular total. Esto demuestra la capacidad osteoconductora del implante y la neoformación ósea que produce.

5.3.2. Comparativa de la evolución en el tiempo entre los distintos materiales

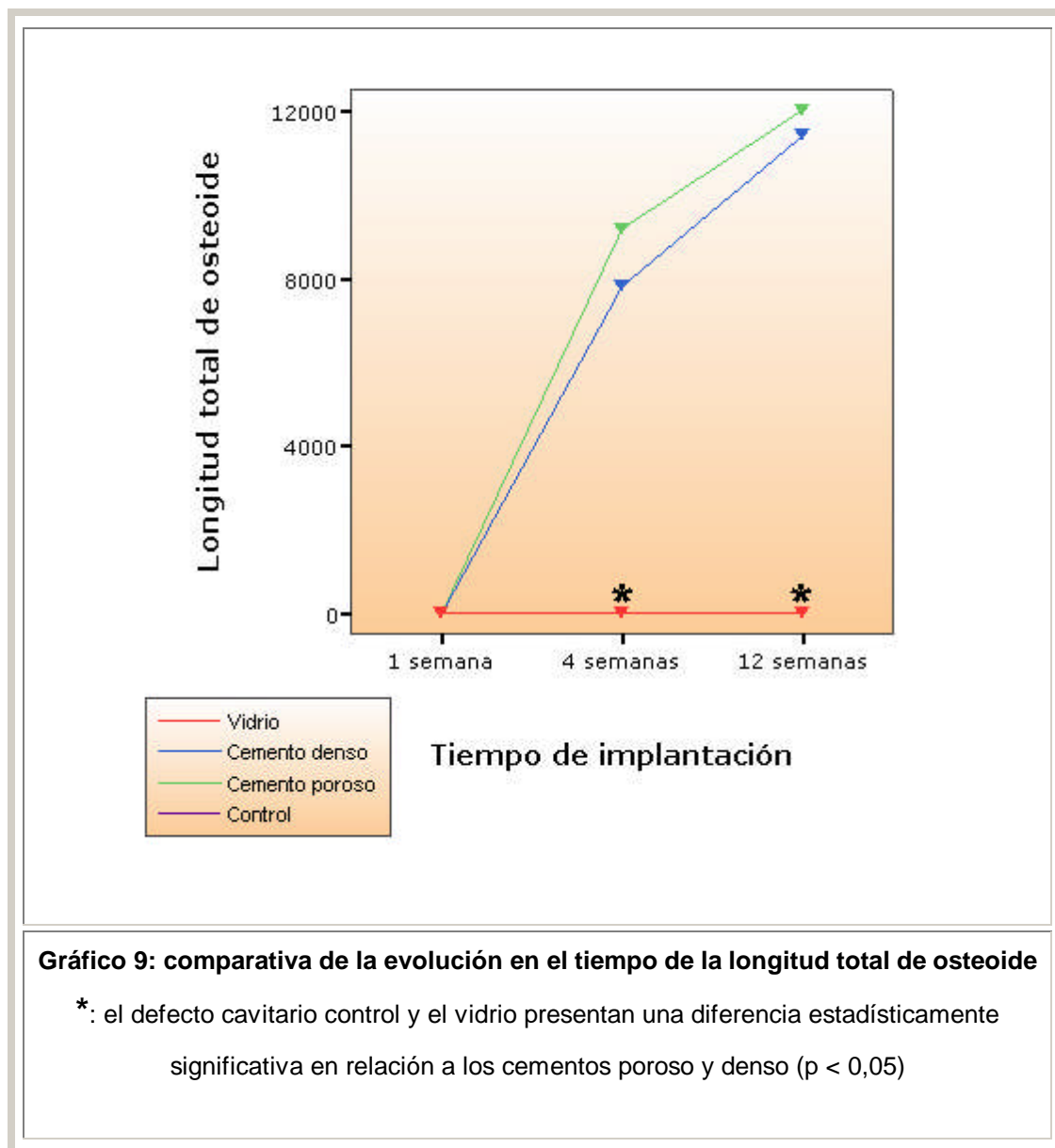


Podemos observar una evolución en el **área trabecular total** en todos los biomateriales y el control desde la primera semana de estudio; aunque en un

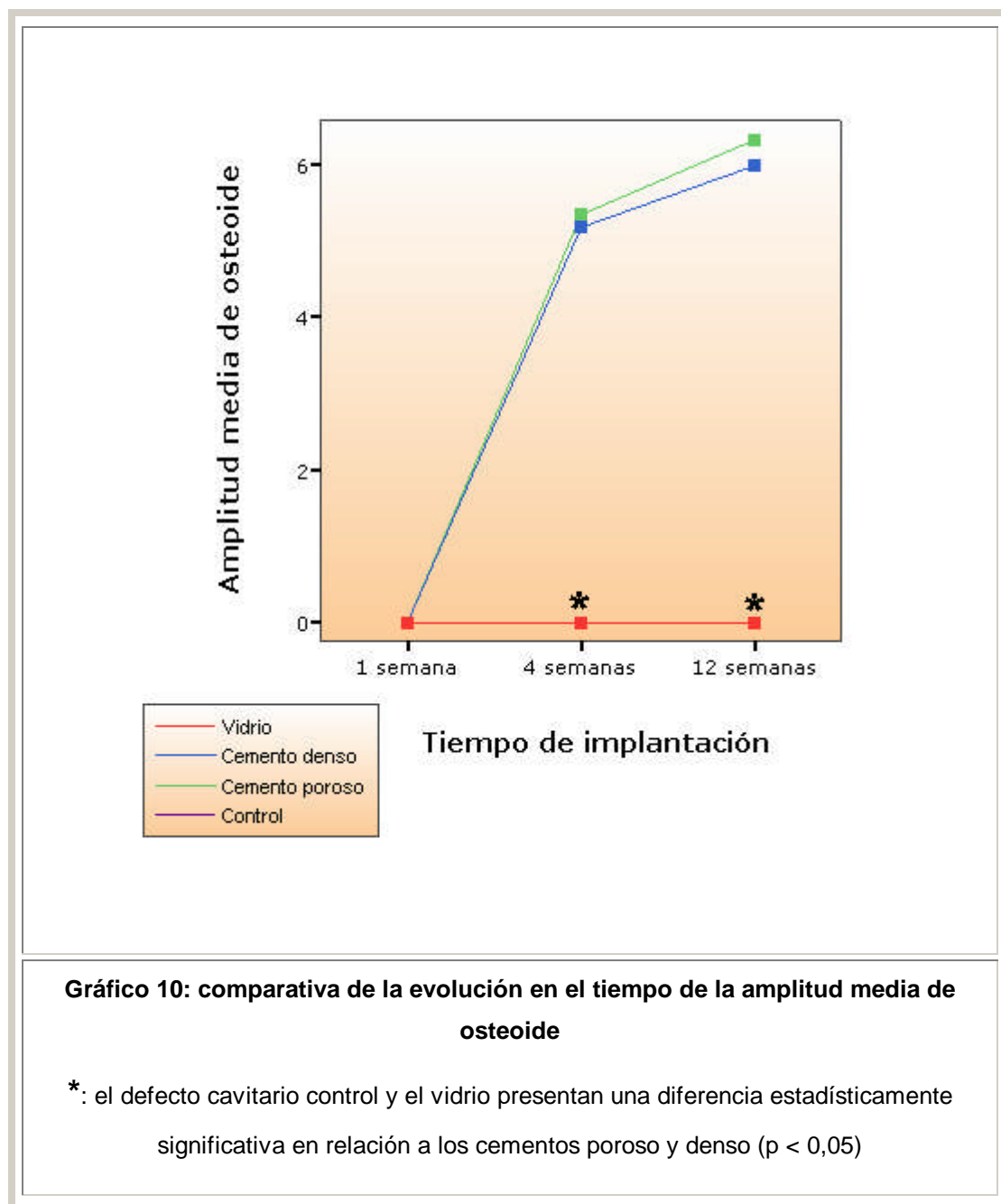
primer momento los cementos manifiestan un valor superior, este parámetro se va igualando en el tiempo. En ningún caso las diferencias son estadísticamente significativas.



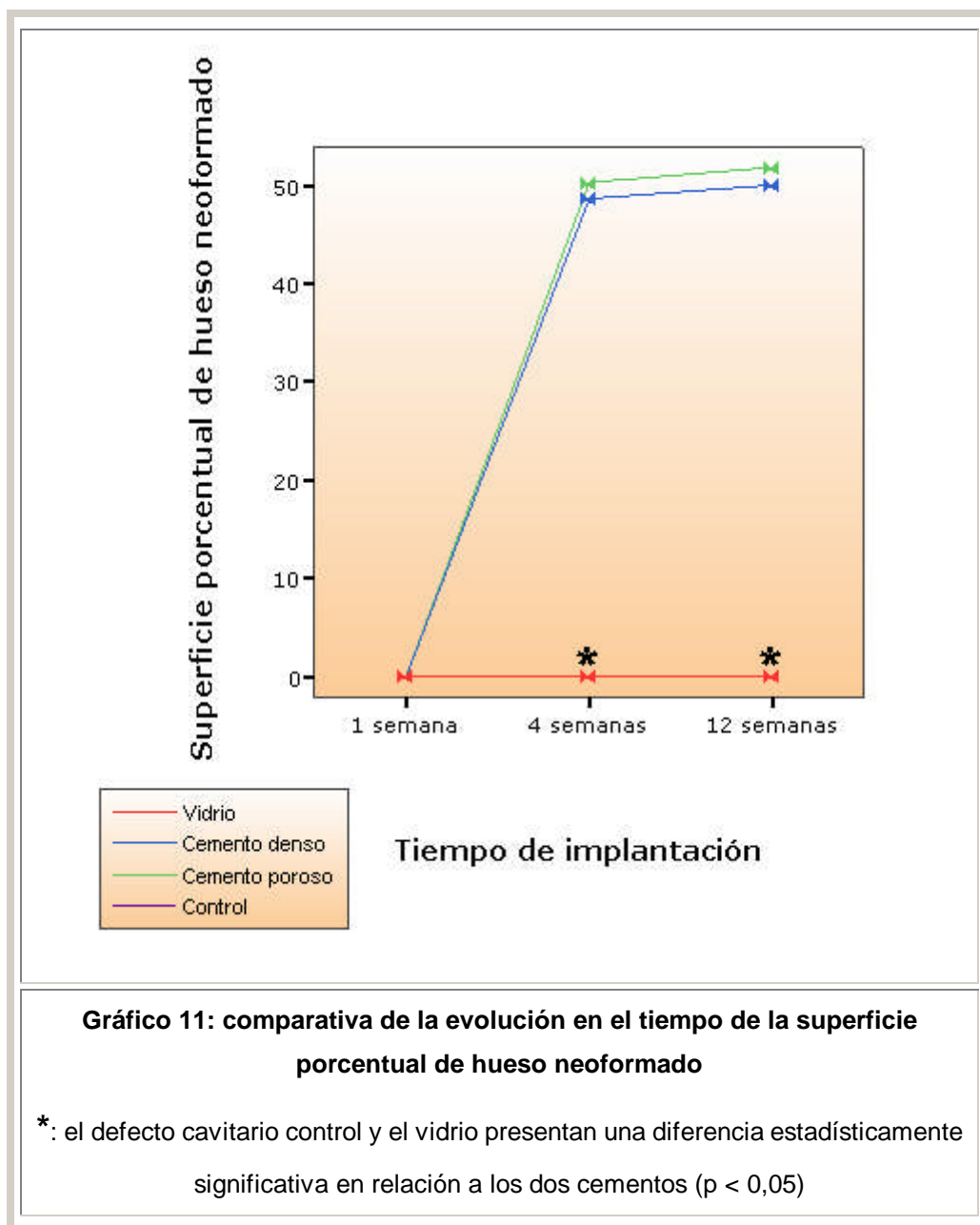
Subrayamos la diferencia estadísticamente significativa existente entre el vidrio y el control por un lado, y los dos cementos por el otro. En este sentido, vemos que en el vidrio y control la **profundidad de crecimiento** es nula durante todo el estudio, mientras que en los cementos aumenta progresivamente.



Los dos cementos presentan un aumento muy parejo en la **longitud total de osteoide** a lo largo del tiempo, existiendo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al vidrio y al control, que no muestran esta evolución.



Se aprecia un aumento progresivo de la **amplitud media de osteoide** en el caso de los cementos poroso y denso, que muestran a su vez una diferencia estadísticamente significativa respecto al vidrio y control.



Respecto a la **superficie porcentual de hueso neoformado** hay dos grupos:

- vidrio y control, que no muestran aumento en el tiempo.
- los cementos, que muestran un aumento estadísticamente significativo respecto a los anteriores a lo largo del estudio.

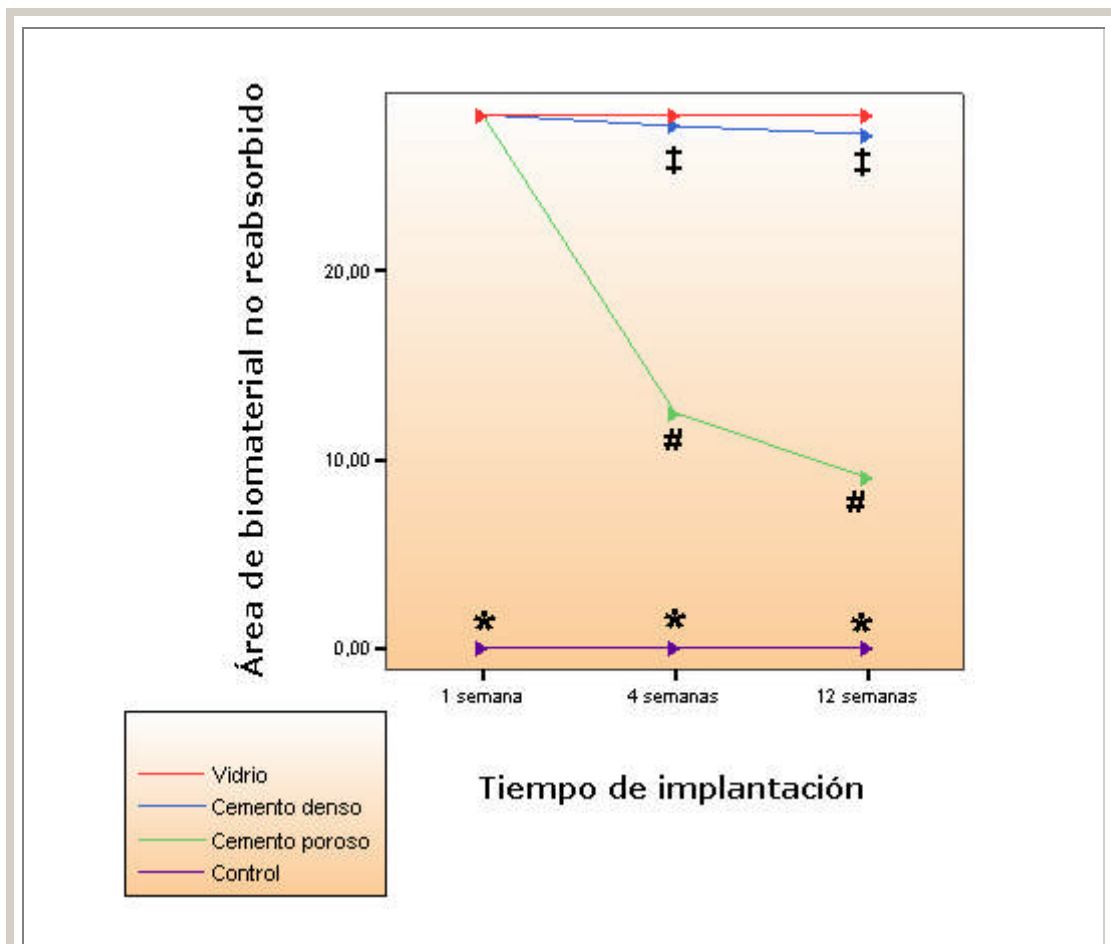
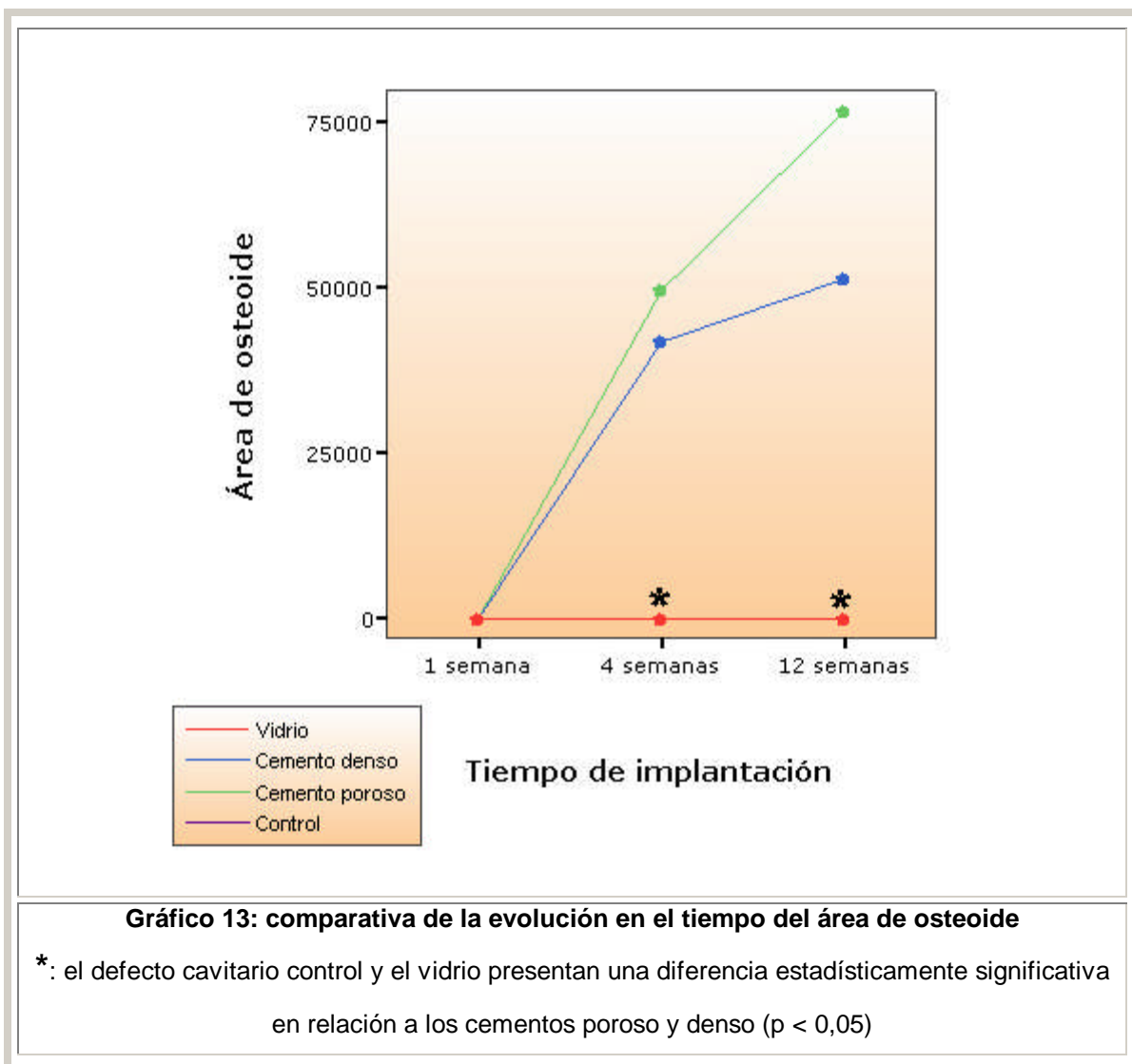


Gráfico 12: comparativa de la evolución en el tiempo del ABNR

*: el control no evoluciona en relación a los biomateriales ($p < 0,05$). ‡: el vidrio y el cemento denso se reabsorben lentamente respecto al poroso a las 4 y 12 semanas ($p < 0,05$). #: el poroso evoluciona significativamente ($p < 0,05$) comparado con los demás

Respecto al **área de biomaterial no reabsorbido**, existen diferencias estadísticamente significativas a lo largo del estudio entre los cuatro subgrupos.



El **área de osteoide** aumenta de forma progresiva en los dos cementos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Por otro

lado, los datos obtenidos en el vidrio y el control muestran una diferencia estadísticamente significativa respecto a los dos cementos.

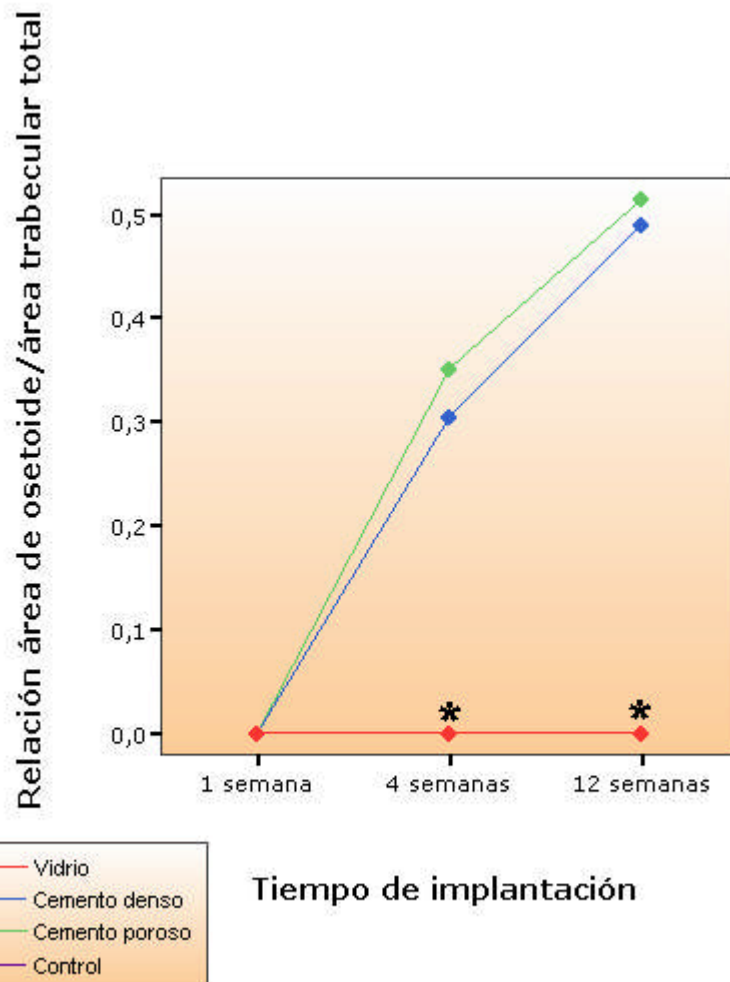


Gráfico 14: comparativa de la evolución en el tiempo del área de osteoide/ATT

*: el defecto cavitario control y el vidrio presentan una diferencia estadísticamente significativa en relación a los cementos poroso y denso ($p < 0,05$)

Al comparar el **área de osteoide / ATT** vemos de nuevo como existe una diferencia estadísticamente significativa entre:

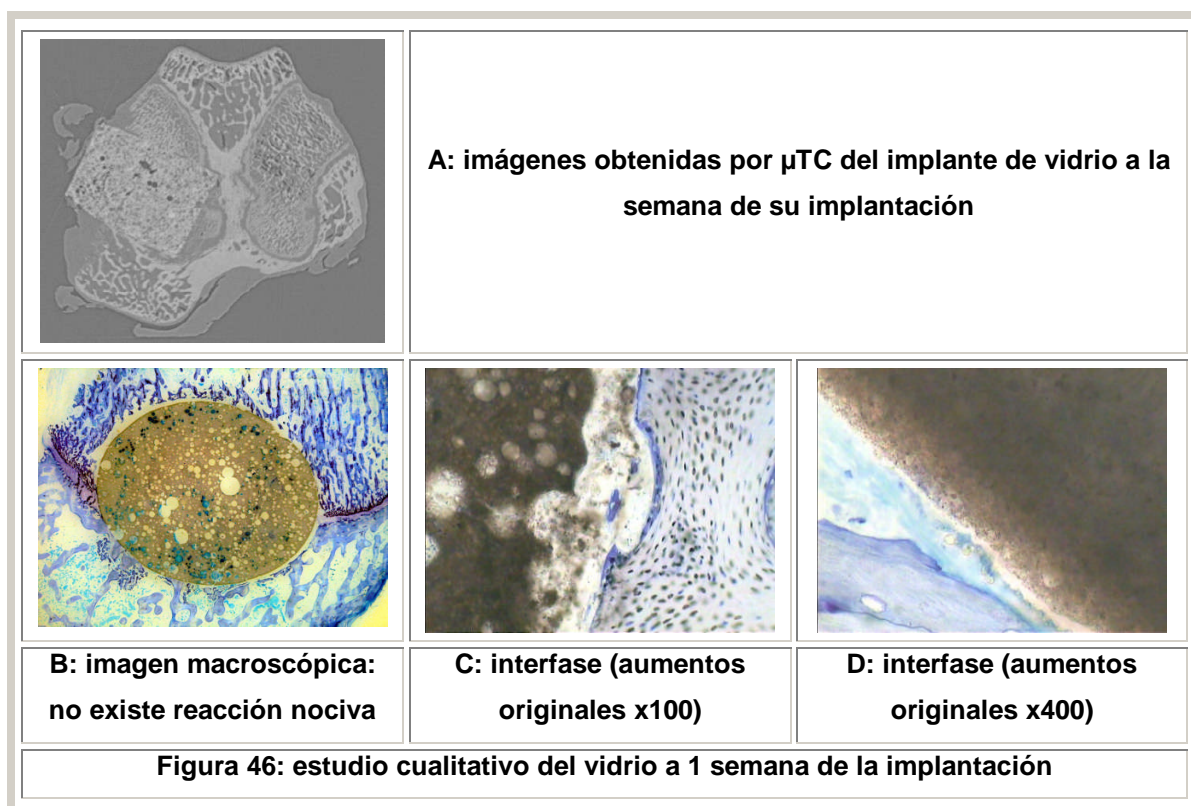
- el vidrio y el control, que no modifican su valor inicial a lo largo del estudio.
- los dos cementos, que muestran un aumento progresivo en este parámetro.

5.4. ESTUDIO CUALITATIVO

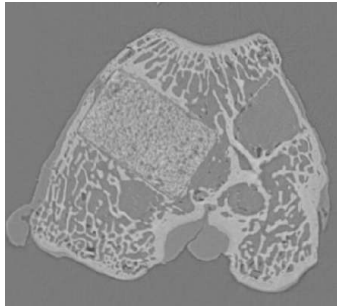
Seguidamente se muestran imágenes obtenidas mediante μ TC, lupa y microscopía óptica -a distintos aumentos-, de los implantes y del control.

5.4.1. Vidrio

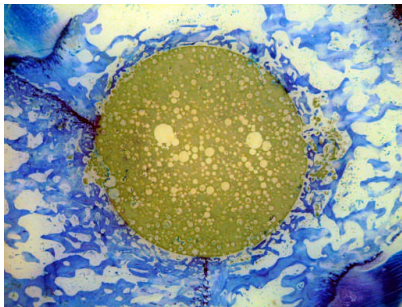
5.4.1.1. Primera semana



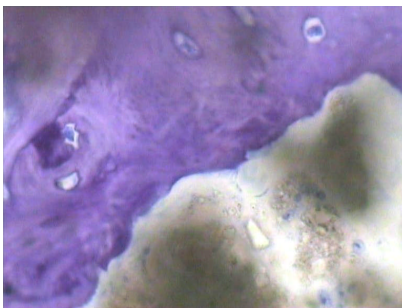
5.4.1.2. Cuarta semana



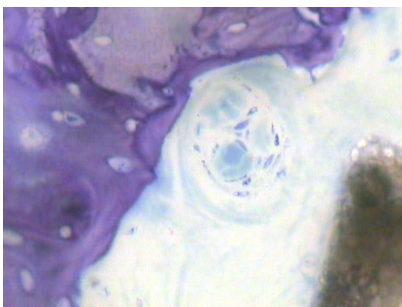
A: imágenes obtenidas por μ TC del implante de vidrio a las 4 semanas de su implantación



B: imagen macroscópica: gran remodelación ósea alrededor del implante



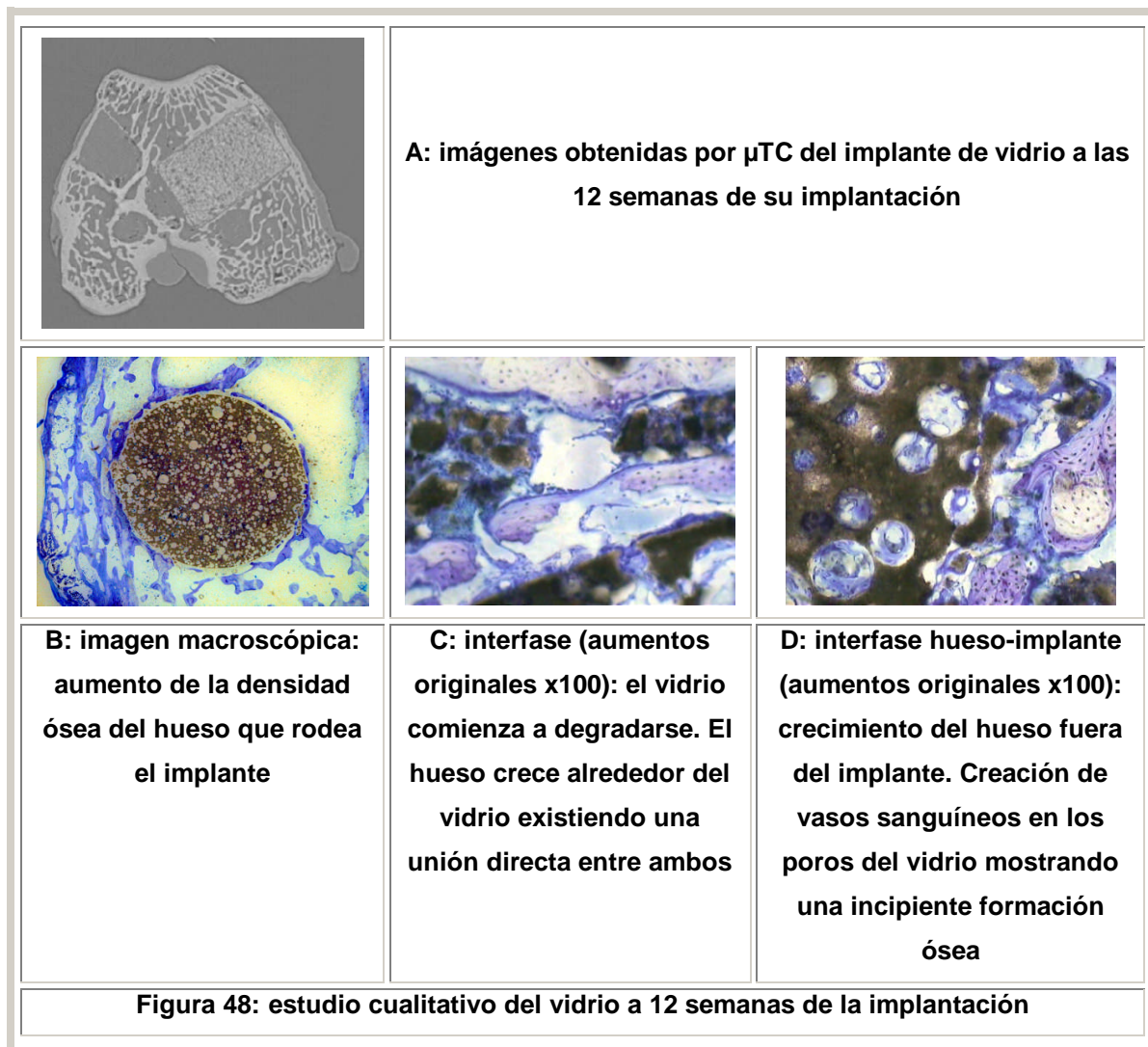
C: remodelación ósea presente en el hueso hospedador (aumentos originales x100)



D: interfase hueso-implante (aumentos originales x400): formación de vasos sanguíneos y presencia de fibroblastos

Figura 47: estudio cualitativo del vidrio a 4 semanas de la implantación

5.4.1.3. Duodécima semana



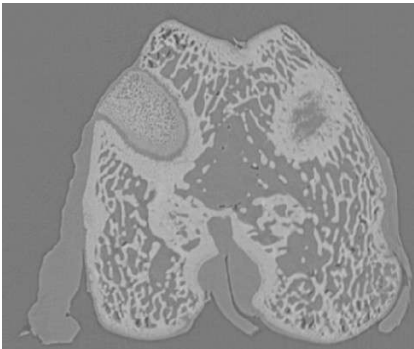
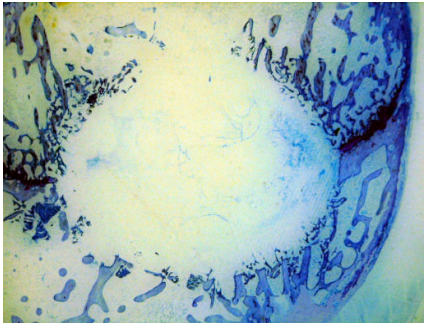
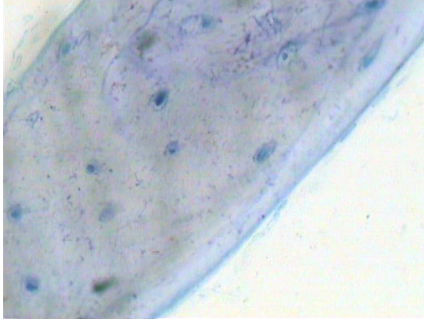
En las imágenes obtenidas mediante μ TC podemos observar la estabilidad del vidrio a lo largo del estudio, descubriendo una posible bioinercia del material o una pobre capacidad osteotransductora.

En el **estudio macroscópico** no se describe ninguna reacción inflamatoria o de cuerpo extraño al implante, lo que indica su biocompatibilidad. También nos muestra la presencia íntegra del implante en el defecto cavitario del cóndilo distal del fémur durante todo el estudio, así como una separación clara entre hueso e implante en la que existe una gran proporción de tejido conjuntivo. A las doce semanas hay zonas donde ya se aprecia una unión directa. Todo esto señala la lentitud que existe en el proceso de biorreabsorción del biomaterial. Tampoco se observa formación ósea desde la periferia hacia el centro del defecto cavitario en que se encuentra el implante en ninguno de los períodos del estudio, lo que parece demostrar que la capacidad osteoinductora del vidrio es bastante reducida. Sí parece haber cierta remodelación del hueso que rodea al implante, que puede ocurrir como respuesta a la impactación que sufre el mismo en el momento de la implantación.

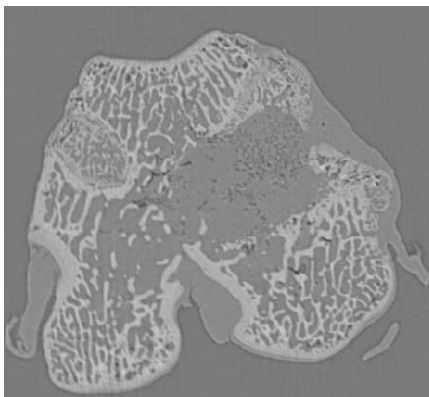
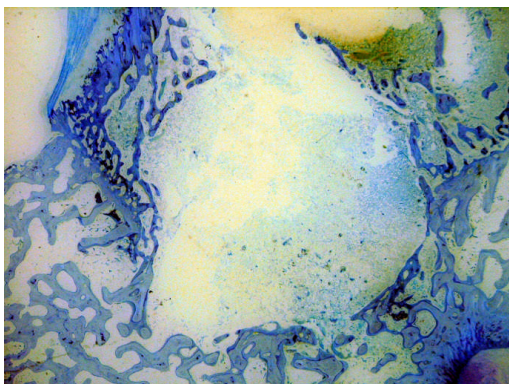
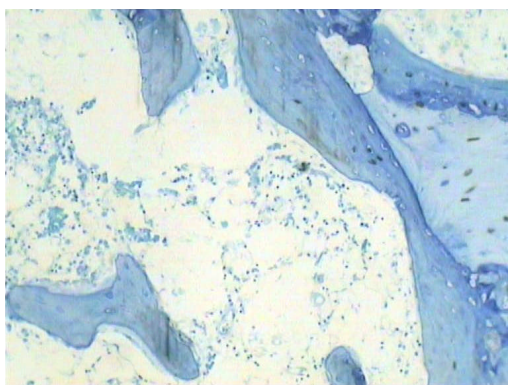
Respecto a los **cambios microscópicos**, debemos destacar la biocompatibilidad que presenta el vidrio a la semana de la implantación, ya que no existe ninguna respuesta inflamatoria aguda tras su incorporación. A las cuatro semanas podemos observar el proceso de remodelación que ocurre en el tejido óseo que rodea el defecto cavitario, con la presencia de osteoclastos. También constatamos la ausencia de bioactividad por parte del vidrio, pues sigue existiendo una marcada interfase entre vidrio y tejido óseo. A las doce semanas ya podemos ver zonas donde el implante se une de forma directa al hueso. Comienza aquí la biodegradación del vidrio y la invasión vascular acompañada de neoformación ósea que ocurre en los poros del material, iniciándose una acción osteoconductora y existiendo una osteointegración.

5.4.2. Control

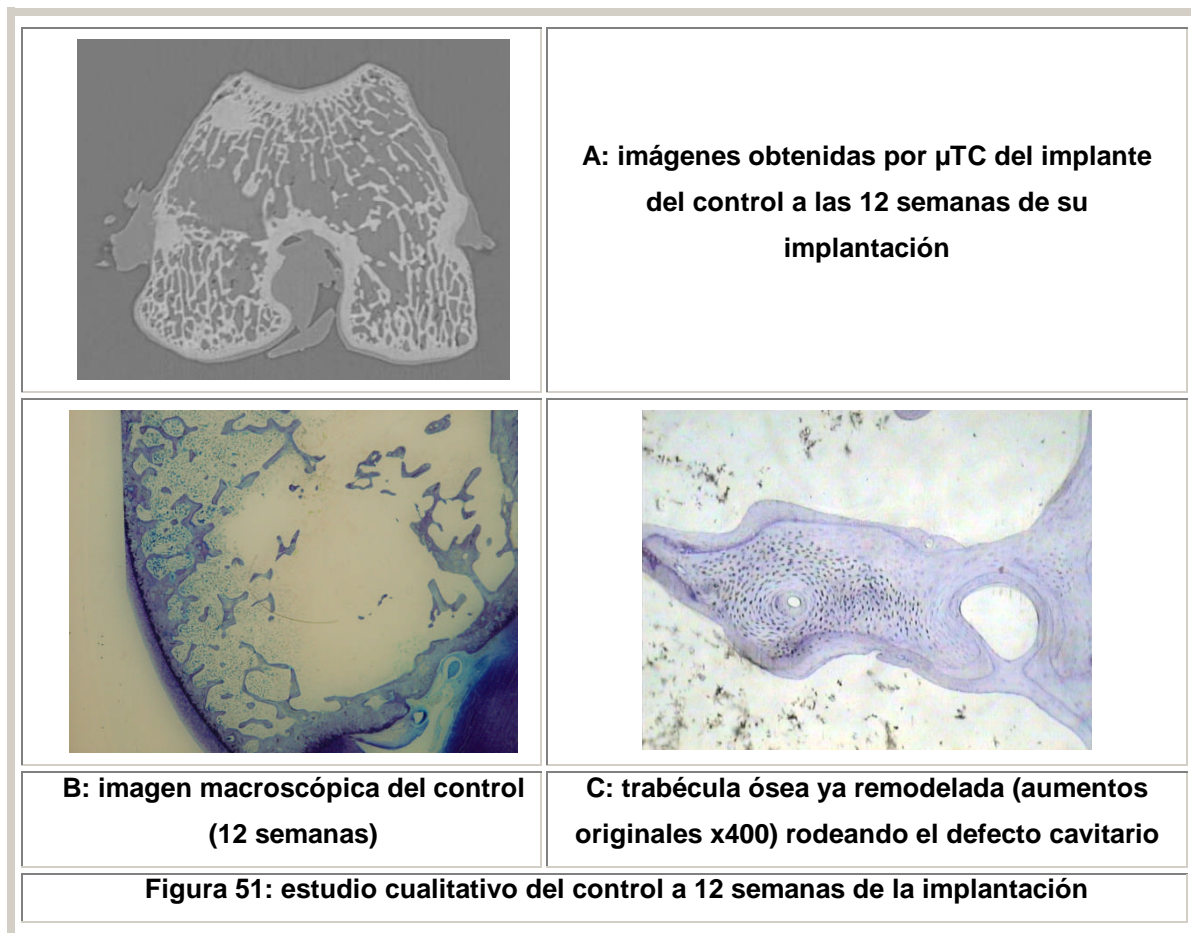
5.4.2.1. Primera semana

	<p>A: imágenes obtenidas por μTC del control a la semana de su implantación</p>
	<p>B: imagen macroscópica del control</p>
	<p>C: interfase (aumentos originales x400): trabécula ósea perteneciente al hueso maduro</p>
<p>Figura 49: estudio cualitativo del control a 1 semana de la implantación</p>	

5.4.2.2. Cuarta semana

	<p>A: imágenes obtenidas por μTC del control a las 4 semanas de su implantación</p>
	<p>B: imagen macroscópica del control donde se aprecia la remodelación ósea del hueso hospedador</p>
	<p>C: células de la médula ósea dentro del defecto cavitario (aumentos originales x100)</p>
<p>Figura 50: estudio cualitativo del control a 4 semanas de la implantación</p>	

5.4.2.3. Duodécima semana



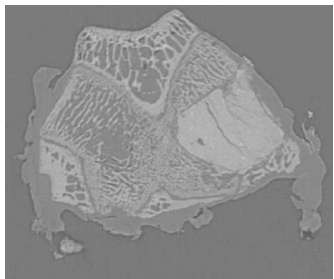
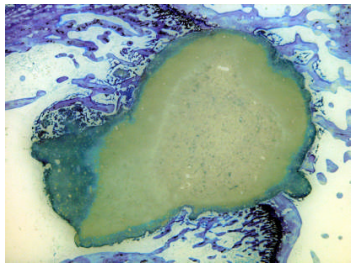
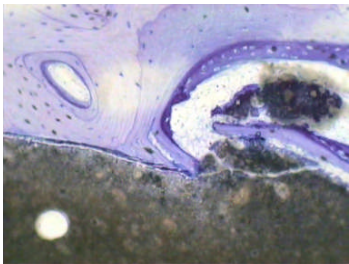
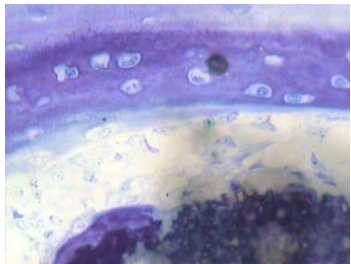
Las imágenes obtenidas por μ TC permiten observar el defecto cavitario que se mantiene vacío durante todo el estudio, aunque sí existe una ligera remodelación ósea alrededor del mismo.

Macroscópicamente también constatamos la progresiva remodelación ósea que tiene lugar en el tejido óseo hospedador que rodea al defecto cavitario y como éste último no llega a ser invadido por tejido óseo neoformado.

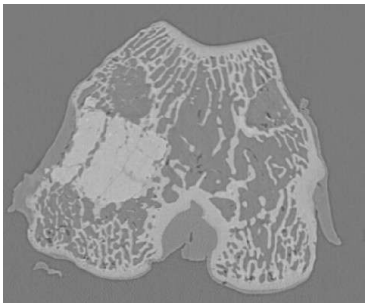
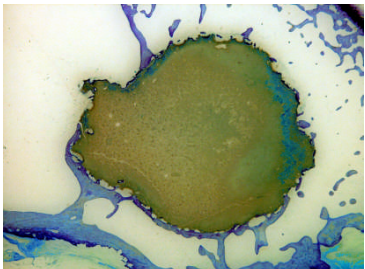
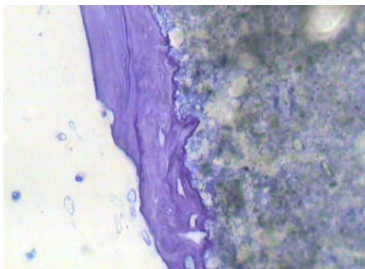
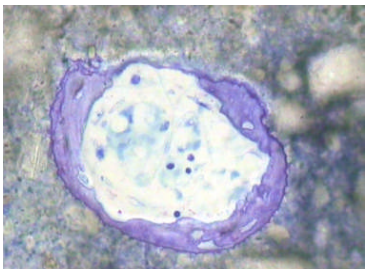
Desde el punto de vista **microscópico**, a las cuatro semanas apreciamos la presencia, aunque muy escasa, de tejido osteoide en el hueso hospedador, limitando el defecto cavitario. Este tejido ya no aparece a las doce semanas debido a que el tejido óseo ya ha experimentado totalmente su remodelación trabecular y se encuentra calcificado.

5.4.3. Cemento denso

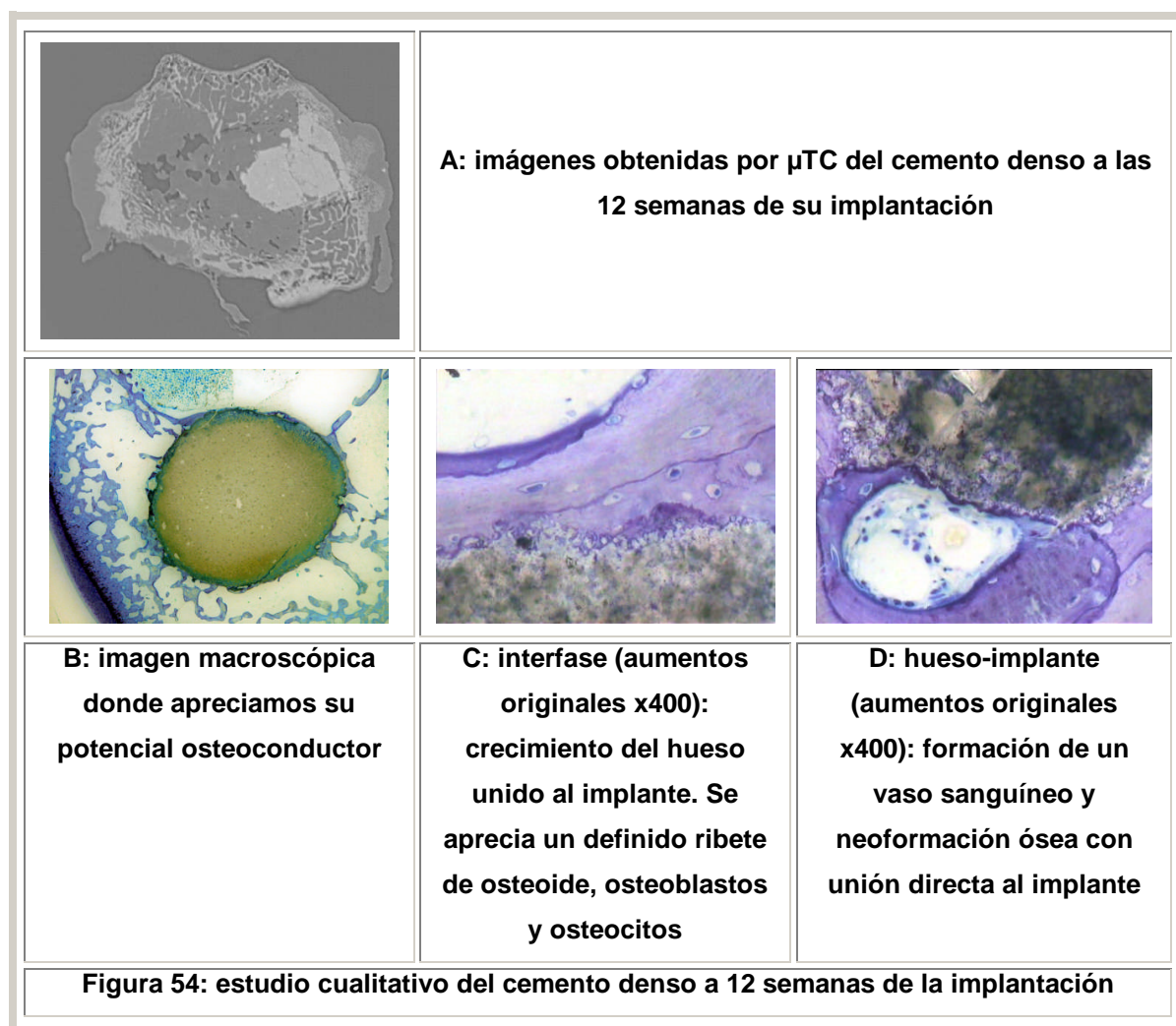
5.4.3.1. Primera semana

	<p>A: imágenes obtenidas por μTC del cemento denso a la semana de su implantación</p>	
		
<p>B: imagen macroscópica donde vemos como rellena completamente el defecto cavitario</p>	<p>C: interfase (aumentos originales x100): No se observa crecimiento del hueso, pero apreciamos cierta remodelación ósea</p>	<p>D: interfase hueso-implante (aumentos originales x400) donde se aprecia la separación entre ambos</p>
<p>Figura 52: estudio cualitativo del cemento denso a 1 semana de la implantación.</p>		

5.4.3.2. Cuarta semana

	<p>A: imágenes obtenidas por μTC del cemento denso a las 4 semanas de su implantación</p>
	<p>B: imagen macroscópica del cemento denso donde podemos apreciar la biodegradación que ocurre en la periferia del mismo</p>
	<p>C: interfase (aumentos originales x400): se aprecia la unión directa entre hueso e implante</p>
	<p>D: hueso-implante (aumentos originales x400): formación de un vaso sanguíneo y neoformación ósea con unión directa al implante</p>
<p>Figura 53: estudio cualitativo del cemento denso a 4 semanas de la implantación</p>	

5.4.3.3. Duodécima semana



Las imágenes obtenidas por μ TC muestran la progresiva reabsorción que ocurre en el cemento y la formación de hueso que ocurre de forma paralela, indicando las excelentes propiedades osteotransductoras de este material.

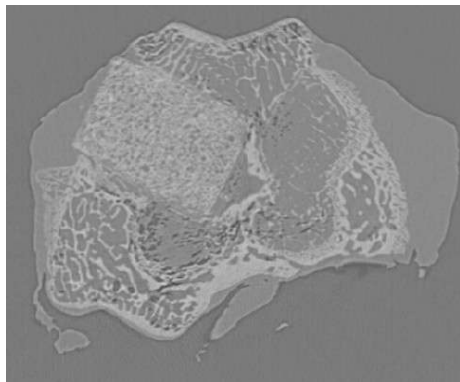
Al realizar el estudio **macroscópico** podemos destacar, por un lado, que no se observa reacción inflamatoria o de cuerpo extraño al implante, lo que indica su biocompatibilidad.

Por otro lado, verificamos una relativa lentitud en la reabsorción del biomaterial, puesto que apreciamos su presencia casi íntegra en el defecto cavitario durante todo el estudio. En cualquier caso, esta bioabsorción es mayor a la que observábamos en el caso del vidrio. También verificamos la osteointegración progresiva del cemento implantado en el defecto cavitario femoral. Por otro lado, constatamos la formación de hueso nuevo inmaduro desde el primer período del estudio, que acompaña al proceso de reabsorción del biomaterial. Esto confirma la capacidad osteotransductora del cemento denso y la coordinación en los dos procesos, que es muy importante desde el punto de vista biomecánico.

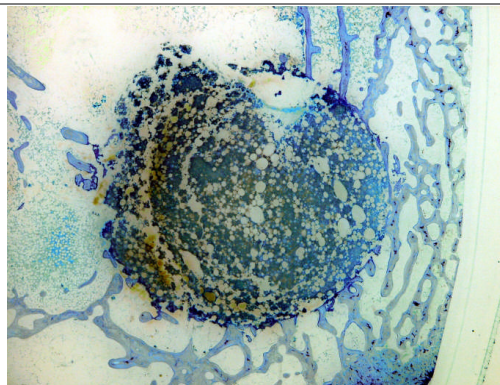
El estudio **microscópico** revela en la primera semana del estudio que no existe reacción inflamatoria tras la implantación, manifestando la biocompatibilidad del material, y también se aprecia la existencia de una clara interfase entre el cemento denso y el tejido óseo que lo rodea. A las cuatro semanas distinguimos una abundante presencia de osteoide de grosor moderado en la periferia del defecto cavitario, constituyendo numerosas trabéculas óseas inmaduras, a lo que podemos sumar la aparición de múltiples capilares sanguíneos en el implante junto a la presencia de macrófagos tanto a las cuatro como a las doce semanas del estudio. El área de contacto entre el tejido óseo neoformado y la estructura de cemento de fosfato de calcio denso es íntima y no se aprecia interfase. A las doce semanas observamos la progresión del tejido óseo neoformado y la presencia de abundante osteoide, que va penetrando en el cemento óseo. Todo esto permite constatar la gran capacidad osteotransductora de este biomaterial.

5.4.4. Cemento poroso

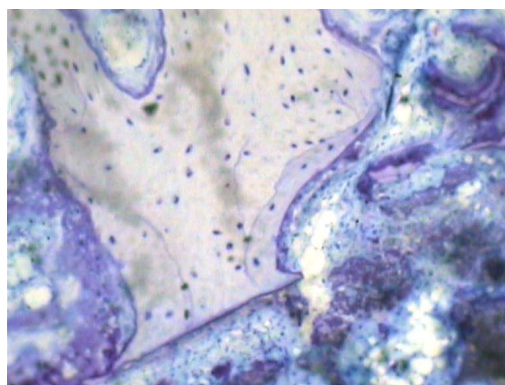
5.4.4.1. Primera semana



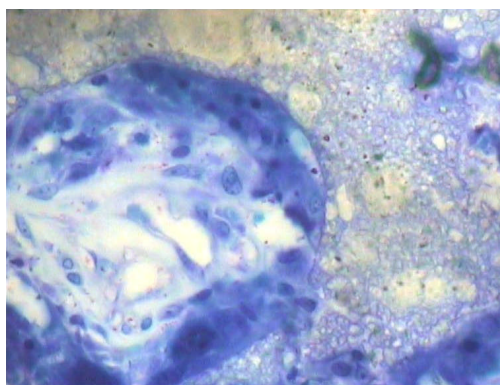
A: imágenes obtenidas por μ TC del cemento poroso a la semana de su implantación



B: imagen macroscópica del cemento poroso donde no se aprecia la existencia de reacción inflamatoria



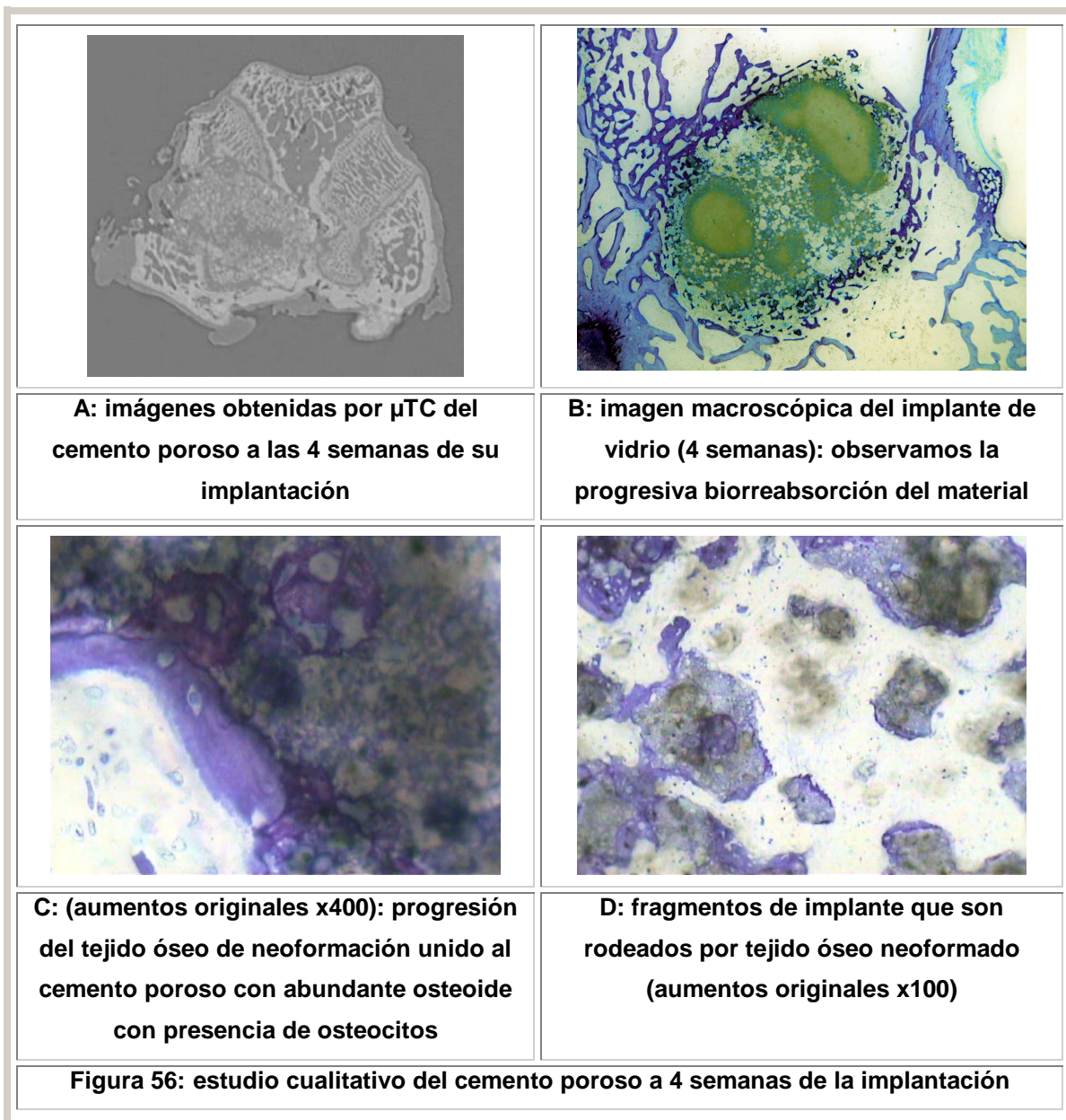
C: interfase (aumentos originales x100): trabécula ósea del hueso hospedador. Se distingue una clara zona de interfase



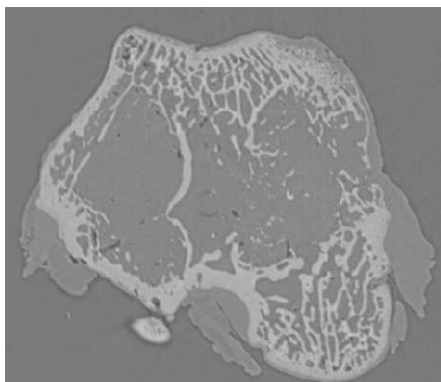
D: formación de un vaso sanguíneo (aumentos originales x400) en la zona donde el material empieza a biodegradarse

Figura 55: estudio cualitativo del cemento poroso a 1 semana de la implantación

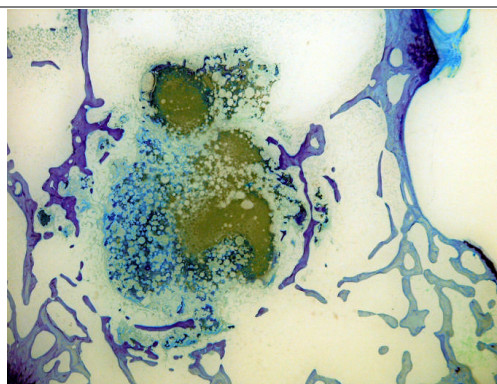
5.4.4.2. Cuarta semana



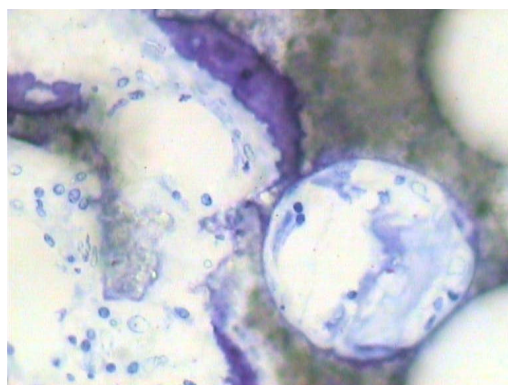
5.4.4.3. Duodécima semana



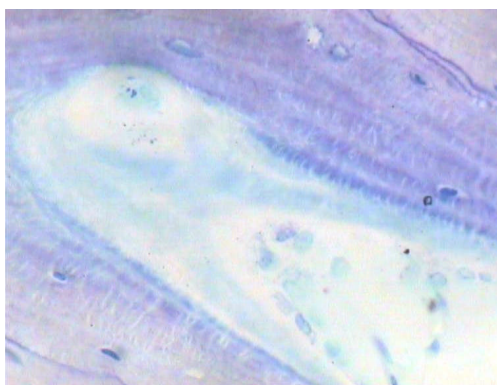
A: imágenes obtenidas por μ TC del cemento poroso a las 12 semanas de su implantación



B: imagen macroscópica del cemento poroso (12 semanas): se aprecia la progresiva bioabsorción del cemento poroso



C: células de la médula ósea invadiendo los poros del material y hueso neoformado (aumentos originales x100)



D: formación de tejido óseo con abundante ribete de osteoide (aumentos originales x400). Se aprecia la línea de osteoblastos y la evolución de los osteoblastos a osteocitos

Figura 57: estudio cualitativo del cemento poroso a 12 semanas de la implantación

Las imágenes obtenidas por μ TC permiten ver la rápida reabsorción de este material poroso y la, comparativamente, más lenta neoformación ósea. Esto puede asumirse como una demostración de las pobres propiedades biomecánicas de este material.

Respecto al **estudio macroscópico**, no se aprecia reacción inflamatoria ni de cuerpo extraño, lo que demuestra la biocompatibilidad del biomaterial. También podemos afirmar la rápida reabsorción que ocurre desde la primera semana. En un primer momento ocurre en toda la superficie del biomaterial, pero a partir de las cuatro semanas ya podemos constatar su carácter centrípeto. Esto va acompañado por la formación de hueso nuevo. A las cuatro semanas apreciamos un hueso inmaduro que a las doce semanas ya es en gran parte hueso ordenado en trabéculas óseas, que indican que está teniendo lugar el proceso de remodelación ósea. El problema principal que apreciamos es que esta formación de tejido óseo ocurre a la misma velocidad que la bioabsorción, de forma que a nivel biomecánico constituye un problema para la estabilidad del hueso en el que fue implantado.

El **estudio microscópico** realizado en la primera semana verifica que no existe reacción inflamatoria tras la implantación; también permite apreciar una clara zona de interfase entre el cemento poroso y el hueso hospedador. A las cuatro semanas ya observamos la presencia de numerosas trabéculas neoconstituidas en la periferia del defecto cavitario, que se encuentran en continuidad con el tejido óseo receptor. Los ribetes de osteoide son abundantes, se distribuyen de manera regular y se encuentran cubiertos por osteoblastos cúbicos. Los fragmentos de material son rodeados por tejido óseo neoformado y macrófagos; del mismo modo apreciamos la presencia de numerosos vasos sanguíneos. Todo esto constata la rápida biorreabsorción del material y sus excelentes propiedades osteointegradoras y osteoconductoras.

A las doce semanas es muy difícil distinguir las trabéculas óseas neoformadas en la periferia del defecto cavitario de las pertenecientes al hueso hospedador. En la zona central, donde el proceso de osteogénesis es más activo, podemos distinguir numerosos vasos sanguíneos y abundantes ribetes de osteoide, cubiertos por osteoblastos cúbicos.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**



Discusión

6. DISCUSIÓN

El desarrollo de nuevos sustitutivos de hueso requiere que posean unas características esenciales como son su biocompatibilidad, bioactividad, capacidad osteoconductora y osteoinductora. A estas propiedades hay que añadir su capacidad de ser moldeables, llenar completamente el defecto cavitario y favorecer un buen contacto entre el hueso y el implante.

En esta tesis doctoral comparamos el comportamiento biológico de tres diferentes sustitutivos de hueso, un vidrio bioactivo y dos cementos, para establecer su posible uso clínico en cirugías ortopédicas o como relleno de defectos óseos y valorar los factores que influyen directamente en sus propiedades físico-químicas y biológicas para poder optimizar el diseño de los mismos. Con el fin de realizar la discusión de una forma clara seguiremos el mismo esquema empleado en los resultados, aunque previamente hablaremos de algún aspecto importante para el desarrollo de esta tesis doctoral que no está incluido de forma directa en dicho apartado.

6.1. MODELO EXPERIMENTAL

Debemos destacar la dificultad de comparar los resultados obtenidos en nuestro estudio con respecto a otras investigaciones realizadas por distintos autores debido a la gran diversidad que existe en los métodos de evaluación de la respuesta ósea generada por los biomateriales. En este sentido, cada autor propone tanto modelos animales como lugares de implantación diferentes que dan lugar a que un mismo biomaterial desarrolle distintas propiedades biomecánicas y biofuncionales, influyendo así en los resultados obtenidos.

El primer elemento clave de este trabajo es la selección de la especie animal utilizada. El uso del conejo como animal de experimentación está profundamente aceptado en el campo de la investigación por su coste, relativamente razonable, la fácil disponibilidad de la infraestructura necesaria para llevar a cabo un cuidado óptimo y un manejo sencillo, además de cumplir con las indicaciones legislativas vigentes que indican que siempre se debe recurrir a la especie animal menos desarrollada desde el punto de vista evolutivo¹. Por otro lado, diversos autores han concluido que la anatomía de los huesos largos del conejo y de su espina dorsal es muy similar a la humana², por lo que proponen el fémur y tibia de conejo como un lugar óptimo para la colocación de los implantes³. Una cuestión que genera bastante controversia es la extrapolación de los resultados obtenidos en animales de experimentación a la especie humana, ya que el proceso de regeneración ósea es más rápido en el conejo². En este sentido, consideramos que los estudios realizados por otros autores utilizando la misma especie animal tienen suficiente validez, demostrando la utilidad de este modelo experimental; además, la comparación de los distintos biomateriales con el defecto cavitario control, cuyo comportamiento biológico está totalmente demostrado⁴, es suficiente para determinar que las variaciones que encontramos son debidas a las diferentes propiedades biológicas de los implantes utilizados en este

¹ **Flecknell P.A. (2002):** Manejo, sujeción y técnicas clínicas. En Manual de Medicina y Cirugía del conejo. Flecknell (Ed.), British Small Animal Veterinary Association, Gloucestershire, United Kingdom, pps.: 1-17.

² **Liebschner M.A.K. (2004):** Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* **25** (2004), pps.: 1697-1714.

³ **CEN (Comité Europeo de Normalización):** Norma Española UNE-en 30993-6. *Evaluación biológica de los productos sanitarios*. Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación (ISO 10993-6:1994). AENOR, Madrid, 1995.

⁴ **Jackson D.W., Lalor P.A., Aberman H.M., Simon T.M. (2001):** Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* **83** (1), pp. 53-64.

estudio^{5,6}. Estos autores han demostrado que tras la creación de un defecto cavitario de 6 mm. de diámetro realizado en el cóndilo femoral no se produce una reparación espontánea del defecto óseo, sino que incluso puede ocurrir una pérdida de densidad ósea en los bordes del defecto⁶. Esto es fundamental porque nos da la seguridad de que la regeneración ósea que observamos es debida necesariamente al sustituto óseo empleado, y por ello hemos definido el grupo control como aquellos animales de experimentación que no reciben en uno de sus cóndilos ningún tipo de implante, definiéndolo como grupo control negativo.

Por otro lado, hemos escogido conejos hembras de edad adulta con el objetivo de que sus cartílagos de crecimiento estuviesen cerrados para así obtener resultados más fiables y poder realizar defectos cavitarios de mayor tamaño.

Otro punto clave es el tiempo de duración del estudio y los períodos de toma de muestras. Tras estudiar las distintas opciones que se recogen en los numerosos estudios que pudimos consultar, los períodos escogidos para el sacrificio fueron 1, 4 y 12 semanas. Las muestras recogidas en la primera semana nos aportan información sobre la biocompatibilidad de los materiales, como han establecido diversos estudios realizados en conejos albinos de raza neozelandesa^{7,8,9}. Estos mismos autores también han determinado que durante

⁵ **Lewandrowski K-U., Bondre S.P., Wise D.L. y Trantolo D.J. (2002):** Healing of osteochondral osteotomies after fixation with a hydroxyapatite-buffered polylactide. A histomorphometric and radiographic study in rabbits. *Bio-Medical Materials and Engineering* **12**, pps.: 259-270.

⁶ **Ruhé P.Q., Kroese Dedutman H.C., Wolke J.G.C., Spauwen P.H.M. y Jansen J.A. (2004):** Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* **25 (11)**, pps.: 2123-2132.

⁷ **Liu D (1996):** Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials* **17**, pps.: 1955-1957.

⁸ **Voor M.J., Arts J.J.C., Klein S.A., Walschot L.H.B., Verdonschot N., Buma P. (2004):** Is Hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **71 B**, pps.: 398-407.

las primeras cuatro semanas lo que se produce es el proceso de neoformación ósea cuantitativamente más importante y entre las cuatro y ocho semanas se desarrollan fenómenos de remodelación ósea; por ello hemos seleccionado las cuatro semanas como el siguiente momento de toma de muestras. La elección de las doce semanas como la fase final de nuestro estudio se debe a que estos mismos autores han observado como a partir de este momento los procesos de reabsorción y neoformación ósea ocurren con menor intensidad, de forma que la información que se puede obtener a partir de este momento no va a ser muy relevante^{7,8,9}. Este momento también ha sido establecido por el CEN como el período crítico entre los estudios realizados a corto plazo, hasta las doce semanas, y aquellos llevados a cabo a largo plazo, a partir de las doce semanas³. Este estudio a corto plazo nos ha permitido caracterizar de forma suficiente las propiedades que desarrollan los dos cementos, aunque, en la vista de los resultados finales que hemos obtenido, hubiera sido interesante prolongar el estudio para el vidrio bioactivo, y por lo tanto para el control, debido a su lenta capacidad de reabsorción.

Otro factor condicionante en este estudio fue la elección del lugar de implantación; en este sentido, Lu et al.¹⁰ han demostrado que la respuesta de los biomateriales es significativamente diferente tras su implantación en hueso cortical, trabecular o en la zona medular. Sus resultados manifiestan que la biodegradación del material es muy superior en la zona medular, y mayor en el hueso trabecular que en el cortical, coincidiendo con los datos que aportan Fini

⁹ **Togawa D., Bauer T.W., Woolf S.K., Hawkins M., Edwards B., An J.A. (2002):** Evaluation of resorption rates of five injectable bone cement using a rabbit femoral defect model. *Proceedings of the Orthopaedic Research Society (Annual Meeting Dallas, TX)*, **27**, póster 738.

¹⁰ **Lu J.X., Gallur A., Flautre B., Anselme K., Descamps M., Thierry B. y Hardouin P. (1998):** Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* **42**, pps.: 357-367.

et al.¹¹, que también determinan que la osteogénesis es mayor en la zona cortical que en la medular. Hoshikawa et al.¹² han tenido en cuenta estas diferencias en la respuesta del implante y del tejido óseo en función del lugar de implantación y han colocado todos los materiales lejos de la zona de fisis intentando eliminar la influencia de la placa de crecimiento en la osteogénesis. Finalmente, Lu et al.¹⁰ han concluido que el lugar idóneo para realizar estudios sobre la biofuncionalidad de los biomateriales es el hueso trabecular, presente en el cóndilo distal del fémur, debido al equilibrio que presenta en las actividades de osteogénesis y biodegradación, y por ello ha sido el lugar escogido por nosotros para realizar este estudio. Estos autores también han descrito que el tejido presente en la zona medular parece ser óptimo para realizar evaluaciones sobre la biocompatibilidad de estos materiales.

Respecto al modelo experimental sólo queda comentar que la elección del tamaño muestral ha sido realizada en base a anteriores estudios^{6,13,14}, en los que se ha visto que era suficiente incluir seis animales en cada uno de los grupos para obtener resultados estadísticamente significativos, además de cumplir con ello la legislación vigente sobre la necesidad de usar el mínimo número de animales suficiente para la realización de un estudio fiable.

¹¹ Fini M., Giavaresi G., Aldini N. N., Torricelli P., Botter R., Beruto D., Giardino R. (2002): A bone substitute composed of polymethacrylate and β -tricalcium phosphate : results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. *Biomaterials* **23**, pps.: 4523-4531.

¹² Hoshikawa A., Fukui N., Fukuda A., Sawamura T., Hattori M., Nakamura K., Oda H (2003): Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials* **24**, pps.: 4967-4975.

¹³ Sepulveda P., Bressiani A.H., Bressiani J.C., Meseguer L., König B. (2002): In vivo evaluation of hidroxiapatite foams. *Journal of Biomedical Material Research* **62**, pps.: 587-592.

¹⁴ Oonishi H. Hench L.L., Wilson J., Sugihara F., Tsuji E., Matsuura M., Kin S., Yamamoto T., Mizokawa S. (2000): Quantitative comparison of bone growth behaviour in granules of Bioglass®, A-W glass-ceramic, and hidroxiapatite. *Journal of Biomedical Material Research* **51**, pps.: 37-46.

6.2. ESTUDIO RADIOLÓGICO

El primer punto que analizaremos son los resultados radiológicos, aplicando los criterios propuestos por Lane y Sandhu¹⁵.

En primer lugar, observamos que en todos los casos el defecto cavitario quedó perfectamente lleno y el material en contacto directo con el tejido óseo que lo rodea, y, aunque en algún momento observamos que el cemento denso había rebasado la cavidad creada, no podemos hablar de migraciones del mismo lejos del defecto cavitario. La realización de una evaluación radiológica post-implantación es muy importante para comprobar este punto pues de ello depende de forma directa el éxito del estudio y es una práctica muy habitual en este tipo de experimentos¹⁶. Esta técnica también nos permite observar la evidencia de una reacción de cuerpo extraño o la aparición de osteolisis sin necesidad de realizar un estudio histológico. En nuestro caso, no constatamos ningún tipo de reacción adversa, lo que indica, al menos en un primer momento, la buena biocompatibilidad que desarrollan los tres tipos de biomateriales compuestos de fosfatos de calcio, y que ya ha sido descrita por otros autores¹⁷. También hay que valorar de forma positiva que no existan fracturas óseas, que es una de las complicaciones más frecuentes tras la implantación, debido a las deficientes propiedades biomecánicas que

¹⁵ Lane J.M., Sandhu H.S. (1987): Current approaches to experimental bone grafting. *The Orthopedic Clinics of North America* **18**, pps.: 213-225.

¹⁶ Niedhart C., Maus U., Piroth W., Miltner O., Schmidt-Rohlfing B., Siebert C.H. (2004): Evaluation of reabsorbable, in situ setting bone substitute in a sheep model. *Journal of Biomedical Material Research. Part B: Applied Biomaterial* **71 B**, pps.: 123-129.

¹⁷ Gauthier O., Khairoun I., Bosco J., Obadia L., Bourges X., Rau C., Magne D., Bouler J.M., Aguado E., Daculsi G., Weiss P. (2003): Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *Journal of Biomedical Material Research* **66 A**, pps.: 47-54.

desarrollan algunos biomateriales¹⁸. Por otro lado, este estudio nos ayuda a constatar la osteointegración de los tres biomateriales implantados. La osteointegración es el tipo de repuesta más eficaz a la colocación de un implante y es una de las propiedades básicas que se buscan en el diseño de los mismos¹⁹. Respecto a la formación y remodelación ósea no apreciamos evolución en el caso del biovidrio. En el cemento denso sí existe cierta neoformación, que es ligeramente superior en el cemento poroso. Todo esto indica la tendencia del vidrio a una lenta biorreabsorción y neoformación en relación a los cementos. Hay que considerar que el estudio radiológico es impreciso a la hora de aportar información cuantitativa sobre el proceso de regeneración ósea y, por ello, estos resultados obtenidos deben ser discutidos en relación con los datos obtenidos mediante histomorfometría¹⁵.

6.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Esta técnica permite realizar distintos tipos de estudio, tanto cualitativos como semicuantitativos y cuantitativos. Numerosos autores usan el estudio cualitativo con el objetivo de caracterizar el tamaño de partícula, tamaño de poro o distribución de partículas en las cerámicas, vidrios o polvos de cementos previo a la realización de un estudio *in vivo*, pues se ha demostrado que el **tamaño de partícula** es un factor clave que modifica significativamente las propiedades finales de los cementos. Este parámetro afecta especialmente a la cinética de las reacciones químicas que tienen lugar en su fase de fraguado, así como a la consolidación mecánica de los mismos, de forma que es útil para ajustar el

¹⁸ Yap A. U. J. , Pek Y. S., Cheang P. (2003): Physico-mechanical properties of a fast-set highly viscous GIC restorative. *Journal of Oral Rehabilitation* **30**, pps.: 1-8.

¹⁹ Herrero Climent M., Herrero Climent F. (1995): Interfases osteoimplantarias. En *Atlas de procedimientos clínicos en implantología oral*. Herrero Climent M., Herrero Climent F (Eds.). TRP Ediciones, España, pps. 5-6.

comportamiento de un cemento a unos requerimientos clínicos específicos²⁰. Tras la implantación de un biomaterial el estudio cualitativo también aporta abundante información. Por un lado, permite observar el **tipo de unión** entre el material implantado y el hueso que lo rodea; como ejemplo podemos describir que en algún caso la respuesta ósea lleva a la formación de una lámina de tejido fibroso sin existir contacto directo entre los dos, lo que implica una importante falta de estabilidad²¹. En el caso del vidrio bioactivo que hemos implantado, durante la primera y la cuarta semana de estudio aparece un área de separación de 100 micras aproximadamente entre el material y el tejido óseo que lo rodea, constituida en gran parte por tejido conjuntivo que actúa de sostén. Esto podría sugerir una falta de biodegradación del material, debido a que, como han descrito otros autores²², el biovidrio aparece encapsulado y conserva su forma íntegra; sin embargo, a las doce semanas ya encontramos zonas donde este área reduce su espesor y el material se une al implante, además de aparecer pequeños fragmentos de material, lo que indica que comienza el proceso de disgregación del vidrio. La lentitud en el comienzo de esta biorreabsorción nos lleva a afirmar que para cuantificar y cualificar con exactitud este proceso sería necesario ampliar el tiempo de estudio de este material. Por otro lado, podemos aseverar que el factor clave de la gran permanencia de este material en el defecto cavitario es el titanio que se añade a su composición. Este mineral se ha agregado de forma expresa con el objetivo de determinar su comportamiento estabilizador porque, aunque de

²⁰ **Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. (2004):** Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cements: a kinetic analysis. *Biomaterials* **25**, pps.: 3453-3462.

²¹ **Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee Jr. T.K. (1971):** Bonding mechanism at the interface of the ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* **2**, pps.: 117-141.

²² **Bert M., Missika P. (1997):** Osteointegración. En *Implantología Quirúrgica y Protésica*. Bert M., Missika P. (Eds.) Masson, España, pps. 3-10.

forma habitual se usa la adición de Na_2O y CaO en el diseño de los vidrios de fosfato de calcio para controlar la solubilidad de los mismos y sus propiedades mecánicas, en algunas circunstancias se requiere una mayor estabilidad, que puede ser conseguida con el uso de partículas como el titanio. Así, distintos autores han descrito que la incorporación de iones metálicos (como son el hierro, aluminio o titanio) aumenta la durabilidad de los materiales compuestos de fosfatos de calcio^{23,24}. La limitada degradación que obtenemos lleva pareja una inhibición del proceso de sustitución ósea. Existen otras hipótesis que justifican la estabilidad de los biomateriales basadas fundamentalmente en las características de los mismos; un claro ejemplo es la **porosidad**. De esta forma, algunos autores observaron una escasa degradación del biomaterial que habían diseñado-CPC-, apreciando como la neoformación ósea sólo ocurría en la superficie del mismo, sin penetrar dentro del defecto cavitario creado, permaneciendo el material intacto²⁵. En este caso, las células fueron incapaces de penetrar dentro del CPC debido a su estructura densa, y por ello no se produjo la neoformación ósea. En nuestro caso, el tamaño de poro no es la causa de la lenta reabsorción, pues estudios previos *in vitro* han demostrado que los macroporos conseguidos gracias a la aplicación de albumen de huevo como agente espumante conforman un esqueleto altamente interconectado para promover una extensa vascularización que lleve a una regeneración ósea rápida, un buen crecimiento de tejido óseo en su interior y una buena

²³ Navarro M., Clément J., Ginebra M.P., Martínez S., Avila G., Planell J.A. (2002): Improvement of the stability and mechanical properties of reabsorbable phosphate glasses by the addition of TiO_2 . *Key Engineering Materials* **218-220**, pps.: 275-278.

²⁴ Clément J., Ávila G., Navarro M., Martínez S., Ginebra M.P., Planell J.A. (2000): Chemical durability and mechanical properties of calcium phosphate glasses with the addition of Fe_2O_3 , TiO_2 and ZnO . *Bioceramics* **13**, pps.: 621-624.

²⁵ Gauthier O., Khairoun I., Bosco J., Obadia L., Bourges X., Rau C., Magne D., Bouler J.M., Aguado E., Daculsi G., Weiss P. (2003): Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *Journal of Biomedical Material Research* **66 A**, pps.: 47-54.

osteointegración. Sepúlveda et al.¹³ han demostrado que, como ya habían propuesto Ducheyne et al.²⁶, el porcentaje de crecimiento óseo se ve influido por la morfología de los poros, el grado de conectividad entre ellos y el volumen de poro, y que son necesarios poros de un tamaño superior a 100 micras para permitir el acceso de la sangre y los nutrientes esenciales que llevan a la mineralización ósea dentro del implante. La influencia del tamaño de poro también fue constatada en nuestro estudio al comparar los dos tipos de cementos; con estos biomateriales pudimos apreciar que a mayor tamaño de poro tiene lugar una mayor reabsorción del material y mayor neoformación ósea, confirmando el comportamiento osteoconductor del material y la habilidad de su esqueleto poroso para promover el crecimiento del tejido. La porosidad puede obtenerse mediante métodos muy diversos, como hemos visto con anterioridad, pero muchos de ellos no pueden emplearse en el organismo vivo. En nuestro caso el agente utilizado como espumante para obtener el cemento poroso fue el albumen de huevo deshidratado, previa preparación y esterilización del mismo. Hemos comprobado que funciona bien como agente espumante y que forma un esqueleto poroso más o menos resistente, de forma que soporta la presión de la sangre que emana del lecho óseo creado sin perder su estructura porosa. Otra ventaja del uso de este agente espumante es la facilidad de obtención del material necesario para su uso y la reproducibilidad del diseño experimental, factor clave para su aplicación biomédica en intervenciones quirúrgicas.

La experiencia que hemos obtenido con el vidrio que hemos implantado y los estudios que han realizado otros autores para demostrar la influencia de distintos factores, como la composición o la porosidad, en los procesos de

²⁶ **Ducheyne P y Qiu Q. (1999):** Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* **20**, pps.:2287-2303. Review.

reabsorción y neoformación ósea nos ayuda a confirmar que hay distintos parámetros morfológicos y físicos que influyen en el comportamiento *in vivo* de los biomateriales.

Otro hecho que debemos comentar en el vidrio es que la **unión** directa que se produce a las doce semanas ocurre mediante la formación de una capa de hidroxiapatita (HA) de un espesor aproximado de 100 micras entre el material y el tejido óseo; este tipo de unión ya fue observado por Hench en 1973 al diseñar los vidrios a base de silicio²⁷. Hench et al. proporcionaron con ello la primera evidencia efectiva del establecimiento de un enlace directo entre un biomaterial y el tejido óseo que lo rodea; estos autores observaron como los vidrios a base de silicio se unen al tejido óseo por fijación bioactiva, experimentando una modificación cinética en su superficie al contactar con los fluidos biológicos, para formar una capa de hidroxicarbonatoapatita que es equivalente, química y estructuralmente, a la fase mineral del hueso y establece una fuerte unión con el tejido óseo que hace posible su osteointegración. Los vidrios de base fosfato, como el que estudiamos en esta tesis doctoral, también desarrollan una unión química al tejido óseo, como relatan numerosos autores. Así, Oonishi et al.¹⁴, Daculsi²⁸ y LeGeros et al.²⁹, al comparar el comportamiento de distintas formulaciones de vidrios e hidroxiapatitas, observaron como la unión química de la hidroxiapatita al hueso comprendía una disolución parcial de la superficie de la cerámica y la formación y precipitación de cristales de hidroxiapatita carbonatados junto con biomoléculas del fluido que rodea al tejido circundante. Estos mismos autores

²⁷ **Hench L.L., Paschall H.A. (1973):** Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of Biomedical Material Research* **7**, pps.: 25-42.

²⁸ **Daculsi G. (1998):** Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* **19**, pps.: 1473-1478.

²⁹ **LeGeros R.Z. (2002):** Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 81-98.

también observaron la formación de una lámina de hidroxiapatita en la superficie de dos formulaciones de vidrios, aunque han sido otros estudios los que han documentado la función real de la existencia de dicha lámina. En este sentido, Ohgushi et al.³⁰ atribuyeron un papel estimulador a la lámina de hidroxiapatita biológica en la diferenciación osteoblástica, de forma que, para ellos, la hidroxiapatita formada en la superficie de los distintos materiales puede promover la aposición osteoblástica y/o la unión de células del estroma que activa, a su vez, la diferenciación osteoblástica. Según esto, la velocidad de formación de la apatita biológica o carbonatada en la superficie de los materiales bioactivos controla, en un periodo inicial, el porcentaje de crecimiento óseo y de formación de hueso nuevo alrededor de las partículas. También se recoge en la literatura que, tras la implantación, los cristales de hidroxiapatita formados pueden funcionar como inhibidores de las metaloproteasas de la matriz, que actúan en la degradación de la matriz extracelular formada de nuevo y el osteoide, incluyendo el colágeno tipo I. Oonishi et al.¹⁴ también sugirieron que el papel de los cristales de hidroxiapatita es crítico para la formación de hueso y para la inhibición de la reabsorción ósea, debido a que la degradación del colágeno promovida por las metaloproteasas parece producirse en el lugar donde tiene lugar la formación ósea; esto evidencia que la zona donde se produce la neoformación ósea funciona como una estructura que va envolviendo al resto de tejido que se va reabsorbiendo. La colagenasa intersticial podría funcionar como un factor de acoplamiento permitiendo a los osteoblastos iniciar la remodelación ósea que genera fragmentos de colágeno, que a su vez activa a los osteoclastos. Wong et al. también observaron la aparición de una lámina de hidroxiapatita un mes

³⁰ Ohgushi H., Okumura M., Yoshikawa T., Inoue K., Senpuku N., Tamai S., Shors E.C. (1992): Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Material Research* **26(7)**, pps.: 885-95.

después de la implantación sin existir aún un contacto directo, observando a los tres meses una unión directa entre el implante y el hueso³¹.

Respecto al **análisis cuantitativo**, hemos determinado que el **ratio calcio/fósforo** aumenta desde la parte central del implante hasta la periferia, donde se encuentra el tejido óseo, como en su momento han señalado Hoshikawa et al.³². También observamos la gran diferencia que existe en este ratio entre los dos cementos y el vidrio bioactivo. Es muy importante estudiar este parámetro, pues los mecanismos físico-químicos que controlan la disolución y precipitación de los compuestos también influyen en los procesos de fraguado y endurecimiento del cemento en el ambiente fisiológico del lugar de implantación³³. En general, la precipitación de un compuesto mineral a partir de una solución acuosa ocurre cuando la solución acuosa está sobresaturada de este compuesto mineral. Por el contrario, la disolución de un compuesto mineral tiene lugar cuando la solución acuosa que lo rodea está infrasaturada de dicho compuesto. Por ello, en el diseño de estos materiales se han tenido en cuenta los diagramas de solubilidad de los mismos en función del pH, pues las sales básicas se hacen menos solubles al aumentar el pH, mientras que las sales ácidas se hacen más solubles. No se puede conocer a priori las combinaciones de fosfatos de calcio que darán lugar a un producto cementante a temperatura ambiente, pues esto depende de muchos factores, como la reactividad de los productos, y la morfología de los cristales que precipitan. En

³¹ **Wong C. T., Lu W. W., Chan W. K., Cheung K. M. C., Luk K. D. K., Lu D. S., Rabie A. B., M., Deng L. F., Leong J. C. Y. (2003):** In vivo cancellous bone remodeling on a Strontiumcontaining hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **68A**, pps.: 513-521.

³² **Hoshikawa A., Fukui N., Fukuda A., Sawamura T., Hattori M., Nakamura K., Oda H. (2003):** Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials* **24**, pps.: 4967-4975.

³³ **Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. (1999):** Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10**, pps.: 169-176.

el caso del β -TCP, con una relación Ca/P de 1,5, sabemos que la fase que precipita es hidroxiapatita deficiente en calcio, de características muy similares a la fase mineral ósea, lo que asegura su comportamiento osteoconductor³⁴. Es importante señalar que la tendencia a la reabsorción, denominada solubilidad, y las propiedades mecánicas de los cementos no dependen sólo de su relación Ca/P, sino que se ven influidas por su microestructura, de forma que un tamaño de poro demasiado grande puede llevar a una cinética de reabsorción que no se adapte al proceso de remodelación ósea³⁵. Este proceso ocurre en nuestro cemento poroso pues, aunque los poros conseguidos mediante el agente espumante que añadimos en su preparación mejoran sus propiedades osteoinductoras al permitir un mayor crecimiento óseo dentro de los poros del material, su mayor solubilidad lleva a que su tendencia a la reabsorción sea superior a la formación de hueso, de forma que su resistencia mecánica sea débil, como han constatado otros LeGeros et al.³⁶.

En el análisis semicuantitativo (EDX) también determinamos la presencia de un pequeño porcentaje de **magnesio** dentro del vidrio implantado a partir de la duodécima semana y su presencia, en una proporción superior, en los dos cementos durante todo el estudio. Hoshikawa et al.¹² también detectaron la presencia de este mineral en un trabajo en el que realizaron un análisis cuantitativo seriado tras la implantación de un cemento de fosfato de calcio compuesto de fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico. La importancia de su

³⁴ **Driessens F.C.M., Boltong M.G., Bermúdez O., Planell J.A., Ginebra M.P., Fernández E. (1994):** Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **5**, pps.: 164-170.

³⁵ **LeGeros R.Z., Lin S., Rohanizadeh R., Mijares D., LeGeros J.P. (2003):** Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, pps.: 201-209.

³⁶ **Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1999):** Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the $\text{CaHPO}_4\text{-}\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10**, pps.: 223-30.

presencia viene determinada porque el magnesio es uno de los minerales esenciales en el tejido óseo y está asociado con los procesos de cristalización y calcificación del hueso y las apatitas³⁷. Esto se ajusta a los resultados histológicos que nosotros obtuvimos, en los cuales vemos que el vidrio comienza su disolución y la formación ósea a las doce semanas, coincidiendo con el período del estudio en que determinamos la presencia de magnesio en el material. En los dos cementos el magnesio está siempre presente en el material, concordando con el estudio histológico en que aparece formación de tejido óseo y remodelación ósea desde el primer momento del estudio.

Otros autores han detectado un aumento de los niveles de calcio y fósforo en la interfase entre el cemento y el hueso^{38,39,40}. En el caso de Wong et al.³⁸, encontraron un área más clara, de unas 70 micras de espesor, en esta zona de unión, en la que los niveles de fósforo y calcio eran mayores a los medidos tanto en el hueso como en el cemento de hidroxiapatita y estroncio que habían implantado. Los niveles elevados se mantuvieron durante todo el estudio; para estos autores es una clara evidencia de que el hueso crecía dentro del cemento de HA-Sr. Tay et al.³⁹ también detectaron niveles altos de calcio y fósforo en la superficie entre el vidrio ionómero adhesivo que estudiaron y la dentina, apreciándose un aumento de densidad. Estos autores interpretaron esta zona como una manifestación ultraestructural de la interacción entre el

³⁷ Serre C.M., Papillard M., Chavassieux P., Voegel J.C., Boivin G. (1998): Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. *Journal of Biomedical Material Research* **42**, pps: 626-633.

³⁸ Wong C. T., Lu W. W., Chan W. K., Cheung K. M. C., Luk K. D. K., Lu D. S., Rabie A. B., M., Deng L. F., Leong J. C. Y. (2003): In vivo cancellous bone remodeling on a Strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **68A**, pps.: 513-521.

³⁹ Tay F.R., Sano H., Tagami J., Hashimoto M., Moulding K.M., Yiu C., Pashley D.H. (2001): Ultrastructural study of a glass ionomer-based, all-in-one adhesive. *Journal of Dentistry* **29**, pps.: 489-498.

⁴⁰ Chen Q.Z., Wong C.T., Lu W.W., Cheung K.M.C., Leong J.C.Y., Luk K.D.K. (2004): Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo. *Biomaterials* **25**, pps.: 4243-4254.

material y la dentina. Por último, Chen et al.⁴⁰, mediante el estudio de la unión del tejido óseo a una hidroxiapatita cristalina determinaron que, aunque existe gran dispersión en los valores de calcio y fósforo a lo largo de la interfase, la cantidad de calcio y fósforo era mayor en la zona de unión con la hidroxiapatita que en la matriz ósea cercana, y esto concuerda con los resultados obtenidos por Kokubo et al.⁴¹. En los cementos que nosotros implantamos también apreciamos un área más clara de unas 10 micras de espesor en el lugar de unión de los dos biomateriales con el hueso. Esta área aparece en el cemento poroso a las cuatro y doce semanas de la implantación, y en el cemento denso a las doce semanas. Los niveles de calcio y fósforo en esta zona presentaron un aumento en relación a los que determinamos en el implante y en el hueso revelando, como en el caso de los autores que hemos detallado, la interacción entre el material implantado y el tejido óseo que se está formando alrededor.

6.4. MICROTOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA

Las imágenes obtenidas mediante ^{99m}Tc muestran gran coherencia con los resultados histológicos e histomorfométricos, pues podemos apreciar como en los cementos los fenómenos de reabsorción y remodelación ósea ocurren de forma progresiva, mientras que en el caso del vidrio, tanto el inicio de estos procesos como su evolución son mucho más lentos. Aunque nosotros hemos empleado esta técnica de forma muy superficial, debemos destacar que existen muy pocos autores que hayan aplicado este procedimiento y por ello las referencias que tenemos de su uso son muy actuales. De esta forma,

⁴¹ Kokubo T., Ito S., Huang Z.T., Hayashi T., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T. (1990): Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Material Research* **24**, pps.: 721-734.

Rustichelli et al.⁴² y Weiss et al.⁴³ han utilizado esta técnica para evaluar la arquitectura ósea y el crecimiento de hueso, así como la posible influencia del tamaño de poro en la respuesta del tejido hospedador a la implantación del material. Sin embargo, los resultados descritos por Weiss et al.⁴³ no permiten determinar detalladamente los procesos que tienen lugar en la interfase biomaterial-hueso. No obstante, dichos autores consideran que esta técnica puede ser muy útil para comparar las imágenes tridimensionales obtenidas con las provenientes de otros métodos laboratoriales microtomodensitométricos basados en fuentes de rayos X que, aunque son menos costosos, tienen menor resolución espacial y definición. La calidad de las imágenes también supone una ventaja frente a otras técnicas como el SEM, que no nos permite realizar análisis de volumen, y, por otro lado, la preparación de la muestra para someterla a este estudio ultramicroscópico puede modificar la estructura de la interfase entre el biomaterial y el hueso. La descripción en dos dimensiones de una muestra preparada para su visualización con el microscopio de barrido no es suficiente para representar la conectividad entre dos espacios, de forma que es imposible saber si las trabéculas óseas están interconectadas o no, o si existe colonización ósea, como relatan Gauthier et al.⁴⁴, que usaron la microtomografía computerizada en un estudio comparativo entre un cemento y otro sustituto óseo que diseñaron para confirmar la capacidad que desarrollan los dos biomateriales para unirse de forma íntima al hueso. Otra gran ventaja

⁴² Rustichelli F., Romanzetti S., Dubini B., Girardin E., Raven C., Snigirev A., Rizzi G. (2004): Phase-contrast microtomography of thin biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **15** (9), pps.: 1053-1057.

⁴³ Weiss P., Obadia L., Magne D., Bourges X., Rau C., Weitkamp T., Khairoun I., Bouler J.M., Chappard D., Gauthier O., Daculsi G. (2003): Synchrotron X-ray microtomography (on micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials* **24**, pps.: 4591-4601.

⁴⁴ Gauthier O., Khairoun I., Bosco J., Obadia L., Bourges X., Rau C., Magne D., Bouler J.M., Aguado E., Daculsi G., Weiss P. (2003): Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *Journal of Biomedical Material Research* **66 A**, pps.: 47-54.

que permite esta técnica es la obtención de imágenes de animales vivos, por lo que puede estudiarse la evolución a lo largo del tiempo en el mismo animal, permitiendo reducir el número de animales y de muestras empleados, de forma que los estudios son menos costosos y más rápidos. En síntesis, este tipo de estudios forman parte del futuro de la investigación sobre biomateriales debido a las ventajas que ofrecen y a que los resultados que se obtienen son coherentes y complementarios a los obtenidos por los métodos bidimensionales.

6.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Aunque los estudios histológico e histomorfométrico se discutirán de forma independiente, muchos de los aspectos que trataremos a continuación se refieren a los dos, pues los resultados histológicos muestran gran coherencia con los histomorfométricos, debido a su complementariedad diagnóstica.

En primer lugar, debemos destacar que aunque se han realizado los análisis histológico e histomorfométrico desde el mismo corte histológico y que se ha buscado aquel en que la calidad del mismo asegure la fiabilidad de los resultados obtenidos, estos deben interpretarse con precaución, pues las medidas realizadas en diferentes puntos varían considerablemente debido al hecho de que frecuentemente el hueso neoformado en los bordes del defecto óseo es difícil de distinguir del hueso adyacente, que está sufriendo una remodelación activa como resultado del trauma quirúrgico generado. De esta forma, como afirman Apelt et al. en un estudio en que comparan el comportamiento de tres tipos diferentes de cementos, el área de las medidas

histomorfométricas realizadas puede desviarse ligeramente del resultado real⁴⁵. En este sentido, los defectos cavitarios vacíos, establecidos como control, aportan una importante información cualitativa.

Comenzando por la información que aporta el estudio histológico, destacamos que uno de los puntos importantes es que podemos verificar que, en el caso de los cementos, el defecto cavitario se llenó completamente con el material, y esto es muy importante porque una buena **aposición** del material inyectado con el tejido óseo hospedador favorece la biocompatibilidad y el fenómeno de osteogénesis, como destacan Gisep et al. en un trabajo en que compararon distintos patrones de reabsorción de dos cementos de fosfato de calcio, uno monofásico y otro bifásico, en dos lugares de implantación diferentes, fémur distal y tibia proximal, usando como animal de experimentación ovejas⁴⁶. La **biocompatibilidad** es una de las características más importantes que debe poseer cualquier implante candidato a ser utilizado como sustituto del tejido óseo, como afirman Sepúlveda et al.¹³. Aunque esta propiedad es inherente a cada material, existen distintos factores que tienen un efecto sobre la misma. Así, el tiempo de fraguado ejerce una acción importante sobre ella y sobre la osteoconductividad, como afirman Frayssinet et al.⁴⁷, estos autores compararon la respuesta de un cemento de fosfato de calcio implantado de dos formas diferentes: en la primera, su implantación se realizó tras el fraguado del cemento y en la segunda, el fraguado se produjo después de la implantación. Sus resultados demostraron que el material sólido parecía tolerarse mejor que

⁴⁵ Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger R., Böhner M., Matter S., Auer J.A., von Rechenberg B. (2004): In vivo behavior of the different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* **25**, pps.: 1439-1451.

⁴⁶ Gisep A., Wieling R., Böhner M., Matter S., Schneider E., Rahn C. (2002): Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone. *Journal of Biomedical Material Research* **66 A**, pps.: 532-540.

⁴⁷ Frayssinet P., Roudier M., Lerch A., Ceolin JL, Depres E, Rouquet N. (2000): Tissue reaction against a self-setting calcium phosphate cement set in bone or outside the organism. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **11(12)**, pps.: 811-815.

el inyectable, y también encontraron más tejido óseo neoformado y menor degradación del material en este caso. La conclusión que aportaron estos autores es que existen diversas modificaciones físico-químicas del medio biológico que rodean al material durante el fraguado que incrementan la posibilidad de que se desarrolle una reacción de cuerpo extraño al material o que la respuesta de cada cemento de fosfatos de calcio sea muy diferente e imposible de extrapolar. Entre las modificaciones que pueden variar los patrones de **reabsorción** Niedhart et al.¹⁶ destacan:

-Variaciones de pH: estos autores han determinado que puede disminuir entre 2 y 4 puntos en el momento del fraguado y mantenerse así durante un período inicial tras la implantación.

-La dilución de diferentes componentes de la formulación, lo que lleva a una mayor desintegración del material. La disgregación de un mayor número de partículas favorece el desarrollo de numerosos macrófagos en la vecindad del implante, que liberan diferentes factores que afectan a los osteoblastos, pudiendo llevar a un retraso en la osificación.

-La aparición de sangre en el lecho óseo, pues la presión sanguínea puede modificar la porosidad del material, favorecer su descohesión o impedir la buena aposición al tejido adyacente; por otro lado, ciertas proteínas que aparecen en la sangre pueden retardar el tiempo de fraguado, exacerbando los procesos anteriormente citados, como relatan Orsini et al.⁴⁸.

Autores como Moghadam et al. han encontrado como respuesta a la fragmentación del cemento de fosfatos de calcio que implantaron la **formación**

⁴⁸ Orsini G., Ricci J., Scarano A., Pecora G., Petrone G., Leéis G., Piatelli A. (2004): Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: An experimental study in rabbit. *Journal of Biomedical Material Research* **66 B**, pps.: 199-208.

de una lámina de tejido fibroso⁴⁹. La explicación a este proceso es que si el material no fragua adecuadamente antes de proceder al cierre de la incisión quirúrgica, o si se contamina con algún fluido postoperatoriamente, el material no fraguado se disocia en pequeñas partículas. Estas partículas de cemento dan lugar a una reacción inflamatoria, que se caracteriza por la presencia de células gigantes multinucleadas. Otros autores han encontrado reacciones inflamatorias similares a la implantación de cementos de fosfato de calcio. Kurashina et al. descubrieron que 4 de los 12 animales que fueron implantados habían perdido su implante debido al sangrado producido en los tejidos que lo rodeaban⁵⁰. Estos autores habían evaluado el comportamiento del cemento en distintos fluidos que simulaban los fisiológicos, y en ellos la reacción de fraguado se producía a la perfección; pero al probar en sangre, el cemento no consiguió fraguar. Aunque otros autores que observaron este proceso lo justificaron como una respuesta celular, la explicación que Kurashina et al. aportaron es que el ión de magnesio presente en la sangre puede impedir el proceso de fraguado⁵⁰. A este fenómeno se le conoce como “decaimiento del sangrado” y fue sugerido por Pioletti et al. (2000), que confirmaron este fenómeno en cultivos celulares de osteoblastos con partículas de cementos de fosfatos de calcio⁵¹. En nuestro caso, gracias al uso de alginato de sodio como agente acelerante del fraguado y al amplio estudio previo que se hizo para determinar el tiempo de cohesión y de fraguado, determinando así el momento óptimo para inyectar los cementos, este tipo de procesos no tuvo lugar, de

⁴⁹ **Moghadam H.G., Sándor G.K.B., Holmes H.H.I., Clokie C.M.L. (2004):** Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic substitutes. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **62 (2)**, pps.: 202-213.

⁵⁰ **Kurashina K., Kurita H., Kotani A. (1998):** Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an α -tricalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short term experiment in rabbits. *Biomaterials* **19**, pps.: 701-716.

⁵¹ **Pioletti D.P., Takei H., Lin T. (2000):** The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function. *Biomaterials* **21**, pps.: 1283-2000.

forma que en ningún caso apareció una lámina de tejido fibroso rodeando al implante, ni se vieron retrasados la reabsorción del material o el proceso de osteogénesis. Podemos afirmar así que los tres biomateriales que hemos implantado son biocompatibles y que en ningún caso se observaron reacciones de cuerpo extraño, inflamatorias o necrosis. Autores como Yuan et al.⁵² aseguraron que la biocompatibilidad es una propiedad común de los biomateriales, tanto cementos como vidrios y cerámicas, pues el fosfato de calcio es uno de los constituyentes inorgánicos principales del tejido óseo y los iones de calcio y fósforo libres pueden ser usados por el metabolismo. En el caso del vidrio que hemos desarrollado posee una pequeña cantidad de titanio, que en algún estudio previo parece haber provocado fenómenos de migración, pero raramente de rechazo.

La **osteotransductividad** es otro fenómeno que debemos valorar en nuestros implantes. Este fenómeno se define como “sustitución progresiva” y corresponde al proceso completo de reabsorción y formación ósea en la laguna de reabsorción. En nuestro estudio podemos apreciar que, tanto en los cementos como en el vidrio, el hueso que está en pleno proceso de osteogénesis se une directamente al material implantado, pudiendo afirmar que los tres materiales son osteointegrables, propiedad básica para llevar a cabo los procesos de osteogénesis y osteoconducción. Esta unión directa ocurre a partir de las cuatro semanas de estudio en los cementos, y en el vidrio a partir de las doce semanas.

Hablando de otros fenómenos que conforman el proceso de osteotransducción, tanto la reabsorción del material como la formación de hueso nuevo es mucho más rápida en los dos cementos que en el vidrio, así como la aparición de

⁵² Yuan H., Yang Z., Li Y., Zhang X., De Bruijn J.D., De Groot K. (1998): Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9, pps.: 723-726.

tejido osteoide, que indica el proceso de mineralización del hueso inmaduro. Esto indica que los cementos son mucho más osteotransductivos que el vidrio. Debemos destacar aquí, aunque ya tratamos este punto en el apartado correspondiente a los resultados obtenidos mediante microscopía de barrido, que el cemento poroso tiene una tasa de reabsorción muy superior a la del cemento denso, y esto conlleva numerosas desventajas a nivel biomecánico. También comentamos que la gran estabilidad del vidrio implantado inhibe el proceso de reabsorción, el cual va ligado al de formación ósea, y por ello sus propiedades osteotransductivas son inferiores, como también observaron Voor et al. comparando un cemento de hidroxiapatita mezclado por un lado con gránulos porosos de fosfato de calcio (mayoritariamente TCP) y por el otro con hueso trabecular alogénico⁸. Estos autores determinaron que la incorporación de pequeñas cantidades de hueso alógeno al cemento mejoraba sus propiedades osteotransductivas.

Si bien hemos definido con anterioridad distintos factores que influyen en la reabsorción pasiva, o disolución química, a que se ven sometidos los materiales desarrollados en este estudio, y el fracaso a que pueden llevar en su osteointegración debido a la formación de una lámina de tejido fibroso alrededor de ellos, también es importante indicar que, de forma habitual, existe una **reabsorción mediada por células**, o reabsorción activa; este fenómeno ha sido detallado por Theiss et al. (2005) al describir los fenómenos de biocompatibilidad y reabsorción que experimentan los gránulos de β -fosfato tricálcico embebidos en una matriz de fosfato dicálcico dihidrato⁵³. El comportamiento de esta respuesta celular ha sido objeto de numerosos trabajos y gracias a ello podemos describir dos tipos de procesos:

⁵³ Theiss F., Apelt D., Brand B., Kutter A., Zlinszky K., Bohner M., Matter S., Frei C., Auer J.A., von Rechenberg B. (2005): Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 26, pps.: 4383-4394.

- a) Por un lado, los macrófagos y células gigantes multinucleadas participan en la biodegradación de los materiales que se reabsorben con rapidez.
- b) En los implantes que se reabsorben de forma lenta participan los osteoclastos.

Por ello, los macrófagos juegan un papel importante en la homeostasis de la formación y reabsorción ósea, de forma que su presencia en los cementos de rápida reabsorción en que no existe fibroosteointegración o reacciones inflamatorias se considera normal.

Lu et al. describieron en un estudio en que compararon el mecanismo de biodegradación de una cerámica de β -TCP, un cemento de fosfato de calcio y una cerámica de hidroxapatita, como la biodegradación observada en el cemento de fosfato de calcio se produce acompañada de un descenso del volumen de material desde la periferia al centro, reabsorción centrípeta, así como con la formación de pequeñas partículas de material que son fagocitadas por los macrófagos y las células gigantes multinucleadas¹⁰. En cambio, en la cerámica de β -TCP, aunque su reabsorción se produce de forma similar, no aparecen pequeñas partículas de material y hay una ausencia total de macrófagos que lleven a cabo procesos de fagocitosis. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por nosotros, pues el patrón de reabsorción que ellos describieron para la cerámica se ajusta enormemente al que nosotros observamos en el vidrio bioactivo, donde determinamos la presencia mayoritaria de osteoclastos en el tejido que lo rodea en su fase de reabsorción; por otro lado, el proceso de reabsorción que ellos observaron para el cemento también se ajusta al que nosotros obtuvimos en nuestros cementos, tanto en el denso como en el poroso, con la presencia de macrófagos envolviendo a los cementos mientras se produce su reabsorción activa. En este caso, se puede afirmar que la presencia de pequeñas partículas de material disgregadas tras la

implantación de los cementos es debida a un proceso físico-químico que sufren los cementos de fosfatos de calcio, que se ve beneficiado por una baja cristalización. En cambio, el vidrio bioactivo sufre un proceso de sinterización diferente que conlleva una estructura más cristalizada, de forma que no encontramos pequeñas partículas de material disgregadas. Esta observación fue hecha por Lu et al. y explica a su vez que el proceso de reabsorción de los cementos sea mucho más rápido que el del vidrio, de forma que la neoformación ósea se produce de forma más temprana¹⁰. Wong et al. también observaron la presencia de células multinucleadas en la superficie de reabsorción del cemento que diseñaron, compuesto de HA y estroncio, otorgándoles una función similar a los osteoclastos, sin suponer ningún tipo de reacción inflamatoria³¹. A su vez, Hoshikawa et al. también advirtieron la presencia de células gigantes multinucleadas en la superficie de un cemento de fosfato de calcio que diseñaron, formado por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhidro¹². Estos autores demostraron mediante estudios histoenzimáticos que las células que aparecían en la superficie del cemento implantado se teñían positivamente para la actividad TRAP, un marcador enzimático de los osteoblastos, por lo que se puede asegurar que este cemento resultó reemplazado de forma eficiente por hueso a través de un proceso normal de acoplamiento osteoblasto-osteoclasto, que confirma sus propiedades osteoconductoras. Niedhart et al. también encontraron gran cantidad de células gigantes multinucleadas cerca del cemento que implantaron en la epífisis femoral distal de ovejas, mostrando la presencia de vacuolas intracelulares con partículas minerales en su interior, que indican un proceso de fagocitosis¹⁶. Estos autores no detectaron reacciones inflamatorias al implante, por lo que afirmaron, como nosotros, que la existencia de este tipo

celular en los procesos de reabsorción no puede ser interpretado siempre como una reacción inflamatoria.

Otro fenómeno que debemos discutir es la **neoformación ósea**, que, como detallan Wong et al. se muestra por la gran concentración de osteoblastos, mayor que en otras áreas de hueso, que aparece en la interfase entre el hueso y el material implantado³¹. También es importante observar la proporción de tejido osteoide que aparece pues indica que, al mismo tiempo que sucede el proceso de neoformación, también está ocurriendo un proceso de remodelación y maduración ósea mediante la mineralización de tejido óseo inmaduro. Este fenómeno es descrito por Fini et al. en un estudio en el que valoran la función osteoblástica y de formación de hueso en relación a un compuesto formado por polimetacrilato y β -TCP¹¹. Nosotros podemos verificar la gran capacidad osteogénica de los dos cementos implantados, tanto histológicamente como con los resultados histomorfométricos determinados (mediante la presencia de gran número de osteoblastos, gran cantidad de tejido osteoide, el aumento progresivo de la superficie porcentual de hueso neoformado y de la relación entre el área de osteoide con respecto al área trabecular total), y las diferencias estadísticas que encontramos con el vidrio bioactivo, demostrando su menor capacidad osteoinductiva. Lu et al. también puntualizaron distintos aspectos sobre el proceso de osteogénesis, indicando las diferencias que existen en este proceso en función del lugar de implantación, como ya comentamos con anterioridad¹⁰. A esta variación en el fenómeno de la osteogénesis en función del lugar de implantación también se refieren Constantz et al. que justifican esta desigualdad debido a que la tasa de flujo sanguíneo en el hueso trabecular es muy superior a la presente en el hueso cortical, como consecuencia de la diferente organización de vasos y

capilares sanguíneos que presentan⁵⁴. En este sentido, del Real et al. afirman la necesidad de realizar la implantación de estos biomateriales en lugares ectópicos, tales como zonas de tejido muscular, con el objetivo de determinar si las propiedades osteoinductivas de los implantes son reales o se ven influenciadas por los procesos propios de osteogénesis ósea⁵⁵. En este trabajo no hemos realizado esta fase del experimento, que será objeto de estudios posteriores.

6.6. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO

Respecto a los resultados histomorfométricos, debemos tener en cuenta una serie de consideraciones. En primer lugar, el **área de implante** debería ser 28,274 mm², debido a que el orificio realizado tiene un diámetro en toda su profundidad de 6 mm. De todas formas, las áreas medidas no se corresponden con este resultado, debido a la influencia de la perpendicularidad del corte efectuado. Esta medida es una de las más importantes pues entrega el valor de referencia para el resto de los parámetros histomorfométricos. En nuestro caso, hemos extrapolado todos los resultados igualando las distintas medidas al área de implante teórica, para tener la seguridad de que los resultados obtenidos al comparar el resto de parámetros histomorfométricos son reales.

Al hablar sobre el **área trabecular total**, debemos tomar esta medida como relativa y compararla con el área del implante, pues también está influida por el corte histológico y a mayor oblicuidad de éste las trabéculas óseas pueden aparecer con mayor área. Los resultados obtenidos para los cementos óseos

⁵⁴ Constantz B., Ison I., Fulmer M., Poser R., Smith S., VanWagoner M., Ross J., Goldstein S.A. (1995): Skeletal repair by in situ formation of mineral phase of bone. *Science* **267**, pps.: 1796-1799.

⁵⁵ del Real R.P., Ooms E., Wolke J.G., Vallet-Regi M., Jansen J.A. (2003): In vivo response to porous calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Material Research* **65 A**, pps.: 30-36.

de nuestro estudio son ligeramente superiores a los logrados por otros autores tras implantar una cerámica de fosfatos de calcio en el mismo lugar de implantación, e inferiores para el vidrio bioactivo tanto a las cuatro como a las doce semanas, lo que indica que los cementos inducen la formación de hueso más rápidamente, siendo a su vez las cerámicas más rápidas que el vidrio bioactivo que hemos implantado¹⁰.

Otra medida muy importante es la **profundidad de crecimiento**, pues permite objetivar el crecimiento medio del hueso neoformado que progresa de forma centrípeta desde los bordes del defecto óseo creado. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la profundidad de crecimiento a las cuatro y doce semanas en el cemento poroso, pero al comparar los distintos grupos las diferencias estadísticas sólo se establecen entre los dos cementos con respecto al vidrio y al defecto cavitario control, confirmando las buenas propiedades osteoconductoras de los cementos, muy superiores a las detentadas por el vidrio bioactivo, que, como ya apreciamos histológicamente, no comienza su neoformación ósea hasta las doce semanas.

La **longitud total de osteoide** aporta información sobre el hueso inmaduro neoformado que se encuentra en vías de calcificarse, e indica la cantidad de borde trabecular en que se produce la formación ósea. En nuestros resultados vemos que aumenta de forma estadísticamente significativa en los cementos a lo largo del estudio, y esta diferencia se mantiene al compararlos con el vidrio bioactivo; estos resultados se relacionan con los obtenidos para el área trabecular total, y confirman que la neoformación ósea es mucho más lenta en el vidrio bioactivo que en los cementos óseos. Muy ligado a este parámetro está la **amplitud media de osteoide**, que se corresponde con el grosor de los ribetes de osteoide presentes en el defecto óseo creado. Es un indicador

directo de la actividad osteoblástica, y es importante destacar que los resultados obtenidos se correlacionan con los anteriores, indicando una importante calcificación del osteoide en los cementos óseos, que mantienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto al vidrio bioactivo, constatando su lentitud en el proceso de formación ósea, y por tanto de mineralización del hueso neoformado. Estas dos medidas nos permiten obtener el **área de osteoide**; los resultados obtenidos para este parámetro son ligeramente superiores a los obtenidos en otros estudios¹⁰, mostrando la rápida formación ósea que promueven los cementos óseos al compararlos con una cerámica de fosfatos de calcio, y la lentitud en este proceso que desarrolla el vidrio bioactivo implantado. Este parámetro se relaciona a su vez con el área trabecular total, aportándonos un valor porcentual de la neoformación ósea generada. Nuestros resultados confirman que los valores obtenidos para el área de osteoide tienen una relación directa con el área trabecular total, por lo que se mantienen las diferencias estadísticamente significativas de los dos cementos óseos con respecto al vidrio bioactivo y al defecto cavitario control.

El **área de biomaterial no reabsorbido** es de gran importancia, porque indica la velocidad de reabsorción de los biomateriales. Los resultados obtenidos en la valoración histológica coinciden con los valores histomorfométricos, pues el biomaterial se va reabsorbiendo de forma gradual y significativa en los dos cementos, sin llegar a apreciarse reabsorción en el vidrio bioactivo. Asimismo, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el cemento poroso y el denso a las cuatro semanas y doce semanas, pues la tasa de reabsorción del primero es muy superior. Aunque ya discutimos este punto, debemos insistir en la necesidad de que exista una adecuada correlación entre las velocidades de reabsorción del material y la osteoformación, y este parece ser un factor crítico en el cemento poroso.

La **superficie porcentual de hueso neoformado** es un parámetro obtenido al dividir el área trabecular total entre el área de implante, y permite conocer el valor porcentual de la neoformación ósea. Es uno de los parámetros más utilizados en los estudios *in vivo*. En nuestro estudio, los dos cementos porosos presentan una mayor tasa de regeneración ósea durante todo el período, que es estadísticamente significativa con respecto al vidrio bioactivo, mostrando una vez más la lenta y escasa osteoformación ósea que genera el vidrio bioactivo.

Con todos los resultados histomorfométricos que acabamos de interpretar relativos al área trabecular total, área de biomaterial no reabsorbido, profundidad de crecimiento, superficie porcentual de hueso neoformado, longitud total de osteoide, amplitud media de osteoide, área de osteoide y relación **área de osteoide/área trabecular total**, podemos afirmar que los valores obtenidos en cada uno de los materiales son coherentes con los resultados histológicos y, al compararlos con los descritos por otros autores^{10,12,16,45,53,55} aseveramos que, aunque los procesos de reabsorción, neoformación y remodelación ósea del vidrio bioactivo que hemos estudiado son más lentos que los dos cementos que también hemos implantado, cualquiera de ellos poseen unas propiedades de biocompatibilidad y osteoconductoras similares a las obtenidas por estos otros estudios utilizando biomateriales con una composición parecida, lo que significa que las variaciones obtenidas en cada uno de ellos como consecuencia de su diferente composición, tiempo de fraguado, macroporosidad... condicionan su posible aplicación biomédica.

Por último, y en vista a los resultados obtenidos, debemos reiterar que lo más importante a la hora de diseñar un implante es:

- Conseguir, en el caso de los cementos basados en fosfatos de calcio, una buena coordinación entre las dos fases del proceso osteotransductivo, que parece no ser óptima en el caso del cemento poroso que hemos desarrollado.

- Conseguir que la formulación de los materiales vítreos obtenga unas propiedades de bioabsorción concordantes a las de las apatitas biológicas, que es un punto crítico en el vidrio bioactivo desarrollado en nuestro estudio, ya que generó una lenta velocidad de reabsorción y formación ósea en el defecto cavitario creado.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

Tras haber expuesto los resultados obtenidos y realizar la discusión de los mismos, procederemos a concluir los aspectos más importantes de este trabajo, dando respuesta a los objetivos que inicialmente nos habíamos planteado:

- Existe una buena aceptabilidad biológica de los tres biomateriales, al no apreciarse en ningún caso fenómenos de osteolisis, fracturas óseas ni reacciones de cuerpo extraño.
- Los cementos óseos fomentan una unión directa con el hueso hospedador más precoz que en el caso del vidrio bioactivo.
- Los cementos óseos poseen unas excelentes propiedades osteoconductoras y osteotransductoras. Dichas cualidades son peores en el vidrio bioactivo.
- La aplicación de un agente espumante en el desarrollo de los cementos óseos aumenta el número de poros que se desarrollan, optimizando su capacidad de reabsorción. Sin embargo, las propiedades osteoconductoras no se ven correlativamente mejoradas, influyendo negativamente en su resistencia biomecánica.
- Ambos cementos óseos favorecen una mineralización ósea más temprana que en el caso del vidrio bioactivo.
- La mayor capacidad osteogénica que manifiestan los cementos óseos con respecto al vidrio bioactivo es debida a que poseen un ratio calcio/fósforo muy similar al del tejido óseo.

En consecuencia, podemos afirmar que con la metodología utilizada en el análisis de la respuesta ósea generada por los tres biomateriales incluidos en

este estudio hemos conseguido una buena herramienta para profundizar en su comportamiento como sustitutivos óseos, reflejando como conclusión final:

“Tanto los cementos óseos como el vidrio bioactivo que hemos implantado enlazan directamente con el tejido óseo circundante al ser implantados en defectos cavitarios en el cóndilo distal del fémur de conejo, mostrando así su capacidad osteointegradora, aunque debemos destacar que esta osteointegración se manifiesta en el caso del vidrio bioactivo de forma tardía con respecto a los cementos óseos”.

Esta afirmación nos permite expresar con total seguridad que:

“Los cementos óseos y el vidrio bioactivo basados en fosfatos de calcio son biomateriales osteoconductivos, biocompatibles y biodegradables, que se comportan como sustitutivos óseos en la reparación de los defectos cavitarios experimentales, aunque el vidrio bioactivo nuevamente desarrolla estas propiedades más lentamente que los cementos óseos”.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**



Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Albrektsson T., Johansson C. (2001):** Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* **10 (Suppl)**, pps.: S96-S101.
2. **Almirall A., Delgado J.A., Ginebra M.P., Planell J.A. (2004):** Effect of albumen as protein-based foaming agent in a calcium phosphate bone cement. *Key Engineering Materials* **254-256**, pps.: 253-256.
3. **Almirall A., Larrecq G., Delgado J.A., Martínez S., Planell J.A., Ginebra M.P. (2004):** Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials* **25**, pps.: 3671-80
4. **An Y.H., Wolf S.K., Friedman R.J. (2000):** Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* **21**, pps.: 2635-52.
5. **Anselme K., Noel B., Flautre B., Blary M.C., Delecourt C., Descamps M., Hardouin P. (1999):** Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. *Bone* **25 (Suppl)**, pps.: 51-54.
6. **Aoki H., Kato K., Ebihara M, Inoue M. (1976):** Studies on the application of apatite to dental materials. *The Journal of Dental Engeering* **17**, pps.: 200.
7. **Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger R., Bohner M., Matter S., Auer J.A., Von Rechenberg B. (2004):** In vivo behavior of the different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* **25**, pps.: 1439-1451.
8. **Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger R., Bohner M., Matter S., Auer J.A., Von Rechenberg B.**

- (2004): In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* **25**, pps.: 1439-1451.
9. **Asián E., Conde M. D. (2002):** Complicaciones y fracasos en implantología. En *Integración de la Implantología en la Práctica Odontológica*. Gutiérrez Pérez J. L., García Calderón M (Eds.). Ediciones Ergon, España, pps. 251-260.
10. **Athanasίου K.A., Niederauer G.G., Mauli Agrawal C. (1996):** Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* **17**, pps.: 93-102.
11. **Aulas prácticas de Anatomía Patológica de la FCM de la UNICAMP.** *Página Web de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNICAMP*, puesta al día el 7 de diciembre de 2005 [<http://www.fcm.unicamp.br/>] (Consultada el 1 de abril de 2005).
12. **Babbush C. A. (1972):** Endosseous blade-vent implants: a research review. *Journal of Oral Surgery Marine* **30(3)**, pps.:168-75.
13. **Bacha W.J., Bacha L. M. (2001):** Hueso. En *Atlas Color de Histología Veterinaria*. Bacha W.J., Bacha L. M (Eds.), 2ª edición Inter-Médica, Buenos Aires (Argentina), pps.: 21-27.
14. **Banks W.J. (1986):** Supportive Tissues-Bone. En *Applied Veterinary Histology*. Banks W.J. (Ed), 2º edición Williams and Wilkins, Baltimore (USA), pps.: 119-145.
15. **Bauer T.W., Muschler G.F. (2000):** Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **371**, pps.: 10-27.
16. **Bauer T.W., Smith S.T. (2002):** Bioactive materials in orthopaedic surgery. Overview and regulatory considerations. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 11-22.

17. **Bermúdez O., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1993):** Compressive strength and diametrical tensile strength of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **4**, pps.: 389-393.
18. **Bert J.D. (1981):** Differential diagnosis and treatment of root angulation problems. *Dental Clinics of North America* **25(1)**, pps.:85-93.
19. **Bert J.D. (1996):** Custom total hip arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* **11(8)**, pps.:905-915.
20. **Bert M., Missika P. (1997):** Anestesia, incisiones, colgajos, suturas. En *Implantología Quirúrgica y Protésica*. Bert M., Missika P. (Eds.) Masson, España, pps. 45-52.
21. **Bert M., Missika P. (1997):** Osteointegración. En *Implantología Quirúrgica y Protésica*. Bert M., Missika P. (Eds.) Masson, España, pps. 3-10.
22. **Blom E.J., Klein-Nulend J., Wolke J.G., Van Waas M.A., Driessens F.C.M., Burger E.H. (2002):** Transforming growth factor-1 incorporation in calcium phosphate bone cement: material properties and release characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research* **59**, pps.: 265-272.
23. **Bohner M. (2000):** Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* **31, Suppl.4**, pps.: 37-47.
24. **Bohner M. (2001):** Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal* **10**, pps.: 114-121.
25. **Bohner M. (2004):** New hydraulic cement based on α -tricalcium phosphate-calcium sulfate dihydrate mixtures. *Biomaterials* **25**, pps.:741-749.
26. **Bohner M., Lemaitre J., Van Landuyt P., Zambelli P.Y., Merkle H.P., Gander B. (1997):** Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone

- cement as antibiotic delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **86**, pps.: 565-572.
27. **Bohner M., Theiss F., Apelt D., Hirsiger W., Houriet R., Rizzoli G., Gnos E., Frei C., Auer J.A., Von Rechenberg B. (2003):** Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* **24**, pps.: 3463-3474.
28. **Böstman O., Pihlajamäki H. (2000):** Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* **21**, pps.: 2615-2621.
29. **Bostrom M.P., Camacho N.P. (1998):** Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clinical Orthopaedics* **355 (Suppl)**, pps.: 274-282.
30. **Bostrom M.P., Saleh K.J., Einhorn T.A. (1999):** Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *The Orthopaedic Clinics of North America* **30**, pps.: 647-658.
31. **Boyde A. (1972):** Scanning electron microscope studies of bone. En *The Biochemistry and Physiology of Bone*, Vol I. Bourne G.H. (Ed.), Academic Press, New York, pps.: 259-264.
32. **Boyde A., Maconnachie E., Reid S.A. (1986):** Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications. *Scanning Electron Microscopy* **4**, pps.: 1537-1554.
33. **Bränemark P.I., Hansson B.O., Adell R., Breine U., Lindstrom J., Hallen O., Ohman A. (1977):** Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10 year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. Supplementum* **16**, pps.: 1-132.

34. **Bränemark P.I., Adell R., Albrektsson T., Lekholm U., Lindstrom J., Rockler B. (1984):** An experimental and clinical study of osseointegrated implants penetrating the nasal cavity and maxillary sinus. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **42(8)**, pps.:497-505.
35. **Bromer H., Pfeil E., Kas H.H. (1973):** *Patente alemana* **2**, 326, pp: 100.
36. **Brow R.K. (2000):** Review: the structure of simple phosphate glasses. *Journal of Non-Crystallographic Solids* **263-264**, pps.: 1-28.
37. **Brow R.K., Tallant D.R., Hidgens J.J., Martin S.W., Irwin A.D. (1994):** The short range structure of sodium ultraphosphate glasses. *Journal of Non-Crystallographic Solids* **177**, pps.: 221-228.
38. **Brown P.W., Fulmer M. (1991):** Kinetics of hydroxyapatite formation at low temperature. *Journal of the American Ceramic Society* **74**, pps.: 934-940.
39. **Brown W.E., Chow L.C. (1983):** A new calcium phosphate setting cement. *Journal of Dental Research* **62**, pps.: 672-681.
40. **Bryce R., Aspden R.M., Wytch R. (1995):** Stiffening effects of cortical bone on vertebral cancellous bone in situ. *Spine* **20**, pps.: 999-1003.
41. **Bucholz R.W. (2002):** Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **395**, pps.: 44-52.
42. **Burchardt H. (1983):** The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **174**, pps.: 28-42.
43. **Burg J.L., Burg, Porter S., Kellam F. (2000):** Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **21**, pps.: 2347-2359.
44. **Burnie J., Gilchirst T., Duff S.R.I., Drake C.F., Harding N.G.L., Malcolm A.J. (1981):** Controlled release glasses (C.R.G.) for biomedical uses. *Biomaterials* **2**, pps.: 244-246.

45. **Caeiro-Rey J.R., Dapía R.S., Vaquero-Cervino E., Roca R.L., García D. C., Blanco-Ramos M. (2005):** Determinantes de la resistencia ósea. *Educación Médica Continuada en Traumatología*, pps.: 11-16.
46. **Cartmell S.H., Doherty P.J., Rhodes N.P., Hunt J.A., Healy D.M., Gilchrist T. (1998):** Haemocompatibility of controled release glass. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **9**, pps.: 1-7.
47. **Cassidy C., Jupiter J.B., Cohen M., Delli-Santi M., Fennell C., Leinberry C., Husband J., Ladd A., Seitz W.R., Constanz B. (2003):** Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **85 A**, pps.: 2127-2137.
48. **CEN (Comité Europeo de Normalización):** Norma Española UNE-en 30993-6. *Evaluación biológica de los productos sanitarios*. Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación (ISO 10993-6:1994). AENOR, Madrid, 1995.
49. **Chen Q.Z., Wong C.T., Lu W.W., Cheung K.M.C., Leong J.C.Y., Luk K.D.K. (2004):** Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo. *Biomaterials* **25**, pps.: 4243–4254.
50. **Chena Q.Z., Wongb C.T., Lub W.W., Cheungb K.M.C., Leongb J.C.Y., Luk K.D.K. (2004):** Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo. *Biomaterials*, **25**, pps.: 4243-4254.
51. **Chow L.C. (1992):** Development of self-setting calcium phosphate cements. *Journal of the Ceramic Society of Japan* **99**, pps.: 927-936.
52. **Clément J., Ávila G., Navarro M., Martínez S., Ginebra M.P., Planell J.A. (2000):** Chemical durability and mechanical properties of calcium phosphate glasses with the addition of Fe₂O₃, TiO₂ and ZnO. *Bioceramics* **13**, pps.: 621-624.

53. **Clément J., Bjelkemyr A., Martínez S., Fernández E., Ginebra M.P., Planell J.A. (1999):** Analysis of the kinetics of dissolution and the evolution of the mechanical properties of a phosphate glasses stored in simulated body fluid. *Bioceramics* **12**, pps.: 375-378.
54. **Clément J., Ekeberg L., Martínez S., Ginebra M.P., Gil F.J., Planell J.A. (1998):** Influence of the chemical composition on the mechanical properties and in vitro solubility of phosphate glasses in the system P2O5-CaO-Na2O. *Bioceramics* **11**, pps.: 141-144.
55. **Clokic C.M., Moghadam H.G., Jackson M.T. et al. (2002):** Closure of critical sized defects with allogeneic and alloplastic bone substitutes. *Journal of Craniofacial Surgery* **13 (1)**, pps.: 111-121.
56. **Constantz B., Ison I., Fulmer M., Poser R., Smith S., VanWagoner M., Ross J., Goldstein S.A. (1995):** Skeletal repair by in situ formation of mineral phase of bone. *Science* **267**, pps.: 1796-1799.
57. **Daculsi G. (1998):** Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* **19**, pps.: 1473-1478.
58. **Dammaschkea T., Gerthb H. U.V., Züchnerb H., Schäfer E. (2005):** Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dental Materials* **21**, pps.: 731-738.
59. **Dapía R.S., Caeiro-Rey J.R., Blanco-Ramos M., Vaquero-Cervino E. (2005):** Microtomografía computerizada (μ -TC): Nueva técnica para la evaluación de la microestructura ósea. *Acta Ortopédica Gallega* **1 (1)**, pps.: 34-38.

60. De Bruijn J.D., Van Blitterswijk C.A., Davies J.E. (1995): Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *Journal of Biomedical Material Research* **29**, pps.: 89-99.
61. De Groot K. (1980): Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* **1**, pps.: 47-50.
62. Del Real R.P., Ooms E., Wolke J.G., Vallet-Regi M., Jansen J.A. (2003): In vivo response to porous calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Material Research* **65A**, pps.: 30-36.
63. Del Real R.P., Wolke J.G., Vallet-Regi M., Jansen J.A. (2002): A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials* **23**, pps.: 3673-3680.
64. Delahaye F, Montagne L, Palavit G, Touray JC, Baillif P (1998): Acid dissolution of sodium-calcium metaphosphate glasses. *Journal of Non-Crystallographic Solids* **242**, pps.: 25-32.
65. Dellmann H.D. (1993): Tejidos conjuntivos y de sostén. En *Histología Veterinaria*. Dellmann (Ed), Acribia, S.A., Zaragoza (España), pps.: 31-58.
66. Delloye C., Cnockaert N., Cornu O. (2003): Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthopaedica Belgica* **69**, pps.: 1-8.
67. Domínguez Z.R., Cortés M.E., Gomes T.A., Diniz H.F., Freitas C.S., Gomes J.B., Faria A.M.C., Sinisterra R.D. (2004): Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with β -Cyclodextrin. *Biomaterials* **25**, pps.: 327-333.
68. Doms R.C. (1974): The tissue response to endosteal blade implants-microradiographic and tetracycline marking. I. *Oral Implantology* **4(4)**, pps.: 470-474.
69. Donado A., Guisado B., Ortega R. y Sanz J. V. (2003): Respuesta ósea en implantología. Osteointegración. En *Anatomía Implantológica. Bases*

Morfológicas y su Aplicación Clínica en Implantología Dental. Donado M. (Ed.), Ars Medica, España, pps. 42-47.

70. **Donado A., Guisado B., Ortega R. y Sanz J. V.(2003)**: Respuesta de la mucosa periimplantaria. En *Anatomía Implantológica. Bases Morfológicas y su Aplicación Clínica en Implantología Dental*. Ed. Donado M. Ars Medica, España, pps. 49-59.
71. **Donath K. (1995)**: Preparation of histologic sections. Exakt-Kulzer-Publication, Norderstedt.
72. **Donnelly T.M. (2004)**: Basic Anatomy, Physiology, and Husbandry. En *Ferrets, Rabbits, and Rodents. Clinical Medicine and Surgery*. Quesenberry K.E., Carpenter J.W. (Eds.), 2º edición Saunders, Missouri, pps.: 136-147.
73. **Driessens F.C.M., Boltong M.G., Bermúdez O., Planell J.A., Ginebra M.P., Fernández E. (1994)**: Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **5**, pps.: 164-170.
74. **Driessens F.C.M., Boltong M.G., De Maeyer E.A., Wenz R., Nies B., Planell J.A. (2002)**: The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. *Biomaterials* **23**, pps.: 4011-4017.
75. **Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Bermúdez O., Ginebra M.P., Fernández E. (1993)**: A new apatitic calcium phosphate bone cement: preliminary results. *Bioceramics* **6**, pps.: 469-473
76. **Driessens F.C.M., De Maeyer E.A.P., Fernández E., Boltong M.G., Berger G., Verbeeck R.M.H., Ginebra M.P., Planell J.A. (1996)**: Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite. *Bioceramics* **9**, pps.: 231-234.

77. **Driessens F.C.M., Planell J.A., Boltong M.G., Khairoun I, Ginebra M.P. (1998):** Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers (H)* **212**, pps.: 427-435.
78. **Driessens F.C.M., Planell J.A., Boltong M.G., Khairoun I., Ginebra M.P. (1998):** Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers (H)* **212**, pps.: 427-435
79. **Driessens F.C.M., Ramselaar M.M.A., Schaeken H.U., Stols L.H., Van Mullem P.J. (1992):** Chemical reactions of calcium phosphate implants after implantation in vivo. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **3**, pps.: 413-417.
80. **Ducheyne P y Qiu Q. (1999):** Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* **20**, pps.:2287-2303. Review.
81. **Educational resource materials by the American Society for Bone and Mineral Research.** *Página Web de la American Society for Bone and Mineral Research*, puesta al día el 28 de febrero de 2005 [<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRRed/ASBMRRed/>] (Consultada el 1 de abril de 2005).
82. **El Briak-Ben Abdeslam H., Mochales C., Ginebra M.P., Nurit J., Planell J.A., Boudeville P. (2003):** Dry mechanochemical synthesis of hidroxiapatites from dicalcium phosphate dihydrate and calcium oxide: A kinetic study. *Journal of Biomedical Material Research* **67 A**, pps.: 927-937.
83. **Fawcett D. W., Jenhs R. P. (1999):** Hueso. En *Compendio de Histología*. Fawcett D. W., Jenhs R. P. (Eds), Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid (España), pps.: 73-86.

84. **Fernández E., Boltong M.G., Ginebra M.P., Bermúdez O., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1994):** Common ion effect on some phosphate cements. *Clinical Materials* **16**, pps.: 99-103
85. **Fernández E., Boltong M.G., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Bermúdez O., Planell J.A. (1996):** Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **15**, pps.: 1004-1005.
86. **Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. (1999):** Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **10**, pps.: 177-183.
87. **Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1999):** Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the $\text{CaHPO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **10**, pps.: 223-230.
88. **Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. (1999):** Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10**, pps.: 169-176.
89. **Fernández E., Ginebra M.P., Bermúdez O., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. (1995):** Dimensional and thermal behavior of calcium phosphate cements during setting compared to PMMA bone cements. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **1**, pps.: 4-5.
90. **Fernández E., Ginebra M.P., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Ginebra J., De Maeyer E.A., Verbeeck R.M., Planell J.A. (1996):** Kinetic study of

- the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **32**, pps.: 367-374.
- 91. Fernández N.J. (1991):** "El vidrio". Fernández N.J. (Ed). Textos Universitarios. CSIC Fundación Centro Nacional del vidrio. Real Fábrica de cristales de la granja, 2ª Edición, Madrid, pps.: 47-51.
- 92. Ferretti J.L., Cappozza R.F., Zanchetta J.R. (1995):** Mechanical validation of a non-invasive (pQCT) index of bending strength in rat femurs. *Bone* **18**, pps.:97-102.
- 93. Fini M., Giavaresi G., Aldini N. N., Torricelli P., Botter R., Beruto D., Giardino R. (2002):** A bone substitute composed of polymethacrylate and β -tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. *Biomaterials* **23**, pps: 4523-4531.
- 94. Flautre B., Maynou C., Lemaitre J., Van Landuyt P., Hardouin P. (2002):** Bone colonization of β -TCP granules incorporated in brushite cements. *Journal of Biomedical Material Research* **63**, pps.: 413-417.
- 95. Flecknell P.A. (1999):** Conejos. En *Manual de animales exóticos*. Beynon P.H., Cooper J.E. (Eds.), British Small Animal Veterinary Association, Gloucestershire, United Kingdom, pps.: 81-95.
- 96. Flecknell P.A. (2002):** Manejo, sujeción y técnicas clínicas. En *Manual de Medicina y Cirugía del conejo*. Flecknell (Ed.), British Small Animal Veterinary Association, Gloucestershire, United Kingdom, pps.: 1-17.
- 97. Franks K., Abrahams I., Georgiou G., Knowles J.C. (2001):** Investigation of thermal parameters and crystallization in a ternary CaO-Na₂O-P₂O₅ - based glass system. *Biomaterials* **22**, pps.: 497-501.
- 98. Frayssinet P, Roudier M, Lerch A, Ceolin JL, Depres E, Rouquet N. (2000):** Tissue reaction against a self-setting calcium phosphate cement

- set in bone or outside the organism. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **11(12)**, pps.: 811-815.
- 99. Gartner L.P., Hiatt J.L. (1997):** Cartílago y hueso. En *Histología: Texto y Atlas*. Gartner L.P., Hiatt J.L. (Ed). Mc Graw-Hill-Interamericana. México, pps.: 114-136.
- 100. Gasser J.A. (2003):** Bone measurements by peripheral quantitative computed tomography in rodents. En *Bone Research Protocols*, Helfrich M.H., Ralston S.H. (Eds.), Humana Press Inc, New Jersey, pps.:323-341.
- 101. Gauthier O., Khairoun I., Bosco J., Obadia L., Bourges X., Rau C., Magne D., Bouler J.M., Aguado E., Daculsi G., Weiss P. (2003):** Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *Journal of Biomedical Material Research* **66 A**, pps.: 47-54.
- 102. Gbureck U., Grolms O., Barralet J.E., Grover L.M., Thull R. (2003):** Mechanical activation and cement formation of β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* **24**, pps.: 4123-4131.
- 103. Georgiou G., Knowles J.C. (2001):** Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery. Part I: mechanical properties. *Biomaterials* **22**, pps.: 2811-2815.
- 104. Gil-Albarova J., Montón I., Clément J., Castiella T., Esteva F., Planell J.A., Herrera A. (2002):** Desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea. Implantación subcutánea en conejos. *Mapfre Medicina* **13**, pps.: 252-257.
- 105. Gil-Albarova J., Salinas A.J., Bueno-Lozano A.L., Román J., Aldini-Nicolo N., García-Barea A., Giavaresi G., Fini M., Giardino R., Vallet-Regí M. (2005):** The in vivo behaviour of a sol-gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials* **26**, pps.: 4374-4382.

- 106. Ginebra M.P. (1997):** Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico- □ para aplicaciones quirúrgicas. *PhD Thesis*; Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.
- 107. Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. (2004):** Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cements: a kinetic analysis. *Biomaterials* **25**, pps.: 3453-3462.
- 108. Ginebra M.P., Fernández E., Boltong M.G., Bermúdez O., Planell J.A., Driessens F.C.M. (1994):** Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clinical Materials* **17**, pps: 99-104
- 109. Ginebra M.P., Fernández E., Driessens F.C.M., Boltong M., Muntasell J., Font J., Planell J.A. (1995):** The effects of temperature on the behavior of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **6**, pps.: 857-60
- 110. Ginebra M.P., Fernandez E., Maeyer E.A.P., Verbeeck R.M.H. (1997):** Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research* **76 (4)**, pps.: 905-912.
- 111. Gisep A., Wieling R., Bohner M., Matter S., Schneider E., Rahn (2002):** Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone. *Journal of Biomedical Materials Research* **66 A**, pps.: 532-540.
- 112. Goldberg V.M., Powell A., Shaffer J.W., Zika J., Bos G.D., Heiple K.G. (1985):** Bone grafting: role of hiscompatibility in transplantation. *Journal of Orthopaedic Research* **3**, pps.: 389-404.
- 113. Gómez de S.I., Tendillo C.F.J. (2001):** Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. En *Ciencia y tecnología en Protección y Experimentación*

- Animal*. Zúñiga J.M., Tur M.J.A., Milocco S.N., Piñeiro R. (Eds.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 385-419.
- 114. Gómez Gordo L., Moya Jiménez L., Vidal Rubial S. (2004):** *Tratado de Histología Veterinaria*. Gázquez Ortiz A., Blanco Rodríguez A. (Eds), Masson, Barcelona (España), pps. 105-125
- 115. Graig R.G. (1999):** Review: Advances in biomaterials from 1957 to 1997. *Journal of Oral Rehabilitation* **26**, pps.: 841-846.
- 116. Greenspan D.C. (1999):** Bioactive ceramic implant materials. *Science* **4**, pps.: 389-393.
- 117. Groot K. de, Klein C.P.A.T., Wolke J.G.C., de Blieck-Hogervorst J.M.A. (1990):** Chemistry of calcium phosphate bioceramics. En *Handbook of Bioactive Ceramics*, vol. II. Yamamuro T., Hench L.L., Wilson J. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón (FL), Florida, pps.: 3-15.
- 118. Gruber H.E., Wiggins W.W. (2003):** Methods for Transmission and Scanning Electron Microscopy of bone and cartilage. En *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. An Y.H., Martin K.L. (Eds.), Humana Press Inc., New Jersey, pps.: 497-505.
- 119. Gutiérrez Pérez J., García Calderón M. (2002):** Fundamentos de la Implantología actual. Concepto de osteointegración. Aspectos estructurales y biológicos de los implantes. En *Integración de la Implantología en la Práctica Odontológica*. Eds. Gutiérrez Pérez J. L., García Calderón M. Ediciones Ergon, España, pps. 1-9.
- 120. Hamadouche M., Sedel L. (2000):** Ceramics in orthopaedics. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **82 B**, pps.: 1095-1099.
- 121. Harris C.T., Cooper L.F. (2004):** Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research* **68 A**, pps.: 747-755.

- 122. Hashimoto M., De Munck J., Ito S., Sano H., Kaga M., Oguchi H., Van Meerbeek B., Pashley D.H. (2004):** In vitro effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. *Biomaterials* **25**, pps.: 5565-5574.
- 123. Hedenqvist P., Hellebrkers L.J. (2003):** Laboratory animal analgesia, anesthesia and euthanasia. En *Handbook of Laboratory Animal Science*. Hau J., Van H.G.L.. (Eds.), 2ª edición CRC Press, USA, pps.: 413-457.
- 124. Hench L.L. (1991):** Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* **74**, pps.: 1487-1510.
- 125. Hench L.L. (1995):** Ceramics, glasses and glass-ceramics. En *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. Henc L.L. (Eds.), Academic Press, New York.
- 126. Hench L.L. (1998):** Bioactive glass: Present and future. En Bioceramics 11. LeGeros R.Z., LeGeros J. (Eds.), *World Scientific Publishing, Singapore*, pps. 31-36.
- 127. Hench L.L. (1998):** Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* **81**, pps.: 1705-1728.
- 128. Hench L.L., Paschall H.A. (1973):** Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of Biomedical Materials Research* **7**, pps.: 25-42.
- 129. Hench L.L., Paschall H.A. (1974):** Histochemical responses at a biomaterial's interface. *Journal of Biomedical Materials Research* **8**, pps.: 49-64.
- 130. Hench L.L., Polak J.M. (2002):** Third-generation biomedical materials. *Science* **295**, pps.: 1014-1017.

-
131. **Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee Jr. T.K. (1971):** Bonding mechanism at the interface of the ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* **2**, pps.: 117-141.
132. **Hench L.L., Wilson J. (1984):** Surface-active biomaterials. *Science* **226**, pps.: 630-636.
133. **Hench L.L., Wilson J. (1993):** An introduction to bioceramics. *Advanced Series in Ceramics 1. Singapore: World Scientific Publishing Co*, pps. 1-24.
134. **Herrero Climent M., Herrero Climent F. (1995):** Interfases osteoimplantarias. En *Atlas de Procedimientos Clínicos en Implantología Oral*. Herrero Climent M., Herrero Climent F (Eds.). TRP Ediciones, España, pps. 5-6.
135. **Higgins T.F., Dodds S.D., Wolfe S.W. (2002):** A biomechanical analysis of fixation of intraarticular distal radial fractures with calciumphosphate bone cement. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **84 A**, pps.: 1579-1586
136. **Histología UC. Página Web de la Escuela de Medicina de la Universidad Católica de Chile**, puesta al día el 10 de noviembre de 2004 [<http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/indiceGeneral>] (Consultada el 7 de abril de 2005).
137. **Hoshikawa A., Fukui N., Fukuda A., Sawamura T., Hattori M., Nakamura K., Oda H. (2003):** Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials* **24**, pps.: 4967-4975.
138. **II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Página Web del II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía**

- Patológica*, puesta al día el 7 de noviembre de 1998 [http://www.conganat.org/iicongreso/] (Consultada el 2 de abril de 2005).
- 139. Ishikawa K., Asaoka K. (1995):** Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **29**, pps.: 1537-1543.
- 140. Ishikawa K., Takagi S., Chow L.C., Ishikawa Y, Eanes E.D., Asaoka K. (1994):** Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dental materials* **10**, pps.: 26-32.
- 141. Jackson D.W., Lalor P.A., Aberman H.M., Simon T.M. (2001):** Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* **83-A (1)**, pp. 53-64.
- 142. James R. A. (1974):** Training programs in oral implantology at Loma Linda University. *Oral Implantology* **5(1)**, pps.:80-84.
- 143. Jansen J.A., De Ruijter J.E., Schaeken H.G., Van der Waerden J.P.C., Planell J.A., Driessens F.C.M. (1995):** Evaluation of tricalciumphosphate / hydroxiapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **6**, pps.: 653-657.
- 144. Jarcho M., Bolen C.H., Thomas M.B., Bobick J., Kay J.F., Doremus R.H. (1976):** Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **11**, pps.: 2027-2035.
- 145. Kasuga T, Sawada M, Nogami M, Abe Y (1999):** Bioactive ceramics prepared by sintering and crystallization of calcium phosphate invert glasses. *Biomaterials* **20**, pps.: 1415-20.

-
146. **Keating J.F., Hajducka C.L., Harper J. (2003):** Minimal internal fixation and calciumphosphate cement in the treatment of fractures of the tibial plateau. A pilot study. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **85 B**, pps.: 68-73.
147. **Kelly C.M., Wilkins R.M., Gitelis S., Hartjen C., Watson J.T., Kim P.T. (2001):** The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute. Results of a multicenter trial. *Clinical Orthopaedics* **382**, pps.: 42-50.
148. **Kenny S.M., Buggy M. (2003):** Bone cements and fillers: A review. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **14**, pps.: 923-938.
149. **Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C., Planell J.A. (1997):** Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **38**, pps.: 356-360.
150. **Khairoun I., Driessens F.C.M., Boltong M.G., Planell J.A., Wenz R. (1999):** Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* **20**, pps.: 393-398.
151. **Khan S.N., Bostrom M.P., Lane J.M. (2000):** Bone growth factors. *The Orthopedic Clinics of North America* **31**, pps.: 375-88.
152. **Klawiter J.J., Hulbert S.F. (1971):** Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopedic applications. *Journal of Biomedical Material Research* **2**, pps: 161173.
153. **Klein C.P.A.T., Driessen A.A., de Groot K., Van den Hooff (1981):** Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *Journal of Biomedical Materials Research* **17**, pps.: 769-784.
154. **Koerten H.K., Van der Meulen J. (1999):** Degradation of calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Material Research* **44**, pps.: 78-86.

- 155. Kokubo T. (1991):** Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* **12**, pps.: 155-163.
- 156. Kokubo T., Ito S., Huang Z.T., Hayashi T., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T. (1990):** Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Material Research* **24**, pps.: 721-734.
- 157. Kokubo T., Ito S., Sakka S., Yamamuro T. (1986):** Formation of a high-strength bioactive glass-ceramic in the system MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **21**, pps.: 536-542.
- 158. Kokubo T., Kim H., Kawashita M. (2003):** Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* **24**, pps.: 2161-2175.
- 159. Kozma C., Macklin W., Cummins L.M., Mauer R. (1974):** Anatomy, Physiology and Biochemistry of the rabbit. En *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Weisbroth R.H., Flatt R.E., Kraus A.L. (Eds.), Academic Press, New York, pps.: 50-69.
- 160. Kurashina K., Kurita H., Kotani A. (1998):** Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an α -tricalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: A preliminary short term experiment in rabbits. *Biomaterials* **19**, pps.: 701-712.
- 161. Laffargue P., Hildebrand H.F., Rtaimate M., Frayssinet P., Amoureux J.P., Marchandise X. (1999):** Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits bone defects. *Bone* **25** (suppl 2), pps.: 55-58.
- 162. Lane J.M., Sandhu H.S. (1987):** Current approaches to experimental bone grafting. *The Orthopedic Clinics of North America* **18**, pps.: 213-225.

-
- 163. Larsson S., Bauer T.W. (2002):** Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.:23-32.
- 164. LeGeros R.Z. (2002):** Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 81-98.
- 165. LeGeros R.Z., Chohayeb A., Shulman A. (1982):** Apatitic calcium phosphate: possible restorative materials. *Journal of Dental Research* **61**, pps.: 343-356.
- 166. LeGeros R.Z., Lin S., Rohanizadeh R., Mijares D., LeGeros J.P. (2003):** Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **14**, pps.: 201-209.
- 167. Lemaitre J., Munting E., Mirtchi A. (1992):** Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale* **93**, pps.: 163-165.
- 168. Levitt S.R., Crayton P.H., Monroe E.A., Condrate R.A. (1969):** Forming method for apatite prosthesis. *Journal of Biomedical Material Research* **3**, pps.: 683-691.
- 169. Lewandrowski K-U., Bondre S.P., Shea M., Untch C.M., Hayes W.C., Hile D.D., Wise D.L., Trantolo D.J. (2002):** Composite resorbable polymer/hydroxylapatite composite screws for fixation of osteochondral osteotomies. *Bio-Medical Materials and Engineering* **12**, pps.: 423-438.
- 170. Lewandrowski K-U., Bondre S.P., Wise D.L. y Trantolo D.J. (2002):** Healing of osteochondral osteotomies after fixation with a hydroxyapatite-buffered polylactide. A histomorphometric and radiographic study in rabbits. *Bio-Medical Materials and Engineering* **12**, pps.: 259-270.

171. Li R.H., Bouxsein M.L., Blake C.A., Augusta D., Kim H., Li X.J., Wozney J.M., Seeherman H.J. (2003): rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (β -BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research* **21**, pps.: 997-1004.
172. Liebschner M.A.K. (2004): Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* **25**, pps.: 1697-1714.
173. Lin F.H., Lin C.C., Liu H.C., Huang Y.Y., Wang C.Y., Lu C.M. (1994): Sintered porous DP-bioactive glass and hydroxyapatite as bone substitute. *Biomaterials* **15**, pps.: 1087-1098.
174. Lin F-H., Chen T-M., Lin C-P., Lee C-J. (1999): The merit of sintered PDLLA/TCP Composites in management of bone fracture internal fixation. *Artificial organs* **23 (2)**, pps.: 186-194.
175. Liu C., Huang Y., Chen J. (2004): The physicochemical properties of the solidification of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **69 B**, pps.: 73-78.
176. Liu D (1996): Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials* **17**, pps.: 1955-1957.
177. Livingston T.L., Gordon S., Archambault M., Kadiyala S., McIntosh K., Smith A., Peter S.J. (2003): Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **14**, pps.: 211-218.
178. Lopes M.A., Santos J.D., Monteiro F.J., Ohtsuki C., Osaka A., Kaneko S., Inoue H. (2001): Push-out testing and histological evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composites implanted in the tibia of rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* **54**, pps.: 463-469.

-
- 179. López Rubín F., López Rubín H. (1994):** La interfase hueso-implante. En *Bases para una Implantología segura*. López Rubín F., López Rubín H (Eds.). TRP Ediciones, España, pps. 22-27.
- 180. López Rubín F., López Rubín H. (1994):** Mantenimiento de los implantes endoóseos. En *Bases para una Implantología segura*. Eds. López Rubín F., López Rubín H. TRP Ediciones, España, pps. 220-226.
- 181. López Rubín F., López Rubín H. (1994):** Oseointegración. En *Bases para una Implantología segura*. López Rubín F., López Rubín H. (Eds.), Offser color, España, pps. 8-21.
- 182. Lu J.X., Gallur A., Flautre B., Anselme K., Descamps M., Thierry B. y Hardouin P. (1998):** Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* **42**, pps.: 357-367.
- 183. Manderson R. D. (1972):** Experimental intra-osseous implantation in the jaws of pigs. *The Dental Practitioner and Dental Record* **22(6)**, pps.:225-231.
- 184. Markovic M., Takagi S., Chow L.C. (2001):** Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Bioceramics* 13, pps.: 773-778.
- 185. Marshall D., Helfrich M.H., Aspden R.M. (2003):** Scanning Electron Microscopy of bone. En *Bone Research Protocols*. Helfrich M.H., Ralston S.H. (Eds.), Humana Press Inc, New Jersey, pps.: 311-323.
- 186. Martin A.W. (1997):** Rewiev of the structures of phosphates glasses. *European Journal of Solid State Inorganic Chemistry* **28**, pps.: 163-205.
- 187. Meenaghan M.A., Natiella J.R., Armitage J.E., Wood R.H. (1974):** Evaluation of the crypt surface adjacent to metal endosseous implants: an electron microscopic study in clinically successful implants. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **31(5)**, pps.:574-581.

- 188. Meffert R. (1985):** The soft Tissue-Implant Interface. En *The Dental Implant. Clinical and Biological Response of Oral Tissues*. McKinney R., Lemons J. (Eds.) PSG Publishing Company, Massachusetts, pps. 95-113.
- 189. Mickiewicz R.A., Mayes A.M., Knaack D. (2002):** Polymer-calcium phosphate cement composites for bone substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research* **61**, pps.: 581-592.
- 190. Mirtchi A.A., Lemaitre J., Munting E. (1989):** Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of the β -tricalcium phosphate – monocalcium phosphate cements. *Biomaterials* **10**, pps.: 634-638.
- 191. Miyamoto Y., Ishikawa K., Fukao H., Sawada M., Nagayama M., Kon M., Asakoa K. (1995):** In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement in bone. *Biomaterials* **16**, pps.: 855-860.
- 192. Mochales C., El Briak-Ben Abdeslam H., Ginebra M.P., Perol A., Planell J.A., Boudeville P. (2004):** Dry mechanochemical synthesis of hydroxyapatites from DCPD and CaO: influence of instrumental parameters on the reaction kinetics. *Biomaterials* **25**, pps.: 1151-1158.
- 193. Moghadam H.G., Sándor G.K.B., Holmes H.H.I., Clokie C.M.L. (2004):** Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic substitutes. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **62 (2)**, pps.: 202-213.
- 194. Mundy G.R., Boyce B., Hughes D., Wrigth K., Bonewald L., Dallas S., Harris S., Ghosh C.N., Chen D., Dunstan C. (1995):** The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone* **17 (Suppl 2)**, pps.: 71-75.

-
- 195. Nagase M., Abe Y., Chigira M., Udagawa F. (1992):** Toxicity of silica-containing calcium phosphate glasses demonstrated in mice. *Biomaterials* **13**, pps.: 172-175.
- 196. National Institutes of Health Cells 1/STS-59.** *Página Web del National Institutes of Health Cells 1*, puesta al día el 9 de abril de 1994 [http://lifesci.arc.nasa.gov/lis2/Chapter4_Programs/NIH_C/NIH_C1.html] (Consultada el 12 de febrero de 2005).
- 197. Navarro M., Clément J., Ginebra M.P., Martínez S., Avila G., Planell J.A. (2002):** Improvement of the stability and mechanical properties of reabsorbable phosphate glasses by the addition of TiO₂. *Key Engineering Materials* **218-220**, pps.: 275-278.
- 198. Navarro M., del Valle S., Ginebra M.P., Martínez S., Planell J.A. (2004):** Development of a new calcium phosphate glass ceramic porous scaffold for guided bone regeneration. *Key Engineering Materials* **254-256**, pps.: 945-948.
- 199. Navarro M., del Valle S., Martínez S., Zeppetelli S., Ambrosio L., Planell J.A., Ginebra M.P. (2004):** New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. *Biomaterials* **25**, pps.: 4233-4241.
- 200. Navarro M., Ginebra M.P., Clément J., Martínez S., Ávila G., Planell J.A. (2003):** Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications. *Journal of the American Ceramic Society* **86**, pps.: 1345-52
- 201. Navarro M., Ginebra M.P., Planell J.A. (2003):** Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility *Journal of Biomedical Materials Research* **67A**, pps.: 1009-1015.

- 202. Navarro M., Ginebra M.P., Planell J.A., Zeppetelli S., Ambrosio L. (2004):** Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **15**, pps.: 419-422.
- 203. Navarro M., Sanzana E.S., Planell J.A., Ginebra M.P., Torres P.A. (2005):** In vivo behavior of calcium phosphate glasses with controlled solubility. *Key Engineering Materials* **284-286**, pps.: 893-896.
- 204. Neo M., Nakamura T. (2003):** SEM Methods for observation of the bone-implant interface. En *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. An Y.H., Martin K.L. (Eds.), Humana Press Inc., New Jersey, pps.: 505-513.
- 205. Nesbit S.A., Horton M.A. (2003):** Fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts by confocal microscopy. En *Bone Research Protocols*, Helfrich M.H., Ralston S.H. (Eds.), Humana Press Inc, New Jersey, pps.:259-281.
- 206. Niedhart C., Maus U., Piroth W., Miltner O., Schmidt-Rohlfing B., Siebert C.H. (2004):** Evaluation of reabsorbable, in situ setting bone substitute in a sheep model. *Journal of Biomedical Material Research. Part B: Applied Biomaterial* **71 B**, pps.: 123-129.
- 207. Nilsson M., Fernández E., Sarda S., Lidgren L., Planell J.A. (2002):** Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* **61**, pps.: 600-607.
- 208. Nilsson M., Wielanek L., Wang J.S., Tanner K.E., Lidgren L. (2003):** Factors influencing the compressive strength of an injectable calcium sulfate-hydroxyapatite cement *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **14**, pps.: 399-404.

-
209. **Nishikawa S., Toh S., Tsukahara S., Takahashi I. (2003):** Endoscopic treatment of delayed unions and nonunions with calcium phosphate paste. *Arthroscopy* **19**, pps.: 436-439.
210. **Ohgushi H., Okumura M., Yoshikawa T., Inoue K., Senpuku N., Tamai S., Shors E.C. (1992):** Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite, *Biomaterials* **26(7)**, pps.: 885-95.
211. **Ohura K., Hamanishi C., Tanaka S., Matsuda N. (1999):** Healing of segmental bone defects in rats induced by a β -TCP-MCPM cement combined with rhBMP-2. *Journal of Biomedical Materials Research* **44**, pps.: 168-175.
212. **Oki A.R., Parveen B., Hossain S., Adeniji S., Donahue H. (2004):** Preparation and in vitro studies on bone cells of sol gel derived bioglass incorporating zinc. *Journal of Biomedical Materials Research* **69A**, pps.: 216-221
213. **Ooms E.M., Egglezos E.A., Wolke J.G.C., Jansen J.A. (2003):** Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements. *Biomaterials* **24**, pps.: 749-757.
214. **Ooms E.M., Wolke J.G.C., Van der Waerden J.P.C.M., Jansen J.A. (2003):** Use of injectable calcium-phosphate cement for the fixation of titanium implants: an experimental study in goats. *Journal of Biomedical Materials Research* **66 B**, pps.: 447-456.
215. **Oonishi H. Hench L.L., Wilson J., Sugihara F., Tsuji E., Matsuura M., Kin S., Yamamoto T., Mizokawa S. (2000):** Quantitative comparison of bone growth behaviour in granules of Bioglass[®], A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Material Research* **51**, pps.: 37-46.
216. **Orsini G., Ricci J., Scarano A., Pecora G., Petrone G., Leéis G., Piatelli A. (2004):** Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement:

- An experimental study in rabbit. *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials* **66 B**, pps.: 199-208.
- 217. Paniagua Gómez-Álvarez R., Nistal Martín de Serrano M., Sesma Egozcue M. P., Álvarez-Uría Rico-Valdemoro M., Anadón Álvarez R., Fraile Laíz B., Sáez Crespo F. J., de Miguel González M. P.(1998):** Tejidos de sostén: Cartilaginoso y óseo. En *Citología e histología vegetal y animal: Biología de las células y tejidos animales y vegetales*. Paniagua R. (Ed), 2ª edición Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., Madrid (España), pps.: 513-552.
- 218. Parfit A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., Recker R.R. (1987):** Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research* **2**, pps.: 595-610.
- 219. Pelker R.R., FrieLAender G.E. (1987):** Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *The Orthopedic Clinics of North America* **18**, pps.: 235-239.
- 220. Piermattei D.L. (1993):** Approach to caudal limb. En *An Atlas of Surgical Approachs to the bones of the dog and cat*. Piermattei D.L. (Ed.), 3ª edición WB Saunders Co., Philadelphia, pps.: 275.
- 221. Pioletti D.P., Takei H., Lin T. et al.. (2000):** The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function. *Biomaterials* **21**, pps.: 1283-2000.
- 222. Planas A. (2003):** Comportamiento de los materiales en el medio biológico. Biocompatibilidad de los BMO. En *Arte y ciencia de los materiales odontológicos*. Eds. Toledano Pérez M., Osorio Ruiz R.,

- Sánchez Aguilera F., Osorio Ruiz E. Ediciones Avances Medico-Dentales, España, pps. 13-37.
- 223. Planell J.A., Ginebra M.P., Fernández E. (2002):** Cementos óseos basados en fosfatos de calcio. *Cursos de actualización del 39 Congreso Nacional SECOT*, pps.: 39-43.
- 224. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (1999):** *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (Eds.), Ergon, Madrid.
- 225. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (1999):** *Fundamentos de biomecánica y biomateriales*. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (Eds.), Ergon, España.
- 226. Rahn B.A. (1999):** Intra vitam staining techniques. En *Handbook of biomaterials evaluation*. Von Recum A.F. (Ed.), Taylor and Francis, Philadelphia, PA, pps.: 727-738.
- 227. Rangavittal N, Landa-Canovas A.R., González-Calbet J.M., Vallet-Regí M. (2000):** Structural study and stability of hydroxyapatite and -tricalcium phosphate: Two important bioceramics *Journal of Biomedical Material Research* **51**, pps.: 660-668.
- 228. Ravaglioli A., Krajewski A., Biasini V., Martinetti R., Mangano C., Venini G. (1992):** Interface between hydroxyapatite and mandibular human bone tissue. *Biomaterials* **13(3)**, pps.:162-7.
- 229. Reddi A.H. (2001):** Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* **83 A (Suppl)**, pps.: 1-6.
- 230. Reenspan D.C. (1999):** Bioactive ceramic implant materials. *Science* **4**, pps.: 389-393.
- 231. Reid S.A., Boyde A. (1987):** Changes in the mineral density distribution in human bone with age: Image analysis using backscattered electrons in the SEM. *Journal of Bone and Mineral Research* **2**, pps.: 123-131.

- 232. Roether J.A., Gough J.E., Bocaccini A.R., Hench L.L., Maquet V., Jérôme R. (2002):** Novel bioreabsorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polyglactide foams for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **13**, pps.: 1207-1214.
- 233. Rokkanen P.U., Böstman O., Hirvensalo E., Mäkelä E.A., Partio E.K., Pätäälä H., Vainionpää S., Vihtonen K., Törmälä P. (2000):** Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials* **21**, pps.: 2607-2613.
- 234. Romero N., Vallecillo M. (2003):** Injertos óseos, materiales aloplásticos y membranas para regeneración tisular guiada. En *Arte y ciencia de los materiales odontológicos*. Toledano Pérez M., Osorio Ruiz R., Sánchez Aguilera F., Osorio Ruiz E. (Eds.) Ediciones Avances Medico-Dentales, España, pps. 13-37.
- 235. Ruhé P.Q., Kroese Dedutman H.C., Wolke J.G.C., Spauwen P.H.M. y Jansen J.A. (2004):** Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* **25 (11)**, pps.: 2123-2132.
- 236. Rustichelli F., Romanzetti S., Dubini B., Girardin E., Raven C., Snigirev A., Rizzi G. (2004):** Phase-contrast microtomography of thin biomaterials. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **15 (9)**, pps.: 1053-1057.
- 237. Salih V., Georgiou G., Knowles J.C., Olsen I. (2001):** Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery. Part II: in vitro evaluation of bone cell growth and function. *Biomaterials* **22**, pps.: 2817-2824.
- 238. Sánchez-Valverde M.A. (1997):** Fracturas de fémur. En *Traumatología y ortopedia de pequeños animales*. Sánchez-Valverde M.A. (Ed.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 153-169.

-
- 239. Sarda S., Fernández E., Nilsson M., Planell J.A. (2003):** Influence of surfactant molecules as airetraining agent of bone cement macroporosity. *Journal of Biomedical Materials Research* **65 A**, pps.: 215-221
- 240. Sasaki S., Ishii Y. (1999):** Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Science* **4**, pps.:361-369.
- 241. Sepulveda P., Bressiani A.H., Bressiani J.C., Meseguer L., König B. (2002):** In vivo evaluation of hidroxiapatite foams. *Journal of Biomedical Material Research* **62**, pps.: 587-592.
- 242. Serre C.M., Papillard M., Chavassieux P., Voegel J.C., Boivin G. (1998):** Influence of magnesium substitution on a collegen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matriz by human osteoblasts. *Journal of Biomedical Material Research* **42**, pps: 626-633.
- 243. Shinzato S., Kobayashi M., Moussa W.F., Kamimura M., Neo M., Kitamura Y., Kokubo T., Nakamura T. (2000):** Bioactive polymethyl methacrylate-based bone cement: Comparison of glass beads, apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic, and hydroxyapatite fillers on mechanical and biological properties. *Journal of Biomedical Material Research* **51**, pps.: 258-272.
- 244. Shires P. (2000):** Fracturas del fémur. En *Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies*. Birchard S.J., Sherding R.G. (Eds.), 2ª edición McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 1333-1343.
- 245. Siegel M.A. (1999):** Osseointegration?. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **88**: pp. 113.
- 246. Silver I., Deas J., Erecinska M. (2001):** Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass and 58S and 77S

- bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* **22**, pps.: 175-185.
- 247. Steiniche Torben S., Hauge E.M. (2003):** Normal structure and function of bone. En *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Yuehuei H., Kylie L. M. (Eds.), Humana Press, New Jersey (USA), pps.: 59-73.
- 248. Strong D.M., Friedlaender G.E., Tomford W.W., Springfield D.S., Shives T.C., Burchardt H., Enneking W.F., Mankin H.J. (1996):** Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clinical Orthopedics* **326**, pps.: 107-114.
- 249. Sun J-S., Lin F-H., Wang Y-J., Huang Y-C., Chueh S-C., Hsu F-Y. (2003):** Collagen-Hydroxyapatite /Tricalcium phosphate microspheres as a delivery system for recombinant human transforming growth factor- β 1. *Artificial Organs* **27 (7)**, pps.: 605-612.
- 250. Tay F.R., Sano H., Tagami J., Hashimoto M., Moulding K.M., Yiu C., Pashley D.H. (2001):** Ultrastructural study of a glass ionomer-based, all-in-one adhesive. *Journal of Dentistry* **29**, pps.: 489-498.
- 251. Taylor G.L., Millar G.D., Ham F.J. (1975):** The free vascularized bone graft: A clinical extension of microvascular techniques. *Plastic and Reconstructive Surgery* **55**, pps.: 533-544.
- 252. Temenoff J.S., Mikos A.G. (2000):** Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* **21**, pps.: 2405-2412.
- 253. Theiss F., Apelt D., Brand B., Kutter A., Zlinszky K., Bohner M., Matter S., Frei C., Auer J.A., Von Rechenberg B. (2005):** Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* **26**, pps.: 4383-4394.

- 254. Togawa D., Bauer T.W., Woolf S.K., Hawkins M., Edwards B., An J.A. (2002):** Evaluation of resorption rates of five injectable bone cement using a rabbit femoral defect model. *Proceedings of the Orthopaedic Research Society* (Annual Meeting Dallas, TX), **27**, póster 738.
- 255. Toth J.M., Lynch K.L., Hackbarth D.A. (1993):** Ceramic-induced osteogenesis following subcutaneous implantation of calcium phosphates. *Bioceramics* **6**, pps.: 9-13.
- 256. Triffitt J.T. (2002):** Osteogenic stem cells and orthopedic engineering: summary and update. *Journal of Biomedical Materials Research* **63**, pps.: 384-389.
- 257. Tuck C., Evans J.R.G. (1999):** Porous ceramics prepared from aqueous foams. *Journal of Materials Science Letters* **18**, pps.: 1003-1005.
- 258. Urist M.R. (1965):** Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, pps.: 893-899.
- 259. Valentin-Opran A., Wozney J., Csimma C., Lilly L., Riedel G.E. (2002):** Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Orthopaedics* **395**, pps.: 110-120.
- 260. Valiente Álvarez A., Montes Jiménez J., Feinberg S. E. (2002):** Injertos y sustitutivos óseos en implantología. *Integración de la Implantología en la Práctica Odontológica*. Gutiérrez Pérez J. L., García Calderón M. (Eds.). Ediciones Ergon, España, pps. 59-68.
- 261. Vallet-Regí M. (2001):** Ceramics for medical applications. *Journal of the Chemical Society* pps.: 97-108.
- 262. Vallet-Regí M., Munuera L. (2000):** *Biomateriales: Aquí y ahora*. Vallet-Regí M., Munuera L. (Eds.), Ed. Dykinson, España.
- 263. Van Wazer J.R. (1958):** Phosphorous and its compounds, Vol I. En *Chemistry*. Van Wazer J.R. (Ed.), Interscience Publisher, Inc, New York.

- 264. Vats A., Tolley N.S., Buttery L.D.K., Polak J.M. (2004):** The stem cell in orthopaedic surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **86 B**, pps.: 159-164.
- 265. Vidal A.R. (2001):** *Fases de un experimento y elección del modelo experimental.* Zúñiga J.M., Tur M.J.A., Milocco S.N., Piñeiro R. (Eds.), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pps.: 587-605.
- 266. Vitale-Brovarone C., Di Nunzio S., Bretcanu O., Verné E. (2004):** Macroporous glass-ceramic materials with bioactive properties. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **15**, pps.: 209-217.
- 267. Vogel J., Wange P., Hartmann P. (1997):** Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. *Glass Technique Versus Glass Science Technique* **70**, pps.: 220-223.
- 268. Voor M.J., Arts J.J.C., Klein S.A., Walschot L.H.B., Verdonschot N., Buma P. (2004):** Is Hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **71 B**, pps.: 398-407.
- 269. Wang C.X., Chen Z.Q., Wang M. (2002):** Fabrication and characterization of bioactive glass coating produced by the ion beam sputter deposition technique. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **13**, pps.: 247-251.
- 270. Wang M., Joseph R., Bonfield W. (1998):** Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials* **19**, pps.: 2357-2366.
- 271. Wang Y-J., Lin F-H., Sun J-S., Huang Y-C., Chueh S-C. y Hsu F-Y. (2003):** Collagen-Hydroxyapatite microspheres as carriers for bone morphogenic protein-4. *Artificial Organs* **27(2)**, pps.: 162-168.

- 272. Weiland A.J., Phillips T.W., Randolph M.A. (1984):** Bone grafts: a radiologic, histologic and biomechanical model comparing autografts, allografts and free vascularized bone grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery* **74**, pps: 368-379.
- 273. Weiss A., von der Mark K., Silbermann M. (1986):** A tissue culture system supporting cartilage cell differentiation, extracellular mineralization, and subsequent bone formation, using mouse condylar progenitor cells. *Cell Differentiation* **19(2)**, pps.: 103-113.
- 274. Weiss P., Obadia L., Magne D., Bourges X., Rau C., Weitkamp T., Khairoun I., Bouler J.M., Chappardi D., Gauthier O., Daculsi G. (2003):** Synchrotron X-ray microtomography (on micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials* **24**, pps.: 4591-4601.
- 275. Wingerd B.D. (1985):** The circulatory system. En *Rabbit Dissection Manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 54-63.
- 276. Wingerd B.D. (1985):** The muscular system. En *Rabbit Dissection Manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 15-33.
- 277. Wingerd B.D. (1985):** The nervous system. En *Rabbit Dissection Manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 34-40.
- 278. Wingerd B.D. (1985):** The skeletal system. En *Rabbit Dissection Manual*, Wingerd B.D. (Ed.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, London, pps.: 1-11.

- 279. Winter M., Griss P., de Groot K., Tagai H., Heimke G., van Dijk H.J.A., Sawai K. (1981):** Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* **2**, pps.: 159-160.
- 280. Wong C. T., Lu W. W., Chan W. K., Cheung K. M. C., Luk K. D. K., Lu D. S., Rabie A. B.,M., Deng L. F., Leong J. C. Y. (2003):** In vivo cancellous bone remodeling on a Strontiumcontaining hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **68A**, pps.: 513-521.
- 281. Xu H.H.K., Quinn J.B., Takagi S., Chow L.C., Eichmiller F.C. (2001):** Strong and macroporus calcium phosphate cement: Effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties. *Journal of Biomedical Material Research* **57**, pps.: 457-466.
- 282. Yang Q., Troczynski T., Liu D. (2002):** Influence of apatite seeds on the synthesis of calcium phosphate cement. *Biomaterials* **23**, pps.: 2751-2760.
- 283. Yap A. U. J., Pek Y. S., Cheang P. (2003):** Physico-mechanical properties of a fast-set highly viscous GIC restorative. *Journal of Oral Rehabilitation* **30**, pps.: 1-8.
- 284. Yoon S.T., Boden S.D. (2002):** Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clinics Orthopaedics* **395**, pps.: 33-43.
- 285. Young B. y Heath J.W. (2000):** Skeletal tissues. En *Wheather's functional histology. A text and colour atlas*. Young, B. y Heath J.W. (Eds.), Churchill Livingstone, London, pp. 172-192.
- 286. Yuan H., Li Y., Bruijn J.D., Groot K., Zhang X (2000):** Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* **21**, pps.: 1283-1290.

- 287. Yuan H., Yang Z., Li Y., Zhang X., De Bruijn J.D., De Groot K. (1998):** Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **9**, pps.: 723-726.
- 288. Yungler E.M., Chapman M.W. (1989):** Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of Orthopedic Trauma* **3**, pps.: 192-197.
- 289. Zarb G., Schmitt A. (1989):** Implant materials. En *Dental materials: Properties and selection*. O'Brien W (Ed.), Quintessence books, Chicago, pps. 449-461.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA ÓSEA GENERADA POR DOS CEMENTOS Y UN BIOVIDRIO
BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS EN DEFECTOS CAVITARIOS
EXPERIMENTALES**

Resúmenes

9. RESÚMENES

9.1. RESUMEN

El gran compromiso de la sociedad actual por alcanzar una mejor calidad en el ámbito sanitario unido al aumento en la esperanza de vida que se está produciendo llevan consigo numerosos avances en el campo biomédico, como son las cirugías reconstructivas tras accidentes de tráfico o resecciones tumorales, y la colocación de prótesis. En la actualidad se están diseñando multitud de sustitutos óseos variando sus propiedades biológicas y físico-químicas con el objetivo de obtener distintos biomateriales con unas propiedades óptimas para su aplicación en los numerosos campos que comprende la traumatología y cirugía reconstructiva.

En este sentido, los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio son biomateriales que poseen propiedades biológicas muy interesantes para su uso como sustitutos óseos. Con el objetivo de comparar el comportamiento *in vivo* de dos formulaciones de cementos de fosfatos de calcio, uno denso y otro poroso, y un vidrio bioactivo con un defecto cavitario vacío (control) se realizó un estudio experimental en 36 conejos de raza neozelandesa a los que se les practicaron defectos cavitarios de 6 mm en el cóndilo distal de cada fémur, implantando un material distinto en cada uno: 18 conejos recibieron en uno de los cóndilos un cemento de fosfato \square tricálcico denso y en el otro un cemento de fosfato \square tricálcico poroso. A los otros 18 se les implantó en uno de los cóndilos unos cilindros de un vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 y en el otro se dejó el defecto cavitario vacío, constituyendo el grupo control.

El estudio radiológico reveló la existencia de una progresiva reabsorción y remodelación ósea en el caso de los cementos óseos y la nula evolución en el vidrio bioactivo y el grupo control, aunque en ningún caso se apreciaron fenómenos de osteolisis o fracturas óseas, constatando la biocompatibilidad de los materiales. Los mismos resultados se apreciaron en el estudio cualitativo mediante microscopía de barrido, donde también se observó la macroporosidad conseguida gracias al agente espumante utilizado en el desarrollo del cemento poroso, que aceleró el proceso de reabsorción por encima de la neoformación ósea. El estudio cuantitativo mediante microscopía de barrido determinó el ratio Ca/P, muy similar al del hueso en el caso de los cementos óseos y muy inferior en el vidrio bioactivo, lo que, junto con la presencia de titanio en este último, explica la lenta biorreabsorción generada en el vidrio y, consecuentemente, la escasa neoformación ósea. También aportó datos sobre el proceso de mineralización ósea que aparece en los cementos desde la cuarta semana, al constatar la aparición de una pequeña proporción de magnesio. El estudio histológico mostró una correcta osteointegración de los tres biomateriales sin existir fenómenos de reacción inflamatoria o de cuerpo extraño. Del mismo modo que el estudio radiológico y la microscopía de barrido, también reveló una progresiva biorreabsorción y neoformación ósea en el caso de los cementos, y una gran lentitud en el desarrollo de estos procesos en el vidrio bioactivo. El estudio histomorfométrico reveló que la neoformación ósea conseguida a las cuatro y doce semanas era mayor, con diferencias estadísticamente significativas en los dos cementos óseos, con respecto al vidrio y al defecto cavitario vacío. La reabsorción en el cemento poroso a las cuatro semanas fue significativamente mayor que en el cemento denso, y éste a su vez mayor que en el vidrio bioactivo. La diferencia se mantuvo a las doce

semanas en el vidrio con respecto a los dos cementos, entre los que ya no existieron diferencias.

Estos resultados permiten afirmar que los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio son materiales osteoconductivos, biocompatibles y biodegradables, que se comportan como sustitutos óseos en los defectos cavitarios creados en conejos como animal de experimentación, constatando que las diferentes propiedades físico-químicas y biológicas que se aplican en el diseño de estos biomateriales influye de forma notable en su comportamiento post-implantación, definiendo así sus posibles aplicaciones clínicas.

9.2. SUMMARY

The main goal of the modern society is achieve a high sanitary status, which added to an increase in the life expectancy bring about a great number of advances in biomedical areas such as reconstructive surgery after road accidents, tumour resection or prosthetic procedures. Nowadays, numerous bone substitutes are being designed by means of changes in their biological, mechanical, physical and chemical properties. The aim of these studies is to obtain biomaterials with optimal properties in order to be applied to different fields included in orthopedic and reconstructive surgery.

On this way, calcium phosphate based cements and glasses are biomaterials that have interesting biological properties to be employed as bone substitutes.

The objective of this dissertation is to compare the behaviour of different bone cements (dense cement and porous cement), and a bioactive glass against an empty cavitory bone defect (considered control group). An experimental study was conducted with 36 New Zealand White Rabbits. A bone cavitory defect, with a diameter of 6 mm, was done in the distal condyle of each femur and afterwards we proceeded to implant different materials in every single specimen: 18 femurs were implanted with dense α -tricalcium phosphate cement, 18 with porous α -tricalcium phosphate cement, 18 with a cylinder made of phosphate bioactive glass (P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 system) and the next 18 femurs didn't receive any implant; the bone cavitory defect remained empty. This last group was considered as control group.

A radiological study was performed in each group. In both bone cements appeared a sequential resorption and formation of new bone but the others groups didn't suffer the above mentioned modifications. Osteolysis or fractures were not found showing an adequate attachment of the alloplastic material to

the bone. Qualitative study by means of Scanning Electron Microscopy showed similar results and we have observed also bigger macroporosity in the porous bone cement group obtained from the foamy agent added in the formulation of porous cement. This agent caused acceleration in the resorption over the osseous neoformation. Quantitative study through Scanning Electron Microscopy determined a similar Ca/P ratio in the both bone cement groups but lower ratio in the bioactive glass group compared with normal bone. Additionally, titanium presence was identified in the bioactive glass material. These findings could explain the slow bioresorption observed in bioactive glass group and therefore the limited neoformation of bone. As regards the mineralization process, Scanning Electron Microscopy showed that, in bone cements, four weeks after implantation it appeared new bone tissue. This was confirmed because a small quantity of magnesium was detected at that moment. Histological study showed an adequate osseointegration of implants in all studied groups. No inflammatory reaction neither rejection reaction were detected. Moreover, we could observe again a sequential resorption and formation of new bone in bone cement groups and a marked slowness in these processes in the bioactive glass group.

Histomorphometrical study revealed a greater bone formation at 4 and 12 weeks in the bone cement groups with statistically significant differences when they were compared with bioactive glass group and control group. After four weeks, resorption was significantly greater in porous bone cement than in dense bone cement and the latter greater than bioactive glass material. Statistically significant differences were maintained until twelve weeks when the bioactive glass material was compared with cements, however at this time no differences in resorption were found between both cements.

These results permit us to state that calcium phosphate based cements and glasses are osteoconductor, biocompatible and biodegradable materials; in our experimental rabbits they acted like bone substitutes in the surgically made cavitory defects. We have verified that the different physicochemical and biological properties applied to biomaterials designing have a real influence over their post-implantation (post-grafting) behavior, which establishes their possible clinical application.

9.3. RÉSUMÉ

Le grand compromis dans la société actuelle pour acquérir une meilleure qualité de l'attention médicale avec l'augmentation de l'espérance de vie mènent plusieurs avancements dans le domaine biomédical, telles que les chirurgies reconstructives après les accidents de voiture ou les résections des tumeurs, et la mise en place de prothèses. Actuellement, on est en train de développer une grande variété de remplaçants de l'os en modifiant leurs propriétés biologiques et physico-chimiques dans le but d'obtenir différents biomatériaux avec les caractéristiques convenables pour leur emploi dans les divers domaines qui comprennent la traumatologie et la chirurgie reconstructive.

Dans ce sens, les ciments et les vitres en phosphate de calcium sont des biomatériaux qui possèdent des propriétés biologiques très intéressantes pour leur emploi comme remplaçants de l'os. Dans le but d'étudier le comportement *in vivo* de deux formules de ciments en phosphate de calcium, l'un dense et l'autre poreux, et une vitre bioactive avec un défaut cavitaire vide (control) on a développé une étude expérimentale avec 36 lapins de la race néo-zélandaise auxquels nous avons réalisé des défauts cavitaires de 6 mm dans le condyle distal de tous les deux fémurs, en implantant un matériel différent à chacun d'eux: 18 lapins ont reçu dans un condyle un ciment de phosphate tricalcique dense et dans l'autre un ciment de phosphate tricalcique poreux. Chez les autres 18 lapins nous avons implanté dans un condyle un cylindre d'une vitre en phosphate du système P_2O_5 -CaO-Na₂O-TiO₂ et dans l'autre nous avons laissé un défaut cavitaire vide, constituant le groupe contrôle.

L'étude radiologique a montré l'existence d'une progressive réabsorption et remodelation de l'os dans les ciments osseux et l'absence d'évolution dans la vitre bioactive et le groupe contrôle, même si dans aucun cas on a apprécié des

phénomènes d'osteolyse ou fractures de l'os, démontrant la biocompatibilité des matériaux. Les mêmes résultats ont été observés dans l'étude qualitative en employant le microscope électronique à balayage, dans lequel on a aussi constaté l'augmentation du diamètre du pore grâce à l'agent écume utilisé pour le développement du ciment poreux, qui a accéléré le progrès de la reabsorption plus que celle de la néoformation de l'os. L'étude quantitative avec le microscope de transmission a déterminé le ratio Ca/P, pareil à celui de l'os dans le cas des ciments et très inférieur pour la vitre bioactive. Dans le cas de la vitre bioactive, il y avait aussi du titanium ce qui explique la reabsorption lente de l'os et en conséquence la faible néoformation de l'os. Il a apporté aussi des données sur le processus de minéralisation de l'os qui apparaît dans les ciments dès la quatrième semaine, quand on peut constater l'apparition d'une petite proportion de magnésium. L'étude histologique a montré une ostéointégration des trois biomatériaux sans l'existence de phénomènes de réactions inflammatoires ou de corps étrangers. De même que l'étude radiologique ou le microscope électronique à balayage, il a aussi montré une biorréabsorption et une néoformation d'os progressive dans le cas des ciments, et une vitesse très lente de développement de ces deux processus dans le cas de la vitre bioactive. L'étude histomorphométrique a révélé que la réabsorption de l'os obtenue dans la quatrième et douzième semaine était supérieure avec signification statistique dans les deux ciments en relation à la vitre et au défaut cavitaire vide. Dans la quatrième semaine, la réabsorption d'os a été significativement plus grande dans le ciment poreux que dans le ciment dense, et plus grande dans celui-ci que dans la vitre bioactive. Cette différence s'est maintenue dans la douzième semaine chez la vitre bioactive, mais disparaissait parmi les deux ciments.

Ces résultats nous permettent affirmer que les ciments et les vitres en phosphate de calcium sont des matériaux osteoconductives, biocompatibles et qui se comportent comme remplaçants de l'os dans les défauts cavitaires créés dans les lapins. Cet étude nous permet confirmer que les différentes propriétés physiques, chimiques et biologiques utilisées dans le dessin de ces biomatériaux ont une influence très importante sur leur comportement après l'implantation et leurs possibles applications cliniques.