

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía e Histología Humanas



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS REACCIONES
BIOLÓGICAS DEL TEJIDO ÓSEO FRENTE A
BIOMATERIALES BASADOS EN MONETITA**

TESIS DOCTORAL

Lorena Benito Garzón

SALAMANCA, 2012

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS REACCIONES
BIOLÓGICAS DEL TEJIDO ÓSEO FRENTE A
BIOMATERIALES BASADOS EN MONETITA**

Lorena Benito Garzón

DIRECTORES:

Dr. D. F. Collía Fernández

Dr. D. J. A. De Pedro Moro

Dr. D. A. López-Valverde Centeno



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

SALAMANCA, 2012

A mis padres y hermana.

A Juan.

A todos aquellos que sienten la ciencia como una forma de vivir.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar querría agradecer a los directores D. Francisco Collía, D. José Antonio De Pedro y D. Antonio López-Valverde el haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis. En especial querría dar las gracias a Paco, por apostar siempre por mí, por animarme, por guiarme en este camino y por sus buenos consejos.

Al Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Salamanca, por su cálida recepción, por hacerme sentir una más desde el primer día y por tener siempre palabras de aliento. Una mención especial a Javi y a Rosa, por su disposición, por su trabajo, por estar pendientes de mí, por hacerme pasar muy buenos ratos y porque al fin y al cabo, han sido mis compañeros de batalla. A Marta, por tener siempre algo que decir y animarme.

No podría olvidarme del departamento de Biomateriales del ICTP-CSIC de Madrid, donde comencé mi camino de investigación, donde encontré un grupo lleno de ilusión y gracias a ellos estoy ahora aquí. Además, encontré muy buenas amigas, mis queridas Feli, Paula, Patricia y Sandra. Juntas aprendimos a sacar el lado positivo y divertido de las cosas, compartimos muy buenos momentos y aunque estén lejos y las eche de menos en el laboratorio, las siento cerca.

A Azurebio S.L. por proporcionarme los materiales, en especial a Sussette, que ha sido mi compañera en la distancia, por estar siempre disponible, por resolver mis dudas y tener palabras de aliento en esta etapa.

Al grupo de Bioquímicos, Alberto, María, Vero, Isa y Oli por esos ratos en el Bécquer y por compartir nuestro camino como investigadores.

A Sara, por ayudarme a darle formato a esta tesis, por desahogarnos juntas y compartir muchas risas, sin olvidar a Eloy.

A mis amigos, tanto a los que entienden mi trabajo como investigadora, como a los que no, porque aunque así sea, son mis amigos y forman parte de mi vida.

A Raquel, Ana y Rober, por apostar siempre por mí. Con vuestros ánimos me habéis ayudado a dar cada paso y seguir adelante.

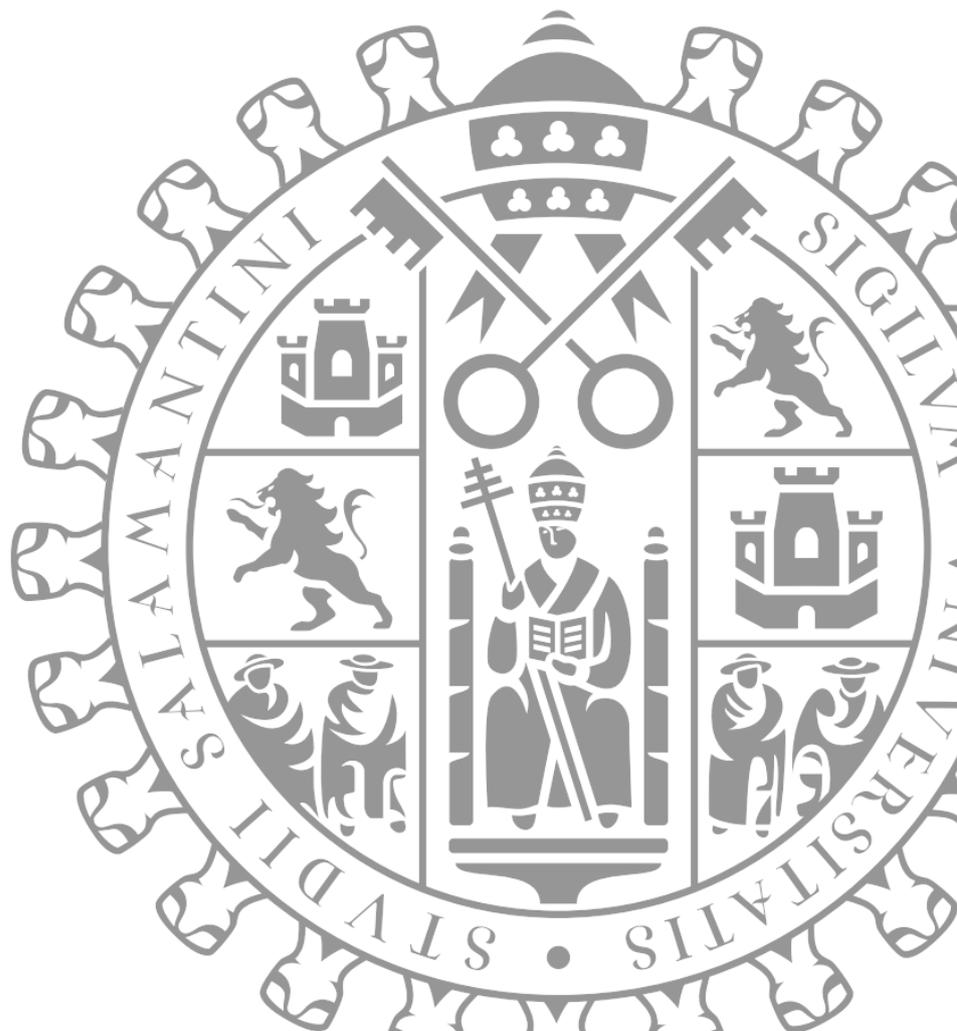
A mis padres, que me lo han dado todo y han conseguido que pueda llegar donde estoy, porque aunque no comprendan muy bien el mundo de la investigación, siempre están a mi lado.

A mi hermana, por tener confianza en mí, por saber siempre qué decir para darme ánimos y buenos consejos, por darme siempre un punto de vista diferente, por poder aprender de ella.

No menos importante ha sido el apoyo recibido de mi familia y mi nueva familia, que han compartido conmigo esta etapa, recordando también a los que ya no están pero tengo presentes.

A Juan, por poder compartir mi vida contigo, por confiar siempre en mí, por hacerme creer que puedo con todo y animarme a conseguirlo, por estar a mi lado.

fNDiCE



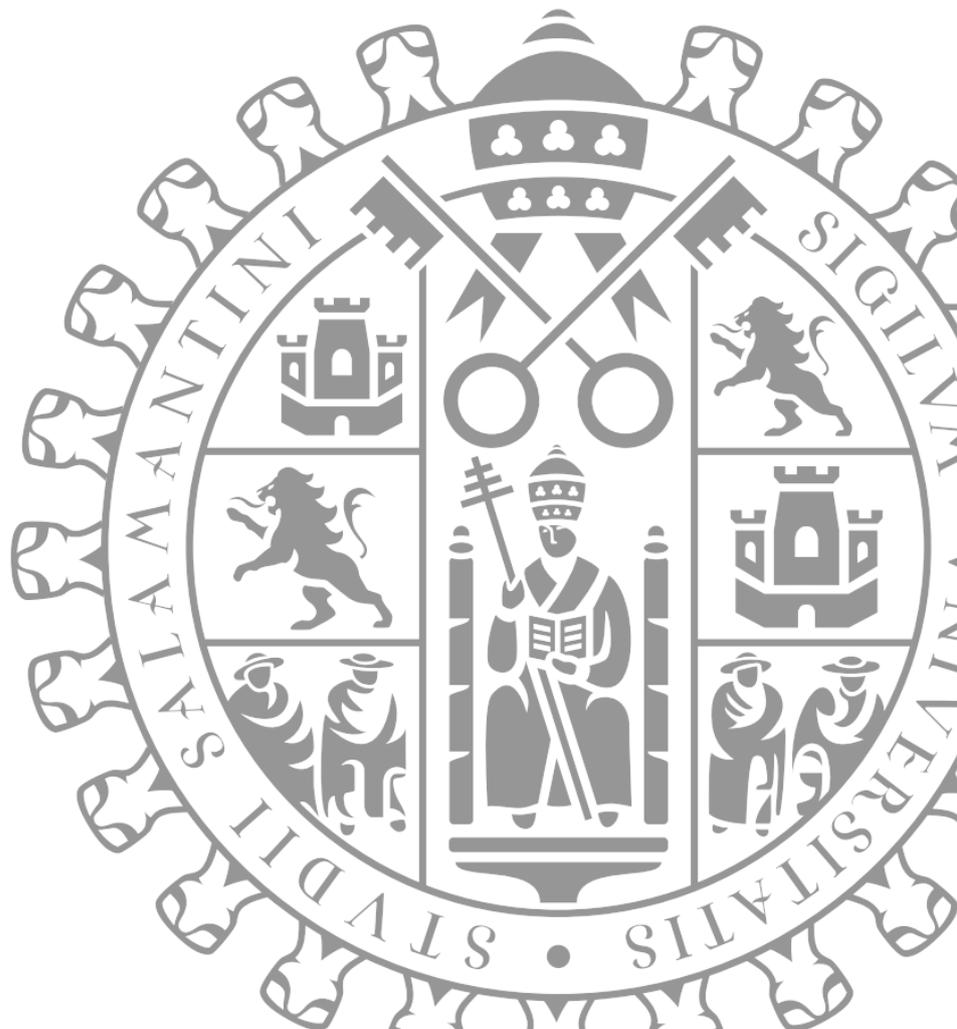
íNDICE

i.~ JUSTIFICACIÓN	19
ii.~ OBJETIVOS:	25
iii.~ INTRODUCCIÓN:	29
1. MATERIALES DE ORIGEN HUMANO APLICADOS EN REGENERACIÓN ÓSEA.....	30
1.1. Autoinjertos.-.....	30
1.2. Aloinjertos.-.....	31
1.3. Matriz ósea desmineralizada.-	32
2. BIOMATERIALES COMO SUSTITUTOS ÓSEOS.	32
2.1. Biomateriales orgánicos: polímeros.-	33
2.2. Biomateriales inorgánicos metálicos.-	34
2.3. Biomateriales inorgánicos no metálicos: cerámicas.-	34
2.3.1. Cerámicas bioinertes.-	35
2.3.2. Cerámicas bioactivas.-	35
2.3.2.1. Fosfatos de calcio.-.....	36
2.3.2.2. Vidrios bioactivos.-	39
2.3.2.3. Vitrocerámicas.-	40
2.3.2.4. Silicatos bioactivos.-	41
2.3.2.5. Compuestos inorgánicos bioactivos no cerámicos.-	41
2.3.3. Cerámicas biodegradables o reabsorbibles.-	42
2.3.4. Cerámicas porosas.-.....	43
2.4. Biomateriales tipo cemento.-	44
2.4.1. Cementos de ionómeros de vidrio (polialquenoatos de vidrio).-.....	44
2.4.2. Cementos de fosfato de calcio (CPC).-.....	45
2.4.2.1. Formas de presentación de los cementos.-.....	49
2.5. Sustitutos óseos de DCPD (brushita) y su derivado DCPA (monetita) en forma granulada.	52
3. BIOLOGÍA ÓSEA.-.....	55
3.1. Organización del hueso.-	56
3.1.1. Envolturas óseas.-	57
3.1.2. Composición.-	58
3.1.3. Tipos celulares del hueso.-.....	60

3.2.	Procesos de modelación y remodelación.-	70
3.3.	Mecanotransducción.-.....	73
3.4.	Reparación ósea.-	75
3.5.	Efectos de los biomateriales sobre el tejido óseo.-.....	76
IV.~	MATERIAL Y MÉTODOS:	83
1.	BIOMATERIALES GRANULADOS BASADOS EN MONETITA.-	83
1.1.	Síntesis y composición:	84
1.2.	Caracterización físico-química:	92
2.	ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.-	93
3.	INSTALACIONES.-	93
4.	PROTOCOLO QUIRÚRGICO.-	94
4.1.	Material quirúrgico:	94
4.2.	Técnica quirúrgica:	94
5.	PROTOCOLO ANESTÉSICO.-.....	97
5.1.	Anestesia y analgesia:.....	97
5.2.	Monitorización:	97
6.	SEGUIMIENTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.-.....	98
7.	GRUPOS EXPERIMENTALES.-	98
8.	ESTUDIO RADIOLÓGICO.-	99
9.	PROTOCOLO HISTOLÓGICO.-	100
9.1.	Inclusión:	100
9.2.	Corte de las muestras:	101
10.	PROTOCOLO TINCCIONES.-	102
10.1.	Tricrómico de Goldner:	102
10.2.	Von Kossa:.....	103
11.	TÉCNICA FOTOGRÁFICA.-.....	103
V.~	RESULTADOS:	107
	CONTROL 1:.....	108
	CONTROL 2: BioOss®	116
	CONTROL 3: Cerasorb® (β-TCP)	131
	GRUPO I:	139
	GRUPO II:	162
	GRUPO III:	187
	GRUPO IV:	210
VI.~	DISCUSIÓN:	225

Vii.~ CONCLUSIONES:	251
Viii.~ ABREVIATURAS:	255
ix.~ BIBLIOGRAFÍA:	259

JVSTiFiCACIÓN



i.~ JVSTiFiCACIÓN

La pérdida de masa ósea constituye un grave problema de salud que resulta aún más acuciante en pacientes de edad avanzada. En tratamientos odontológicos es frecuente que, tras una intervención, se produzca una pérdida de masa ósea debido a complicaciones y patologías asociadas, como la causada por la reabsorción alveolar posterior a una extracción dental y la originada por la enfermedad periodontal. Por otro lado, tanto en traumatología como en otros tratamientos quirúrgicos, la pérdida de masa ósea es un problema grave de la salud, que puede incluso ocasionar la muerte del paciente.

Según los demógrafos de Naciones Unidas, dentro de unos 5 años es muy probable que haya más personas de más de 60 años, que niños de menos de 15 años. Hoy en día una de cada diez personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050 se prevé que será una de cada cinco. También se estima que el número de personas de 80 años se multiplicará por cinco a su vez. De lo dicho se deduce que la longevidad masiva presentará implicaciones individuales relacionadas con mantenimiento de la calidad de vida. Estos factores sociológicos han impulsado un gran avance en el desarrollo de los Biomateriales, y han potenciado la investigación en este campo. Si a esto se le añade la mejora de las técnicas quirúrgicas, se puede entender, el gran incremento en la utilización de prótesis, implantes, sistemas y aparatos médicos que deben trabajar en íntimo contacto con los tejidos corporales (1).

Según los últimos estudios de la Comisión Europea, el crecimiento anual estimado para el sector de los Biomateriales a nivel mundial, está fijado en torno a un 12%. De la globalidad del mercado, Estados Unidos cuenta aproximadamente con un 40% de la cifra total y un crecimiento estimado del 20%. Europa, situada como segunda potencia, cuenta con una cuota de mercado del 28% y basa sus principales esfuerzos en investigaciones en el campo de materiales e ingeniería de tejidos. No obstante, no hay que olvidar que mientras que la Unión Europea compite con Estados Unidos y Japón, donde actualmente los avances en el desarrollo de nuevas tecnologías para la creación de Biomateriales es una prioridad, economías emergentes tales como Corea del Sur, Taiwán y China están introduciéndose rápidamente en este sector.

Desde otro punto de vista, el desarrollo de nuevos materiales puede tener implicaciones a largo plazo en el sistema sanitario europeo. Con una población envejecida (el número de adultos jubilados se prevé que se incremente en un 50% para el 2025, llegando a tener un promedio superior al 30% de ciudadanos por encima de los 60 años) y una esperanza de vida mayor, los posibles beneficios de los Biomateriales en la reducción de la creciente carga de costes en el sistema sanitario actual es evidentemente primordial. Actualmente, se han desarrollado alrededor de 2.700 tipos de dispositivos médicos considerados como Biomateriales. En USA se estima que se implantan unos 3 millones de prótesis anuales, generando un mercado de más de 100 millones de dólares. En Europa, se implantan anualmente alrededor de 40.000 prótesis cardíacas y 275.000 prótesis de cadera, siendo de fabricación europea sólo el 15%. Se pronostica que el aumento del uso de prótesis crecerá a un ritmo de un 6% anual, con un incremento de los costes asociados de un 10%.

Europa en su conjunto dedica entorno al 8,6% del PNB al sector Salud, frente al 13,9% dedicado por Estados Unidos. De este porcentaje, el 6,37% representa el gasto en tecnología médica europea, frente al 5,1% americano. Los últimos datos disponibles de los años 2002/2003 valoran la tecnología médica europea en torno a los 55,2 billones de euros. Alemania es el país líder con una cuota de mercado del 34,4%, seguido de Francia con el 16,3%. España posee una cuota de mercado de las tecnologías sanitarias de alrededor del 5,4% en Europa.

El mercado mundial de la tecnología sanitaria se estimó en más de 184 billones de euros en el año 2002. El mercado europeo de la tecnología sanitaria representa en torno al 30% del mercado mundial, precedido por Estados Unidos con el 43% (79 billones de euros) y seguido de Japón con el 11% (20 billones de euros).

Dentro de áreas más especializadas, el mercado ortopédico mundial se situaba en unos 8 billones de euros, con una tasa de crecimiento del 5-7% anual, dentro del cual los implantes de cadera ocupaban un 30% de dicho segmento. El mercado del tratamiento de heridas supera los 10 billones de euros anuales, de los cuales los tratamientos de lesiones graves representan casi el 40% y las aplicaciones vasculares unos 3 billones de euros. La reparación de tejidos, excluyendo las aplicaciones ortopédicas y cardiovasculares, se estima en unos 4 billones de euros (2).

Con estos datos se pone de manifiesto la gran importancia que tiene el desarrollo de materiales que permitan la reparación y regeneración de defectos óseos. Para ello numerosos equipos multidisciplinares, que agrupan investigadores de diversos campos como las ciencias básicas, las ciencias biomédicas, las especialidades médicas y la ingeniería, están trabajando para desarrollar un amplio rango de materiales que permitan su aplicación en el campo clínico, como es el caso de la ortopedia y la odontología.

Desde hace casi un siglo se utilizan biomateriales para reparar o reemplazar defectos óseos. Un ejemplo es el uso de injertos de hueso autólogo para rellenar cavidades óseas y en reconstrucciones quirúrgicas. Sin embargo los inconvenientes asociados a su uso, como son el suministro limitado de hueso y la cirugía adicional requerida, han hecho que se busquen otras opciones, como es el caso de los aloinjertos de donantes. Sin embargo su menor revascularización y capacidad osteogénica, además del riesgo de transmisión de agentes patógenos, han promovido la búsqueda de otras alternativas. Un ejemplo es el uso de xenoinjertos procedentes, sobre todo, de la especie bovina, como es el caso del BioOss®. Este material se utiliza ampliamente en el campo de la odontología. En el proceso de fabricación de BioOss® se elimina la matriz orgánica sin alterar la estructura de composición mineral, manteniendo unas propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales, muy similares al hueso humano. Sin embargo, el uso de estos preparados a partir de material biológico representa problemas de posible contaminación con agentes infecciosos, como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), y existe un estricto control de calidad.

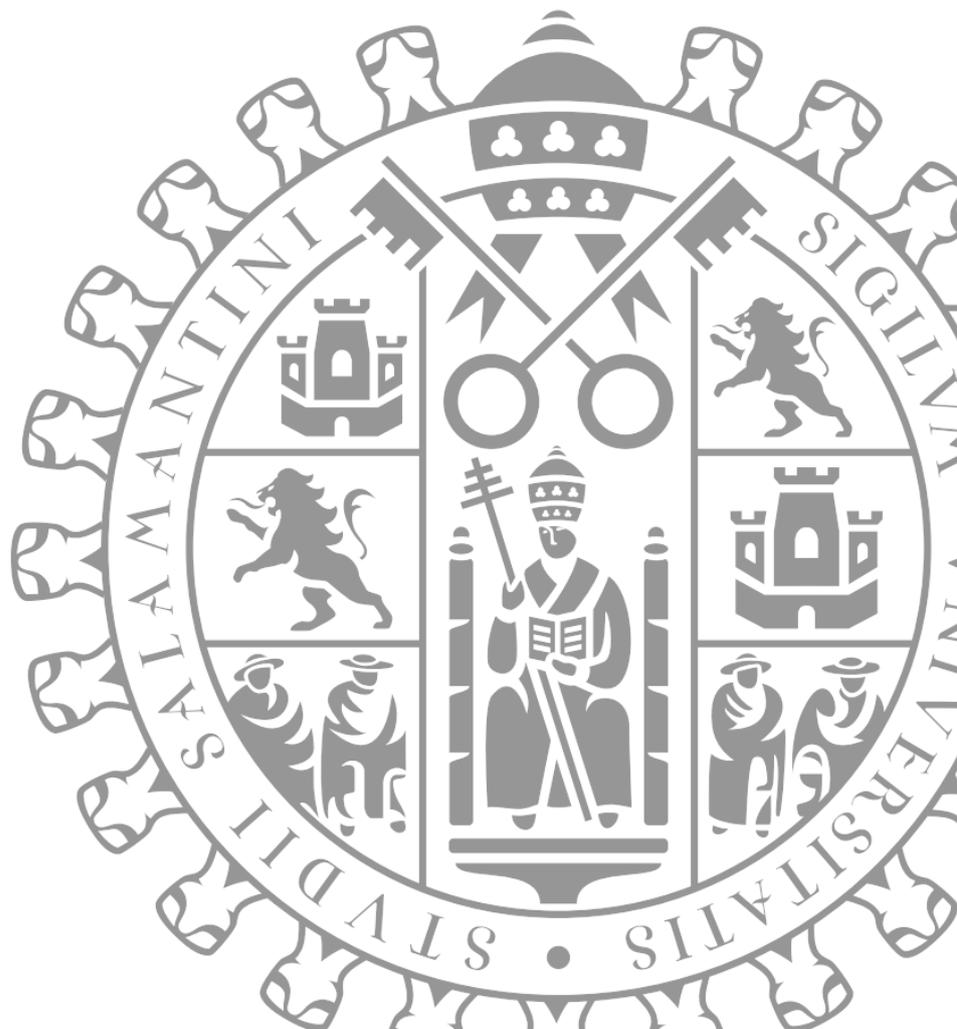
Con el fin de evitar estos problemas se han desarrollado matrices sintéticas. La investigación en nuevos biomateriales sintéticos para la reparación ósea trata de reducir al máximo la necesidad del empleo de injertos óseos, buscando un material artificial que con el

tiempo se reabsorba y/o se integre con el hueso adyacente y, además, sirva de fijación en fracturas osteoporóticas. Los fosfatos de calcio tienen especial interés en regeneración ósea ya que presentan similitudes con la fase mineral del hueso natural y son susceptibles a la remodelación y reabsorción ósea. Los fosfatos cálcicos más comúnmente utilizados son la hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (TCP) y brushita (fosfato dicálcico dihidratado) (DCPD). Estos materiales pueden administrarse en diversas formas, como en pastas de cementos, de forma de piezas sólidas o formulaciones granulares.

Los materiales se diseñan para que presenten cierto grado de porosidad intentando aumentar la capacidad de regeneración ósea. La introducción de porosidad en el sistema aumenta considerablemente la superficie de contacto del material en el lugar de implante, y la superficie susceptible de interactuar con las células de los tejidos circundantes. En el mercado, encontramos gránulos de HA, TCP y combinaciones de ambos. Sin embargo, en el ámbito de los materiales de regeneración ósea es de creciente interés la brushita (DCPD) ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) altamente reabsorbible en comparación con la HA. Este fosfato de calcio puede encontrarse en la naturaleza o producirse sintéticamente a partir de reacciones ácido-base. Sin embargo la brushita en condiciones fisiológicas se transforma en HA provocando un descenso del pH además de retardar la reabsorción del material. Por lo que se han buscado otros materiales alternativos donde asociado al empleo de la brushita encontramos la monetita (DCPA) (CaHPO_4). La monetita puede sintetizarse directamente, mediante una reacción de descomposición de la brushita o se puede encontrar como mineral en la naturaleza. El uso de la monetita en la regeneración ósea no ha sido explotado por considerarse un material con una rápida disolución y poca resistencia.

En esta tesis se ha llevado a cabo el estudio de matrices de monetita sintéticas mejoradas a partir de la introducción de otros compuestos de calcio bioactivos que modulan la velocidad de degradación del material resultante, promueven la regeneración ósea, mejoran sus propiedades osteoinductoras, osteoconductoras y biomecánicas. Con estas propiedades los gránulos de monetita sintetizados pueden utilizarse en odontología como relleno de defectos óseos tras la extracción de piezas dentales, para la regeneración ósea de mandíbulas que presentan cantidad insuficiente de hueso para el soporte de dentaduras o puentes, para el relleno de defectos periodontales o alrededor de implantes dentales, regeneración de hueso alveolar y relleno de defectos óseos después de cirugías de tumores o quistes, por citar algunas de las posibles aplicaciones.

OBJETIVOS



ii.~ OBJETIVOS:

En la actualidad son muchos los biomateriales que se han desarrollado para su uso en el área de la regeneración ósea. Dentro de esta gran variedad de biomateriales algunos presentan grandes ventajas, como propiedades osteogénicas, osteointegradoras, osteoinductoras y/o osteoconductoras. Sin embargo, también pueden presentar algunas desventajas, como una reabsorción muy lenta, llegando a permanecer inalterado durante largos periodos de tiempo, o al contrario, que presentan velocidades de reabsorción tan rápidas que hace que sus propiedades mecánicas sean tan pobres que sus aplicaciones sean limitadas. Por todo ello es interesante investigar nuevos biomateriales, con un grado intermedio de reabsorción y sin llegar a perder las ventajas comentadas anteriormente.

Por todo lo expuesto el objetivo de este trabajo es el desarrollo de un nuevo biomaterial que se acerque lo más posible al biomaterial ideal, donde el componente principal será la monetita, pero que además presente sustituciones iónicas o compuestos que mejoren sus propiedades y ofrezcan un producto con prestaciones superiores, cuali y cuantitativamente diferentes a los ya existentes en el mercado con aplicación en la regeneración del tejido óseo. Este material será diseñado para que cumpla los siguientes requisitos:

- ❖ Ser biocompatible, no provocando efectos adversos como procesos inflamatorios, fibrosis o necrosis tisular.
- ❖ Ser osteoinductor, osteoconductor y/u osteointegrable.
- ❖ Ser reabsorbible, permitiendo un equilibrio entre los procesos de formación ósea y reabsorción del biomaterial.

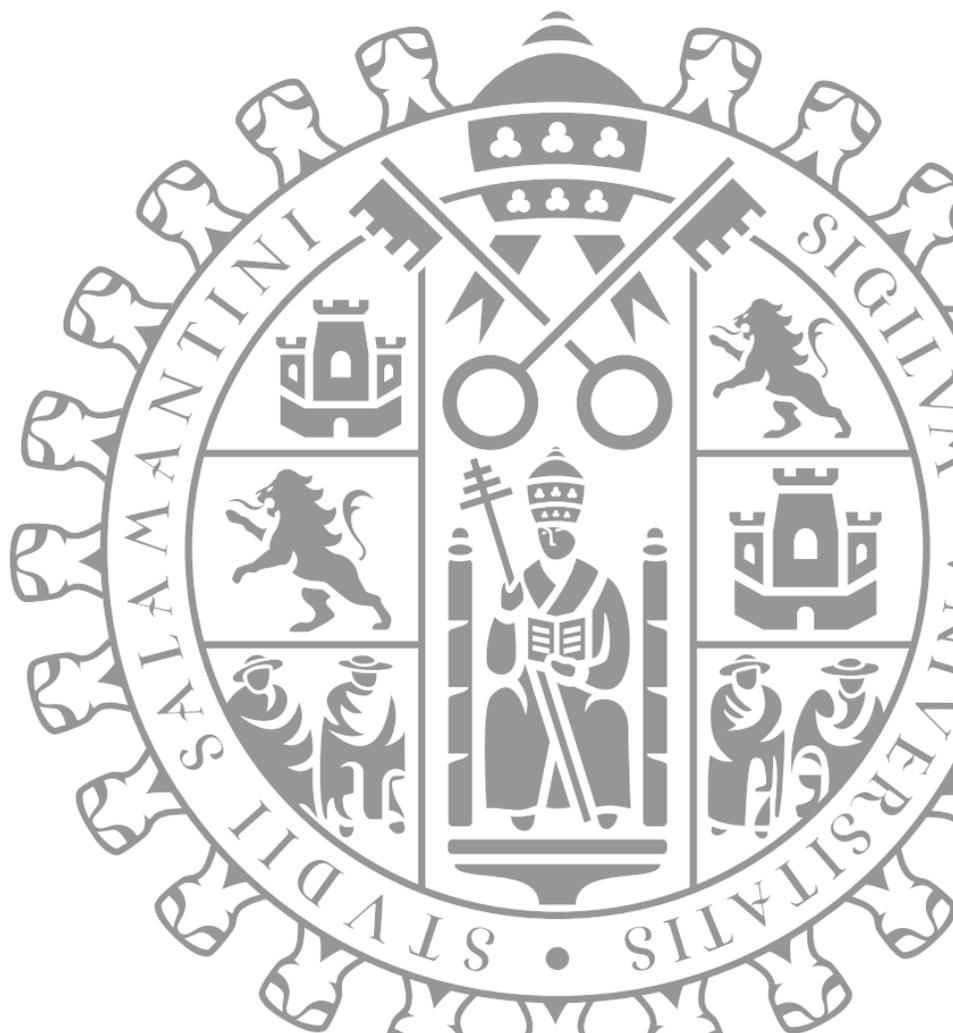
Este material estará constituido principalmente por monetita, que es un fosfato de calcio mucho más reabsorbible que los fosfatos de calcio tradicionalmente utilizados (hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico). Además, se incorporaran otros compuestos de silicio, como la pseudo-wollastonita, un vidrio bioactivo y el gel de sílice, que pueden potenciar la capacidad osteoinductiva del material final. Así mismo, para mejorar las propiedades osteogénicas del material se realizaran diferentes sustituciones iónicas en la monetita. Y por último, se estudiará la influencia de los diferentes compuestos en la velocidad de reabsorción del material. Siendo los objetivos secundarios de este trabajo:

- ❖ Estudiar el comportamiento de la monetita como material de regeneración ósea.
- ❖ Estudiar la influencia de las sustituciones de Mg y Zn de la monetita en las propiedades finales del material.
- ❖ Estudiar la influencia de los diferentes compuestos de silicio utilizados y sus materiales de partida en las propiedades del material final.
- ❖ Estudiar la influencia de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico en las propiedades

del material final.

Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende valorar la respuesta tisular a distintos biomateriales (18), diseñados por Azurebio S.L. e implantados en defectos óseos de ovejas, comparándolos entre sí y frente a la reacción a un defecto crítico y a dos granulados comerciales de amplio uso en la práctica clínica como son el Bio-Oss® (HA bovina) y Cerasorb® (β -TCP).

INTRODUCCIÓN



iii.~ INTRODUCCIÓN:

Muchos procesos tisulares patológicos, que carecen aún de tratamientos eficaces, han promovido la búsqueda de soluciones alternativas, que junto con el avance en el diseño de materiales y un mayor conocimiento de los procesos biológicos implicados, han motivado el desarrollo de los biomateriales. Uno de los avances tecnológicos más significativos del siglo XX ha sido el desarrollo de dispositivos médicos e implantes, basados en biomateriales, hecho que ha permitido aumentar considerablemente la calidad de vida de millones de personas

Una definición aceptada de biomaterial es “aquel material diseñado para interactuar con sistemas biológicos con el fin de tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” (3). Los **biomateriales** pueden ser materiales sintéticos, naturales o naturales modificados, destinados a estar en contacto e interactuar con el sistema biológico. La mayor ventaja de los biomateriales como implantes, prótesis o dispositivos implantables, es su disponibilidad, reproducibilidad y adaptación biomecánica. Una de las características esenciales que debe presentar un biomaterial es que sea biocompatible, entendiendo como biocompatibilidad “la capacidad de un material para desempeñarse en una aplicación específica con una respuesta apropiada del sistema biológico huésped” (4).

El concepto de biocompatibilidad implica que el biomaterial utilizado no debe afectar al tejido adyacente, las células cercanas no deben mostrar anormalidades, no se deben presentar reacciones de tipo inflamatorio, no debe causar una fibrosis reactiva excesiva y no debe aparecer necrosis tisular en la zona circundante al implante (5). La respuesta que tiene lugar en la interfaz implante-tejido dependerá de muchos factores como son: el tipo de tejido, edad del paciente, flujo sanguíneo, la composición del material, reactividad química, su morfología y porosidad, así como de la carga mecánica a la que esté sometido y la movilidad de la interfaz (6).

En los estudios de los biomateriales, fundamentalmente ha primado el análisis de cuestiones, tales como la biocompatibilidad, la reacción del tejido receptor hacia el implante, la citotoxicidad y las propiedades estructurales del implante.

La definición anteriormente dada de biocompatibilidad es una definición amplia, pero que no profundiza sobre cómo medirla. Esta carencia se suple con la normativa ISO 10993-1 sobre biocompatibilidad, donde se detalla una serie de ensayos que debe superar un biomaterial para ser considerado biocompatible.

Un biomaterial además debe ser capaz de soportar la esterilización, mediante métodos como los rayos gamma, gas o autoclave y sus propiedades no deben verse afectadas por ninguno de estos procesos.

En un principio los materiales se diseñaron con el único objetivo de que fueran tolerables por el organismo, aunque gran parte de ellos eran patógenos o tóxicos (7). La

primera generación de biomateriales desarrollada para implantarse en el cuerpo humano se generó en los años 60-70. Debían cumplir dos objetivos claros: presentar una propiedades físicas similares a las de los tejidos a reemplazar, y que provocaran una respuesta tóxica mínima en el lugar de implante (7). Se conocen como materiales bioinertes, es decir no provocaban ninguna respuesta positiva en el organismo. Posteriormente, el objetivo fue obtener biomateriales bioactivos, de forma que permitieran una respuesta biológica específica en relación con los tejidos favoreciendo así la unión de ambos (8). Otro avance de esta segunda generación fue la creación de materiales reabsorbibles, de manera que presentan una degradación y reabsorción controlada al ser implantados en el organismo. De esta forma, en el caso de la regeneración ósea, estos materiales se irían reabsorbiendo a la vez que se formaba el nuevo tejido óseo.

En la actualidad los biomateriales se utilizan en gran número de aplicaciones que incluyen reemplazar partes del cuerpo humano que han perdido funcionalidad debido a traumatismos o enfermedades (prótesis de cadera, implantes dentales, materiales de relleno dental, prótesis de rodillas, relleno de defectos óseos, conductos urinarios, arterias, etc.), facilitar la recuperación de traumatismos y heridas (suturas, placas y tornillos), mejorar la funcionalidad de ciertos órganos (marcapasos, lentes intraoculares), corrección de problemas cosméticos (prótesis de mama, aumento de barbilla, cirugía estética, etc.), ayudar en el diagnóstico de enfermedades (sondas y catéteres) y asistir a cierto tipo de terapias (catéteres y drenajes) (9).

En particular, los materiales destinados a sustituir o reparar el tejido óseo, además de ser biocompatibles deben favorecer la regeneración ósea, reabsorberse a la misma velocidad que son reemplazados por el nuevo hueso, o de no ser así, deben enlazarse directamente al hueso y presentar propiedades mecánicas similares a las del tejido que están reemplazando.

A continuación se va a realizar un recorrido por los diferentes materiales que se han desarrollado y destinado para la reparación de defectos óseos.

1. MATERIALES DE ORIGEN HUMANO APLICADOS EN REGENERACIÓN ÓSEA.

1.1. Autoinjertos.-

Un injerto óseo ideal debe presentar cuatro características básicas: (10) (11) (i) **osteointegración**, o capacidad de unirse químicamente a la superficie del hueso sin la formación de una capa de tejido fibroso intermedia, (ii) **osteoconducción**, o capacidad de sostener el crecimiento del hueso sobre su superficie, (iii) **osteoinducción**, habilidad de inducir la diferenciación de células madre pluripotentes de tejidos adyacentes, a células osteoprogenitoras con la capacidad de generar nuevo hueso, y (iv) **osteogénesis**, o propiedad para promover la formación de nuevo hueso por células osteoblásticas presentes dentro del injerto. Un ejemplo de materiales osteoconductores serían el sulfato de calcio, polímeros sintéticos, cerámicas, cementos de fosfato de calcio (CPC) y colágeno. Por otro lado, tanto la matriz ósea desmineralizada (siglas en inglés: DBM) y proteínas morfogénicas óseas (BMP)

presentan capacidad osteoinductora. El autoinjerto es el único material que satisface estos cuatro requisitos.

Debido a esto, el patrón de referencia en los injertos óseos es el empleo de hueso **autólogo**, tanto cortical como trabecular. La cresta ilíaca es el lugar elegido más frecuentemente como donante ya que proporciona un acceso fácil a un hueso trabecular (12). Las ventajas del uso de injertos autólogos son la ausencia de rechazo inmunológico, el aporte de factores de crecimiento con capacidad osteoinductora y de células osteogénicas, además de que actúa como un soporte osteoconductor (13). Pero por otro lado, los inconvenientes que conllevan como son la limitación en cuanto a su disponibilidad, el dolor residual, la morbilidad en la zona donde se obtiene el injerto, problemas de infecciones (12) y en ocasiones de resorción ósea, así como el compromiso del comportamiento biomecánico, han favorecido el desarrollo de nuevas alternativas de sustitutos óseos.

1.2. Aloinjertos.-

Los avances experimentados en los últimos años sobre la manipulación, tratamiento y conservación de tejidos y órganos permiten ampliar las posibilidades de disponibilidad de injertos, de tejidos y órganos a partir de donantes humanos, conocidos como aloinjertos. El aloinjerto representa una opción interesante respecto al hueso autólogo, pues evita la morbilidad asociada a la segunda cirugía para obtener el autoinjerto y proporciona un sustituto óseo sin limitaciones de cantidad, además de que se puede conseguir en los depósitos. Esta alternativa ofrece las mismas características que el autoinjerto: osteointegración, osteoconducción y osteoinducción, pero no presenta capacidad osteogénica, ya que las células osteogénicas no sobreviven a los tratamientos de preparación de estos aloinjertos.

Las complicaciones asociadas a los aloinjertos incluyen fracturas, ausencia de unión con el hueso huésped, riesgo de enfermedades de transmisión viral (hepatitis B, C y VIH) e infecciones (14). Además, es necesaria la administración de inmunosupresores para evitar rechazos.

Los aloinjertos pueden utilizarse en estado fresco o procesado, donde sufren un tratamiento de congelación. Los aloinjertos frescos se usan con menor frecuencia que los congelados, debido al tiempo insuficiente para la detección de enfermedades. Los aloinjertos congelados se conservan a temperaturas inferiores a -60°C , lo que disminuye la degradación enzimática y la respuesta inmunológica del huésped. Los aloinjertos pueden procesarse como polvo, gránulos, fragmentos esponjosos o corticales, cuñas, cilindros o vástagos. Además se les puede dar forma por fresado, adecuándolos como tornillos, siendo muy útiles en determinadas situaciones.

La esterilidad es una preocupación importante cuando se emplean aloinjertos. Se pueden someter a esterilización terminal, empleando técnicas como la irradiación gamma o esterilización con óxido de etileno. La esterilización terminal con radiación gamma ejerce mayores efectos sobre las propiedades mecánicas de los aloinjertos, mientras que el óxido de etileno afecta a las propiedades osteoinductoras.

Su aplicación es importante sobre todo cuando se requiere un soporte estructural en defectos de huesos largos y cuando se necesita un volumen de autoinjerto demasiado grande (15). Las posibles aplicaciones de los aloinjertos, en el contexto traumatológico, comprenden la reconstrucción de defectos esqueléticos, reparación de fracturas y el tratamiento de la pseudoartrosis.

1.3. Matriz ósea desmineralizada.-

Marshall R. Urist introdujo el concepto de osteoinducción en la década de 1960 (16). El conocimiento inicial fue que la matriz ósea, en particular, la matriz ósea desmineralizada (DMB) presentaba alguna propiedad capaz de inducir osteogénesis cuando se implantaba en una localización extra esquelética.

La DMB contiene factores osteoinductores que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) cuya función es regular *in vivo* la expresión y proliferación de fenotipos diferenciados de muchas poblaciones celulares. Entre estos factores se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) las cuales presentan un papel fundamental tanto en la formación como en la reparación ósea (17).

La DMB se puede obtener a partir de la descalcificación de hueso cortical de cadáveres en medio ácido. Posteriormente se realiza un procesamiento para reducir el potencial infeccioso y la respuesta inmunológica del huésped. La DMB mantiene la estructura trabecular original de colágeno y puede servir como un soporte biológico osteoconductor, a pesar de la pérdida de la fuerza mecánica estructural aportada por la fase mineral del hueso. La desmineralización ósea, no elimina los factores de crecimiento si no que los hace más accesibles. La DMB presenta una buena capacidad osteoinductora y se emplea sobre todo como relleno de defectos óseos (18).

2. BIOMATERIALES COMO SUSTITUTOS ÓSEOS.

Debido a las limitaciones que presentan los injertos de origen humano y al desarrollo de nuevas técnicas en el ámbito de la biomedicina, era necesario el estudio y aplicación de materiales muy diversos para ser utilizados como implantes permanentes o temporales en todas las especialidades médicas.

A lo largo de la historia, una gran variedad de materiales artificiales han sido utilizados para rellenar defectos óseos. Hoy en día la búsqueda de sustitutos óseos, para su utilización en numerosas aplicaciones médicas, está siendo uno de los campos con mayor desarrollo dentro de la investigación. Los injertos óseos artificiales presentan como mucho sólo dos de las cuatro características que posee un injerto óseo estándar, como son la osteointegración y la osteoconducción. Idealmente un sustituto óseo debe ser biocompatible, bioreabsorbible y fácil de usar. Además debe mostrar una reacción de tejido fibroso mínima y favorecer los procesos tanto de formación como de remodelación del hueso. Desde un punto de vista mecánico, los sustitutos óseos artificiales deben presentar una fuerza similar al hueso cortical o trabecular que va a ser reemplazado (10).

Son muchos los materiales que se han utilizado y que se están aplicando actualmente en el campo de la biomedicina, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes y encontrar un material con altas cualidades para ser aplicado en la reparación y regeneración ósea (19). En el presente trabajo comenzaremos hablando de materiales orgánicos como los polímeros, inorgánicos como metales, cerámicas y por último de los cementos de fosfato de calcio (CPC), sobre todo los que tienen como producto final brushita (DCPD). Por último haremos hincapié en los materiales estudiados en esta tesis, que son compuestos sintéticos de fosfato de calcio, formados por monetita, aplicados en su forma granulada. La monetita se consigue mediante la conversión de la brushita mediante una reacción de hidrólisis térmica. Se proponen como materiales de regeneración ósea a partir de combinaciones de monetita con otros compuestos de calcio bioactivos.

2.1. Biomateriales orgánicos: polímeros.-

La utilización de biomateriales poliméricos naturales con fines médico quirúrgicos se ha llevado a cabo a lo largo de cientos de años, en donde se utilizaban como elementos de sutura. Sin embargo, no fue hasta la segunda mitad del siglo XX donde realmente consiguieron un interés apreciable debido al paralelismo entre el desarrollo de nuevos materiales y su utilización con fines biomédicos (8).

En la actualidad los polímeros son ampliamente utilizados en clínica. Deben su éxito a que presentan una gran variedad de composiciones y versatilidad de diseño. Se pueden fabricar de diferentes maneras, con características bien determinadas y con posibilidad de conformar fibras, tejidos, películas o piezas.

Los polímeros pueden ser tanto naturales como sintéticos y, en cualquiera de los casos, se pueden encontrar formulaciones bioestables o biodegradables. Los polímeros bioestables presentan un carácter permanente y son particularmente útiles para sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos lesionados o destruidos. Sin embargo los biodegradables presentan un carácter temporal, por tanto, tienen una funcionalidad adecuada durante un tiempo limitado, el necesario mientras el problema subsista. Tanto en implantes quirúrgicos, como en membranas protectoras o en sistemas de dosificación de fármacos existen aplicaciones de este tipo de materiales, y de particular importancia son los cementos óseos acrílicos, que han encontrado importantes campos de aplicación, en particular, en traumatología.

Uno de los materiales poliméricos más utilizados en ortopedia es el cemento óseo de polimetacrilato de metilo (PMMA), desarrollado por J. Charnley en 1958 (20). Este cemento se aplicó por primera vez en la fijación de componentes protésicos. El PMMA ha sido un material ampliamente utilizado en clínica para cementar prótesis de cadera. La función del cemento de PMMA en este tipo de aplicaciones era la de transferir las cargas desde la prótesis hacia el hueso y/o aumentar la capacidad de carga del conjunto prótesis- cemento-hueso. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que el cemento de PMMA no tiene capacidad de unirse al hueso, no se produce una unión estable entre el implante y el hueso, provocando un aflojamiento de la prótesis a medio o largo plazo. Por otro lado, durante el proceso de curado, se produce una reacción exotérmica aumentando la

temperatura de la masa del cemento de tal modo que puede dañar los tejidos adyacentes, produciendo necrosis. Además es un compuesto no degradable ni reabsorbible, que puede liberar restos de monómero que no ha reaccionado, llegando a ser tóxico y carcinogénico (21) (22).

2.2. Biomateriales inorgánicos metálicos.-

El número de elementos metálicos que se usan en la fabricación de implantes es muy limitado aunque tienen un amplio rango de aplicaciones como prótesis para la reconstrucción ósea y dental. Los elementos más comunes en traumatología y odontología son: aceros inoxidables (316L, 3162VM), aleaciones de CoCr (CoCrMo, F75; CoNiCrMo, F562), aleaciones de Ti (Ti6Al4V) y titanio químicamente puro (23).

Los metales presentan una ventaja debido a sus altas propiedades mecánicas, lo que los convierte en los materiales más utilizados en la sustitución de partes relativamente grandes del tejido óseo. Esto hace que sean los materiales más adecuados para aplicaciones estructurales, como prótesis articulares, placas de osteosíntesis, tornillos de fijación, implantes dentales, etc.

Por otro lado sus grandes inconvenientes son: su falta de bioactividad y su corrosión. Los metales se encuentran en la categoría de materiales bioinertes, por lo que no se unen al hueso, sino que se recubren de una capa de tejido fibroso, trayendo consigo problemas de aflojamiento de las prótesis a largo plazo. Además la corrosión puede provocar tanto la reducción de las propiedades mecánicas y acortamiento del tiempo de vida del implante, como reacciones perjudiciales para el organismo ya sea de forma local o sistémica debido a la liberación de los productos de corrosión a los tejidos circundantes (4).

Actualmente, las investigaciones en este campo van encaminadas a buscar nuevas técnicas de procesado y nuevas aleaciones con propiedades mecánicas más parecidas a las del hueso y por otro lado a lograr superficies con texturas y composición adecuadas para aumentar la resistencia a la fricción y al desgaste, además de inducir una respuesta biológica adecuada. Un ejemplo es el caso de las prótesis articulares metálicas que se combinan con otro tipo de materiales, bien poliméricos o cerámicos (24).

2.3. Biomateriales inorgánicos no metálicos: cerámicas.-

Otro tipo de materiales más utilizados en la implantación ósea son las cerámicas. A finales de los años 70 se despertó un gran interés por el uso de los materiales cerámicos en aplicaciones biomédicas debido a que se comenzaron a detectar fallos en los biomateriales utilizados hasta el momento, como eran el acero, las aleaciones de cobalto y el PMMA. Dentro del grupo de las cerámicas se clasifican todos los cuerpos sólidos fabricados a partir de materiales inorgánicos no metálicos sometidos a un tratamiento térmico a altas temperaturas.

El parámetro que diferencia los materiales cerámicos de los metales y polímeros orgánicos es el tipo de enlace químico. Los materiales cerámicos presentan enlaces iónicos y

covalentes, los polímeros orgánicos presentan enlaces covalentes y los metales presentan enlaces metálicos. Así como los metales presentan una estructura cristalina y los polímeros acrílicos una estructura amorfa, los productos cerámicos suelen estar constituidos de una fase amorfa y/o cristalina.

Las biocerámicas se han convertido en una clase diversa de biomateriales, incluyendo actualmente 3 tipos: (25)

- Bioinertes.
- Bioactivas o reactivas superficialmente.
- Reabsorbibles o biodegradables.

2.3.1. Cerámicas bioinertes.-

Las cerámicas bioinertes sufren pocos o ningún cambio químico cuando están expuestas a ambientes fisiológicos. Al colocarse en un tejido óseo vivo la fijación se realiza a través de una fuerte unión física, produciéndose un íntimo contacto entre el hueso y la superficie de la cerámica, pero no hay intercambio iónico con el medio. La respuesta biológica frente a estos materiales, es la formación de una fina capa de tejido conectivo fibroso entre el tejido circundante y la superficie del implante (25). Estas cerámicas pueden utilizarse en forma densa o porosa, para facilitar el crecimiento óseo entre los poros del implante, lo que le confiere una fijación mecánica al mismo. Ejemplos de este tipo de cerámicas son: alúmina (Al_2O_3), zirconia y combinaciones de ambas, entre otras. La alúmina fue la primera cerámica usada extensamente en la práctica clínica, en algunos componentes de prótesis articulares y como implantes dentales, por sus excelentes propiedades de resistencia mecánica y resistencia al desgaste, y por presentar una buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión e inducir una cápsula fibrosa muy fina (4).

2.3.2. Cerámicas bioactivas.-

Se define como un material bioactivo aquel que provoca una respuesta biológica en la interfaz tejido-implante, que resulta en la formación de un enlace químico entre el material y el tejido óseo en entornos fisiológicos permitiendo así que se produzca una fijación estable (8). Dentro de los materiales bioactivos se distinguen dos clases (26).

Bioactividad clase A: Estos materiales provocan una respuesta extra e intra celular en la interfaz que hace que la superficie biológica sea colonizada por células osteogénicas libres presentes en la zona adyacente al defecto. Estos materiales son capaces de enlazarse con los tejidos blandos, por lo que son conocidos como osteoinductivos. El proceso de unión con el hueso se produce de una forma rápida.

Bioactividad de clase B: Los biomateriales que pertenecen a este grupo actúan como un soporte bioconductor que permite que el hueso crezca a través de él, por lo que el material solo exhibe una respuesta extracelular en la interfaz. Es decir, estos materiales se unen al hueso *in vivo* pero no a los tejidos blandos. Tales materiales se conocen como

osteoconductivos. En estos materiales el proceso de unión con el hueso es lento.

La capacidad de los materiales bioactivos para enlazarse al hueso ha sido atribuida a la formación de una capa de carbonato apatita en su superficie cuando se encuentran en contacto con fluidos biológicos. Esta capa tiene una estructura y composición similar a la del hueso mineral por lo que resulta un entorno ideal para que ocurran las reacciones celulares que permiten que se forme un enlace entre el hueso y el material (21).

Entre los sustitutos óseos sintéticos con gran aplicación clínica destacan las biocerámicas de fosfato de calcio como la HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), el TCP (β -TCP o α -TCP) o la combinación de las dos, fosfato de calcio bifásico (BCP), que son biocompatibles, bioactivas y osteoconductoras.

2.3.2.1. Fosfatos de calcio.-

Los fosfatos de calcio resultan muy atractivos para la restauración del sistema óseo, ya que estos son los principales constituyentes inorgánicos de la matriz extracelular de los tejidos biológicos duros tales como los dientes y los huesos. La HA, en particular, resulta de gran interés dado que es el principal componente de la fase mineral de los tejidos mencionados anteriormente (27).

Se han preparado sustitutos óseos basados en mezclas de HA y β -TCP que evolucionan, bajo condiciones fisiológicas, a nano-apatitas carbonatadas. Estas reacciones están basadas en equilibrios entre la fase más estable, HA, y la más reabsorbible, β -TCP, que dan lugar a una mezcla que sufre una progresiva disolución en el cuerpo humano, sirviendo como núcleo de formación de nuevo hueso y aportando iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} al medio local. Este material se puede utilizar conformado en piezas, en forma de recubrimientos o inyectado. En la actualidad, se están preparando muy diversas mezclas bifásicas con distintos fosfatos de calcio, vidrios, y sulfatos de calcio entre otros.

En cuanto a los procesos de obtención, las cerámicas densas de fosfatos de calcio se obtienen habitualmente por sinterización. Este proceso consiste en compactar el polvo de partida, dándole la forma deseada, someténdolo a un tratamiento térmico a alta temperatura, en el rango de 1000 a 1500°C, con lo que mediante difusión en estado sólido, se obtiene una compactación del sólido. Dependiendo de las variables de procesado, como la temperatura de sinterización, el tiempo, o la distribución del tamaño de partícula del polvo inicial, se puede controlar la porosidad de la cerámica obtenida, considerándose que una cerámica es densa cuando contiene menos de un 5% en volumen de porosidad. Relaciones molares Ca/P de 1,67, o ligeramente superiores, en los materiales de partida y temperaturas de sinterización superiores a los 900°C, conducen a la obtención de biocerámicas monofásicas de HA. Si la relación se fija en 1,50 o ligeramente inferior, y se emplean temperaturas entre 900 y 1100°C, el producto final será β -TCP; mientras que si se emplean temperaturas entre 1200 y 1400°C con tiempos de retención prolongados y enfriamiento rápido, se obtendrá α -TCP. Finalmente, para preparar BCP es necesario fijar la relación Ca/P entre 1,50 y 1,67 y emplear temperaturas superiores a 900°C. (28).

Actualmente se acepta que las cerámicas de HA son bioestables, a diferencia de las BCP y del β -TCP, que son parcial y totalmente biodegradables respectivamente. De esta forma, estas dos últimas son útiles cuando se necesita un material que sea gradualmente biodegradado y reemplazado por nuevo tejido óseo (29). Esta propiedad se describirá en el apartado siguiente.

FOSFATO TRICÁLCICO (β -TCP):

En 1920 aparecieron las primeras referencias en revistas científicas de estudios sobre el uso de estos materiales en la reparación de defectos óseos. Fueron F. Albee y H. Morrison quienes utilizaron el β -TCP para estimular el crecimiento óseo (30). Los resultados revelaban que fracturas óseas, con pérdida ósea, presentaban un mayor crecimiento y unión ósea, cuando se inyectaba un fosfato tricálcico en comparación con los controles que no tenían este compuesto.

El β -TCP puede presentarse de diversas formas: porosa o sólida, en forma de gránulos o bloques, o combinación de ambos. En forma granular presenta una fuerza de compresión y tensión similar a la del hueso trabecular (31). Normalmente se usa en su forma porosa granular, ya que éstos presentan una tendencia menor a migrar que los gránulos sólidos debido a que se produce una fijación temprana debido al crecimiento fibrovascular (10). La desventaja que presenta el β -TCP es que se reabsorbe demasiado rápido, provocando que haya menos volumen de hueso formado que volumen de β -TCP reabsorbido; por eso su aplicación en clínica se combina con materiales menos reabsorbibles.

Si una biocerámica de fosfato de calcio se implanta en tejido óseo o blando se observa la formación sobre la superficie del material de una capa de microcristales, identificados como carbonato apatita, asociada a una matriz orgánica. El mecanismo de formación de esta capa de microcristales de carbonato apatita parece comenzar con la disolución parcial de la biocerámica de fosfato de calcio, lo que conlleva un aumento de la sobresaturación con respecto a los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} en el entorno inmediato a la superficie de la biocerámica. La sobresaturación del microentorno superficial provoca la precipitación de apatitas biológicas que incorporan otros iones, principalmente CO_3^{2-} y Mg^{2+} , presentes en el fluido biológico y estos microcristales quedan fuertemente asociados a la matriz orgánica. El nuevo tejido óseo es capaz de enlazarse directamente a la capa de apatita biológica así formada, originando las propiedades bioactivas de estas cerámicas (32). Esta sustitución iónica provoca grandes diferencias en cuanto a cristalinidad y solubilidad en las apatitas biológicas (29). La sustitución iónica de la estructura de la apatita de grupos PO_4^{3-} por grupos CO_3^{2-} provoca la formación de carbonato apatita. La presencia de este grupo carbonato hace que se reduzca su cristalinidad y el tamaño de los precipitados, de forma que las uniones son más débiles, aumentando así su velocidad de disolución y solubilidad (21).

Sin embargo, las biocerámicas de fosfato de calcio tienen una grave desventaja, además de sus pobres propiedades mecánicas, ya que sólo se puede disponer de ellas en formas prefabricadas o en forma de gránulos. Presentan una gran dificultad para conformar piezas con las formas requeridas en la práctica clínica. Como la mayoría de las cerámicas, son frágiles, tienen una baja resistencia al impacto y presentan una resistencia a la tracción relativamente pequeña. Estas características hacen que disminuya su campo de aplicación,

seleccionando sólo funciones que no requieran elevadas prestaciones mecánicas.

Muchas de estas cerámicas están siendo utilizadas como recubrimientos de prótesis metálicas. La cerámica además de aportar una superficie bioactiva, constituye una verdadera y eficaz barrera que ralentiza la cinética de difusión de iones metálicos al organismo vivo. Por esta razón, se está utilizando la HA, entre otros, para mejorar o incrementar la fijación de las prótesis articulares al hueso, mejorando así su osteointegración (24).

HIDROXIAPATITA (HA):

Al principio de los años 50, R. Ray y Jr. A.A. Ward (33) evaluaron por primera vez el empleo de gránulos sintéticos de Hidroxiapatita en regeneración de defectos óseos, concluyendo que los gránulos de HA eran sustituidos por nuevo hueso, pero que no eran tan efectivos como los injertos óseos autógenos en la reparación de los defectos.

La Hidroxiapatita es el ejemplo típico de cerámica bioactiva. Es la única que se une directamente al hueso, ya que el resto de materiales bioactivos, como se ha dicho anteriormente, se unen al hueso mediante la formación de una capa de carbonato apatita biológicamente activa. La hidroxiapatita es el componente mineral principal de tejidos duros como son el hueso y dientes de animales vertebrados y humanos. La HA es un fosfato de calcio, cuya fórmula estequiométrica es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, y sus propiedades son similares a las que presentan los componentes más resistentes del hueso (25). La HA puede mostrar diferentes ratios de Ca/P, desde 1,55 a 2,2, según la forma de sintetizarla. La HA sintética puede ser cerámica o no cerámica, en forma porosa, sólida, granulada o en bloques. La estructura cerámica se refiere al hecho de que los cristales de HA se calientan entre 700 y 1300°C para formar una estructura altamente cristalina. La forma cristalina es resistente a la reabsorción *in vivo*, sin embargo la HA no cerámica es más fácilmente reabsorbible (10).

La HA puede ser densa o de baja densidad. La HA densa, como otros materiales de fosfato de calcio, es osteoconductor pero no osteoinductor. El papel de la HA densa no es pasivo, sino que contribuye a la formación de carbonato apatita en las superficies y promueve la adhesión de células productoras de matriz y materia orgánica como resultado de la química y cargas de la superficie. Por otro lado, la HA de baja densidad presenta una gran porosidad interconectada. Estas estructuras porosas promueven el crecimiento del hueso en el interior del implante, por lo que se produce una mejor fijación y una reparación integrada, sobre todo en el hueso trabecular, donde la estructura es muy similar a la del hueso huésped. El inconveniente de presentar una estructura porosa es que se obtienen bajas propiedades mecánicas.

El interés de la HA como biomaterial recae en que es muy similar a la fase mineral del hueso, es biocompatible, bioactiva y osteoconductor. Sin embargo, presenta una baja resistencia y dureza, por lo que su aplicación se limita a zonas donde no se requieran esfuerzos mecánicos.

Estos materiales se utilizan, en general, para el relleno de defectos óseos en traumatología, cirugía máxilo-cráneo-facial, neurocirugía y fundamentalmente en tratamientos periodontales o de aumento de cavidades alveolares (34).

2.3.2.2. Vidrios bioactivos.-

Los **vidrios bioactivos** fueron descritos por primera vez en la década de los 70 por Hench y cols. (35). Su componente mayoritario es la sílice, además de estar compuestos de óxido de sodio, óxido de calcio y fosfatos; de forma que variando la concentración y proporción de estos compuestos, pueden cambiar sus propiedades de no reabsorbibles a solubles. Una de las formulaciones comerciales más importantes es la conocida con el nombre de Bioglass®, con una composición $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$. Este vidrio fue obtenido por el método tradicional de fusión y enfriamiento rápido. En el año 90, Li y cols. (36) obtuvieron vidrios por el método sol-gel en el sistema ternario $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$. Los vidrios obtenidos por este método resultaron ventajosos respecto a los de fusión, por lo que rápidamente comenzó a utilizarse este método para preparar vidrios bioactivos. Estos presentan mayor pureza y homogeneidad, así como mayor área superficial y porosidad que los obtenidos por el método de fusión, lo que hace que sean más reactivos y presenten excelentes propiedades de degradación y reabsorción. Además, este método de síntesis de vidrios por sol-gel permite preparar vidrios a baja temperatura y no es necesario añadir componentes con el objetivo de disminuir la temperatura de fusión (como por ejemplo, Na_2O , MgO , CaF_2 , etc.) lo cual permite trabajar con composiciones más simples.

Los vidrios presentan una alta reactividad en medio acuoso, provocando un rápido intercambio de iones de la superficie del vidrio con los fluidos circundantes, proceso que produce una variación de la concentración iónica del fluido y que a su vez provoca la formación de la capa de gel de sílice en la superficie del vidrio. Dentro de la capa de gel de sílice los iones de calcio, fosfato y carbonato se combinan formando una capa de carbonato apatita muy similar, en términos de cristalinidad, a la apatita presente en el hueso (37). Esta capa es química y estructuralmente equivalente a la de la fase mineral del hueso. La apatita formada es similar a la biológica, es nanocristalina y no estequiométrica, con presencia de carbonato. Esta capa de apatita permite una unión química al hueso, sin que se forme tejido conectivo fibroso en la interfaz. Generalmente, las roturas se producen en el implante o en el hueso pero casi nunca en la interfaz. En estadios posteriores se produce la absorción de compuestos biológicos, como proteínas, a la capa de carbonato apatita y la subsiguiente actividad celular con lo que finalmente la capa de apatita acaba siendo sustituida por hueso.

Los vidrios bioactivos presentan una fuerza mecánica mayor que la de los compuestos cerámicos de fosfato de calcio. Uno de los inconvenientes de estos materiales es la dificultad a la hora de fijarlos en el esqueleto, ya que son duros y frágiles, y al moldearlos se fracturan.

Estos vidrios además de ser biocompatibles, bioactivos y producir osteointegración, son materiales osteoconductores y osteoinductores (38). Una de las características más significativas que se ha encontrado de los vidrios bioactivos es que sus productos de disolución ejercen un control genético sobre los osteoblastos y una rápida expresión de los genes que regulan la osteogénesis y la producción de factores de crecimiento. De los componentes del vidrio, el silicio es considerado como fundamental en la diferenciación y proliferación de osteoblastos y la activación de la expresión de ciertos genes osteoblásticos implicados en el metabolismo óseo (39) (40).

Clínicamente los vidrios bioactivos se han utilizado para aumentar el volumen del injerto autógeno y como sustituto óseo en la cirugía maxilofacial.

2.3.2.3. Vitrocerámicas.-

Dentro de los materiales cerámicos bioactivos, también hay que destacar las vitrocerámicas bioactivas, cuyo desarrollo se inició en los años 60. Son cerámicas policristalinas obtenidas mediante cristalización controlada de vidrios, donde coexisten fases amorfas y cristalinas. Estos materiales presentan excelentes propiedades térmicas y mecánicas en comparación con las cerámicas tradicionales, y en el campo de los biomateriales se sintetizan con la esperanza de mejorar las escasas propiedades mecánicas de los vidrios, sus precursores, pero sin que el tratamiento térmico o la adición de precipitados metálicos afecte a la bioactividad de los mismos. En general estas vitrocerámicas están constituidas por apatita, cristales de silicatos (como la wollastonita) y una fase vítrea residual.

Uno de los mayores intereses en el desarrollo de estos materiales es que se pueden obtener en formas muy complejas. Pueden contener además de CaO , P_2O_5 y SiO_2 , que son los compuestos mayoritarios, otros componentes como Na_2O , K_2O , MgO , CaF_2 , Al_2O_3 y CaF_2 (41). Además poseen una microestructura muy fina, con prácticamente ningún poro residual, lo que le aporta unas propiedades mecánicas mejoradas.

Muchas vitrocerámicas biomédicas presentan una composición similar a la de los vidrios bioactivos de L. Hench (Bioglass), sin embargo, la mayoría presenta un bajo contenido de óxidos alcalinos (42).

Dentro de las vitrocerámicas cabe destacar:

- **Ceravital:** Fue desarrollada por Brömer y Pfeil en 1973 (43) y ha sido una de las primeras en utilizarse en clínica, aunque actualmente, bajo este nombre ya se incluye un amplio rango de diferentes composiciones. La resistencia a la tensión de estos materiales está por debajo de los 160 MPa del hueso cortical humano y son similares a la que presenta la HA densa (115 MPa). Se cuestionó también su estabilidad a largo plazo, por lo que en la actualidad se utilizan en zonas donde el requerimiento mecánico sea mínimo.

- **Cerabone A/W:** Una de las vitrocerámicas de mayor éxito clínico, debido a su resistencia, es probablemente la denominada vitrocerámica A/W, la cual está formada por dos fases cristalinas: oxifluoroapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OF}_2)$) y wollastonita ($\beta\text{-CaSiO}_3$), además de una fase vítrea residual de SiO_2 . Originalmente fue desarrollada por Kokubo y col. (44) (45) y comercialmente se conoce con el nombre de Cerabone A/W. Este tipo de vitrocerámicas presentan una superficie muy irregular, al contrario que la de los vidrios y apatitas, que es lisa. Se caracteriza por la formación de enlaces químicos fuertes con el hueso. Cristales como la apatita y la wollastonita precipitan desde la matriz vítrea mejorando las propiedades mecánicas mientras, que además, promueven la bioactividad de las vitrocerámicas. Esta propiedad se debe sobre todo al grupo SiO_2 , como se ha descrito para los vidrios bioactivos.

Las buenas propiedades mecánicas, su buena biocompatibilidad y bioactividad, hacen que se haya fomentado el uso de las vitrocerámicas desde los años 80 en situaciones donde existen ciertas sollicitaciones de carga, como en la reconstrucción de la cresta iliaca, y en su forma granular, como relleno de defectos óseos (42).

2.3.2.4. Silicatos bioactivos.-

Otro tipo de materiales a tener en cuenta dentro de las cerámicas bioactivas, son aquellos que presentan grupos CaO-SiO_2 en vez de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, como son los silicatos bioactivos. Anteriormente, se entendía que, tanto vidrios como vitrocerámicas, debían tener los grupos CaO y P_2O_5 para presentar bioactividad, los cuales son los componentes mayoritarios de la HA. Sin embargo, Ohura y cols. (46) demostraron que los vidrios con grupos CaO-SiO_2 , libres o con pocos grupos P_2O_5 , formaban también una capa de HA en su superficie cuando estaban en contacto con un fluido fisiológico simulado; mientras que los vidrios $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ libres de grupos SiO_2 no forman esta capa de HA al sumergirlos en fluido fisiológico simulado.

Al combinar el calcio con silicio se mejoran tanto las propiedades mecánicas y como su bioactividad.

Dentro de los silicatos bioactivos encontramos la wollastonita que es uno de los materiales de refuerzo más importantes. Se trata de un silicato de calcio que se encuentra en forma natural con una fórmula molecular de CaSiO_3 . Es un material biocompatible y con características bioactivas, por lo que puede utilizarse como sustituto óseo o en reparaciones óseas donde los requerimientos mecánicos no sean muy elevados (47). Se han realizado estudios in vitro de la capacidad que presenta la pseudo-wollastonita a que se adhieran células osteoblásticas a su superficie, demostrándose que éstas se adhieren, mediante mecanismos mediados por proteínas, y proliferan en su superficie (48). En el año 2000, De Aza y cols. (49) mostraron que la ps-wollastonita (α - CaSiO_3) se integraba en la estructura ósea de tibias de ratas mediante mecanismos de disolución-precipitación-transformación. Además observaron que los osteoblastos migraban hacia la interfase formada, que era biológica y químicamente activa, colonizando la superficie ósea.

2.3.2.5. Compuestos inorgánicos bioactivos no cerámicos.-

Uno de los materiales que entra dentro de este grupo se conoce con el nombre de yeso, en inglés "Plaster of Paris". En un principio tenía un uso externo en la colocación de vendajes, pero en 1892, Dressman lo aplicó como relleno de defectos óseos con sustancias antisépticas (50). También se ha utilizado como portador de antibióticos en el tratamiento de la osteomielitis con gran éxito (51). Esta aplicación permite su uso en el tratamiento de defectos óseos infectados.

El sulfato de calcio se usa en forma de hemihidrato, por lo que en contacto con el agua produce una reacción exotérmica, que conlleva a la formación de sulfato dihidrato, formando cristales muy homogéneos, similares en forma y tamaño. Una vez que el sulfato de calcio ha endurecido muestra una resistencia a la compresión mayor que presenta el hueso trabecular y una resistencia a la tensión ligeramente inferior a que presenta el hueso

trabecular (10).

El sulfato de calcio requiere ambientes secos para fraguar y si se re-expone a un ambiente húmedo tiende a ablandarse y fracturarse. Por este motivo, no presenta propiedades mecánicas fiables por lo que su aplicación se limita a áreas delimitadas, como relleno de defectos óseos.

2.3.3. Cerámicas biodegradables o reabsorbibles.-

El último grupo de biocerámicas corresponde a aquellas que son biodegradables o reabsorbibles. Las cerámicas reabsorbibles comenzaron a utilizarse en el año 1969. Este tipo de biocerámicas se disuelven con el tiempo y son gradualmente sustituidas por tejidos naturales. Pueden considerarse como los implantes ideales, porque permanecen en el cuerpo mientras su función sea necesaria y desaparecen según el tejido se regenera. Su mayor desventaja es que su fuerza mecánica disminuye durante el proceso de reabsorción (25). Por consiguiente, la función de estos materiales es participar en los procesos dinámicos de formación y reabsorción que se producen en los tejidos óseos. Cuando estos materiales se implantan se produce un contacto directo con el hueso sin que se forme una capa fibrosa intermedia en la interfaz.

Las cerámicas biodegradables o reabsorbibles son principalmente fosfatos cálcicos de diferente solubilidad en agua. Esta solubilidad es la que permite predecir su comportamiento *in vivo*. Si su solubilidad es inferior a la de la parte mineral del hueso, el material se degradará muy lentamente o no se degradará. Si su solubilidad es superior a la de la parte mineral del hueso, se degradará. De esta forma podemos predecir la velocidad de degradación del fosfato cálcico *in vivo* y se puede clasificar, a pH 7, de la siguiente manera: (52) MCPM > TTCP = α -TCP > DCPD > DCP > OCP > β -TCP > PHA > HA.

La capacidad de biodegradación aumenta (28):

- Si aumenta la superficie específica.
- Si la cristalinidad disminuye.
- Si el tamaño del grano o del cristal disminuye.
- Si se produce una sustitución iónica de grupos CO_3^{2-} , Mg^{2+} o Sr^{2+} en HA.

Los factores que influyen en el descenso de la biodegradación son:

- Sustitución de Mg^{2+} en β -TCP.
- Bajos ratios β -TCP/HA en compuestos bifásicos.

La biodegradación o reabsorción de los fosfatos de calcio se produce debido a:

- Una disolución fisicoquímica, que depende de la solubilidad del producto del material y del pH local. Se forman nuevas fases, como fosfatos cálcicos amorfos, DCPD...
- Ataque prioritario a las uniones de grano y desintegración física de pequeñas partículas.
- Factores biológicos, como la fagocitosis, que provoca un descenso en la concentración de pH local, afectando a la actividad celular y al sitio de implantación.

2.3.4. Cerámicas porosas.-

Los requisitos de las aplicaciones clínicas de los biomateriales implicaban el desarrollo de otro tipo de materiales que presentaran propiedades que se pudieran combinar con las existentes previamente, pero que además permitieran una mayor interacción con el tejido adyacente y sirvieran además como soporte. Por ello se desarrollaron las cerámicas porosas, las cuales presentan una mayor eficacia. En el caso de materiales poco reabsorbibles como la hidroxiapatita, la estructura porosa actúa como soporte para el crecimiento óseo, permitiendo una unión entre el material y el tejido, de forma que se produce una firme fijación del material. El crecimiento del hueso en el interior de los poros hace que aumente considerablemente la resistencia del implante, siendo además, las propiedades mecánicas finales mucho más parecidas a las del hueso y por lo tanto, el éxito del implante es mayor. Además de la porosidad también juega un papel muy importante en el crecimiento del hueso la interconexión entre los poros, ya que permite el intercambio de fluidos, iones, nutrientes y una correcta vascularización (53) (54).

El uso de cerámicas porosas resulta útil también en el caso de materiales reabsorbibles puesto que de esta manera se puede aumentar significativamente su velocidad de disolución y biodegradación.

A pesar de la importancia de este tipo de materiales en implantación ósea y de las múltiples investigaciones realizadas en este sentido, todavía quedan aspectos significativos sin resolver como por ejemplo, cual es el tamaño y forma óptimos de poro y de interconexión, así como el disponer de métodos de conformado adecuados para su obtención.

Los trabajos publicados hasta el momento difieren en cuanto al tamaño de poro necesario para permitir el crecimiento óseo. Debido a este hecho actualmente no existe consenso respecto a las condiciones óptimas de osteoconducción tales como, tamaño de poro, forma, interconexión y distribución de poros. En general, la mayoría de los trabajos que evalúan el crecimiento óseo en cerámicas porosas plantean que el tamaño mínimo de poros para que el hueso crezca en el interior del implante es de $100\mu\text{m}$. Sin embargo también hay que tener en cuenta que existe otro factor limitante del crecimiento óseo que es la interconexión de los poros, ya que resulta fundamental para que el hueso pueda crecer hasta el interior del implante.

Estudios realizados en este sentido sugieren que el factor que realmente limita el crecimiento óseo es el tamaño de interconexión de los poros en lugar del propio tamaño del poro. En este sentido Chang y cols. (55) evaluaron la influencia del tamaño de poro y la interconexión en la osteoconducción en piezas con tres geometrías de poro diferentes: cilíndricos, tipo esponja y con porosidad cruzada. Las cerámicas con poros cilíndricos mostraron las mejores propiedades mecánicas antes y después de la implantación y en ellas se observó osteoconducción activa aún en los materiales con canales de $50\mu\text{m}$, resultando $300\mu\text{m}$ el diámetro de poro óptimo. Por otra parte Tamai y cols. observaron osteoconducción activa en piezas porosas con un tamaño de interconexión de $40\mu\text{m}$ (56). Lu y cols. encontraron que el tamaño de interconexión debe ser alrededor de $50\mu\text{m}$ para que la formación de hueso mineralizado tenga lugar (57). Teniendo en cuenta estos resultados, el tamaño y grado de interconexión de los poros deben considerarse como uno de los factores

más críticos para que tenga lugar el crecimiento óseo en el interior del implante.

Las biocerámicas se caracterizan en general por su alta biocompatibilidad, bioactividad y algunas de ellas son reabsorbibles y/o porosas. La principal desventaja de estos materiales es que sus propiedades mecánicas son muy pobres, lo que restringe su aplicación a zonas del organismo que no soporten cargas, rellenos de defectos óseos, aumento del reborde alveolar, etc. Otra de las limitaciones de las biocerámicas ha sido la dificultad para conformar piezas con las formas requeridas en la práctica clínica, por lo que estas se utilizan en forma de granulados o de piezas preconformadas. Los granulados tienen el inconveniente de que es difícil colocarlos en el sitio de implantación. Por otro lado las piezas al presentar tamaños y formas preestablecidos, son difíciles de adaptar al sitio de implantación por lo que generalmente resulta necesario adaptar el defecto a la forma del implante.

A pesar de la amplia utilización de los materiales mencionados anteriormente, todos fallan en algún sentido por lo que ninguno reúne los requisitos del material ideal. En general, los metales ofrecen las mejores propiedades mecánicas pero no se unen al hueso, las cerámicas son las que presentan mayor biocompatibilidad y bioactividad pero sus propiedades mecánicas son pobres, mientras que los polímeros a pesar de su gran versatilidad, no son tan biocompatibles como las cerámicas y en general no son bioactivos. Por esta razón gran parte de las investigaciones han estado encaminadas a la preparación de materiales compuestos, de manera que al combinar las propiedades de los elementos por separado se obtengan materiales con características superiores.

2.4. Biomateriales tipo cemento.-

Una alternativa a los tradicionales granulados y piezas en que comúnmente se emplean los fosfatos de calcio han sido los cementos, los cuales pueden ser aplicados en el sitio de implante en forma de pasta, adquiriendo la forma del defecto a reparar, con lo que se elimina el problema del conformado previo de las piezas. Los cementos se diferencian de las cerámicas, en que éstos se producen por cristalización directa *in vivo* y no requieren altas temperaturas para la formación de un implante estructuralmente estable.

2.4.1. Cementos de ionómeros de vidrio (polialquenoatos de vidrio).-

En un esfuerzo por prolongar el tiempo de vida de las prótesis, los investigadores llevaron a cabo el desarrollo de diferentes tipos de cementos. Los primeros cementos de polialquenoatos de zinc y de vidrio se utilizaron con una aplicación dental a finales de 1960 y a principios de 1970. Los polialquenoatos o policarboxilatos de zinc fueron desarrollados por Smith en 1968 como modificación de los cementos de fosfato de zinc (58). Este tipo de materiales se sintetizan mediante una reacción ácido-base a temperatura ambiente. Se trata de un cemento frágil aunque presenta una fuerza de compresión relativamente alta. Si bien, el zinc es un metal esencial que participa en una gran variedad de procesos metabólicos, este tipo de cementos provocan la formación de una cápsula fibrosa de naturaleza colágena que los rodea, de forma que compromete la fuerza de interfase entre el hueso y el cemento (59).

Los cementos de ionómero de vidrio surgieron gracias a las investigaciones llevadas a cabo por Wilson y Kent en 1969 (60). Estos materiales se usaron por primera vez en odontología, donde el empleo de un cemento era necesario para la unión del esmalte a los dientes en un ambiente húmedo. En los últimos años se han difundido como materiales obturadores.

Los cementos de ionómero de vidrio se obtienen a través de una reacción ácido-base inmediata y exotérmica, aunque la temperatura a la que se llega no es muy elevada y produce CO_2 , siendo el resultado una pasta de cemento poroso. Estos cementos son biocompatibles, presentan una osteointegración similar a los vidrios bioactivos y su estructura porosa proporciona osteoconducción (61). Una de sus características más importantes es la capacidad que presentan de pegarse a la fase mineral del esmalte o la dentina. Estos materiales presentan excelentes propiedades de adhesión al tejido dañado pero a su vez, no muestran muy buenas propiedades mecánicas, si se comparan con otros materiales de obturación, como son la resina y la amalgama. Además presentan una pobre resistencia a la fractura.

Los ionómeros de vidrio se han considerado como los sustitutos de los cementos de PMMA. Ambos pueden llevar añadidos antibióticos y proteínas de alto peso molecular, aunque los ionómeros liberan las proteínas de una forma más eficaz además de que provocan un daño menor a las proteínas termosensibles, ya que su reacción de curado es menos exotérmica que la del cemento de PMMA (18).

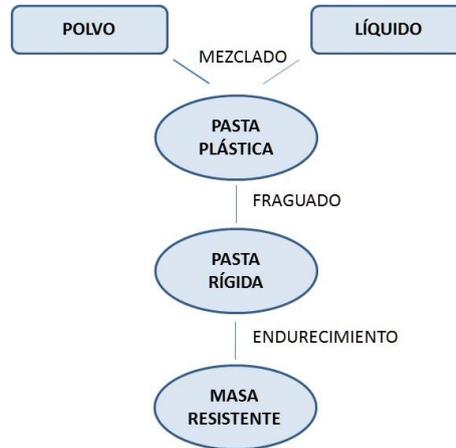
Sin embargo, a la hora de hablar de los inconvenientes de este tipo de cementos, encontramos que provocan la desmineralización del hueso cercano al lugar de implantación, la acumulación de aluminio tanto a nivel local como en zonas que se encuentran a cierta distancia del sitio de implantación, y además, se produce una deficiente mineralización del hueso neoformado (62). Debido a esto la aplicación de estos materiales en cirugía ortopédica conlleva el desarrollo futuro de cementos de polialquenoatos de vidrio que presenten una liberación baja o nula de aluminio.

2.4.2. Cementos de fosfato de calcio (CPC).-

Los fosfatos de calcio están siendo desarrollados como cementos óseos para aplicaciones en la reconstrucción, relleno y aumento de defectos óseos. Las numerosas investigaciones que se han llevado a cabo sobre los cementos de fosfato de calcio han llevado a la publicación de numerosas patentes desde mediados de 1980. Grüniger y cols. (63) introdujeron el término de Cemento de Fosfato de Calcio (CPC) y lo describieron como: un polvo, compuesto por uno o más fosfatos de calcio, y una fase líquida, que puede ser agua o una solución acuosa, que al mezclarse produce una reacción a temperatura ambiente o corporal entre las dos fases, dando lugar a una pasta. Ésta fragua y endurece, debido a la disolución de los fosfatos de calcio originalmente presentes y a la precipitación de otros más insolubles en forma de cristales entrelazados entre sí. De esta forma se puede dar lugar a la formación de cuerpos sólidos de hidroxapatita u otro tipo de fosfato de calcio (64).

En general, se considera que la transformación de la pasta inicial a un cuerpo sólido tiene lugar en dos etapas. En la primera, la masa pierde su plasticidad de manera que, si se moldea nuevamente o se mezcla con más agua la plasticidad no se recupera o se recupera sólo parcialmente. En la segunda etapa tiene lugar la consolidación, aumentando la dureza y la resistencia mecánica hasta obtenerse una consistencia sólida. Estas dos etapas se conocen como los procesos de fraguado y endurecimiento, respectivamente.

A continuación se muestra una representación esquemática del comportamiento de un sistema cementante: (64)



Teniendo en cuenta, por una parte, las propiedades de las cerámicas de fosfato de calcio, y por otra, las características de un material cementante, se enumeran a continuación las ventajas que cabe esperar de la obtención de cementos basados en fosfatos de calcio en cuanto a su aplicación como materiales para la reconstrucción o regeneración ósea:

- a) Moldeabilidad: no es necesario dar forma al implante *a priori*, sino que es el mismo cirujano el que moldea el material *in situ*, introduciéndolo en estado pastoso en la cavidad que conviene llenar. Esto se traduce en una buena adaptación del implante a la región que debe ser reconstruida. Con el fraguado *in situ* se consigue simultáneamente una buena fijación.
- b) En algunos casos se pueden obtener, modificando convenientemente las variables de procesado, materiales con la fluidez inicial suficiente para que sean inyectables. Esto puede suponer una gran ventaja de aplicación del material, en lo que respecta a la técnica quirúrgica.
- c) Una propiedad que se deriva de la moldeabilidad y de la adaptación del material a la cavidad es la buena aposición entre el cemento y el tejido óseo circundante. La existencia de un buen contacto entre el biomaterial y el hueso es fundamental para que se pueda producir el crecimiento óseo sobre el biomaterial, con la formación de un enlace entre ambos.
- d) Otra consecuencia de las características del material es su fácil manipulación. Esta propiedad es importante si se considera, por contraste, la fragilidad de los biovidrios

y de las cerámicas, que requieren una manipulación muy cuidadosa por parte del cirujano, ya que cualquier daño producido en la superficie del implante durante el proceso de implantación puede producir un fallo catastrófico del mismo.

e) Los cambios de volumen que presentan son prácticamente insignificantes, con lo que no plantean problemas en su aplicación *in vivo*.

No todos los fosfatos de calcio pueden precipitar a temperatura ambiente o corporal. Si clasificamos los cementos de fosfatos de calcio en función del producto obtenido en la reacción de fraguado, esto limita el número de distintos tipos de cementos teóricamente a seis, que se recogen en la siguiente tabla (65):

Ca / P	Fosfato de calcio	Fórmula	pH
1,35	Fosfato de calcio amorfo (ACP)		4 a 9
0,5	Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0 a 2
1	Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 a 6
1,33	Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,5 a 7,0
1,5	Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	6,5 a 9,5
1,67	Hidroxiapatita precipitada (PHA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9,5 a 12

Hay que precisar que desde un punto de vista estrictamente termodinámico, sólo existen dos fases estables a temperatura ambiente cuando están en contacto con una solución acuosa, que son el DCPD a $\text{pH} < 4,2$, y la HA a $\text{pH} > 4,2$. Sin embargo, por razones cinéticas, pueden precipitar más fácilmente otras fases. Concretamente, para valores de pH comprendidos entre 5 y 7 el OCP es la fase favorecida, mientras que a valores de pH más elevados se ve favorecida la precipitación de CDHA, y a pH aún más elevado precipita HA (65).

Todas las formulaciones posibles de CPC, pueden englobarse mayoritariamente en dos categorías, según el resultado de la reacción o reacciones de fraguado, donde la fase mayoritaria que se forma es hidroxiapatita o brushita. Se puede decir que la mayor diferencia entre ambas se encuentra en su solubilidad y reabsorción; siendo la brushita mucho más soluble que la HA, por lo que, en principio, la brushita se reabsorbe más rápidamente.

Para la mayoría de los cementos de HA el agua no es un reactivo en la reacción, además la cantidad de agua que se necesita es muy baja. Sin embargo, en los cementos de brushita, el agua siempre participa en las transformaciones químicas ya que es necesaria para la formación de brushita. Por esta razón, los cementos de brushita se denominan hidráulicos, mientras que este término normalmente no se asocia a los cementos de apatita.

Los cementos de brushita son biocompatibles y bioreabsorbibles. Al contrario de los cementos de HA, los de brushita pueden ser inicialmente líquidos y aun así curan en un periodo de tiempo corto. Debido a la mejor solubilidad de la brushita, son rápidamente degradados *in vivo* y sufren un descenso rápido de su dureza. Sin embargo, los tiempos de curado cortos, bajas propiedades mecánicas y su inyectabilidad limitadas, hacen que estos cementos tengan limitadas aplicaciones en clínica. Además el ratio entre la fase líquida y la sólida es elevada para mantener por más tiempo la pasta viable e inyectable en un periodo de tiempo adecuado, lo que provoca una alta porosidad y por lo tanto hace que sean materiales débiles (66).

Los CPC en los que su producto final es la HA, ésta se produce a temperatura ambiente y por lo tanto es más similar a las apatitas biológicas que las HA sintetizadas a altas temperaturas. Además, la formación de HA a bajas temperaturas permite la incorporación de moléculas orgánicas, como factores de crecimiento y drogas, así como células vivas.

Muchos estudios se han decantado por los CPC que forman HA debido, fundamentalmente, a tres razones: (i) la apatita es la forma de fosfato de calcio presente en el hueso; (ii) los CPC de apatita presentan mejores propiedades mecánicas; (iii) al contrario que los cementos de brushita, los de apatita curan a pH neutro. Pero a pesar de las ventajas que presentan los cementos de HA, la brushita ha creado un gran interés, ya que es estable en un ambiente fisiológico y se reabsorbe más rápidamente.

En relación a las propiedades biológicas *in vivo* de los CPC, Driessens y cols. introdujeron el término osteotransductividad, el cual se puede definir como la capacidad que presenta un material al integrarse rápidamente en la estructura ósea y transformarse en tejido óseo después de ser implantado. Los CPC al ser implantados en defectos óseos exhiben una rápida osteointegración, pero a más largo plazo son lentamente reabsorbidos y simultánea y gradualmente reemplazados por un nuevo tejido óseo sin la aparición de un espacio u holgura entre el material y el hueso, y sin pérdida de la estabilidad mecánica durante la transformación. La velocidad de osteotransducción *in vivo* de los CPC depende fundamentalmente de las fases que lo componen, aceptándose el siguiente orden: DCPD > CDHA > HA. Además la velocidad de osteotransducción puede aumentarse mediante la adición de DCPA y/o CaCO_3 al polvo del cemento (67).

A pesar de que los CPC son reabsorbidos por el organismo, su velocidad de reabsorción es lenta. En algunos casos se ha observado que tras la integración de las capas externas del cemento, se llega a una situación de equilibrio en la cual el material deja de ser reabsorbido. Esto es debido, en parte, a que el cemento tiene una estructura con microporos, con un tamaño de poro excesivamente pequeño, que no permite la colonización del mismo por tejido óseo y su progresiva reabsorción (68).

En los últimos años se está investigando la forma de aumentar la velocidad de reabsorción de estos cementos y conseguir la regeneración total del tejido.

Se pueden distinguir dos tipos de bioreabsorción:

- La reabsorción pasiva: que se debe a la velocidad de disolución del material en los fluidos corporales y que depende de los componentes finales del cemento fraguado. Este tipo de reabsorción depende también de la porosidad del material, de las sustituciones iónicas, de la cristalinidad y del pH de la interfase cemento-tejido. Corresponde a una degradación únicamente físico-química, sin implicación de la actividad celular.
- La reabsorción activa: que se debe a la actividad celular (osteoclastos, macrófagos y otras células inflamatorias). Los osteoclastos crean un medio ácido, con un pH cercano a 5,5, que aumenta la velocidad de disolución del material. Este tipo de reabsorción ocurre normalmente únicamente en la superficie del cemento porque los poros presentes en los CPC no permiten la penetración de células o de vasos sanguíneos en el material.

Una alternativa frente a la estructura con microporos, ha sido la preparación de CPC con macroporosidad. La formación de macroporos se puede realizar *in situ* mediante el uso de agentes espumantes como el peróxido de hidrógeno, aceites y moléculas de sacarosa. La introducción de macroporosidad (poros $>100\mu\text{m}$) de manera controlada permite incrementar la superficie de contacto, favoreciéndose así la reabsorción y la sustitución del implante por tejido óseo nuevo (69). Si bien, hay que tener en cuenta que el crecimiento del hueso no solo depende de la macroporosidad sino también de la interconectividad que existe entre los poros, como se ha comentado anteriormente.

La disponibilidad de los CPC con resistencia mecánica próxima a la resistencia de los huesos humanos y con tiempos de fraguado regulables, aumentaría considerablemente el campo de las aplicaciones potenciales de estos materiales, en la actualidad limitado a la odontología, la cirugía maxilofacial y a la reparación de fracturas en los miembros superiores. Por otra parte, si además de desempeñar un papel estructural en la reparación o remodelación del tejido óseo, pueden actuar como portadores de antibióticos y prevenir o combatir eficazmente las infecciones óseas, el espectro de sus aplicaciones se ampliaría aún más. Finalmente, otros aditivos pueden ser incorporados en el cemento con el fin de mejorar su bioactividad, como compuestos inorgánicos, orgánicos e incluso moléculas bioactivas y factores de crecimiento.

2.4.2.1. Formas de presentación de los cementos.-

Dependiendo de las aplicaciones clínicas y la localización anatómica donde se va a utilizar el biomaterial, los requisitos y las propiedades que deben presentar son muy variados. Por ello se han diseñado diferentes métodos de síntesis de los cementos para intentar optimizar sus propiedades en función de las necesidades a la hora de aplicarlos. De este modo se han desarrollado cementos granulados o inyectables, de forma que pueden amoldarse al tamaño del defecto óseo; también se han diseñado materiales de forma que puedan adquirir una estructura tridimensional y así desempeñar las funciones de soporte para permitir el crecimiento tisular. Estos ejemplos, entre otros, ponen de manifiesto el gran

desarrollo y estudio de las características de los biomateriales, de forma que se intentan optimizar sus propiedades a la hora de ser utilizados.

APLICACIÓN DE CPC COMO SISTEMAS INYECTABLES:

Una variante dentro de los CPC son los cementos inyectables (iCPC) que presentan las características de ser osteoconductores y osteogénicos. Las ventajas que presentan los iCPC son su moldeabilidad y su capacidad de ajustarse al tamaño del defecto. Además se pueden utilizar en lugares difícilmente accesibles, pudiendo rellenar defectos óseos estrechos y facilitar así las técnicas de mínima invasión. Su característica principal es la plasticidad, además de que se puede variar su porosidad y el tiempo de inyección. La inyectabilidad de un cemento puede mejorarse mediante el aumento de la viscosidad de la fase líquida o reduciendo la permeabilidad de la fase sólida. Para mejorar la manipulación de estos cementos se pueden realizar cambios en el tamaño y forma de las partículas, en la viscosidad de la fase líquida y en la ratio líquido/sólido (L/S). Por ejemplo, ratios L/S bajos implican una baja porosidad y una alta resistencia a la compresión. Por otro lado, ratios L/S altos mejoran la inyectabilidad pero implican un mayor tiempo de curado y un descenso en las propiedades mecánicas. La inyectabilidad también mejora con tamaños pequeños de partículas y con formas esféricas.

APLICACIÓN DE CPC COMO SOPORTES:

Los CPC como tal no pueden ser utilizados como andamios o soportes en ingeniería de tejidos ya que no presentan macroporosidad. La macroporosidad es un requerimiento clave en el diseño de un material que vaya a ser utilizado en ingeniería de tejidos y en medicina regenerativa. Su función es guiar y permitir el crecimiento tisular dentro del material, de forma que la angiogénesis y la colonización celular puedan llevarse a cabo mientras el andamio es bioreabsorbido.

A continuación se van a exponer brevemente las diferentes estrategias que se han llevado a cabo para diseñar la fabricación de este tipo de soportes sin modificar las características propias de los cementos CPC.

- Formación de macroporos mediante Disolución/Degradación:

Durante el proceso de formación del cemento se utilizan agentes porógenos como los azúcares tales como la sacarosa o el manitol. Dependiendo de la naturaleza de estos agentes, se pueden disolver antes de la implantación o degradarse *in vivo*. Una de las limitaciones de este proceso es la necesidad de añadir grandes cantidades de agente porógeno para garantizar la interconexión entre los poros, comprometiendo por lo tanto la biocompatibilidad y bioactividad de los CPC. Además el material resultante presenta pobres propiedades mecánicas.

- Formación de macroporos mediante Espumado:

Otra estrategia se basa en la obtención de una espuma mediante la generación de gas por una reacción química en la pasta del cemento. El control de las condiciones del proceso

permite modular el porcentaje de porosidad así como la dimensión y la forma de los poros. Uno de los inconvenientes es la falta de propiedades mecánicas, lo que limita su aplicación a zonas en descarga.

– Formación de macroporos mediante Emulsión:

Variando la fracción de volumen de agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W), se puede producir la dispersión de gotas de aceite en la pasta del cemento, formando macroporos, o gotas de cemento en el aceite, en cuyo caso se producen microesferas de cemento. Una de las desventajas que presenta este método, además de dar lugar a materiales de poca resistencia, es el riesgo de embolismo debido a la posible liberación de gotas de aceite en el torrente sanguíneo.

– Formación de macroporos mediante Liofilización:

Este método utiliza la congelación del agua y su posterior liofilización para la obtención de macroporos. La desventaja de esta técnica es la obtención de materiales con pobres propiedades mecánicas.

ALTERNATIVA DE LOS CPCS: GRANULADOS:

Una vertiente es el uso de fosfatos de calcio granulados, que aunque no aportan una gran resistencia mecánica, permiten la formación de una red con macroporos interconectados que facilita la penetración del tejido y por lo tanto favorece una buena integración. Los gránulos son fáciles de manejar pudiendo ser moldeados con la forma deseada en el momento de la operación, permitiendo que se rellene la cavidad ósea de una forma cómoda.

La forma y tamaño de los gránulos es un factor muy importante, ya que se sabe que paquetes irregulares de gránulos pueden causar respuestas inflamatorias y retrasar la formación ósea. Por el contrario, esferas empaquetadas de forma regular con una distribución de poros homogénea favorecen el crecimiento óseo (70).

La combinación de materiales en forma de gránulos permite una difusión tanto de iones como de nutrientes, de modo que se puede promover la reabsorción del material y la formación de nuevo hueso. El crecimiento del hueso se puede producir en el interior de los espacios que se crean donde el material ya ha comenzado a reabsorberse (71).

A partir de ahora y en relación con nuestro estudio, nos centraremos en aquellos cementos cuyo producto final en el proceso de curado mayoritario es la brushita (DCPD) y en su forma deshidratada, denominada monetita (DCPA). A estos dos tipos de compuestos dedicaremos el siguiente apartado.

2.5. Sustitutos óseos de DCPD (brushita) y su derivado DCPA (monetita) en forma granulada.

En 1987 Mirtchi y Lemaitre e independientemente Bajpai y cols. introdujeron por primera vez los cementos de brushita (72). Este tipo de cementos se sintetizan mediante una reacción de ácido-base. Debido a que la brushita puede precipitar sólo en soluciones con $\text{pH} < 6$, la pasta del cemento de brushita es ácida durante el proceso de curado (73).

Se ha estudiado que la brushita *in vivo* se transforma en HA (74). Por este motivo la rápida reabsorción de la brushita únicamente se puede conseguir si la reabsorción del cemento ocurre antes de la conversión a HA. De esta forma, la reabsorción *in vivo* es inicialmente rápida pero se enlentece al transformarse la brushita y precipitar en forma de HA, que es menos soluble. Este fenómeno provoca una reabsorción incompleta de la brushita *in vivo* (75). Por este motivo, se ha intentado prevenir ésta transformación *in vivo* a HA mediante la adición de inhibidores de la formación de cristales de apatita, como una sal de magnesio (76). Además, los cristales de brushita presentan una reabsorción *in vivo* similar a la velocidad de crecimiento del hueso, lo que implica la estabilización del hueso neoformado.

El actual desarrollo de cementos de brushita ha despertado el interés en su derivado, la monetita. La monetita puede precipitarse mediante deshidratación de la brushita o mediante la modificación de las condiciones de los cementos de brushita, de forma que favorezca la formación de monetita en vez de brushita. La precipitación de la brushita es exotérmica, mientras que la de la monetita es endotérmica, por lo que la precipitación de los cementos de fosfato dicálcico suelen ser en forma de brushita. Pero si se dan unas condiciones tales como reacciones a pH bajos, o en ambientes deficientes de agua o en presencia de iones metálicos que alteran los cristales de brushita, se favorece la formación de monetita (77). Además, la monetita puede ser obtenida de un modo sencillo a través de la recristalización de la brushita. La brushita puede transformarse en monetita mediante un tratamiento térmico entre 80 y 300°C a través de un proceso de hidrólisis térmica (78). La monetita es más estable que la brushita a temperaturas superiores a 121°C, por lo que se puede obtener monetita a partir de brushita mediante procesos de esterilización poco costosos, como el autoclave (79).

Aunque ambos materiales son muy similares químicamente, su comportamiento *in vivo* es algo distinto, debido principalmente a que presentan diferente solubilidad en agua a pH fisiológico. La monetita es el fosfato de calcio más estable a valores de pH bajos ($\text{pH} < 7,4$). La monetita no se transforma HA *in vivo* como la brushita, y estudios recientes con animales han demostrado sus buenas propiedades osteoconductoras, además de su continuada reabsorción en el tiempo *in vivo* (77). Estudios *in vitro* han comparado la biocompatibilidad y la capacidad biodegradable de la monetita y la brushita (80) concluyendo que ambos materiales son apropiados para su aplicación en regeneración ósea, aunque presenten leves diferencias en relación a su solubilidad y la transformación de la brushita en HA. Algunos fosfatos de calcio que forman cementos de brushita han sido aplicados en regeneración ósea, pero pocos son los estudios que hay en este campo sobre la posible aplicación de granulados de monetita como biomaterial (81).

En este trabajo se han sintetizado gránulos de monetita mejorados a partir de la introducción de otros compuestos de calcio bioactivos que modulan la velocidad de degradación del material resultante y promueven la regeneración ósea, mejorando sus propiedades osteoinductoras, osteoconductoras y biomecánicas. Los materiales están basados en elementos biocompatibles, biodegradables, osteoconductores y osteoinductores. Estos compuestos bioactivos incluyen fosfatos y/o silicatos cálcicos, como la ps-wollastonita, y/o vidrios bioactivos de sílice.

Estos materiales basados en monetita tienen como finalidad conseguir la regeneración ósea y ser aplicados en cirugía traumatológica, cirugía maxilofacial, cirugía dental y/o procesos osteoporóticos, además de otras aplicaciones donde sea necesaria una regeneración de hueso.

Los gránulos de monetita utilizados en este trabajo se sintetizan a partir de reacciones ácido-base, en donde reaccionan ácido ortofosfórico o dihidrógeno fosfato de calcio anhidro (MCP) con compuestos bioactivos basados en sílice (ps-wollastonita y/o vidrios) y/o fosfatos cálcicos, como la hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) o β -TCP. Este método de síntesis permite la fabricación de materiales de monetita que contienen más de un compuesto de calcio bioactivo y/o vidrios bioactivos. La incorporación en exceso a la reacción ácido-base de más de uno de estos compuestos origina un producto final que incorpora distintas proporciones de estos compuestos a los materiales de monetita. Los compuestos resultantes de la reacción, además de la monetita y gel de sílice (H_2SiO_3), pueden ser ps-wollastonita (α - $CaSiO_3$), vidrio bioactivo (SiO_2 - CaO), β -TCP y/o CDHA. Estos materiales se combinan con la monetita para incorporar así propiedades osteoinductoras, gracias a los compuestos basados en sílice, y modular su reactividad, solubilidad y reabsorción, mediante su conjugación con otros fosfatos de calcio.

A continuación se muestran diversas tablas donde se exponen las ventajas que aportan los diferentes materiales de los que pueden estar formados los compuestos granulados de monetita estudiados en este trabajo:

Compuestos basados en Sílice: OSTEOINDUCTORES/BIOACTIVOS

Gel de Sílice (H_2SiO_3): presenta una elevada porosidad y superficie específica, es muy reactiva, su disolución libera iones (SiO_2) que estimulan la expresión de genes asociados a la reparación y regeneración del hueso (39).

Vidrios Bioactivos (SiO_2 - CaO): materiales vítreos, obtenidos por el método de sol-gel que incluyen en su composición Si y Ca, entre otros, en concentraciones tales que hacen que sea un material bioactivo (82).

Ps-wollastonita (α - $CaSiO_3$): bioactiva (47, 49).

Compuestos basados en Fosfato de Calcio: OSTEOCONDUCTORES

Monetita (CaHPO_4): altamente bioreabsorbible, poca resistencia mecánica (78).

β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$): bioreabsorción lenta (83).

CDHA: composición similar a las apatitas biológicas en cuanto a su estequiometría y cristalinidad, por lo que la hacen más reactiva en el medio biológico (84).

Además, estos materiales de monetita pueden incorporar sustituciones con iones metálicos divalentes como magnesio o zinc, lo cuales están involucrados en el metabolismo óseo y juegan un papel fisiológico en la angiogénesis, crecimiento y mineralización del tejido óseo. Estos iones interactúan con las células óseas, y si su metabolismo se ve alterado puede que altere la función de los osteoblastos y osteoclastos (85). Concretamente el magnesio es uno de los cuatro cationes más abundantes y el segundo catión más abundante intracelularmente en los vertebrados. El magnesio está involucrado en numerosos procesos biológicos y es esencial para la vida. Posee un papel importante en el crecimiento y desarrollo esquelético, además de que participa en el metabolismo y la homeostasis mineral ósea (86).

Sustituciones iónicas

Magnesio (Mg^{2+}): inhibe la reabsorción y favorece la formación ósea, mediante la estimulación de la proliferación y diferenciación de osteoblastos (87). Interviene en la deposición y mineralización ósea (88).

Zinc (Zn^{2+}): “*in vitro*” estimula la proliferación y diferenciación osteogénica hacia células osteoblásticas e inhibe la reabsorción mediada por los osteoclastos (89, 90). “*In vivo*” estimula la formación y mineralización ósea (91).

En la tabla anterior se pone de manifiesto la capacidad de estos iones de estimular la regeneración ósea y/o la colonización y diferenciación celular. A partir de su incorporación a los materiales de estudio, se propone aprovechar la capacidad estimulante y/o aceleradora de los mecanismos de regeneración ósea atribuida a dichos elementos, y así mejorar sus propiedades osteoinductoras.

Los materiales diseñados en este trabajo presentan diversas composiciones, de forma que pueden tener distintas proporciones de monetita y gel de sílice, puede que la monetita se encuentre parcialmente sustituida por los cationes Mg^{2+} o Zn^{2+} , y/o que presenten otros compuestos de calcio bioactivos. Estos materiales tienen un interés especial ya que incorporan modificaciones a materiales basados en monetita y gel de sílice en donde se combinan diferentes tipos de materiales que mejoran sus propiedades. Se trata de materiales biocompatibles, bioreabsorbibles, osteoconductores y osteoinductores. Estas características hacen que su posible campo de aplicación médica sea muy amplio, como podría ser su uso en cirugía traumatológica, cirugía maxilofacial, cirugía dental y/o en procesos osteoporóticos.

3. BIOLOGÍA ÓSEA.-

El diseño de materiales destinados a la regeneración del tejido óseo necesita apoyarse en un conocimiento profundo no sólo de la anatomía y biomecánica del hueso, sino también de los procesos que dan lugar al crecimiento óseo y a la reparación de fracturas. Por ello, a continuación hablaremos en detalle del tejido óseo para así comprender mejor su composición, estructura, propiedades y mecanismos de reparación.

El tejido óseo presenta una característica única, pues cuando se daña o fractura, no responde con la formación de una capa fibrosa, como hacen los demás tejidos. La respuesta del hueso es la regeneración de nuevo tejido y su posterior remodelación en la dirección de las tensiones locales. En ocasiones, la dinámica del organismo es suficiente para reconstruir la continuidad del defecto. Sin embargo, en otros casos las grandes cantidades de masa ósea perdida pueden hacer que sea necesario acudir a los injertos de tejido óseo o el uso de un biomaterial.

Existen cuatro categorías generales de huesos: largos (con una diáfisis entre las dos cabezas), cortos (con longitud y anchura similar), planos (semejantes a una placa) e irregulares (como el esfenoides y etmoides). Los huesos planos se forman a partir de tejido conectivo, es decir sufren una osificación intramembranosa; mientras que el resto de los huesos se forman a partir de cartílago, la denominada osificación condral (92).

El tejido óseo es un tejido conectivo altamente especializado en la función esquelética y de sostén, cuyas propiedades especiales se deben a la composición de su matriz, en la cual se depositan sales de calcio. El tejido óseo desempeña 3 funciones fundamentales en el organismo: (93)

En primer lugar, el hueso es la principal reserva de calcio del cuerpo humano. Es capaz de intercambiar calcio con los fluidos extracelulares actuando como un factor regulador de la concentración de calcio en los fluidos corporales; manteniendo así el equilibrio necesario para el correcto funcionamiento de algunos procesos fisico-químicos vitales.

En segundo lugar, la médula ósea que alberga, suministra al organismo los glóbulos rojos que actúan como portadores de nutrientes para las células, tejidos y órganos, y los glóbulos blancos que son fundamentales para el sistema inmunológico.

El tercer papel que desempeña el tejido óseo es una función mecánica, de soporte y protección de órganos, proporcionando además puntos de sujeción de los músculos, responsables de la locomoción y el movimiento corporal.

El hueso además posee una gran resistencia a la tracción y a la compresión, cierta elasticidad y una arquitectura ligera eficaz. Se trata de un órgano dinámico que sufre un recambio notable de sustancias, está muy bien irrigado y se remodela de forma continua.

3.1. Organización del hueso.-

En lo que se refiere a la estructura macroscópica, a simple vista pueden distinguirse dos tipos de tejido óseo que se continúan sin límites nítidos: el hueso cortical o compacto y el hueso trabecular o esponjoso. El 80% del esqueleto de un humano adulto está constituido por hueso cortical y el 20% por hueso trabecular.

El **hueso cortical** aparece como una masa sólida, dura y estructurada que se encuentra en la periferia de los huesos individuales del esqueleto, por ejemplo, en la parte externa de los huesos largos de las extremidades. Rodea al hueso trabecular y forma la capa más externa de los huesos, proporcionándoles la forma y tamaño. La mayor parte del hueso cortical se encuentra calcificado y su función es proporcionar resistencia mecánica y protección, aunque también puede participar en respuestas metabólicas, particularmente cuando hay un déficit mineral severo o prolongado (94).

El **hueso trabecular** se dispone como un sistema tridimensional de espículas óseas finas y ramificadas. Entre las espículas óseas quedan espacios amplios donde se encuentra la médula ósea, compuesta por grasa (médula ósea amarilla) y por células progenitoras de las células sanguíneas (médula ósea roja). Es un hueso menos denso, más elástico y con un alto recambio, en comparación con el hueso cortical, por lo que tiene una mayor función metabólica. La orientación de las trabéculas es paralela a los grandes esfuerzos de presión como ocurre en las vértebras, o a los esfuerzos de flexión, que se producen por ejemplo en la epífisis proximal del fémur. Este tipo de hueso se encuentra en los extremos de los huesos largos y en la parte interna de los huesos planos. El hueso trabecular contribuye al soporte mecánico, sobre todo en huesos como las vértebras, y proporciona las primeras reservas minerales en estados agudos de deficiencia.

La mayoría de los huesos contienen ambos tipos de configuración ósea, aunque en distintas proporciones y cantidades. En los huesos largos existe una zona central o tallo en forma de tubo, la diáfisis, compuesta por hueso compacto grueso que rodea la médula ósea. En los extremos del tallo óseo se encuentran las epífisis, formadas por tejido óseo esponjoso rodeado en su parte más superficial por una delgada capa de tejido óseo compacto, que a su vez está recubierto sólo en la superficie articular, por el cartílago articular. Nuestros estudios los realizaremos sobre la parte proximal de la diáfisis del húmero, epífisis distal del fémur y la epífisis proximal de la tibia.

Las unidades estructurales del tejido óseo maduro son laminillas de fibras de colágeno de 3 a 7 μm de espesor que se disponen concéntricamente alrededor de vasos que transcurren longitudinalmente al eje mayor del hueso, sobre todo en las regiones de sustancia compacta, formando sistemas tubulares finos, denominados **Osteonas** o **Sistemas de Havers**. Estos conductos contienen vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y tejido conectivo. Además dentro del sistema de laminillas hay pequeños espacios denominados **lagunas** donde se encuentran los osteocitos. En las laminillas de las osteonas, las fibrillas colágenas transcurren con una disposición helicoidal. Entre las osteonas hay restos de osteonas antiguas y degradadas que llenan el espacio entre las osteonas intactas, son las **laminillas intersticiales**. Los límites entre las osteonas y los sistemas intersticiales están marcados con

nitidez por las denominadas **líneas de cemento**, donde predominan los proteoglucanos (95).

Además de los conductos de Havers, existen los **conductos de Volkmann**, que también llevan capilares al hueso, aunque de manera casi transversal y no están rodeados de láminas concéntricas.

Tanto el hueso cortical como el trabecular normalmente están organizados con un patrón laminar, en el que las fibras de colágeno están organizadas con diferentes orientaciones. La alternancia de las orientaciones de las fibras hace que presente una gran resistencia y fuerza. Por otro lado, cuando el hueso es inmaduro, las fibras de colágeno se disponen de forma desorganizada, formando un hueso entretejido o inmaduro o primario, que es más débil que el hueso laminar o secundario. Este tipo de hueso se produce normalmente durante la formación del hueso y se ha detectado también a veces en estados con alto intercambio óseo, como son situaciones de reparación de fracturas, hiperparatiroidismo y la enfermedad de Paget.

3.1.1. Envolturas óseas.-

El hueso presenta varias envolturas, de forma que por la parte externa se encuentra el **Periostio** y en la parte interna, el **Endostio**. El periostio es una capa de tejido conectivo fibroso especializado que recubre la parte externa de los huesos excepto en las zonas de unión a otro hueso, donde se encuentra tejido cartilaginoso articular. En el periostio predomina la formación ósea frente a la reabsorción, de tal forma que presenta un crecimiento aposicional del hueso aumentando el diámetro del hueso con la edad. Esta envoltura ósea posee un papel importante en la reparación de las fracturas. Microscópicamente el periostio se compone de dos capas: la capa más interna está formada por tejido conectivo laxo vascularizado, en el que se encuentran células formadoras de hueso u osteoblastos, con capacidad osteogénica, y sus precursoras, las células osteoprogenitoras. Se sabe que esta capa osteogénica juega un papel importante en la osificación intramembranosa durante el crecimiento radial de los huesos largos, al igual que proporciona células condrogénicas que forman nuevo hueso en la osificación condral que se produce en la reparación de fracturas o daños óseos. Por otro lado, la capa externa está formada por tejido conectivo denso, que contiene vasos sanguíneos y nervios, que se ramifican hacia los conductos de Volkmann. Además, de esta capa salen las fibras de Sharpey, que son fibras de colágeno que unen fuertemente el periostio con la zona externa cortical del hueso adyacente (96).

Por otro lado, el endostio es un tejido conectivo con una estructura membranosa que recubre la parte más interna del hueso cortical, las trabéculas óseas y los canales vasculares presentes en el hueso. En el endostio predomina la reabsorción frente a la formación debido a que sufre mayores fuerzas biomecánicas, de modo que el espacio medular se expande con la edad. En esta capa existe un revestimiento de células aplanadas, entre las que se encuentran las células madre mesenquimales y células precursoras de osteoblastos, por lo que también presenta capacidad osteogénica.

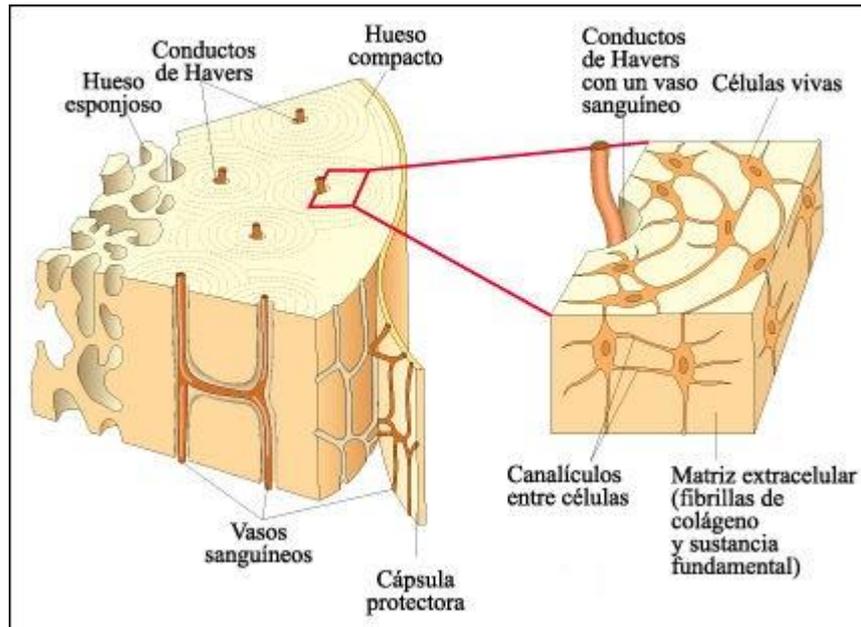


Fig 1.- Esquema de la estructura ósea.

3.1.2. Composición.-

La composición y estructura de los huesos están sujetas a influencias hormonales, metabólicas y nutricionales múltiples. En principio, el hueso es un material compuesto por dos fases: una fase mineral dura y una fase orgánica en relación estrecha con la primera. La matriz no tiene sólo una función de sostén sino que también cumple tareas metabólicas. La buena irrigación facilita mucho la adaptación a condiciones diversas, a la reparación y a la regeneración de la matriz.

La matriz ósea está compuesta alrededor de un 35% de material orgánico (sobre todo fibras colágenas, proteínas óseas y proteoglicanos), y de un 65% de sales inorgánicas.

Matriz Orgánica:

Está compuesta por fibras de colágeno predominantemente de tipo I, que constituyen aproximadamente el 95% del componente óseo, y se encuentran incluidas en una sustancia fundamental. El colágeno es sintetizado por los osteoblastos y proporciona al hueso propiedades elásticas y de resistencia a la tracción, limita el movimiento de otros componentes del tejido y de la matriz, modula la deposición de cristales de hidroxapatita en el hueso y además tiene una función muy importante sobre la regulación y diferenciación de diversas células y tejidos (97).

La sustancia fundamental está formada por proteoglicanos, glicoproteínas y diversas proteínas no colágenas (5%), donde cabe destacar la osteopontina, osteocalcina, osteonectina y sialoproteínas (98). Las funciones de estas proteínas aún no están bien definidas, aunque se piensa que participan en la regulación del depósito del componente mineral del hueso, del recambio óseo y de la actividad celular ósea. Los osteoblastos son los encargados de sintetizar la mayoría de estas proteínas no colágenas.

En uno de los estudios sobre las posibles funciones de estas proteínas, se ha visto que la **osteocalcina**, que presenta la capacidad de unirse al calcio, normalmente está implicada en la inhibición de la formación ósea. Inhibe la formación de cristales de hidroxiapatita, retardando su nucleación. La osteocalcina aparece en suero debido a la liberación desde la matriz mediante la actividad osteoclástica y de la síntesis por parte de los osteoblastos; por lo que se usa como un marcador de recambio óseo mejor que un marcador de formación ósea (99).

En relación a la **sialoproteína ósea**, se trata de una sialoglicoproteína ácida que contribuye el 15% de las proteínas no colágenas del hueso y está involucrada en la mineralización y el remodelado óseo. La sialoproteína ósea se expresa en la mayoría de los tipos celulares del hueso, cartílago y dientes. En la matriz ósea mineralizada encontramos las mayores concentraciones de sialoproteínas en las áreas donde el hueso se está sintetizando de nuevo o está siendo remodelado. Se ha estudiado que presenta la secuencia proteica RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), que es el mínimo requisito estructural para la adhesión celular en células de mamíferos, por lo que puede mediar la unión de osteoblastos y osteoclastos a la matriz ósea durante el proceso de remodelación ósea (100).

La **osteopontina** es una glicoproteína ácida y fosforilada presente en varios tejidos. Se trata de un potente inhibidor de la formación de hidroxiapatita mediante la inhibición del crecimiento cristalino (101). Al igual que la sialoproteína, presenta la secuencia RGD que promueve la adhesión celular y está involucrada en la regulación de la movilidad de osteoclastos en los procesos de reabsorción ósea.

Por otro lado, se piensa que la **osteonectina**, que constituye el 2% del total del componente proteico del hueso en desarrollo, provoca el aumento del número de osteoblastos y/o la proliferación y mineralización de la matriz. Esta glicoproteína es sintetizada por los osteoblastos. Se parece a la fibronectina, y está unida a las células óseas mediante integritinas. Además puede interactuar tanto con las fibras de colágeno como con las sales inorgánicas, ya que presenta la capacidad de unirse al calcio (102).

En relación con las enzimas óseas, la más importante es la **fosfatasa alcalina**. En el hueso se puede encontrar tanto unida a la superficie celular de los osteoblastos como libre dentro de la matriz mineralizada.

Matriz Mineralizada:

El hueso está compuesto por entre un 50-70% de mineral, 20-40% matriz orgánica, 5-10% de agua y menos de un 3% de lípidos. Los componentes minerales mayoritarios de la matriz del hueso son el calcio y el fósforo, en su mayoría en forma de cristales de HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). También existen otros iones como el carbonato, citrato, magnesio, potasio y sodio. Los cristales de HA óseos, en comparación con los cristales geológicos, son más pequeños, presentan un menor grado de cristalización y sustituciones de grupos carbonato, características que hacen que sean más solubles, manteniendo así el metabolismo mineral.

La mineralización del hueso comienza en el colágeno, donde inicialmente se depositan los cristales de apatita en intervalos regulares.

La maduración de la matriz está asociada a la expresión de la fosfatasa alcalina y algunas de las proteínas no colágenas, como la osteocalcina y sialoproteína ósea. Se piensa que estas proteínas fosforiladas se unen al calcio y al fosfato, provocando centros de nucleación y formando cristales de fosfato de calcio. De esta forma, estas proteínas ayudan a regular el depósito mineral mediante la regulación de la cantidad y tamaño de los cristales de hidroxiapatita formados (98).

La parte mineral proporciona al hueso una rigidez mecánica y una gran resistencia a la compresión y a la tracción, mientras que la matriz orgánica proporciona elasticidad y flexibilidad.

Además de la mineralización mediada por las proteínas, se piensa que los condrocitos y osteoblastos sintetizan unas vesículas pequeñas de matriz extracelular que actúan como microambientes protegidos, donde las concentraciones de calcio y fosfato pueden aumentar hasta el punto de provocar la formación de cristales. La HA no es capaz de precipitar espontáneamente, pero estas vesículas contienen un centro de nucleación compuesto por proteínas y complejos de fosfolípidos, calcio y fosfato inorgánico, que es suficiente para provocar la precipitación de cristales de HA. Dentro de los promotores de la nucleación mineral están la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) y la sialoproteína ósea (99) (101).

Por otro lado, la vitamina D tiene un papel indirecto sobre la estimulación de la mineralización de matriz ósea desmineralizada. Después de la absorción o producción de la vitamina D por la piel, el hígado sintetiza 25-Hidroxivitamina D y los riñones seguidamente producen 1,25-dihidroxivitamina D (1,25-(OH)₂D) que es activa biológicamente. 1,25-(OH)₂D es responsable del mantenimiento de concentraciones adecuadas de calcio y fosfato en el suero, permitiendo una mineralización pasiva de la matriz no mineralizada del hueso. Esta acción la realiza mediante la estimulación de la absorción intestinal de calcio y fosfato. Además el 1,25-(OH)₂D en suero promueve la diferenciación de osteoblastos y estimula la expresión de fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteonectina, osteoprotegerina (OPG) y una variedad de citocinas por los osteoblastos (99).

3.1.3. Tipos celulares del hueso.-

De las muchas células asociadas al hueso, tres son de gran interés: los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Estas células son responsables de producir, mantener y reabsorber el hueso, respectivamente. Dichas células diferenciadas son muy especializadas y generalmente no se proliferan. Además existen células menos diferenciadas de la misma línea celular que mantienen la población celular mediante su proliferación y diferenciación. Estas células se conocen como las células troncales y en la formación ósea se llaman células osteogénicas.

Células mesenquimales:

En la población de células de la médula ósea encontramos células con morfología fibroblástica derivadas de la sangre periférica que tienen la capacidad de autorrenovarse y originar células especializadas, características típicas de las células madre o *stem cell* (SC). Para integrar todas estas variaciones morfológicas se utiliza el término *fibroblast-like*, que engloba a las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), los fibrocitos y las células mesenquimales (CM) (103). En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales (CMM); primero, éstas células deben ser adherentes en cultivo; segundo, expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, las CMM deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (104). Las células madre mesenquimales pueden diferenciarse hacia una amplia línea mesenquimal celular: osteoblastos, adipocitos, condrocitos y mioblastos. Entre las señales que dirigirán la diferenciación hacia la osteogénesis se incluyen las proteínas morfológicas óseas (BMP-2) y el factor de transferencia tipo β (TGF- β 1) (105). Las células osteoprogenitoras durante la vida postfetal se encuentran cerca de los centros de osificación, en el endostio y en el periostio (106).

Osteoblastos:

Los osteoblastos, como se ha comentado anteriormente, derivan de células madre mesenquimales pluripotentes (CFU-F) que presentan la capacidad de diferenciarse a diferentes líneas celulares y están presentes en la médula ósea. Estas células madre mesenquimales requieren de la vía Wnt/ β -catenina y las proteínas asociadas para que se diferencien a osteoblastos. Esta vía tiene un papel muy importante en el patrón embrionario del esqueleto, del desarrollo esquelético fetal y del remodelado óseo en el adulto. El sistema Wnt es importante también en la condrogénesis y la hematopoyesis, y puede estimular o inhibir en diferentes etapas, la diferenciación de los osteoblastos (99). La ruta de señalización Wnt/ β -catenina regula la masa ósea y la función celular ósea. Respecto a los osteoblastos, ésta ruta regula su diferenciación, proliferación y la síntesis de matriz ósea (107).

Los osteoblastos maduros no poseen capacidad migratoria, son células altamente diferenciadas que pueden mostrar funciones muy diferentes en función de su estado de desarrollo. Su función y fenotipo varía, de modo que se pueden diferenciar 4 categorías: (98)

- Osteoblastos activos: tienen una forma cúbica, son mononucleares y presentan una actividad fosfatasa alcalina elevada. Sintetizan y secretan fibras de colágeno tipo I, glicoproteínas (osteopontina y osteocalcina), citocinas y factores de crecimiento en zonas de la matriz no mineralizada.
- Osteocitos: son osteoblastos maduros que se han quedado atrapados dentro de la matriz mineralizada del hueso y son responsables de su mantenimiento.
- Células de revestimiento óseo: se encuentran a lo largo de la superficie ósea donde no se está produciendo ni formación ni reabsorción ósea. Son osteoblastos

en reposo, quiescentes, que forman un epitelio plano que recubre las superficies óseas formando el endostio en las trabéculas, y se encuentran por debajo del periostio en las superficies mineralizadas. Esta capa se considera una barrera selectiva entre el hueso y otros compartimentos. Además contribuye a la homeostasis mineral regulando el flujo de calcio y fosfato desde y hacia los fluidos óseos. La reabsorción ósea se produce en superficies no recubiertas por este tipo de epitelio. Tanto los osteoblastos como las células de revestimiento se encuentran muy próximas y unidas mediante uniones adherentes. Además presentan marcadores comunes como actividad fosfatasa alcalina y receptores a la hormona paratiroidea (PTH).

- Osteoblastos inactivos: son células alargadas, que no se distinguen en su morfología de las células de revestimiento.

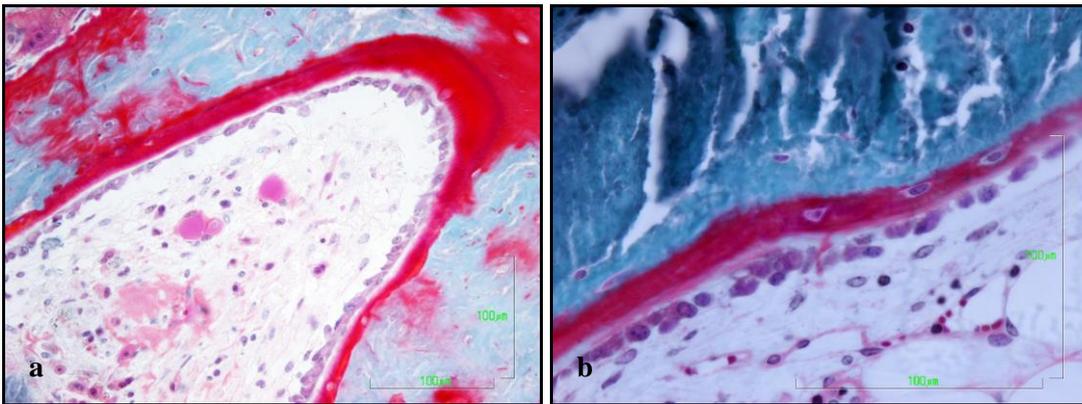


Fig.2.- a) Hilera de osteoblastos activos, depositando matriz orgánica formando líneas de osteoide (en rojo). (10x) (Tinción de Goldner (TG)). **b)** Osteoblastos embebidos en la matriz orgánica sintetizada por ellos, transformándose así en osteocitos. (20x) (TG).

La remodelación ósea presenta un balance entre la formación y la reabsorción ósea. Este balance está controlado por el hecho de que los osteoblastos presentan dos fenotipos opuestos. Uno es el fenotipo osteogénico, el cual promueve la síntesis de la matriz ósea, y el otro es el fenotipo osteoclastogénico, el cual favorece la diferenciación de los osteoclastos en zonas donde el hueso es viejo (108).

La fase de diferenciación osteogénica hacia osteoblastos implica tres periodos biológicos: proliferación celular, maduración celular y mineralización de la matriz. Durante estos periodos, los osteoblastos sintetizan y secretan colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y otras proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea (osteopontina, osteonectina, osteocalcina y sialoproteína ósea). El colágeno tipo I y la matriz extracelular se sintetizan durante el periodo inicial de la proliferación, mientras que la fosfatasa alcalina se expresa durante el periodo post-proliferativo de maduración de la matriz extracelular. La expresión de las proteínas ocurre durante el tercer periodo, cuando la matriz extracelular se mineraliza (98).

Durante el desarrollo esquelético se produce la diferenciación de los osteoblastos y el posterior depósito de la matriz ósea, lo que implica una coordinación espacio-temporal

entre diferentes factores endo, para y autocrinos. La diferenciación de los osteoblastos está estimulada mediante complejos factores en diferentes etapas. El factor estimulador de osteoblastos (OSF-1), también conocido como Pleiotropina (PNT), es quimiotáctica para las células osteoprogenitoras y estimula la actividad de osteoblastos maduros.

La expresión de Runx2 es un factor de transcripción clave para la diferenciación de los osteoblastos, pues es necesaria para la diferenciación de células madre mesenquimales (CMM) multipotentes a líneas celulares osteoblásticas. Runx2 también inhibe la diferenciación de CMM a líneas celulares de adipocitos y condrocitos. Además las vías de BMP-2 y Wnt activan conjuntamente la expresión de Runx2 para promover la diferenciación de osteoblastos (109).

Los osteoblastos secretan además citoquinas y factores de crecimiento con efectos locales sobre la formación y reabsorción ósea. Entre ellas se encuentran las interleucinas (IL) 1,6 y 11, que favorecen la formación de osteoclastos. Factores como la PTH y la vitamina D3 activa, aumentan la producción de estos factores. Otros factores de crecimiento o señalizadores solubles que tienen función de mediadores locales en la formación ósea y que son producidos por los osteoblastos son: el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), la prostaglandina (PGE2), TGF- β y BMPs 1,2 y 3 (94) (110).

Se piensa que el hueso juega un papel importante en el metabolismo energético, ya que se ha estudiado como la osteocalcina, proteína no colágena secretada por los osteoblastos, controla el nivel de glucosa en sangre y los depósitos de grasa. Por lo que se deduce que la función de los osteoblastos puede estar relacionada con la obesidad e intolerancia a la glucosa. El hueso ejerce una regulación endocrina del metabolismo energético y por lo tanto puede contribuir al comienzo de desequilibrios metabólicos (111).

La transformación de los osteoblastos a osteocitos depende del modo de osificación, ya sea intramembranosa o endocondral, y del tipo de hueso que se está formando, inmaduro o laminar. También depende de la localización del hueso que se está formando, de las especies, de la edad y/o del género del individuo (112).

- Durante la formación ósea intramembranosa, en el periodo embrionario, se forma hueso directamente a partir de tejido conectivo fetal. Las células mesenquimales comienzan a diferenciarse aparentemente al azar, en sitios diferentes hacia células osteoprogenitoras y osteoblastos, formando un tejido fetal muy vascularizado. Los osteoblastos secretan matriz ósea orgánica formando el osteoide primario. Éste progresivamente se va calcificando a la vez que se forma un sistema de canalículos que comunicarán las células óseas. Estos osteoblastos, una vez rodeados por la matriz ósea, se transforman en osteocitos y son reemplazados por otros osteoblastos formados a partir de células mesenquimales circundantes (posteriormente células osteoprogenitoras). De esta manera se van formando islotes o trabéculas aisladas, rodeadas de tejido conectivo muy vascularizado que poco a poco irán creciendo, poniéndose en contacto unos con otros para formar la esponjosa primitiva. Esta diferenciación al azar forma una serie de trabéculas óseas interconectadas que posteriormente constituirán el hueso esponjoso. En algunos lugares habrá un engrosamiento mayor de las trabéculas con disminución del espacio conectivo, originando así la compacta

primitiva.

En este tejido óseo primitivo, inmaduro o primario, las fibras colágenas están entrecruzadas al azar, por lo que se denomina hueso reticular o inmaduro. En la compacta primitiva, por la disposición de las fibras de forma paralela y en capas, con cierto parecido a los sistemas de Havers, se denominan sistemas de Havers primitivos u osteonas primitivas.

El tejido mesenquimatoso se diferencia en la periferia y dará lugar al periostio, que marca el sitio donde se formará el hueso compacto. Además, en este tipo de osificación el hueso se forma sin sustituir un modelo cartilaginoso previo.

-Por otro lado, la osificación endocondral se produce en los huesos largos de mamíferos. En este caso el modelo es cartilaginoso, en concreto se trata de cartílago hialino embrionario, que es reemplazado por hueso, mediante un proceso que implica la coordinación de numerosos pasos secuenciales, entre los que podemos encontrar: la calcificación de la matriz del cartílago, hipertrofia de los condrocitos y subsiguiente apoptosis o transdiferenciación a osteoblastos, reabsorción del cartílago calcificado, reclutamiento de osteoblastos y el depósito de hueso inmaduro o reticular en la superficie del cartílago mineralizado. Posteriormente se irá remodelando hasta formar el hueso maduro, secundario o laminar.

Osteocitos:

Los osteocitos constituyen el componente celular más abundante del tejido óseo, ya que el 90% de las células del hueso adulto son de este tipo, mientras que los osteoblastos forman menos del 5% y los osteoclastos menos del 1%. Los osteocitos son viables durante años, incluso décadas, mientras que los osteoblastos viven unas semanas y los osteoclastos días.

Una vez que los osteoblastos han sido embebidos dentro de la matriz mineralizada del hueso, cesa su actividad y pasan a ser osteocitos. Éstos presentan la capacidad de percibir estímulos y cambios de tensión y presión; señales que son importantes para el mantenimiento de la estructura ósea.

Una característica única que presentan los osteocitos es que forman largas prolongaciones dendríticas que van a través de pequeños túneles dentro de la matriz ósea, denominados canaliculos. Estos canaliculos conectan a los osteocitos entre ellos dentro de sus cavidades o lagunas, o con células de la superficie ósea y pueden llegar hasta el espacio medular (113). El sistema canalicular es un conducto para el tráfico e intercambio metabólico. Proporciona un sistema microcirculatorio del fluido periostiocítico o canalicular, el cual es diferente al fluido del plasma sanguíneo o de la linfa. Este fluido, no sólo define el ambiente bioquímico celular local, sino que también sirve como un medio de acoplamiento, mediante el cual, las fuerzas mecánicas se transforman en señales mecanobiológicas, bioquímicas y electromecánicas, que poseen un efecto a nivel celular (114).

La matriz que se encuentra en contacto directo, rodeando tanto el cuerpo celular de los osteocitos como sus prolongaciones, no se encuentra mineralizada. De este modo es más

fácil que pequeñas moléculas y agua penetren hacia el interior de las células y haya un mayor intercambio con el medio extracelular (115).

Además de la unión de los osteocitos mediante los canalículos, también se produce a través de uniones tipo gap, igualmente presentes en las comunicaciones entre osteocitos y osteoblastos (108). Doty en 1981 (116) fue el primero en demostrar uniones gap entre células óseas *in vivo*. Estas están presentes entre todos los tipos celulares del hueso, pero son particularmente abundantes entre osteoblastos y osteocitos, en los extremos de las prolongaciones de los osteocitos, y entre éstas y los osteoblastos. Las uniones tipo gap son un tipo de interacción directa entre célula y célula, que forman canales transmembrana y permiten la comunicación de los citoplasmas entre las células. Este tipo de unión permite una difusión de iones, metabolitos y pequeñas moléculas de señalización de célula a célula (117).

Dependiendo del tipo de hueso formado, proceso comentado anteriormente, los nuevos osteocitos que quedan embebidos dentro de la matriz pueden presentar diferentes tamaños y formas respecto a los osteocitos que son más viejos y maduros. De forma que en el hueso reticular o inmaduro, el cual se ha depositado de un modo rápido y con una orientación de colágeno al azar, encontramos osteocitos isodiamétricos. Sin embargo, en el hueso laminar, el cual se ha depositado de una forma más lenta, los osteocitos están más aplanados. Además los osteocitos maduros situados dentro de las lagunas en la matriz ósea, presentan una morfología estrellada y con prolongaciones (112). Además en el hueso laminar, la distribución de los osteocitos y sus prolongaciones citoplasmáticas no se producen al azar, sino que se disponen al mismo tiempo que se produce la formación ósea. Las células presentan una polarización de sus prolongaciones, de modo que la parte de la membrana celular que se encuentra más cerca de la superficie ósea presenta más prolongaciones (118).

Los osteocitos forman sus prolongaciones dendríticas mediante un proceso pasivo una vez que las células están rodeadas de osteoide. Esto se debe a que el osteocito tiene el 30% de su citoplasma produciendo matriz como los osteoblastos. Una vez que las prolongaciones dendríticas se van quedando atrapadas en la matriz, el citoplasma se ve reducido (113).

Se piensa que los osteocitos pueden presentar diferentes funciones: (i) participan de modo activo en el recambio óseo, (ii) realizan un intercambio de iones mediante su amplia red de canalículos que facilita el contacto entre la superficie celular y la matriz, (iii) actúan como células mecano-sensitivas y juegan un papel importante en la adaptación funcional del hueso (119).

Además los osteocitos presentan la capacidad de depositar y reabsorber hueso alrededor de la laguna ósea donde se encuentran, cambiando de este modo la forma de la laguna. Este proceso se conoce como Osteolisis Osteocítica. Aunque no es característico de los osteocitos humanos si se ha detectado en otras especies de vertebrados, como en ratas y conejos. La osteolisis osteocítica se encuentra limitada a situaciones de lactancia, hibernación o embarazo, las cuales requieren una mayor movilización de minerales óseos (112).

Los osteocitos presentan la capacidad de sentir las fuerzas mecánicas y transformar estas señales mecánicas en señales bioquímicas que afectan a la modelación y remodelación ósea. Parece que la matriz lagunar que rodea al osteocito se encuentra hipomineralizada, de forma que estos cambios en la matriz pueden alterar el tipo o magnitud de la fuerza que es percibida por el osteocito y por lo tanto modificar su respuesta a las cargas (113).

Se considera que los osteocitos también juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis mineral mediante el movimiento de iones y cationes hacia el líquido intersticial que se encuentra en la matriz que los rodea. En condiciones donde existe una demanda de calcio, los osteocitos pueden desmineralizar sus lagunas y hacer accesible el calcio, debido a que sus canalículos ocupan grandes extensiones y tienen acceso a un gran volumen mineral. Además la transmisión de las señales se hace de forma rápida, similar a los neurotransmisores. Además la densidad de osteocitos es proporcional a las demandas metabólicas de las especies (120).

Se ha propuesto que los osteocitos envían señales a los osteoclastos para que comience la remodelación. Si los osteoclastos no responden a estas señales, los osteocitos se ven comprometidos y comienzan a liberar el mineral de su laguna y de la matriz adyacente. De esta forma los osteocitos son capaces de modificar el diámetro de sus canalículos. Cualquier cambio en el diámetro de los canalículos puede tener un efecto sobre el flujo del componente líquido óseo. Un aumento en el diámetro de los canalículos puede disminuir las fuerzas de tensión y un descenso en el diámetro puede aumentarlo (113).

Los osteocitos pueden morir como consecuencia de la senescencia, degeneración/necrosis, apoptosis, y/o por el atrapamiento osteoclástico (114). Además, estudios recientes sugieren que la apoptosis de los osteocitos puede mantener o inhibir señales que regulan las funciones de los osteoblastos y osteoclastos. De modo que la apoptosis de osteocitos asociada a regiones de hueso dañadas precede a la actividad osteoclástica (118) (121). En uno de los trabajos, tras la administración de glucocorticoides, se comprobó que inducía la apoptosis de osteocitos, desencadenando procesos de reabsorción ósea; pero no se sabe si es debido a la estimulación de osteoclastos o debido a que los osteocitos vivos inhibían a los osteoclastos, y al morir éstos cesan estas señales inhibitorias (122).

Osteoclastos:

Los osteoclastos son células multinucleadas que reabsorben hueso durante los procesos normales de remodelado óseo y provocan una pérdida de masa ósea en condiciones patológicas donde su actividad de reabsorción ósea está aumentada. Son células que derivan de los precursores de la línea mieloide/monocito que circula por la sangre después de su formación en la médula ósea.

El sistema monocítico-macrofágico, formado por macrófagos, monocitos y microgliocitos, es la primera línea de defensa ósea. Estos precursores de osteoclastos (OCPs) son atraídos desde el torrente circulatorio a zonas de la superficie ósea destinadas a ser reabsorbidas y se fusionan unos con otros formando células multinucleadas que reabsorben las matrices calcificadas bajo la influencia, entre otros factores, de los osteoblastos de la

médula ósea. Baron y cols. (123) demostraron que inicialmente las células mononucleares que se unen a la superficie ósea contienen una esterase no específica, pero que cuando se diferencian, expresan la ácido fosfatasa tartrato resistente (TRAP), marcador enzimático de los osteoclastos. Estas células pierden su actividad esterase no específica, se fusionan y forman osteoclastos multinucleados.

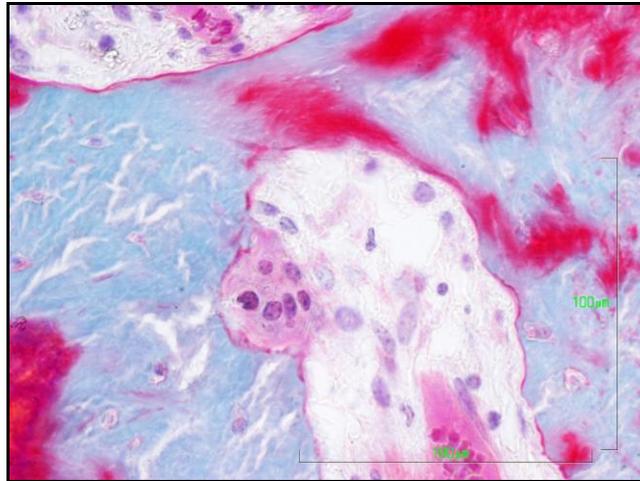


Fig.3.- Detalle de un osteoclasto reabsorbiendo la superficie ósea. (20x) (TG).

La reabsorción ósea es necesaria en muchos procesos esqueléticos. Es un proceso obligatorio durante el crecimiento óseo, erupción de los dientes y curación de las fracturas, además de ser necesaria para el mantenimiento de un nivel adecuado de calcio en la sangre.

- Ciclo de reabsorción:

Los osteoclastos han desarrollado una maquinaria eficiente para disolver los cristales de HA y degradar la materia orgánica rica en fibras de colágeno. El proceso de reabsorción requiere actividades celulares como: migración de los osteoclastos al lugar de reabsorción, su unión al hueso, polarización y formación de los dominios de membrana, disolución de la HA, degradación de la matriz orgánica y eliminación de los productos de degradación de la laguna de reabsorción. Previamente a la reabsorción, los precursores de osteoclastos han tenido que sufrir procesos de diferenciación y mecanismos celulares de tal forma que se fusionan los precursores mononucleares para formar el osteoclasto multinuclear maduro.

Cuando se inicia la reabsorción, los osteoclastos se polarizan, apareciendo tres dominios de membrana diferentes: un borde festoneado, una zona de sellado y un dominio funcional secretor. Simultáneamente, el citoesqueleto sufre una pronunciada reorganización. Durante este proceso, el citoesqueleto de actina forma un anillo de unión en la zona sellante, que permite una unión fuerte a la matriz ósea, de forma que deja un espacio cerrado entre el borde festoneado de los osteoclastos y la superficie ósea, denominado laguna de reabsorción. En esta laguna el osteoclasto va a secretar protones y proteasas encargadas de la degradación (124). Los osteoclastos están situados en cavidades poco profundas de la superficie ósea, denominadas lagunas de Howship.

Los osteoclastos se unen a la matriz ósea mediante receptores de integrinas que se encuentran en sus membranas y se unen a los péptidos de la matriz ósea. Los osteoclastos al menos expresan 4 tipos de integrinas: $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, que son capaces de unirse al colágeno. La integrina $\alpha_v\beta_3$ se expresa en niveles muy altos en los osteoclastos, aunque su función específica aún no se conoce, se piensa que puede jugar un papel importante en la adhesión y migración de osteoclastos y en la endocitosis de los productos de degradación. $\alpha_v\beta_3$ se ha encontrado en los bordes fenestrados y se une a las fibras de colágeno tipo I desnaturalizado, mientras que la integrina $\alpha_2\beta_1$ se une a las fibras originales de colágeno tipo I (125). Los osteoclastos activos forman podosomas, los cuales se unen y se separan de la matriz ósea de un modo rápido, permitiendo el movimiento y la reabsorción de los osteoclastos a lo largo de toda la superficie ósea. Los podosomas están formados por un núcleo de actina rodeado por integrinas $\alpha_v\beta_3$ y asociadas a proteínas del citoesqueleto (99).

En los sitios donde los osteoclastos están junto a la matriz ósea se polarizan y la membrana celular forma muchos pliegues estrechos muy apretados, formando un borde festoneado. Estos pliegues se forman mediante la fusión de vesículas intracelulares ácidas con la región de la membrana plasmática que reviste al hueso (124). Durante el proceso de fusión mucha membrana interna se transfiere para formar largas proyecciones que penetran en la matriz ósea. Estas prolongaciones cambian constantemente de forma y realizan movimientos activos.

La disolución de la fase inorgánica ósea precede a la degradación de la matriz. La secreción de protones logra la disolución de las sales de calcio y por otro lado se crea un medio ácido necesario para la actividad de las hidrolasas ácidas que degradan la matriz orgánica, sobre todo el colágeno (126).

Los osteoclastos durante la reabsorción ósea forman pequeños surcos en el hueso mediante la secreción de ácido clorhídrico y proteasas, como la **catepsina K**, que se encuentran en vesículas acidificadas. Éstas se transportan mediante microtúbulos por el interior del citoplasma de los osteoclastos y se unen con la membrana, vertiendo su contenido a un compartimento lisosomal extracelular que se encuentra debajo de su membrana basal. Esto provoca que se disuelvan los componentes minerales, debido al medio ácido generado, y la matriz ósea, mediante la acción de la catepsina K (127). La catepsina K es una enzima capaz de degradar la triple hélice del colágeno a pH ácido, por lo que es la mayor responsable de la degradación de la matriz. Esta enzima se expresa en los osteoclastos de forma selectiva y en gran cantidad (128). El pH ácido de la laguna de reabsorción se consigue mediante la acción de una bomba de protones dependiente de ATP que se encuentra tanto en el borde festoneado como en las vacuolas extracelulares.

Después de la degradación de la matriz, los productos de degradación de la laguna de reabsorción son transportados mediante una ruta vesicular de transcitosis desde el borde festoneado hasta el dominio de secreción funcional, donde son liberados al espacio extracelular. El dominio de secreción funcional se origina en la zona opuesta al borde festoneado (129). Esta ruta de transcitosis permite a los osteoclastos eliminar una gran cantidad de productos de degradación de la matriz sin que se pierda su fuerte unión a la superficie ósea. Además, facilita su procesado intracelular durante su paso a través de la

célula (124). Estas vesículas cargadas con productos de la disolución de la matriz ósea, se liberan en la membrana basal, la cual suele estar en contacto con un vaso sanguíneo (128). Estudios recientes han sugerido que la enzima TRAP, un marcador de osteoclastos ampliamente utilizado, se localiza en las vesículas de transcitosis de los osteoclastos que están reabsorbiendo. Además la enzima TRAP puede generar reactivos de oxígeno muy destructivos que son capaces de destruir el colágeno (124).

Los osteoclastos no sólo reabsorben el hueso, sino que también regulan la acción de otras células mediante la secreción de citocinas. Entre diversas funciones encontramos la regulación de la salida de células hematopoyéticas desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo, la regulación de la diferenciación de precursores de osteoblastos y actúan como células inmunes en enfermedades inflamatorias óseas (127).

El proceso de la Osteoclastogénesis:

Las citocinas RANKL (receptor activador del factor nuclear kB) y CSF-M (factor estimulador de colonias de macrófagos) son esenciales para la formación de osteoclastos. Ambas se producen principalmente por las células mesenquimales de la médula ósea y por los osteoblastos. CSF-M es imprescindible en la maduración de los macrófagos. Se une a su receptor Fms-c en los precursores de osteoclastos, emitiendo las señales para su proliferación, supervivencia y diferenciación, al igual que para la supervivencia de los osteoclastos y la organización citoesquelética necesaria para la reabsorción ósea (130). Aunque CSF-M es un producto de secreción, la osteoclastogénesis requiere el contacto directo entre los precursores de los osteoclastos y células del estroma u osteoblastos en la médula ósea (126).

Por otro lado RANKL pertenece a la superfamilia de TNF (factor de necrosis tumoral) y es esencial para el reclutamiento y activación de osteoclastos. Los osteoblastos sintetizan dos formas de RANKL: una que se une directamente a la membrana de las moléculas RANK, que es un receptor transmembrana presente en la membrana de los precursores de osteoclastos, y otra forma de RANKL soluble (sRANKL) que es liberada por los osteoblastos o los precursores de osteoblastos, para ser difundida a través del espacio extracelular e interactuar con las moléculas de membrana RANK de los precursores de osteoclastos y osteoclastos maduros (99).

Las hormonas y factores que estimulan la reabsorción ósea *in vivo* inducen la expresión de RANKL en células osteogénicas estromales. La expresión de RANKL por los osteoblastos coordina la remodelación mediante el estímulo de la reabsorción ósea por osteoclastos locales, que a su vez estimula la síntesis ósea por osteoblastos que se encuentran muy cerca, mediante un proceso denominado “acoplamiento”. El cuerpo celular de los osteoclastos se polariza en respuesta a la activación de RANK por la unión de su ligando (RANKL), provocando cambios internos que preparan al osteoclasto para realizar la reabsorción ósea. Los cambios implican una reorganización del citoesqueleto de actina, unión de los osteoclastos a la superficie ósea y la formación de la zona sellada, como se ha comentado anteriormente. RANKL estimula además la activación de osteoclastos induciendo la secreción de protones y enzimas líticas en la zona sellada, donde se produce la reabsorción (131).

Las funciones principales de RANKL en el hueso son: la estimulación de la diferenciación de osteoclastos, fusión de células para formar células multinucleadas activas e inhibición de la apoptosis de osteoclastos. La expresión de RANKL está estimulada, entre otros factores, por PTH, $1,25 D_3$ y glucocorticoides (132).

Además hay que tener en cuenta otra molécula, la Osteoprotegerina (OPG), que interviene también en el proceso de osteoclastogénesis. La OPG es una proteína soluble y de unión a membrana que se une a RANKL, en sus dos formas, con una gran afinidad. Presenta la capacidad de inhibir la unión de RANKL al receptor RANK presente en los osteoclastos. Debido a esta propiedad de OPG de unión a RANKL evita que se produzca una sobre estimulación de los osteoclastos e inhibe la reabsorción ósea. OPG es una proteína de secreción de la superfamilia de TNF que actúa como receptor señuelo, que regula la densidad y la masa ósea, y por lo tanto bloquea los efectos de RANKL. Muchos tipos celulares, como los osteocitos, producen OPG y parece que inhibe el estado de fusión/diferenciación de los osteoclastos que están diferenciándose, en vez de inhibir la fase proliferativa (133). Los estrógenos y TGF- β estimulan la producción de OPG.

Los niveles de OPG en suero se emplean como marcadores de recambio óseo, donde la formación ósea está favorecida frente a la reabsorción. Los niveles de OPG en suero aumentan en condiciones como el envejecimiento y osteoporosis postmenopáusia (134).

La supervivencia de los osteoclastos maduros y su participación en sucesivas rondas de reabsorción ósea, está regulada por hormonas y citocinas. Tanto RANKL como la interleucina 1(IL-1) aumentan el tiempo de supervivencia de los osteoclastos *in vitro* e *in vivo* (131).

La regulación de los osteoclastos no solamente recae exclusivamente en los osteoblastos, sino que hormonas como la calcitonina, cuyos receptores se encuentran sólo en los osteoclastos y no en macrófagos, actúan directamente sobre ellos inhibiéndolos; o como los estrógenos que inducen la apoptosis de los osteoclastos, al igual que inhiben su diferenciación. Ambos son factores que influyen en la inhibición de la osteoporosis (132).

Dentro del gran número de factores que influyen en la regulación de los osteoclastos, podemos destacar aquellos que estimulan la diferenciación de los precursores a osteoclastos, la reabsorción, proliferación y/o supervivencia, como son la IL-1, IL-6, IL-11, TNF α y β , CSF-M, y TGF- α . Y por otro lado enumerar aquellos que inhiben la función de los osteoclastos, ya sea inhibiendo procesos de diferenciación o formación a partir de sus precursores o inhibiendo la reabsorción. Podemos destacar TGF- β , IFN- γ , IL-4, IL-18, óxido nítrico, estrógenos y OPG (133).

3.2. Procesos de modelación y remodelación.-

El hueso experimenta un crecimiento longitudinal y radial, denominado **modelación**, que ocurre durante el crecimiento y el desarrollo en la infancia y la adolescencia. Por otro lado, además sufre procesos de **remodelación** durante la vida. El crecimiento longitudinal se produce en las placas de crecimiento, donde el cartílago prolifera en la epífisis y metáfisis de

los huesos largos, antes de que se produzca la mineralización y se forme el nuevo hueso primario.

La **modelación** es el proceso mediante el cual, durante todo el proceso de crecimiento de una persona, los huesos mantienen aproximadamente su forma externa. El hueso cambia su forma en respuesta a influencias fisiológicas o fuerzas mecánicas, provocando un ajuste gradual del esqueleto a las fuerzas que sufre. Los huesos pueden ensancharse o cambiar su eje mediante la eliminación o formación ósea en las superficies apropiadas mediante una acción independiente de los osteoblastos y los osteoclastos en respuesta a fuerzas mecánicas. Son actividades independientes entre sí, se definen como procesos no acoplados. El balance global de masa ósea es generalmente positivo, con crecimiento en anchura de la cortical y engrosamiento de las trabéculas. El incremento de masa ósea constante sucede hasta los 20-25 años, donde se alcanza un valor máximo de “masa ósea pico”. Posteriormente, este fenómeno disminuye en la segunda mitad de la vida y con él el balance óseo. Habitualmente la forma externa ósea no cambia con la edad, aunque sí la densidad y también aumenta el área medular debido a la pérdida del hueso trabecular más precozmente que el cortical.

Durante la juventud hay un ratio muy elevado de recambio óseo en el que predomina la formación frente a la reabsorción. La modelación ósea es menos frecuente en adultos que la remodelación.

Por otra parte, la **remodelación** es un mecanismo fisiológico mediante el cual el hueso se renueva para mantener su fuerza, la homeostasis mineral y la forma, además de la calidad y el tamaño del esqueleto. A diferencia de la modelación, es un proceso acoplado porque después de la reabsorción osteoclástica de pequeñas cantidades de hueso pre-existente, éste es repuesto total o parcialmente por formación ósea osteoblástica en el mismo sitio. La remodelación implica una reabsorción de zonas de hueso viejo o dañado, que presenta microfracturas causadas por la fatiga y la modificación de su estructura en respuesta a la tensión y otras fuerzas biomecánicas (94). Estas microfracturas son detectadas por la red de canalículos de los osteocitos, los cuales hacen que sean capaces de detectar cambios de presión dentro de la matriz ósea, como se ha comentado anteriormente. Se produce una sustitución de estas zonas por una matriz proteica sintetizada de nuevo, la posterior mineralización de la matriz para formar nuevo hueso y mantener intacta su estructura y funcionalidad. En este proceso intervienen las Unidades de Básicas Multicelulares (UBMs), que están formadas por un grupo fuertemente unido de osteoclastos y osteoblastos (135). Estas UBMs desempeñan la reabsorción mediada por osteoclastos del hueso viejo, que puede presentar microfracturas y osteocitos muertos, y la formación del nuevo hueso mediada por los osteoblastos (136).

De una forma esquemática podemos explicar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la remodelación ósea, mediante 5 pasos consecutivos, como son: activación, reabsorción, cambio, formación y terminación (137).

-Activación:

El proceso de remodelación comienza en la superficie de un área pequeña de hueso quiescente, donde la membrana endóstica es digerida por enzimas liberadas por las células de revestimiento óseo. Asimismo, en opinión de Martin R.B (138) estas células son responsables de la activación de las UBM's en respuesta a señales provenientes de osteocitos u hormonas. Los osteoclastos no reabsorben hueso si hay osteoide, es decir materia orgánica. De esta forma, son las células de revestimiento, que sufre cambios morfológicos, las que se encargan de eliminar la matriz orgánica y dejar al descubierto el mineral óseo para que actúen los osteoclastos (139). Posteriormente, se produce una neoangiogénesis y la liberación o reclutamiento de precursores de osteoclastos desde el torrente circulatorio a la superficie ósea (110).

Las señales que hacen que se produzca el proceso de remodelación pueden ser, o bien porque se produzcan microfracturas, que conllevan a la apoptosis de osteocitos y la consiguiente activación de la osteoclastogénesis; o por cambios sistémicos de la homeostasis, donde intervienen las señales hormonales.

Cuando se producen microdaños por fatiga, debido a cargas repetidas que se acumulan, provocan una discapacidad de las propiedades mecánicas de la matriz ósea, y el hueso requiere ser renovado. Estos microdaños o grietas, pueden propagarse a través de la matriz mineralizada, independientemente de la organización compacta o trabecular. Debido a esto puede alterar la integridad de la red laguno-canalicular de los osteocitos, mediante la interrupción de las prolongaciones y las comunicaciones entre osteocitos y otras células óseas (115). Estas microfracturas inducen la apoptosis de los osteocitos, provocando la activación de la osteoclastogénesis de forma indirecta, ya que los osteocitos secretan habitualmente TGF- β , que inhibe la osteoclastogénesis.

Los osteoblastos además participan en el reclutamiento de pre-osteoclastos, la diferenciación a osteoclastos y su activación, mediante la unión de la PTH a su receptor de membrana PTHr que se encuentra en los osteoblastos.

-Reabsorción:

Los osteoblastos expresan citoquinas, como CSF-1, RANKL y OPG, modulado por la acción de la PTH. Las dos primeras actúan de modo coordinado, aumentando su concentración en respuesta a la PTH, y por lo tanto activando a los osteoclastos. Mientras que la expresión de OPG se ve reducida, activando también a los osteoclastos. Además, los osteoblastos expresan, por acción de PTH y/o estímulos mecánicos, Matriz Metaloproteínas (MMPs). Las MMPs son las encargadas de degradar el osteoide, matriz no mineralizada, de la superficie ósea, dejando libres sitios de unión RGD relacionados con las integrinas $\alpha\beta3$, de osteoclastos en la matriz mineralizada. De este modo, los osteoclastos se unen a la matriz ósea mediante la interacción con las integrinas que presentan la secuencia RGD, secuencias que se encuentran en proteínas de la matriz como la osteopontina y sialoproteína, que fueron depositadas por los osteoblastos durante el ciclo previo de formación. De este modo comienza la reabsorción mediada por los osteoclastos.

-Cambio:

Seguidamente de la reabsorción mediada por osteoclastos, las lagunas de Howship quedan cubiertas con matriz de colágeno desmineralizada sin digerir. En un principio se pensó que células mononucleares eran las encargadas de eliminar estos remanentes de colágeno y preparar la superficie ósea para la consecutiva formación ósea mediada por los osteoblastos. Estudios posteriores han concluido que estas células pertenecen a la línea celular de los osteoblastos, concretamente se trata de células de revestimiento (140).

-Formación:

Durante el proceso de reabsorción, se liberan moléculas embebidas en la matriz ósea, como IGF-I, IGF-II y TGF- β . Este último activa el reclutamiento de células mesenquimales al lugar de reabsorción.

Por otro lado, los osteocitos maduros, de forma basal producen esclerostina, que es una molécula antagonista de las BMPs. La inhibición en la expresión de esclerostina inicia la formación ósea mediada por los osteoblastos e inhibe la reabsorción, favoreciendo un aumento de la masa ósea. Además la inhibición de la esclerostina activa la ruta de señalización de Wnt, una ruta que regula la masa ósea y la función de las células óseas. La activación de la ruta Wnt provoca la diferenciación, proliferación y síntesis de matriz ósea por los osteoblastos (118).

-Terminación:

Cuando una cantidad igual de hueso reabsorbido ha sido reemplazado, el ciclo de remodelación concluye. Cuando la formación del hueso es completa, la secreción de esclerostina por los nuevos osteocitos formados, embebidos en la matriz durante la formación de hueso, inhibe la ruta Wnt y provoca la terminación del ciclo de remodelación, entrando en un estado de reposo. Además, las células de revestimiento vuelven a cubrir la superficie ósea de nuevo. De esta forma el ambiente de la superficie ósea en reposo se ha restablecido y se mantiene hasta que el próximo ciclo de remodelación sea activado.

Una vez mineralizada la matriz ósea sintetizada, los osteoblastos pueden sufrir apoptosis, revertir a células de revestimiento o pueden quedar atrapados en la matriz mineralizada, diferenciándose a osteocitos.

3.3. Mecanotransducción.-

Las fuerzas mecánicas que se ejercen sobre el hueso tienen un papel fundamental en la regulación de la modelación y remodelación ósea. Durante una inmovilización prolongada o microgravedad, la reducción en las cargas, puede desencadenar un descenso significativo de la masa ósea. Por el contrario, las fuerzas mecánicas favorecen la formación del hueso y se estimula en la misma dirección. Lo mismo ocurre en los procesos de reparación ósea, donde las fuerzas mecánicas regulan la osteogénesis. El proceso de transformar estímulos mecánicos en respuestas biológicas recibe el nombre de Mecanotransducción (141).

Este modelo explica el mecanismo patogénico por el que se regula el crecimiento y la pérdida de hueso en función de estímulos mecánicos que deforman localmente el mismo (fuerza, presión, torsión). Según este modelo, el aumento de la fuerza muscular ejercida sobre el hueso (durante el crecimiento o en respuesta al incremento de la carga) o a la disminución de la carga (por inactividad o inmovilización) afectarán a la masa, al tamaño y a la resistencia del mismo, de forma positiva o negativa, respectivamente. De forma que, por estímulos mecánicos se pondría en marcha un sistema de retroalimentación que determinaría cuándo el hueso necesita más resistencia o cuándo no es necesario.

El proceso de mecanotransducción se realiza en cuatro fases: acoplamiento mecánico, acoplamiento bioquímico, transmisión de señales bioquímicas y respuesta de ejecución:

-Acoplamiento mecánico:

Proceso mediante el cual las células detectan la carga o deformación del hueso. Cuando se aplica una fuerza mecánica sobre el hueso, ésta produce una deformación que genera un gradiente de presión dentro de los sistemas de canaliculos internos del hueso. Esto hace que los fluidos traspasen las membranas de los osteocitos y produzcan cizallamientos en ellas originándose así la estimulación celular. No todos los estímulos mecánicos son capaces de producir la activación celular, es necesario que posea una magnitud adecuada. Si el estímulo sobrepasa el umbral, los osteocitos y osteoblastos de superficie lo detectan emitiendo señales a modo de factores de crecimiento y citosinas (107).

El osteocito juega un papel fundamental como el mecano-sensor que transforma la señal mecánica en química y ésta, a su vez, produce la respuesta de los osteoblastos y osteoclastos.

-Acoplamiento bioquímico:

Las células óseas se unen a la matriz de colágeno mediante integrinas que se exponen bajo tensión hacia la matriz extracelular, conformando un nuevo citoesqueleto celular. Por eso, la tensión viscoelástica se transmite hasta el núcleo celular provocando la alteración de la expresión génica. Se libera el calcio intracelular que se utiliza en la reorganización del nuevo citoesqueleto.

En los adultos la proporción de osteoblastos de superficie no supera el 5% por lo que la respuesta de estas células a la deformación resulta muy lenta. Por eso se requieren de otros mecanismos de transmisión de la señal bioquímica a través de segundos mensajeros.

-Transmisión de señales bioquímicas:

Los segundos mensajeros mantienen la comunicación entre osteoblastos y entre los osteocitos. Éstos producen factores de crecimiento anabólicos que viajan hasta la superficie y transforman células osteoprogenitoras en osteoblastos.

-Ejecución:

Se produce por la acción celular de los osteoblastos y osteoclastos en el proceso de generar nuevo hueso o repararlo a través de los procesos de modelación y remodelación.

En 1638 Galileo fue el primero en sugerir que la forma de los huesos estaba relacionada con las cargas. Fue en 1892 Julius Wolf quien propuso que el hueso se adapta y responde a las fuerzas (113). En 1892, Wolf dictó su famosa ley que dice literalmente: "Cualquier alteración en la forma y en la función de un hueso o sólo de su función, es seguida de ciertos cambios definitivos en su arquitectura interna e igualmente de alteraciones definitivas de su conformación externa, de acuerdo con leyes matemáticas". Es decir, el hueso se deposita allí donde se solicita y se reabsorbe donde no se solicita (142). Harold Frost propuso las 4 ventanas de las fuerzas mecánicas, para tratar de explicar las relaciones que hay entre la formación y remodelación ósea, y los estímulos mecánicos (143).

Esta teoría describe en primer lugar una "ventana de uso mecánico", la cual se considera fisiológica y mantiene la homeostasis del hueso, donde la reabsorción es igual a la formación, y por lo tanto es necesaria para el mantenimiento normal de la masa ósea.

En la "ventana de desuso o falta de tensión" las tensiones están por debajo de los límites fisiológicos, de forma que el resultado es una pérdida de masa ósea. Esto ocurre en el caso de los astronautas y pacientes inmovilizados.

En la "ventana de sobrecarga", las tensiones exceden a las condiciones fisiológicas, de modo que el hueso se forma y se produce un aumento de masa ósea por procesos incrementados de modelación ósea.

Y por último, la cuarta ventana, que corresponde a una sobrecarga patológica donde se aplica una carga extrema, produciendo una reabsorción aguda seguida de una formación ósea. Como predomina la reabsorción, se produce un recambio óseo negativo.

3.4. Reparación ósea.-

El tejido óseo destaca de otros tejidos, entre otras características, por su poder de regeneración. Cuando ocurre una lesión o fractura en el tejido óseo se van a producir una serie de fenómenos que preparan al hueso para su reparación (144) (145).

-Impacto y formación de hematoma:

Se trata de una fase inflamatoria donde se produce un hematoma que posteriormente se coagula. El hematoma es una fuente de moléculas de señalización que inician la cascada de consolidación de la fractura. Las plaquetas se van agregando en el hematoma y liberan IL-1, IL-6, TGF- β y factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF).

-Formación del callo de fractura:

Las fases iniciales de la reparación de la fractura ocurren a partir de los tejidos blandos. Las células reparadoras de la fractura son células osteogénicas que proliferan a partir de la capa profunda del periostio, formando un callo de fractura externo; y en menor medida las que proliferan a partir del endostio, formando callo interno. Cuando el periostio ha sufrido un gran desgarramiento, las células reparadoras deben diferenciarse a partir de células mesenquimales indiferenciadas de los tejidos blandos. Hay hiperemia en todo el hueso

afectado.

Durante este primer período, se produce un crecimiento desmesurado del tejido con capacidad osteogénica, formando una masa gruesa que corresponde con el callo de fractura. Las células de este tejido, se diferencian en osteoblastos que a su vez sintetizan hueso primario. Este proceso ocurre en los extremos de la fractura y continúa hasta la fusión.

En el centro de la fractura (foco de fractura), donde el aporte sanguíneo es más escaso y existe hipoxia, el hematoma se ha transformado en tejido de granulación, sufriendo los fibroblastos metaplasia y transformándose en condroblastos. Según avanza la fase proliferativa, el cartílago sufre la transformación a hueso, se produce un proceso de osificación endocondral. Además las células osteoprogenitoras se diferencian en condroblastos, que formaran cartílago y posteriormente, hueso primitivo. En la fase inicial de curación predomina la formación cartilaginosa, mientras que posteriormente aparece el hueso primario. Los condrocitos dejan de proliferar y el tipo celular predominante es el condrocito hipertrófico. Estas células liberan iones fosfato que pueden precipitar con el calcio, calcificando el cartílago. Este hueso inicial inmaduro o fibrilar, sin orientación, recibe el nombre de “callo primario”. Este hueso va siendo progresivamente transformado en hueso maduro mediante el proceso de remodelación.

Cuando la lesión es tan extensa que no puede ser reparada de modo natural, la única posibilidad de reparación en la actualidad es la aplicación de técnicas quirúrgicas.

3.5. Efectos de los biomateriales sobre el tejido óseo.-

Cuando se introduce quirúrgicamente un biomaterial en el tejido óseo se pueden producir una serie de manifestaciones muy tipificadas. Entre las más comunes se encuentran:

- **Procesos inflamatorios:**

La inflamación es la respuesta del organismo a la agresión de un agente externo. La operación quirúrgica de implantación de prótesis y dispositivos biomédicos, va acompañada siempre de una serie de procesos interdependientes que comienzan con cambios hemodinámicos, seguidos de alteraciones en la permeabilidad vascular de la zona afectada, provocando una acumulación de líquido y leucocitos en los tejidos extravasculares. El aumento de la permeabilidad promueve el transporte de un fluido inflamatorio rico en proteínas o exudado, al tejido extravascular y la zona lesionada. Simultáneamente, los leucocitos, por efecto de determinados factores de estimulación, tienden a adherirse al endotelio de los vasos sanguíneos para seguidamente atravesar las paredes de los vasos hasta llegar al tejido extravascular que rodea el implante (146).

La intensidad y duración de tal respuesta está controlada por el tamaño y naturaleza del material implantado, la zona del organismo donde se ha efectuado la implantación, el tipo de lesión y la capacidad reactiva del receptor. Una respuesta o reacción a nivel celular relativamente breve y de poca intensidad es un buen síntoma de compatibilidad con el tejido o tejidos en contacto con el dispositivo implantado.

La respuesta inflamatoria está estrechamente entrelazada con el proceso de reparación. La inflamación sirve para destruir o diluir al agente agresor, y pone en acción una serie de acontecimientos que tratan de curar y reconstruir el tejido dañado.

La respuesta inflamatoria consta de dos componentes principales: una reacción vascular y una reacción celular. Muchos tejidos y células están implicados en estas reacciones, incluyendo el líquido y las proteínas del plasma, las células circundantes, los vasos sanguíneos y los elementos celulares y extracelulares del tejido conectivo. Las células circundantes incluyen los leucocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean íntimamente los vasos sanguíneos, los fibroblastos, los macrófagos residentes y los linfocitos.

La inflamación se divide en patrones agudo y crónico:

La **fase aguda** de la inflamación que aparece inmediatamente después de haber realizado la operación y está caracterizada por la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos (polimorfonucleados) que posteriormente son reemplazados por monocitos (147). El máximo de migración normalmente ocurre en las primeras setenta y dos horas. En las últimas etapas de este periodo inflamatorio agudo predominan los leucocitos mononucleados (macrófagos y linfocitos) que proceden de los monocitos sanguíneos. Una vez que los monocitos salen del sistema circulatorio, para incorporarse al tejido extravascular que rodea al implante o biomaterial, sufren una transformación en respuesta a estímulos muy concretos dando origen a los macrófagos diferenciados. El conjunto de los componentes del plasma que abandonan el sistema circulatorio para inundar el tejido lesionado, se conoce con el nombre de exudado.

Los macrófagos y neutrófilos son capaces de sintetizar proteínas que tienen importantes efectos en el proceso inflamatorio, responsables del proceso denominado fagocitosis, por el que mediante un mecanismo bien conocido son capaces de degradar e ingerir partículas extrañas al organismo. La fagocitosis implica tres pasos distintos pero interrelacionados: reconocimiento y unión de las partículas que serán ingeridas por el leucocito, su interiorización, con la subsiguiente formación de una vacuola fagocítica, y muerte o degradación del material ingerido (148).

Las sustancias más importantes que liberan los macrófagos y leucocitos son las enzimas lisosomales, presentes en los gránulos. Son sustancias capaces de producir una lesión endotelial y daño tisular, y por ello, pueden amplificar los efectos del agente nocivo inicial. Así pues cuando persiste y no está controlado, el infiltrado leucocitario se transforma, por sí mismo, en ofensor. Tras la fagocitosis, los neutrófilos rápidamente sufren muerte celular apoptótica y sus restos son eliminados por los macrófagos (149).

La activación celular durante el proceso inflamatorio depende del tamaño del implante e incluso de su textura y forma, ya que, si está constituido por partículas fácilmente segregables puede ser fagocitado provocando un grado de inflamación diferente al que provocaría el mismo material con una textura no fagocitable.

En circunstancias favorables, el proceso inflamatorio agudo debe remitir en pocos

días observándose claros síntomas histológicos de regeneración celular y formación de nuevo tejido en la zona afectada. El resultado más positivo sería lograr una completa restauración de la estructura normal y de las funciones de la zona lesionada. La presencia del biomaterial inevitablemente origina un período de inflamación aguda cuya intensidad depende del tamaño de la zona afectada por el defecto óseo y de las interacciones previas que se han establecido entre los leucocitos y el biomaterial.

Por otro lado, una respuesta inflamatoria **crónica** supone la presencia continua de un agente lesivo y se caracteriza siempre por una abundancia de leucocitos mononucleados, como macrófagos, células plasmáticas y linfocitos, en la zona afectada. Puede estar provocada no sólo por la propia naturaleza, forma y tamaño del biomaterial implantado, sino además porque el biomaterial desprenda agentes citotóxicos o simplemente como consecuencia de irritaciones producidas por infecciones o factores inherentes del receptor como pueden ser un riego sanguíneo insuficiente.

Se produce una inflamación de duración prolongada, en la cual la inflamación activa, destrucción tisular e intento de reparación se suceden simultáneamente.

Uno de los tipos celulares característico de la inflamación crónica son las células plasmáticas, que derivan de los linfocitos B activados y producen anticuerpos dirigidos contra antígenos persistentes en el sitio de la inflamación o contra componentes alterados de los tejidos. En algunas reacciones inflamatorias crónicas intensas, la acumulación de linfocitos, células presentadoras de antígeno y células plasmáticas pueden mimetizar las características morfológicas de los órganos linfoides (146).

La inflamación crónica se asocia histológicamente con una proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular. La necrosis tisular es siempre patológica. Ocurre después de un estrés anormal, como isquemia, debido a una pérdida de riego sanguíneo, y lesión química. En estos casos la integridad de la membrana se pierde y hace que las enzimas lisosomales entren en el citoplasma y digieran a la célula. Estos contenidos celulares se derraman extracelularmente provocando la necrosis.

En opinión de G. Majno (150) la inflamación crónica se caracteriza por presentar intentos de curación del tejido dañado por sustitución con tejido conectivo, mediante la proliferación de pequeños vasos sanguíneos, angiogénesis, y en particular, fibrosis.

Los macrófagos activos secretan una amplia variedad de productos biológicamente activos que, si no se controlan, ocasionan lesión tisular y fibrosis.

- **Formación de cápsulas fibrosas:**

El proceso inflamatorio crónico, va acompañado en un gran número de casos de una fibrosis que origina el desarrollo de una cápsula fibrosa muy desarrollada, que en definitiva afecta a los tejidos adyacentes al implante.

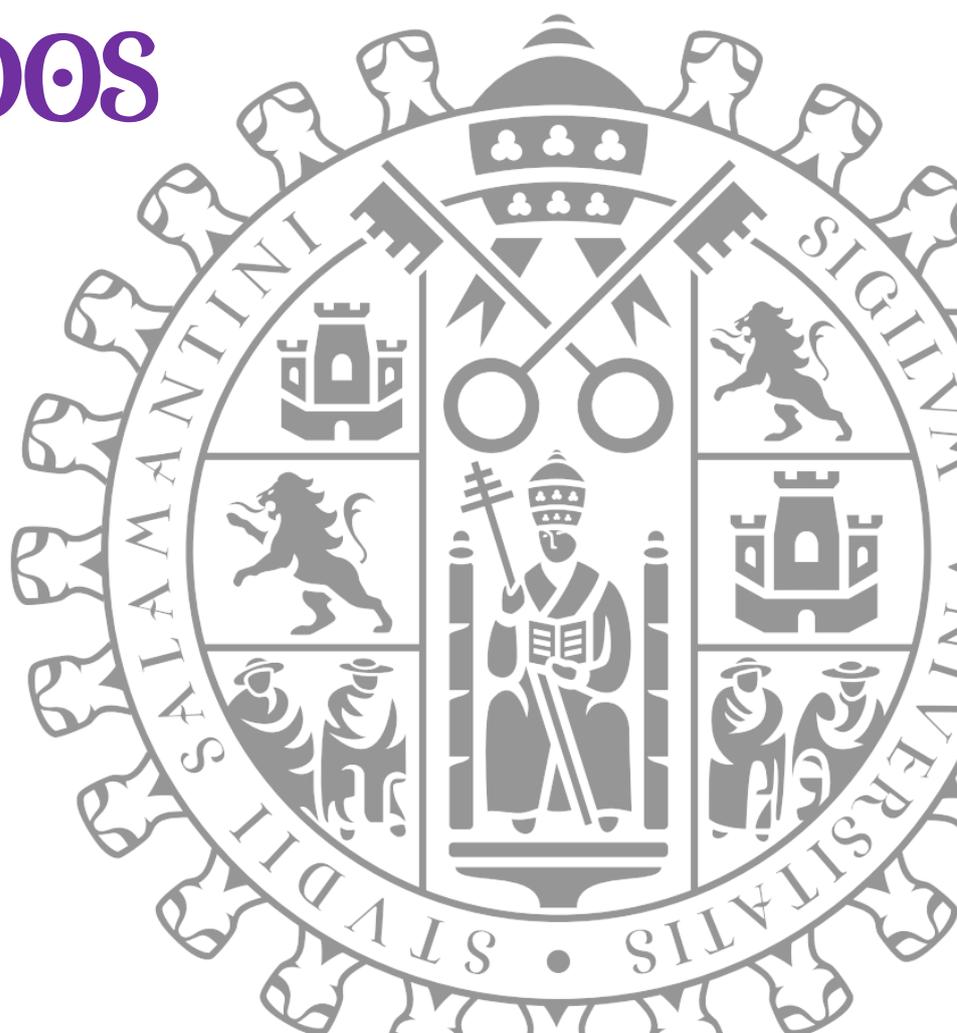
La formación de tejido fibroso comienza alrededor de la masa de leucocitos y tiende a recubrir el cuerpo extraño con una densa cápsula de tejido conjuntivo, tratando de aislar el

implante del resto del organismo y formando un granuloma. El granuloma es un foco de inflamación crónica que consiste en la agregación microscópica de macrófagos que se transforman en células semejantes a las epiteliales rodeadas por un collar de leucocitos mononucleares, principalmente linfocitos y ocasionalmente células plasmáticas. Frecuentemente, las células epiteloides se funden para formar células gigantes en la periferia o en el centro del granuloma. Estas células gigantes pueden alcanzar diámetros de 40 a 50 μm y poseer más de 20 núcleos dispuestos periféricamente (células gigantes de Langhans) o al azar (células gigantes de cuerpo extraño). Existen dos tipos de granulomas según su patogenia. Los granulomas de cuerpo extraño están provocados por cuerpos extraños relativamente inertes. Son materiales que no pueden ser fagocitados por un único macrófago, y no provocan ninguna respuesta inflamatoria o inmunitaria. Se forman células epiteloides y células gigantes que se superponen a la superficie y abarcan el cuerpo extraño. El material extraño suele encontrarse en el centro del granuloma. Por otro lado encontramos los granulomas inmunitarios, producidos por partículas insolubles, típicamente microbios, capaces de inducir una respuesta inmunitaria celular. El agente incitante se degrada escasamente o lo hace en forma de partículas. En estas respuestas los macrófagos ingieren el material extraño, lo procesan y presentan parte de él a los linfocitos T, provocando su activación. Estos al activarse producen una serie de moléculas que activan a los macrófagos y los transforman en células epiteloides y células gigantes multinucleadas. Además podemos encontrar linfocitos y células plasmáticas.

En casos de inflamación crónica, donde el estímulo nocivo persiste activando macrófagos y linfocitos, provoca la producción de factores de crecimiento, que activan la proliferación de fibroblastos y células endoteliales, causando un aumento de la síntesis de colágeno. Por otro lado, la disminución de la actividad de las metaloproteinasas, por activación de macrófagos y fibroblastos, conlleva a una degradación disminuida de colágeno, todo ello, desencadena el desarrollo de la fibrosis (146).

Durante los procesos inflamatorios también son muy importantes los procesos de angiogénesis, mediante reclutamiento de células endoteliales a partir de la médula ósea. La angiogénesis es crítica en la inflamación crónica, la fibrosis, el crecimiento tumoral y la vascularización de tejidos isquémicos. Se puede producir angiogénesis a partir de vasos preexistentes, mediante la degradación de la matriz extracelular y migración de células endoteliales (151).

MATERIAL Y MÉTODOS



IV.~ MATERIAL Y MÉTODOS:

1. BIOMATERIALES GRANULADOS BASADOS EN MONETITA.-

En este trabajo se han evaluado materiales diseñados y fabricados por Azurebio S.L. (Madrid), basados en monetita (CaHPO_4) y gel de sílice (H_2SiO_3). Algunos de ellos contienen además otros compuestos de silicio como ps-wollastonita (α - CaSiO_3) y un vidrio bioactivo, los cuales son capaces de liberar especies iónicas de silicio al medio biológico y estimular la regeneración ósea. Además pueden contener otros fosfatos de calcio, además de monetita, como beta-fosfato tricálcico (β -TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA; $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$) que debido a sus diferentes grados de solubilidad en relación a la monetita, modulan la biodegradabilidad y osteointegración del material final. Siendo la hidroxiapatita la menos soluble y la monetita la de más rápida reabsorción. Por otra parte, en alguno de los materiales el calcio presente en la monetita está parcialmente sustituido por otros iones como zinc (Zn^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}), para aprovechar la capacidad osteoinductora atribuida a dichos elementos.

En total se han estudiado veinte composiciones diferentes. Para su evaluación *in vivo* los materiales han sido preparados en forma de granulados, ya que esta es la forma comercial estándar en que se presentan este tipo de materiales. Además se ha estudiado el comportamiento de tres tipos de piezas cilíndricas con la misma composición de uno de los granulados.

Como controles se han utilizado defectos óseos de tamaño crítico sin ningún tipo de material, **vacíos (control 1)**, defectos rellenos por un granulado comercial **Bio-Oss® (control 2)** que es hidroxiapatita de origen bovino y **Cerasorb® (control 3)** que es una cerámica sintética de β -TCP de fase pura.

Los biomateriales granulados sintetizados se implantaron en huesos largos de ovejas (húmero, fémur y tibia), en defectos óseos cilíndricos, bilaterales y críticos, de forma que los defectos presentan un tamaño suficiente para evitar su regeneración espontánea. Se han organizado en diferentes grupos atendiendo a su composición. La clasificación de los materiales es la siguiente:

- **Grupo I:** Formado por gránulos de monetita, que pueden presentar o no sustitución iónica, y como fuente de silicio presentan ps-wollastonita y/o gel de sílice. Dos de estos materiales está formado además por otro tipo de fosfato de calcio, como es el β -TCP. Seis materiales: **A, B, C, D, E y F.**
- **Grupo II:** Formado por gránulos de monetita, con o sin sustitución iónica, combinados con otro tipo de fosfato de calcio, o bien CDHA o β -TCP. Pero todos presentan en común vidrio en pequeñas cantidades y gel de sílice, que puede estar tanto en grandes como en pequeñas cantidades. Cinco materiales: **G, H, I, J y K.**

- **Grupo III:** Formado por gránulos de monetita, con o sin sustitución iónica, y gel de sílice, como única fuente de iones de silicio. Cuatro de los materiales presentan además CDHA añadida. Cinco materiales: *L*, *M*, *N*, *N̄* y *O*.
- **Grupo IV:** Formado por dos materiales cuya reacción de síntesis es diferente a la del resto. Se trata de los materiales *P* y *Q* los cuales en su composición muestran un porcentaje muy bajo de monetita (sustituida por Zinc en el material *Q*), una gran cantidad de CDHA y como fuente de silicio, un alto contenido de gel de sílice y ps-wollastonita.

A continuación se van a detallar los procesos de síntesis atendiendo a la composición de cada grupo de materiales.

1.1. Síntesis y composición:

La síntesis de los materiales se realiza mediante una reacción de cementación, similar a la que ocurre en el yeso. Para ello reaccionan un compuesto ácido y uno básico en un medio acuoso dando lugar a la precipitación de uno o más compuestos. En estos materiales siempre ocurre, la formación y precipitación de al menos dos compuestos, brushita y/o monetita y gel de sílice. Para ello se utilizan como materiales de partida una sal de calcio (componente básico), como por ejemplo un fosfato de calcio (β -TCP, CDHA) o un compuesto conteniendo Ca y Si, como por ejemplo la ps-wollastonita o un vidrio bioactivo. Como componente ácido se utiliza en la síntesis de la mayor parte de los materiales ácido ortofosfórico y en otros materiales el dihidrógeno fosfato de calcio anhidro ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) conocido por sus siglas en inglés como MCP.

En algunos materiales se forma brushita como producto de la reacción. Para lograr su deshidratación y por tanto su transformación a monetita se introducen tratamientos térmicos a 80°C durante diferentes pasos en la síntesis y por último el propio proceso de esterilización en autoclave consigue la conversión de brushita a monetita.

En algunos materiales se añaden determinados componentes básicos en exceso para que quede como parte de la composición del material final.

Para la síntesis de aquellos materiales donde se obtiene monetita parcialmente sustituida por Zn o Mg se añaden sales de estos elementos que no dejen ningún residuo en el material, como es el caso de carbonatos e hidróxidos, excepto en uno de los grupos donde fue necesario añadir el Zn en forma de ZnCl_2 . Todos ellos se añaden al líquido de la reacción.

Mezclado: Los componentes sólidos de la reacción se mezclan en una túbula durante 10 minutos para garantizar la homogeneidad de los mismos.

El componente líquido se prepara el mismo día de la reacción y generalmente es ácido fosfórico con la concentración deseada. En el caso que se quiere obtener monetita sustituida se disuelve en este ácido la sal del ión correspondiente.

Uno de los aspectos claves en la obtención de los materiales es el mezclado de los componentes sólidos y líquidos. Este tiempo debe ser suficiente para garantizar la homogeneidad de la mezcla. Sin embargo, si este tiempo se prolonga puede comenzar el fraguado (comienzo de la precipitación de los nuevos cristales), por lo que la cohesión y dureza del material final se ven afectadas.

Relación líquido/polvo: Este es un factor muy importante tanto para el mezclado como para las propiedades del material final. La cantidad de líquido debe ser suficiente para que se forme una pasta. Una cantidad insuficiente de líquido haría que la reacción quedara incompleta y afectaría las propiedades mecánicas del material final. Un exceso de líquido también es desfavorable ya que afectaría a las propiedades mecánicas del material final. La relación líquido/polvo utilizada en la mayoría de las síntesis fue de 0,8 ml/g.

Fraguado y endurecimiento: Después del mezclado el sistema comienza a fraguar, aumentando la viscosidad de la muestra hasta que finalmente el sistema endurece. En todos los materiales el endurecimiento ocurre entre 1 y 5 minutos.

Envejecimiento: Una vez que el sistema ha endurecido se coloca a 80°C en un ambiente con 100 % de humedad relativa durante 24 horas. El objetivo de este paso es garantizar que la reacción se complete totalmente.

Secado: Al terminar el envejecimiento, los materiales fueron secados a 80°C en vacío durante 24 horas.

Trituración: Después de secados los materiales fueron triturados manualmente de manera que todos los gránulos tuvieran un tamaño inferior a 1mm.

Lavado: Posteriormente los materiales se lavan durante 20 minutos en agua destilada, tres veces seguidas, con el objetivo de eliminar el ácido que pueda haber quedado sin reaccionar.

Secado: Los materiales fueron secados a 80°C y en vacío.

Tamizado: Los materiales fueron tamizados y seleccionada la fracción entre 250 y 1000µm.

Esterilización: Por último los materiales fueron esterilizados en autoclave a 121°C, 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

Caracterización: Después de esterilizados los materiales fueron caracterizados química y físicamente antes de su evaluación *in vivo*.

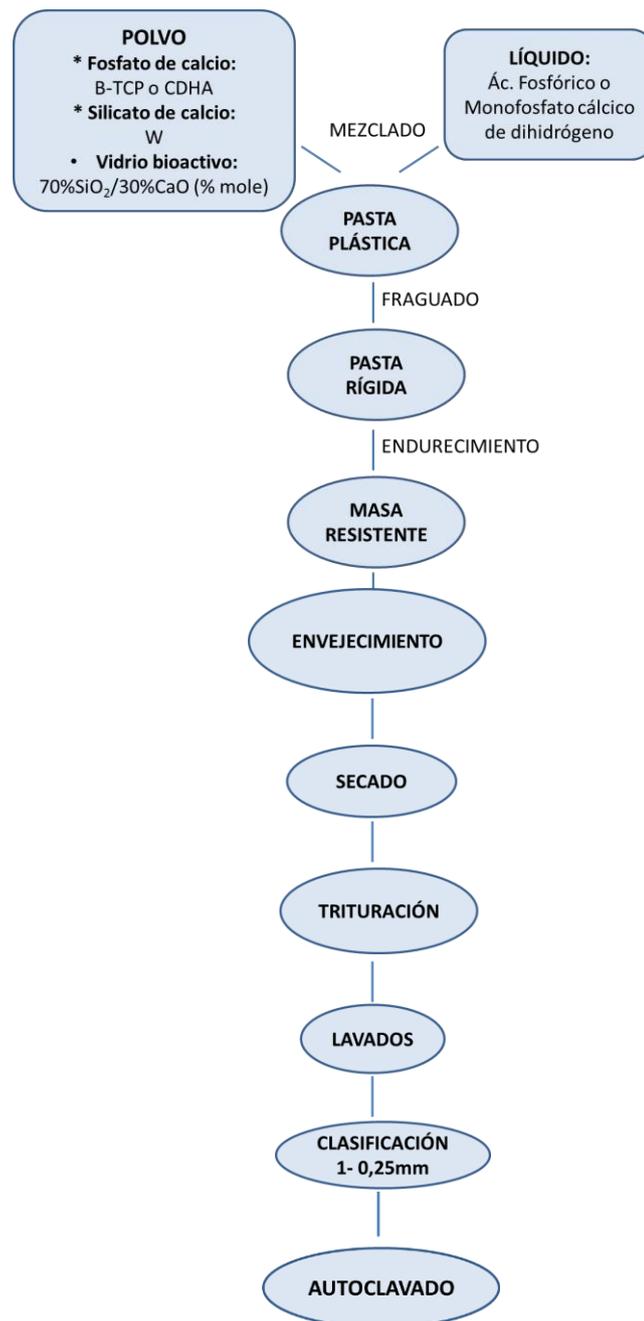


Fig.1. Esquema del proceso de preparación de los materiales.

Para una mejor comprensión del trabajo los materiales estudiados se han organizado en cuatro grupos atendiendo a su composición. La síntesis de los materiales se llevó a cabo de la manera descrita anteriormente. A continuación se describirá la composición final de los materiales, así como los materiales de partida, los compuestos que se forman y las reacciones involucradas.

La clasificación de los materiales es la siguiente:

GRUPO I:

Estos materiales tienen en común que la fuente de monetita y gel de sílice son la ps-wollastonita y el ácido fosfórico. En este grupo se estudió la influencia de sustituir parcialmente el calcio de la monetita por Mg o por Zn, así como la influencia de sustituir parte de la monetita por fosfatos de calcio menos solubles como la CDHA o el β -TCP.

Tabla 1. Composición final de los materiales del grupo I.

GRUPO I	M (%)	M-Mg (%)	M-Zn (%)	CDHA (%)	β -TCP (%)	GS (%)	ps-W (%)
A	58					34	8
B		60				34	6
C		59		7		31	3
D			60			34	6
E	63				18	19	
F	46			2	38	14	

Tabla 2. Compuestos de partida, en exceso y formados en la síntesis de los materiales del grupo I.

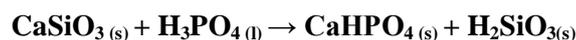
GRUPO I	Comp. básico	Comp. ácido	Exceso	Formación	Fuente Zn	Fuente Mg
A	ps-W	Ac. Fos	ps-W	M, GS		
B	ps-W	Ac. Fos	ps-W	M-Mg, GS		CBMg
C	ps-W, CDHA	Ac. Fos	ps-W, CDHA	M-Mg, GS		CBMg
D	ps-W	Ac. Fos	ps-W	M-Zn, GS	CBZn	
E	ps-W, β -TCP	Ac. Fos	β -TCP	M, GS		
F	ps-W, β -TCP	Ac. Fos	β -TCP	M, GS, CDHA		

CBMg: $\text{MgCO}_3 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

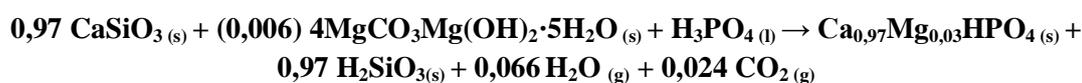
CBZn: $2\text{ZnCO}_3 \cdot 3\text{Zn}(\text{OH})_2$

Reacciones:

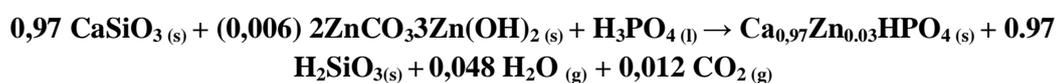
General:



Reacción para obtener monetita parcialmente sustituida con Mg^{2+} (I y A).



Reacción para obtener monetita parcialmente sustituida con Zn^{2+} (Z).

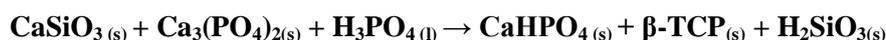


En el caso de los materiales *C*, *E* y *F* además de la ps-W es necesario añadir un fosfato de calcio para aumentar la cantidad de monetita que se obtiene respecto al gel de sílice. En este caso el objetivo era obtener materiales con un menor contenido de gel de sílice y a su vez incorporar otros fosfatos de calcio menos solubles que la monetita y el gel de sílice. Por esta razón estos fosfatos de calcio se añaden además en exceso.

En particular en el caso del material *C* el fosfato de calcio añadido fue la CDHA. En este caso además de la reacción general donde interviene la ps-W y el ácido fosfórico ocurre la siguiente reacción.



En los materiales *E* y *F* se añadió β -TCP en exceso como fosfato de calcio. En este caso la reacción que tiene lugar junto con la de la ps-W con el ácido fosfórico es:



Además en el caso del material *F* se observó la formación de una pequeña cantidad de CDHA. Esta puede haberse formado como resultado de un aumento local del pH debido a la hidrólisis de la ps-W, donde la CDHA es un fosfato de calcio más estable que la monetita que precipita a pH más ácidos.

GRUPO II:

El elemento diferenciador de este grupo es que presenta en su composición un vidrio bioactivo. El objetivo fue evaluar el comportamiento de estos materiales en presencia de este vidrio y estudiar la influencia de utilizar este vidrio bioactivo como precursor del gel de sílice en lugar de un silicato de calcio, como la ps-wollastonita, utilizada en el grupo I.

El vidrio estudiado pertenece al sistema 70%SiO₂/30%CaO (% mole) y fue obtenido por el método sol-gel. Este vidrio fue seleccionado debido a la simplicidad de su composición y que a su vez presenta una alta bioactividad demostrada tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

En este grupo se estudió también la influencia del contenido de gel de sílice y monetita, así como las sustituciones iónicas parciales de Ca²⁺ en la monetita por Zn²⁺ o Mg²⁺, así como la sustitución de parte de la monetita por fosfatos de calcio menos solubles como el β -TCP o la CDHA.

Tabla 3. Composición final de los materiales del grupo II.

GRUPO II	M (%)	M-Mg (%)	M-Zn (%)	CDHA (%)	β -TCP (%)	GS (%)	V (%)
<i>G</i>	74			6		18	2
<i>H</i>	55			5		37	3
<i>I</i>			51	7		39	3
<i>J</i>	45				36	14	5
<i>K</i>		45			35	15	5

Tabla 4. Compuestos de partida, en exceso y formados en la síntesis de los materiales del grupo II.

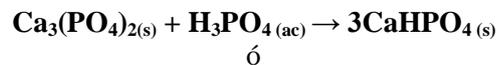
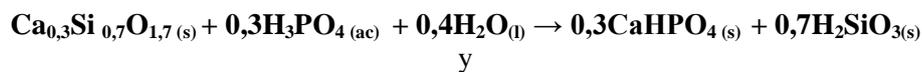
GRUPO II	Comp. básico	Comp. ácido	Exceso	Formación	Fuente Zn	Fuente Mg
<i>G</i>	V, TCP	Ac. Fos	V	M, GS, CDHA		
<i>H</i>	V, CDHA	Ac. Fos	V	M, GS, CDHA		
<i>I</i>	V, CDHA	Ac. Fos	V	M-Zn, GS, CDHA	CBZn	
<i>J</i>	ps-W, β -TCP	Ac. Fos	V, β -TCP	M, GS		
<i>K</i>	ps-W, β -TCP	Ac. Fos	V, β -TCP	M-Mg, GS		CBMg

CBMg: $\text{MgCO}_3 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

CBZn: $2\text{ZnCO}_3 \cdot 3\text{Zn}(\text{OH})_2$

Reacciones:

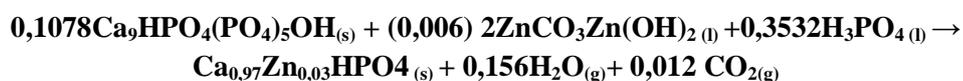
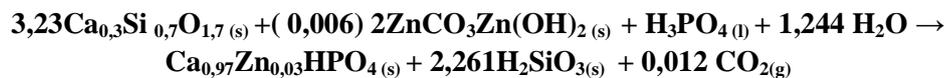
General:



En este grupo ocurren dos reacciones: una de ellas entre la CDHA o el β -TCP con el ácido fosfórico dando lugar a monetita, aunque en pequeñas cantidades, y la otra reacción entre el vidrio, el ácido fosfórico y el agua, que da lugar a la formación de gel de sílice y monetita. En el proceso, la reacción entre el vidrio y el agua provoca un aumento de pH, basificando el medio, llegando a formar pequeñas cantidades de CDHA como producto final de la reacción.

En todos estos materiales a diferencia de algunos del Grupo I, es necesario utilizar como componente básico la DCHA o el β -TCP además del vidrio para lograr las composiciones deseadas. Este vidrio presenta mucho más silicio que calcio en su composición por lo que su reacción con el ácido fosfórico daría lugar a materiales con un alto contenido de gel de sílice y poca monetita. Con la adición de un fosfato de calcio es posible aumentar la cantidad de monetita que se forma.

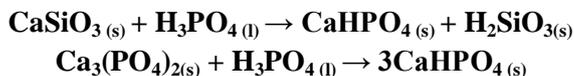
En el caso del material *I* donde el Ca^{2+} de la monetita está parcialmente sustituida por Zn^{2+} , las reacciones involucradas son las siguientes.



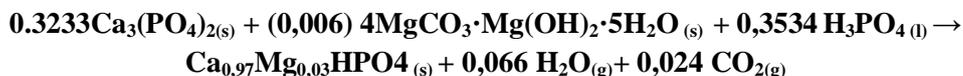
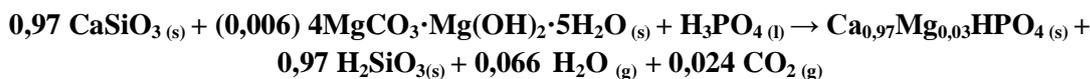
En el caso de los materiales *J* y *K* fue necesario utilizar ps-wollastonita como precursor del gel de sílice y de la monetita en lugar del vidrio para poder obtener la

composición deseada. Con la ps-W se garantiza que se forme el gel de sílice deseado ya que la ps-W al ser la más reactiva de los componentes sólidos reacciona primero y totalmente. En cambio el vidrio es el menos reactivo y el último en reaccionar, por lo que al añadir β -TCP en exceso se garantiza que todo el vidrio añadido quede sin reaccionar. El β -TCP se añade para completar la cantidad de monetita requerida y además se añade en exceso para disminuir la reabsorción del material final.

Las reacciones que ocurren en el caso del material *J* son:



En el caso del material *K* las reacciones que ocurren son similares al del material *J* pero con la incorporación del carbonato básico de magnesio para obtener monetita parcialmente sustituida por magnesio:



GRUPO III:

A este grupo pertenecen aquellos materiales que están formados por altos contenidos de monetita y solo un 7% de compuestos de silicio. En este caso el silicio está presente solo como gel de sílice.

Este es un sistema más sencillo que los anteriores, donde el objetivo era estudiar la influencia de sustituciones iónicas como el Zn^{2+} , así como la influencia de la sustitución de parte de la monetita por la CDHA que presenta una reabsorción menor que la monetita. Los materiales *M* y *O* presentan sustituciones iónicas parciales del 3% de Ca^{2+} por Zn^{2+} en la monetita.

Tabla 5. Composición final de los materiales del grupo III.

GRUPO III	M (%)	M-Zn (%)	CDHA (%)	GS (%)
<i>L</i>	93			7
<i>M</i>		78	15	7
<i>N</i>	78		15	7
<i>Ñ</i>	63		30	7
<i>O</i>		63	30	7

GRUPO IV:

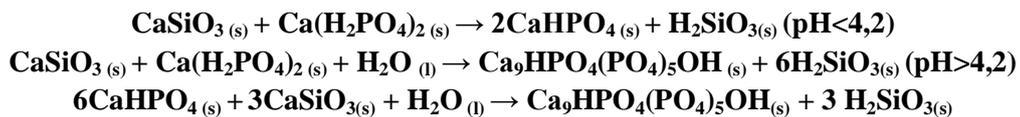
Formado por dos materiales caracterizados por presentar poca cantidad de monetita y un alto contenido de CDHA, junto a un alto contenido de gel de sílice y ps-wollastonita. El objetivo en este caso era obtener un material con una mayor proporción de ps-wollastonita

residual que los obtenidos en el grupo I, por lo que este material se diseñó para obtener una composición final de 60% Mn, 17% GS y 23 % de ps-W. Dada la estequiometría de la reacción entre la ps-wollastonita y el ácido fosfórico, no es posible obtener esta composición. Para ello fue necesario utilizar otro componente ácido, el MCP ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) con el que se podía obtener una menor cantidad de gel de sílice y un alto contenido de ps-wollastonita. En este caso es necesario usar agua como líquido, ya que tanto el componente ácido como básico son sólidos.

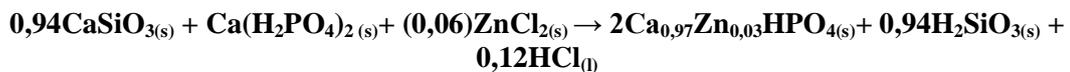
Al caracterizar los materiales obtenidos se observó que estos contenían mucho menos cantidad de monetita y ps-wollastonita que lo previsto, así como un alto contenido de CDHA (ver Tabla 6). Este comportamiento se explica debido a que en este sistema hay un gran exceso de ps-W que en contacto con agua provoca un aumento del pH del medio, esto unido a que la reacción entre la ps-W y el MCP es algo más lenta que con el ácido fosfórico hace que durante el fraguado hayan aumentos locales de pH que hace que se favorezca la precipitación de la CDHA en lugar de monetita. Por otra parte, durante el envejecimiento la ps-wollastonita en exceso reacciona con la monetita transformándose en CDHA.

Los materiales *P* y *Q* son similares, salvo que en el *Q* la monetita se encuentra sustituida por Zn^{2+} . En este caso fue necesario añadir el ión en forma de cloruro de zinc, ya que el CBZn utilizado en el resto de los materiales es insoluble en agua.

La reacción de síntesis del material *P* se detalla a continuación:



La reacción principal en el caso del material *Q* es la siguiente:



Las otras reacciones de formación de CDHA, son similares a las que ocurren en el material *P*, pero incorporando el Zn.

Tabla 6. Composición final de los materiales del grupo IV.

GRUPO IV	M (%)	M-Zn (%)	GS (%)	CDHA (%)	ps-W (%)
<i>P</i>	35		22	24	18
<i>Q</i>		20	27	46	7

Tabla 7. Compuestos de partida, en exceso y formados en la síntesis de los materiales del grupo IV.

GRUPO IV	Comp. básico	Comp. ácido	Exceso	Formación	Fuente Zn
<i>P</i>	ps-W	MCP	ps-W	M, CDHA, GS	
<i>Q</i>	ps-W	MCP	ps-W	M-Zn, CDHA, GS	ZnCl ₂

1.2. Caracterización físico-química:

Una vez esterilizados los materiales, éstos fueron evaluados mediante diferentes técnicas para determinar su composición, porosidad, área superficial específica, microestructura, pH, etc.

La composición de los materiales se determinó mediante difracción de rayos X y análisis cuantitativo de Ca, P, Si, Zn y/o Mg en aquellos materiales donde se añadieron dichos elementos.

La porosidad se determinó mediante porosimetría de mercurio, el área superficial específica mediante porosimetría de absorción de nitrógeno y la microestructura se analizó mediante microscopía electrónica de barrido.

- Porosidad: La porosidad intrínseca de los materiales (porosidad intragranular) es de gran importancia, ya que influye en la reabsorción del mismo, en la capacidad de liberar iones al medio e interactuar con los fluidos circundantes. Por otra parte la porosidad intergranular es fundamental para la formación de nuevo hueso. Esta porosidad debe ser lo suficientemente grande como para que pueda ocurrir la colonización ósea. El porcentaje medio de porosidad intergranular de los materiales utilizados en este trabajo es del 50%, mientras que la porosidad intragranular es del 60%.
- Tamaño de gránulo: el tamaño de los granulados utilizados en este trabajo está entre 1 y 0,25 mm. Se seleccionó esta fracción teniendo en cuenta los tamaños de los materiales comerciales existentes. Área superficial específica (ASE): está directamente relacionada con la capacidad de que se produzcan reacciones superficiales. Por lo que a valores elevados de este parámetro son indicativos de un mayor contacto ente la superficie de los gránulos y el medio que los rodea. En general los materiales estudiados tienen un alto valor de área superficial específica, aumentando el valor con el contenido de gel de sílice. El valor medio del ASE de los gránulos de monetita evaluados en este trabajo es: en el grupo I, materiales *A*, *B*, *C* y *D* $100\text{m}^2/\text{g}$ y materiales *E* y *F* $50\text{m}^2/\text{g}$, en el grupo II $80\text{m}^2/\text{g}$, en el grupo III $55\text{m}^2/\text{g}$ y en el grupo IV $100\text{m}^2/\text{g}$.
- pH: es importante determinar este parámetro ya que la hidrólisis de la monetita con el agua es ligeramente ácida produciendo un descenso del pH hasta valores de 5,5. Se ha estudiado el pH de los materiales en contacto con agua y en fluido biológico simulado (FBS). En agua el pH suele ser inferior a 7 y en FBS el pH se mantiene sin variación (7,4).

2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.-

De acuerdo con la bibliografía existente, la oveja constituye un modelo reproducible para la valoración de la osteointegración. Además, presenta facilidad en el abordaje para la colocación de los implantes siendo un animal dócil y relativamente económico.

Las ovejas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de un centro de cría de especie ovina. Se emplearon 27 animales hembras, adultas, de la raza Merina precoz y con un peso medio de $46,2 \pm 6,7$ Kg. Todas presentaban un buen estado de salud y permanecieron como mínimo 14 días en periodo de aclimatación antes de iniciar el estudio. La oveja adulta presenta una mayor semejanza en cuanto a peso y dimensiones de huesos largos al humano, siendo adecuados para la implantación de implantes humanos y prótesis (152), lo cual no es posible en razas más pequeñas.

La composición mineral no difiere significativamente entre el humano y los animales (153), considerándose la oveja como un modelo válido para evaluar la regeneración ósea y la actividad de remodelación en humanos (154).

3. INSTALACIONES.-

Las instalaciones que se han utilizado para los ensayos de implantación han sido las del Centro de Cirugía Mínima Invasiva Jesús Usón (CCMIJU) (Cáceres). Este centro está acreditado por la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Extremadura como establecimiento usuario y de cría de animales de experimentación (No.: ES 100370001499). El animalario del CCMIJU cuenta con una superficie de 2.000 m². En el postoperatorio las ovejas fueron distribuidas en una sala del animalario, manteniendo 2 ovejas por cubículo, y posteriormente permanecieron en salas con salida a un patio para que estuviesen juntas y de este modo, más cómodas, todo ello debido a su carácter gregario.

Las condiciones mantenidas en el animalario son:

- Luz: ciclo de 12 horas.
- Humedad: 55+/-10 %.
- Temperatura sala: 21°C, sometida a control constante.
- Calidad de agua: control cada 6 meses.
- Aire: exterior con renovaciones controladas.

Se realiza una limpieza y administración de alimento diarias por parte de personal de la Unidad de Animalario. La alimentación suministrada a los animales fue *Unifeed* (Coop. Ganadera Casar de Cáceres), paja para aportarles volumen (Coop. Ganadera Casar de Cáceres) y bloques de sales (Pienso Gaydi). La cama para el suelo pertenecía al mismo proveedor. Los animales disponen de agua de grifo ad libitum en bebederos metálicos de tipo chupete. Todos los animales estaban sujetos a un control diario de su estado general por parte de un veterinario, para poder instaurar el tratamiento correspondiente en caso de signos de dolor o patología. El día previo a la implantación los materiales se esterilizaron mediante autoclave, a 121°C, 0,96 atmosferas y durante 30 minutos.

4. PROTOCOLO QUIRÚRGICO.-

4.1. Material quirúrgico:

- Bisturí con hoja del nº 11 y 22.
- Pinzas de Adson sin dientes.
- Pinzas sin dientes.
- Pinzas con dientes.
- Tijera de disección.
- Porta-agujas.
- Tijera de hilo.
- Pistola de motor neumático con brocas de distinto tamaño: 2.5, 4, 5.5, 6.5 y 8 mm.

4.2. Técnica quirúrgica:

Todos los sujetos del estudio fueron sometidos al mismo protocolo bajo anestesia general y de forma aséptica. La zona de implantación fue el hueso esponjoso de la epífisis proximal de la tibia, la epífisis distal del fémur y la diáfisis proximal del húmero. Se disecaron los planos epiteliales y musculares, y bajo irrigación con suero salino fisiológico frío, se practicaron seis orificios transversales de 8 mm de diámetro y 13 de profundidad (Figs. 2 y 3). Estos orificios se marcaron inicialmente con una guía y se fueron ampliando progresivamente con varias brocas de menor a mayor tamaño. Posteriormente se procedió al relleno de defectos óseos con gránulos de 6 materiales distintos y localización aleatoria. En algunos casos uno de los defectos óseos se dejó vacío (Fig.4), sin rellenar, como control y así comprobar que el tamaño del defecto es crítico y que no se pueda producir una regeneración ósea espontánea.

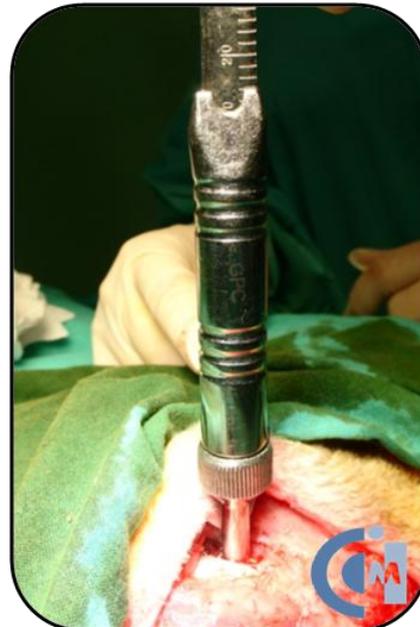


Fig.2. Realización del defecto (13 x 8mm) refrigerando con suero salino frío.

Fig.3. Medida de las dimensiones del defecto.

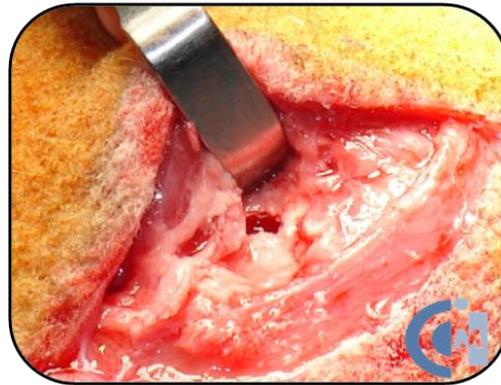


Fig.4. Orificio control vacío.

En caso de sangrado se introducía una pieza de Espongostan® (Nycomed Pharma) retirándose a los 2 minutos. Posteriormente se rellenaron con el material correspondiente (Fig. 5) compactándolo constantemente con la superficie lisa de la broca para asemejar la cantidad de material colocado en todos los orificios.

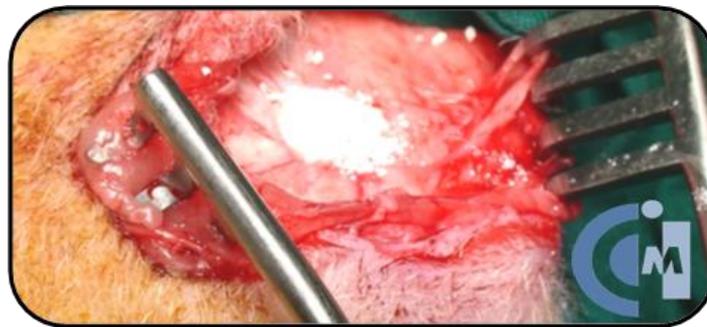


Fig.5. Vista del orificio una vez rellenado el defecto óseo con el material granulado.

Tras la implantación del material se colocó 1 cm² de una membrana de colágeno (ACE Surgical Supply Co., Inc.). Los planos musculares se suturaron con sutura monofilamento absorbible de 3/0 (Biosyn™, Covidien) (Fig. 6). El tejido subcutáneo y la piel (Fig. 7) se cerraron con material trenzado absorbible 2/0 (Polysorb™, Covidien) y 0 (Polysorb™, Covidien), respectivamente.

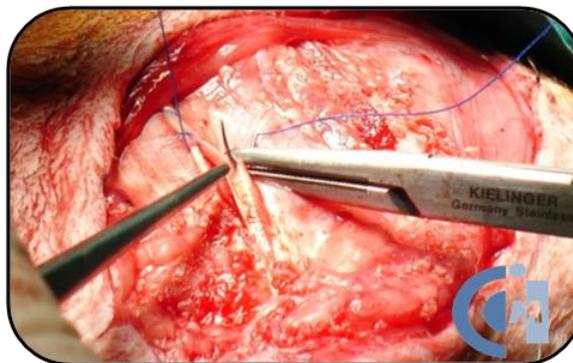


Fig.6. Cierre del tejido muscular



Fig.7. Sutura simple discontinua en piel.

Los animales se vendaron (Fig.8) inmediatamente después de la intervención para restringir el movimiento, principalmente de la articulación del hombro, y se retiró dicho vendaje a los 7 días.



Fig.8. Animal con vendaje realizado el día después de la intervención.

Durante la primera semana del estudio los animales fueron controlados diariamente y se les administró una terapia antibiótica con Cefotiofur (Excenel[®] RTU 50mg/ml. Pharmacia Spain, S.A.) vía IM a dosis de 1mg/kg/día durante 7 días, analgésica con buprenorfina (Buprex[®]. Shering-Plough, S.A.) vía IM a dosis de 0.01mg/kg/12h durante 3 días y anti-inflamatoria con Carprofeno (Rymadil[®]. Pfizer S.A.) vía IM a dosis de 2mg/kg/12h durante 7 días.

5. PROTOCOLO ANESTÉSICO.-

5.1. Anestesia y analgesia:

Tras un periodo de acondicionamiento, los animales se anestesiaron mediante isoflurano dosificado para obtener 1 CAM (EtIso: 1,58), como analgesia intraoperatoria utilizamos carprofeno por vía IV (4 mg/kg) y buprenorfina por vía IM (300 µg/animal) como analgesia postoperatoria. Dichos animales, debido a su docilidad y gracias a un método de estabulación poco estresante fueron inducidos directamente con tiopental a dosis-efecto, aproximadamente 15 mg/kg, según nuestra experiencia en estos animales. Posteriormente los animales fueron intubados con tubos endotraqueales con neumotaponamiento (Sims Portex Inc., Keene, USA). Tras la intubación endotraqueal, el tubo endotraqueal se conectó a un circuito circular semicerrado unido a un ventilador (Ohmeda, Madrid, España). Para todos los grupos la mezcla del mantenimiento anestésico se realizó con oxígeno al 100% con un flujo de gas fresco de 1 L/min.

Se empleó ventilación controlada mediante un ventilador mecánico para mantener valores de normocapnia (35-45 mmHg). La vena cefálica se cateterizó para administrar una solución de suero salino fisiológico a una dosis de infusión de 5 ml/kg/h.

Como antibioterapia preventiva se administró ceftiofur a una dosis de 1 mg/kg/24 horas.

Una vez realizado el procedimiento de implantación y el cierre de los planos quirúrgicos, se cerró el vaporizador de isoflurano y comenzó la etapa de recuperación anestésica.

5.2. Monitorización:

Durante el mantenimiento anestésico se registraron los siguientes parámetros en diferentes tiempos a lo largo del estudio:

- Parámetros ventilatorios: frecuencia respiratoria, presión en vías aéreas, concentración de agente inhalatorio inhalado y exhalado, saturación de oxígeno de la hemoglobina, concentración al final de la espiración de dióxido de carbono y oximetría.

- Parámetros hemodinámicos: frecuencia cardíaca medida a través del ECG (derivación III) y el pulsímetro colocado en la lengua.

- Durante la recuperación anestésica se valoró la calidad de la misma mediante el registro de tiempos de recuperación de reflejos (reflejo corneal, reflejo palpebral, reflejo deglutorio y reflejo doloroso), cambios posturales, etc. para proceder a la extubación.

6. SEGUIMIENTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.-

Durante la primera semana del periodo postoperatorio se observó 2 veces al día el estado general y la marcha del sujeto de estudio. Posteriormente y hasta el final del estudio se realizó una revisión diaria del estado general de los animales.

Además, se realizó un estudio de la evolución de los defectos mediante tomografía axial computerizada (TAC) (Philips Brilliance CT-6). Se obtuvieron TACs en el postoperatorio inmediato, a las 4, 8, 12 y 16 semanas de la implantación (Fig. 9), después de la eutanasia, para obtener una secuencia temporal del estado del área implantada, ver cómo evoluciona la regeneración del defecto y la densidad del material. Para la correcta realización de los TACs los animales fueron anestesiados.

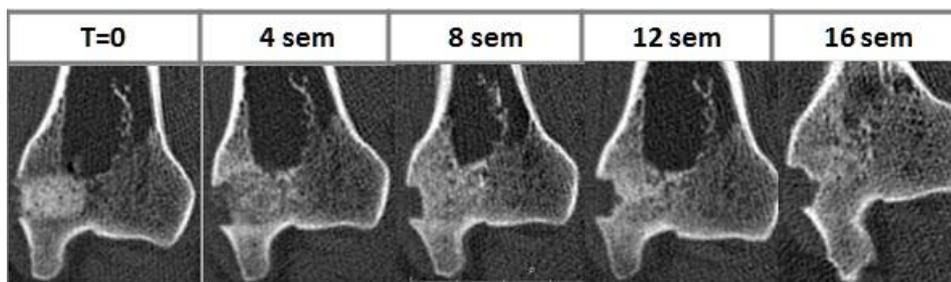


Fig.9. Ejemplo de secuencia de imágenes de TAC tomadas en todos los tiempos de estudio.

Una vez finalizado el periodo de estudio, 16 semanas, los animales fueron sacrificados humanitariamente procediendo a la extracción en bloque del tejido óseo de las zonas implantadas en cada animal. El método eutanásico que se utilizó consistió en una inyección intravenosa de cloruro potásico una vez anestesiado el animal por vía intravenosa.

Una vez aisladas las partes de estudio donde están implantados los materiales, tanto del fémur, tibia y húmero, se realiza la limpieza de las partes blandas y se fijan en formol salino al 4%.

Las muestras fueron introducidas individualmente en frascos de plástico y enviadas al Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

7. GRUPOS EXPERIMENTALES.-

El orden de la colocación de los implantes y de los orificios control fue aleatorio en cada sujeto. En la siguiente Tabla (Tabla 8) se muestran las localizaciones óseas de cada material y el número de muestras en cada lugar de implantación. (T.D: tibia derecha, T.I: tibia izquierda, F.D: fémur derecho, F.I: fémur izquierdo, H.D: húmero derecho y H.I: húmero izquierdo). El número total de implantes estudiados fueron: 150 y el número de ovejas: 27. Algunos de los casos han sido descartados debido a diversas complicaciones, como infecciones graves, seromas o efectos totalmente inadecuados de los materiales; de

forma que no se han tenido en cuenta a la hora de realizar este trabajo. Sin embargo si se han tenido en cuenta los casos adversos, mostrados en el apartado de resultados.

Tabla 8. Materiales implantados y localización anatómica.

MATERIAL	T.D	T.I	F.D	F.I	H.D	H.I
<i>A</i>	1	1			1	1
<i>B</i>	2	1		2	2	
Bio-Oss®	3	2	3	1	2	
<i>C</i>	1	1	1	1	1	1
Cerasorb®	1	1	1	1	1	1
<i>D</i>	1		1	2	1	1
<i>E</i>	1	1	1	1	1	1
<i>F</i>	1	1	1		1	1
<i>G</i>	1	1	1	1	1	1
<i>H</i>	1	1	1	1	1	1
<i>I</i>	1	1	1	1	1	1
<i>J</i>	1	1	1	1	1	1
<i>K</i>	1	1	1	1	1	1
<i>L</i>		2	2		1	2
<i>M</i>	1	2	1	2	1	3
<i>N</i>	2	1	2		1	1
<i>Ñ</i>	1	2	1	1		2
<i>O</i>	1	1	2	1	1	1
<i>P</i>	1	1	1	2	1	1
<i>Q</i>	2	2	1	1	1	1
Vacío	1	2	1	1	2	1

8. ESTUDIO RADIOLÓGICO.-

Una vez recibidas las muestras óseas, se lavaron con agua para eliminar restos de formol y se realizaron las radiografías. Primero se hicieron radiografías de la pieza entera (Fig. 10a) y después se hicieron cortes, obteniendo 3 partes del hueso, para tomar una segunda radiografía de la loncha que presenta el defecto (Fig. 10b), para una mejor demostración del lugar de implantación.

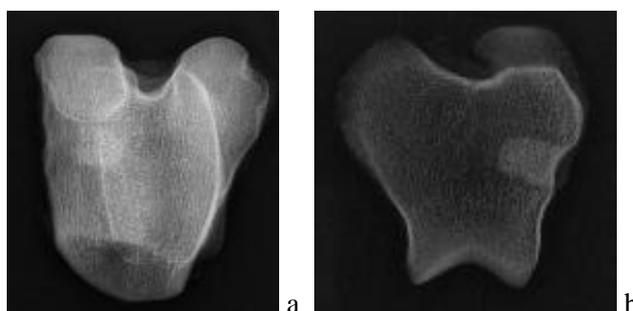


Fig.10. Ejemplo de imágenes radiológicas realizadas una vez terminado el tiempo de experimentación, 16 semanas, sacrificadas las ovejas y aisladas las piezas óseas con los defectos implantados. (a) pieza entera. (b) loncha.

9. PROTOCOLO HISTOLÓGICO.-

Una vez radiografiados, los huesos se post fijan en formol salino al 10%. Una vez que se va a comenzar el procesado de las muestras, no descalcificadas, para su estudio histológico, las piezas óseas se vuelven a lavar con agua y se realiza un serrado macroscópico en porciones que incluyan hueso normal, hueso neoformado y material implantado. Las porciones óseas se introducen en cassettes, adecuadamente etiquetados, y se deshidratan empleando disoluciones de graduación creciente de etanol (70, 80, 90 y 95), estando embebidas cada día en una de las disoluciones, hasta llegar a etanol absoluto, donde permanecieron durante dos días.

9.1. Inclusión:

A continuación se procede a la inclusión de las muestras óseas en metilmetacrilato en estado líquido durante 15 días a 4°C en agitación.

Por otro lado, se preparan unos cilindros de vidrio con una base de metilmetacrilato polimerizado que se van a utilizar como soporte para la posterior inclusión de las muestras de tejido óseo. Para ello, los tubos de vidrio se rellenan con la mezcla de metilmetacrilato hasta una altura de 2,5 cm, se cierran herméticamente con parafilm y se dejan en la estufa a 32°C, para que polimerice. Una vez transcurrido el tiempo de polimerización, que es de 2 a 3 días, se sacan las bases de la estufa y se tiene de reserva para la inclusión.

Componentes del metil metacrilato:

- 800mL M-metacrilato (monómero estabilizado de hidroquinona).
- 160mL Nonifenol poliglicol-éter acetato (Plastoid N).
- 16mL Dibutil-ftalato.
- 40gr Peróxido de benzoilo (este catalizador se adiciona de inmediato).

Una vez preparada la mezcla se guarda en un frasco cerrado en nevera a 4°C. Antes de abrir la botella se espera a que esté a temperatura ambiente.

Transcurridos los 15 días, durante los cuales las piezas óseas han sido incluidas en metilmetacrilato líquido, se pasan a los cilindros con bases de metilmetacrilato ya polimerizado. Utilizando un tubo con la base de metacrilato se introduce la pieza ósea junto con una etiqueta de papel cebolla con la referencia de la muestra, se recubre de metilmetacrilato líquido, se etiqueta el tubo por fuera, y se tapa con parafilm para que no entre aire. Se meten los tubos en la estufa a 32°C para su polimerización durante 5 y 6 días. Seguidamente se rompe el tubo de vidrio quedando el bloque polimerizado con la muestra ósea, que va a ser cortado con una sierra de cinta para desbastar la muestra, antes de realizar los cortes definitivos.



Fig.11. Fotografías las piezas óseas embebidas en los bloques de metilmetacrilato.

9.2. Corte de las muestras:

Una vez serrado el bloque para tener un tamaño que permita su manejabilidad, se lija y se coloca en el microtomo (Microm HM 350 S) (Fig.11).



Fig.12. Microtomo.

Tanto el bloque como la cuchilla se pincelan con alcohol de 70° constantemente, al objeto de que esté humedecido. Los primeros cortes se realizarán con un grosor de 30 μm hasta llegar a la pieza ósea, vigilando y mojando con alcohol. Una vez se llega a la pieza, se empieza a cortar a 5 μm , desechando los primeros cortes que salen. Los cortes de 5 μm se colocan sobre un portaobjetos previamente gelatinizado con gelatina de Haupt. Se echan por encima unas gotas de alcohol de 95° y, pasado unos 5 minutos, se cubren con un film de polietileno y se aplanan con el dedo o con un rodillo de goma. El film cubre toda la

superficie del portaobjetos, donde se encuentra el corte. Los portas se van apilando uno encima del otro y se colocan en una prensa con soportes de madera o metacrilato de 5 a 8 mm de grosor. Se aprieta la prensa hasta encontrar resistencia y permanecen en la estufa 24h a 60°C. Transcurrido ese tiempo, se quita el film de polietileno que cubre el portaobjetos, y se desplastifica el corte hasta agua destilada introduciendo los portas en una solución de metil-acetato durante 55 minutos. Posteriormente, se lavan en soluciones decrecientes de alcohol (100 → 70%) hasta agua destilada. Por último, se procede a la tinción de las muestras.

Gelatinizado de portaobjetos:

Composición gelatina de Haupt:

- 1gr de gelatina.
- 100mL de agua destilada.
- 15mL de glicerina.
- 2gr de fenol.
-

Pasos a seguir:

Calentar el agua a 55°C y echar la gelatina.

Cuando se enfríe añadir la glicerina y el fenol.

Para gelatinizar el porta se pone una gota de gelatina sobre él y se extiende ayudándonos con otro porta.

10. PROTOCOLO TINCIONES.-

Las microfotografías que se presentan en este trabajo están realizadas con las técnicas que se exponen a continuación, por lo que se obviará su descripción en cada una de las figuras presentadas.

10.1. Tricrómico de Goldner:

- Hematoxilina férrica de Weigert 5': formada por dos compuestos:
Weigert A (concentrada x2): Hematoxilina (2gr) + Alcohol 96° (100mL).
Weigert B: Percloruro de hierro (1,16gr)
HCl (10mL) + Agua destilada (5mL): 1mL
Agua destilada 98mL.
Mezclar a partes iguales las soluciones A y B sólo antes de su uso.
- Agua corriente 10'.
- Ponceau de xilidina 40':
200mL agua destilada
2gr Ponceau de xilidina
0,4mL ácido acético glacial
1gr fucsina ácida
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Diferenciar en ácido fosfotungstico-Orange G 10':
200mL agua destilada

- 2gr ácido fosfotungstico
- 1gr orange G
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Verde luz 15´:
 - 200mL agua destilada
 - 0,4gr verde luz
 - 0,4mL ácido acético glacial
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Deshidratar y montar.

10.2. Von Kossa:

- Nitrato de plata al 3%, 5 min.
- Agua destilada x2 veces, 5 min.
- Formol-carbonato de sodio, 5 min:
 - 10mg de carbonato de sodio
 - 150mL de agua destilada
 - 50mL de formaldehído al 37%.
- Agua corriente 10 min.
- Sulfato de sodio al 5%, 5 min.
- Agua corriente, 10 min.
- Ponceau de xilidina 45 min.
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Diferenciar en ácido fosfotúngstico-Orange G 15 min.
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Deshidratar y montar.

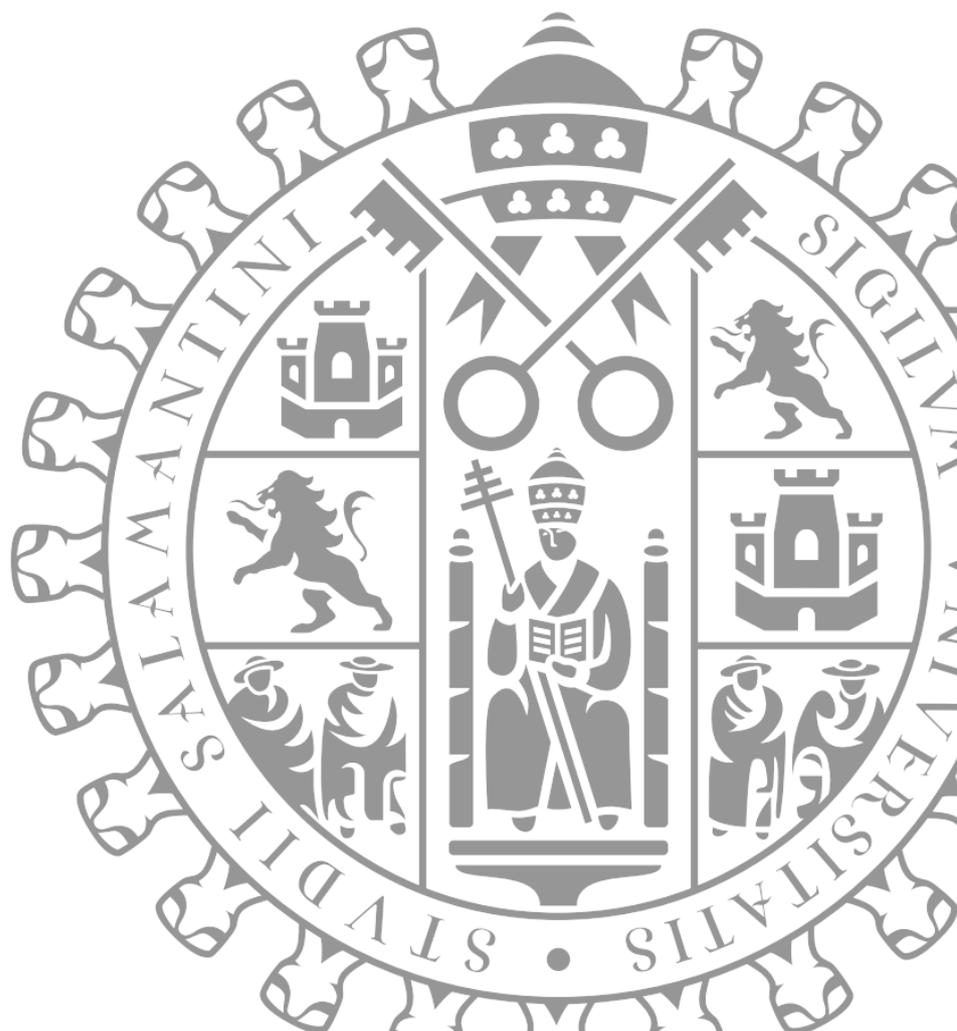
11. TÉCNICA FOTOGRÁFICA.-

Las radiografías digitales se capturaron en el Hospital Universitario de Salamanca con un equipo SIEMENS FD-X.

Se realizaron fotografías de las preparaciones histológicas teñidas mediante una lupa Zeiss Stemi 2000-C con una fuente de luz Zeiss KL1500 electronic acoplada a una cámara Nikon digital camera DXm 1200, para poder obtener una imagen completa del corte histológico.

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se captaron utilizando una máquina fotográfica Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon eclipse 90i, y digitalizadas directamente por un programa capturador de imágenes MetaMorph Meta Imaging Series 6.1.

RESULTADOS



V.~ RESVITADOS:

Los biomateriales granulados basados en monetita estudiados en este trabajo se han organizado en diferentes grupos atendiendo a su composición. La clasificación de los materiales es la siguiente:

- **Control 1:** Defectos óseos de tamaño crítico sin ningún tipo de material, se dejan vacíos.
- **Control 2:** Defectos rellenos de Bio-Oss® (hidroxiapatita de origen bovino).
- **Control 3:** Defectos rellenos de Cerasorb® (β -TCP sintético).
- **Grupo I:** Formado por gránulos de monetita, que pueden presentar o no sustitución iónica, y como fuente de silicio presentan ps-wollastonita y/o gel de sílice. Alguno de ellos está formado además por otro tipo de fosfato de calcio, como es el β -TCP. 6 materiales: *A, B, C, D, E* y *F*.
- **Grupo II:** Formado por gránulos de monetita, con o sin sustitución iónica, combinados con otro tipo de fosfato de calcio, o bien CDHA o β -TCP. Pero todos presentan en común vidrio en pequeñas cantidades y gel de sílice, que puede estar tanto en grandes como en pequeñas cantidades. 5 materiales: *G, H, I, J* y *K*.
- **Grupo III:** Formado por gránulos de monetita, con o sin sustitución iónica, y gel de sílice, como única fuente de iones de silicio. Cuatro de los materiales presentan además CDHA añadida. cinco materiales: *L, M, N, Ñ* y *O*.
- **Grupo IV:** Formado por dos materiales cuya reacción de síntesis es diferente a la del resto de materiales, tal y como se ha explicado en el apartado de material y métodos. Se trata de los materiales *P* y *Q* los cuales en su composición muestran un porcentaje muy bajo de monetita (sustituida por zinc en el material *Q*), una gran cantidad de CDHA y como fuente de silicio, un alto contenido de gel de sílice y ps-wollastonita.

La exposición de los resultados correspondientes a los distintos grupos experimentales se realizará por separado contemplando las posibles variaciones que se puedan encontrar dentro de cada grupo, de forma que en primer lugar se describirán aquellos casos cuyo comportamiento sea la norma y a continuación aquellos casos cuyo comportamiento constituye una desviación del proceso general. Al final de la exposición de los resultados de cada grupo se adjuntan unas tablas resumen de cada material perteneciente a cada grupo y otra tabla de la valoración histológica de cada grupo, exponiendo los parámetros valorables más relevantes en relación a la respuesta tisular desarrollada y regeneración ósea. El estudio de los diferentes grupos se realizará siguiendo como guía los criterios detallados a continuación:

1. **Valoración de imágenes TAC:** se muestran las imágenes correspondientes a la parte central de la pieza ósea donde se ha realizado la implantación, analizando los distintos tiempos de experimentación.
2. **Valoración radiológica:** aparecen las radiografías realizadas una vez finalizado el tiempo de experimentación, es decir 16 semanas; los animales han sido sacrificados y las piezas óseas han sido cortadas en rodajas para facilitar la localización de los defectos.

3. **Imágenes de lupa:** correspondientes a las secciones histológicas una vez teñidas con las técnicas de Tricrómico de Goldner y/o Von Kossa.
4. **Valoración histológica:** atendiendo a los parámetros de evaluación de la respuesta biológica del tejido óseo frente a los diferentes materiales.

CONTROL 1:

Corresponde al grupo de defectos óseos (n=7) de tamaño crítico a los que no se les ha colocado ningún tipo de material de relleno, de modo que se han dejado vacíos. De esta forma nos permite realizar el análisis de la evolución de las cavidades, en relación con la posible regeneración ósea espontánea que puedan sufrir, sin influencia de ningún tipo de material. La relación de los 7 casos y su correspondiente localización ósea es la siguiente: Caso 1: F.I., Caso 2: F.D., Caso 3: T.I., Caso 4: T.D., Caso 5: H.I., Caso 6: H.D. y Caso 7: H.D.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

A continuación se muestran las secuencias de imágenes de TAC de la parte central de la pieza ósea, más representativas de la evolución mostrada por los defectos vacíos.

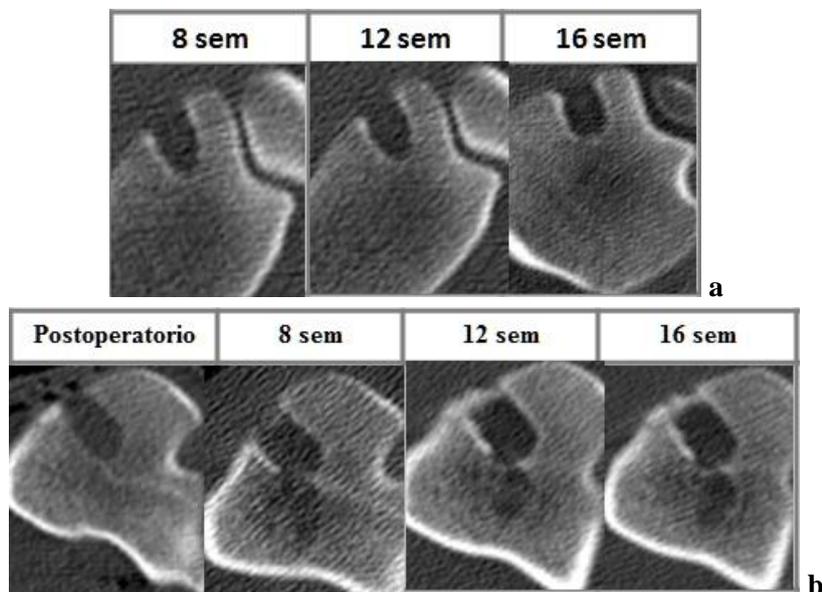


Fig.1. a) TACs caso 1. b) TACs caso 3.

La Fig.1 pone de manifiesto los dos posibles comportamientos encontrados en los defectos vacíos. La Fig.1a muestra en la secuencia de imágenes la ausencia de regeneración ósea, ya que los defectos se encuentran vacíos, no existen zonas radiodensas dentro de las cavidades, son radiolúcidas. Sin embargo, en 3 de los 7 casos (Casos 3, 5 y 7), se observan pequeñas modificaciones respecto a la tendencia general de encontrar los defectos vacíos. Tal y como aparece en la Fig.1b, la imagen de TAC del caso 3 presenta, en la zona externa del defecto que correspondería a la zona cortical, a las 8 semanas de estudio, una fina y leve línea radiodensa desde los laterales del defecto, que a las 12 y 16 semanas aumenta su intensidad, uniendo sus extremos y formando una especie de puente óseo que cierra la

cavidad. El resto del defecto es radiotransparente. Además, en el caso 6, aunque no se muestran los TAC, se aprecia también esta formación radiodensa que evoluciona a lo largo del experimento, pero con una localización diferente, ya que en este caso aparece hacia la mitad de la cavidad del defecto. En el caso 6 los extremos de las prolongaciones óseas formadas no se unen entre sí, por lo que no llegan a dividir totalmente el defecto en dos cavidades.

VALORACIÓN DE LAS IMÁGENES RADIOLÓGICAS Y DE LUPA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.-

Las imágenes radiológicas mostradas a continuación corresponden a las lonchas cortadas de las piezas óseas donde se han realizado los defectos de los casos 1 y 5 (Fig.2 y Fig.3), puesto que son los casos más representativos.

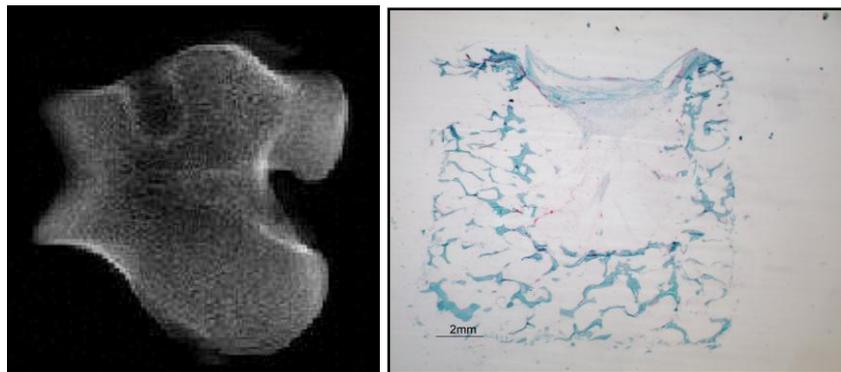


Fig.2. Imagen radiológica y foto de lupa correspondientes al caso 1.

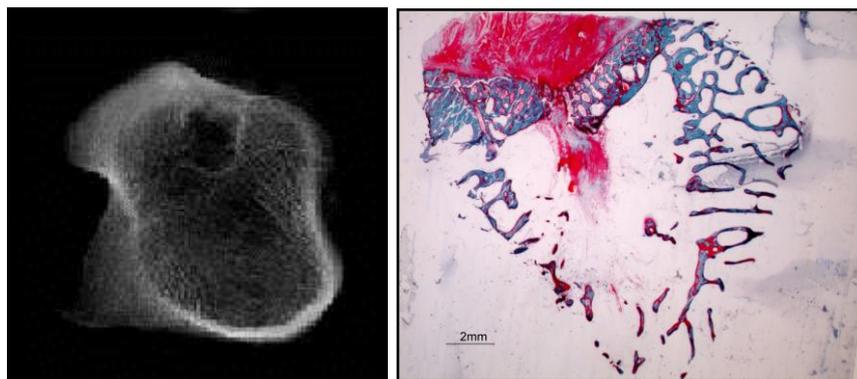


Fig.3. Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico del caso 5.

La radiografía del caso 1 (Fig.2) muestra la cavidad ósea completamente radiotransparente, tratándose de un defecto óseo no regenerado. Sin embargo, la radiografía del caso 5 (Fig.3), corrobora lo analizado mediante las imágenes de TAC, en donde se apreciaba una formación ósea con captación radiológica en la zona superficial del defecto, correspondiente a la zona cortical. Se observa la cavidad del defecto vacía, radiolúcida y en la zona externa una línea radiodensa heterogénea que cierra el defecto.

Por otro lado, mediante la observación de las fotografías de lupa de los cortes histológicos (Fig.2 y Fig.3) podemos hacer una valoración de la evolución de los controles

vacíos. Como era de esperar, los defectos al tener un tamaño crítico, no se han regenerado de forma espontánea.

Al igual que lo observado en los TACs y radiografías del caso 5, los casos 3 y 7 (aunque no se muestren las imágenes), presentan una formación ósea en la zona externa del defecto cerrándolo. En la Fig.3 el hueso formado en la zona cortical aparece con cierta coloración roja indicando que se trata de un hueso inmaduro, aún no mineralizado.

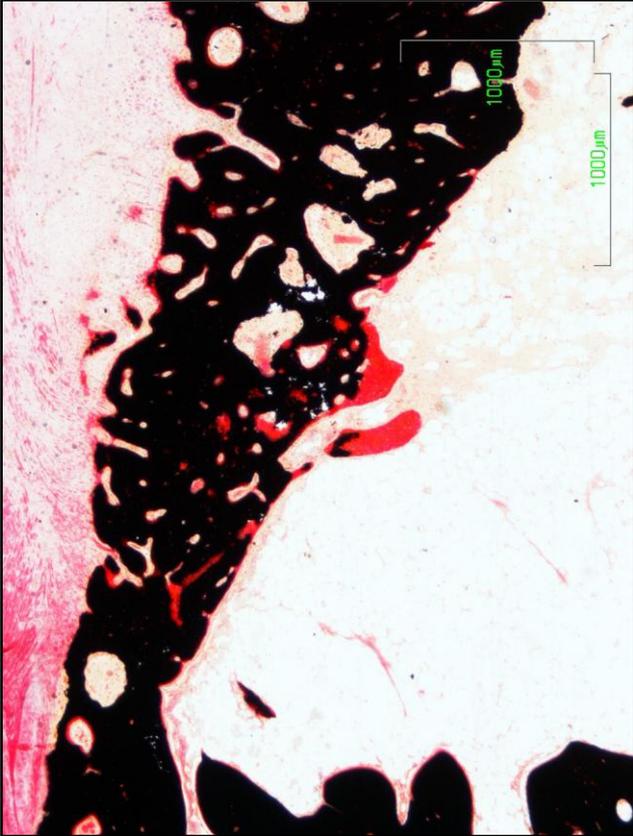


Fig.4 (2x)



Fig.5 (2x)

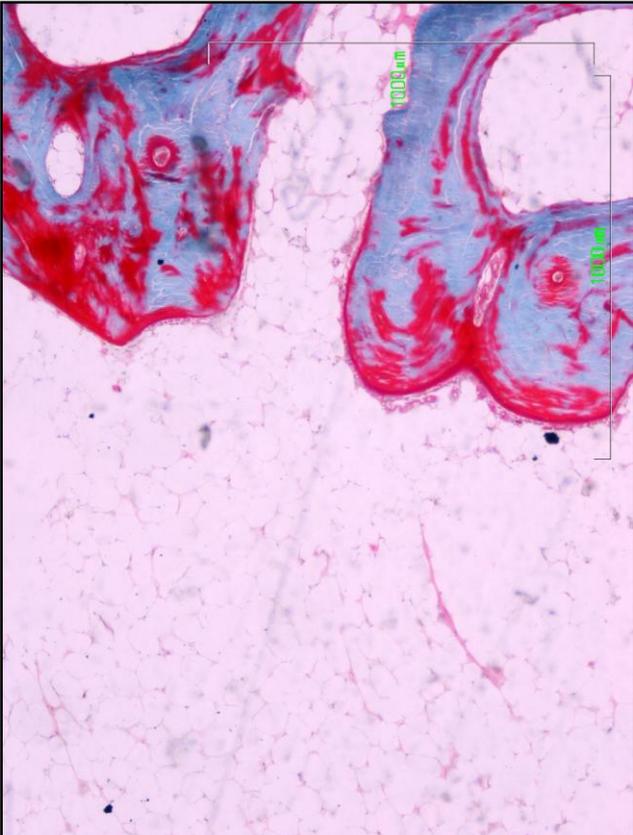


Fig.6 (4x)

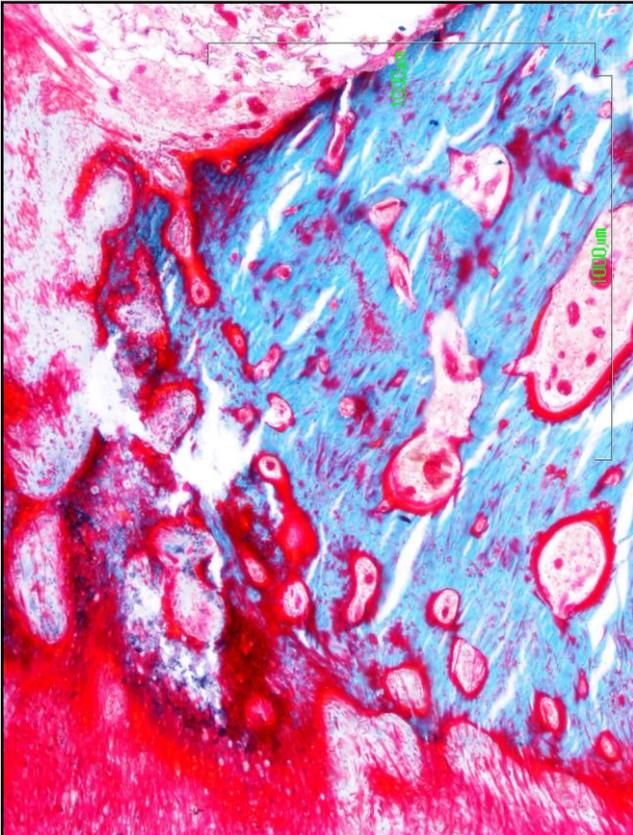


Fig.7 (4x)

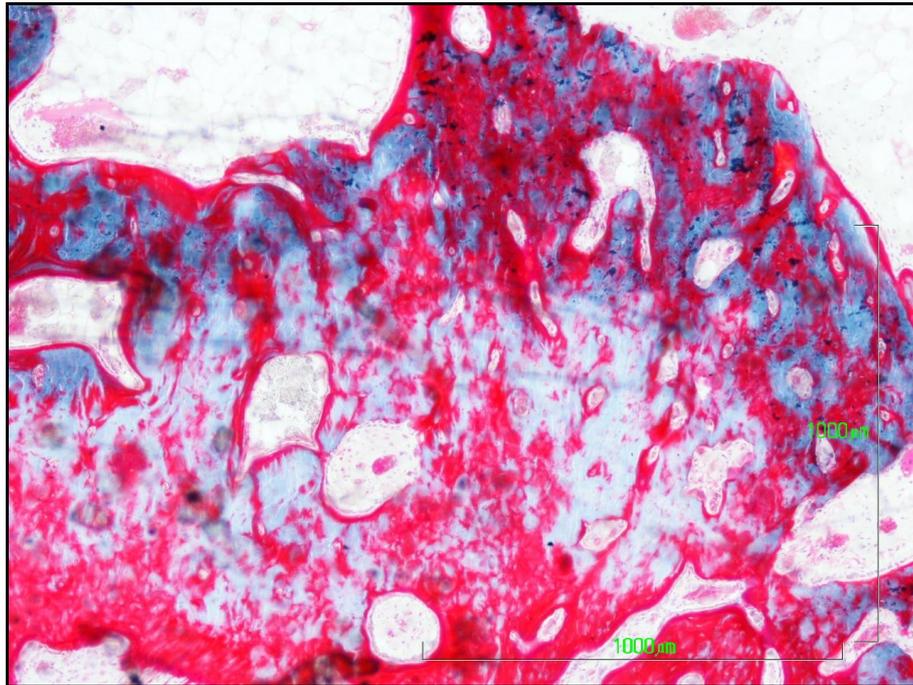


Fig.8 (4x)

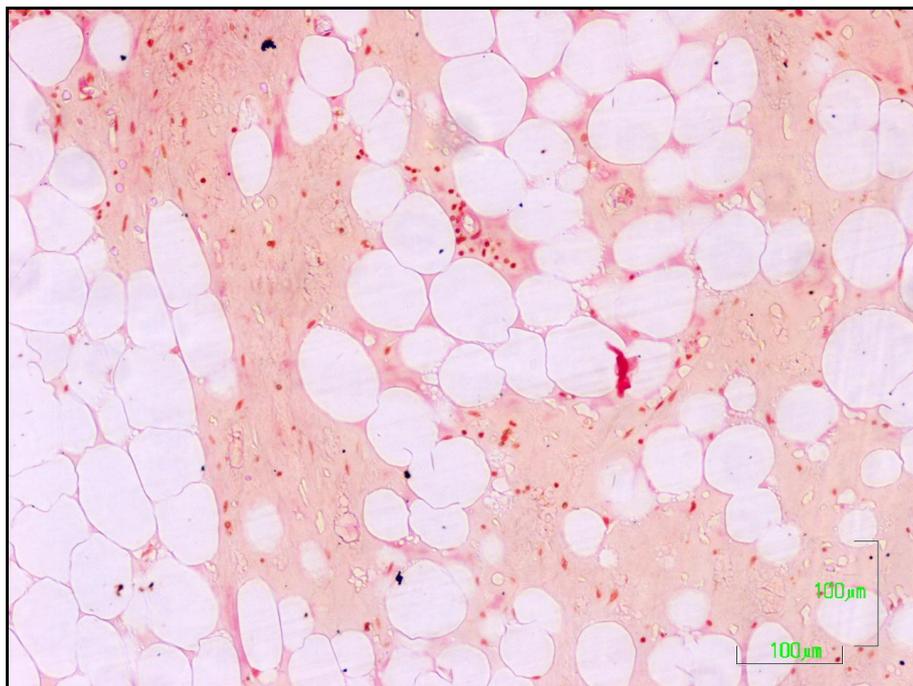


Fig.9 (10x)

Fig.4 (caso 3).- Panorámica donde se puede apreciar la formación de un puente óseo en la zona superficial de la cavidad del defecto. Se trata de un hueso neoformado, no compacto, desorganizado y con zonas aún no mineralizadas, que aparecen de color rojo al tratarse de una tinción con la técnica de Von Kossa. Por debajo de la formación ósea se aprecia la cavidad del defecto vacía, sin hueso, con desarrollo de tejido adiposo. (2x, VK).

Fig.5 (caso 3).- Panorámica del hueso que rodea los laterales de la cavidad del defecto. Se aprecia como la respuesta del hueso es mínima frente al defecto producido. Se observan trabéculas finas y quiescentes, típicas del hueso de la oveja, que adquieren algo más de grosor según se encuentren más próximas a la cavidad. (2x, VK)

Fig.6 (caso 3).- Detalle del hueso que rodea a la cavidad del defecto. En esta imagen se aprecia un hueso con una notable deficiencia en mineralización, pero muy poca actividad osteogénica, debido a que prácticamente no encontramos líneas de osteoide. Los espacios de la cavidad presentan tejido adiposo. (4x, TG).

Fig.7 (caso 5).- Detalle de la zona superficial regenerada. Se aprecia también en la zona más externa la formación de tejido conectivo en respuesta a la realización del defecto. El hueso formado es inmaduro, con abundantes zonas con deficiencia de mineralización, con gruesas líneas de osteoide y osteocitos inmaduros. (4x, TG).

Fig.8 (caso 3).- Otra imagen en detalle del hueso regenerado en la zona externa del defecto. Se trata de un hueso inmaduro, desorganizado, con grandes cavidades vasculares, osteocitos inmaduros y en donde la mayor parte de la matriz orgánica no se encuentra aún mineralizada. (4x, TG).

Fig.9 (caso 3).- Detalle del desarrollo de tejido adiposo que encontramos en todos los casos de control vacío ocupando la totalidad de la cavidad del defecto. En esta imagen se aprecia la asociación con tejido conectivo de tipo laxo. (10x, VK).

La respuesta tisular desarrollada en los defectos vacíos, de tamaño crítico y sin relleno de ningún tipo de material, es homogénea, no se ha regenerado. En todos los casos se aprecia la formación de tejido adiposo, que ocupa la totalidad de las cavidades óseas. Asimismo cabe apreciar la inexistencia de médula ósea hematopoyética en ninguno de los casos.

En relación al hueso adyacente, encontramos un hueso que prácticamente no ha reaccionado frente a la generación del defecto. Se aprecian trabéculas finas y quiescentes. Las zonas donde podemos encontrar trabéculas algo más gruesas con cierto grado de actividad osteogénica son escasas y las encontramos en el caso 3, como muestran las Figs. 5 y 6.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que en los casos 3, 5 y 7 se aprecia una formación ósea en la zona cortical de los defectos cerrándolos. Podemos afirmar que las dimensiones de los defectos realizados son las adecuadas y críticas ya que en ninguno de los casos se produce una regeneración espontánea.

Tabla resumen del CONTROL 1: Vacío.-

VACÍO	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Cavidad totalmente radiotransparente.	Cavidad totalmente radiotransparente.	Cavidad totalmente radiotransparente.	Defecto no regenerado ocupado por tejido adiposo.	Defecto no regenerado. Tejido adiposo en toda la cavidad.
Caso 2	F.D.	Cavidad totalmente radiotransparente.	Cavidad totalmente radiotransparente.	Cavidad totalmente radiotransparente.	Defecto no regenerado ocupado por tejido adiposo.	Defecto no regenerado. Tejido adiposo en toda la cavidad.
Caso 3	T.I.	En la zona cortical se distingue una fina y leve línea radiodensa desde los laterales del defecto, que llegan a unirse. Resto de la cavidad radiolúcida.	Aparece una línea radiodensa en la zona cortical que cierra por completo la cavidad. Resto de la cavidad radiotransparente.	Aparece una línea radiodensa en la zona cortical que cierra por completo la cavidad. Resto de la cavidad radiotransparente.	Regeneración de hueso en la zona cortical, cerrando la cavidad, que está vacía rellena de tejido adiposo. Hueso regenerado muy inmaduro y deficiente en mineralización.	Defecto no regenerado aunque la cortical se ha cerrado por la formación de hueso neoformado e inmaduro. Tejido adiposo ocupando toda la cavidad.
Caso 4	T.D.	Cavidad totalmente radiotransparente. Alcanza canal medular.	Radiotransparente. Alcanza canal medular.	Cavidad totalmente radiotransparente.	Defecto no regenerado, formación de tejido adiposo.	Defecto no regenerado. Tejido adiposo ocupando toda la cavidad.
Caso 5	H.I.	En la zona externa se distingue una fina y leve línea radiodensa desde los laterales del defecto, que no llegan a unirse. Resto de la cavidad radiolúcida.	Aparece una línea radiodensa en la zona superficial que cierra por completo la cavidad. Resto de la cavidad radiotransparente.	Aparece una línea radiodensa en la zona cortical que cierra por completo la cavidad. Resto radiotransparente.	Regeneración de hueso en la zona cortical, cerrando la cavidad, que está ocupada por tejido adiposo. Hueso regenerado muy inmaduro y deficiente en mineralización.	Defecto no regenerado aunque la cortical se ha cerrado, formada por hueso neoformado e inmaduro. Tejido adiposo ocupando toda la cavidad.
Caso 6	H.D.	En la zona media del defecto se distingue una fina y leve línea radiodensa desde los laterales del defecto, que no llegan a unirse. Resto de la cavidad radiolúcida.	En la zona media del defecto se distinguen unos pequeños salientes levemente radiodensos, que no llegan a unirse. Resto de la cavidad radiolúcida.	En la zona media del defecto se distinguen unos pequeños salientes levemente radiodensos, que no llegan a unirse. Resto de la cavidad radiolúcida.	Defecto no regenerado formación de tejido adiposo.	Defecto no regenerado. Tejido adiposo en la cavidad ósea.
Caso 7	H.D.	En la zona superficial se distingue una fina y leve línea radiodensa desde los laterales del defecto, que no llegan a unirse. Resto de la cavidad radiolúcida.	Aparece una línea radiodensa en la zona cortical que cierra por completo la cavidad, el resto es radiotransparente.	Aparece una línea radiodensa en la zona cortical que cierra por completo la cavidad. Resto de la cavidad radiotransparente.	Regeneración de hueso en la zona cortical, cerrando la cavidad, que está ocupada por tejido adiposo. Hueso cortical regenerado muy inmaduro y deficiente en mineralización.	Defecto no regenerado aunque la cortical se ha cerrado por la formación de hueso neoformado e inmaduro. Tejido adiposo ocupando toda la cavidad.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA CONTROL 1 Vacío

Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
*	-	-	-	*	-
En zona superficial, cerrando la cavidad. Casos: 3, 5 y 7.					
Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración
*	*	*****	-	-	-
Escasa. Casos: 3, 5 y 7.	Inmaduros. Casos: 3, 5 y 7.	En todos los casos.			
Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Granulomas
-	-	-	-	-	-

Legenda: -: Nulo o inexistente/ *: mínimo o leve/ **: moderado/ ***: frecuente/ ****: abundante/ *****: intenso.

CONTROL 2: BioOss®

Se han considerado gránulos de BioOss® (HA bovina) como uno de los grupos control en la evaluación de los materiales estudiados en este trabajo.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

A partir de técnicas de diagnóstico mediante imágenes de TAC podemos realizar el estudio obteniendo una secuencia temporal de la regeneración ósea. Se evalúa la evolución del relleno de los defectos óseos (n=11) con gránulos de BioOss®. A continuación se muestra, como ejemplo representativo de los casos que han presentado una respuesta favorable (n=7), los TACs del caso 1 realizados a lo largo del periodo de experimentación (Fig.10). La relación de los 11 casos y su correspondiente localización ósea es la siguiente: Caso 1: F.I., Caso 2: F.D., Caso 3: F.D., Caso 4: F.D., Caso 5: T.I., Caso 6: T.I., Caso 7: T.D., Caso 8: T.D., Caso 9: T.D., Caso 10: H.D. y Caso 11: H.D.

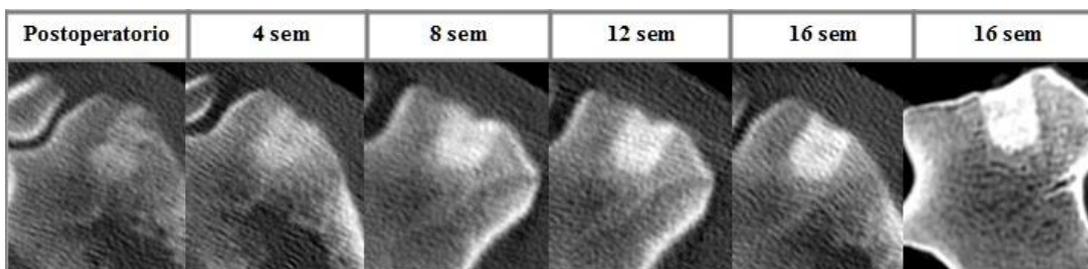


Fig.10.- Secuencia de TACs realizados del caso 1 en el momento después de la implantación de los gránulos del BioOss® y a intervalos de 4 semanas, hasta las 16 semanas de estudio, antes y después del sacrificio.

Las fotografías de TAC que se muestran corresponden a la parte central de la pieza ósea. En todas las imágenes se percibe la gran capacidad de captación radiológica del material BioOss®, ya que aparece como una estructura más radiodensa que las trabéculas óseas adyacentes y ocupa toda la cavidad del defecto, adquiriendo una mayor radiodensidad a lo largo del tiempo de experimentación (Fig.10). Dado que se ha encontrado que la manifestación radiológica, tanto en los cuatro casos de implantación en fémures (casos 1, 2, 3 y 4) como en los dos casos de tibias derechas (casos 7 y 8), se ha considerado como ejemplo representativo el caso 1 y por ello se muestran sus imágenes de TAC; donde cabe destacar que la zona radiodensa correspondiente al BioOss® dentro del defecto, se presenta inalterada a lo largo del periodo de experimentación.

Al contrario que los casos de implantación producidos en los fémures, donde se apreciaba un comportamiento homogéneo entre las diferentes muestras, en el caso de la implantación del BioOss® en las tibias, encontramos un comportamiento heterogéneo. Aquellos casos en los que se han producido reacciones adversas, casos 5 y 6, se detallarán en un apartado al final de la evaluación histológica.

VALORACIÓN RADIOLÓGICA E IMAGEN DE LUPA.-

El análisis radiológico de las piezas óseas con los implantes, una vez sacrificadas las ovejas y cortadas en láminas, nos permite corroborar lo observado hasta ahora con las imágenes de TAC. En los casos 1, 2, 3 y 4, correspondientes a los fémures, en todos los defectos se denota una zona altamente radiodensa y homogénea, continua con los laterales del defecto; estableciéndose un área más o menos definida, de mayor densidad que el hueso normal adyacente, característica del BioOss®. Se muestran la radiografía del caso 4 (Fig.11).

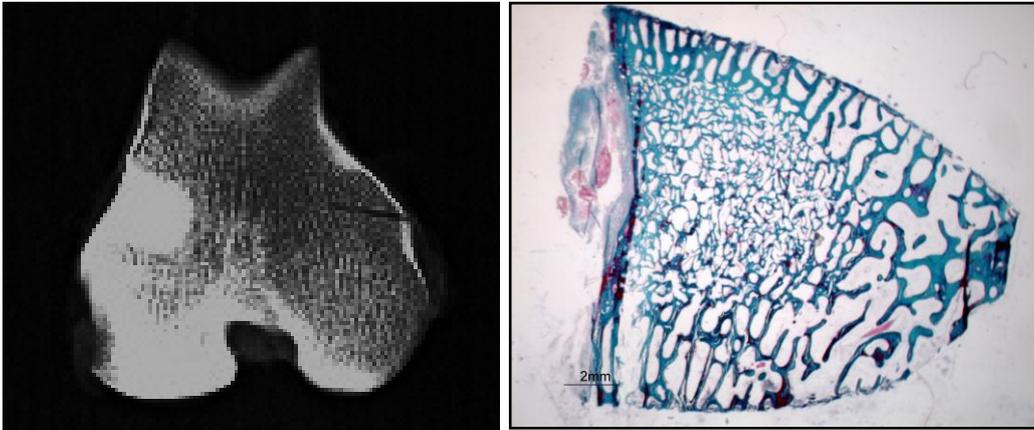


Fig.11. Imagen radiológica y foto de lupa correspondiente al Caso 4.

De la misma forma en que encontramos una correlación entre las imágenes de TAC y las radiológicas en los casos de implantación realizados en fémures, en las tibias aparece la misma correlación. Una de las tibias, concretamente el caso 8, muestra una respuesta similar a otras localizaciones, como los fémures, donde el defecto está relleno por un material que tiene gran afinidad radiológica. No obstante cuando el defecto quirúrgico se extiende hasta la cavidad medular, normalmente se presentan restos de material en el interior del mismo.

A partir de las fotografías de lupa de las secciones histológicas de cada muestra, podemos realizar una valoración general de cuál ha sido la respuesta tisular frente al material BioOss® implantado. En el caso de los fémures (casos del 1 al 4), podemos afirmar que el defecto se encuentra regenerado, mostrando un entramado trabecular que ocupa toda la cavidad y que se encuentra en continuidad con el hueso adyacente. Además la zona externa, correspondiente a la cortical ósea, también se ha regenerado, sin desarrollar la formación de tejido conectivo (Fig.11).

En el caso de las tibias, encontramos respuestas muy dispares, algunas de las cuales se detallarán más adelante, en el apartado de comportamientos adversos. En los casos 7 y 8 el defecto se ha regenerado, del mismo modo que en los fémures. El caso 8 llama la atención, ya que la cavidad del defecto entra en contacto con el canal medular y se aprecia cómo se ha formado hueso incluso dentro de la médula. Cabe destacar que este hueso neoformado presenta trabéculas muy delgadas, irregulares y de arquitectura poligonal.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.-

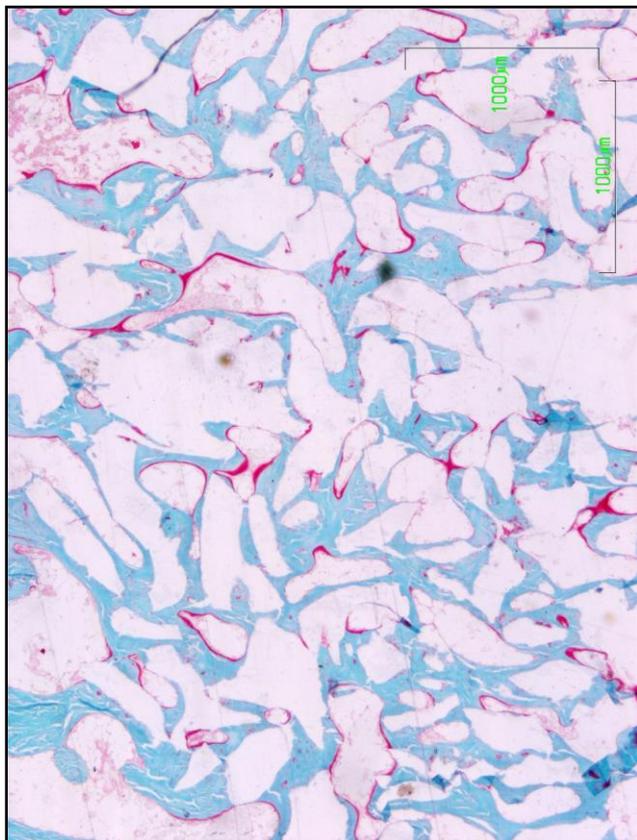


Fig.12 (2x)

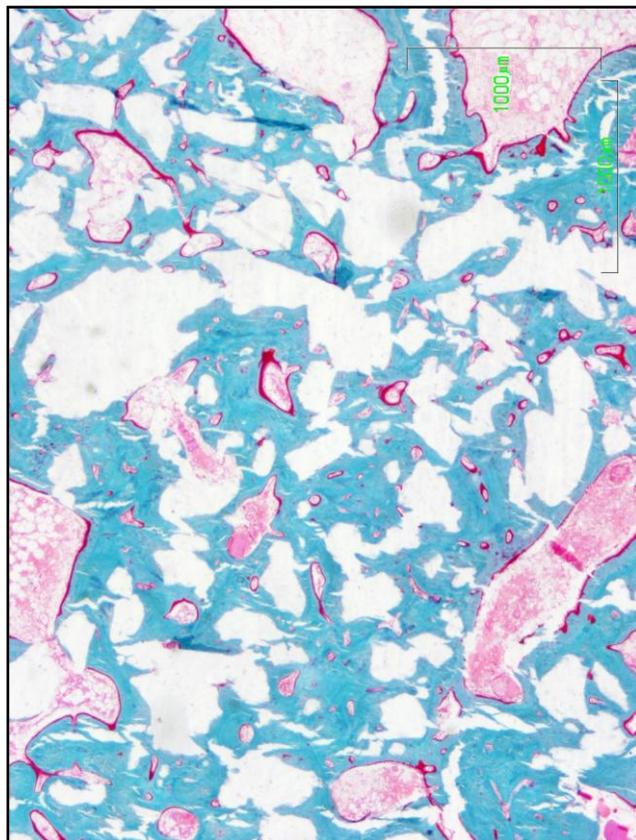


Fig.13 (2x)

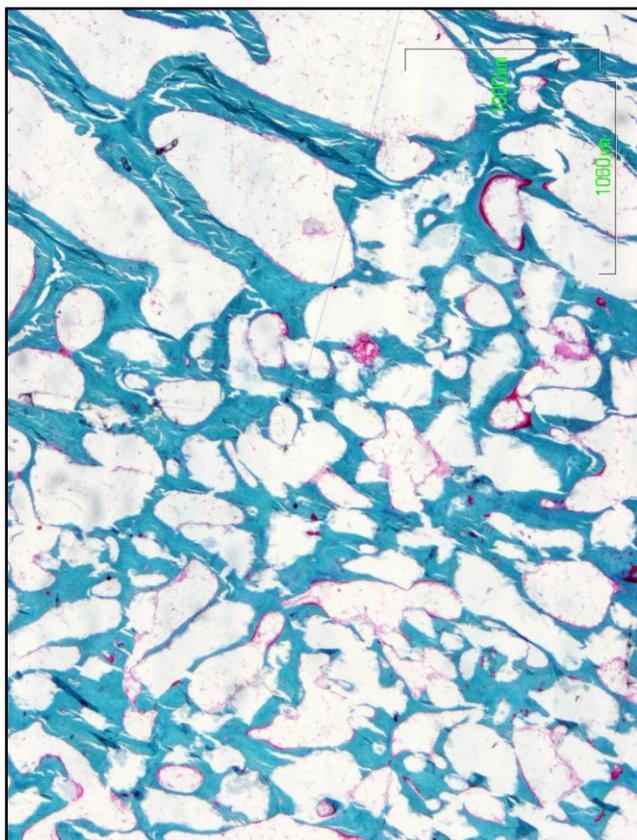


Fig.14 (2x)

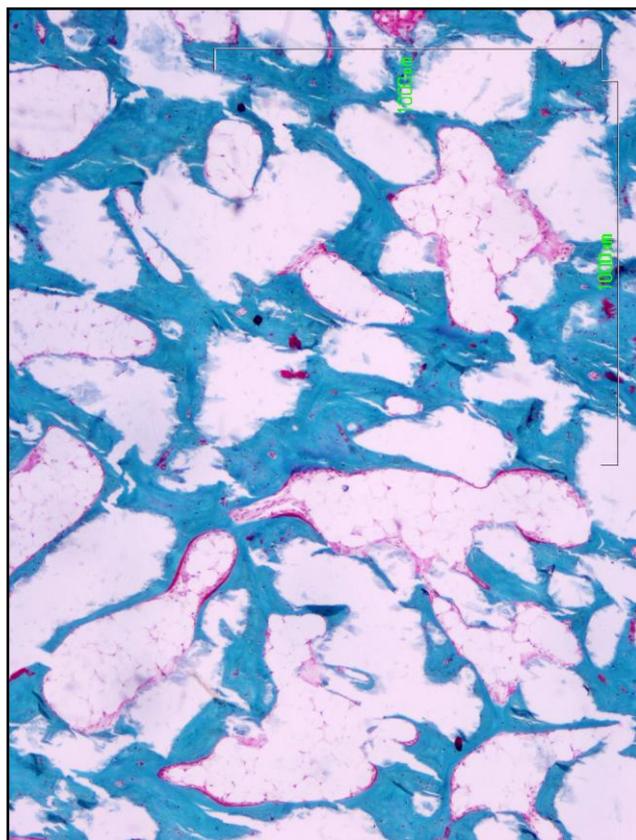


Fig.15 (4x)

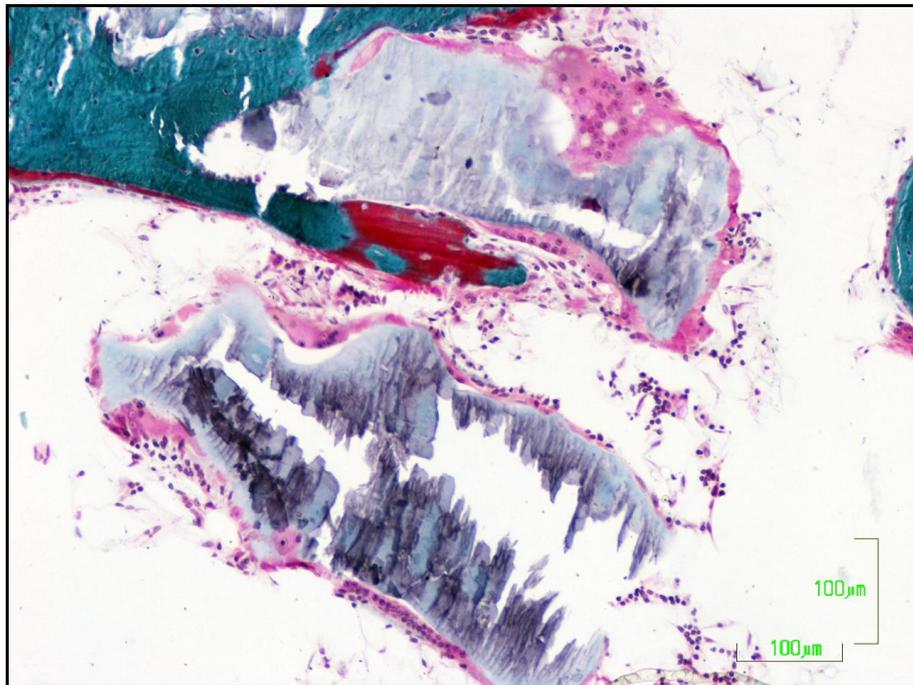


Fig.16 (10x)

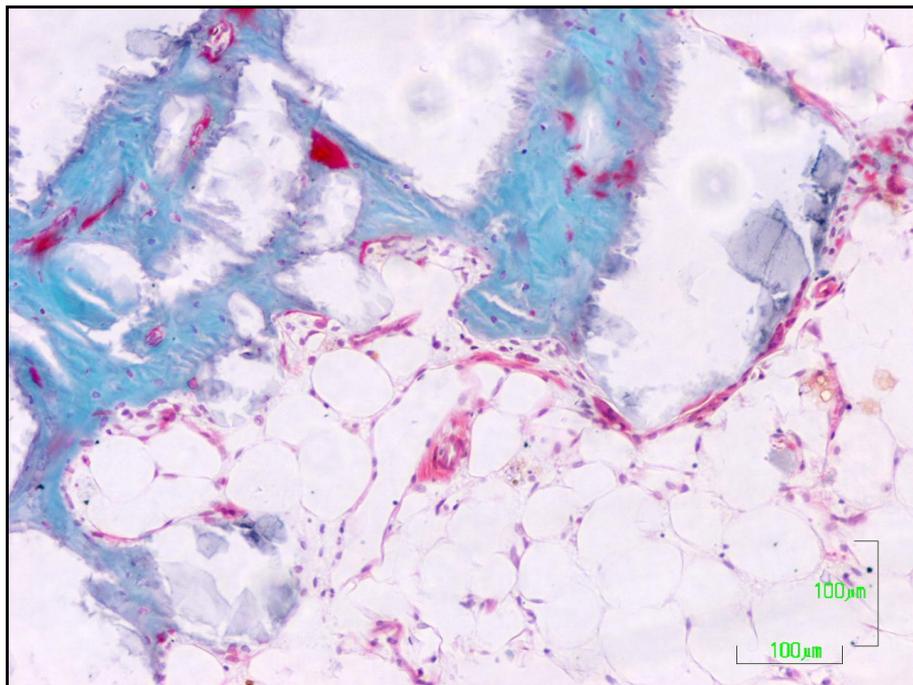


Fig.17 (10x)

Fig.12 (caso 3).- Panorámica de la cavidad del defecto rellena por hueso neoformado. Se muestra un hueso trabecular desorganizado, con trabéculas anastomosadas y aciculares. Presentan estructuras poligonales debido a los fragmentos de BioOss® integrados en las trabéculas óseas. Se observan algunas superficies trabeculares con líneas de osteoide. (2x, TG).

Fig.13 (caso 10).- Imagen de la zona externa del defecto, donde se pone de manifiesto la formación de hueso cortical. Se trata de un hueso inmaduro, con grandes y numerosas cavidades vasculares. Se muestran espacios en blanco dentro del hueso correspondiente a zonas de integración del BioOss®. Se aprecian zonas con osteoide y en los espacios intertrabeculares encontramos médula adiposa. (2x, TG).

Fig.14 (caso 4).- Panorámica de uno de los laterales del defecto donde se aprecia claramente la transición entre las trabéculas neoformadas, que se muestran desorganizadas y finas, y las trabéculas normales, típicas de la oveja, que presentan una organización paralela entre sí y con grosor mayor. En las cavidades óseas está presente la médula adiposa. (2x, TG).

Fig.15 (caso 4).- Imagen de hueso trabecular regenerado donde se reconoce la capacidad de osteointegración del material BioOss® en las trabéculas neoformadas. Los espacios en blanco de las trabéculas corresponden a las zonas de integración del material y presentan formas angulares rodeadas de hueso regenerado. Las cavidades trabeculares presentan médula adiposa. (4x, TG).

Fig.16 (caso 1).- Detalle de una trabécula ósea neoformada donde se pone de manifiesto la integración del material BioOss® en el hueso. La superficie del material que no está rodeada por hueso, sino que se encuentra expuesta hacia el espacio medular, se encuentra rodeada por células gigantes multinucleadas. Del mismo modo, la partícula de BioOss® que aparece en el espacio medular, dentro del tejido adiposo, se encuentra rodeada por células multinucleadas. Hay zonas en el hueso no mineralizadas, zonas de color rojo, y líneas de osteoide. (10x, TG).

Fig.17 (caso 1).- Osteointegración del material BioOss® en las trabéculas óseas regeneradas. La cavidad medular es de tipo adiposo y encontramos vasos con delgadas paredes y luces dilatadas. (10x, TG).

En el caso del BioOss®, la estructura del hueso regenerado que apreciamos mediante la observación de las secciones histológicas presenta un aspecto singular. Tal y cómo se puede apreciar en las imágenes panorámicas tomadas con microscopía óptica (Fig.12-15), el hueso trabecular regenerado muestra una gran osteointegración con los restos de material. Las trabéculas neoformadas no son gruesas, sino que son muy delgadas, de aspecto acicular, de geometrías muy irregulares y poligonales. Se aprecian grandes huecos en blanco, dentro de las trabéculas óseas, debido a que por el proceso de manipulación y corte de las muestras, se han levantado los restos de BioOss® integrados en el hueso. Las líneas de osteoide están presentes aunque no son muy abundantes. La Fig.13 representa la regeneración de la parte cortical del hueso, ya que el entramado óseo presenta una estructura más compacta y gruesa que la del hueso trabecular. La Fig.14 evidencia la transición entre el hueso trabecular regenerado y el hueso trabecular normal de la oveja, característico al presentar las trabéculas con una disposición paralela y ser más gruesas.

Las Fig.16 y Fig.17 son representativas de la notable osteointegración que muestra el BioOss® en asociación con el hueso trabecular regenerado. En los espacios intertrabeculares encontramos médula adiposa.

La cavidad medular presenta una vascularización abundante en todos los casos de este grupo.

CASOS ADVERSOS DE BioOss®.-

Todo lo comentado anteriormente se refiere a la respuesta tisular que provoca el material BioOss® en los distintos defectos óseos, con diferente localización. Sin embargo, en 4 de los casos, concretamente los casos 5 y 6 (ambos de tibia) y 9 y 10 (ambos de húmero), se manifiestan unas reacciones adversas y opuestas a la tendencia general, que se describirán en este apartado.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

A continuación se muestran secuencias de imágenes de TACs (Fig.18 y Fig.19) realizadas durante el periodo de experimentación, correspondiente al caso 6 (tibia izquierda) (Fig.18) y caso 10 (húmero derecho) (Fig.19) como ejemplo representativo de las respuestas adversas (n=4) encontradas en los casos con material BioOss® implantado.

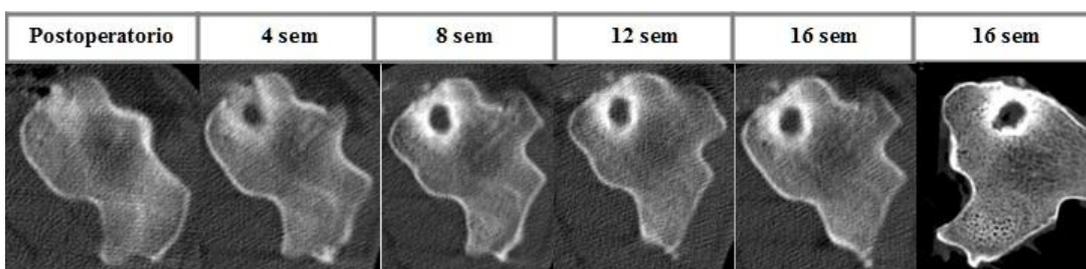


Fig.18. Imágenes de TAC del caso 6 durante el tiempo de ensayo.

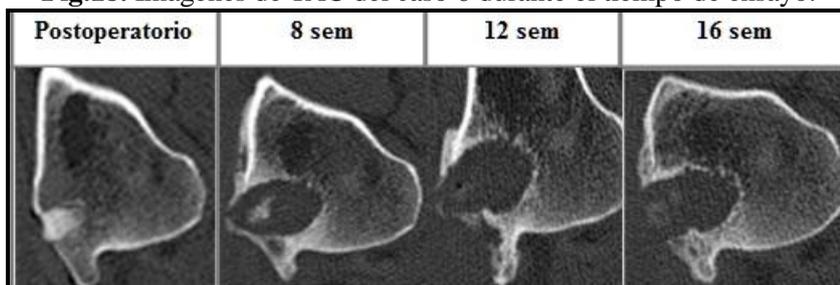


Fig.19. Imágenes de TAC del caso 10 durante el tiempo de ensayo.

Encontramos un comportamiento heterogéneo en los defectos realizados en las tibias izquierdas (casos 5 y 6). De modo que en el caso 5 el defecto se encuentra totalmente radiotransparente, es decir vacío, donde no se advierten restos de material y el caso 6, tal y como se muestra en las imágenes de TACs (Fig.18), aunque sí que se reconocen restos de material, debido a su fuerte radiodensidad, en el centro de la cavidad del defecto se distingue un hueco radiolúcido, vacío, ya a las 4 semanas de implantación.

En relación a los casos 9 y 10 correspondientes a los húmeros, podemos exponer que se tratan de dos casos excepcionales; en los que, seguramente debido a alguna complicación quirúrgica, ambos casos han desarrollado una pérdida de masa ósea. Se ha desarrollado una respuesta tisular que ha provocado que los defectos aumenten sus dimensiones y no se hayan regenerado. En estos casos, las imágenes de TAC exponen unos defectos radiotransparentes (Fig.19).

VALORACIÓN RADIOLÓGICA Y FOTOS DE LUPA.-

El análisis radiológico de los casos que presentan alguna incidencia corrobora lo observado en las imágenes de TAC. El caso 6, donde por TAC distinguíamos la cavidad rellena por BioOss® salvo en la parte central que estaba vacía; en la imagen radiológica efectivamente aparece un agujero vacío, radiotransparente, rodeado por un entramado trabecular más radiodenso que el hueso adyacente (imagen radiológica no mostrada).

En relación a las muestras de los materiales implantados en los húmeros, reconocemos una respuesta tisular no favorable. De forma que se distinguen defectos de gran tamaño. Uno de ellos vacío, pues se aprecia una zona grande radiotransparente (Fig.20) y el otro (caso 9) presenta un proceso de encapsulación del BioOss®, ya que se observa en el centro del defecto restos de material con cierto grado de radiodensidad dentro de una cavidad radiolúcida, vacía y rodeado por la parte más externa, por una red irregular y desestructurada altamente radiodensa.

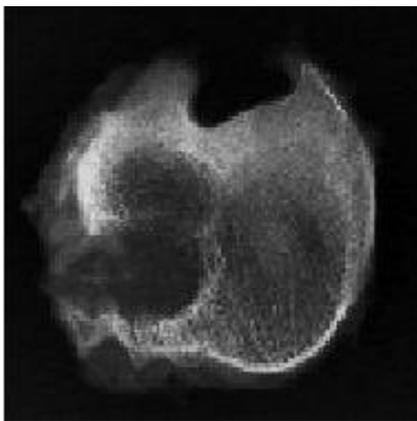


Fig.21. Imagen radiológica del Caso 10.

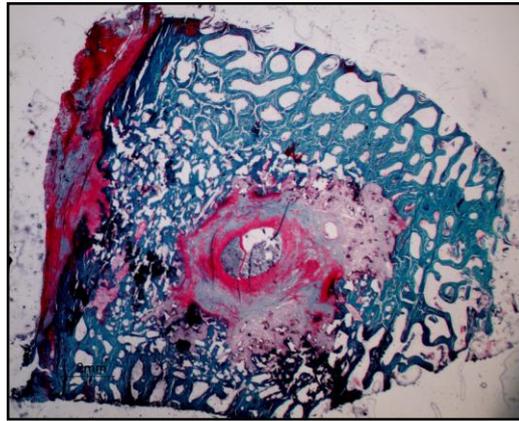


Fig.20. Fotografía de lupa del corte histológico correspondiente al Caso 6.

Por otro lado, mediante la evaluación de las fotos de lupa de los cortes histológicos de los casos adversos encontrados en BioOss®, se confirma que se han producido complicaciones. Respecto al caso 6, con las técnicas anteriores contemplábamos un hueco vacío en el centro del defecto. En la imagen de lupa (Fig.21) efectivamente encontramos, en el centro de la preparación, restos de material delimitado por tejido conectivo denso. El encapsulado está rodeado por hueso trabecular regenerado, incluso llega a cerrar la parte cortical de la pieza ósea. En el caso 5 el defecto ni se ha regenerado ni muestra restos de material. Encontramos un hueco de gran tamaño, con apenas hueso adyacente y con formación de tejido conectivo denso, donde se reconocen fibras de colágeno, relleno todo el defecto.

Por último, las imágenes de lupa de los dos húmeros ponen de manifiesto las reacciones adversas que se han producido. En el caso 9, parte del defecto presenta hueso regenerado con la apariencia característica que provoca el material BioOss® pero también observamos zonas sin regeneración ósea, vacías, que están rellenas por tejido conectivo. Y en el caso 10, el defecto presenta grandes dimensiones, sin apenas hueso adyacente y relleno por tejido conectivo denso.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.-

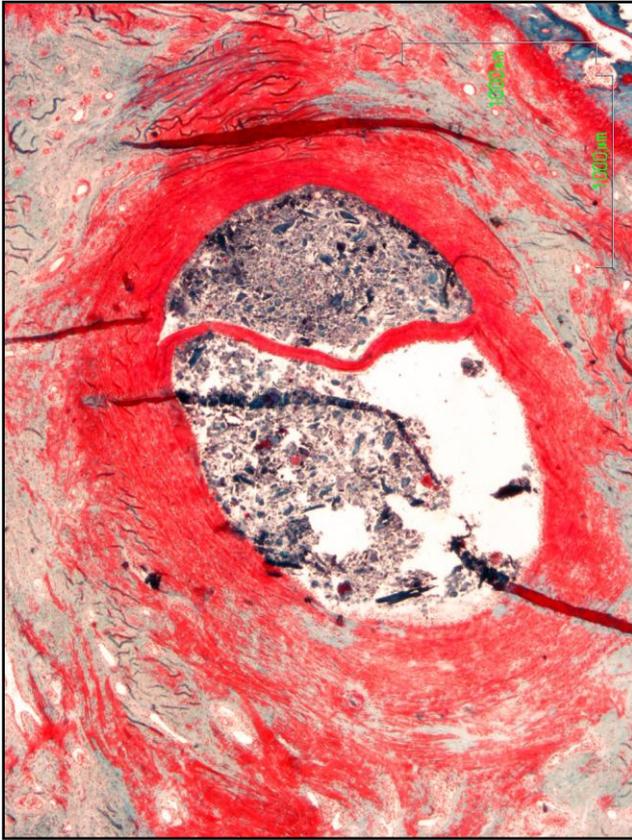


Fig.22 (2x)

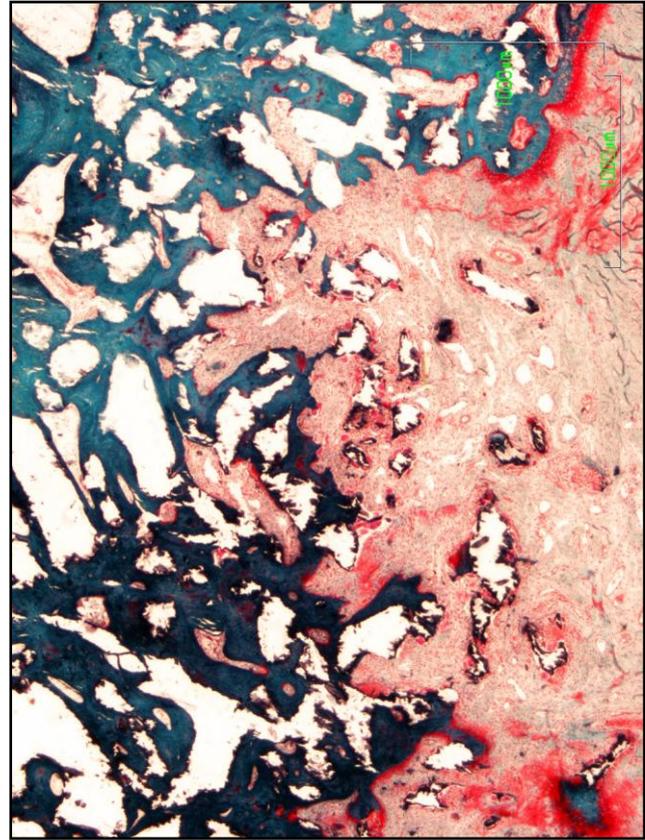


Fig.23 (2x)

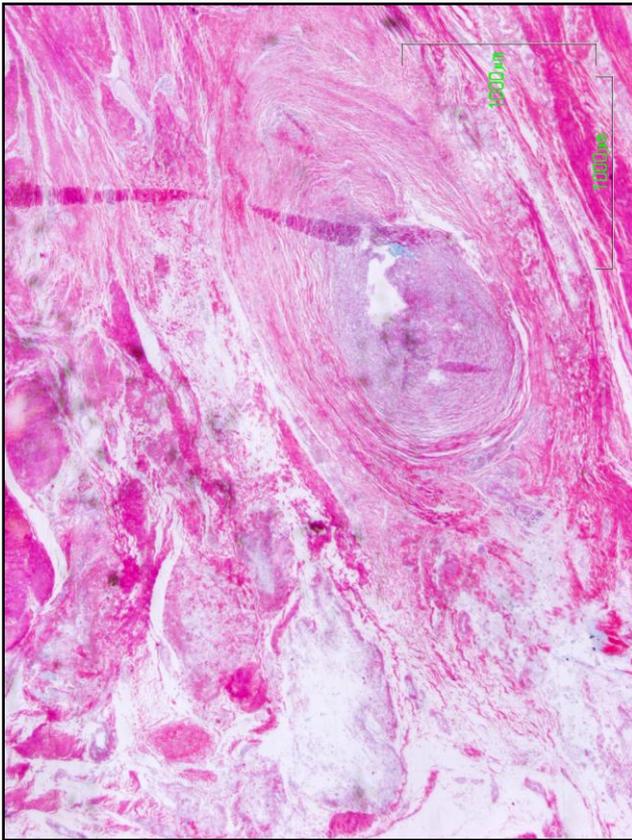


Fig.24 (2x)

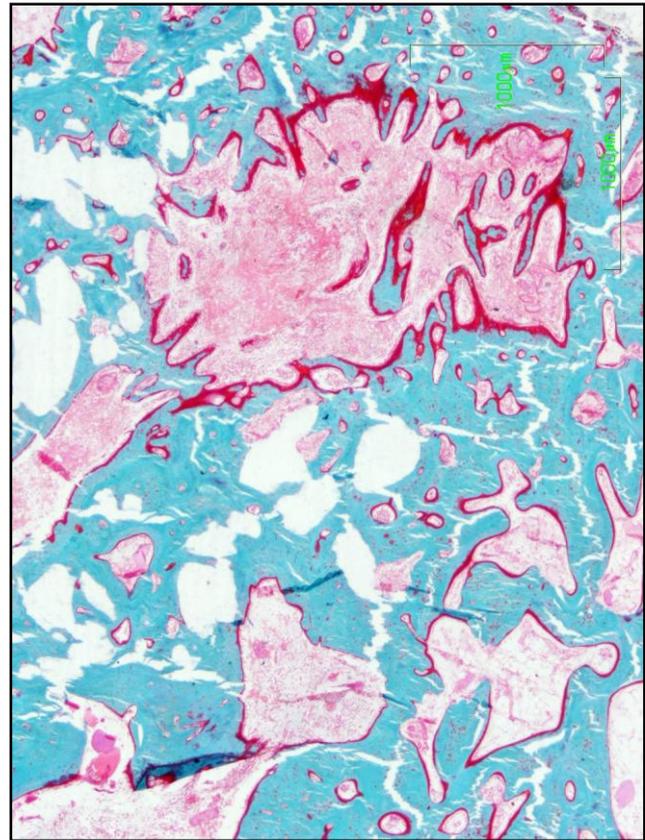


Fig.25 (4x)

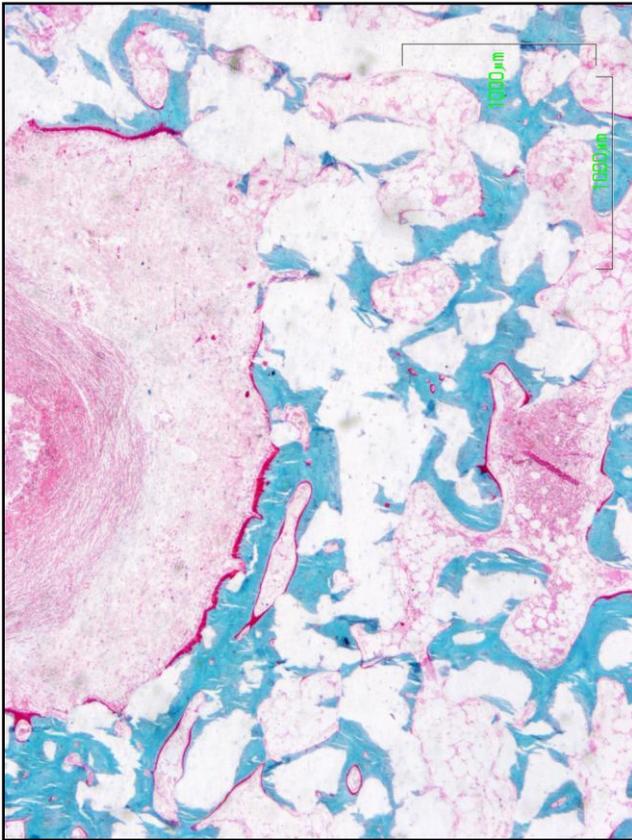


Fig.26 (2x)

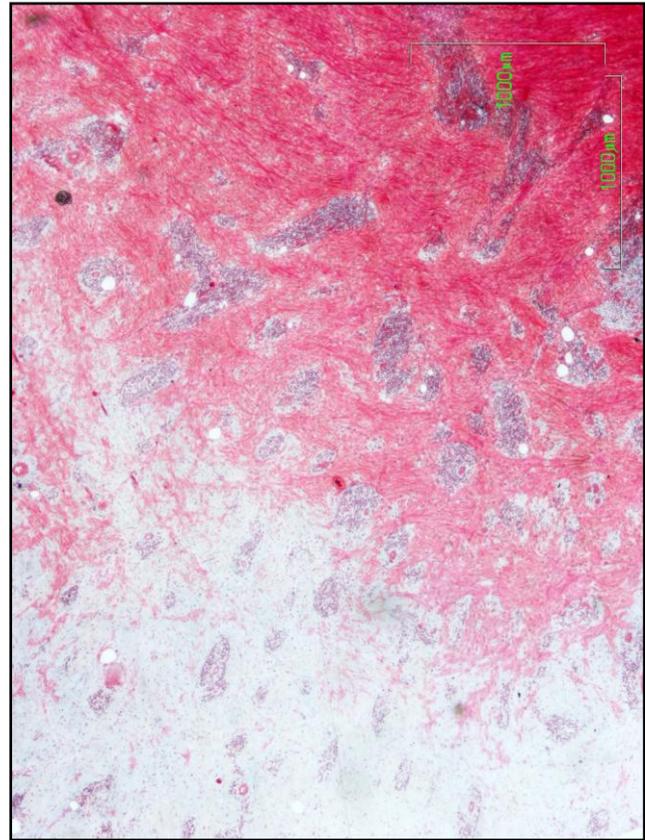


Fig.27 (2x)

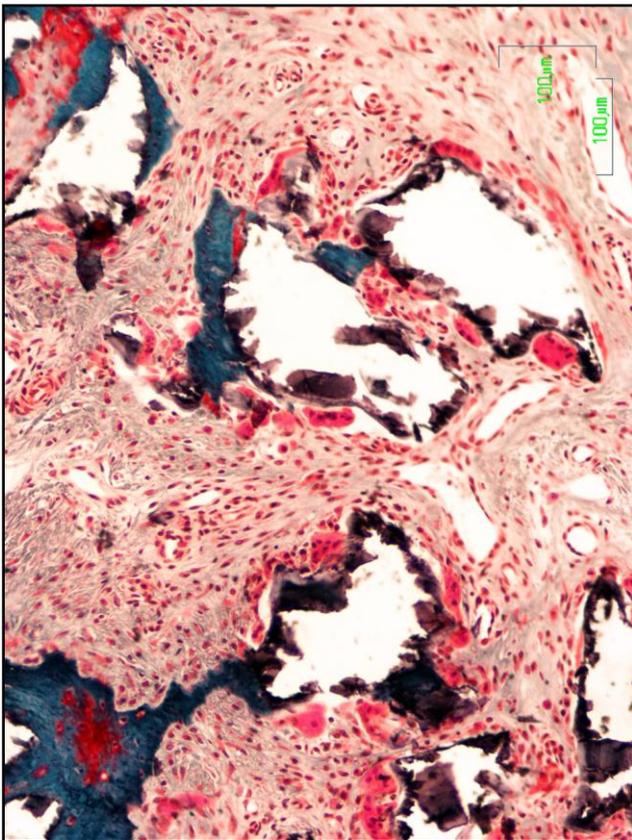


Fig.28 (10x)

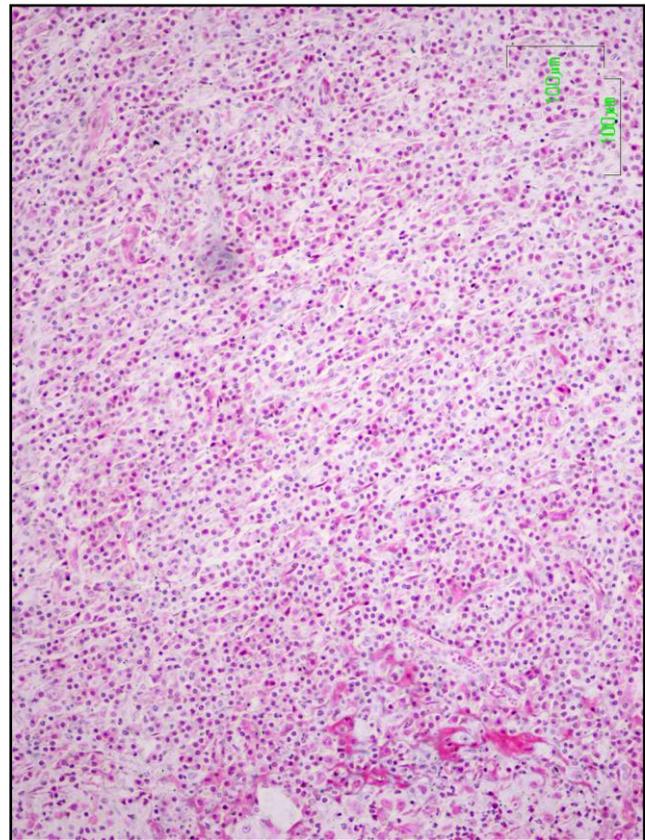


Fig.29 (10x)

Fig.22 (caso 6).- Fotografía panorámica en la que se ponen de manifiesto, los procesos de encapsulación de restos de material BioOss®. Se aprecia la formación de fibras de colágeno dispuestas concéntricamente alrededor del material. Se distingue una formación de tejido conectivo que divide en dos el hueco donde se encuentra el material residual. El tejido conectivo desarrollado es de tipo denso y muestra una gran vascularización. (2x, TG).

Fig.23 (caso 6).- Imagen donde se aprecia la transición entre la cavidad del defecto que no se ha regenerado y se encuentra ocupada por tejido conectivo denso, y parte la cavidad que se ha regenerado, mostrando la imagen característica del hueso trabecular neoformado con restos de BioOss integrados. Las trabéculas óseas regeneradas muestran una morfología acicular, característica de los procesos de osteointegración de BioOss®. En el tejido conectivo se distinguen restos de material, de menor tamaño, rodeados por células multinucleadas. También se hace evidente la alta vascularización presente en el tejido conectivo. (2x, TG).

Fig.24 (caso 5).- Reacción desmoplásica que ocupa la totalidad del defecto. El tejido conectivo predominantemente es de tipo denso. En el centro de la imagen se advierte una reacción granulomatosa de tipo inflamatorio en relación con restos de material. (2x, TG).

Fig.25 (caso 9).- Panorámica de una parte del defecto donde se aprecia una de las zonas en donde se ha desarrollado la formación de tejido conectivo de tipo denso y no se ha regenerado. El resto de la imagen muestra un hueso trabecular regenerado, inmaduro, con gruesas franjas de osteoide, más notables en aquellas superficies óseas en contacto con el tejido blando. Cabe destacar que en el entramado trabecular regenerado encontramos numerosas cavidades óseas, relacionadas siempre con un vaso sanguíneo. Estas cavidades, se encuentran con gran frecuencia delimitadas por líneas de osteoide. En los escasos espacios intertrabeculares encontramos tejido conectivo. (2x, TG).

Fig.26 (caso 9).- Otra imagen panorámica de otra zona de la cavidad del caso 9 donde aparece otra zona sin regenerar, de mayor tamaño, en donde se ha desarrollado la formación de tejido conectivo. También se distingue, en la zona superior de la fotografía, una reacción granulomatosa con una elevada celularidad de tipo inflamatorio. Alrededor de este hueso relleno por tejido conectivo encontramos hueso trabecular neoformado. Las trabéculas óseas regeneradas son inmaduras y presentan abundantes huecos blancos dentro del entramado trabecular correspondientes a zonas donde se han integrado restos de BioOss®. En este caso las cavidades óseas relacionadas con vasos sanguíneos son escasas. Las superficies óseas en contacto con el tejido blando son las que presentan franjas de osteoide. Los espacios intertrabeculares están ocupados por tejido adiposo y se distingue algún pequeño foco inflamatorio. (2x, TG).

Fig.27 (caso 10).- Panorámica que muestra la formación de tejido conectivo que ocupa la totalidad de la cavidad. Existe una transición de tejido conectivo de tipo denso, parte derecha de la imagen, a tipo laxo, en la parte izquierda. Se distinguen numerosos focos de células de tipo inflamatorio. También se aprecian algunas luces de vasos. (2x, TG).

Fig.28 (caso 6).- Imagen a gran aumento donde se ven espículas óseas con osteointegración de restos de BioOss® dentro del tejido conectivo denso formado en las zonas no regeneradas mostradas en las Figs.1 y 2. La superficie de BioOss® en contacto con el tejido blando se encuentra rodeada por células multinucleadas. Es destacable la alta vascularización desarrollada, apareciendo vasos con paredes delgadas y luces dilatadas. (10x, TG).

Fig.29 (caso 5).- Detalle del severo infiltrado de células de componente inflamatorio desarrollado en el tejido conectivo que ocupa toda la cavidad del defecto. (10x, TG).

Los casos 5 y 10 muestran el desarrollo de tejido conectivo denso, que ocupa toda la cavidad del defecto y por lo tanto no hay ninguna señal de regeneración ósea. Además las fotos de lupa ponen de manifiesto que el defecto se ha hecho más grande, han aumentado sus dimensiones. Por otro lado, los casos 6 y 9, también presentan una respuesta anómala a la tendencia general. De modo que aunque parte del defecto se ha regenerado, y el hueso trabecular neoformado presenta la morfología característica presente cuando se emplea el material BioOss®, en la parte central de la cavidad no hay hueso. En el hueco aparece tejido conectivo, incluso se ha desarrollado la formación de reacciones granulomatosas, debido a la presencia de abundantes restos de material en contacto con el tejido blando. Debido a esto encontramos un numeroso componente celular de tipo inflamatorio. Además, es notable la presencia de células gigantes multinucleadas en asociación a los restos de BioOss® que se encuentran en contacto con el tejido conectivo, el cual a su vez presenta numerosos vasos dilatados. En estos dos casos, incluso se ponen de manifiesto procesos de reabsorción ósea, demostrada por la presencia de osteoclastos sobre la superficie trabecular ósea.

Lo que sí que podemos afirmar en todos los casos es que el material BioOss® implantado en los defectos óseos no presenta procesos de necrosis ni tampoco ha desarrollado médula ósea de tipo hematopoyético.

Tabla resumen del CONTROL 2: BioOss®.-

BioOss®	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Fuertemente radiodenso	Fuertemente radiodenso	Defecto regenerado incluso zona cortical.	Regenerado, trabéculas delgadas.	Regenerado: h.cortical maduro. H.trabrecular: delgado, poco osteoide, gran osteointegración. Material no osteointegrado rodeado por células multinucleadas.
Caso 2	F.D.	Fuertemente radiodenso	Fuertemente radiodenso	Defecto regenerado incluso zona cortical.	Regenerado, trabéculas delgadas.	Regenerado: cortical más evolucionada, más delgada. H.trabrecular acicular, gran osteointegración de material, poco osteoide.
Caso 3	F.D.	Fuertemente radiodenso	Fuertemente radiodenso	Defecto regenerado incluso cortical.	Regenerado, trabéculas delgadas.	Regenerado, trab.aciculares, notable osteointegración, poco osteoide.
Caso 4	F.D.	Fuertemente radiodenso	Fuertemente radiodenso	Defecto regenerado incluso cortical.	Regenerado, trabéculas delgadas.	Regenerado, trab.aciculares, notable osteointegración, poco osteoide.
Caso 5	T.I.	Radiolúcido, de gran tamaño.	Radiolúcido, de gran tamaño.	No se ve claro.	No regenerado, tejido conectivo.	No regenerado, tej.conectivo denso, granulomas, resp. inflamatoria.
Caso 6	T.I.	Radiolúcido en la parte central, cortical levemente radiodensa	Zona central radiolúcida. Zona superficial radiodensa	Regenerado incluso cortical pero hueco central.	1/2 superficial regenerada + 1/2 interna: granuloma, abundantes restos de material.	Gran hueco central con deposito de material encapsulado, abundantes osteoclastos, cél.multinucleadas y resp.inflamatoria. Muchos vasos. Resto del defecto reg. con hueso más compacto con cavidades vasculares.
Caso 7	T.D.	Fuertemente radiodenso	Fuertemente radiodenso	No regenerado gran zona radiodensa.	No hay corte, pieza del defecto vacía.	No evaluable.
Caso 8	T.D.	1/2 superficial radiolúcida + 1/2 interna radiodensa.	3/4 superficie radiotransparente + 1/4 int. radiodensa.	No evaluable.	Sólo aparece una pequeña parte del defecto. Regenerado.	Se ha cogido una parte pequeña del defecto. Regenerado, trab.finas, osteointegración de material, médula adiposa.
Caso 9	T.D.	Fuertemente radiodenso	Fuertemente radiodenso	Defecto llega al canal médular, radiodenso pero no con estructura trabecular.	Regenerado. Hueso trabéculas delgado.	Regenerado: h.cortical notablemente vascularizado. H.trabecular fino, acicular. Espacio intertrab. con médula adiposa.
Caso 10	H.D.	Zona superficial radiodensa, el resto levemente radiopaco.	Zona superficial radiodensa, el resto levemente radiopaco.	Cortical fuertemente radiodensa, zona poco radiodensa en el centro, lo demás radiotransparente	Regenerado, aunque con huecos con restos mat. Granulomas.	Regenerado aunque con huecos con tej.conectivo y células inflamatorias. Predominio h.compacto con abundantes cavidades vasculares.
Caso 11	H.D.	Radiolúcido.	Radiolúcido.	Radiolúcido, de gran tamaño.	Gran tamaño, no regenerado. Tejido conectivo denso.	No regenerado, tej.conectivo denso, resp. inflamatoria. El hueso adyacente presenta osteoclastos, gran reabsorción.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA CONTROL 2 BioOss®										
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Osteoide	
****	**	*	-	***	**	-	*	-	*	
6 casos completa, 2 parcial	2 casos todo conectivo, casos 6 y 10 con huecos no regenerados	caso 6: encapsulación			Cuando el material está en contacto con tejidos blandos		casos: 5, 6 y 10		escaso	
Deficiencia mineralización	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación	Necrosis		
*	**	****	-	*	*****	*	*	-		
escasa	inmaduros	Casi todos los casos desarrollan médula adiposa		Casos: 6 y 11	Todos los casos que no presentan complicaciones	Casos 5 , 6 y 10	caso 6			

CONTROL 3: Cerasorb® (β -TCP)

Corresponde al grupo de defectos (n=6) rellenos con el material comercial denominado Cerasorb®, cuya composición es la cerámica sintética β -TCP. La utilización del TAC nos permite realizar el análisis de la evolución de las cavidades, en relación con los signos de regeneración ósea debido al empleo del Cerasorb®. Del mismo modo que en el resto de grupos, a continuación se muestra la secuencia de imágenes de TAC (Fig.30) representativas de la respuesta que encontramos en los defectos con gránulos de Cerasorb® implantados, correspondientes al caso 6 (húmero derecho). La relación de los 6 casos estudiados y su correspondiente localización ósea es la siguiente: Caso 1: F.I., Caso 2: F.D., Caso 3: T.I., Caso 4: T.D., Caso 5: H.I., Caso 6: H.D.

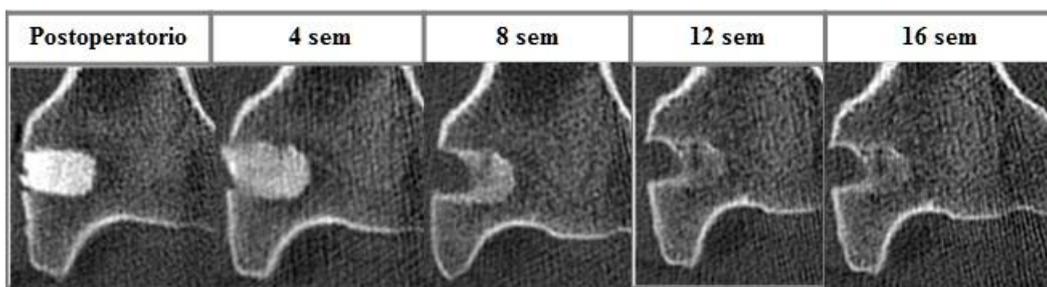


Fig.30. Secuencia de imágenes centrales de TACs del caso 6 realizadas durante todo el periodo de experimentación con intervalos de 4 semanas, representativas del comportamiento que presenta el material Cerasorb® colocado en los defectos óseos.

Las imágenes de TACs de los defectos óseos con el material Cerasorb® implantado son similares en todos los casos, salvo en el caso 5, el cual se ha descartado debido a que la lesión ósea se realizó en la zona metafisaria, afectando el cartílago articular y modificando por tanto la respuesta tisular, provocando un efecto adverso. Por todo ello, no se va a evaluar. El resto de los casos, en la imagen de TAC de la 4ª semana de estudio, muestran elevados signos de radiodensidad, mucho mayores que los del hueso normal adyacente. Esta radiodensidad, debida al material Cerasorb®, puede ocupar por completo la cavidad, como ocurre en los casos 1 y 6, o casi por completo en los casos 2, 3 y 4, donde la zona externa, correspondiente a la cortical, es radiolúcida. A las 8 semanas de experimentación, encontramos niveles de radiodensidad menores, como ocurre en los casos 1 y 6, donde la cavidad del defecto a las 4 semanas de estudio era en su totalidad radiopaca, en este tiempo de experimentación únicamente la mitad más profunda del defecto es radiopaca, siendo la mitad externa radiotransparente. Esta señal radiológica indica una pérdida inicial de material en la parte externa del defecto. Mientras que por otro lado, las imágenes de TAC de los casos 2, 3 y 4 prácticamente no muestran diferencias a lo largo del tiempo, mostrando en la parte superficial del defecto una pequeña zona radiotransparente, presentando elevados niveles de radiopacidad en resto de la cavidad. (Imágenes no mostradas). La leve diferencia que podemos apreciar es que en las imágenes de TAC a las 8 semanas de experimentación, la distribución de la radiodensidad es homogénea, mientras que a las 16 semanas, se aprecian pequeñas zonas radiotransparentes dentro de las cavidades radiopacas debido a la desaparición de restos de material y la progresiva formación óseo trabecular.

VALORACIÓN RADIOLÓGICA E IMAGEN DE LUPA.-

Las radiografías nos permiten realizar un diagnóstico mediante imagen y relacionarlas con los signos radiológicos presentes en los TAC. Tal y como se observó en las imágenes de TAC del caso 6 a las 16 semanas, la imagen radiológica del caso 1 muestra como se ha restablecido la continuidad radiológica entre el hueso regenerado en el defecto y el hueso adyacente, presentando el defecto con una radiodensidad similar al hueso normal, con organización trabecular (Fig.31). Aunque en el caso 1 y 6, encontramos estos signos únicamente en la mitad más interna del defecto, ya que la mitad yuxtacortical se muestra radiotransparente, el resto de los casos también muestran una zona radiolúcida en la zona más externa del defecto, de menor extensión, presentando una proporción mayor del defecto radiodenso.

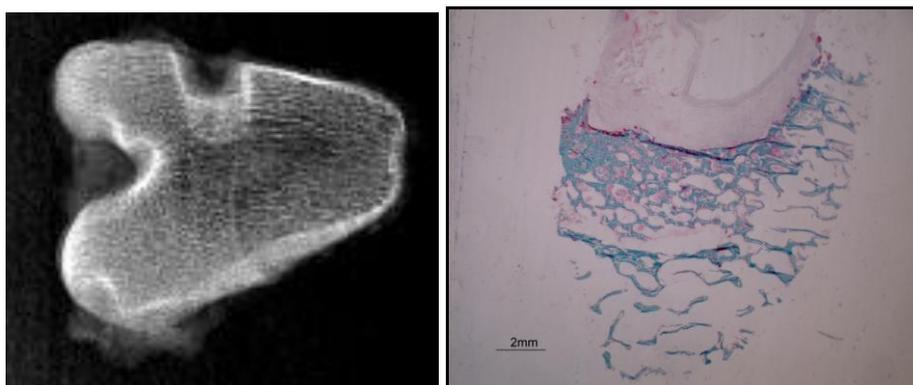


Fig.31. Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico correspondiente al caso 1.

Por otro lado, mediante la observación de las fotografías de lupa de los cortes histológicos podemos hacer una valoración de la respuesta tisular provocada en los diferentes casos. En todos los casos se ponen de manifiesto procesos de regeneración ósea en mayor o en menor medida. Comenzando por los que mayores niveles de reparación muestran encontramos los casos 1, 2 y 3. Como ejemplo representativo de la respuesta tisular provocada frente a la implantación del material Cerasorb® se muestra la imagen del lupa del caso 1. Se diferencia un hueso trabecular neoformado, cuyas trabéculas son gruesas, desorganizadas y están en continuidad con el hueso adyacente. Se distingue la transición entre las trabéculas del hueso normal adyacente y las regeneradas. La formación de hueso trabecular ocupa únicamente la mitad más interna del defecto, desarrollando en la zona superficial la formación de tejido conectivo de tipo laxo (Fig.31), o denso, como ocurre en el caso 3.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.-

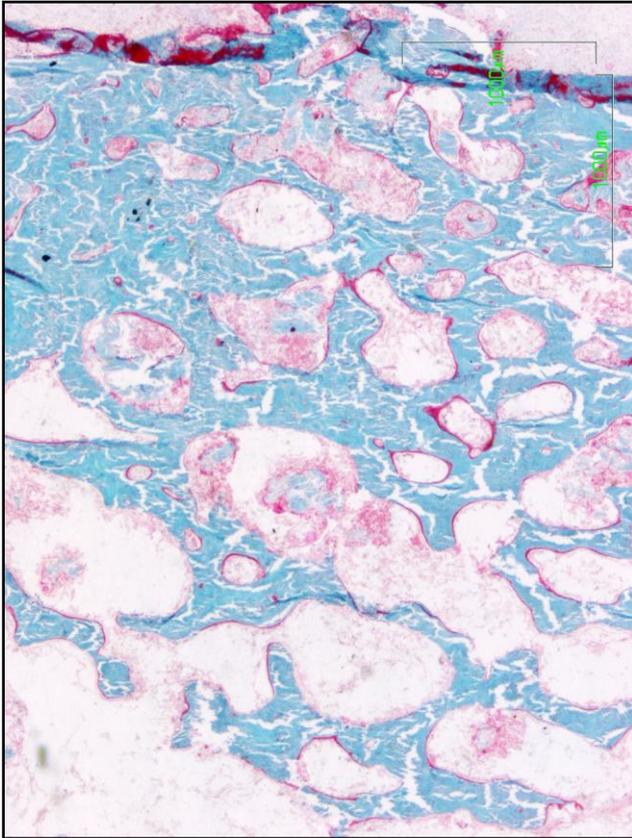


Fig.32 (2x)

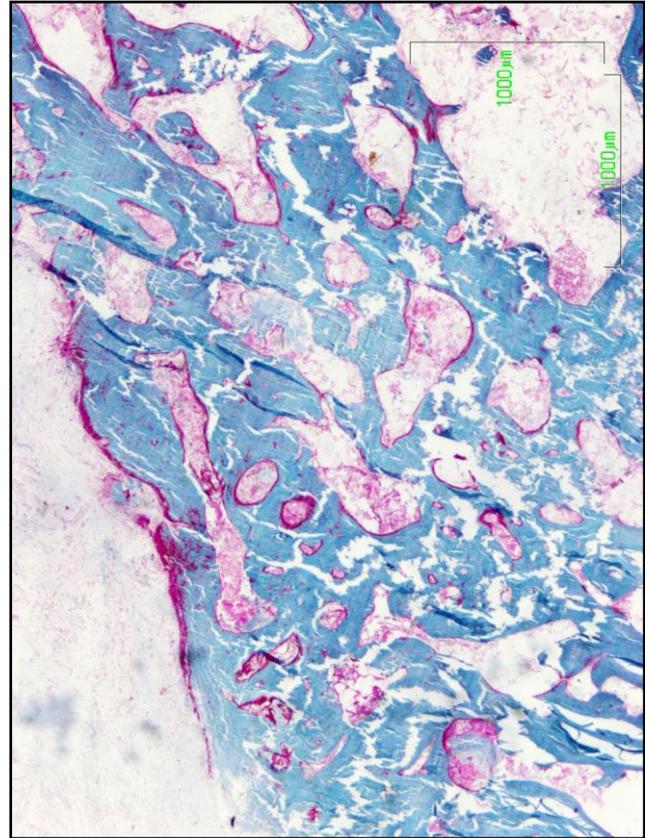


Fig.33 (2x)

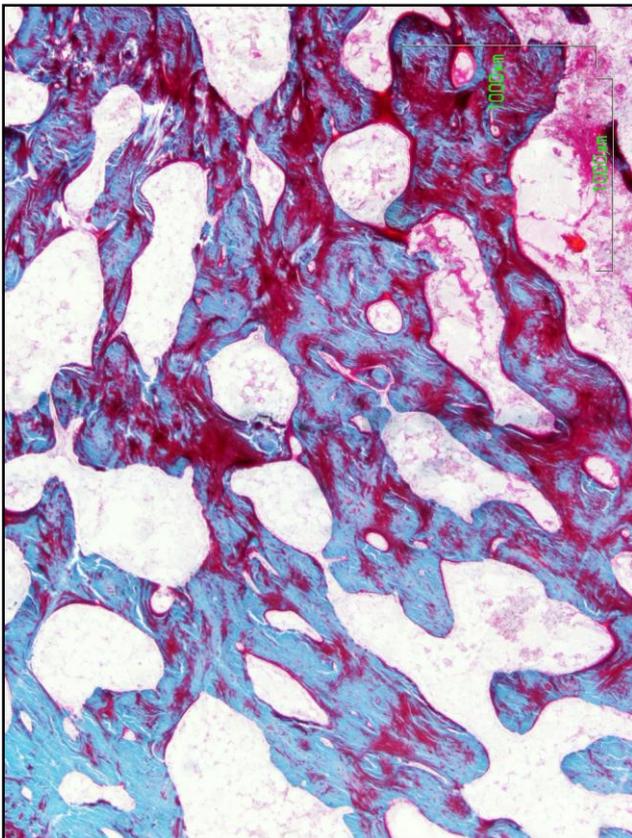


Fig.34 (2x)

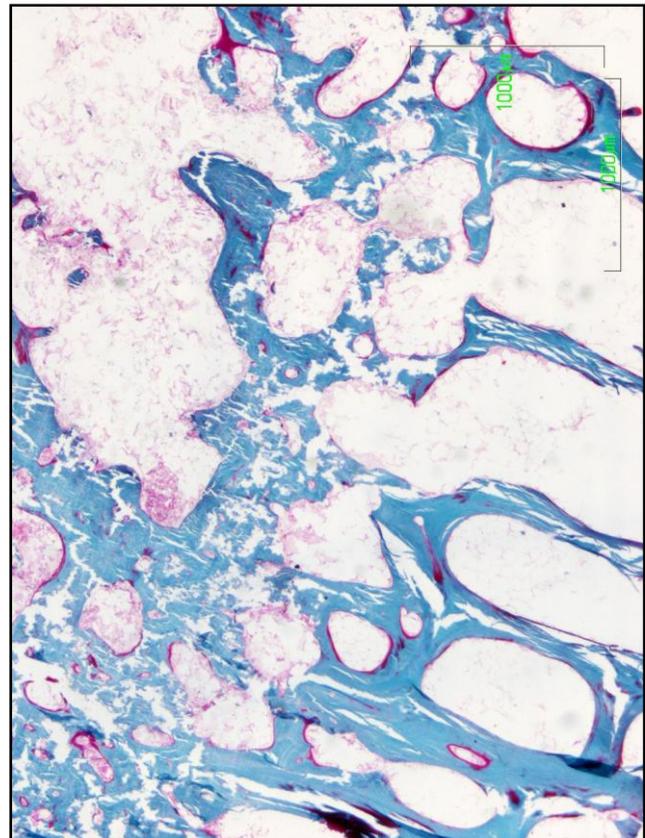


Fig.35 (2x)

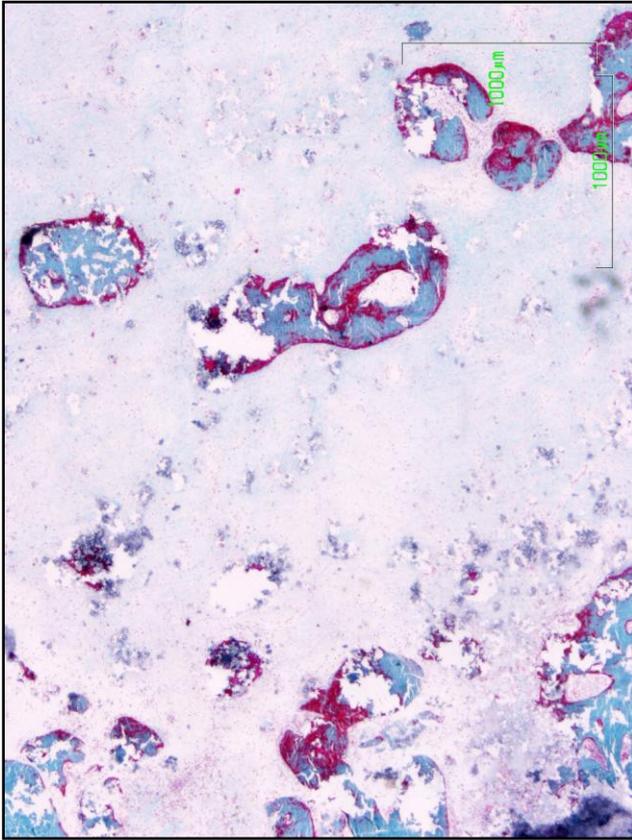


Fig.36 (2x)

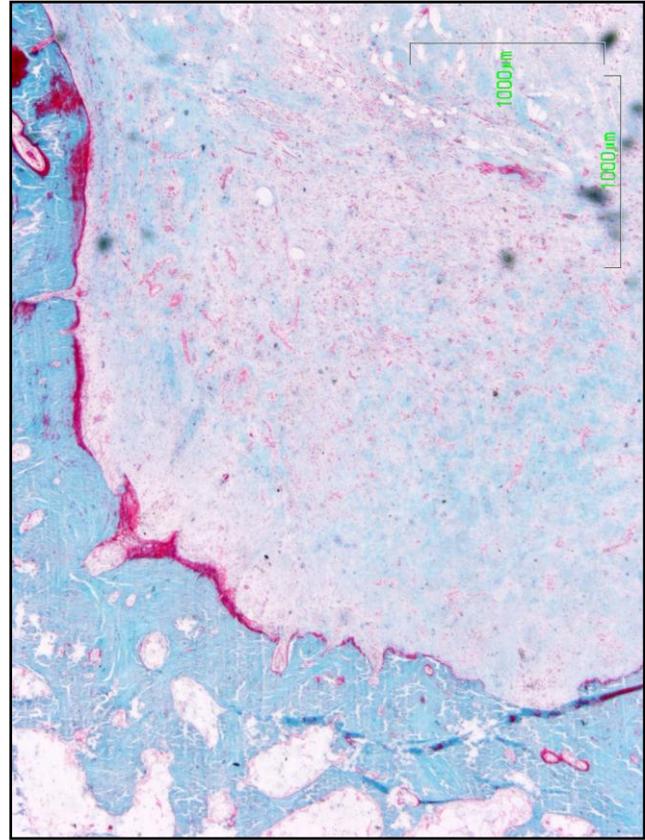


Fig.37 (2x)

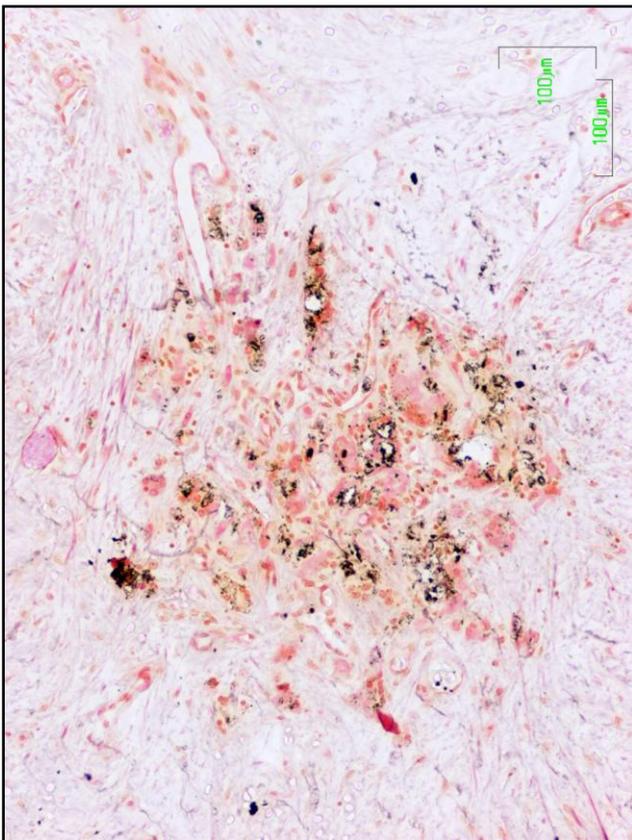


Fig.38 (10x)

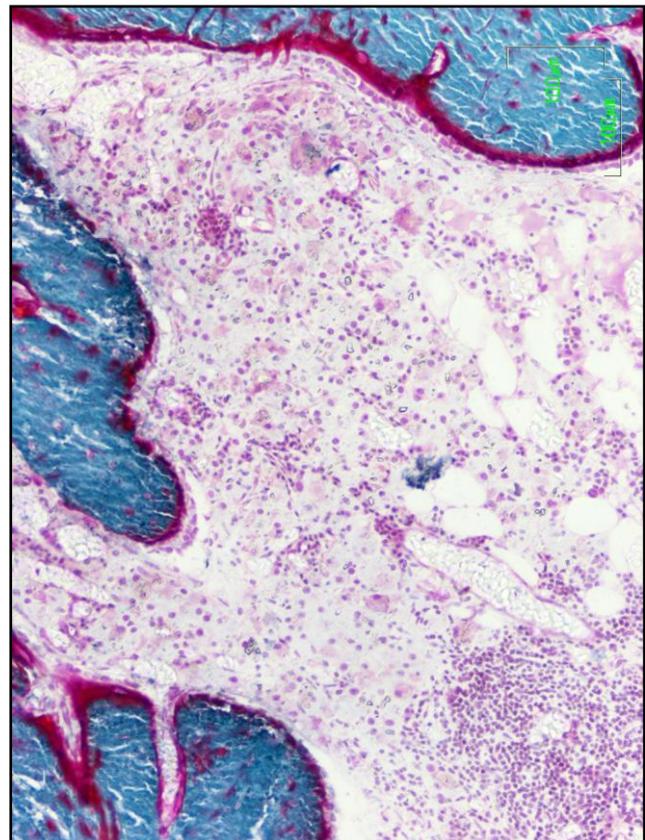


Fig.39 (10x)

Fig.32 (caso 1).- Panorámica en donde se puede apreciar la regeneración ósea del defecto. Encontramos hueso neoformado trabecular, con trabéculas muy gruesas sin apenas cavidades vasculares en transición con trabéculas algo más finas y con más espacios entre ellas. Se diferencian algunas superficies óseas con franjas de osteoide, aunque no es muy abundante. En los espacios medulares hayamos tejido conectivo de tipo laxo. (2x, TG).

Fig.33 (caso 2).- Imagen panorámica que muestra hueso cortical regenerado, con unidades de remodelación, ya que encontramos cavidades asociadas a vasos sanguíneos. Se aprecia una transición a un hueso regenerado con gruesas trabéculas. En la zona más externa del defecto se ha desarrollado tejido conectivo de tipo laxo y la superficie ósea en contacto con él presenta una franja de osteoide. (2x, TG).

Fig.34 (caso 3).- Imagen donde se pone de manifiesto la notable deficiencia de mineralización del hueso trabecular neoformado. El hueso regenerado está formado por trabéculas gruesas, desorganizadas y anastomosadas. (2x, TG).

Fig.35 (caso 2).- Panorámica que muestra la transición entre las trabéculas normales, que son delgadas y tienen una distribución paralela, a trabéculas regeneradas, que son gruesas y desorganizadas. En los espacios intertrabeculares encontramos tejido conectivo de tipo laxo. (2x, TG).

Fig.36 (caso 4).- Imagen del centro de la cavidad del defecto, en el que predomina la formación de tejido conectivo de tipo laxo. Se distinguen pequeñas espículas óseas neoformadas con abundantes franjas de osteoide en su superficie y zonas con deficiencia en mineralización. (2x, TG).

Fig.37 (caso 6).- Panorámica donde aparece el desarrollo de tejido conectivo de tipo denso en la mitad externa del defecto. Este tejido conectivo se encuentra altamente vascularizado. El hueso que lo rodea muestra trabéculas gruesas, cuyas superficies óseas en contacto con el tejido óseo tienen líneas de osteoide. (2x, TG).

Fig.38 (caso 1).- Imagen a gran aumento de la zona superficial teñida con la técnica de Von Kossa. De este modo los restos de material adquieren un color negro-marrón, y se encuentran rodeados por escasas células multinucleadas, dentro del tejido conectivo de tipo laxo formado. Se distingue también algún vaso sanguíneo. (10x, VK).

Fig.39 (caso 3).- Fotografía a gran aumento donde aparecen trabéculas óseas neoformadas, con gruesas líneas de osteoide en su superficie. En el espacio intertrabecular se ha desarrollado una respuesta celular de tipo inflamatorio, además de aparecer vasos sanguíneos. (10x, TG).

Podemos concluir diciendo que el material comercial Cerasorb® en todos los casos ha provocado la regeneración del defecto, aunque únicamente el caso 2 es el que presenta casi la totalidad de la lesión regenerada. En los demás casos, en mayor o en menor medida, la zona externa del defecto, correspondiente a la zona cortical, se ha desarrollado la formación de tejido conectivo, provocando una diferencia de altura entre el hueso cortical del hueso adyacente al defecto y el hueso cortical regenerado. Es preciso destacar que el material Cerasorb® provoca la formación de una especie de hueso cortical inmaduro, en la zona más externa del defecto. Este hueso cortical inmaduro se caracteriza por presentar escasos espacios medulares, pero no obstante tiene abundantes cavidades óseas, relacionadas siempre con un vaso sanguíneo. Estas cavidades, se encuentran con gran frecuencia delimitadas por líneas de osteoide. Además se aprecia la transición desde el hueso cortical regenerado a un hueso con trabéculas gruesas, desorganizadas y anastomosadas. En los casos 2, 4 y 6 además se observan procesos de osteointegración de restos de material dentro de la matriz ósea, aunque debido al procesado de las muestras, en las imágenes microscópicas las zonas donde estaría integrado el material aparecen en blanco, al desprenderse los restos de Cerasorb®. Al presentarse esta transición entre dos tipos de tejido óseo, podemos afirmar que se trata de un estadio de regeneración avanzado, además de que hemos encontrado procesos de remodelación. En los casos 1, 4 y 6 se han detectado procesos de reabsorción ósea mediados por hileras de osteoclastos, acoplados a frentes osteoblásticos encontrados debajo de las franjas de osteoide. Los casos 2 y 3 son los que muestran mayor actividad osteogénica ya que se aprecian numerosas superficies óseas con franjas de osteoide.

El hueso trabecular regenerado muestra otros signos de inmadurez como puede ser las abundantes zonas deficientes de mineralización, mayoritarias en el caso 3.

La continuidad ósea con respecto al hueso adyacente es correcta y apreciable sobre todo en los casos 1 y 2.

En el caso 4 la regeneración del defecto se ha producido de una manera heterogénea y descompensada, ya que la zona cortical presenta un hueso cortical regenerado e inmaduro y por debajo de esta formación la cavidad ha desarrollado la formación de tejido conectivo laxo, donde encontramos pequeñas espículas óseas neoformadas. Estas espículas muestran líneas de osteoide y zonas aún no calcificadas. Se aprecia una transición desde tejido conectivo laxo a adiposo. Esta formación anómala puede deberse a que dentro del tejido conectivo se han encontrado abundantes restos de material que han tardado más en reabsorberse y han retardado los procesos de regeneración ósea.

En relación al desarrollo del tejido conectivo formado en la zona exterior, suele encontrarse en él restos de material de pequeño tamaño, asociado a escasas células multinucleadas. En todos los casos excepto en el caso 2, se han detectado pequeños focos celulares de componente inflamatorio, como leucocitos y linfocitos. Además hay que destacar la notable vascularización presente en el tejido conectivo, sobre todo en los casos 3 y 6. Incluso se han distinguido numerosos hematíes en el interior de los vasos.

Es característico de este material, que incluso macroscópicamente los restos son apreciables y translúcidos.

Tabla resumen CONTROL 3: Cerasorb®.-

Cerasorb®	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Radiodensidad mitad interna del defecto. Mitad externa radiotransparente.	Radiodensidad mitad interna del defecto. Mitad externa radiotransparente.	Defecto regenerado en la mitad interna del defecto. Presenta un entramado trabecular. Resto de la cavidad radiotransparente	Formación de hueso trabecular que ocupa únicamente la mitad interna del defecto, desarrollando en la zona superficial tejido conectivo de tipo laxo.	Mitad interna del defecto regenerada, resto desarrollo de tejido conectivo. Aparecen restos de material. Espacios intertrabeculares con tejido conectivo laxo y elevada vascularización. Procesos de remodelación. Algún pequeño foco inflamatorio y células multinucleadas. Transición hueso regenerado a hueso normal adyacente.
Caso 2	F.D.	Radiodensidad casi completo, menos en la zona superficial.	Radiodensidad completo menos zona superior algo embebida y radiolúcida.	Se ha restablecido la continuidad radiológica del fémur, presentando el defecto con una radiodensidad similar al hueso normal, con un aspecto trabecular organizado.	Regeneración que llega hasta la zona cortical. Se diferencia un hueso trabecular neoformado. Se distingue la transición entre las trabéculas del hueso normal adyacente y las regeneradas.	Regenerada aunque no se recupera la cortical. Hueso trabecular neoformado, cuyas trabéculas son gruesas, desorganizadas, con osteoide y están en continuidad con el hueso adyacente. Zona interna: zonas sin hueso, con tejido adiposo, debido a que llega al canal medular.
Caso 3	T.I.	Radiodensidad casi completo, menos una pequeña parte en la zona externa.	Radiodensidad casi completo, menos una pequeña parte en la zona externa. La radiodensidad no homogénea, presenta un entramado radiopaco similar al trabecular, con huecos radiotransparentes debido a los espacios trabeculares.	Radiopacidad similar a la del hueso adyacente, aunque con una organización heterogénea. Se intuye un entramado trabecular radiodensidad desorganizado que ocupa casi la totalidad del defecto, excepto en la zona externa, que es más tenue.	Formación de hueso trabecular que ocupa los 2/3 de la zona interna del defecto, desarrollando en la zona externa tejido conectivo de tipo denso.	Regenerado menos en la zona cortical que se encuentra embebida, ocupada por tejido conectivo. Hueso regenerado inmaduro. Trabéculas óseas neoformadas gruesas, desorganizadas y actividad osteogénica. Elevada vascularización. Pequeños focos inflamatorios. Células multinucleadas.
Caso 4	T.D.	Radiodensidad casi completo, menos en la zona más externa.	Radiodensidad casi completo, menos una pequeña parte en la zona externa. Presenta menor radiodensidad, sobre todo en la zona medular y con aspecto trabecular.	En la mitad externa se muestra una franja con altos niveles de radiopacidad en continuidad con los rebordes óseos. Sin embargo en la zona interna del defecto, en contacto con el canal medular, encontramos una radiodensidad más leve con un aspecto granulado y alguna región radiotransparente.	Zona externa aparece una franja ancha formada por un hueso regenerado predominantemente de tipo cortical, debido a las escasas cavidades vasculares. Debajo de esta formación ósea, la cavidad se muestra ocupada por tejido conectivo, con alguna espícula ósea.	Zona superficial: formación ósea, resto desarrollo de tejido conectivo con espículas óseas, ya que alcanza el canal medular. Gran interacción material-hueso. Procesos de remodelación. Pequeños focos inflamatorios. Células multinucleadas y macrófagos.
Caso 5	H.I.	Radiotransparente, de gran tamaño.	Radiotransparente, de gran tamaño.	No evaluable	No evaluable	No evaluable
Caso 6	H.D.	Radiodensidad mitad interna del defecto. Mitad externa radiotransparente.	Radiodensidad mitad interna del defecto, pero con una intensidad más leve y con aspecto trabecular. Mitad externa radiotransparente.	Mitad interna de la cavidad con un entramado trabecular radiodensidad, en continuidad con el hueso adyacente; mientras que la mitad superficial es radiotransparente.	Mitad superficial no regenerada, desarrollo de tejido conectivo. Mitad interna: trabéculas regeneradas.	Defecto parcialmente regenerado, con trabéculas gruesas y desorganizadas. Buena vascularización. Restos de material, interacción material-hueso. Pequeños focos inflamatorios. Células multinucleadas.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA CONTROL 3 Cerasorb®					
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
***	***	*	*	***	***
En ningún caso total, no llega a la altura de la cortical del hueso normal adyacente	Desarrollado en la zona externa no regenerada y en espacios intertrabeculares	Escaso, casos: 1, 4 y 6	Escaso, casos: 1, 4 y 6	Casos 1, 3 y 6	En todos los casos menos en el caso 2
Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración
*	*	**	-	***	**
Escasa, solo en caso 3	No relevante	Casos 2, 4 y 6		Casos 1, 4 y 6	No muy notable. Casos 2, 4 y 6
Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Granulomas
*	**	-	-	**	-
Caso 4	Pequeños focos inflamatorios en todos los casos menos en el 2	Encapsulación		Casos 2 y 3.	
		-			

GRUPO I:

El grupo I está formado por seis materiales *A*, *B*, *C*, *D*, *E* y *F* en los que los gránulos de monetita pueden presentar o no sustitución iónica, y como fuente de silicio presentan ps-wollastonita y/o gel de sílice. Estos materiales tienen en común que la fuente de monetita y gel de sílice son la ps-wollastonita y el ácido fosfórico. En este grupo se estudió la influencia de sustituir parcialmente el calcio de la monetita por Mg o por Zn, así como la influencia de sustituir parte de la monetita por fosfatos de calcio menos solubles como la CDHA o el β -TCP.

Tabla 9. Composición de cada material perteneciente al grupo I.

GRUPO I	M (%)	M-Mg (%)	M-Zn (%)	CDHA (%)	β -TCP (%)	GS (%)	ps-W (%)
<i>A</i>	58					34	8
<i>B</i>		60				34	6
<i>C</i>		59		7		31	3
<i>D</i>			60			34	6
<i>E</i>	63				18	19	
<i>F</i>	46			2	38	14	

Tabla 10. Número de casos realizados de cada material y su localización ósea.

GRUPO I	Nº de casos	Localización
<i>A</i>	11	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: F.D. 4: F.D. 5: T.I. 6: T.I. 7: T.I. 8: T.D. 9: H.I. 10: H.I Y 11: H.D.
<i>B</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I Y 6: H.D.
<i>C</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I Y 6: H.D.
<i>D</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I Y 6: H.D.
<i>E</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I Y 6: H.D.
<i>F</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I Y 6: H.D.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

A continuación se van a mostrar las imágenes de TAC de la parte central de las piezas óseas de las respuestas más representativas presentes en los materiales pertenecientes a este grupo. La tendencia general es la de encontrar imágenes de TAC con escasa captación radiológica desde la 8ª semana de experimentación.

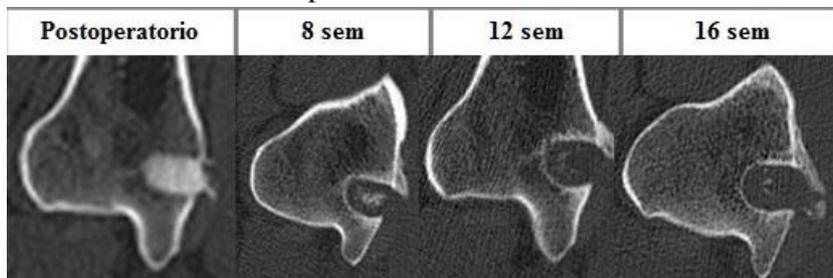


Fig.40. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 5 del material C.

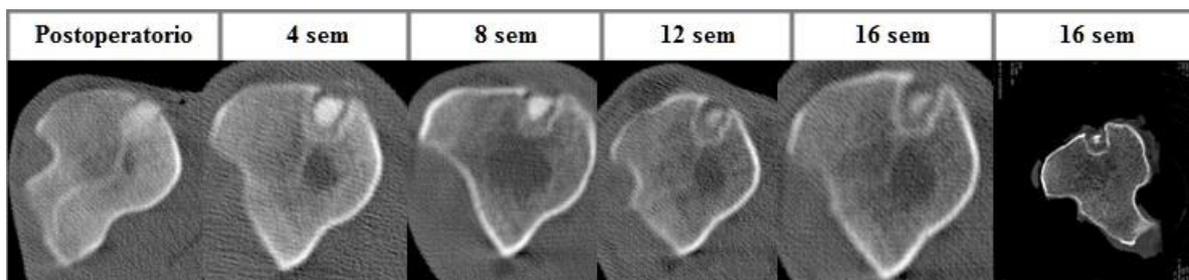


Fig. 41. Imágenes de TAC del caso 4 del material D.

Se han seleccionado estos dos casos como ejemplos representativos de la respuesta general encontrada en los materiales pertenecientes al grupo I. De esta forma, tal y como se aprecia en la Fig.40, a la 8ª semana de experimentación, la señal radiológica es muy tenue, mostrando un pequeño punto radiodenso y difuso en la zona central de la cavidad ósea que es radiolúcida. A la 12ª semana, el defecto no presenta ninguna señal radiodensa, mostrándose completamente radiotransparente y por lo tanto vacío, manteniéndose así hasta las 16 semanas de estudio.

La otra manifestación radiológica que presentan parte de los materiales del grupo I, mostrada en la Fig. 41, es que el punto radiodenso que aparece en la imagen de TAC a las 8 semanas, en comparación con el caso anterior, es de mayor tamaño, ocupando gran parte de la cavidad. Este punto radiopaco se encuentra aislado, sin continuidad con el reborde óseo adyacente. Esta captación radiológica se mantiene durante todo el ensayo, aunque su tamaño disminuye progresivamente de forma paulatina, de modo que a las 16 semanas, únicamente se distingue un pequeño punto radiopaco en el centro, mostrándose el resto de la cavidad radiotransparente.

Por lo tanto, este conjunto de imágenes de TAC resumen el comportamiento de todos los materiales pertenecientes al grupo I, incluso el de los materiales E y F cuyas composiciones químicas difieren del resto al presentar β -TCP. De esta forma podríamos indicar que en el análisis de imágenes de TAC no encontramos diferencias entre los materiales.

VALORACIÓN DE LAS IMÁGENES RADIOLÓGICAS Y DE LUPA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.-

A partir de las imágenes radiológicas de las lonchas de las piezas óseas ya extraídas, y disecadas una vez sacrificadas las ovejas, podemos ver si existe una correlación con la valoración realizada mediante las imágenes de TAC en distintos tiempos y la imagen radiológica una vez finalizado el tiempo de experimentación. Además las fotos de lupa de las secciones histológicas mostradas a continuación, ponen de manifiesto las respuestas tisulares más comunes provocadas frente a la implantación de los materiales pertenecientes al grupo I. De este modo podemos relacionar los signos radiológicos encontrados hasta ahora con los procesos biológicos que se manifiestan en los defectos a las 16 semanas de experimentación.

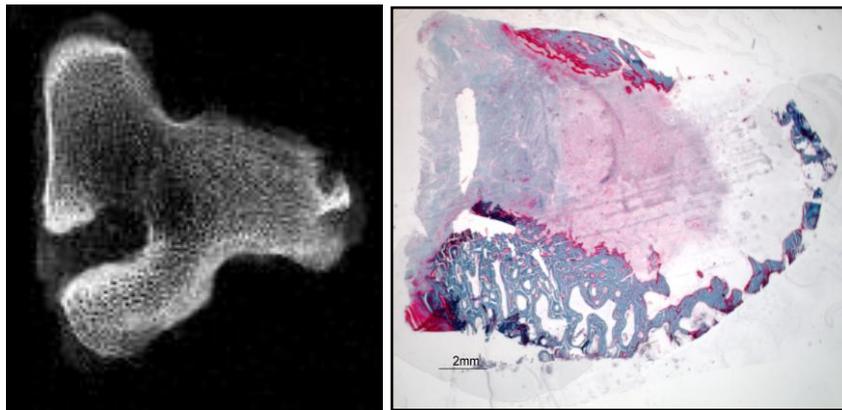


Fig.42. Imagen radiológica correspondiente al caso 3 del material *F* y su correlativa fotografía de lupa del corte histológico.

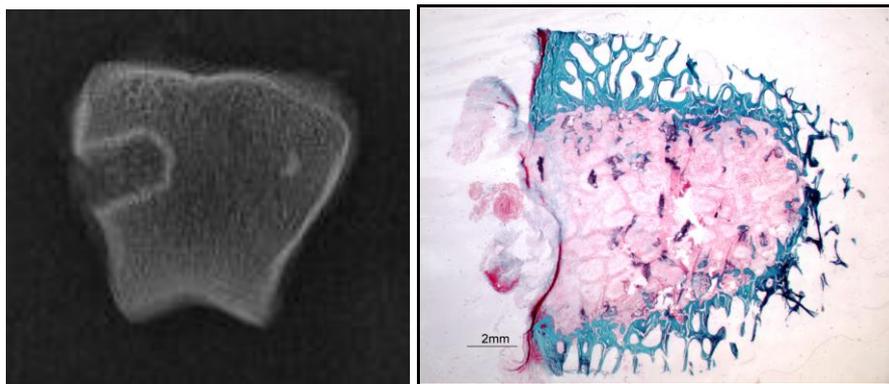


Fig.43. Imagen radiológica correspondiente al caso 3 del material *A* y su correlativa fotografía de lupa del corte histológico.

Como ejemplo se han escogido las radiografías correspondientes a las respuestas más representativas de los materiales del grupo I. En la Fig.42 la radiografía muestra una cavidad totalmente radiotransparente, sin ningún tipo de captación radiológica, símbolo de que no se ha regenerado el defecto. La imagen de TAC correspondiente a este caso, sería la misma que la presentada en la Fig.40. Por otro lado, la imagen de lupa de la Fig.42 demuestra que la formación de hueso es nula y que la cavidad se encuentra ocupada por la formación de tejido conectivo. En el hueso adyacente se puede distinguir una cierta respuesta a la generación del defecto óseo, de forma que ha reaccionado formando hueso, mostrando

trabéculas regeneradas más gruesas, anastomosadas y con cierta actividad osteogénica, al apreciarse líneas de osteoide (de color rojo).

En relación a la Fig.43 pone de manifiesto el comportamiento radiológico y la imagen de lupa que presentarían aquellos casos que mostraran las imágenes de TAC de la Fig. 41. La radiografía de la Fig.43 presenta ausencia de radiodensidad debida a la nula captación del calcio en el defecto óseo, signo de que no se ha regenerado, de modo que se distinguen las lesiones óseas radiolúcidas, con forma cilíndrica y pequeños puntos radiodensos repartidos homogéneamente, que pueden corresponder a restos de material. Además se puede diferenciar el contorno del defecto óseo debido a que existe una gruesa línea radiodensa que lo delimita. Finalmente la imagen de lupa, corrobora lo observado previamente en la radiografía, al mostrar defectos no regenerados, donde se ha desarrollado tejido conectivo y se distinguen numerosos restos de material dentro del tejido blando. Estos restos corresponden a los puntos radiopacos que aparecen en la radiografía.

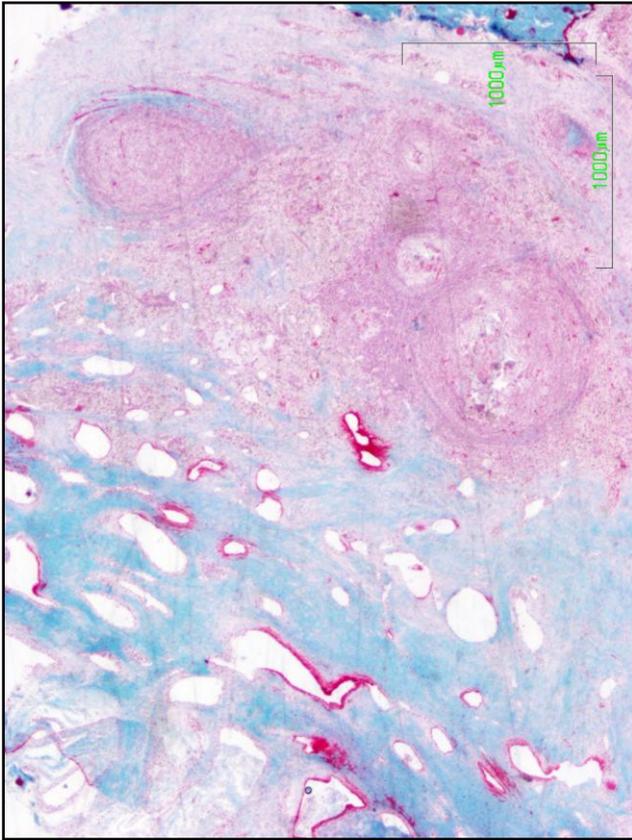
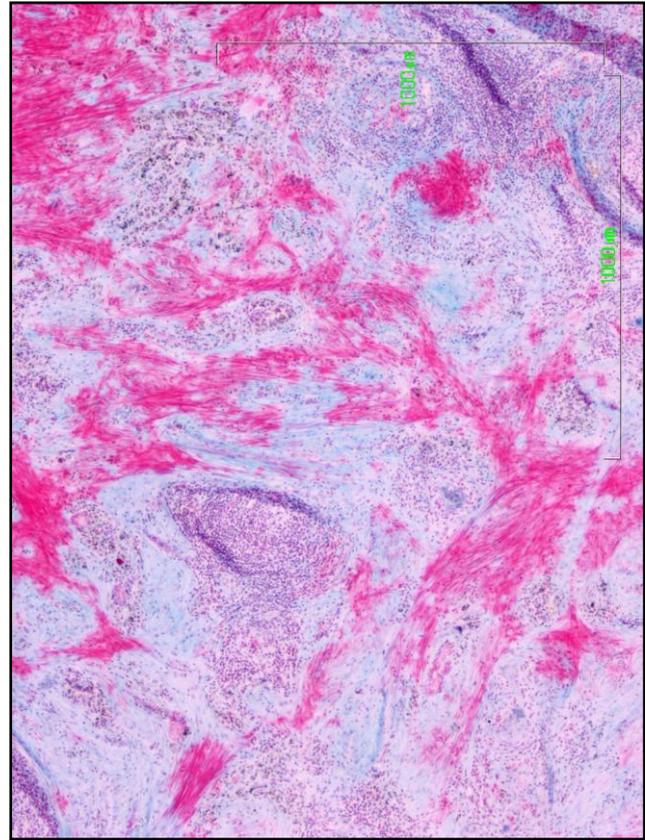
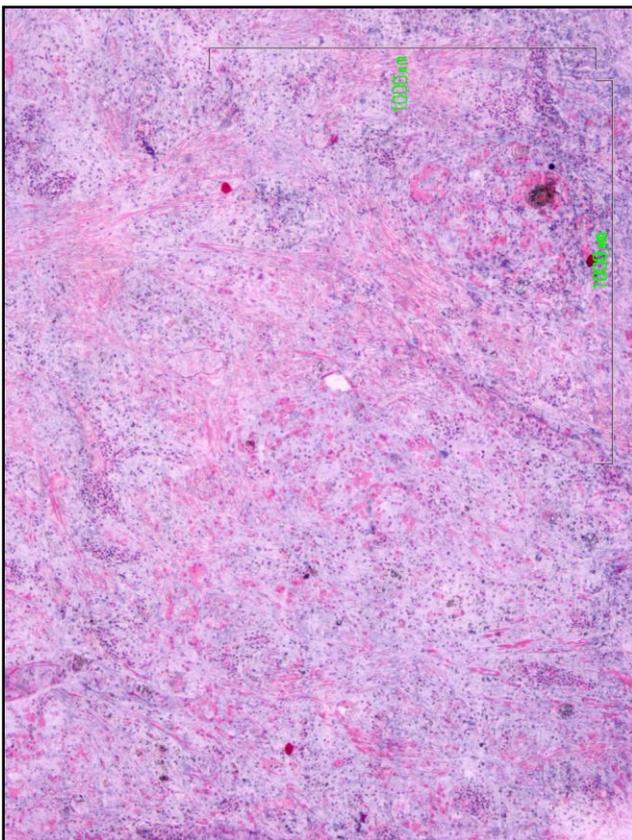
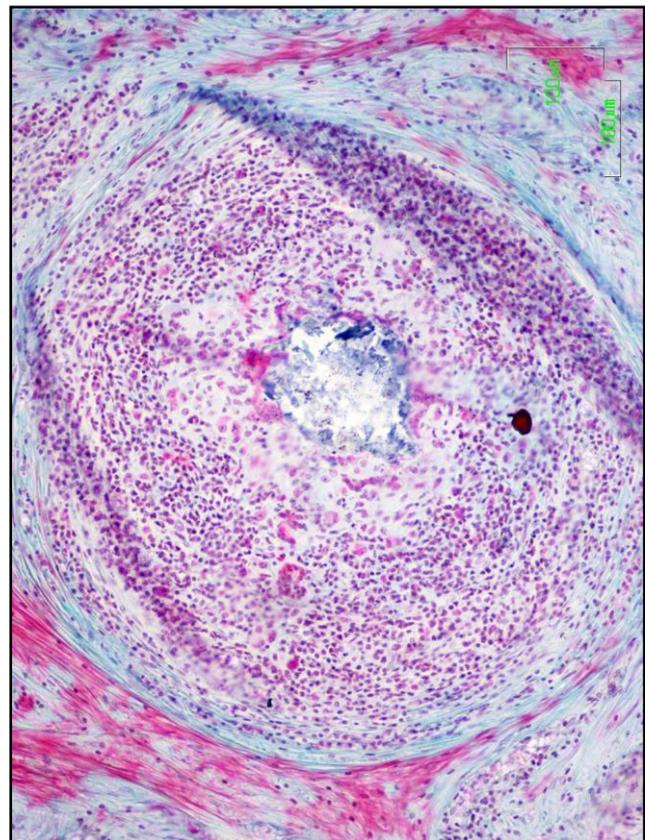
Por lo tanto, la respuesta general de estos materiales es que no presentan reparación radiológica de los defectos óseos, ya que se distingue o bien una cavidad completamente radiolúcida, o bien pequeños puntos levemente radiodensos aislados, manteniéndose el resto radiotransparente. Este comportamiento implica que no se ha producido una regeneración ósea del defecto, hecho evidente al observar en las fotos de lupa la formación de tejido conectivo que ocupa la totalidad del defecto.

VALORACIÓN HISTOLÓGICA.-

A continuación se van a mostrar las imágenes microscópicas más representativas de los cortes histológicos correspondientes a los materiales pertenecientes al grupo I. De esta forma veremos que las respuestas biológicas predominantes en este tipo de materiales, en su mayor parte, son comunes para todos ellos, al igual que hemos visto comportamientos similares mediante la evaluación de imágenes de TAC, radiológicas y de lupa. Sin embargo, para algunos comportamientos, se pueden hacer dos subgrupos dentro del grupo I. Al final de este apartado agruparemos por un lado los materiales *A*, *B*, *C* y *D* y por otro *E* y *F*, ya que en relación a la respuesta biológica muestran leves diferencias, importantes de reseñar a nuestro juicio.

A partir de la evaluación histológica de la respuesta tisular desarrollada frente a la implantación de los materiales del grupo I, podemos afirmar que no existe regeneración ósea del defecto. La cavidad del defecto se encuentra ocupada por tejido conectivo de tipo laxo o denso, con una gran vascularización, más abundante en la zona superficial del defecto. El componente celular presente en el tejido conectivo es elevado y en su mayor parte de tipo inflamatorio. Algunos de ellos han desarrollado procesos inflamatorios crónicos, por la presencia de células plasmáticas aunque en los materiales *B* y *D* no se han encontrado procesos inflamatorios de tipo crónico, aunque si agudos. También son destacables las formaciones granulomatosas formadas en relación a restos de material no reabsorbidos. Otra de las respuestas tisulares destacables es que en todos los materiales, salvo en los materiales *D* y *F*, ha habido algún caso que mostraba signos de necrosis tisular,

Por otro lado, se van a mostrar imágenes histológicas que van a poner de manifiesto las diferencias, en relación a las respuestas tisulares, encontradas entre los materiales que conforman el grupo I.

**Fig.44 (2x)****Fig.45 (4x)****Fig.46 (4x)****Fig.47 (10x)**

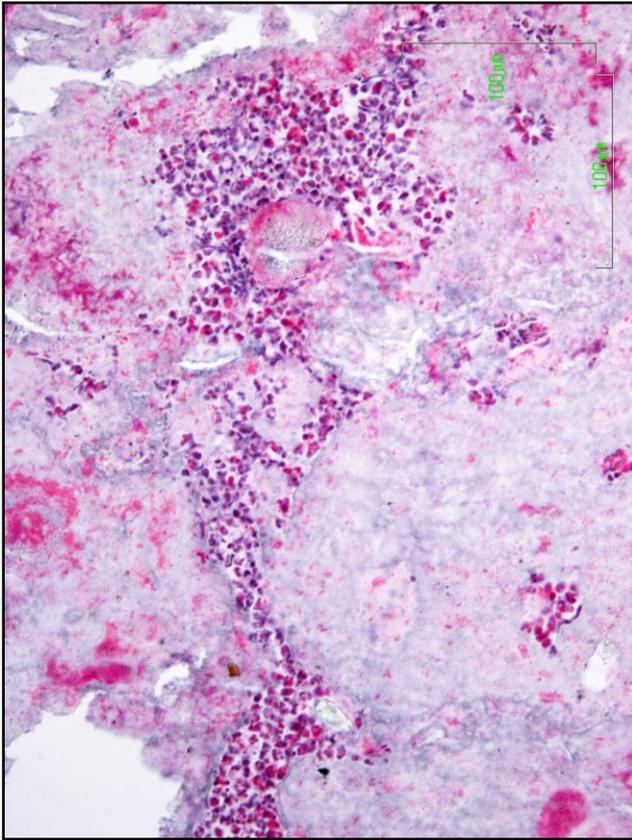


Fig.48 (20x)

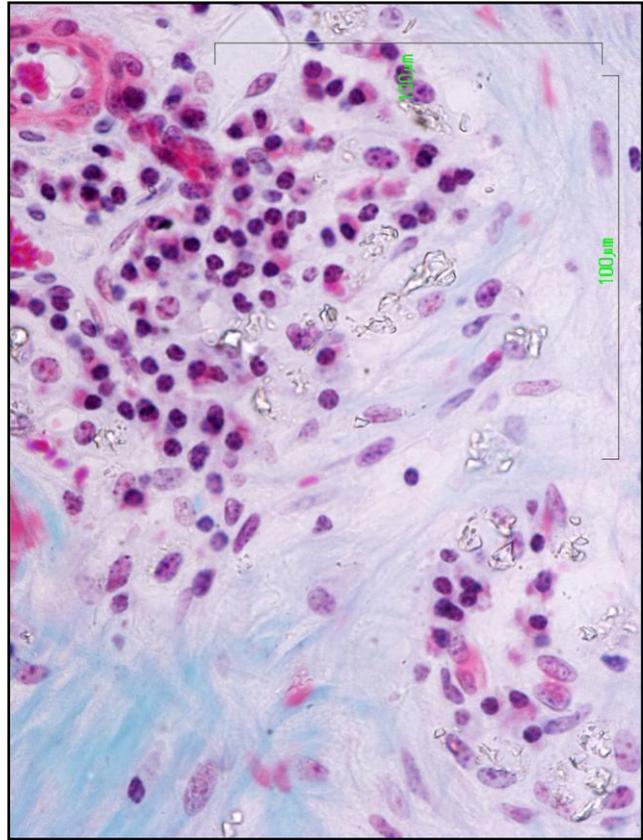


Fig.49 (40x)

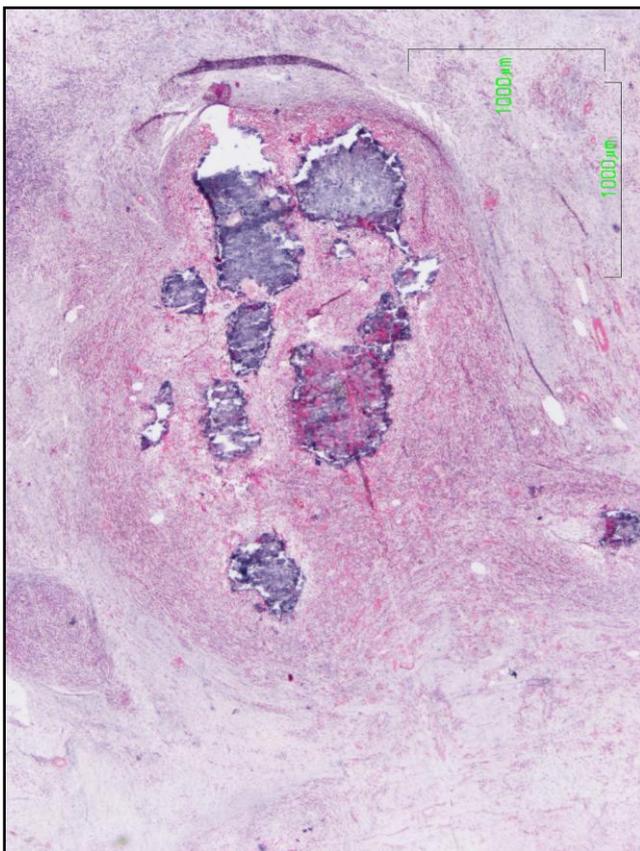


Fig.50 (2x)

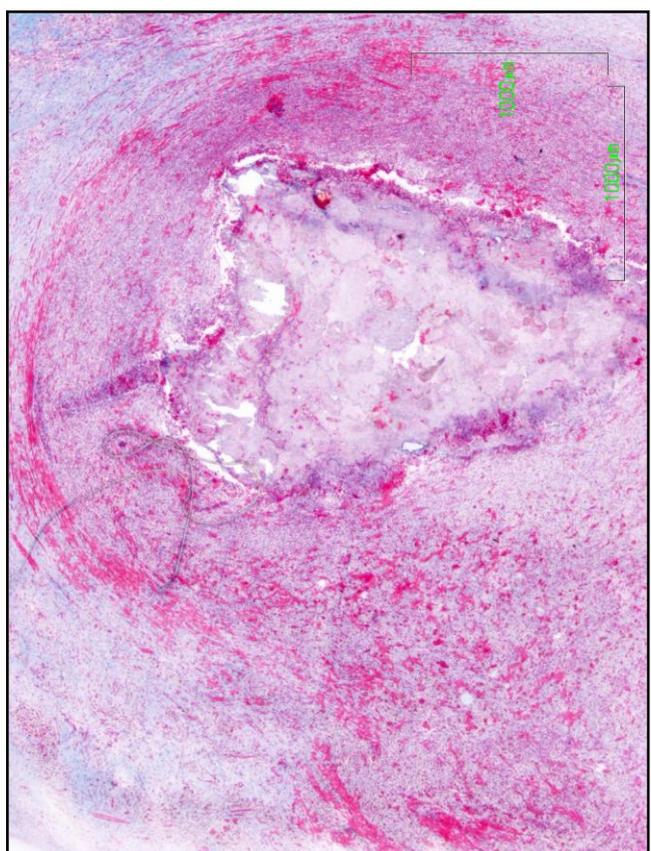


Fig.51 (2x)

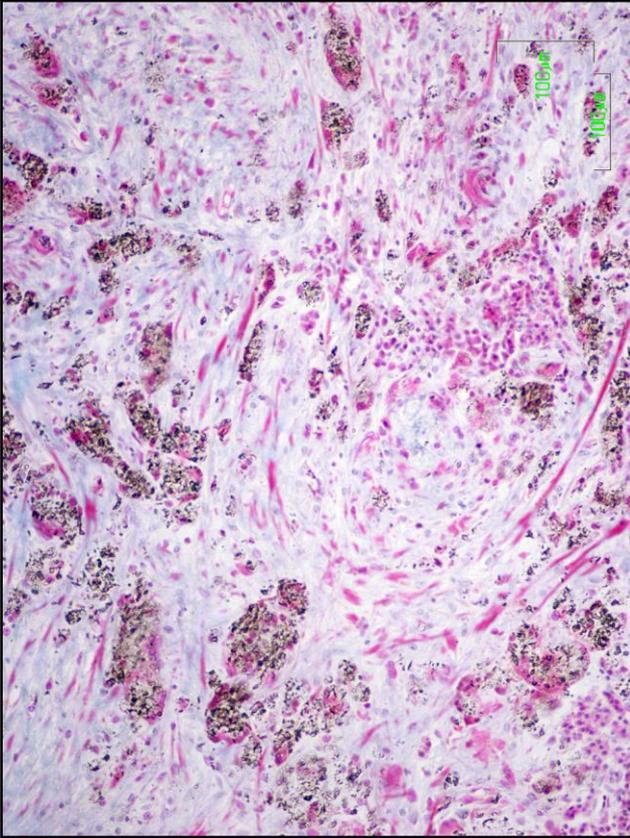


Fig.52 (4x)

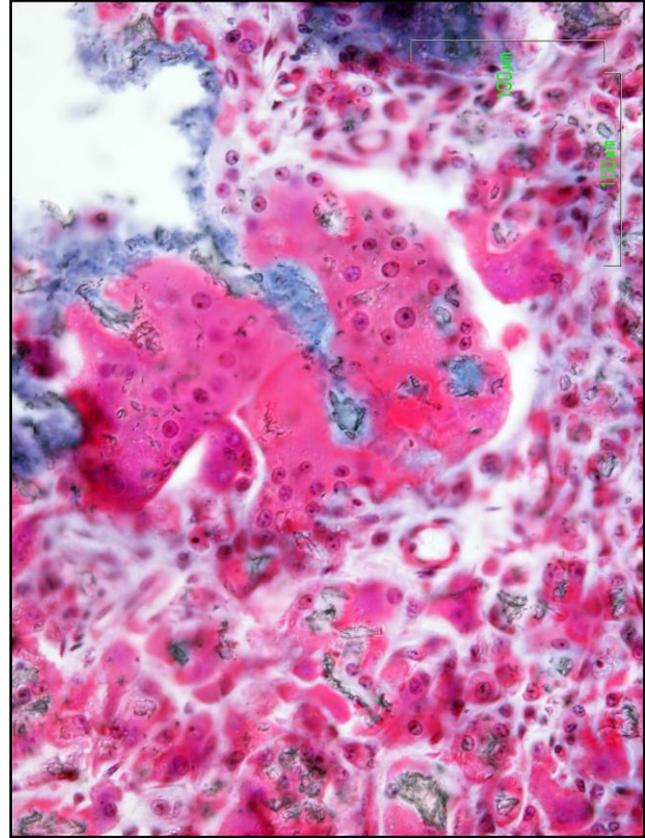


Fig.53 (20x)

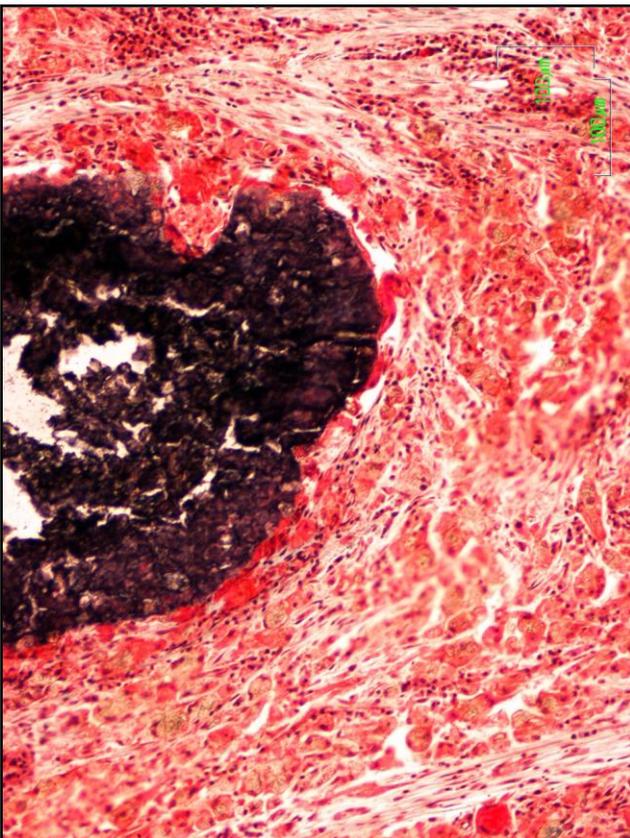


Fig.54 (10x)

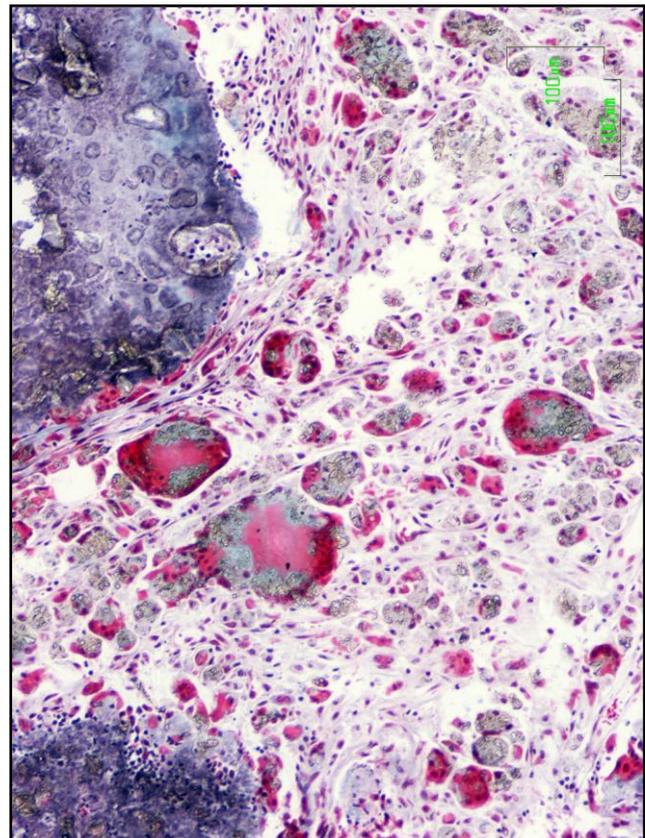


Fig.55 (10x)

Fig.44 (caso 5, F).- Fotografía que muestra diversas formaciones granulomatosas, con un elevado componente celular inflamatorio. El tejido conectivo formado presenta una notable vascularización sobre todo en la zona superficial del defecto. Los vasos presentan finas paredes con luces grandes y dilatadas. (2x, TG).

Fig.45 (caso 1, B).- Imagen representativa del centro de la cavidad donde se ha desarrollado tejido conectivo denso, donde se aprecian las fibras de colágeno (de color rosado) y focos localizados de componente inflamatorio. (4x, TG).

Fig.46 (caso 3, F).- Muestra el tejido conectivo formado, donde se distingue alguna fibra de colágeno (color rosado) y un importante infiltrado inflamatorio. (4x, TG).

Fig.47 (caso 1, F).- Detalle de una prominente respuesta inflamatoria con abundante celularidad que rodea a un resto de material. Todo ello desarrollado dentro de un tejido conectivo denso. (10x, TG).

Fig.48 (caso 5, E).- Detalle de una zona de tejido necrosado, donde se observan los núcleos picnóticos de las células apoptóticas. (20x, TG).

Fig.49 (caso 5, C).- Imagen de gran aumento que pone de manifiesto la presencia de células plasmáticas, que son un índice de respuesta inflamatoria de tipo crónico, presente en la mitad de los casos 3, 4 y 5 del material A. (40x, TG).

Fig.50 (caso 2, B).- Imagen panorámica de la zona central del defecto, en donde se ha desarrollado la formación de tejido conectivo y se localizan grandes restos de material. Además aparece un abundante componente celular de tipo inflamatorio, sobre todo alrededor del material remanente. (2x, TG).

Fig.51 (caso 5, E).- Panorámica que representa la parte central se distingue una zona de tejido necrosado, dentro del tejido conectivo formado. Aparecen también fibras colágenas delimitando la zona necrosada y una elevada celularidad. (2x, TG).

Fig.52 (caso 6, B).- Detalle del tejido conectivo formado, con fibras colágenas. Aparecen partículas de material remanente, algunas de ellas en el interior de los macrófagos ya que han sido fagocitadas. (10x, TG).

Fig.53 (caso 4, D).- Detalle de una célula gigante multinucleada que rodea casi por completo un resto de material de gran tamaño. Además aparecen numerosas células multinucleadas, de menor tamaño, ocupando todo el espacio de la cavidad, en asociación con partículas de material. Se observa también un vaso sanguíneo. Imagen del caso 4. (20x, TG).

Fig.54 (caso 11, A).- Imagen en detalle donde se aprecia un gran resto de material delimitado por células multinucleadas. El tejido conectivo está totalmente ocupado por una severa infiltración de células multinucleadas. (10x, VK).

Fig.55 (caso 6, A).- Aparecen restos de material de gran tamaño y células multinucleadas rodeando restos de material más pequeños. También se diferencian macrófagos con partículas de material en el interior de su citoplasma. (10x, TG).

A partir de la evaluación histológica podemos apreciar algunas diferencias entre los materiales *E* y *F* del resto. Se distinguen, por un lado grandes restos de material que aún no han sido reabsorbidos y por el otro, la ausencia de pequeñas partículas, a la vez que también es escasa o casi nula la presencia tanto de macrófagos como de células gigantes multinucleadas. En ambos casos destaca que el predominio celular es del tipo mononuclear inflamatorio, siendo de tipo crónico en la mayoría de los casos, con presencia de células plasmáticas.

Sin embargo en el resto de los materiales pertenecientes al grupo I, encontramos una respuesta celular totalmente opuesta en donde predomina la presencia de células gigantes multinucleadas y macrófagos en asociación con restos de material de pequeño tamaño. De hecho, se pueden diferenciar restos de material en el interior del citoplasma de los macrófagos debido a procesos de fagocitosis.

A pesar de estas diferencias, ninguno de estos materiales ha inducido la regeneración del defecto óseo. Sin embargo hemos considerado oportuno hacer una consideración en relación a tres de los casos (1, 7 y 9) del material *A* y dos de los casos (2 y 4) del material *B*; ya que en estos casos se han encontrado signos de regeneración ósea. Los defectos en estos casos presentan áreas ocupadas por hueso regenerado, en las que la mayor parte adquieren una organización de hueso trabecular, aunque la regeneración ósea también se ve representada por la formación de espículas óseas. Estos casos se detallaran a continuación como casos excepcionales y se analizaran siguiendo la misma dinámica que para los anteriores casos, comenzando con la valoración de las imágenes de TAC.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

A continuación presentamos las imágenes de TAC tomadas de la parte central de la pieza ósea donde se implantó el material *A* durante el periodo de experimentación. Estas imágenes son representativas de aquellos casos en donde se han producido máximos signos de regeneración ósea, tal y como se han detectado en los casos 1,7 y 9 del material *A* y caso 2 y 4 del material *B*.



Fig.56. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 1 del material *A*.

En la Fig.56 vemos como el defecto presenta una elevada captación radiológica a lo largo de todo el ensayo, mostrando toda la cavidad radiodensa de mayor intensidad que el hueso normal y continua entre los extremos del defecto; aunque progresivamente, en la zona externa del defecto se va perdiendo radiodensidad a lo largo del experimento. De este modo, a las 16 semanas la imagen de TAC presenta la cavidad del defecto con una elevada radiopacidad excepto en la parte más externa, donde aparece una zona radiotransparente que se invagina levemente hacia el interior de la cavidad.

VALORACIÓN DE LAS IMÁGENES RADIOLÓGICAS Y DE LUPA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.-

A partir de las imágenes radiológicas podemos ver si existe una correlación con la valoración realizada mediante las imágenes de TAC en distintos tiempos y la imagen radiológica una vez finalizado el tiempo de experimentación.

En la radiografía que muestra la Fig.57 se detectan signos de reparación ósea radiológica, de forma que el defecto muestra una radiodensidad homogénea y continúa con el hueso adyacente, en toda la cavidad del defecto. Estos signos son tan similares a la radiopacidad del hueso normal que en la imagen radiológica no es posible discriminar fácilmente la localización los defectos óseos regenerados, por eso se ha encuadrado.

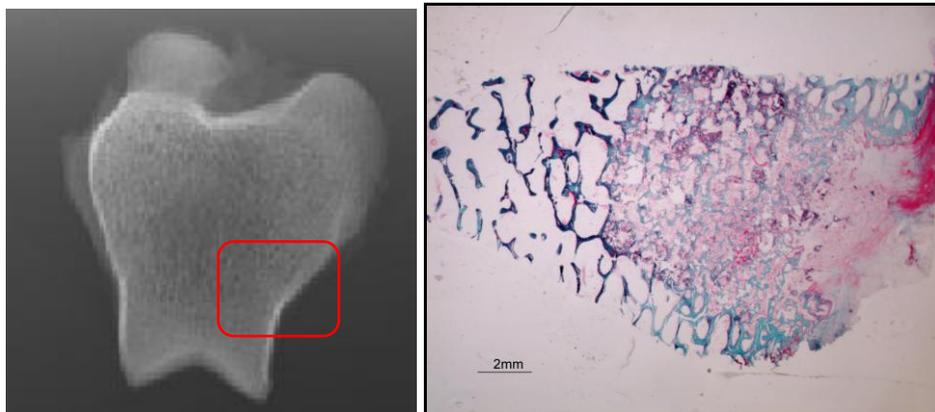


Fig.57. Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico correspondiente al caso 1 del material A.

Las fotos panorámicas de lupa de las secciones histológicas permiten obtener una visión conjunta y general de la apariencia del defecto. En relación a la foto de lupa de la Fig.57, es muy ilustrativo ver como se aprecia la formación de un entramado trabecular desorganizado. Las trabéculas regeneradas muestran osteointegración de material y se encuentran en continuidad con el hueso adyacente. Sin embargo, la zona superficial del defecto, correspondiente a la zona cortical, tal y como se apreciaba en las imágenes de TAC mediante una zona radiotransparente, no se ha regenerado, si no que se ha desarrollado la formación de tejido conectivo.

VALORACIÓN HISTOLÓGICA.-

Seguidamente se van a analizar las imágenes microscópicas de los cortes histológicos de aquellos casos que presentan signos regeneración ósea. En estos casos el hueso trabecular neoformado ocupa casi la totalidad de la cavidad menos en la zona superficial, donde se ha formado tejido conectivo de tipo laxo. En el caso 7 del material A aunque también apreciamos la formación de trabéculas regeneradas, ésta no se encuentra tan desarrollada, ya que solo aparece regeneración en la mitad interna del defecto, manteniéndose el resto ocupado por tejido conectivo. El hueso trabecular regenerado en estos casos, presenta trabéculas desorganizadas, anastomosadas, con gran osteointegración del material y zonas con grandes depósitos de matriz orgánica aún no mineralizada. Sin embargo, en los espacios intertrabeculares encontramos tejido conectivo con una infiltración severa de células multinucleadas y macrófagos asociados a numerosas partículas de material remanentes. Es preciso destacar, que en todos los casos donde el defecto se encuentra regenerado, la zona cortical no lo está. Presenta un hundimiento, encontrándose la formación ósea en un nivel más bajo que el nivel en el que se encuentra la cortical del hueso normal adyacente. Esta diferencia de altura en la zona del periostio está ocupada por la formación de tejido conectivo.

En dos de los casos del material A, el 1 y 7 la vascularización es destacable (Fig.60); y en los casos 7 y el 9, se distingue la transición de tejido conectivo a adiposo (Fig.61).

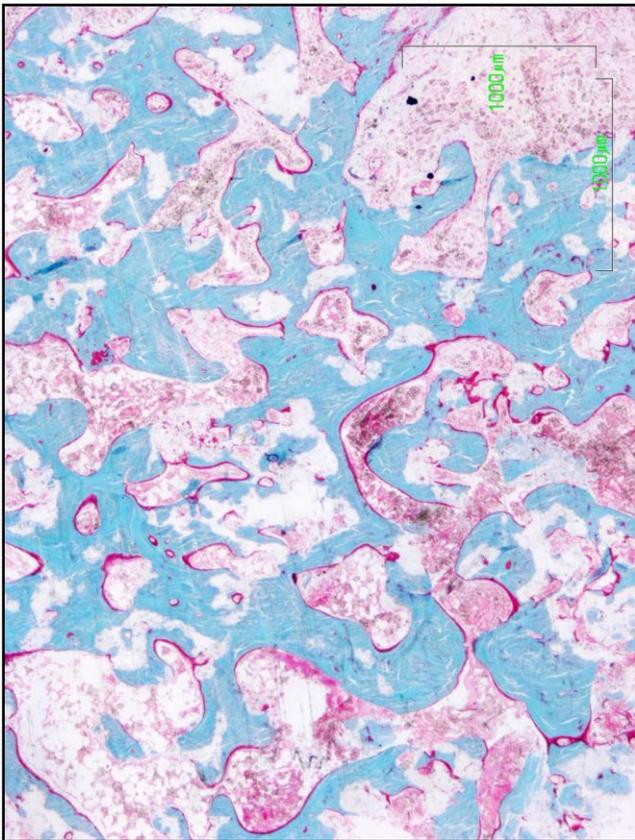


Fig.58 (2x)



Fig.59 (2x)

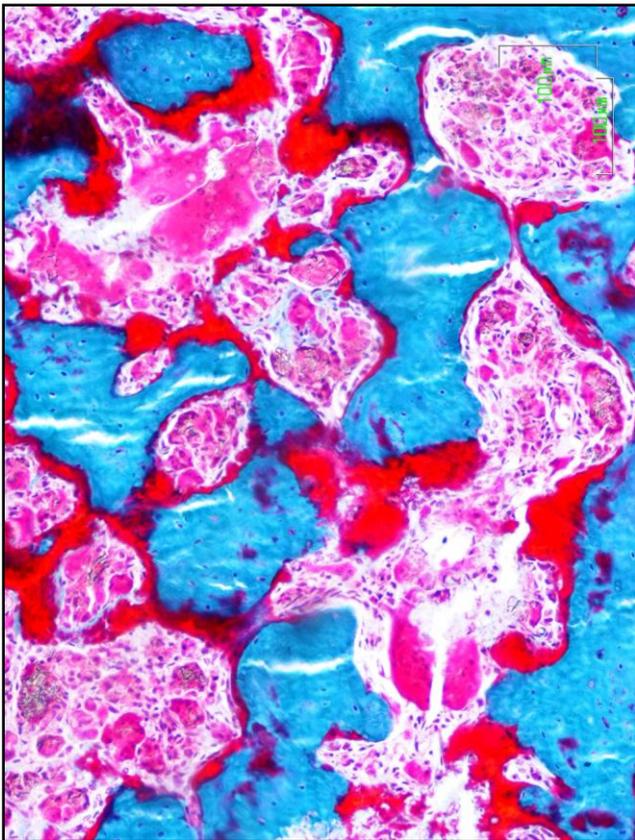


Fig.60 (10x)

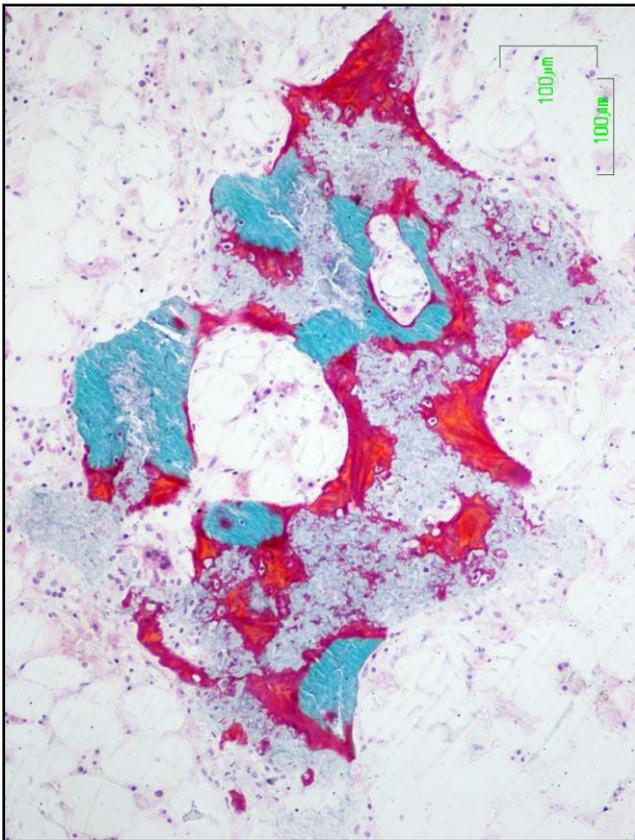


Fig.61 (10x)

Fig.58 (caso 4, B).- Panorámica que muestra un hueso desorganizado, con trabéculas gruesas, anastomosadas, en cuyas superficies óseas presenta líneas de osteoide. Dentro de las trabéculas aparecen zonas blancas, correspondientes al lugar que ocupaba el material integrado en ellas, que debido a los procesos de manipulación se ha perdido. En los espacios intertrabeculares se ha desarrollado tejido conectivo donde aparecen partículas de material. (2x, TG).

Fig.59 (caso 4, B).- Corresponde a una imagen panorámica teñida con la técnica de Von Kossa. Se puede apreciar el correcto grado de mineralización del hueso trabecular neoformado, ya que presenta una coloración negra homogénea. Las zonas en rojo indican una deficiencia de mineralización del hueso. Al igual que la Fig.58, las zonas blancas dentro de las trabéculas corresponden a los lugares de integración del material. (2x, VK).

Fig.60 (caso 7, A).- Detalle del hueso trabecular neoformado. Se aprecia una gran actividad osteosintética ya que toda la superficie trabecular presenta zonas aún no calcificadas. Las trabéculas están muy desorganizadas. En los espacios medulares encontramos numerosas células multinucleadas y macrófagos con restos de material fagocitados. Se percibe algún vaso de pequeño diámetro. (10x, TG).

Fig.61 (caso 9, A).- Imagen a gran aumento que presenta una espícula ósea regenerado, con notable osteointegración de restos de material. Gran parte del material presenta zonas con matriz orgánica aún no calcificada. La espícula ósea se encuentra rodeada por tejido adiposo. (10x, TG).

En resumen, podemos considerar que la respuesta común encontrada entre los diferentes materiales que conforman el grupo I es la ausencia de regeneración ósea, ya que predominan las cavidades con desarrollo de tejido conectivo. Dentro del grupo I podemos hacer dos subgrupos, discriminando por un lado aquellos materiales (*E* y *F*) compuestos por un elevado contenido de β -TCP y una menor concentración de gel de sílice, en comparación con el resto de materiales pertenecientes al grupo I (*A*, *B*, *C* y *D*). La respuesta encontrada frente a la implantación de los materiales *E* y *F* es la formación de tejido conectivo pero que no llega a ser de tipo denso como en el resto de los materiales. En estos casos encontramos grandes restos de material, tanto de pequeño como de gran tamaño asociado una respuesta celular de tipo inflamatorio. Por el contrario, en los materiales *A*, *B*, *C* y *D*, aunque también encontramos restos de material, éstos son de pequeño tamaño y están asociados a células gigantes multinucleadas y macrófagos. Es preciso destacar que en algunos de los casos de los materiales *A* y *B* se han encontrado signos de regeneración ósea como se ha comentado con detalle anteriormente.

Tabla resumen del GRUPO I: material A.-

Grupo I: material A	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Defecto con una región radiodensa que ocupa toda la cavidad menos la zona superficial.	Defecto con una región radiodensa que ocupa toda la cavidad menos la zona superficial.	No se ve muy clara, pero parece regenerado, presenta un entramado trabecular similar al hueso adyacente y en continuidad con este.	Zona cortical embebida hacia dentro, con formación de tejido conectivo. Resto del defecto presenta hueso trabecular regenerado.	Zona cortical: tejido conectivo con restos de material, células multinucleadas y macrófagos. Resto del defecto: hueso trabecular regenerado, gran integración material-hueso, Abundantes líneas de osteoide y partículas de material. Zonas con deficiencia en mineralización.
Caso 2	F.D.	Defecto radiolúcido, se aprecia un punto radiodenso en el centro de la cavidad.	Defecto radiotransparente.	Radiografía de la pieza entera: se ve el orificio del defecto, la parte superficial.	La orientación del bloque no es adecuada, ya que sólo se aprecia la zona más interna del defecto, que no está regenerado.	Defecto no regenerado. Restos de material. Alguna espícula ósea con osteoide y deficiencia en mineralización. Defecto con tejido conectivo laxo. Se aprecia una cierta osteointegración de material en las espículas óseas. Abundantes células multinucleadas. Pequeños focos inflamatorios.
Caso 3	F.D.	Se aprecia el contorno del defecto porque presenta una línea gruesa radiodensa. Defecto radiotransparente, con un punto radiodenso aislado.	Defecto radiolúcido. Paredes del defecto presentan una gruesa línea radiodensa. En el interna se aprecian gránulos radiodensos.	No regenerado.	No regenerado. Tejido conectivo con restos de material.	No regenerado, tejido conectivo, con abundantes restos de material y células multinucleadas. Espículas óseas con material integrado, con líneas de osteoide y zonas no mineralizadas.
Caso 4	F.D.	Radiolúcido. Mancha muy difusa levemente radiodensa en la parte más interna del defecto.	Radiotransparente.	Mitad superior no regenerada. Mitad interna presenta un entramado trabecular desorganizado, radiodenso, aunque no en continuación con el hueso adyacente.	Zona externa: no regenerada, hay tejido conectivo. Zona interna: regenerada.	Zona cortical: desarrollo de tejido conectivo denso, con abundantes células multinucleadas y macrófagos con material fagocitado. Zona interna: hueso regenerado, trabéculas gruesas, con osteointegración de material, deficiencia de calcio y osteocitos inmaduros. Espacios intertrabeculares con numerosas células multinucleadas asociadas a partículas. Tejido adiposo. Material integrado: 2 fases.
Caso 5	T.I.	El contorno del defecto presenta una gruesa línea radiodensa. Defecto radiolúcido, con un pequeño punto radiodenso en el centro de la cavidad.	Defecto radiolúcido. Gruesa línea radiodensa que delimita la cavidad del defecto. Se aprecia un punto más radiodenso en el centro del defecto.	Defecto no regenerado, aparece un punto radiodenso en el centro de la cavidad.	No regenerado. Tejido conectivo denso. Hay grandes restos de material.	No regenerado. Tejido conectivo denso con grandes depósitos blanco de material en el centro de la cavidad. INFLAMACIÓN CRÓNICA. NECROSIS.
Caso 6	T.I.	Radiolúcido, de gran tamaño, alcanza el canal medular. La médula aparece muy radiodensa.	Radiotransparente, de gran tamaño, alcanza el canal medular. La médula aparece muy radiodensa. Se observan gránulos aislados radiodensos.	Defecto no regenerado, gran mancha radiodensa que ocupa toda la cavidad del defecto y está en la médula.	No regenerado. Tejido conectivo. Hay numerosos restos de material.	No regenerado. Tejido conectivo con numerosos restos de material. Muchas células con material fagocitado. Gran respuesta INFLAMATORIA CRÓNICA.
Caso 7	T.I.	Radiotransparente.	Radiotransparente. El contorno de la cavidad presenta una línea gruesa radiodensa. En los laterales y el interna aparecen unas manchas difusas levemente radiodensas.	No se ve claro. No se aprecia la localización del defecto.	Mitad externa: tejido conectivo. Mitad interna: hueso regenerado, con abundantes líneas de osteoide.	Zona superficial: tejido conectivo, vascularizado, con abundantes restos de material y partículas, macrófagos con material fagocitado, células multinucleadas. Respuesta INFLAMATORIA. Zona interna: hueso trabecular regenerado, osteocitos inmaduros, deficiente en mineralización, con abundante osteoide. En los espacios intertrabeculares hay células INFLAMATORIAS, partículas de material y tejido adiposo.
Caso 8	T.D.	Contorno del defecto presenta una línea radiodensa. La mitad interna muestra una mancha difusa levemente radiodensa.	Ya no se aprecia la línea radiodensa. Aparece en la mitad interna del defecto una zona levemente radiodensa en continuidad con el hueso normal.	No regenerado.	No regenerado, desarrollo de tejido conectivo denso.	No regenerado. Tejido conectivo denso muy vascularizado, muchos restos de material asociados a células multinucleadas. Hueso que rodea a la cavidad del defecto, en contacto con el tejido conectivo muestra regeneración, trabéculas gruesas y desorganizadas, osteointegración material, línea de osteoide. Cavidades intertrabeculares hay muchos restos de material y células gigantes dentro de tejido conectivo laxo.
Caso 9	H.I.	Defecto relleno por completo por una mancha radiodensa homogénea.	Defecto relleno por completo por una mancha radiodensa homogénea.	No se ve clara.	REGENERADO. Hueso trabecular neoformado con material osteointegrado.	Defecto regenerado. También hay muchas espículas óseas con abundante osteoide. Gran osteointegración. Espacio intertrabecular con tejido conectivo laxo. Centro de osificación: espículas con material osteointegrado, con células y zonas deficientes de calcio. Células multinucleadas.
Caso 10	H.I.	Defecto no regenerado, aparece un punto radiodenso grande aislado.	Defecto de gran tamaño, radiolúcido. Pequeñas manchas radiodensas en la cavidad.	No regenerado, de gran tamaño. Se ve un punto radiodenso en el centro de la cavidad.	Defecto de gran tamaño, no regenerado, con tejido conectivo denso y restos de material.	No regenerado. Notable respuesta INFLAMATORIA. NECROSIS. Abundantes depósitos de material. Tejido conectivo. Células gigantes asociadas a restos de material.
Caso 11	H.D.	Radiotransparente, con una mancha muy difusa levemente radiodensa dentro de la cavidad.	Radiolúcido. Hay gránulos radiodensos en la cavidad.	Radiotransparente. Aparecen gránulos radiodensos dentro de la cavidad.	No regenerado. Tejido conectivo denso, con abundantes restos de material.	Tejido conectivo denso por toda la cavidad. No regenerado. Abundantes depósitos de material. Zonas de elevada vascularización. INFLAMACIÓN. Células con material fagocitado, células multinucleadas.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA GRUPO I: material A										
Hueso no formado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Osteoide	
**	****	****	****	*	****	****	**	*	****	
Miudad interna del defecto: casos 4 y 7. Casos 1 (menos cortical) y 9 (completa). Caso 8 algo de regeneración pero en el hueso adyacente.	Laxo: por completo en casos 2 y 3. Escaso en casos 1, 7 y 9. Denso: por completo casos 5, 6, 8 y 10. Solo en zona superior en caso 4.	En todos los casos.	En todos los casos.	Casos 7 y 8 (abundantes, con luces dilatadas.)	En todos los casos.	Casos 1, 4, 6 y 7.	Casos 2 (poco), 7 y 10.	Casos 5 y 6.	Casos 1 y 9 notable. Casos 2, 3 y 7.	
Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación	Necrosis		
**	*	*	-	-	**	-	-	*		
Casos 1, 4, 7 y 9.	Casos 4 y 7.	Casos 4 y 7.			Casos 1, 3 (escasa en espículas óseas) y 9 (abundante).			Casos 5 y 10.		

Tabla resumen del GRUPO I: material B.-

Grupo I: material B	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	No regenerado, grandes dimensiones.	No regenerado, grandes dimensiones.	Defecto vacío.	Defecto no regenerado con formación de tejido conectivo.	Desarrollo de tejido conectivo denso. Granuloma. Resp. inflamatoria. Abundante vascularización. Remanente de partículas de material.
Caso 2	F.D.	Todo el defecto relleno por una masa homogénea radiodensa.	Todo el defecto relleno por una masa homogénea radiodensa.	No se ve clara.	Defecto regenerado, aunque cortical embebida hacia el interna con desarrollo de tejido conectivo en la zona del periostio.	Zona cortical: tejido conectivo junto con restos de material particulado. Trabéculas neoformadas, osteointegración del material. Células multinucleadas. Granulomas. Osteocitos inmaduros.
Caso 3	T.I.	No regenerado, zona radiodensa en la parte superficial central.	No regenerado, zona radiodensa en la parte superficial central.	Vacío, zona radiodensa en la parte superficial central,	Defecto no regenerado, de gran tamaño, todo ocupado por tejido conectivo.	Resp. inflamatoria aguda. Macrófagos con material fagocitado. Restos de material. Tejido conectivo.
Caso 4	T.D.	Gran zona radiodensa dispersa, no se distingue el contorno del defecto.	Zona radiodensa con forma cónica ocupando todo el defecto, menos la parte cortical que es radiotransparente.	No se ve clara.	Defecto regenerado, aunque cortical formada a una altura más baja con desarrollo de tejido conectivo.	Zona cortical: tejido conectivo junto con restos de material particulado. Trabéculas neoformadas, anastomosadas y gruesas. Osteointegración del material. Líneas de osteoide. Espacio intertrabecular: restos de material con células multinucleadas en médula adiposa.
Caso 5	H.I.	No regenerado, zona radiodensa en la parte superficial central, de gran tamaño.	No regenerado, zona radiodensa en la parte superficial central, de gran tamaño.	Vacío, zona radiodensa difusa en la parte interna del defecto.	Defecto no regenerado, de gran tamaño, con tejido conectivo y restos de material.	Abundantes restos de material. Granulomas. Células multinucleadas. Resp. inflamatoria. Espacio intertrabecular: tejido conectivo y adiposo. Vascularización de la médula amarilla.
Caso 6	H.D.	No regenerado, con pequeños y numerosos puntos radiodensos en la parte más interna del defecto.	1/2 exterior del defecto radiolúcido. 1/2 interna zona radiodensa.	Vacío, con zonas radiodensas desorganizadas en los laterales del defecto.	Defecto no regenerado, de gran tamaño, todo ocupado por tejido conectivo, con restos de material.	Resp. inflamatoria. Granulomas. Macrófagos con material fagocitado. Tejido conectivo denso. Células multinucleadas. Algún vaso sanguíneo. Necrosis.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA GRUPO I: material B

Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
*	*** (denso)	****	*****		****
Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio
*****	**** (todos menos caso 4)	Caso 3	Caso 6	-	-
Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas
*	*	-	-	**	****
Caso 2				Casos 2 y 4	Casos 1, 2, 5 y 6
Encapsulación					
-					

Tabla resumen del GRUPO I: material C.-

Grupo I: material C	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Línea radiodensa que delimita el contorno del defecto. Zona radiodensa en el centro del hueco.	Igual que 8 sem pero la zona es más pequeña y de menor radiodensidad.	Defecto radiolúcido, aunque se distingue un entramado trabecular levemente radiodenso.	No se ha podido evaluar.	No se ha podido evaluar.
Caso 2	F.D.	Línea radiodensa que delimita el contorno del defecto.	Cavidad radiotransparente. Gruesa línea radiodensa que delimita el contorno del defecto.	Defecto mayoritariamente radiolúcido, aunque se ve un entramado trabecular levemente radiodenso en el interior.	Defecto no regenerado. El hueso adyacente ha reaccionado y se ven procesos de remodelación, presenta cierta actividad osteogénica. Formación de una prolongación ósea en forma de puente.	Debido al corte lateral, parece que se ha estrechado el defecto, como si se hubiera regenerado parcialmente. Pero el defecto presenta tejido conectivo laxo, con células multinucleadas en relación a restos de material. Zona del periostio abundantes vasos dilatados. Zona de hueso, lateral al defecto: integración material-hueso, notable osteoide, deficiencia en calcio y osteocitos inmaduros.
Caso 3	T.I.	Defecto radiolúcido, de grandes dimensiones. Con una pequeña zona radiodensa en el centro del hueco.	Defecto radiotransparente, algo estrechado lateralmente. Parte profunda radiodensa e irregular.	Defecto radiotransparente.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo denso, con grandes restos de material. Formación de granulomas.	Defecto no regenerado. Inflamación crónica. Gran resto de material en el centro. Numerosas células multinucleadas en asociación con partículas remanentes de material. Gran vascularización en la zona del periostio. Desarrollo de tejido conectivo denso. Respuesta del hueso adyacente similar al caso 5.
Caso 4	T.D.	Defecto radiolúcido, alcanza el canal medular. Zona más interna radiodensa.	Cavidad radiotransparente, llega al canal medular. Zona radiodensa en la profundidad del defecto.	En la zona superficial hay una región radiodensa.	Defecto no regenerado, desarrollo de tejido conectivo. En la parte interna existe alguna espícula ósea.	Defecto no regenerado. Necrosis. Gran depósito de material. Inflamación crónica. Transición de tejido conectivo a adiposo. Zona interna presenta espículas óseas, con osteointegración de material, osteoide y deficiencia en mineralización. Numerosas partículas de material.
Caso 5	H.I.	Línea radiodensa que delimita el contorno del defecto. Región radiodensa en el centro.	Defecto radiolúcido.	Defecto radiolúcido.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo denso y granulomas.	Defecto no regenerado. Gran depósito de material. Inflamación crónica. Elevada vascularización. Desarrollo de tejido conectivo laxo. Notables restos particulados de material en asociación a las células inflamatorias.
Caso 6	H.D.	Defecto con contorno radiodenso tenue irregular. Amplia región fuertemente radiodensa en el centro del defecto.	Defecto con un entramado irregular, levemente radiodenso.	No se ve muy claro, apariencia de entramado trabecular levemente radiodenso dentro del defecto.	Defecto no regenerado, con tejido conectivo laxo. Se distinguen espículas óseas neoformadas.	No regenerado. Numerosas espículas óseas con abundante osteoide, rodeadas por tejido conectivo laxo y muchas partículas de material junto con células multinucleadas. Integración material-hueso. Muchos centros de osificación. Presencia de vasos.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA GRUPO I: material C					
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
*	*****	*****	*****	****	****
Casos 4 y 6 presentan espículas neoformadas.	Todos los casos menos el 3 (denso) presentan conectivo laxo.	Grandes depósitos.		Casos 2, 3, 4, 5 y 6.	
Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio
-	*****	*****	*	*	-
	Casos: 3, 4 y 5 Inflamación crónica profusa.	Casos: 3, 4 y 5 Inflamación crónica profusa.	Caso 4.	Caso 6: espículas neoformadas	
Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas
-	-	-	-	**	****
	Caso 4			Casos 4 y 6.	Casos 3, 4 y 5
Encapsulación					
-					

Tabla resumen del GRUPO I: material D.-

Grupo I: material D	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Defecto no regenerado, en el centro zona radiodensa.	Defecto radiotransparente.	Defecto no regenerado. Línea radiodensa gruesa que delimita el contorno del defecto. Aparecen pequeños puntos radiodensos en el interior del defecto.	Defecto no regenerado, con desarrollo de tejido conectivo denso y restos de material.	No regenerado, gran desarrollo de tejido conectivo. Numerosa infiltración de células multinucleadas y material fagocitado. Notable vascularización. Transición de tej-conectivo a adiposo.
Caso 2	F.I.	Defecto no regenerado, en el centro zona radiodensa.	Defecto vacío, aunque se aprecia una mancha muy difusa lligeramente radiodensa.	Defecto no regenerado. Línea radiodensa gruesa que delimita el contorno del defecto. Aparecen pequeños puntos radiodensos en el interior del defecto.	Defecto no regenerado de gran tamaño, desarrollo de tejido conectivo denso, con grandes restos de material.	No regenerado, todo tejido conectivo. Zona del periostio abundante vascularización, con vasos dilatados. Inflamación. Grandes restos de material y también partículas. Abunantes células multinucleadas con material fagocitado.
Caso 3	F.D.	Defecto no regenerado, mancha difusa ligeramente radiodensa en todo el defecto menos en la zona cortical.	1/2 externa del defecto radiolúcida. 1/2 interna zona radiodensa.	1/2 superficial radiolúcida, 1/2 interna traza irregular levemente radiodensa.	Defecto no regenerado, parte externa con desarrollo de tejido conectivo. Parte interna aparecen pequeñas espículas óseas.	1/2 externa no regenerada: tejido conectivo, con abundantes partículas, células multinucleadas y macrófagos con material fagocitado, vasos dilatados. 1/2 interna: trabéculas neoformadas con material integrado.
Caso 4	T.D.	Amplia zona radiodensa que ocupa casi todo el defecto.	Línea gruesa radiodensa que delimita el contorno de la cavidad del defecto. Se aprecia la mancha radiodensa, pero es más tenue.	Defecto no regenerado. Contorno del defecto se aprecia por una línea radiodensa gruesa. Pequeño depósito radiodenso en el centro del defecto.	Defecto no regenerado, con desarrollo de tejido conectivo denso, con grandes restos de material.	Defecto no regenerado, relleno por tejido conectivo. Notable inflamación. Células multinucleadas rodeando restos de material. Abundantes restos de material.
Caso 5	H.I.	Defecto radiotransparente, de grandes dimensiones.	Defecto radiotransparente, de grandes dimensiones.	Defecto vacío de gran tamaño.	Defecto no regenerado de gran tamaño, no hay prácticamente hueso adyacente, con desarrollo de tejido conectivo denso, con grandes restos de material.	INFECCIÓN. NECROSIS.
Caso 6	H.D.	Radiotransparente salvo por un gran depósito radiodenso en el centro de la cavidad.	Radiotransparente con un depósito radiodenso, reducido en tamaño en comparación con 8 sem, en el centro de la cavidad.	Defecto vacío, se aprecia con una línea radiodensa gruesa el contorno del hueco. Depósito radiodenso en el centro del defecto.	Defecto no regenerado de gran tamaño, con desarrollo de tejido conectivo denso, con grandes restos de material.	No regenerado, desarrollo de tejido conectivo, con numerosas células multinucleadas y material fagocitado (menos que el caso 1). Hueso que rodea al defecto muestra osteoide y alguna espícula inmadura. Periostio con abundantes vasos y grandes luces. Inflamación. Granulomas.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL D (GRUPO I)

Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
-	*****	****	*****	****	****
	Denso: en todos los casos.			Zona del periostio, luces dilatadas. Casos 1, 2, 3 y 6.	
Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio
****	****	-	* (Caso 5)	-	-
Osteocitos inmaduros / maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas
-	*	-	*	*	-
	Caso 1		Abundantes en el caso 5 (infección).	Leve en el caso 3.	
Encapsulación					
-					

Tabla resumen del GRUPO I: material E.-

Grupo I: material E	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Defecto radiolúcido. Gran punto radiodenso en la profundidad.	Igual que a las 8 sem.	Defecto no regenerado.	Defecto no regenerado, con tejido conectivo y restos de material. Hueso adyacente con notable deficiencia de mineralización.	Defecto no regenerado. Tejido conectivo con restos de material. Granulomas. Inflamación crónica. El hueso que rodea al defecto ha reaccionado, presenta trabéculas remodeladas, anastomosadas, con osteoide y deficientes en calcio. En espacios intertrabeculares médula y amarilla. Vascularización.
Caso 2	F.D.	Defecto radiolúcido. Gran punto radiodenso en la profundidad.	Igual que a las 8 sem.	No se ve muy clara, aunque se intuye el defecto no regenerado.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo con restos de material.	Defecto no regenerado. Granulomas e inflamación crónica. Grandes depósitos de material remanente. Tejido conectivo laxo.
Caso 3	T.I.	Defecto radiotransparente, de gran tamaño. Zona difusa pobremente radiodensa en la zona interna.	Igual que a las 8 sem.	Defecto no regenerado, alcanza el canal medular.	Defecto de grandes dimensiones con tejido conectivo.	Necrosis. Inflamación crónica. Granulomas. Abundante material remanente.
Caso 4	T.D.	Defecto radiolúcido de grandes dimensiones. Contorno del defecto delimitado por una gruesa línea radiodensa. Zona difusa levemente radiodensa en la parte interna del defecto.	Igual que a las 8 sem.	No se ve muy clara, parece no regenerado.	Caso con una localización anatómica no adecuada: defecto realizado en la metafisis, aparece el cartílago articular.	Defecto en metafisis. Osificación endocondral. No evaluable.
Caso 5	H.I.	Defecto radiotransparente. Punto radiodenso en el fondo.	Igual que a las 8 sem.	Defecto no regenerado, con un punto radiodenso en el fondo.	Defecto no regenerado, con tejido conectivo y restos de material.	Defecto no regenerado. Inflamación crónica. Tejido conectivo laxo. Necrosis. Restos de material encapsulados. Abundantes vasos. El hueso que rodea el defecto ha reaccionado, ya que presenta trabéculas remodeladas, anastomosadas, con osteoide y deficientes en mineralización.
Caso 6	H.D.	Defecto radiolúcido, de gran tamaño. Gran zona radiodensa en parte interna.	Igual que a las 8 sem.	Defecto no regenerado, presenta zonas levemente radiodensas en la parte interna.	Defecto no regenerado, con tejido conectivo.	Defecto no regenerado. Inflamación. Grandes restos de material. Alguna célula multinucleada. Tejido conectivo laxo vascularizado con transición a tejido adiposo.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL E (GRUPO I)					
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
-	*****	****	-	**	-
	Predominio de tipo laxo, aunque se aprecian algunas fibras colágenas.	Grandes depósitos.	No hay partículas pequeñas de material.	No son muy abundantes. Casos: 1,5 y 6.	
Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio
-	*****	*****	**	*	**
	Todos los casos inflamación crónica		Casos: 3 y 5.	Aparece en hueso adyacente al defecto.	Aparece en hueso adyacente al defecto.
Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas
-	*	*	-	-	*****
	Caso 6	Caso 1			Casos: 1, 2 y 3.
Encapsulación					
* (Caso 5)					

Tabla resumen del GRUPO I: material F.-

Grupo I: material F	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Radiotransparente, de gran tamaño, pequeña nebulina radiodensa en la mitad del defecto.	Radiolúcido. Zona lateral superficial con líneas gruesas muy radiodensas, casi cierran la cortical.	No se ve el defecto.	Caso con localización anatómica alterada: realizado en metáfisis, aparece el cartílago articular.	Defecto en metáfisis. Osificación endocondral.
Caso 2	F.D.	Radiotransparente, con dos pequeños puntos levemente radiodensos en el interior del defecto.	Igual que a 8 sem.	Radiotransparente.	Defecto no regenerado, con tejido conectivo. Escasas espículas ósea.	Defecto no regenerado. Tejido conectivo. Granulomas. Inflamación crónica. Transición tejido conectivo a adiposo. El hueso que rodea la cavidad del defecto presenta deficiencia en mineralización con trabéculas gruesas remodeladas. Alguna célula multinucleada, aunque predominan las células inflamatorias. Tejido conectivo vascularizado.
Caso 3	T.I.	Radiolúcido con una pequeña zona levemente radiodensa.	Radiotransparente.	Radiotransparente.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo.	Defecto no regenerado. Tejido conectivo. Reacción inflamatoria. Gran Vascularización en zona del periostio. Tejido conectivo denso con transición a adiposo. Pocas células multinucleadas y pocos restos de material.
Caso 4	T.D.	Radiotransparente con una pequeña zona levemente radiodensa en la parte interior.	Igual que a 8 sem.	Radiotransparente.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo vascularizado. Granulomas e inflamación crónica. Alguna célula multinucleada.
Caso 5	H.I.	Radiolúcido con una pequeña zona levemente radiodensa.	Radiotransparente. Bordes del defecto con aspecto irregular.	Radiotransparente.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo. Aunque parece más pequeño. Se aprecia la reacción del hueso adyacente al defecto con trabéculas regeneradas, gruesas y anastomosadas.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo. Granulomas e inflamación crónica. Zona del periostio con notable vascularización. Hueso adyacente al defecto presenta trabéculas regeneradas, desorganizadas y con osteoide.
Caso 6	H.D.	Radiotransparente, de gran tamaño y los bordes con aspecto irregular.	Radiotransparente. Bordes del defecto con aspecto irregular.	No regenerado. Bordes del defecto irregulares.	Defecto no regenerado, formación de tejido conectivo.	Defecto no regenerado. Formación de tejido conectivo. Inflamación crónica y granulomas. Zona del periostio con notable vascularización. Restos de material en la parte interior. Transición de tejido conectivo a adiposo. Hay una zona con tejido conectivo y abundantes células multinucleadas y otra zona con tej. conectivo denso.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL F (GRUPO I)					
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
-	*****	****	*	*****	**
	Predominio denso.		Caso 5	Zona del periostio muchos vasos con luces dilatadas.	Pocas en todos los casos menos en el caso 6 que son más abundantes.
Macrófagos	Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio
-	****	*****	-	*	***
	Es focal.	Todos los casos crónica menos en caso 3.		En el hueso adyacente. Caso 5	En el hueso adyacente. Casos 2 y 3.
Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas
-	*	-	-	*	*****
	Casos 3 y 6 transición conectivo-adiposo.			Escasa: casos 3 y 6.	En todos los casos menos en el 3.
Encapsulación					
-					

GRUPO II:

El grupo II está formado por cinco materiales *G*, *H*, *I*, *J* y *K* que se diferencian en su composición química, de los otros grupos por la presencia de un vidrio bioactivo (70%SiO₂/30%CaO). De este modo, el objetivo ha sido la evaluación de estos materiales en presencia de este vidrio y estudiar su influencia como precursor del gel de sílice en lugar de un silicato de calcio, como la ps-wollastonita, utilizada en el grupo I. Se estudió también la influencia del contenido de gel de sílice y monetita, así como las sustituciones iónicas parciales de Ca²⁺ en la monetita por Zn²⁺ y Mg²⁺, así como la sustitución de parte de la monetita por fosfatos de calcio menos solubles como el β-TCP, en altas concentraciones, o la CDHA, en menor cantidad.

Estos materiales tienen en común que la fuente de monetita y gel de sílice son el vidrio bioactivo y fosfatos cálcicos como el β-TCP y CDHA, además del ácido fosfórico. Hay que destacar, aunque ya se ha comentado anteriormente en el apartado de material y métodos, que en el caso de los materiales *J* y *K*, para el proceso de síntesis sí se empleó como precursor de la monetita y el gel de sílice, la ps-wollastonita, y que además se añade vidrio bioactivo en exceso a la reacción.

Tabla 11. Composición de cada material perteneciente al grupo II.

GRUPO II	M (%)	M-Mg (%)	M-Zn (%)	CDHA (%)	β-TCP (%)	GS (%)	V (%)
<i>G</i>	74			6		18	2
<i>H</i>	55			5		37	3
<i>I</i>			51	7		39	3
<i>J</i>	45				36	14	5
<i>K</i>		45			35	15	5

Tabla 12. Número de casos realizados de cada material y su localización ósea.

GRUPO II	Nº de casos	Localización
<i>G</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I y 6: H.D.
<i>H</i>	7	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: T.D. 6: H.I y 7: H.D.
<i>I</i>	7	Caso 1: F.I. 2: F.I. 3: T.I. 4: T.D. 5: T.D. 6: H.I y 7: H.D.
<i>J</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I y 6: H.D.
<i>K</i>	6	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: H.I y 6: H.D.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

Las imágenes de TAC que se muestran a continuación corresponden a la parte central de las piezas óseas donde se han realizado los defectos óseos. Presentan las respuestas más representativas encontradas frente a la implantación de los materiales pertenecientes al grupo II.

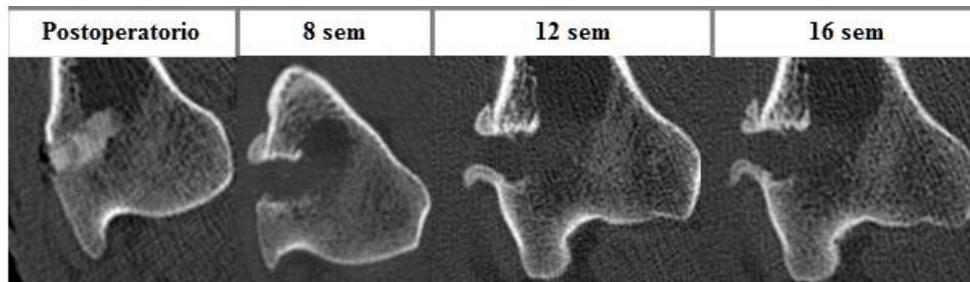


Fig.62. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 7 del material *H*.

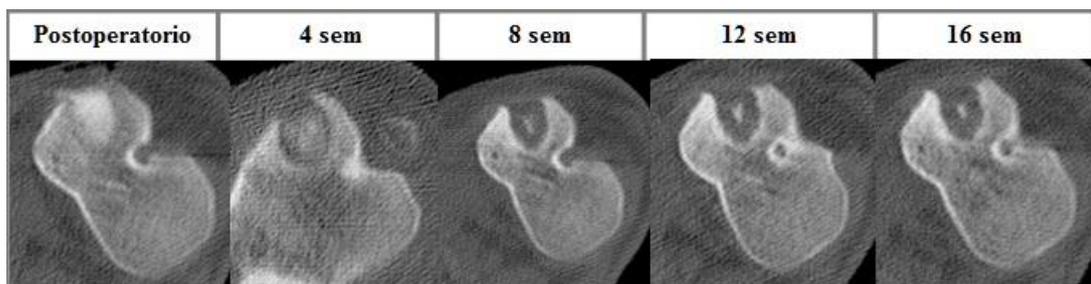


Fig.63. Imágenes de TAC del caso 1 del material *J*.

Se han seleccionado estos dos casos como ejemplos representativos de la respuesta encontrada en los materiales pertenecientes al grupo II. La tendencia general encontrada tras la observación de las imágenes de TAC, es que las cavidades óseas se muestran radiolúcidas a partir de la 8ª semana de experimentación (Fig.62). Las imágenes ponen de manifiesto una nula captación radiológica en la zona del defecto, presentando cavidades radiotransparentes, signo de que están vacías de biomaterial y tejido óseo. Este comportamiento se mantiene ya a lo largo de todo el ensayo, hasta llegar a las 16 semanas de estudio, tal como se aprecia en la secuencia de imágenes de TAC de la Fig.62.

La otra manifestación radiológica presente, aunque en menor medida que la comentada anteriormente, se muestra en la Fig.63. En la imagen de TAC correspondiente a las 4 semanas desde la implantación, la cavidad se muestra totalmente radiodensa, aunque con una captación radiológica muy difusa y en donde se aprecia una discontinuidad entre la radiopacidad dentro de la cavidad y la correspondiente al hueso adyacente. A partir de la 8ª semana de experimentación y en adelante, la captación radiológica presenta un patrón totalmente diferente. La cavidad del defecto es radiolúcida pero en el centro se distingue un pequeño punto radiopaco. El contorno del defecto óseo se encuentra delimitado por una línea gruesa radiopaca.

Este conjunto de imágenes de TAC resumen el comportamiento de todos los materiales pertenecientes al grupo II, poniendo de manifiesto que este tipo de materiales se

reabsorben rápidamente Fig.62. Sólo algunos casos presentan la manifestación radiológica que aparece en la Fig.63. De esta forma podríamos indicar que el análisis de imágenes de TAC no muestra grandes diferencias entre los distintos materiales del grupo II.

VALORACIÓN DE LAS IMÁGENES RADIOLÓGICAS Y DE LUPA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.-

Mediante las imágenes radiológicas, realizadas una vez sacrificadas las ovejas y cortadas en lonchas las piezas óseas, podemos comprobar si existe una correlación entre la valoración realizada mediante las imágenes de TAC en distintos tiempos y la imagen radiológica obtenida una vez finalizado el tiempo de estudio. Por otro lado, a partir de las fotos de lupa de las secciones histológicas, se ponen de manifiesto las respuestas tisulares más comunes provocadas frente a la implantación de los materiales pertenecientes al grupo II. De este modo podemos relacionar los signos radiológicos encontrados hasta ahora con los procesos biológicos que se manifiestan en los defectos a las 16 semanas de experimentación.

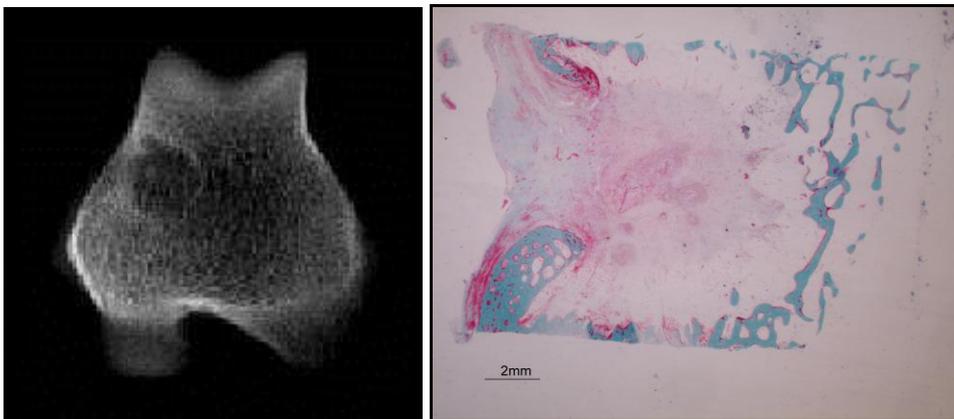


Fig.64. Imagen radiológica correspondiente al caso 2 del material *H* y su correlativa fotografía de lupa del corte histológico.

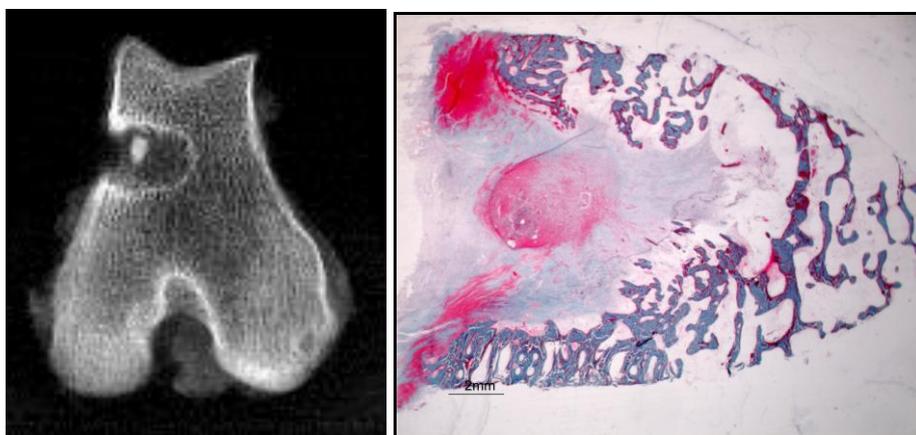


Fig.65. Imagen radiológica correspondiente al caso 2 del material *J*.

Fig.66. Fotografía de lupa del corte histológico del caso 4 del material *G* que presenta el mismo patrón radiológico.

Las imágenes mostradas ilustran las respuestas predominantes presentes en los materiales del grupo II. La radiografía de la Fig.64 corresponde a aquellos materiales que presentan las manifestaciones radiológicas de TAC expuestas en la Fig.62. En esta radiografía se distingue una cavidad totalmente radiotransparente, sin ningún tipo de captación radiológica, símbolo de que no se ha regenerado el defecto. Concretamente en este caso, se puede discernir la captación radiológica correspondiente al entramado trabecular, que es radiopaco y que rodea a la cavidad del defecto. Además en la zona externa del defecto se aprecian zonas difusas radiodensas, pudiendo ser un indicativo de una posible reacción del hueso adyacente frente a la práctica del defecto óseo.

Por otro lado, la imagen de lupa de la Fig.64 demuestra que la formación de hueso es nula y que la cavidad no se encuentra regenerada sino que se ha desarrollado la formación de tejido conectivo. En este caso concreto, tal y como se había puesto de manifiesto en la radiografía en forma de zonas difusas radiodensas; en la imagen de lupa se distinguen formaciones óseas en la zona superficial del defecto, procedentes del hueso adyacente, intentando cerrar la cavidad. Estas manifestaciones indican que se han producido leves procesos de regeneración ósea frente a la generación del defecto óseo.

Por otro lado se muestran las imágenes de las Fig.65 y Fig.66 que estarían en concordancia con aquellos casos de los materiales que presentaban las manifestaciones de TAC mostradas en la Fig.63. En la radiografía de la Fig.65 se distinguen las lesiones óseas radiolúcidas, de forma cilíndrica y con una pequeña zona fuertemente radiodensa en la cavidad del defecto. Esta captación radiológica puede corresponder a restos de material que no se han reabsorbido. Se observa una mayor captación radiológica en el contorno del defecto óseo en forma de línea radiodensa que lo delimita. Finalmente la imagen de lupa, corrobora lo observado previamente radiológicamente, al mostrar defectos no regenerados, donde la cavidad del hueso se ha rellenado por tejido conectivo denso. En la cavidad aparecen restos de material. Además se aprecia la respuesta del hueso adyacente al defecto debido a presencia de zonas de color rojo en las trabéculas óseas, índice de deficiencia de mineralización.

De este modo, mediante la valoración de las imágenes radiológicas y las fotografías de lupa de las secciones histológicas, podemos considerar que la respuesta general de los materiales del grupo II es la de no presentar fenómenos de reparación de los defectos óseos. Este comportamiento implica que no se ha producido una regeneración ósea del defecto, sino que se ha producido la formación de tejido conectivo que rellena la totalidad del defecto.

VALORACIÓN HISTOLÓGICA.-

A continuación se van a mostrar las imágenes microscópicas más representativas de los cortes histológicos de los materiales pertenecientes al grupo II. Se ponen de manifiesto las respuestas biológicas predominantes en este tipo de materiales, comunes en su mayor parte a todos ellos. Una de ellas es la formación de tejido conectivo, sobre todo de tipo denso, que ocupa por completo la cavidad del defecto ósea y muestra una profusa vascularización. Los restos de material encontrados son escasos, indicando que los materiales sufren rápidos procesos de reabsorción. Aunque en algunos de los casos del material *J* se han encontrado ciertos restos de material, asociados a células multinucleadas. En relación al componente celular presente en el tejido conectivo, es elevado y mayoritariamente de tipo inflamatorio, como leucocitos y macrófagos. En todos los materiales encontramos algún caso en el cual los procesos inflamatorios son de tipo crónico diagnosticado por la presencia de células plasmáticas, aunque en el caso del material *G* esta respuesta crónica estaba presente en todos los casos. Así mismo se han detectado numerosos macrófagos sobre todo en los materiales *G*, *H* e *I*.

En el tejido conectivo que ocupa la cavidad, también se encuentran frecuentes formaciones granulomatosas, en algunos casos, en todos los materiales pertenecientes al grupo II.

Hay que tener en cuenta que al realizar el defecto óseo, se produce una cierta respuesta del hueso adyacente, provocando procesos de regeneración ósea. En el grupo II la respuesta es mínima, detectando en todos los materiales algún caso donde se distingue una leve neoformación ósea, con trabéculas que presentan zonas deficientes en mineralización, con osteocitos inmaduros y superficies óseas, sobre todo las que se encuentran en contacto directo con el tejido conectivo desarrollado, con depósitos de matriz ósea no mineralizada y líneas de osteoide. En el material *J*, asociados a restos del material, encontramos procesos de osteointegración del mismo en trabéculas óseas neoformadas.

Dejando a un lado las respuestas biológicas generales que son comunes a todos los materiales del grupo II, hay que destacar ciertas respuestas biológicas que sólo se ponen de manifiesto en alguno de ellos. Por un lado encontramos en todos los casos del material *H* una transición de tejido conectivo a adiposo en la cavidad del defecto. Aunque también se ha encontrado la formación de tejido adiposo en algunos casos de los materiales *K* y *I*. En los materiales *J* y *I*, ciertos casos muestran el desarrollo de procesos de encapsulación de restos de material. Por último, en uno de los casos del material *G* se han producido procesos de necrosis tisular.

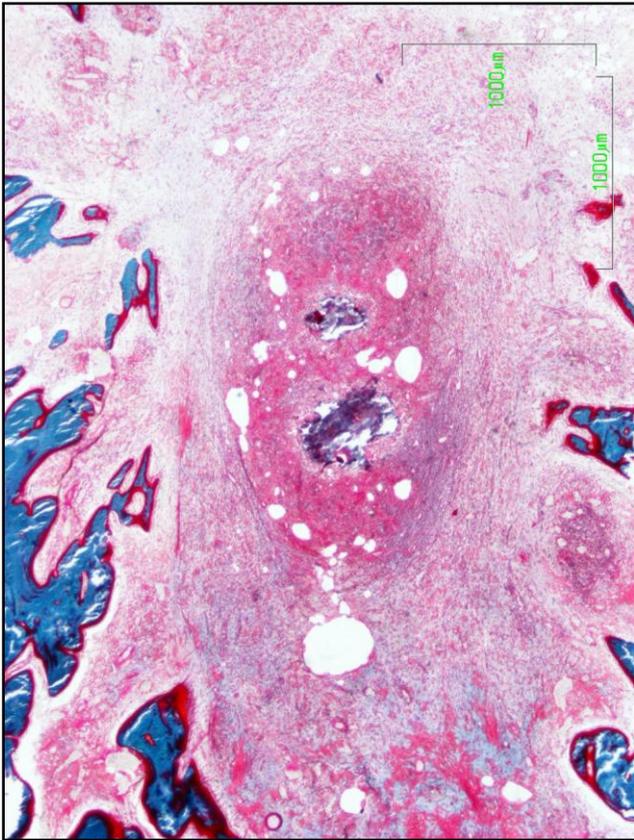


Fig.67 (2x)

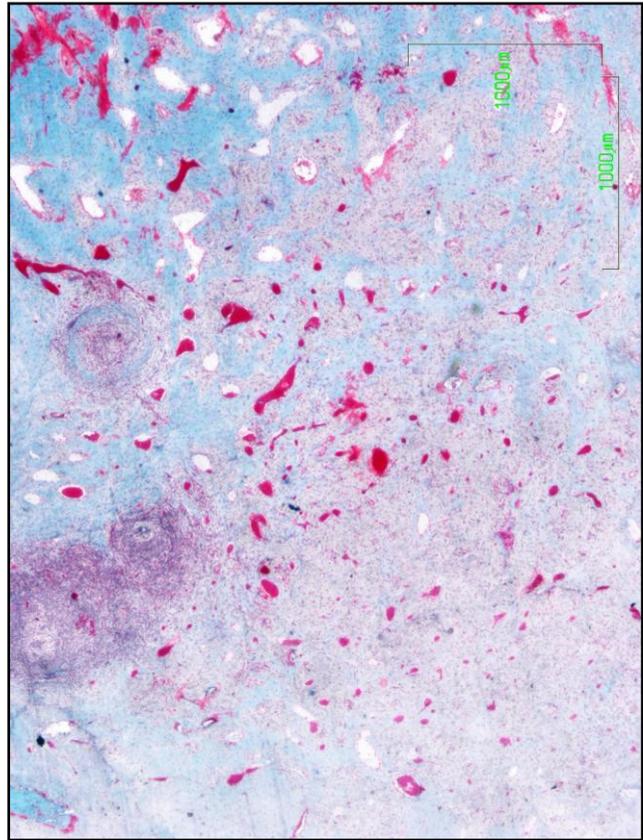


Fig.68 (2x)

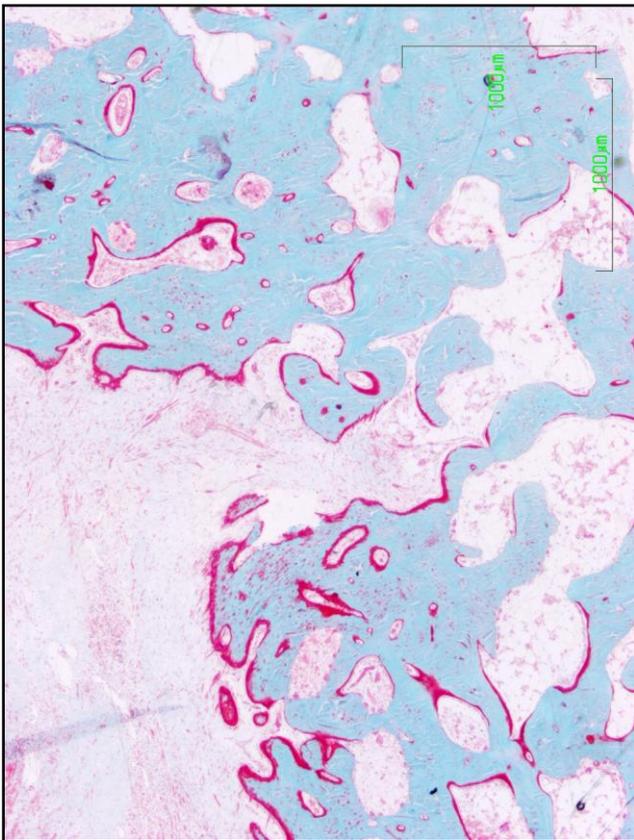


Fig.69 (2x)

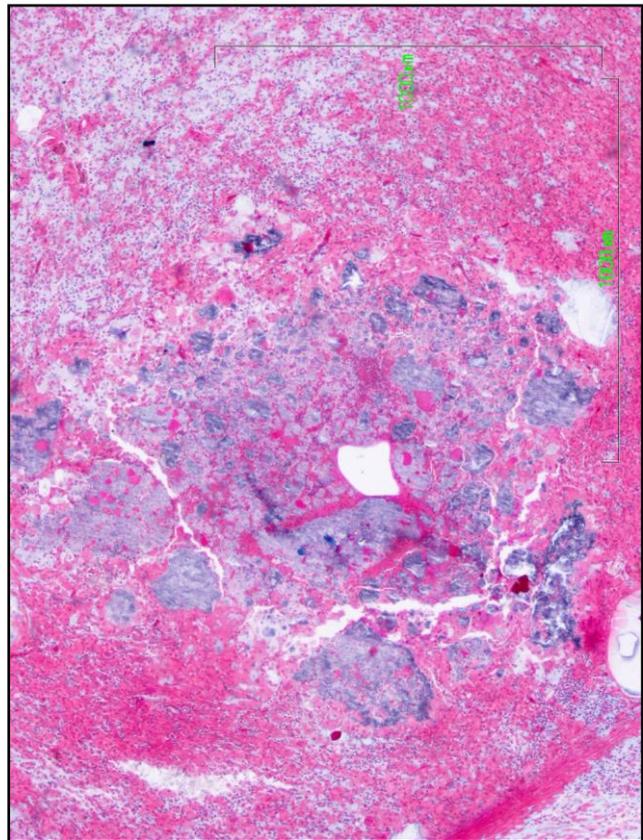


Fig.70 (2x)

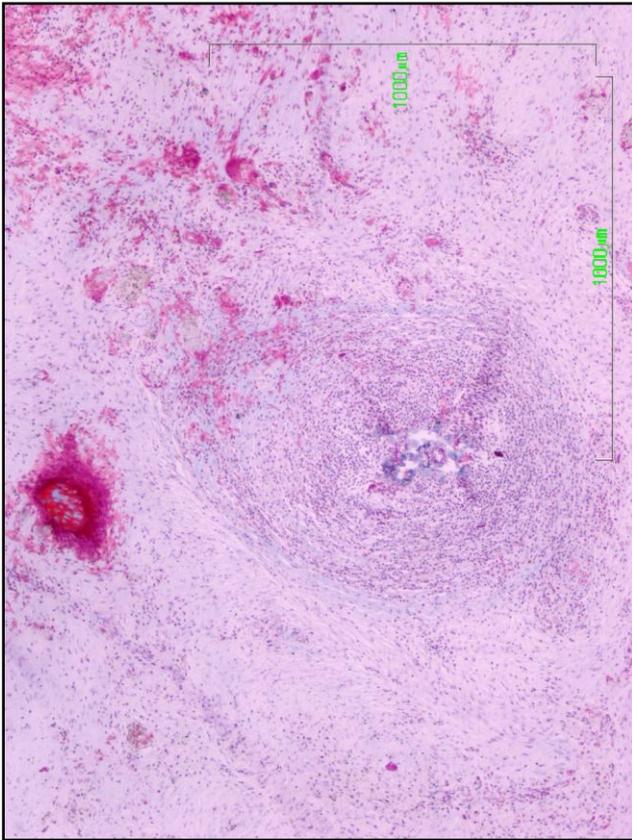


Fig.71 (4x)

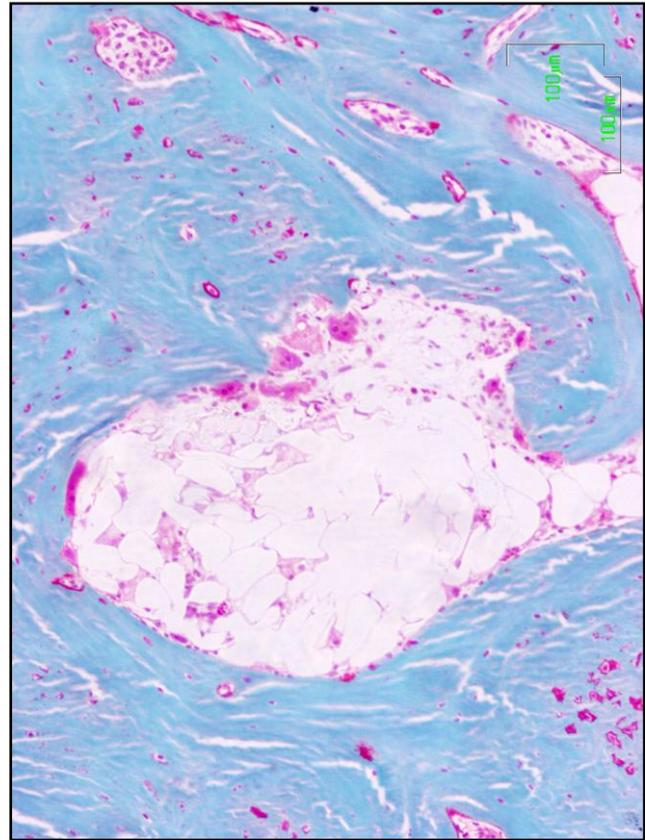


Fig.72 (10x)

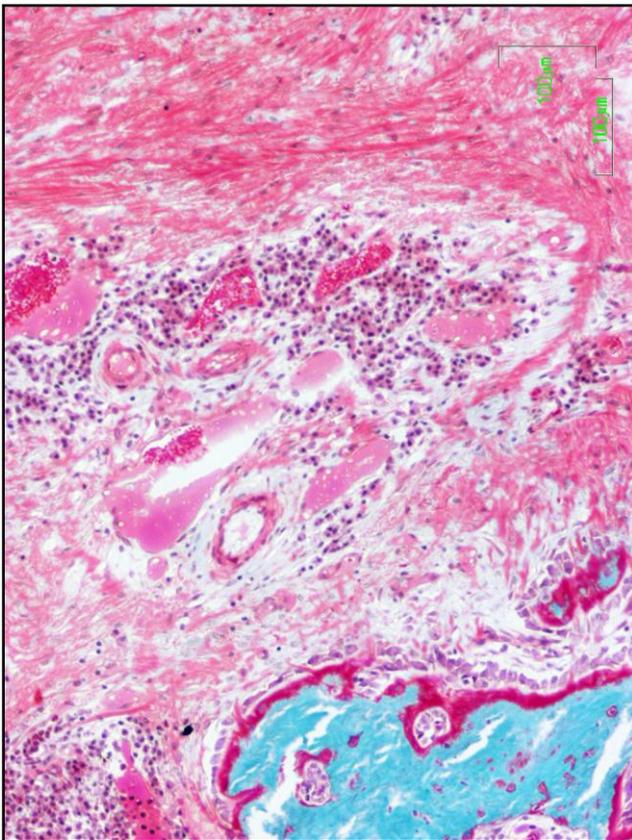


Fig.73 (10x)

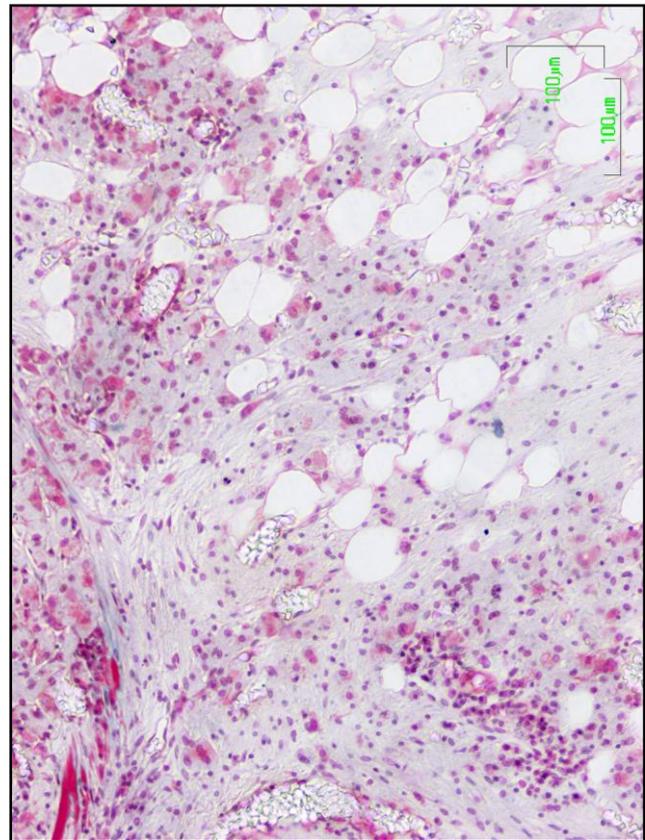


Fig.74 (10x)

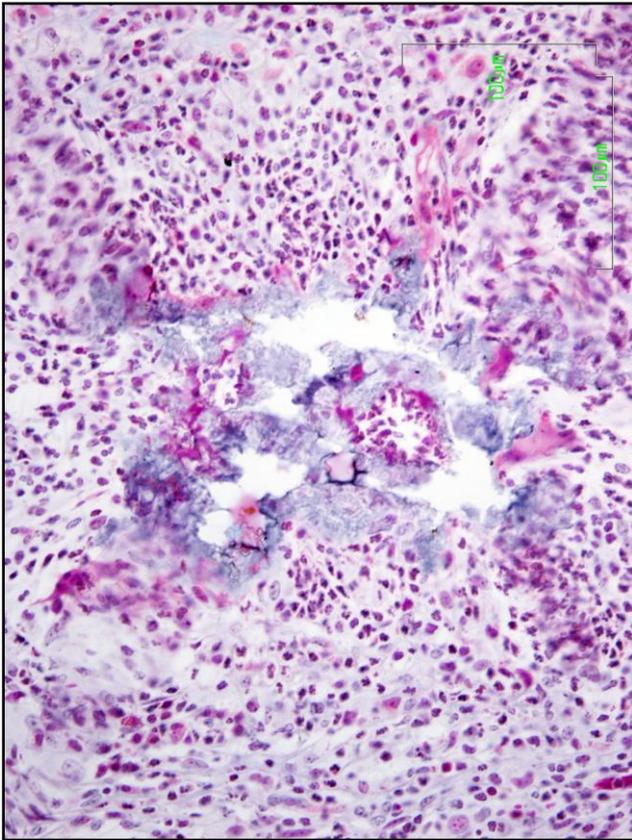


Fig.75 (20x)

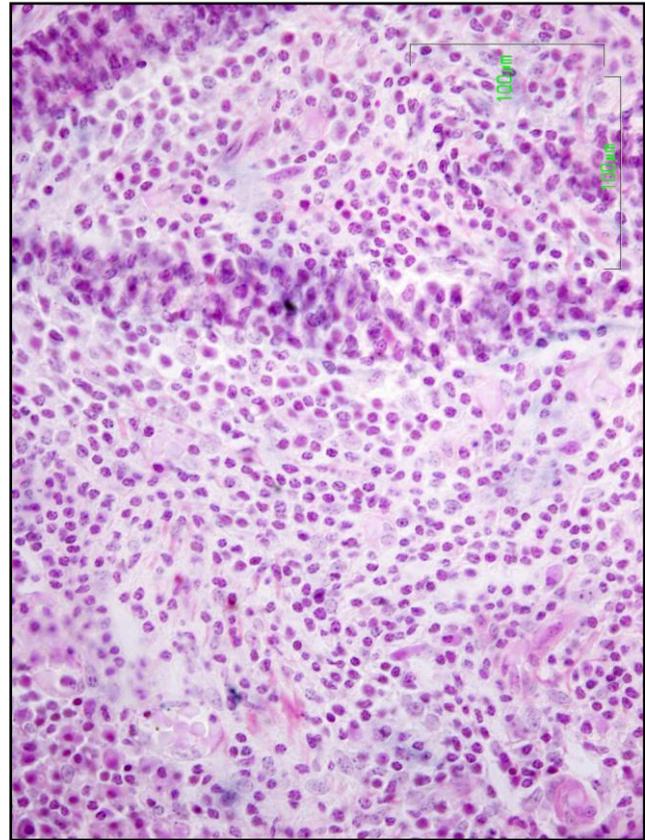


Fig.76 (20x)

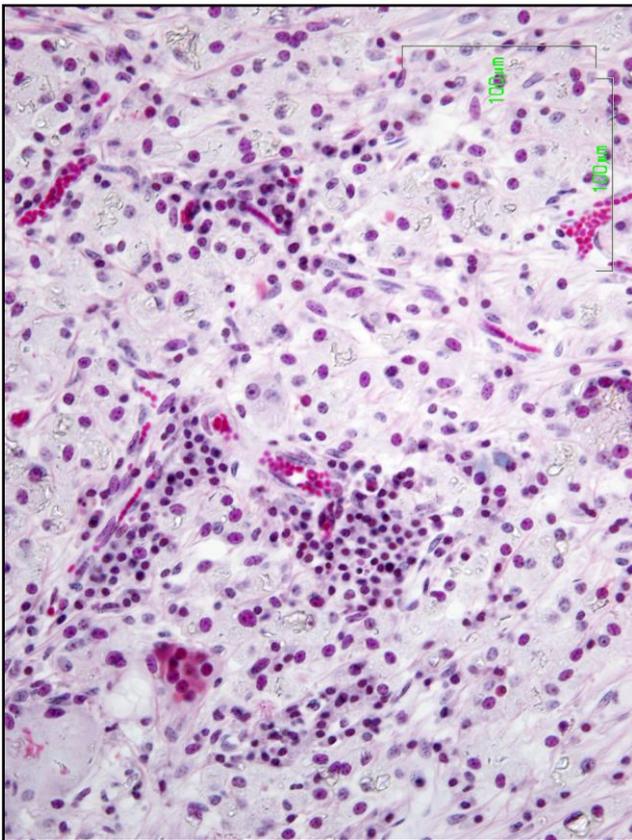


Fig.77 (20x)

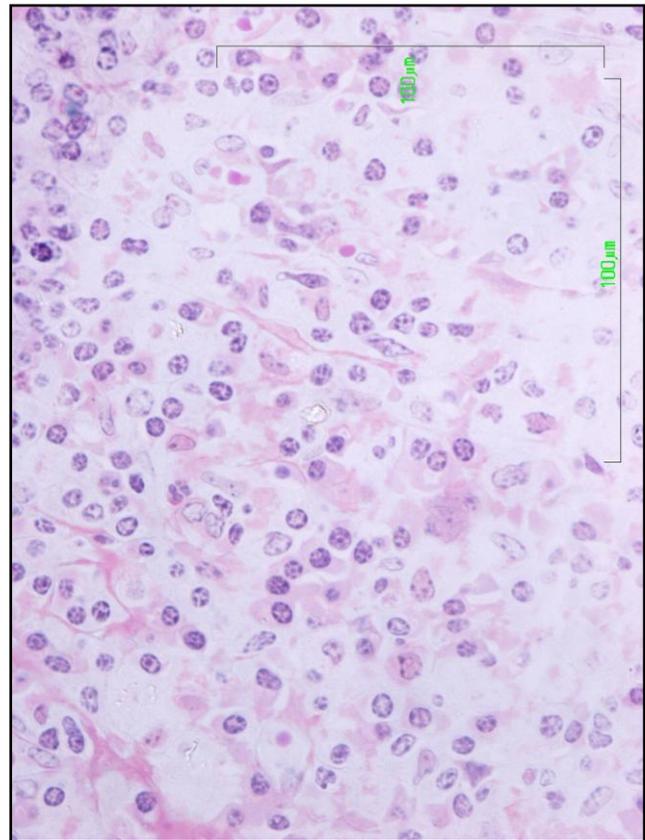


Fig.78 (40x)

Fig.67 (caso 3, H).- Imagen panorámica del centro del defecto donde restos de material remanentes han sido rodeados por un profusa formación de tejido conectivo, vascularizado y con un notable componente celular. La superficie trabecular ósea en contacto con el tejido blando presenta una gruesa línea de osteoide. (2x, TG).

Fig.68 (caso 2, G).- Imagen panorámica de la cavidad del defecto donde se ha desarrollado la formación de tejido conectivo. Presentan focos con un alto contenido celular, indicando reacciones granulomatosas. Además se aprecia una elevada vascularización, ya que se distinguen numerosas luces de vasos dilatados, que aparecen un blanco o rojo, debido a la tinción de los hematíes, que hace que se contemplen de una forma muy clara dentro de los vasos. (2x, TG).

Fig.69 (caso 7, I).- Imagen panorámica representativa de la respuesta del hueso trabecular adyacentes a la cavidad del defecto. Las trabéculas regeneradas son gruesas, desorganizadas, anastomosadas y cuyas superficies óseas presentan líneas de osteoide. Se aprecian abundantes cavidades vasculares y osteocitos inmaduros, rodeados por lagunas aún no mineralizadas. En los espacios intertrabeculares se detecta la formación de tejido conectivo de tipo laxo. (2x, TG).

Fig.70 (caso 4, G).- Desarrollo de una reacción granulomatosa con un elevado componente celular de tipo inflamatorio rodeando restos de material. Además las fibras de colágeno del tejido conectivo denso, adquieren una distribución orientada de tal forma que rodean al material. (2x, TG).

Fig.71 (caso 3, J).- Detalle de una reacción granulomatosa. Se aprecia la formación de un foco concéntrico de numerosas células de tipo inflamatorio alrededor de pequeños restos de material. Se diferencia una pequeña espícula ósea inmadura, debido a su coloración roja, puesto que no se ha mineralizado aún su matriz. (4x, TG).

Fig.72 (caso 7, I).- Imagen donde se ponen de manifiesto signos de reabsorción ósea en el tejido óseo, debido a la presencia de una hilera de osteoclastos en la superficie trabecular. En el espacio medular encontramos tejido adiposo. (10x, TG).

Fig.73 (caso 6, I).- Detalle de la elevada vascularización que presenta el tejido conectivo de tipo denso. Incluso se pueden diferenciar los hematíes dentro de los vasos sanguíneos. Encontramos pequeños focos de células inflamatorias. Aparece una trabécula ósea neoformada del hueso adyacente, con una línea gruesa de osteoide y osteocitos inmaduros. (10x, TG).

Fig.74 (caso 3, H).- Detalle de la desmoplasia desarrollada en todos los casos y se encuentra asociada a una notable celularidad. Se puede apreciar una transición de tejido conectivo a tejido adiposo, presente en todos los casos del material H. (10x, TG).

Fig.75 (caso 3, J).- Detalle de una reacción granulomatosa a gran aumento donde se distinguen restos de material, delimitado por escasas células gigantes multinucleadas y una profusa respuesta inflamatoria aguda. (20x, TG).

Fig.76 (caso 6, G).- Detalle a gran aumento del componente celular de una reacción granulomatosa de tipo crónico, ya que predominan las células plasmáticas. (20x, TG).

Fig.77 (caso 5, K).- Detalle del componente celular de tipo inflamatorio. Aparecen también vasos sanguíneos con hematíes en su interior. (20x, TG).

Fig.78 (caso 4, K).- Detalle a gran aumento de células plasmáticas, típicas de una respuesta inflamatoria crónica. Aparecen en el tejido conectivo formado y se ve alguna fibra de colágeno. (40x, TG).

La evaluación histológica constata algunas diferencias leves en el comportamiento de los distintos materiales. Por un lado, como se ha comentado anteriormente, el desarrollo de tejido adiposo es más notable en los materiales *I* y *K*, y en menor medida en *H*. La presencia de macrófagos es destacable en los materiales *G*, *H* e *I*, que son los que presentan menor contenido de β -TCP en comparación con los materiales *J* y *K*. Siguiendo con la celularidad presente en las preparaciones histológicas del grupo II, hay que destacar que en el caso del material *G*, en cual presentaba el contenido más elevado de monetita en su composición de todo el grupo II, junto con un escaso contenido de gel de sílice, presenta en todos sus casos una marcada reacción inflamatoria crónica. En algunos de los casos de los materiales *G*, *I* y *K* presentaban procesos de remodelación ósea asociados a osteoclastos en el hueso limítrofe a la cavidad. En un caso del material *G* la reacción granulomatosa fue muy marcada y se asociaba a una necrosis.

El material *J* presentaba algunos restos de material bien en procesos de osteointegración o asociados a algunas células gigantes.

Como se ha descrito hasta ahora la respuesta biológica promovida por los materiales del grupo II no es favorable, no provoca regeneración ósea, sino que sobre la lesión ha originado tejido conectivo, de tipo denso en la mayoría de los casos, asociado a una gran respuesta inflamatoria. Sin embargo, es preciso indicar que en el caso 4 del material *J* y el caso 1 del material *K*, encontramos una respuesta totalmente opuesta, encontramos defectos óseos regenerados, donde se ha formado nuevo hueso trabecular. Por ello, a continuación detallaremos el comportamiento de estos dos casos excepcionales siguiendo el mismo orden expositivo. Recordaremos que estos dos casos pertenecen a aquellos materiales que presentan un elevado contenido de β -TCP.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

Se han evaluado las imágenes de TAC (Fig.79 y Fig.80) tomadas de la parte central de la pieza ósea donde se implantó el material a estudio, durante todo el periodo de experimentación y que corresponden a aquellos casos en donde se han producido máximos signos de regeneración ósea, tal y como se han detectado en el caso 4 del material *J* y el caso 1 del *K*.

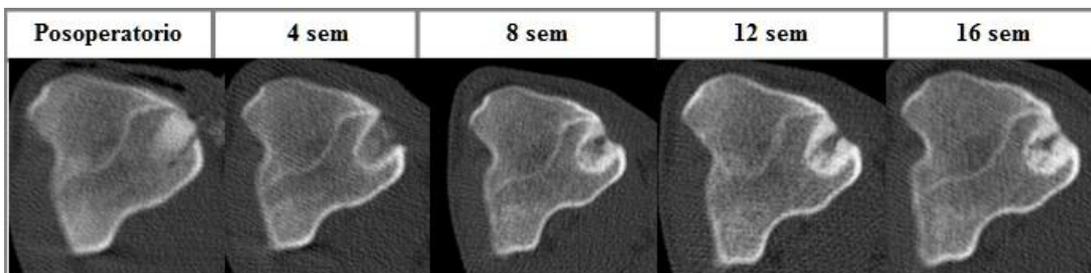


Fig.79. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 4 del material *J*.

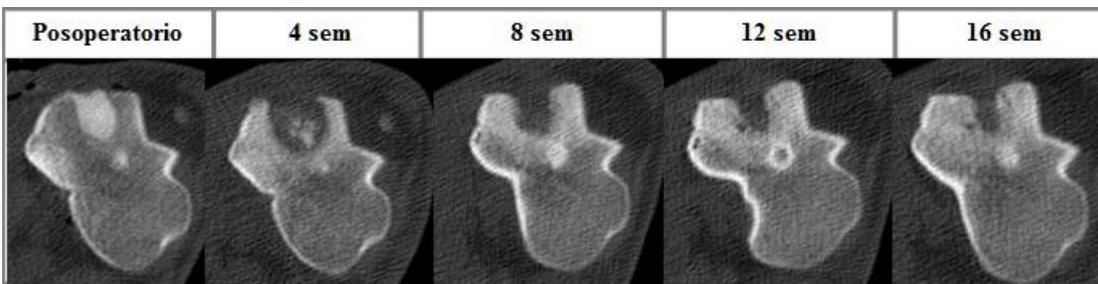


Fig.80. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 1 del material *K*.

En relación a las imágenes de la Fig.79, la correspondiente a las 4 semanas desde la implantación del material *J*, la cavidad se muestra ligeramente radiopaca, y su contorno presenta una gruesa línea fuertemente radiodensa que la delimita. En la imagen de la 8ª semana de estudio, la captación radiológica es mayor y localizada, presentando sobre todo en los laterales de la parte externa zonas radiopacas, y zonas más difusas radiodensas en el interior de la cavidad, manteniendo también la línea radiodensa que rodea al defecto. Las imágenes de TAC a partir de la octava semana de estudio, presentan las mismas características pero aumentando la captación radiológica, siendo las zonas más grandes y más radiodensas, llegando a ocupar casi la totalidad de la cavidad del defecto como aparece en la imagen de las 16 semanas de experimentación. Únicamente se distingue una pequeña zona algo más tenue, más radiolúcida en comparación con el resto de la cavidad en el centro del defecto.

En el caso 1 del material *K* (Fig.80) la dinámica es similar al material *J* aunque presenta menor captación radiológica. En la imagen de la 4ª semana de estudio se aprecia una cavidad de grandes dimensiones, radiotransparente, con pequeños puntos radiodensos repartidos de forma heterogénea en el interior del defecto. En el TAC de la 8ª semana, los puntos radiodensos han desaparecido, y la cavidad se muestra radiolúcida. Encontramos cambios radiológicos en los laterales de la cavidad, donde encontramos una mayor radiodensidad, aunque difusa, rodeando el defecto. A partir de este momento, esta

manifestación radiológica se hace más evidente, aumentando la radiodensidad del contorno del defecto, reduciendo el tamaño de la cavidad que se presenta radiotransparente.

VALORACIÓN DE LAS IMÁGENES RADIOLÓGICAS Y DE LUPA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.-

Junto con las imágenes de TAC comentadas anteriormente, las radiografías permiten establecer una correlación entre las distintas imágenes radiológicas.

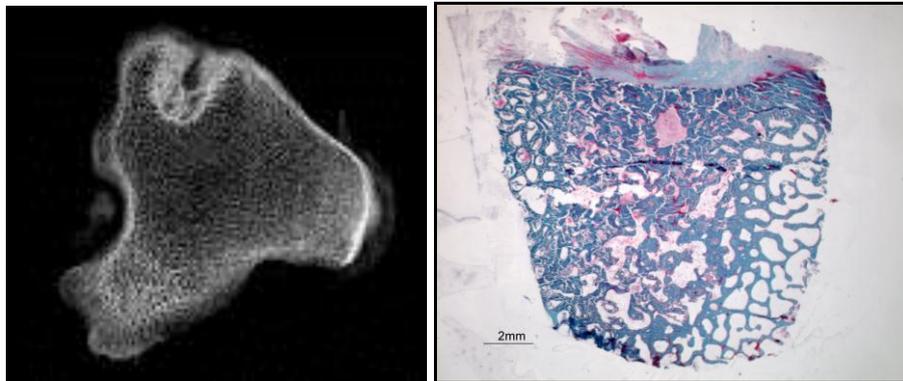


Fig.81. Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico correspondiente al caso 4 del material *J*.

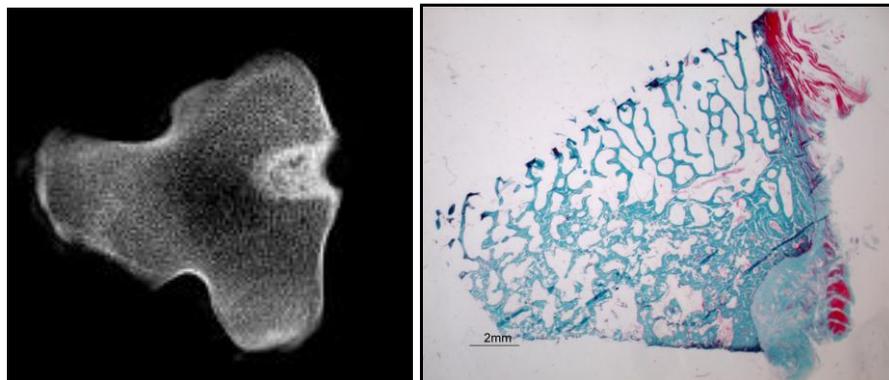


Fig.82. Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico correspondiente al caso 1 del material *K*.

En la radiografía que muestra la Fig.81 se detectan signos de reparación ósea radiológica sobre todo desde los laterales de la cavidad. Se muestra un entramado trabecular desorganizado más radiodenso que el hueso adyacente. Esta traza se encuentra en continuidad con el hueso adyacente. Se puede decir que se ha producido procesos de regeneración. Al igual que en los TACs, en la radiografía se puede ver en la parte central del defecto, una pequeña zona radiolúcida, vacía, sin regenerar. La foto panorámica de lupa de la sección histológica permite obtener una visión de conjunto de la apariencia del defecto. En la foto de la Fig.81 se muestra neoformación de tejido óseo, debida a la formación de un hueso trabecular, muy desorganizado, con trabéculas gruesas y numerosas uniones entre ellas. El defecto se encuentra regenerado en su totalidad salvo en la zona central donde no hay hueso y se ha formado tejido conectivo. Además se aprecia una transición con el hueso trabecular

normal, el cual presenta trabéculas más finas de disposición paralela.

En relación a la Fig.82, la radiografía muestra una cavidad ocupada por un entramado irregular, apretado, más radiodenso que el hueso adyacente, y que ocupa por completo la cavidad menos en la zona cortical, que es radiotransparente. En la imagen de lupa se ve perfectamente la transición de hueso trabecular normal de la oveja, con trabéculas finas y paralelas entre sí, y el hueso regenerado. Se distingue hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas, desorganizadas y anastomosadas. Aunque, como se puede apreciar la parte externa del defecto, no se ha regenerado por completo, se ha quedado a una altura por debajo de la normal de la cortical adyacente y este espacio ha sido ocupado por tejido conectivo denso.

VALORACIÓN HISTOLÓGICA.-

Seguidamente se van a analizar las imágenes microscópicas de los cortes histológicos de aquellos casos que presentan regeneración ósea. En estos casos el hueso trabecular neoformado ocupa casi la totalidad de la cavidad exceptuando la zona superficial del defecto del caso 1 del material *K* donde se ha formado tejido conectivo de tipo laxo con notable vascularización (Fig.83 (2x)).

En el caso 4 del material *J* aunque también apreciamos la formación de trabéculas regeneradas, se distingue una pequeña zona en el interior del defecto, que no muestra hueso regenerado sino que presenta el desarrollo de tejido conectivo con un infiltrado de células de componente inflamatorio.

El hueso trabecular regenerado en estos casos, presenta trabéculas desorganizadas, anastomosadas y cuyas superficies óseas presentan líneas de osteoide (Fig.84 y Fig.85). En estos casos se distinguen zonas en las trabéculas óseas regeneradas con osteointegración de restos de material, más abundante en el caso 4 del material *J*. Los escasos restos de material remanente, no integrados en el hueso, están rodeados por células multinucleadas (Fig.86).

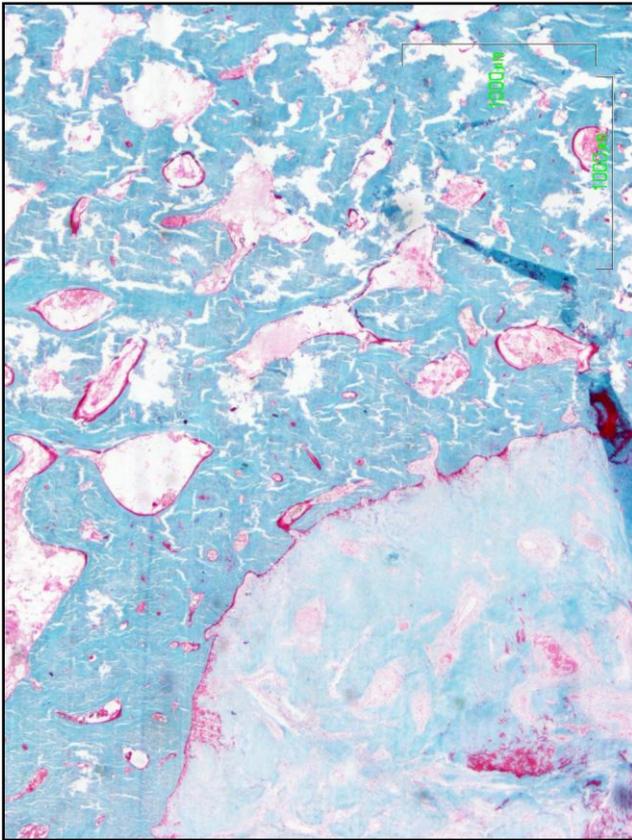


Fig.83 (2x)

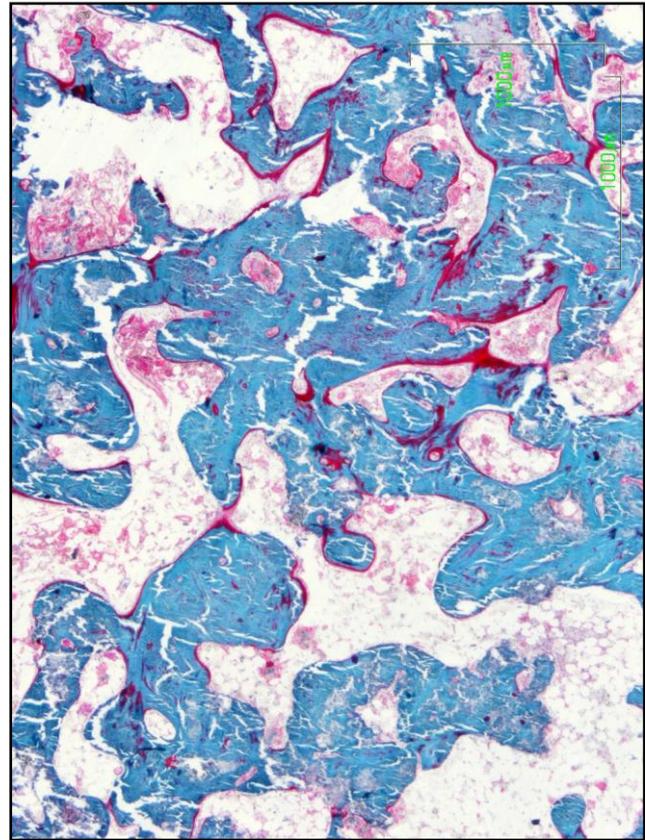


Fig.84 (2x)

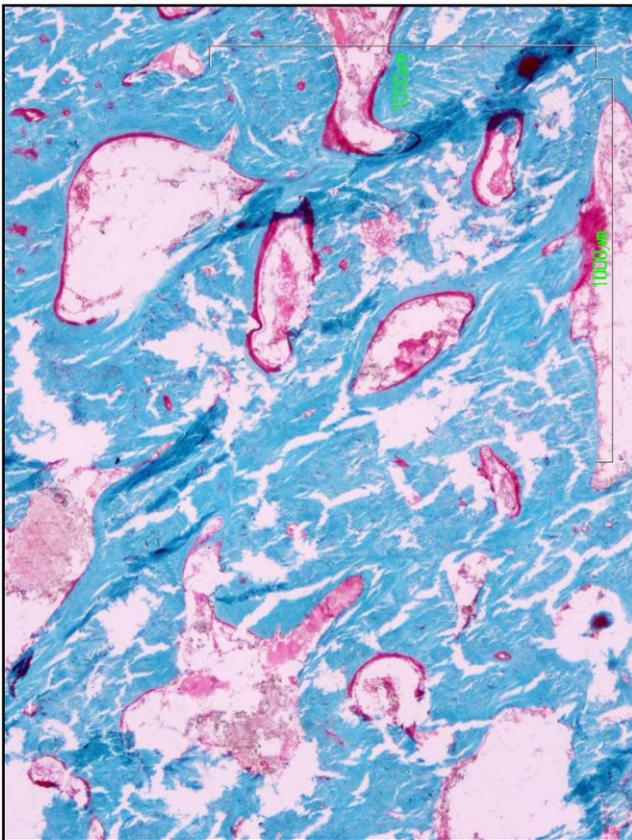


Fig.85 (4x)

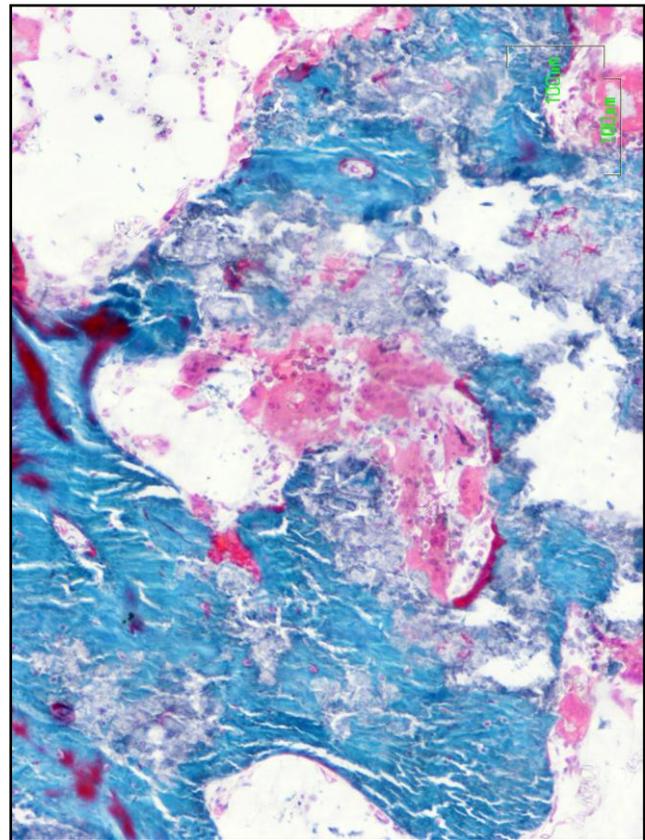


Fig.86(10x)

Fig.83 (caso 1, K).- En la zona cortical, ésta no se ha formado a la misma altura que la del hueso adyacente, si no que se encuentra embebida hacía dentro debido a la formación de tejido conectivo denso, que se produce ocupando esta diferencia de altura. El tejido conectivo formado se encuentra altamente vascularizado. Por otro lado, encontramos un hueso trabecular neoformado, desorganizado, con trabéculas gruesas y abundantes canales vasculares dentro del hueso. Se observa que predomina la formación de tejido óseo ya que prácticamente son imperceptibles los espacios intertrabeculares. (2x, TG).

Fig.84 (caso 4, J).- Panorámica donde se distingue la neoformación de hueso trabecular inmaduro. Sus trabéculas son gruesas y anastomosadas. Se aprecian superficies óseas con una línea gruesa de osteoide, zonas con deficiencia de calcificación e integración de restos de material en las trabéculas. El espacio intertrabecular presenta tejido conectivo. (2x, TG).

Fig.85 (caso 1, K).- Detalle donde se muestra una trabécula ósea regenerada, gruesa, con cavidades óseas asociadas a vasos sanguíneos y gruesas líneas de osteoide. (4x, TG).

Fig.86 (caso 4, J).- Detalle de una trabécula neoformada, con integración de restos de material, los cuales están delimitados por células gigantes multinucleadas cuando se encuentran en contacto con el tejido blando. (10x, TG).

En resumen, podemos considerar que la respuesta común encontrada entre los diferentes materiales que conforman el grupo II es la ausencia de regeneración ósea, ya que predominan las cavidades con desarrollo de tejido conectivo, sobre todo de tipo denso. Este tejido presenta siempre un elevado componente celular inflamatorio leucocitario mononuclear. En todos los casos del material *K*, esta respuesta inflamatoria es tan severa que es de tipo crónico, al distinguir células plasmáticas, características de este tipo de inflamación. La notable vascularización desarrollada, la presencia de numerosos macrófagos y las formaciones granulomatosas, son algunas de las respuestas biológicas comunes que se manifiestan en los materiales del grupo II. Los escasos restos de material son un indicativo de la rápida reabsorción medida por estos materiales. Es preciso destacar que en dos de los casos de los materiales *J* y *K* se han encontrado signos de regeneración ósea como se ha comentado con detalle anteriormente.

Tabla resumen del GRUPO II: material G.-

Grupo II: material G	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Defecto radiotransparente, de grandes dimensiones pues alcanza el canal medular.	Defecto radiotransparente, de grandes dimensiones pues alcanza el canal medular.	No regenerado. Radiolúcido.	No hay. Defecto tan grande que los cortes salen rotos. Macroscópicamente se observan restos blancos.	No evaluable.
Caso 2	F.D.	Radiolúcido.	Radiolúcido.	No regenerado, radiotransparente. Cerca del cartilago metafisario.	No regenerado. Formación de tejido conectivo denso, ocupando toda la cavidad. Hueso adyacente presenta zonas con deficiencia en mineralización.	Desarrollo de tejido conectivo altamente vascularizado. Granulomas. No hay restos de material (únicamente en el centro del granuloma). Focos inflamatorios crónicos.
Caso 3	T.I.	Radiolúcido.	Radiolúcido.	No regenerado, radiotransparente.	No regenerado. Formación de tejido conectivo, que ocupa todo el defecto.	Tejido conectivo. Abundantes restos de material delimitados por Granulomas. Componente celular: células multinucleadas, leucocitos, macrófagos y plasmáticas. Inflamación crónica.
Caso 4	T.D.	Radiotransparente. Laterales irregulares. Punto raidodenso en la parte superficial de la cavidad.	Radiolúcido. Laterales del defecto irregulares.	No se ve clara.	No regenerado. Formación de tejido conectivo denso, en la zona superficial. Hueso adyacente presenta zonas con deficiencia en mineralización.	Tejido conectivo, zona cortical inmaduro. Restos de material. Granulomas. Abundantes células multinucleadas. Inflamación. Necrosis. Hueso adyacente al defecto presenta signos de remodelación: osteoclastos y osteoblastos. Abundante osteoide y gran deficiencia en calcio. Osteocitos inmaduros. Vascularización.
Caso 5	H.I.	Radiotransparente. Laterales del defecto irregulares. Punto raidodenso en la parte superficial de la cavidad.	Radiolúcido. Laterales del defecto irregulares.	No regenerado, radiotransparente.	No regenerado. Formación de tejido conectivo, de tipo denso en la zona superficial.	Tejido conectivo denso inmaduro vascularizado. Granulomas. Defecto realizado cerca de la articulación, zona de inserción del tendón. La patología puede deberse a la localización anatómica.
Caso 6	H.D.	Radiotransparente. Existe una zona difusa levemente radiodensa alrededor de los laterales del defecto.	Radiotransparente. Existe una zona difusa levemente radiodensa alrededor de los laterales del defecto.	No regenerado, radiotransparente. Laterales del defecto muestran un entramado trabecular irregular. Gran tamaño.	No regenerado. Formación de tejido conectivo, denso en la zona superficial. Hueso adyacente presenta zonas con deficiencia en mineralización.	Tejido conectivo denso. No se aprecian restos de material. Granulomas. Inflamación crónica focal. Hueso adyacente: deficiencia en calcio, osteoide, osteocitos inmaduros. Alguna célula multinucleada.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL G (GRUPO II)					
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
*	****	*	-	***	*
Casos 4 y 6, reacción en el hueso adyacente.	Denso abundante en la parte superficial, casos: 2, 4 y 5. Algo en 3 y 6.	Caso 4.			Caso 4.
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros
*****	****	*	*	*	*
Todos.	Todos menos caso 5.	Caso 4.	Hueso adyacente.	Hueso adyacente.	Hueso adyacente.
Médula adiposa	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación	Macrófagos
-	*	-	*****	-	***
	Caso 4, en hueso adyacente.		Todos.		

Tabla resumen del GRUPO II: material H.-

Grupo II: material H	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Zona superficial radiotransparente, parte interna presenta una mancha levemente radiodensa.	Zona superficial radiolúcida. Hacia la mitad del defecto aparece como un puente radiodenso que separa en dos el defecto.	Zona externa radiolúcida.	Defecto no regenerado, formación de tejido conectivo. Aparece un puente óseo hacia la mitad del defecto, separando en dos la cavidad.	Defecto no regenerado, Desmoplasia. Inflamación. Células multinucleadas. Puente cortical con osteoide, abundantes cavidades vasculares y numerosos osteocitos inmaduros. Alguna espícula ósea rodeada de tejido conectivo con deficiencia de mineralización. Hueso adyacente notable osteoide. Espacios intertrabeculares tejido adiposo.
Caso 2	F.D.	Radiotransparente. Contorno del defecto con una línea más fuertemente radiodensa. Centro del defecto presenta un punto radiodenso.	Radiotransparente. Igual que a las 8 sem salvo que el punto radiodenso está reducido en tamaño.	Radiolúcido.	Defecto no regenerado con desarrollo de tejido conectivo.	Defecto no regenerado. Granulomas. Desarrollo de tejido conectivo. Formación de muy poco hueso, con notable osteoide, osteocitos inmaduros, y deficiencia en mineralización. Transición tejido conectivo a adiposo. Inflamación muy desarrollada. Escasas células multinucleadas.
Caso 3	T.I.	Radiotransparente. Llega a la médula. Gran tamaño. Contorno del defecto irregular.	Radiotransparente. Llega a la médula. Contorno del defecto irregular.	Radiolúcido.	No regenerado. Formación de tejido conectivo.	No regenerado. Granulomas. Inflamación crónica. Depósitos de material. Tejido conectivo vascularizado. Transición de tejido conectivo a adiposo. Espículas con deficiencia en mineralización, procesos de remodelación y osteocitos inmaduros.
Caso 4	T.I.	Leve radiodensidad que ocupa la totalidad del defecto.	Zona radiodensa desorganizada en la parte externa del defecto, resto radiolúcido.	Zona radiodensa irregular desorganizada en la parte superficial del defecto.	Defecto no regenerado con desarrollo de tejido conectivo. Gran tamaño.	No regenerado. No restos de material. Inflamación crónica. Gran tamaño. Tejido conectivo denso vascularizado. Hueso adyacente: irregular, con líneas de osteoide y osteocitos inmaduros. Médula adiposa.
Caso 5	T.D.	Defecto grande, radiotransparente, con contorno irregular. Pequeña mancha levemente radiodensa en el centro.	Laterales y parte interna del defecto presenta zonas más radiodensas. Parte superficial radiotransparente.	Radiotransparente. Formación de un hilo radiodenso hacia la mitad del defecto.	Defecto no regenerado, con tejido conectivo. Hacia la mitad del defecto aparece una prolongación ósea neofromada, que no divide por completo la cavidad en dos.	No regenerado, tejido conectivo muy vascularizado. Abundantes macrófagos. Algún foco inflamatorio. Granuloma. Abundantes restos de material. Médula adiposa que ocupa gran parte del defecto. El escaso hueso presenta deficiencia en mineralización, líneas de osteoide y osteocitos inmaduros.
Caso 6	H.I.	Defecto de gran tamaño radiotransparente.	Radiotransparente.	Defecto radiolúcido de gran tamaño.	Defecto no regenerado, con formación de tejido conectivo. Aparece alguna espícula ósea en la parte profunda.	No regenerado. Reacción desmoplásica. Tejido conectivo denso en transición con adiposo. Numerosos vasos. No hay restos de material. Espículas óseas con deficiencia en mineralización, osteoide y osteocitos inmaduros. Pequeños focos inflamatorios.
Caso 7	H.D.	Defecto de gran tamaño radiotransparente.	Radiotransparente.	Defecto radiolúcido de gran tamaño.	Defecto no regenerado, de gran tamaño. Formación de tejido conectivo.	No regenerado. No restos de material. Desmoplasia. Inflamación. Defecto de gran tamaño. Tejido conectivo denso, con muchas fibras y vasos. Transición de conectivo a adiposo.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL H (GRUPO II)						
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos
*	****	**	-	****	*	*****
Formación de puentes óseos y espículas.	Denso.	Casos 3 y 5.				
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa
****	**	-	***	***	**	*****
Predominio macrófagos y leucocitos.	Casos 3 y 4.		Hueso adyacente y escaso en el h.regenerado.	Hueso adyacente y escaso en el h.regenerado.	Hueso adyacente y escaso en el h.regenerado.	Todos.
Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación		
-	-	-	***	-		

Tabla resumen del GRUPO II: material I.-

Grupo II: material I	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Radiotransparente de gran tamaño, con una zona levemente radiodensa en la parte interna.	Radiotransparente de gran tamaño, con una zona levemente radiodensa en la parte interna.	Defecto no regenerado de grandes dimensiones. Zona profunda levemente radiodensa.	No regenerado. Defecto con desarrollo de tejido conectivo denso con abundantes restos de material.	Defecto no regenerado. Encapsulación de restos de material. Granulomas. Tejido conectivo vascularizado con restos de material. Escasas células multinucleadas. Respuesta inflamatoria.
Caso 2	F.I.	Radiotransparente.	Defecto radiolúcido, salvo en parte más profunda que presenta radiodensidad irregular.	Parte superficial del defecto no regenerada. Zona interna presenta radiodensidad con apariencia trabecular.	No regenerado. Formación tejido conectivo.	No regenerado. Formación tejido conectivo.
Caso 3	T.I.	Radiotransparente.	Radiotransparente.	No se ve bien.	Defecto no regenerado, con desarrollo de tejido conectivo. Los laterales del hueso adyacente han formado prolongaciones óseas neoformadas con trabéculas finas y anastomosadas.	Defecto no regenerado. Desarrollo de tejido conectivo altamente vascularizado. No hay restos de material. Aparecen prolongaciones de formación ósea mediante osificación osteocondral. Interfiere la localización anatómica, inserción del tendón. Signos de reabsorción, se observan osteoclastos.
Caso 4	T.D.	Radiotransparente, alcanza el canal medular.	Radiotransparente, alcanza el canal medular.	Defecto no regenerado, de gran tamaño, alcanza el canal medular.	Defecto no regenerado de grandes dimensiones, formación de tejido conectivo.	No regenerado. Llega a la médula. Desarrollo de tejido conectivo denso. Granulomas. Inflamación crónica. Transición de tejido conectivo a adiposo. No hay restos de material. Escasa formación ósea: trabéculas con procesos de reabsorción, osteoclastos.
Caso 5	T.D.	Defecto radiotransparente con un contorno irregular. Pequeño punto radiodenso en la zona superficial.	Defecto radiotransparente. Contorno irregular radiodenso.	No regenerado.	Zona superficial no regenerada, formación de tejido conectivo. Zona profunda con trabéculas neoformadas.	No regenerado. Tejido conectivo denso. Inflamación. Escasa regeneración ósea, espículas. Se detecta un retraso de mineralización por el componente inflamatorio. Espacios intertrabeculares: transición tejido conectivo a adiposo.
Caso 6	H.I.	Defecto radiolúcido de grandes dimensiones.	Defecto radiolúcido de grandes dimensiones.	Defecto radiolúcido de grandes dimensiones. Alcanza el canal medular.	Defecto no regenerado, desarrollo de tejido conectivo vascularizado.	No regenerado. Tejido conectivo denso vascularizado. Granulomas. Predominio de macrófagos y células plasmáticas. Inflamación crónica. Ha habido un hemorragia: abundantes hematíes. Hueso adyacente muy desorganizado.
Caso 7	H.D.	Mitad superficial del defecto radiolúcido. Mitad interna muestra una mancha radiodensa heterogénea.	Mitad superficial del defecto radiolúcida. Mitad interna aparece una zona radiodensa aislada, no está en continuidad con el hueso adyacente.	Zona superficial no regenerada, parte interna apariencia regenerada, ya que muestra un entramado radiodenso con un patrón trabecular.	Defecto no regenerado, desarrollo de la zona del periostio, se mete hacia la profundidad del defecto	Defecto algo regenerado, reducido en tamaño. Parte externa: tejido conectivo denso, muy vascularizado. Transición de tejido conectivo a adiposo. Trabéculas neoformadas con actividad osteogénica, osteoide, osteocitos inmaduros y procesos de reabsorción, osteoclastos.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL I (GRUPO II)						
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos
**	****	*	-	****	-	***
Caso 3 (pero es la inserción del tendón, osificación condral). Escasa regeneración en casos 4, 5 y 6.	Denso			Zona periostio.		
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa
****	**		**	**	**	***
	Casos 4 y 6.				Inmaduros	Casos 4, 5 y 7.
Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación		
-	**	-	**	*		
	Casos: 3, 4 y 7		Casos: 1, 4 y 6.	Caso 1.		

Tabla resumen del GRUPO II: material J.-

Grupo II: material J	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Defecto radiotransparente con una zona radiodensa en el centro.	Defecto radiotransparente con una zona radiodensa en el centro.	Defecto radiotransparente con una zona radiodensa en el centro.	Defecto no regenerado y de gran tamaño. Desarrollo de tejido conectivo.	No regenerado. Tejido conectivo. Encapsulación de restos de material. Gran respuesta inflamatoria crónica. Lesión granulomatosa. Se observan además macrófagos, células plasmáticas y multinucleadas.
Caso 2	F.D.	Contorno con una gruesa línea radiodensa. Mancha radiodensa que ocupa casi por completo el defecto.	Defecto radiolúcido con un contorno marcado con una gruesa línea radiodensa. Pequeño punto radiodenso en el centro de la cavidad.	Defecto no regenerado, radiotransparente. Pequeño punto radiodenso en el centro de la cavidad.	Defecto no regenerado, ocupado por tejido conectivo. Presenta un tamaño reducido.	No regenerado. Tejido conectivo denso vascularizado. Inflamación crónica. Células multinucleadas. Restos de material.
Caso 3	T.I.	Radilúcido, alcanza el canal medular. Pequeña mancha levemente radiodensa en el interior de la cavidad.	Radilúcido, alcanza el canal medular. Pequeña mancha levemente radiodensa en el interior de la cavidad.	Defecto radiolúcido.	No regenerado, de gran tamaño. Desarrollo de tejido conectivo. Se aprecian restos de material.	No regenerado. Tejido conectivo vascularizado. Encapsulación. Granulomas. Hueso adyacente presenta notables líneas de osteoide, deficiencia en mineralización y osteocitos inmaduros. Inflamación. Las espículas óseas muestran procesos de osteointegración de material. Células multinucleadas que rodean restos de material.
Caso 4	T.D.	Todo el defecto muestra una fuerte radiodensidad, destacada en los laterales del defecto. Se distingue un pequeño hueco radiotransparente en la parte central.	Defecto con elevada radiodensidad, destacando en los laterales del defecto, donde a las 16 sem aparecen zonas más amplias radiodensas. Pequeño hueco radiolúcido en la parte central.	Defecto regenerado, traza irregular fuertemente radiodensa que ocupa casi por completo el defecto. Se distingue un pequeño hueco radiotransparente.	Regeneración ósea. Hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas y desorganizadas.	Regeneración ósea. Trabéculas óseas neoformadas gruesas, desorganizadas y con notables líneas de osteoide. Osteointegración material-hueso. Hay una pequeña zona no regenerada, desarrollo de tejido conectivo con infiltrado inflamatorio. Células multinucleadas rodeando restos de material.
Caso 5	H.I.	Defecto radiotransparente, con grandes dimensiones. Pequeña mancha radiodensa en el interior de la cavidad.	Defecto radiotransparente, con grandes dimensiones y contorno irregular. Pequeña mancha radiodensa en el interior de la cavidad.	Defecto radiolúcido, no regenerado y de gran tamaño. Contorno del defecto irregular.	No regenerado, desarrollo de tejido conectivo.	No regenerado, formación de tejido conectivo denso vascularizado. Granulomas. Pequeños focos inflamatorios. Células multinucleadas gigantes delimitando los restos de material. Hueso adyacente presenta deficiencia en mineralización, osteocitos inmaduros, líneas de osteoide y trabéculas desorganizadas. Osteointegración material-hueso.
Caso 6	H.D.	Radiolúcido con una pequeña zona radiodensa.	Radiolúcido con una pequeña zona radiodensa.	No se ve clara.	No regenerado, desarrollo de tejido conectivo. Se aprecia una disposición circular de las fibras de colágeno alrededor de restos de material.	No regenerado, de gran tamaño. Tejido conectivo denso vascularizado. Notable inflamación crónica. Predominio leucocitos. Encapsulación. Granulomas. Gran tamaño.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL J (GRUPO II)					
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
**	***	**	**	***	**
Caso 4 defecto regenerado.	Denso				
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros
****	***	-	**	*	*
En todos los casos menos en el 4, que está regenerado.	Casos 1 , 2 y 6.		En el hueso adyacente al defecto.	En el hueso adyacente al defecto.	
Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación	Macrófagos
-	-	**	****	**	-
		Casos: 1, 3 y 5, pero se da en el hueso adyacente sobre todo.	En todos los casos menos en 2 y 4.	Casos: 1, 3 y 6.	

Tabla resumen del GRUPO II: material K.-

Grupo II: material K	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Defecto radiolúcido.	Defecto radiolúcido.	Defecto con una zona fuertemente radiodensa, con aspecto granulado.	En TAC defecto radiolúcido, en Rx se ve una mancha radiodensa. En lupa zona: cortical embebida con formación de tejido conectivo. Hueso neoformado trabecular grueso y desorganizado.	Regeneración ósea. La cortical se encuentra embebida por la formación de tejido conectivo muy vascularizado. Formación de hueso trabecular grueso, desorganizado y anastomosado. Presenta líneas de osteoide. Cavidades intertrabeculares: células multinucleadas con escasos restos de material. Osteointegración del material.
Caso 2	F.D.	Defecto radiolúcido.	Defecto radiolúcido.	Defecto radiolúcido.	No regenerado, desarrollo de tejido conectivo. Hueso adyacente con notable deficiencia en mineralización.	No regeneración ósea. Tejido conectivo inmaduro y vascularizado. Inflamación crónica difusa. Granulomas. Células multinucleadas. Transición de tejido conectivo a adiposo. Hueso adyacente: numerosas líneas de osteoide y notable deficiencia en mineralización. No se aprecian restos de material.
Caso 3	T.I.	Defecto radiolúcido.	Defecto radiolúcido con un contorno irregular.	No regenerado, radiotransparente.	Defecto realizado en la metafisis, se ve osificación condral. No regenerado, desarrollo de tejido conectivo.	No regenerado. Se ha realizado en la metafisis, encontramos osificación condral. Zona cortical: tejido conectivo inmaduro altamente vascularizado. Resto del defecto: tejido conectivo laxo con focos inflamatorios y espículas óseas inmaduras, no mineralizadas. Hueso adyacente presenta: líneas de osteoide, deficiencia en mineralización y osteocitos inmaduros. Escasos restos de material.
Caso 4	T.D.	Defecto radiotransparente de gran tamaño, parece que alcanza el canal medular. Pequeña zona levemente radiodensa en la parte central.	Igual que a las 8 sem, salvo defecto irregular, con una línea radiodensa.	Radiolúcido. Zona radiodensa difusa en la parte superficial del defecto.	No regenerado, de gran tamaño. Formación de tejido conectivo.	No regeneración ósea. Tejido conectivo denso inmaduro y vascularizado. Granulomas. Inflamación crónica. Células multinucleadas.
Caso 5	H.I.	Defecto radiolúcido con un contorno irregular.	Defecto radiolúcido con un contorno irregular.	No regenerado, radiotransparente.	No regenerado, formación de tejido conectivo.	No regenerado. Tejido conectivo inmaduro. Granulomas e inflamación. Restos de material. Hueso adyacente: remodelado, líneas de osteoide, deficiencia en mineralización, trabéculas no muy gruesas pero desorganizadas y anastomosadas. Zona cortical: estrechamiento por hueso neoformado. Abundantes partículas de material. Médula adiposa. Alguna espícula ósea regenerada dentro de la cavidad del defecto.
Caso 6	H.D.	Defecto radiolúcido con un contorno irregular.	Defecto radiolúcido con un contorno irregular.	No regenerado, radiotransparente.	No regenerado, formación de tejido conectivo.	No regenerado. Tejido conectivo laxo. Focos inflamatorios. Transición de tejido conectivo a adiposo. Numerosos vasos sanguíneos. Células multinucleadas. Hueso adyacente presenta signos de reabsorción, osteoclastos. Predominio de médula adiposa.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL K (GRUPO II)					
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas
**	***	*	*	***	*
Caso 1 regenerado, (aunque en TAC se mostraba radiotransparente).	Denso inmaduro.	Escaso.	Escaso.	Zona cortical: tejido conectivo inmaduro muy vascularizado.	Escasas.
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros
****	*	-	*	**	*
En todos los casos menos en el caso 1, que está regenerado.	Inflamación crónica en los casos 2 (difusa) y 4.		Hueso adyacente.	Hueso adyacente.	
Médula adiposa	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación	Macrófagos
**	*	-	***	-	-
Caso 5 y sobre todo 6.	Caso 6.		Casos: 2, 4 y 5.		

GRUPO III:

A este grupo pertenecen aquellos materiales que están formados por elevadas concentraciones de monetita (superiores al 60%) y un contenido fijo del 7% de compuestos de silicio, presente en forma de gel de sílice. Dentro de este grupo formado por 5 materiales de diferente composición, podemos establecer una subdivisión, atendiendo a la presencia o no de CDHA. Uno de los subgrupos estaría formado por un único material, el *L*, que está formado por un elevado contenido de monetita (93%). Mientras que el otro subgrupo, está formado por los restantes 4 materiales (*M*, *N*, *Ñ* y *O*), en los que su contenido en monetita es menor debido a que presentan cantidades variables de CDHA. Estas concentraciones pueden ser del 15 o el 30% de CDHA, manteniendo constante la concentración del 7% de gel de sílice y variando, por tanto, el porcentaje de monetita.

Tal y como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 13), en los casos de los materiales *M* y *O*, la monetita presenta sustitución iónica del Ca^{2+} por Zn^{2+} al 3%. En este grupo encontramos sistemas más sencillos que en los grupos estudiados anteriormente, de forma que tratamos de estudiar el comportamiento de un material formado únicamente por monetita en altas concentraciones y gel de sílice, y por otro lado, la influencia de la combinación de dos compuestos de fosfato de calcio, como son la monetita y la CDHA, frente a mínimas cantidades de gel de sílice; además tratar de estudiar la influencia de las sustituciones iónicas parciales de la monetita por Zn^{2+} .

Tabla 13. Composición de los materiales del grupo III.

GRUPO III	M (%)	M-Zn (%)	CDHA (%)	GS (%)
<i>L</i>	93			7
<i>M</i>		78	15	7
<i>N</i>	78		15	7
<i>Ñ</i>	63		30	7
<i>O</i>		63	30	7

Tabla 14. Número de casos realizados de cada material y su localización ósea.

GRUPO III	Nº de casos	Localización
<i>L</i>	7	Caso 1: F.D. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.I. 5: H.I. 6: H.I y 7: H.D.
<i>M</i>	10	Caso 1: F.I. 2: F.I. 3: F.D. 4: T.I. 5: T.I. 6: T.D. 7: H.I. 8: H.I. 9: H.I y 10: H.D.
<i>N</i>	7	Caso 1: F.D. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.D. 5: T.D. 6: H.I y 7: H.D.
<i>Ñ</i>	7	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.I. 5: T.D. 6: H.I y 7: H.I.
<i>O</i>	7	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: F.D. 4: T.I. 5: T.D. 6: H.I y 7: H.D.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

En este apartado, a partir de la secuencia de imágenes centrales de los TACs correspondientes a la pieza ósea donde se realizó el defecto, tomadas cada 4 semanas desde la implantación del material, se pone de manifiesto el comportamiento radiológico opuesto existente entre el material *L* y el resto de materiales del grupo III. En el subgrupo de aquellos materiales que conjugan monetita y CDHA presentan TACs similares. La tendencia general de estos materiales es la de proporcionar imágenes con una captación radiológica elevada y progresiva, que a las 16 semanas de estudio, se traduce por una gran radiodensidad de la cavidad. Sin embargo, la manifestación radiológica del material *L* es totalmente distinta, encontrando de forma generalizada, la cavidad del defecto con escasa o nula captación radiológica.

A continuación se van a mostrar tres secuencias de imágenes de TAC, dos de ellas (Fig.87 y Fig.88) son representativas de la mayoría, mientras que la tercera secuencia corresponde al material *L* (Fig.89), cuyo comportamiento difiere del resto de los materiales del grupo III.

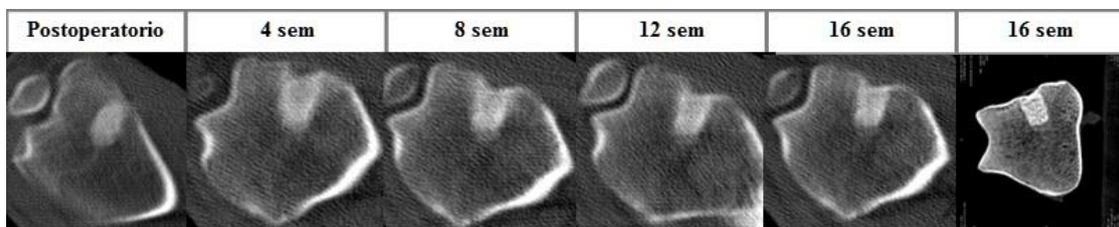


Fig.87. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 2 del material *O*.

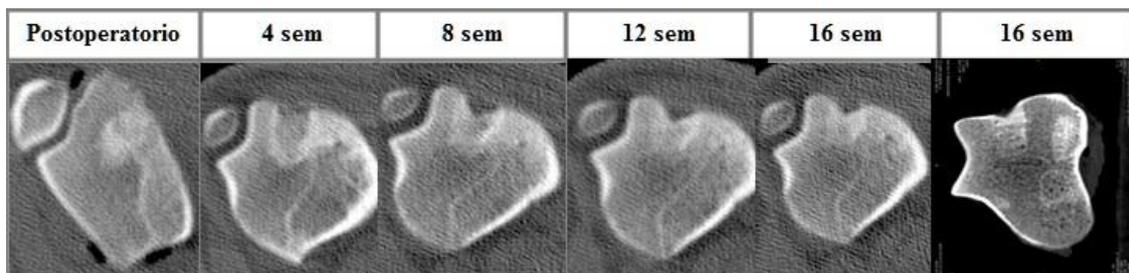


Fig.88. Imágenes de TAC del caso 1 del material *N*.

En relación a las Fig.87 y Fig.88, se han seleccionado estos dos casos como ejemplos representativos de la respuesta encontrada en los materiales pertenecientes al grupo III. El comportamiento general es homogéneo encontrando leves diferencias entre las dos secuencias mostradas. A lo largo de todo el experimento, el defecto presenta una fuerte captación radiológica, manifestándose como una mancha más radiodensa que el hueso adyacente, pero en continuidad con éste. Únicamente, ambas secuencias, difieren en que en la Fig.88, la radiopacidad del defecto no alcanza la altura normal del hueso, apareciendo una franja superficial deprimida con respecto a la cortical del hueso adyacente. Hecho que se manifiesta radiológicamente por una mayor claridad en el TAC (Fig.88).

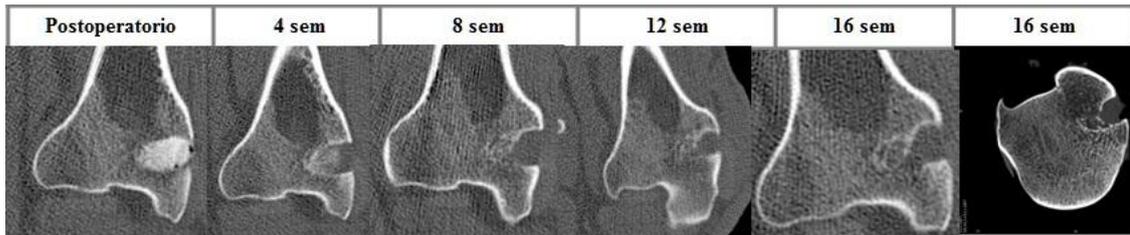


Fig.89. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 5 del material *L*.

En la figura Fig.89, las imágenes de TAC de los estadios más avanzados del ensayo se detectan leves y escasas zonas radiodensas irregulares en las cavidades óseas, sobre todo en la zona más profunda. Desde el momento de la cirugía, donde se aprecia la completa radiodensidad del defecto óseo que se encuentra relleno del material implantado, se produce una progresiva pérdida de radiopacidad a lo largo del experimento, de forma que a las 16 semanas el defecto es radiolúcido.

VALORACIÓN DE LAS IMÁGENES RADIOLÓGICAS Y DE LUPA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.-

Mediante la observación de las radiografías realizadas una vez que las ovejas fueron sacrificadas y las piezas óseas, que contienen el defecto óseo, fueron aisladas y cortadas en rodajas, podemos comprobar si existe una correlación entre la valoración previa realizada mediante las imágenes de TAC en distintos tiempos y la imagen radiológica obtenida una vez finalizado el tiempo de estudio. Además, a partir de las fotos de lupa de las secciones histológicas, podemos realizar una valoración previa de las respuestas tisulares provocadas frente a la implantación de los materiales pertenecientes al grupo III.

Primeramente, hablaremos de la respuesta homogénea encontrada en el resto de materiales del grupo III. La Fig.90, corresponde a aquellos materiales que presentan las manifestaciones radiológicas de TAC expuestas en la Fig.87. Se presenta una radiografía en la que se localiza muy bien el defecto ya que éste presenta un entramado trabecular fuertemente radiolúcido, en comparación con el hueso trabecular normal que lo rodea, apreciando además la continuidad ósea entre ambos. La manifestación biológica de este comportamiento se traduce en la formación de nuevo hueso, con trabéculas gruesas y anastomosadas, recuperando las dimensiones previas a la realización del defecto óseo. Cabe destacar la apreciación de procesos de osteointegración de restos de material en las trabéculas regeneradas (Fig.90).

Por otro lado, y siguiendo la correlación establecida con las imágenes de TAC, a continuación se muestra en la Fig.91 la radiografía correspondiente a aquellos casos del grupo III que mostraban leves diferencias en relación a la respuesta homogénea encontrada (Fig.88). En la Fig.91 se aprecia de forma clara la localización del defecto debido a su gran radiopacidad del mismo modo que ocurre en la Fig.90. Pero en este caso el entramado trabecular radiodenso no ocupa la totalidad del defecto, sino que la zona superficial de éste es radiotransparente. Así se pone de manifiesto una pequeña zona deprimida en la parte externa del defecto. En la imagen de lupa esta manifestación se traduce en la formación de hueso trabecular ocupando la cavidad menos en la zona cortical, donde se desarrolla la

formación de tejido conectivo.

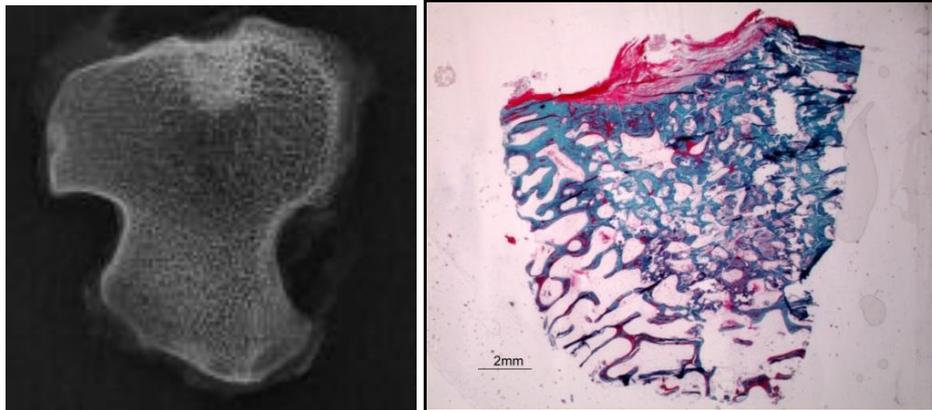


Fig.90. Imagen radiológica correspondiente al caso 5 del material *M* y su correlativa fotografía de lupa del corte histológico.

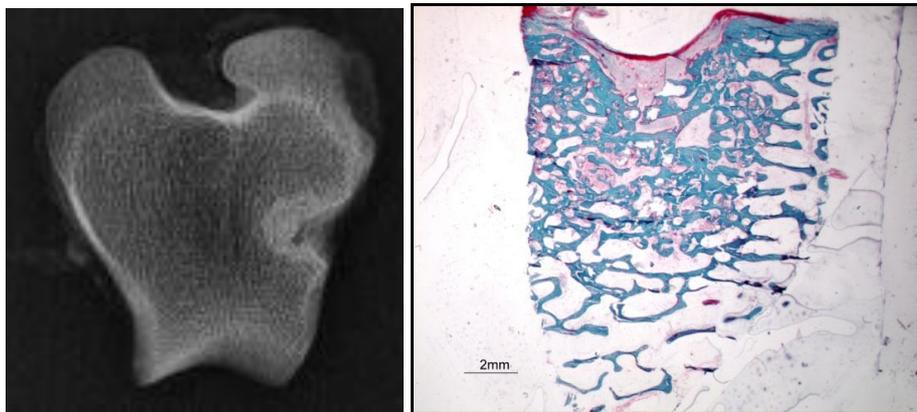


Fig.91. Imagen radiológica correspondiente al caso 2 del material *N* y su correlativa fotografía de lupa del corte histológico.

Por último analizaremos una radiografía representativa del material *L* que se corresponde con la Fig.89 analizada en el apartado anterior. La imagen radiológica (Fig.92) muestra la cavidad del defecto completamente radiotransparente y que por lo tanto no se ha producido la regeneración ósea. Únicamente, en la zona más profunda del defecto se distingue una ligera radiopacidad en el hueso trabecular que rodea al defecto. Esta manifestación radiológica, se traduce como una respuesta biológica de desarrollo de tejido conectivo de tipo denso altamente vascularizado, que ocupa la totalidad del defecto (Fig.93).

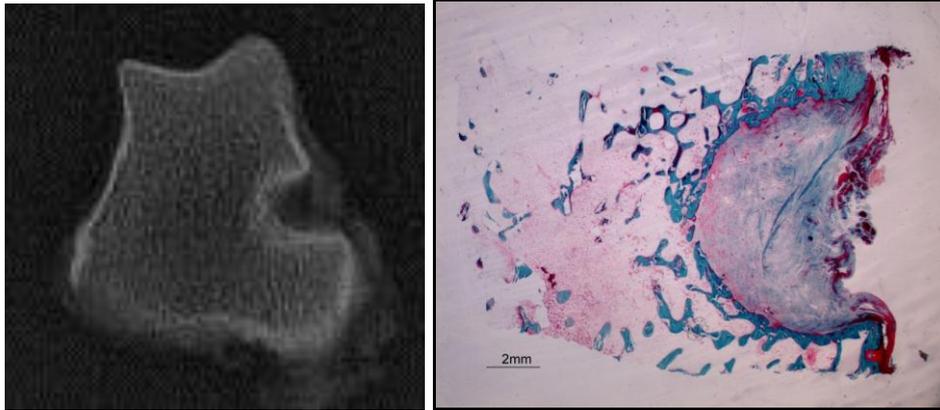


Fig.92. Imagen radiológica correspondiente al caso 1 del material *L*.

Fig.93. Imagen de lupa del corte histológico del caso 5 del material *L* que presenta el mismo patrón radiológico.

Las imágenes mostradas ilustran las respuestas más representativas correspondientes a los materiales del grupo III. De este modo, mediante su valoración podemos hacer una consideración previa de que la respuesta general inducida por los materiales del grupo III, salvo el material *L*, es la de presentar reparación radiológica de los defectos óseos y por lo tanto, regeneración ósea del defecto.

VALORACIÓN HISTOLÓGICA.-

A continuación se muestran las imágenes microscópicas más representativas de los cortes histológicos de los materiales pertenecientes al grupo III. De este modo, se ponen de manifiesto las respuestas biológicas predominantes en este tipo de materiales, comunes a todos ellos en su mayor parte, salvo en el caso del material *L*. Por ello se continuará con la subdivisión que se ha realizado al comienzo con la valoración de las imágenes radiológicas. Así por un lado se agruparan la mayor parte de los materiales que componen el grupo III y se expondrá aparte el comportamiento característico que presenta el material *L*.

Comenzado con la valoración histológica de la mayoría de los materiales pertenecientes al grupo III, revela un avanzado proceso de regeneración del defecto óseo (Figs.94-105). Se ha desarrollado la formación de hueso trabecular e incluso se ha conseguido restablecer la cortical, aunque el hueso que lo forma no es de tipo compacto, sino trabecular. La morfología de las trabéculas pone de manifiesto una gran actividad osteogénica, debido a que son trabéculas gruesas, anastomosadas y con una disposición irregular. La actividad osteogénica se pone de manifiesto al detectar sobre las superficies trabeculares largas hileras de osteoblastos, que van depositando la matriz orgánica sintetizada formando gruesas líneas de osteoide. La trabéculas presentan numerosas cavidades vaculares, rodeadas por osteoide y asociadas siempre a vasos sanguíneos. Escasas son las zonas donde encontramos una deficiencia de mineralización del hueso trabecular.

Los procesos de osteointegración son numerosos, encontrando grandes fragmentos de material embebidos dentro de la matriz ósea trabecular. En aquellos casos en los que la superficie del material osteointegrado se encuentra en contacto con el tejido blando, en vez

de estar rodeado por tejido óseo, está delimitado por células multinucleadas. Algunos restos de material, no osteointegrados, se encuentran rodeados por células multinucleadas, que los aíslan del medio que los rodean e intentan fraccionarlos y fagocitarlos.

Una respuesta biológica característica de estos materiales es que en los espacios intertrabeculares se ha desarrollado médula de tipo adiposo altamente vascularizada.

De forma puntual, en alguno de los casos de cada material perteneciente al grupo III se han detectado pequeños focos inflamatorios, muy focalizados, por lo que no se han considerado como respuestas adversas.

Lo comentado anteriormente, hace referencia a la tendencia general presente en todos los materiales del grupo III, con excepción del material *L*; aunque es preciso indicar que se han encontrado escasos casos en los que no se ha regenerado la cavidad del defecto, desarrollando la formación de tejido conectivo, o casos en los que debido a complicaciones quirúrgicas no han permitido la correcta evolución de los defectos. Cabe destacar, que en otros casos (Figs.102-105), aunque se ha producido la regeneración ósea del defecto, está no es completa, ya que en la zona superficial, correspondiente a la zona cortical, se ha formado hueso trabecular a un nivel inferior que el hueso normal adyacente y esta diferencia se encuentra rellena por la formación de tejido conectivo vascularizado.

Por último, en ninguno de los casos se han detectado procesos granulomatosos o necrosis celular, al igual que no se han encontrado procesos inflamatorios generalizados.

Por otro lado, en la evaluación histológica del material *L*, la manifestación mayoritaria y común en todos los casos, es el desarrollo de tejido conectivo denso en la cavidad del defecto óseo (Fig.106 y Fig.107). Las fibras de colágeno presentes adquieren una coloración azul, debido a la tinción con tricrómico de Goldner, indicando que se trata de un tejido conectivo inmaduro. Otra de las características de la desmoplasia desarrollada es la elevada vascularización detectada en todos los casos, donde predominan vasos con paredes delgadas y luces dilatadas, aunque existen algunos vasos con paredes gruesas (Fig.106). En relación al componente celular presente en el tejido conectivo, cabe destacar la presencia de macrófagos y la asociación de estos, formando células multinucleadas. Aunque los restos de material encontrados son escasos, indicando que los materiales sufren rápidos procesos de reabsorción, encontramos remanentes de material asociados a éste componente celular, encontrándose en el interior de su citoplasma, debido a procesos de fagocitosis (Fig.108). En ciertas zonas se puede distinguir una transición entre tejido conectivo y tejido adiposo (Fig.109). Es preciso destacar, que aunque se ha desarrollado tejido conectivo en todos los casos, y encontramos una elevada celularidad, donde predominan macrófagos con material fagocitado, la respuesta inflamatoria encontrada es muy escasa, presente únicamente formando pequeños focos inflamatorios agudos en los casos 1 y 4 o como en los casos 2 y 3, los cuales no se han tenido en cuenta para realizar la valoración histológica ya que presentan una respuesta tisular adversa debido a complicaciones quirúrgicas.

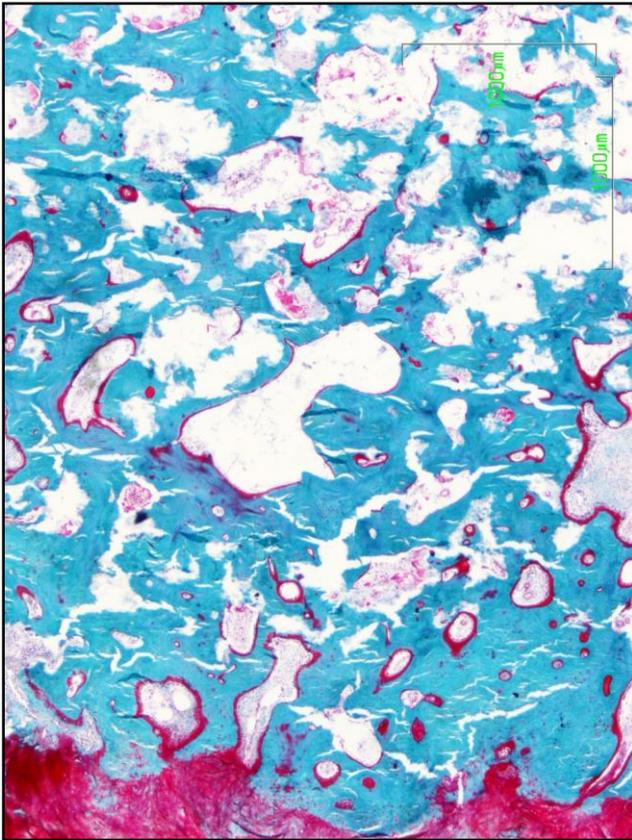


Fig.94 (2x)

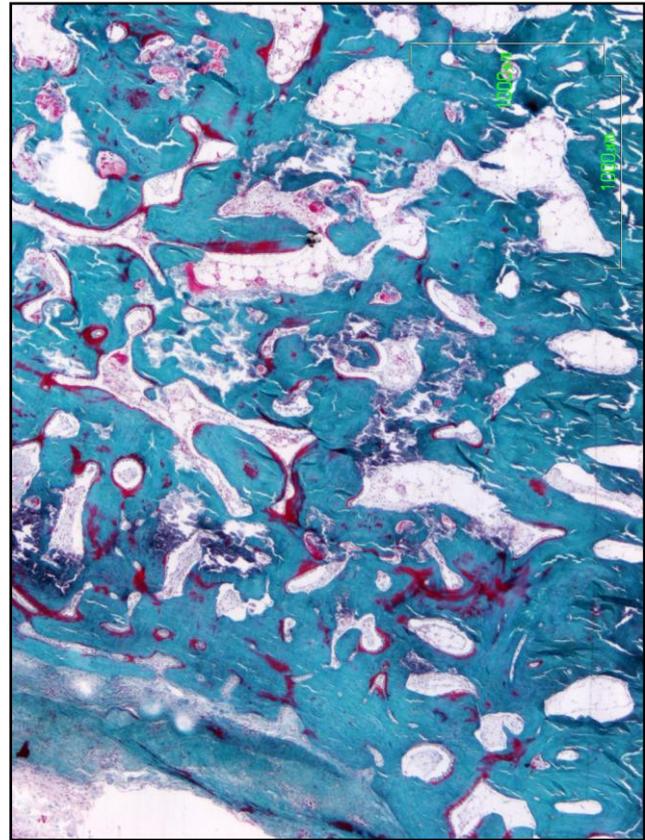


Fig.95 (2x)

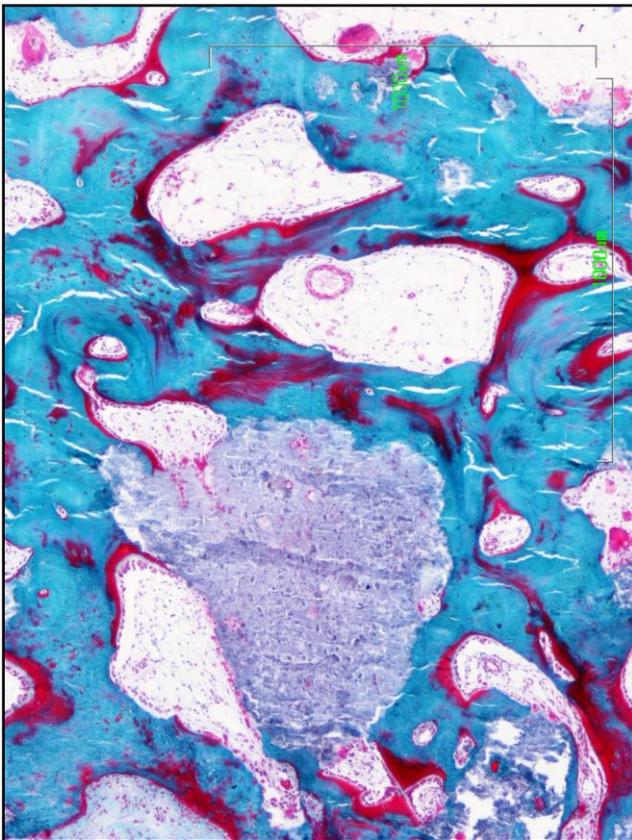


Fig.96 (4x)

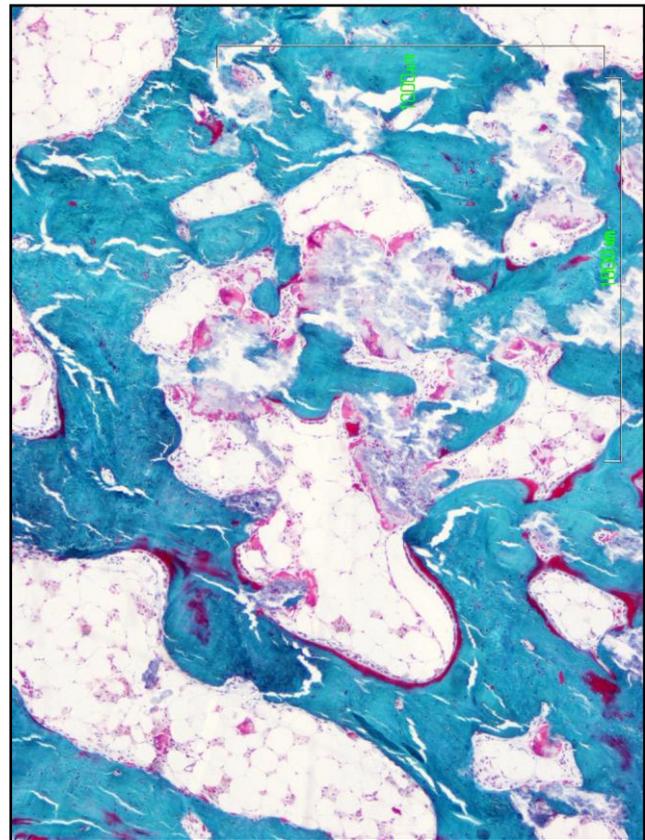


Fig.97 (4x)

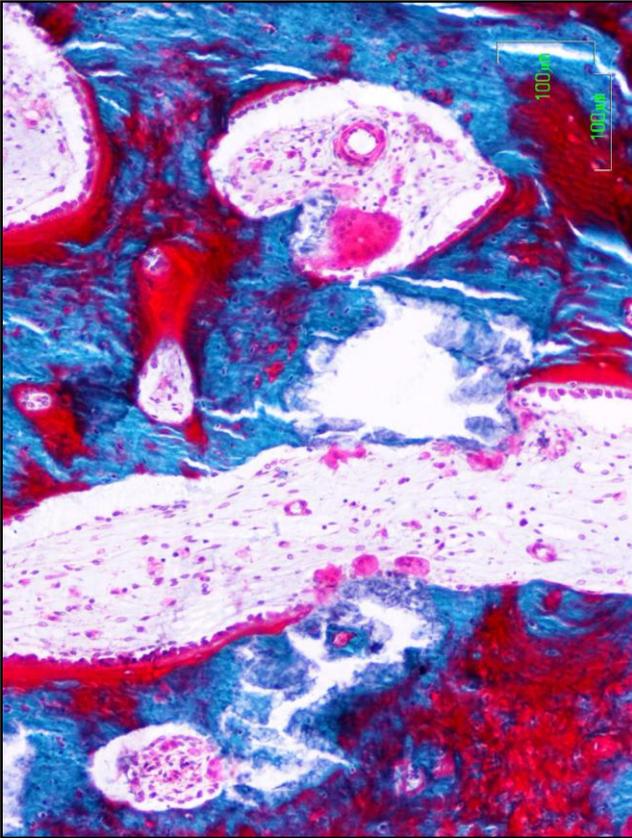


Fig.98 (10x)

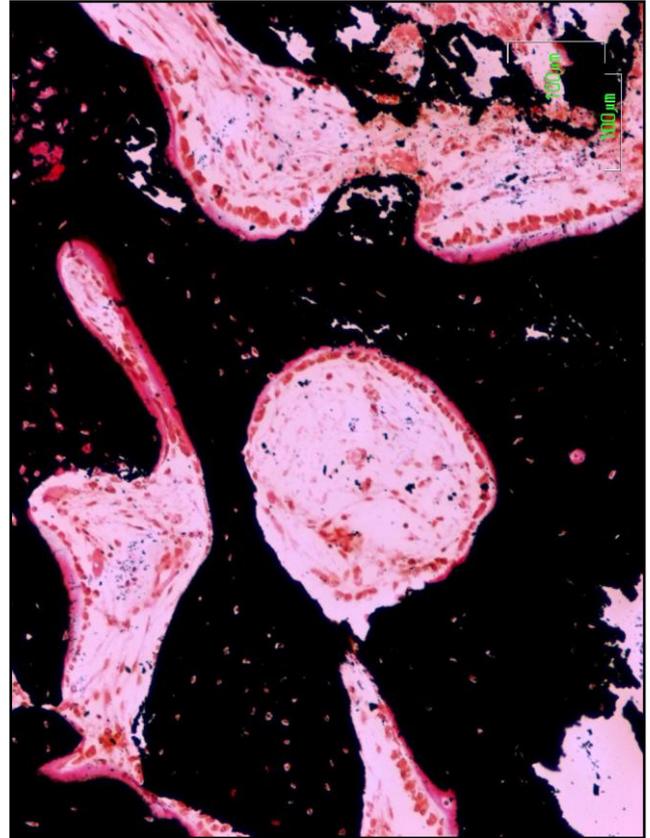


Fig.99 (10x)

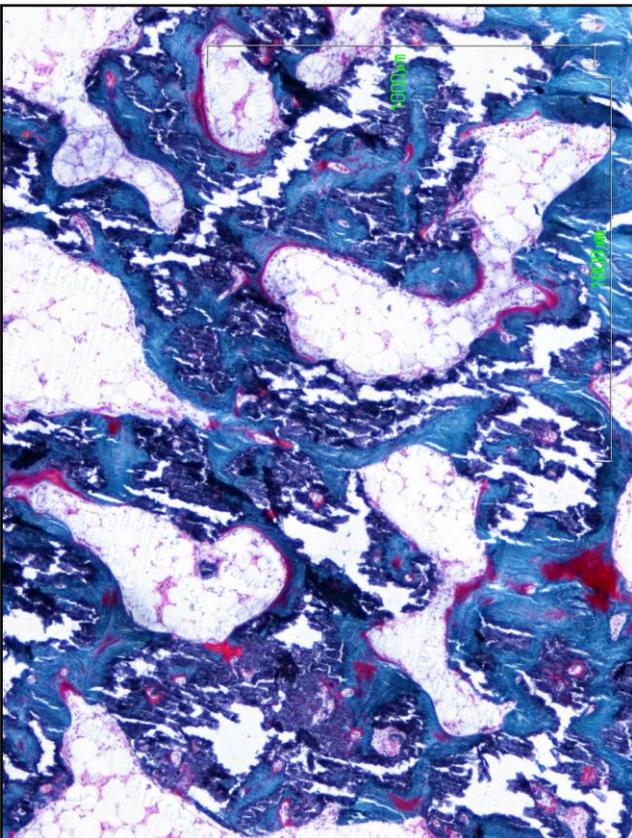


Fig.100 (10x)

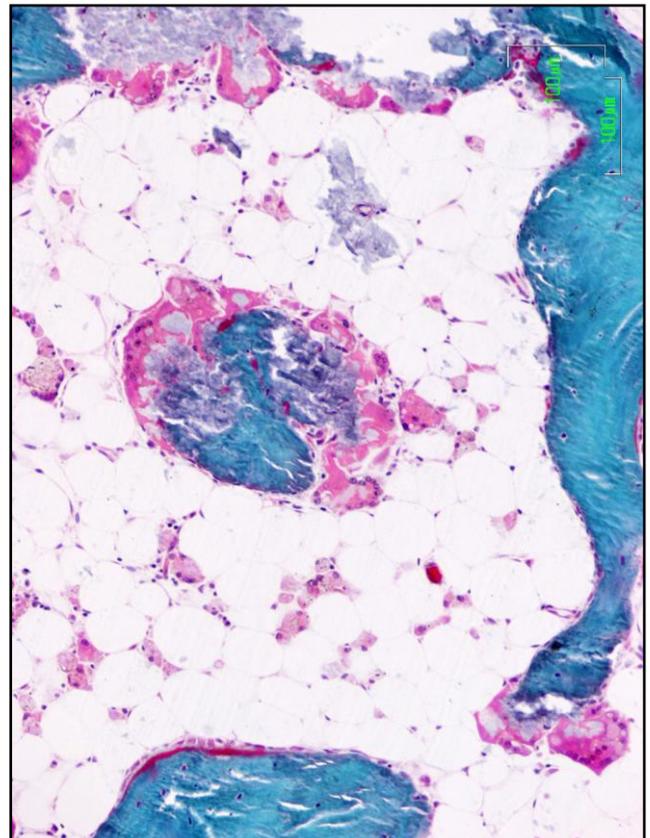


Fig.101 (10x)

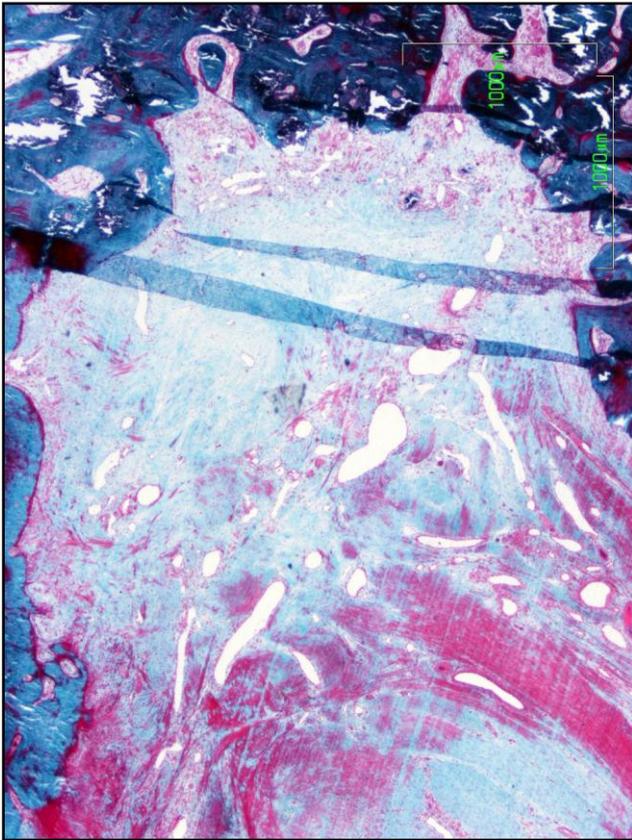


Fig.102 (2x)

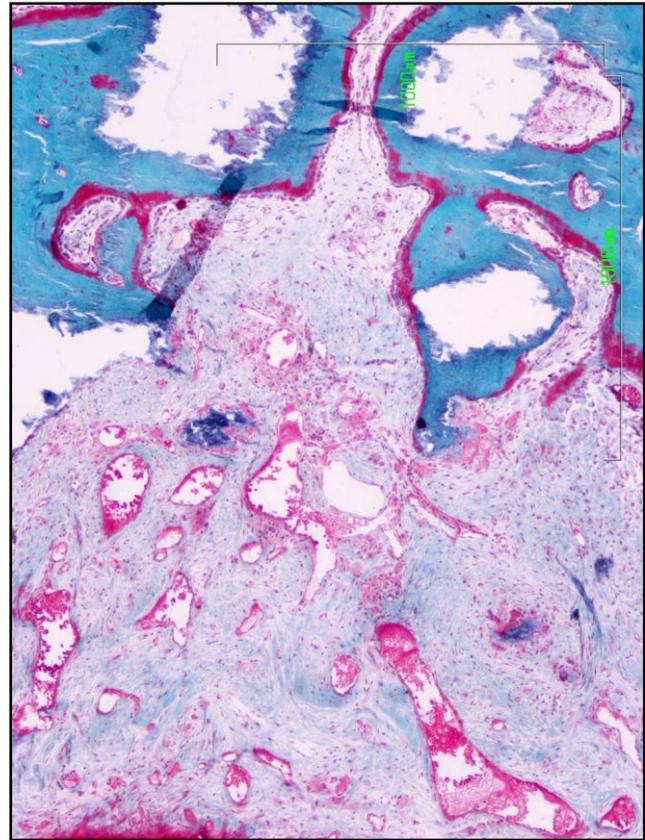


Fig.103 (4x)

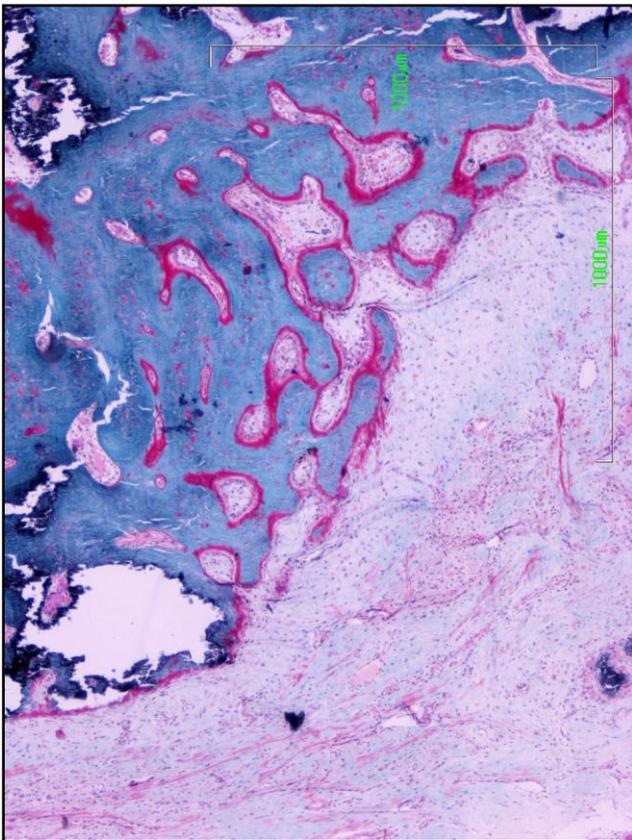


Fig.104 (4x)

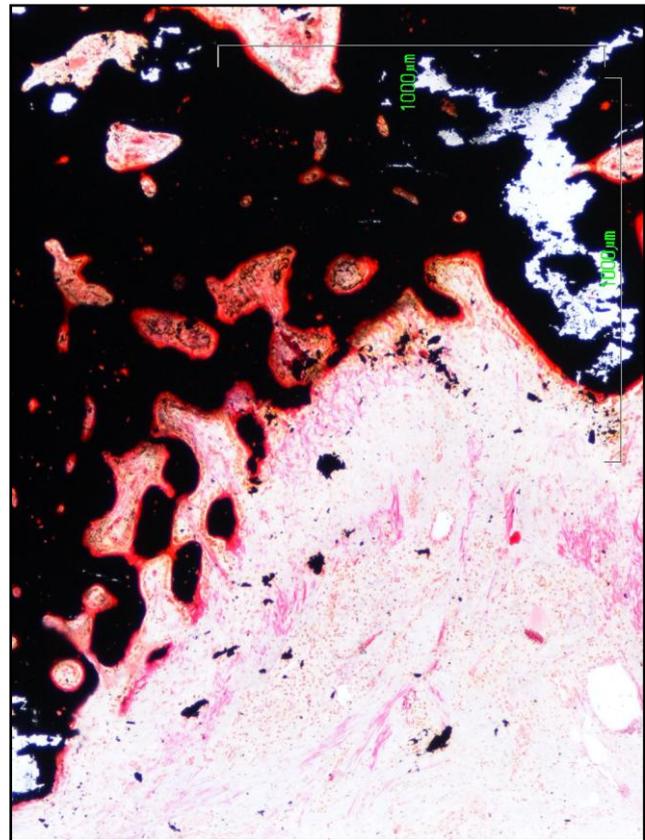


Fig.105 (4x)

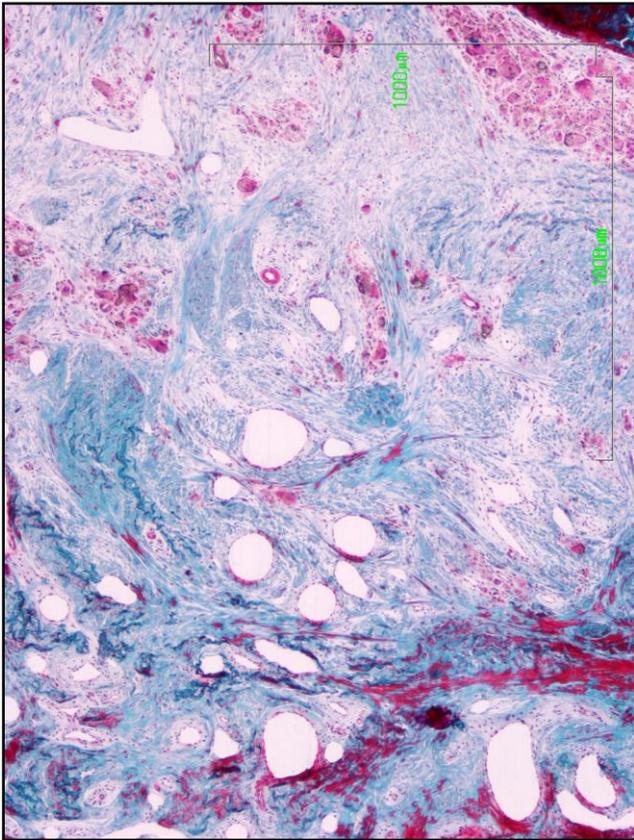


Fig.106 (2x)

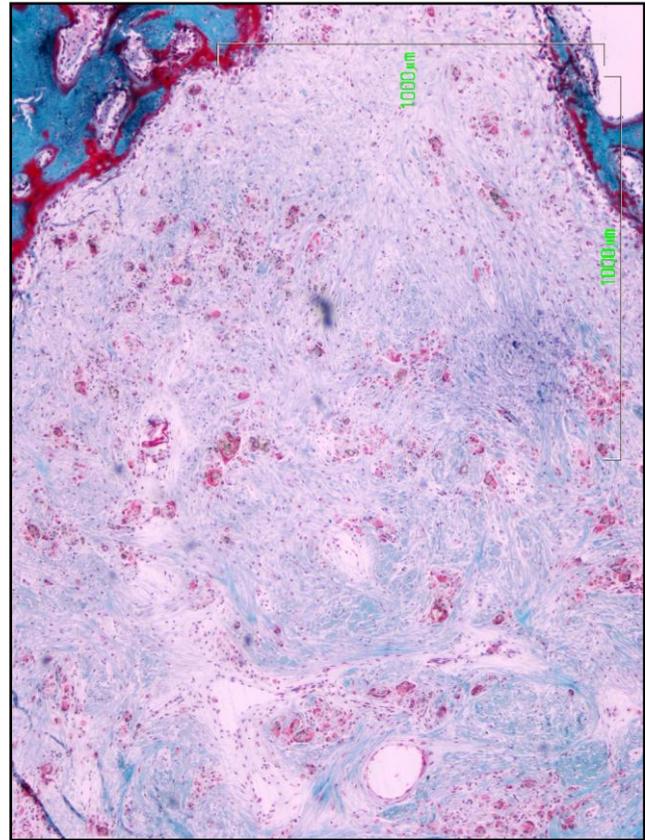


Fig.107 (2x)

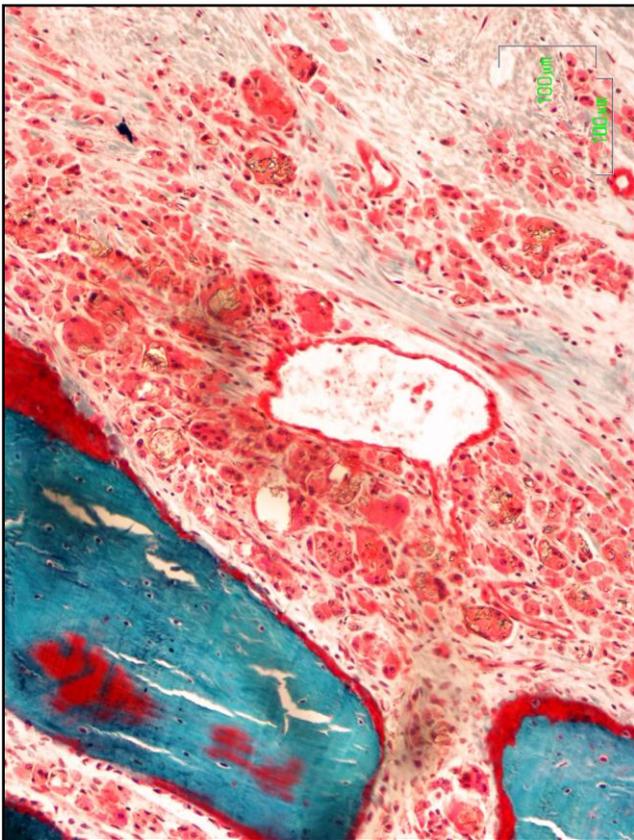


Fig.108 (10x)

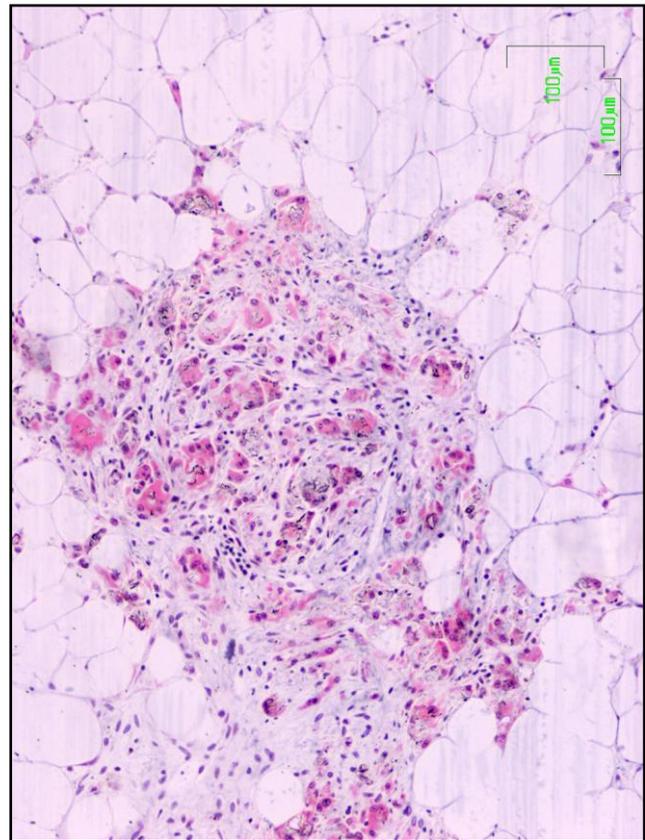


Fig.109 (10x)

Fig.94 (caso 4, M).- Imagen histológica panorámica donde se muestra el hueso trabecular regenerado. Se trata de la zona externa del defecto, cuya cortical se ha restablecido mediante la formación de trabéculas gruesas, anastomosadas y notable osteointegración de restos de material (éstos corresponden a las zonas blancas, angulares e irregulares que aparecen dentro de las trabéculas óseas debido a que se han levantado en el proceso de corte con el micrótopo). Se distinguen cavidades vasculares asociados a gruesas líneas de matriz orgánica no mineralizada, osteoide (zonas de color rojo). Desarrollo de médula adiposa en los espacios intertrabeculares. (2x, TG).

Fig.95 (caso 1, N).- Fotografía panorámica donde se refleja hueso trabecular neoformado, constituido por gruesas trabéculas, anastomosadas y con pequeñas zonas internas aún no mineralizadas. Se aprecian restos de material osteointegrados. Desarrollo de médula adiposa. (2x, TG).

Fig.96 (caso 5, Ñ).- Trabéculas óseas regeneradas, gruesas y con grandes restos de material perfectamente osteointegrados. Se aprecian hileras de osteoblastos, en las superficies trabeculares óseas, con grandes depósitos de material orgánica, formando osteoide. Se diferencian osteocitos inmaduros en sus lagunas no mineralizadas, al igual que pequeñas zonas dentro de las trabéculas aún no calcificadas (ambas de color rojo). Espacios intertrabeculares ocupados por médula adiposa y alguna célula multinucleada en asociación a pequeños restos de material no osteointegrados. (4x, TG).

Fig.97 (caso 1, N).- Se muestra hueso trabecular regenerado con material osteointegrado. En aquellas superficies del material que no se encuentran rodeadas por tejido óseo, se encuentran delimitadas por células multinucleadas. Encontramos también amplias hileras de osteoblastos con líneas de osteoide asociadas y el desarrollo de médula adiposa vascularizada. (4x, TG).

Fig.98 (caso 2, M).- Detalle de las trabéculas regeneradas con material osteointegrado. Las superficies óseas muestran hileras de osteoblastos activos sintetizando matriz orgánica, mientras que la superficie de material en contacto con el espacio medular se encuentra rodeado por células multinucleadas. Espacio medular adiposo con un vaso de gruesas paredes. Se distinguen cavidades remodeladoras y zonas de hueso inmaduro, aún no mineralizadas. (10x, TG).

Fig.99 (caso 2, M).- Imagen donde se pone de manifiesto la notable actividad osteosintética de los osteoblastos al evidenciar de forma clara gruesas líneas de osteoide, (líneas rojas) en contraste con la buena mineralización de las trabéculas regeneradas (color negro). También se advierten las lagunas de los osteocitos inmaduros, que aparecen como puntos rosados dentro de las trabéculas. En los espacios intertrabeculares se ha desarrollado médula adiposa vascularizada. En las trabéculas óseas se diferencian zonas internas blancas con contornos muy irregulares, que se debe a los fragmentos de restos de material, osteointegrados, que se han perdido en el proceso de corte de las muestras. (10x, VK).

Fig.100 (caso 5, N).- Detalle del hueso trabecular regenerado con considerable osteointegración de material, que se muestra con una coloración tintorial de color azul, ligeramente más oscuro que el azul con el que se tiñe el hueso. Se aprecian escasas líneas de osteoide, pequeñas zonas de matriz ósea no mineralizada y médula adiposa. (10x, TG).

Fig.101 (caso 3, Ñ).- Detalle de una espícula ósea neoformada con material osteointegrado, cuya superficie se encuentra delimitada por células multinucleadas. Éstas presentan fragmentos de material dentro de su citoplasma. La espícula ósea se encuentra rodeada por médula de tipo adiposo, con algún resto de material y escasa células multinucleadas. (10x, TG).

Fig.102 (caso 5, N).- Imagen histológica panorámica representativa de aquellos casos en los que la zona cortical no se regeneró. Se aprecia el desarrollo de tejido conectivo en la zona superficial del defecto. Se advierte una profusa vascularización del tejido, mostrando vasos con paredes delgadas y grandes luces dilatadas. (2x, TG).

Fig.103 (caso 2, Ñ).- Imagen a mayor aumento de otros de los casos con el mismo comportamiento que el observado en la Fig.102. Donde también se pone de manifiesto la formación de tejido conectivo altamente vascularizado en la zona superficial del defecto. En los vasos se advierte hematíes. El hueso trabecular regenerado adyacente, presenta zonas de material osteointegrado (aunque se ha desprendido de la muestra al cortarla) y gruesas líneas de osteoide en sus superficies óseas. (4x, TG).

Fig.104 (caso 3, O).- Detalle de la transición entre la zona cortical con desarrollo de tejido conectivo vascularizado y el hueso trabecular regenerado. Existen gruesas líneas de osteoide sobre las superficies trabeculares óseas y en las cavidades remodeladoras. Se aprecian restos de material osteointegrados (aunque se han desprendido por el corte). (4x, TG).

Fig.105 (caso 3, O).- Mismo caso que la Fig.104, pero con diferente tinción, para poner de manifiesto las zonas de depósito de materia orgánica por parte de los osteoblastos sobre las superficies óseas regeneradas, al igual que en el contorno de la unidades remodeladoras. En contraste se presenta el hueso maduro, correctamente mineralizado, que aparece de color negro. Se distinguen zonas blancas con contornos irregulares que correspondería a las zonas de integración de material, desprendido por el procesado de la muestra. (4x, VK).

Fig.106 (caso 6, L).- Imagen panorámica del defecto óseo donde se aprecia la profusa desmoplasia desarrollada altamente vascularizada. Se distinguen las luces de los vasos. La tinción es característica, adquiriendo una coloración azul, que implica la presencia de fibras de colágeno inmaduro. Se aprecia ciertas zonas con notable componente celular. (2x, TG).

Fig.107 (caso 1, L).- Corte histológico donde se ha desarrollado la formación de tejido conectivo denso. Presentan pequeños focos con un alto contenido celular y restos de material. Se distinguen las luces de algunos vasos. Las superficies óseas trabeculares en contacto con el tejido conectivo presentan cierta actividad osteogénica, representada mediante gruesas líneas de osteoide. (2x, TG).

Fig.108 (caso 5, L).- Detalle del tejido conectivo desarrollado con una elevada celularidad, formada por células multinucleadas y macrófagos con material fagocitado en el interior de su citoplasma. Existen vasos con delgadas y finas paredes y grandes luces dilatadas. La superficie trabecular ósea muestra una gruesa línea de osteoide y una pequeña zona deficiente en mineralización. (10x, TG).

Fig.109 (caso 6, L).- Zona donde se aprecia una pequeña formación de tejido conectivo con alta celularidad compuesta por macrófagos y en transición con la formación de tejido adiposo. (10x, TG).

Tabla resumen del GRUPO III: material L.-

Grupo III: material L	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.D.	Radiotransparente.	Radiolúcido con una línea gruesa radiodensa que delimita la cavidad.	No regenerado, radiolúcido. Contorno del defecto marcado por una línea radiodensa.	Zona superficial no regenerada, con tejido conectivo denso.	Zona superficial no regenerada. Tejido conectivo denso vascularizado y con células multinucleadas con partículas de material. Hueso adyacente presenta líneas de osteoide junto con osteoblastos.
Caso 2	F.D.	Radiotransparente de grandes dimensiones.	Radiotransparente de grandes dimensiones.	Radiotransparente, de grandes dimensiones.	Infección. Procesos de osteolisis.	Infección. Procesos de osteolisis.
Caso 3	T.I.	Leve radiodensidad que ocupa todo el defecto, incluso llega al canal medular.	Radiolúcido.	No regenerado, radiolúcido. Alcanza el canal medular.	No regenerado, formación de tejido conectivo denso. Granulomas.	Defecto no regenerado. Formación de tejido conectivo vascularizado. Granulomas. Transición de tejido conectivo denso a adiposo. Hueso cercano presenta notables líneas de osteoide y deficiencia de mineralización. Respuesta inflamatoria crónica profusa. Abundantes células multinucleadas.
Caso 4	T.I.	Zona superficial radiolúcida. Mitad interna radiopaca difusa.	Zona superficial radiolúcida. Mitad interna con mayor radiodensidad que el hueso adyacente, con aspecto trabecular.	Entramado trabecular más radiodenso que ocupa casi por completo la cavidad, menos en la zona superficial.	Regeneración ósea. Trabéculas gruesas con poca actividad osteogénica. Zona externa embebida con desarrollo de tejido conectivo denso.	Regeneración ósea Trabéculas neoformadas gruesas con poca actividad, poco osteoide. Hueso neoformado con abundantes cavidades vasculares con línea de osteoide y osteoblastos. Osteocitos inmaduros. Gran osteointegración de material. Cavidades intertrabeculares: predominio de tejido adiposo, en otras zonas tejido conectivo con macrófagos con material fagocitado. Vascularización. Zona cortical no formada, desarrollo de tejido conectivo denso altamente vascularizado. Algún macrófago con material fagocitado.
Caso 5	H.I.	Zona superficial radiolúcida. Mitad interna radiopaca difusa.	Mitad externa: radiotransparente. Mitad internacentrada trabecular de la misma radiodensidad que el hueso adyacente, en continuidad con él, no se aprecia el contorno del defecto.	Mitad superficial: radiotransparente. Mitad interna: zonas radiodensas difusas y desorganizadas.	No regeneración ósea, relleno por tejido conectivo denso. El hueso que rodea al defecto presenta osteoide en la superficie en contacto con el tejido conectivo.	Defecto no regenerado. Tejido conectivo vascularizado. Se ha producido una formación ósea a modo de puente. El puente óseo presenta osteoide en la superficie en contacto con el tejido conectivo. Abundantes células multinucleadas en asociación con restos de material. En el espacio medular adiposo encontramos restos de material con alguna célula multinucleada, junto con escasas espículas óseas deficientes en mineralización y pocas líneas de osteoide.
Caso 6	H.I.	Radiotransparente. En la zona media lateral se aprecia una zona tenuemente radiodensa.	Radiolúcido. Formación curiosa: a la altura media del defecto aparece un puente óseo que divide la cavidad del defecto en dos.	Prolongaciones trabeculares, con la misma radiodensidad que el hueso adyacente, que estrechan la cavidad e intentan cerrarla. Zonas superficial e interna radiolúcidas.	Formación de un puente ósea hacia la mitad del defecto. Parte superficial con tejido conectivo. Parte interna alcanza el canal medular. Tanto el hueso regenerado que forma el puente como el hueso adyacente presentan una notable deficiencia de mineralización.	No regenerado. Formación de puente óseo en la mitad del defecto. Zona externa: tejido conectivo con numerosos vasos, células multinucleadas y macrófagos con material fagocitado. Puente óseo formado por hueso trabecular neoformado, con integración de material. Gruesas líneas de osteoide y deficiencia de mineralización. Zona interna: médula adiposa: transición de tejido conectivo laxo a adiposo. Hay células multinucleadas y macrófagos con material fagocitado.
Caso 7	H.D.	Casi la totalidad del defecto, menos la zona externa presenta radiodensidad difusa.	Entramado trabecular radiodenso en todo el defecto menos en la zona externa, que es radiotransparente.	Defecto radiolúcido difusa con apariencia granulada. Zona externa radiotransparente.	Zona externa: tejido conectivo denso con restos de material. La mayor parte de la cavidad está ocupada por tejido conectivo y adiposo. Presenta escasas formaciones trabeculares neoformadas.	Zona superficial: tejido conectivo denso y escasos restos de material. Resto de la cavidad rellena por tejido conectivo laxo y adiposo. Escasa formación de hueso trabecular con gran osteointegración de material.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL L (GRUPO III)						
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos
**	***	**	**	***	***	**
Caso 4 presenta regeneración completa menos zona cortical. Casos 5, 6 y 7: formaciones similares a puentes.	Denso: casos 1, 3, 4 y 5. Laxo: Casos 6 y 7.	Casos 1, 6 y 7 (escaso).	Casos 4 y 6	Casos 4, 5 y 6. Escasa en caso 1.	Abundantes en casos 3, 5 y 6. Escasas en 1 y 7.	Casos 4 y 6.
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa
*	*	-	**	***	***	***
Profusa y crónica en caso 3. Pequeños focos inflamatorios en casos 1 y 4.	Caso 3		En hueso adyacente: casos 1,3 y 6. Escaso osteoide en hueso regenerado casos 4, 5 y 7.	En hueso adyacente: casos 3 y 6. En hueso regenerado: escasa en casos 4 y 5, y abundante en caso 6.	En hueso adyacente: casos 1 y 3. En hueso regenerado: casos 4, 6 y 7.	Casos 4, 5, 6 y 7. Transición tejido conectivo a adiposo: casos 3, 6 y 7.
Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación		
-	**	***	*	-		
	Casos: 5, 6 y 7.	Casos 4 y 7. Escasa en casos 1 y 6.	Caso 3.			

Tabla resumen del GRUPO III: material M.-

Grupo III: material M	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Radio denso. La zona cortical se encuentra ligeramente embebida.	Aspecto trabecular muy radiodenso, en continuidad con el hueso adyacente.	Zona superficial no formada a la altura correspondiente, está más baja. Entramado trabecular radiodenso por todo el defecto, en continuidad con el hueso normal, que es menos radiodenso.	Regeneración ósea. Cortical formada a una altura más baja, con escaso tejido conectivo. Hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas y anastomosadas. Superficie ósea en zona cortical, en contacto con tejido conectivo presenta abundantes líneas de osteoide.	Regeneración ósea. Cortical formada una altura más baja pero presenta hueso trabecular, no es compacto. Trabéculas neoformadas en la zona de la cortical, cuya superficie está en contacto con el tejido conectivo son: gruesas, con abundante osteoide e hileras de osteoblastos, deficientes en mineralización y osteocitos inmaduros. Gran osteointegración de material. Restos de material en asociación a células multinucleadas.
Caso 2	F.I.	Radio transparente salvo pequeños puntos radiodensos en la zona profunda. Contorno del defecto delimitado por una gruesa línea radiodensa.	Captación radiopaca homogénea por todo el defecto.	Muestra signos de regeneración radiológica. Se distingue un entramado trabecular algo más radiodenso que el hueso adyacente normal.	Regeneración ósea. Cortical levemente embebida. Hueso trabecular regenerado grueso. Escasos restos de material y escasa osteointegración.	Regeneración ósea. Leve invaginación en zona superficial con formación de tejido conectivo. Trabéculas regeneradas gruesas, desorganizadas y anastomosadas. Osteocitos inmaduros. Zonas de remodelación con gruesas líneas de osteoide. Desarrollo de médula adiposa vascularizada. Escasa osteointegración de material.
Caso 3	F.D.	Zona superficial radiolúcida. Laterales y zona más profunda radiodensos.	Entramado granulado muy radiopaco, en continuidad con el hueso adyacente.	Toda la cavidad rellena por un entramado trabecular radiodenso, en continuidad con el hueso adyacente.	Regeneración ósea. Aún queda una zona no regenerada en donde se ha desarrollado tejido conectivo que se introduce un poco desde la zona del peristio. Resto del defecto presenta hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas, desorganizadas y anastomosadas.	Regeneración ósea: hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas, desorganizadas y anastomosadas. Cortical no formada, ha desarrollado tejido conectivo. Superficie ósea en contacto con el tejido conectivo, en la parte superior presenta gruesas líneas de osteoide, deficiencia en mineralización y osteocitos inmaduros. Notable vascularización. Gran osteointegración de material. Espacios intertrabeculares: médula adiposa. Células multinucleadas rodeando restos de material.
Caso 4	T.I.	Miada externa: radiolúcida, aunque aparece una línea radiodensa. Midad interna: radiodensa.	Ocupando todo el defecto, menos uno de los laterales, aparece un entramado trabecular radiodenso, irregular, en continuidad con el hueso adyacente.	Fuertemente radiodenso, irregular en la parte externa y con aspecto trabecular en la parte más interna. No hay continuidad con el hueso adyacente.	Regeneración ósea. Cortical no formada, aún queda una pequeña invaginación de tejido conectivo desde el peristio. Defecto regenerado con hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas, anastomosadas con una gran osteointegración de material.	Regeneración ósea. Hueso neoformado con gran actividad osteogénica, abundante osteoide y osteocitos inmaduros. Zona externa: tejido conectivo vascularizado. Algún pequeño foco inflamatorio. Gran osteointegración de material. Hueso regenerado con abundantes cavidades vasculares. Células multinucleadas asociadas a restos de material. Focos inflamatorios en espacios intertrabeculares, además transición de tejido conectivo a adiposo.
Caso 5	T.I.	Radiodenso, con mayor captación radiológica que el hueso adyacente.	Radiodenso, con mayor captación radiológica que el hueso adyacente.	Se distingue un entramado trabecular algo más radiodenso que el hueso adyacente, incluso en la zona más externa del defecto. Continuidad con el hueso normal.	Regeneración ósea, incluso la cortical, aunque se trata de hueso trabecular con notable osteointegración de material. Trabéculas neoformadas gruesas y desorganizadas. Espacio medular adiposo.	Regeneración ósea. Hueso trabecular regenerado desorganizado y con notable osteointegración de material. Trabéculas gruesas y anastomosadas. Escasa actividad osteogénica: pocas líneas de osteoide. Zonas aún no mineralizadas en zona cortical, donde el hueso trabecular es inmaduro. Espacio medular adiposo vascularizado. Actividad remodeladora, presencia de osteoclastos en superficie ósea y del material. Escasas células multinucleadas.
Caso 6	T.D.	Radiolúcido, de gran tamaño. Alcanza canal medular.	Radiolúcido, de gran tamaño. Alcanza canal medular.	Radiotransparente, alcanza canal medular.	No regenerado. Desarrollo de tejido conectivo. Restos de material.	No regenerado, tejido conectivo denso, altamente vascularizado. Inflamación y granulomas. Escasos restos de material, algo de integración de material en hueso adyacente al defecto. Transición de tejido conectivo a adiposo. Espículas óseas con gran deficiencia de mineralización y signos de reabsorción por osteoclastos.
Caso 7	H.I.	Radiotransparente de gran tamaño.	Radiotransparente de gran tamaño.	Radiotransparente.	Infección y osteolisis.	Infección y osteolisis. Inflamación crónica. Grandes depósitos de material. Granulomas.
Caso 8	H.I.	Radiolúcido. El contorno del defecto presenta una delgada línea radiodensa. Hay una mancha radiodensa en el interior de la cavidad.	No muy clara la imagen. Aspecto trabecular radiodenso, incluso en la zona externa.	No muy clara, entramado trabecular levemente radiodenso que ocupa todo el defecto, incluso la zona externa.	Regeneración ósea. Cortical formada con aspecto trabecular, inmadura. Resto del defecto hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas, anastomosadas con osteointegración de material.	Regeneración ósea. Cortical formada por hueso trabecular. En peristio no hay tejido conectivo. Hueso neoformado trabecular, con notable deficiencia en mineralización. Gran osteointegración dematerial. Espacios intertrabeculares con numerosos restos de material. Asociación restos material con células multinucleadas. Pequeños focos inflamatorios. Abundantes líneas de osteoide.
Caso 9	H.I.	Se distingue captación radiológica en la zona más interna del defecto, algo más radiodensa que el hueso adyacente, el resto de la cavidad es radiotransparente.	Únicamente la zona más interna del defecto, desde los laterales del defecto, se parece un entramado trabecular radiopaco, el resto de la cavidad es radiolúcida.	No se puede discriminar la localización del defecto.	No regenerado, desarrollo de tejido conectivo vascularizado. El hueso adyacente ha reaccionado y ha formado hueso.	No regeneración ósea, formación de tejido conectivo vascularizado con restos de material rodeados por alguna célula multinucleada. Hueso adyacente ha sufrido procesos de remodelación, ya que presenta formación ósea en la zona más interna del defecto, con material osteointegrado, osteocitos inmaduros y gruesas líneas de osteoide, sobre todo cuando la superficie ósea trabecular se encuentra en contacto con el tejido conectivo. También se detectan osteoclastos.
Caso 10	H.D.	Zona externa radiolúcida. Resto del defecto con radiodensidad similar a la del hueso adyacente, no se distingue el defecto.	Zona externa radiolúcida, con forma de escalón muy regular. Resto del defecto con radiodensidad similar a la del hueso adyacente, no se distingue el defecto.	Zona cortical radiotransparente. Resto de la cavidad: entramado trabecular muy radiodenso, en continuidad con el hueso normal adyacente.	Zona superficial: tejido conectivo, resto del defecto regenerado, con hueso trabecular neoformado.	Regeneración ósea. Hueso trabecular grueso, con líneas de osteoide y procesos de reabsorción (osteoclastos). Menor integración de material que en otros casos. Pequeños granulomas. Zona cortical: tejido conectivo denso, vascularizado. Restos de material en espacio intertrabecular con pequeños focos inflamatorios y células multinucleadas.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL M (GRUPO III)									
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos	Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración
***** Casos 1, 2, 3, 5, 8 y 10. Respuesta del hueso adyacente en caso 9.	** En zona cortical: casos 1, 2, 3, 4 y 10. Todo el defecto de tipo denso casos 6 y 9.	** Casos: 3, 8, 9 y 10.	**** Casos: 1, 3, 4, 8 y 10.	** En tejido conectivo: casos 3 y 9 (muy abundante) y casos 4 y 10. Casos 2 y 5 en tejido adiposo.	**** Casos: 1, 3, 4, 8, 9 y 10.	-	-	** Casos 1, 5, 6 (en espículas óseas). Casos: 2, 9 y 10 (abundantes).	**** Casos 1, 3 y 5 (abundante), 2, 4, 8, 9 y 10 (escasa)
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros	Médula Adiposa	Granulomas	Encapsulación	
*	-	-	****	***	**	**	*	-	
Caso 6, pequeños focos inflamatorios: Casos 4, 8 y 10.			En casos 1 (abundante), 2, 3, 4, 8, 9 y 10.	En zona superficial: hueso regenerado, casos: 1, 3 y 5. En trabéculas más internas: caso 8.	Casos: 1, 2, 3, 5, 8 y 9.	Caso 2, 3, 5 y 9: espacio intertrabecular. Transición de conectivo a adiposo en casos 4 y 6.	Casos 6 y 10 (pequeños)		

Tabla resumen del GRUPO III: material N.-

Grupo III: material N	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.D.	Defecto radiodensos salvo la parte más externa que es radiotransparente. Presenta una mayor captación radiológica que el hueso normal adyacente.	Imagen similar a 8 sem, aunque la zona radiotransparente se ha reducido, siendo la zona radiodensa más grande, ocupando casi la totalidad del defecto, salvo una pequeña zona en la parte más externa que se mantiene radiolúcida.	Regeneración radiológica del defecto. Presenta una radiodensidad levemente mayor que la del hueso normal, presentando un entramado trabecular en continuación con el hueso adyacente.	Regeneración ósea salvo una pequeña zona de la parte cortical, que se encuentra embebida y ha formado escaso tejido conectivo. Resto del defecto: hueso trabecular regenerado.	Regeneración ósea, aunque la cortical se encuentra ligeramente embebida. Hueso trabecular regenerado avanzado, trabéculas finas, escasas líneas de osteoide y osteocitos maduros. Escasa osteointegración de material. Escasos restos de material y células multinucleadas. Remodelación ósea.
Caso 2	F.D.	Miudad interna radiodensa, más fuerte en los bordes óseos. Mitad externa radiotransparente.	Captación radiológica homogénea, cavidad radiopaca.	Regeneración radiológica del defecto. Se aprecia un entramado trabecular radiodenso que ocupa todo el defecto, en continuidad con el hueso adyacente. Regenerado incluso hasta la altura de la cortical.	Regeneración ósea. Hueso trabecular neoformado.	Regeneración ósea, aunque la cortical se encuentra ligeramente embebida. Hueso trabecular neoformado. Osteocitos maduros. Escasa osteointegración de material. Escasos restos de material y células multinucleadas.
Caso 3	T.I.	Zona grande fuertemente radiodensa dentro del canal medular. En la zona externa: contorno irregular, sin continuidad con el hueso adyacente.	Defecto radiodenso, pero no se muestra tan homogéneamente opaco, sino que se intuyen zonas menos radiodensas. Alcanza el canal medular.	Entramado trabecular más radiodenso que el hueso normal en continuidad con él. Encontramos captación radiológica también dentro de la cavidad medular.	Regeneración ósea. La zona cortical no ha alcanzado su altura normal, y ha desarrollado tejido conectivo. Hueso trabecular neoformado irregular, con gruesas y anastomosadas trabéculas en la zona superficial. Zona más profunda con trabéculas más delgadas.	Defecto regenerado, aunque la cortical no ha alcanzado la altura normal, rellenando el desnivel con la formación de tejido conectivo vascularizado. Hueso regenerado en la zona superior presenta trabéculas gruesas, con líneas de osteoide, sobre todo en superficie ósea en contacto con tejido blando y escasa osteointegración. Encontramos osteocitos inmaduros y procesos de remodelación. Existe una transición del tamaño de trabéculas, siendo más delgadas en la zona más interna del defecto, espacio medular adyacente con abundantes restos de material.
Caso 4	T.D.	Defecto altamente radiodenso, menos en la zona superficial donde aparece un pequeño escalón en comparación con la altura normal del hueso adyacente. Esta zona es radiotransparente.	Similar al TAC de las 8 semanas.	Regeneración radiológica del defecto, entramado trabecular radiodenso, en continuidad con el hueso adyacente. Se encuentra en contacto con el canal medular. Zona superficial radiolúcida, embebida, no alcanzado la altura normal.	Regeneración ósea, aunque no completa, ya que en la zona cortical hay tejido conectivo. Hueso trabecular regenerado, con gruesas trabéculas finas, con un grosor similar al del hueso adyacente, aunque con una distribución desorganizada.	Regeneración ósea, aunque la cortical se encuentra embebida, ocupada por tejido conectivo denso altamente vascularizado. Resto del defecto formación de hueso trabecular. Trabéculas finas con osteointegración de material. Se detectan zonas con gruesas líneas de osteoide y deficiencia de mineralización. Son escasos los restos de material no osteointegrados y pocas células multinucleadas. Algún pequeño foco inflamatorio. Cavidad medular adiposa vascularizada. Se detecta algún osteoclasto.
Caso 5	T.D.	Contorno del defecto línea gruesa radiodensa. El defecto muestra radiopacidad difusa, ocupando toda la cavidad.	Zona superficial radiolúcida. Resto del defecto con elevada radiodensidad heterogénea.	Elevada radiodensidad heterogénea ocupando todo el defecto, no se distingue bien si la radiopacidad corresponde a restos de material o a un entramado trabecular.	Zona superficial no regenerada, formación de tejido conectivo. Resto de la cavidad regenerada: hueso neoformado con trabéculas gruesas y anastomosadas. Osteointegración de material.	Zona cortical no regenerada: tejido conectivo muy vascularizado. Resto del defecto: hueso trabecular regenerado. Abundante osteointegración de material y superficies trabeculares con gruesas líneas de osteoide. Cavidades remodeladoras. Espacio medular desarrollo de médula adiposa.
Caso 6	H.I.	Elevada radiopacidad por todo el defecto.	Defecto radiodenso, aunque presenta una captación más tenue que en el TAC de las 8 sem. Muestra una textura granular, con pequeñas zonas radiolúcidas. La zona cortical no alcanza la altura normal y es radiotransparente.	Entramado trabecular-granular con una radiodensidad similar a la del hueso normal. Se distingue una diferencia de altura entre la cortical normal y la zona superior del defecto, mostrándose radiolúcida.	Predomina la cavidad del defecto sin regenerar, ocupada por médula adiposa y restos de material	En la cavidad predominan los espacios sin regenerar ocupados por médula adiposa. Escasas trabéculas y de pequeño tamaño con predominio de osteointegración de material frente a la cantidad de hueso. Algún resto de material remanente rodeado por alguna célula multinucleada.
Caso 7	H.D.	Nula captación radiológica dentro de la cavidad del defecto, es totalmente radiotransparente.	La mayor parte de la cavidad se aprecia radiolúcida, salvo en la zona más interna, en continuidad con el hueso adyacente, donde se distingue una zona de levedad radiodensidad.	Únicamente aparece captación radiológica en la zona más interna del defecto, mostrando un entramado trabecular radiodenso en continuidad con el hueso adyacente. El resto de la cavidad es radiotransparente.	Más de la mitad superficial del defecto se encuentra ocupada por tejido conectivo. En la zona más interna formación de trabéculas óseas con escasa osteointegración de material.	No regenerado, la mayor parte del defecto ocupado por la formación del tejido conectivo vascularizado.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL N (GRUPO III)						
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos
***	*	-	-	**	*	-
Casos 1 y 4: estadio avanzado. Caso 3 y 5.	En la zona superficial. Casos: 1, 3, 4 y 5.	No hay, se encuentra osteointegrado.	No hay, se encuentra osteointegrado.	Caso 3, 5, 4 (en tejido conectivo y médula adiposa).	Caso 4 escasas.	
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa
*	-	-	*	*	**	**
Pequeños focos inflamatorios en el caso 4.			Caso 4: abundante. Caso 5: escaso.	Caso 3.	Caso 1 y 4: maduros. Caso 3: inmaduros.	Caso 3, 4 y 5.
Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación		
-	**	***	-	-		
	Casos 1, 3 y 4.	Casos 1, 3, 4 y 5.				

Tabla resumen del GRUPO III: material Ñ.-

Grupo III: material Ñ	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Zona profunda radiopaca, resto de la cavidad radiolúcida.	Defecto con mayor captación radiológica que el TAC de 8 sem. La cavidad se muestra radiodensa casi en su totalidad excepto en la zona superficial, que aparece una zona zona radiotransparente que se introduce hacia el interior de la cavidad.	Defecto con signos de regeneración radiológica. Se distingue un entramado trabecular radiodenso, en continuidad con el hueso adyacente ocupando toda la cavidad, aunque la zona externa se encuentra algo embebida hacia el interior de la cavidad.	Regeneración ósea. Formación de hueso trabecular. Transición de hueso neoformado con trabéculas gruesas en la zona superficial y más delgadas en la zona interna.	Cortical embebida, formación de tejido conectivo vascularizado. Hueso regenerado trabecular desorganizado, grueso, con osteocitos inmaduros y líneas de osteoide. Zona interna mayor osteointegración, alguna célula multinucleada y trabéculas neoformadas más finas. Médula adiposa. Zona superficial: trabéculas más gruesas y escasas líneas de osteoide.
Caso 2	F.D	Zona profunda radiopaca, resto de la cavidad radiolúcida.	Zona profunda radiopaca, resto de la cavidad radiolúcida.	Captación radiológica en la casi la totalidad del defecto, salvo en la zona superficial que se muestra radiolúcida. Se distingue un entramado trabecular radiodenso, en continuidad con el hueso adyacente.	Regeneración ósea. Zona cortical desarrollo de tejido conectivo. Formación de hueso trabecular.	No se ha reestablecido la cortical, formación de tejido conectivo vascularizado con algún resto de material rodeado por alguna célula multinucleada. Formación de hueso trabecular grueso y amastomoso en la zona superficial, con abundantes osteocitos inmaduros. Encontramos gruesas líneas de osteoide y osteointegración de material. Espacio trabecular: médula adiposa y células multinucleadas. Pequeños focos inflamatorios. Signos de remodelación.
Caso 3	T.I	Gruesa línea radiodensa que delimita el contorno del defecto. Casi la totalidad de la cavidad es radiodensa, aunque se aprecia una pequeña zona radiolúcida en la mitad superficial del defecto.	Gruesa línea radiodensa que delimita el contorno del defecto. Casi la totalidad de la cavidad es radiodensa, aunque se aprecia una pequeña zona radiolúcida en la mitad superficial del defecto.	Ingen radiológica no muy clara, aunque se intuye una formación trabecular radiodensa que ocupa la cavidad del defecto.	Regeneración ósea. Hueso con trabéculas gruesas y desorganizadas. La altura de la cortical está algo por debajo de la altura normal del hueso adyacente, y donde se ha desarrollado tejido conectivo.	Regeneración ósea: incluso la cortical aunque se encuentra formada por hueso trabecular grueso y desorganizado, siendo muy irregular el contorno y ocupado en la zona externa por tejido conectivo vascularizado. Osteocitos inmaduros. Resto del defecto con hueso neoformado, con finas trabéculas con gran osteointegración de material. Escasas líneas de osteoide. Células multinucleadas. Espacio medular adiposo y hematopoyético.
Caso 4	T.I.	Radiotransparente. Reacción del hueso adyacente ya que presenta radiodensidad en el contorno del defecto con aspecto trabecular.	Radiotransparente. Reacción del hueso adyacente ya que presenta radiodensidad en el contorno del defecto con aspecto trabecular.	No se ve clara, alcanza el canal medular.	No regeneración ósea.	No regenerado.
Caso 5	T.D.	Radiodenso, alcanza el canal medular.	Radiodenso, alcanza el canal medular.	Entramado trabecular radiodenso, más definido en la zona más interna del defecto, mostrando en la zona superior una radiopacidad más difusa.	Regeneración ósea. Formación incluso de la cortical, aunque no se ha reestablecido como tal sino que está formada por hueso trabecular.	Defecto regenerado con un estado avanzado, poca osteointegración de material, trabéculas finas y desorganizadas. Zona cortical regenerada. Transición con la zona más interna donde aparecen más restos de material asociados a células multinucleadas. Espacio medular adiposo vascularizado.
Caso 6	H.L.	Complicación quirúrgica. Encapsulación de material.	-	-	Cavidad del defecto totalmente ocupada por tejido conectivo con abundantes restos de material.	Cavidad del defecto totalmente ocupada por tejido conectivo con abundantes restos de material y elevada vascularización. Profusa respuesta inflamatoria. Respuesta del hueso adyacente: remodelado, gruesas trabéculas, con gruesas líneas de osteoide en superficie ósea en contacto con tejido blando. Abundantes cavidades vasculares y osteocitos inmaduros.
Caso 7	H.L.	Cavidad radiotransparente, mayor captación radiológica en el contorno del defecto.	Cavidad radiotransparente, mayor captación radiológica en el contorno del defecto.	Cavidad radiotransparente, mayor captación radiológica en el contorno del defecto.	No regeneración ósea. Defecto con tejido conectivo.	No regeneración ósea. Tej conectivo denso muy vascularizado. Pocos restos material, asociados a células multinucleadas. Reacción del hueso adyacente: osteointegración material, líneas de osteoide y espacio intertrabecular con médula adiposa.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL Ñ (GRUPO III)						
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos
****	**	*	-	***	**	-
Casos: 1,2, 3, 5.	Zona cortical: casos: 2 y 3. Caso 1 mitad superior del defecto. Caso 7: todo el defecto.	Caso 7.		En tejido conectivo: casos: 2, 3 y 7. En tejido adiposo: caso 5.	Escasas: casos 1, 2, 3 y 5. Caso 7 en asociación con restos de material.	
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa
*	*	-	-	-	**	***
Algún foco: caso 2. Profusa en caso 6.	Caso 2		No muy abundante: casos 2, 3 y 5.		Inmaduros: casos 2 y 3.	Casos 1, 2, 3, 5 y 7.
Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación		
*	-	**	-	*		
Caso 3.	Caso 2.	Casos 1, 2, 3 y 5.		Caso 6		

Tabla resumen del GRUPO III: material O.-

Grupo III: material O	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Contorno de la cavidad del defecto con una gruesa línea fuertemente radiodensa. Radiodensidad heterogénea, mostrando puntos radiotransparentes.	Presenta mayor captación radiológica que a las 8 sem.	Entramado trabecular radiodenso, en continuidad con el hueso adyacente, aunque la zona externa está más difusa y no se aprecian tan definidas las trabéculas.	Regeneración ósea. Zona cortical: hueso trabecular inmaduro, con gruesas y desorganizadas trabéculas, además de escasos espacios intr trabeculares. Trabéculas finas en la zona interna y espacios medulares mayores.	Regeneración ósea. Hueso neoformado con trabéculas inmaduras, con escasos espacios intr trabeculares, sobre todo en la zona superficial del defecto. Notable osteointegración de material. Osteocitos inmaduros. Camales vasculares muestran gruesas líneas de osteoide e hileras de osteoblastos. Médula adiposa vascularizada. Se distingue algún pequeño foco inflamatorio junto con células multinucleadas.
Caso 2	F.D.	Radiodensidad homogénea.	Radiodenso, zona superficial ligeramente embebida.	Entramado trabecular radiodenso, con una organización homogénea por toda la cavidad y en continuidad con el hueso adyacente.	Regeneración ósea. Hueso trabecular fino neoformado, con organización paralela y trabéculas delgadas. Se distingue una ligera invaginación de la zona cortical, con escasa formación de tejido conectivo. Notable osteointegración de material.	Regeneración ósea, incluso zona cortical, aunque muestra un ligero escalón en comparación con la altura normal de hueso. Esta leve diferencia se encuentra ocupada por una escasa formación de tejido conectivo, donde se aprecia algún resto de material rodeado por células multinucleadas. El hueso neoformado con trabéculas delgadas y paralelas. Grandes fragmentos de material osteointegrado. Poca actividad osteogénica. Escasas células multinucleadas. Médula adiposa.
Caso 3	F.D.	Centro del defecto radiolúcido. Línea radiodensa que lo delimita el contorno del defecto. Además en la zona externa se aprecia captación radiológica, intentando cerrar la cavidad del defecto.	Centro del defecto radiolúcido. Línea radiodensa que delimita el contorno. Zona externa radiodensa, con aspecto trabecular, intentando cerrar la cavidad del defecto.	Entramado trabecular más radiopaco que el hueso adyacente, desorganizado excepto en la zona central que se presenta una zona radiolúcida. Cortical cerrada, aunque no completa en la zona central y se encuentra más baja de la altura normal.	Defecto regenerado desde los laterales. En la zona externa existen prolongaciones óseas desde los laterales para intentar cerrarla. Se forma a una altura inferior que la del hueso adyacente. Queda un hueso central no regenerado.	Defecto regenerado desde los laterales. Zona cortical algo embebida: tejido conectivo vascularizado y restos de material. Zona central no regenerada ocupada por médula adiposa y grandes restos de material rodeados por células multinucleadas. Hueso trabecular regenerado muestra gran osteointegración de material. Superficie ósea en contacto con el tejido blando tiene gruesas líneas de osteoide.
Caso 4	T.I.	Radiodensidad heterogénea. Contorno de la cavidad marcada por una gruesa línea radiopaca.	Radiopacidad heterogénea, es difusa en la zona superficial, mientras que en la zona profunda se intuye una distribución trabecular.	Regeneración radiológica del defecto. Entramado radiodenso trabecular, en continuidad con el hueso adyacente.	Regeneración del defecto, incluso la zona cortical, aunque el hueso regenerado es trabecular inmaduro, con trabéculas gruesas muy desorganizadas y gruesas. Grandes zonas deficientes en mineralización. Notable osteointegración de material.	Regeneración ósea, incluso zona cortical. Formación de hueso trabecular desorganizado con notable osteointegración de material. Notable deficiencia de mineralización. Desarrollo de médula adiposa. Escasas células multinucleadas asociadas a los pocos restos aislados de material presentes. Existen procesos de remodelación.
Caso 5	T.D.	Radiodensidad heterogénea. Hay zonas radiotransparentes distribuidas de forma irregular. El defecto alcanza el canal medular.	Radiopacidad homogénea.	Regeneración radiológica. El hueso trabecular radiodenso regenerado se encuentra en continuidad con el hueso adyacente. Se distingue una zona difusa radiopaca dentro del canal medular.	Regeneración ósea, hueso trabecular neoformado grueso y desorganizado. En la zona medular hay escasas trabéculas, finas y rodeadas por tejido conectivo y adiposo.	Regeneración ósea. Zona cortical con restos de material rodeados por tejido conectivo. Hueso regenerado cortical grueso y anastomosado en la zona superficial, mientras que encontramos una transición en la zona más interna, donde las trabéculas son más finas. Osteointegración de material. Escasas células multinucleadas. Se detectan procesos de remodelación y actividad osteogénica. Espacio medular tejido conectivo y adiposo.
Caso 6	H.I.	Mitad superficial radiotransparente. Mitad más interna radiodensa.	Mitad superficial radiotransparente. Mitad más interna radiodensa.	Signos de reparación radiológica en la mitad interna del defecto. Se distingue un entramado radiopaco trabecular en continuidad con el hueso adyacente. Zona superficial radiolúcida.	Zona superior no regenerada, desarrollo de tejido conectivo con restos de material. Resto del defecto regenerado: superior trabéculas gruesas. Interior: más finas y predominio de osteointegración de material.	Mitad superior desarrollo de tejido conectivo vascularizado con restos de material. Superficie ósea en contacto con el tejido blando presenta gruesas líneas de osteoide y osteoblastos. Transición, zona superficial: trabéculas gruesas, osteocitos inmaduros y zonas de remodelación. Zona profunda: trabéculas finas con osteointegración de material. Escasas células multinucleadas. Espacio medular adiposo.
Caso 7	H.D.	Mitad interna: fuerte radiodensidad. Zona superficial: radiotransparente.	Mitad interna: fuerte radiodensidad. Zona superficial: radiotransparente.	La imagen radiológica de la que disponemos no nos permite evaluarlo, no se ve claro.	Zona cortical no regenerada, embebida. La diferencia de altura, en relación al hueso adyacente, se encuentra ocupado por tejido conectivo. Resto del defecto regenerado, con la formación de hueso trabecular. Se encuentra en un estadio avanzado, ya que las trabéculas son finas y con una disposición paralela.	Regeneración ósea menos la zona cortical donde se ha desarrollado tejido conectivo altamente vascularizado. Hueso regenerado, en contacto con el tejido conectivo, presenta osteocitos inmaduros. Las trabéculas neoformadas presenta un estadio avanzado de formación, ya que son igual de delgadas que el hueso normal adyacente; se distinguen por la osteointegración de material que presentan. Médula adiposa.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL O (GRUPO III)						
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos
****	**	*	-	**	**	-
Casos: 1, 2,3, 4, 5, 6 y 7	Escaso, en zona superficial: casos 2, 3 y 5. Zona superficial: caso 6 y 7	Escaso: casos 3, 4, 5		En tejido adiposo: caso 1. En tejido conectivo: casos 3, 6 y 7.	Escasas: casos 1, 2, 3, 4, 5 y 6	
Respuesta Inflamatoria	Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa
*	-	-	**	*	*	***
Pequeños focos inflamatorios: Caso 1.			En canales vasculares óseos: casos: 1, 5 y 6. En la superficie ósea en contacto con tejido conectivo: caso 3.	Caso 4.	En hueso trabecular de la zona superficial: Casos 1, 6 y 7.	Casos: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.
Médula hematopoyética	Osteoclastos	Osteointegración	Granulomas	Encapsulación		
-	*	****	-	-		
	Procesos de remodelación: casos 4 y 5	Grandes fragmentos: Casos 1 y 3. Normal: casos 2, 3, 4, 6 y 7. Escasa en caso 5.				

GRUPO IV:

El grupo IV está compuesto por dos materiales: *P* y *Q*, caracterizados por presentar una escasa cantidad de monetita y un alto contenido de CDHA, junto a una elevada concentración de gel de sílice y ps-wollastonita. Estos materiales se sintetizaron a partir de modificaciones realizadas del material *A* perteneciente al grupo I, de forma que se obtuvieron materiales con una mayor proporción de ps-wollastonita residual y CDHA, a expensas de un descenso de la concentración de monetita.

Tabla 15. Composición de los materiales *P* y *Q* pertenecientes al grupo IV.

GRUPO IV	M (%)	M-Zn (%)	GS (%)	CDHA (%)	ps-W (%)
<i>P</i>	35		22	24	18
<i>Q</i>		20	27	46	7

Tabla 16. Número de casos realizados de cada material y su localización ósea.

GRUPO IV	Nº de casos	Localización
<i>P</i>	7	Caso 1: F.I. 2: F.I. 3: F.D. 4: T.I. 5: T.D. 6: H.I Y 7: H.D.
<i>Q</i>	8	Caso 1: F.I. 2: F.D. 3: T.I. 4: T.I. 5: T.D. 6: T.D. 7: H.I Y 8: H.D.

ESTUDIO DE IMÁGENES DE TAC.-

A continuación se muestran las imágenes de TAC correspondientes a la parte central de las piezas óseas donde se han realizado los defectos óseos. Se van a exponer un conjunto de 3 bloques de imágenes representativas de las manifestaciones radiológicas más frecuentes encontradas en los materiales *P* y *Q* que conforman el grupo IV. Se han seleccionado 3 grupos de imágenes de TAC en función de si la radiodensidad de las lesiones óseas ocupa toda la cavidad del defecto, la mitad o no existe tal radiodensidad.

En primer lugar expondremos las imágenes de TAC de los casos en los que encontramos máximos signos de reparación radiológica, siendo la norma hallar los defectos fuertemente radiopacos, en comparación con el hueso adyacente (Fig.110). La imagen de TAC a las 4 semanas desde la implantación del material *P*, es la única que presenta una menor captación, mostrando la cavidad del defecto levemente radiodensa. A medida que pasa el tiempo, las imágenes de TAC ponen de manifiesto una mayor radiopacidad, menos en la zona externa.

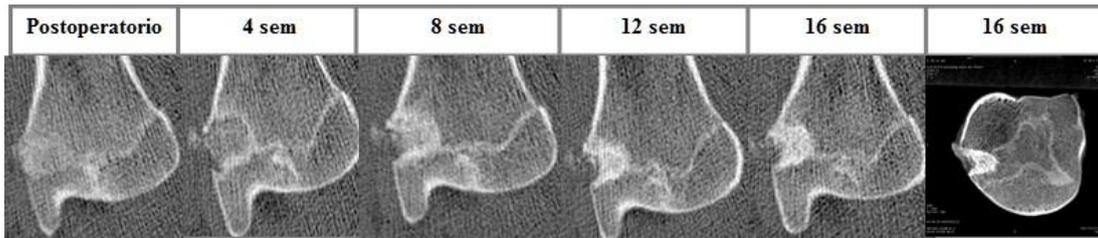


Fig.110. Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 7 del material *P*.

Otro de los comportamientos que encontramos, son aquellos en los que las imágenes de TAC muestran bajos niveles de radiopacidad por toda la cavidad, menos en los rebordes del defecto, donde se presentan signos de reparación ósea con una mayor radiodensidad y un crecimiento centripeto desde los bordes del defecto (Fig.111).

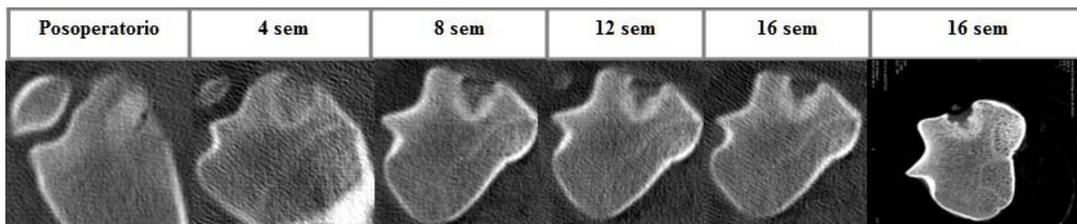


Fig.111. Imágenes de TAC del caso 2 del material *Q*.

Por último, se encuentra la manifestación más desfavorable, ya que corresponde a aquellos casos en los que la cavidad del defecto al final del ensayo, presenta la ausencia de captación radiológica, siendo totalmente radiotransparente (Fig.112). Se distinguen los defectos óseos cilíndricos radiolúcidos.

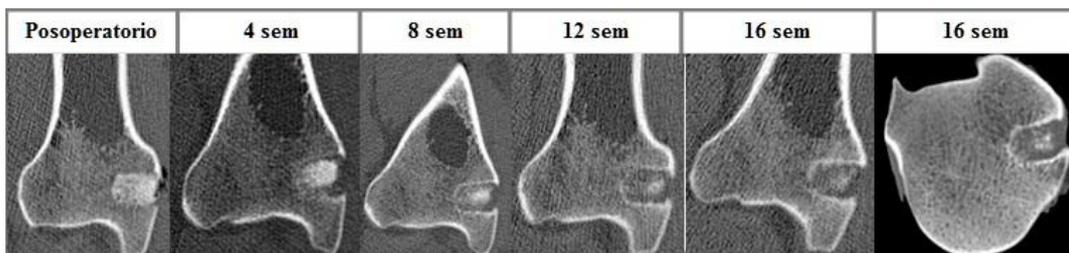


Fig.112. Imágenes de TAC del caso 7 del material *Q*.

Se han seleccionado estas tres manifestaciones como ejemplos representativos de la respuesta general encontrada en los diferentes casos de los materiales *P* y *Q* del grupo IV. Por un lado, tal como observamos en la Fig.110, encontramos un aumento de captación radiológica del defecto óseo a lo largo del ensayo. La cavidad ósea presenta un progresivo aumento de radiodensidad, con una distribución homogénea y con un aspecto granulado. La señal radiológica no ocupa por completo la cavidad, ya que en la zona superficial se discrimina una pequeña zona radiolúcida.

En relación a las imágenes de la Fig.111, podríamos decir que representa la respuesta intermedia entre las tres respuestas seleccionadas, ya que, al igual que ocurría en las imágenes de TAC de la Fig.110, encontramos un aumento progresivo de la radiodensidad del defecto, pero llegando a ocupar sólo la mitad más profunda del defecto. La lesión ósea se

muestra radiotransparente en todos los periodos estudiados, salvo en la zona más interna del defecto, donde encontramos los mayores niveles de radiopacidad en comparación con el hueso adyacente y en continuidad con este, en las imágenes de TAC a las 16 semanas de estudio.

Por último, se exponen las imágenes de TAC que muestran una respuesta opuesta a lo observado anteriormente, la radiodensidad es más intensa en las primeras semanas de estudio y va disminuyendo con el tiempo. En los casos en los que se ponen de manifiesto estas señales radiológicas, a las 4 semanas de ensayo se distingue una mancha radiodensa en el centro del defecto, aislada y sin continuidad con el hueso adyacente (Fig.112). Esta señal radiodensa sigue siendo fuerte a las 8 semanas, pero va disminuyendo su intensidad de forma progresiva hasta que a las 16 semanas únicamente distinguimos pequeños puntos radiodensos dentro de la cavidad del defecto, que se es completamente radiotransparente. El contorno del defecto se encuentra delimitado por una gruesa línea radiopaca.

A partir de la evaluación de estas imágenes de TAC, podemos exponer que el comportamiento de los materiales del grupo IV es heterogéneo, ya que hemos podido agrupar las respuestas más frecuentes en tres. A continuación realizaremos el estudio radiológico e histológico para correlacionar las respuestas biológicas con estos comportamientos.

VALORACIÓN DE LAS IMÁGENES RADIOLÓGICAS Y DE LUPA DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.-

Mediante las imágenes radiológicas, realizadas una vez sacrificadas las ovejas y cortadas en lonchas de las piezas óseas, podemos comprobar si existe una correlación entre la valoración realizada mediante las imágenes de TAC en distintos tiempos y la imagen radiológica obtenida una vez finalizado el tiempo de estudio. Por otro lado, a partir de las fotos de lupa de las secciones histológicas, se ponen de manifiesto las respuestas tisulares más comunes provocadas frente a la implantación de los materiales pertenecientes al grupo IV. De este modo podemos relacionar los signos radiológicos encontrados hasta ahora con los procesos biológicos que se manifiestan en los defectos a las 16 semanas de experimentación.

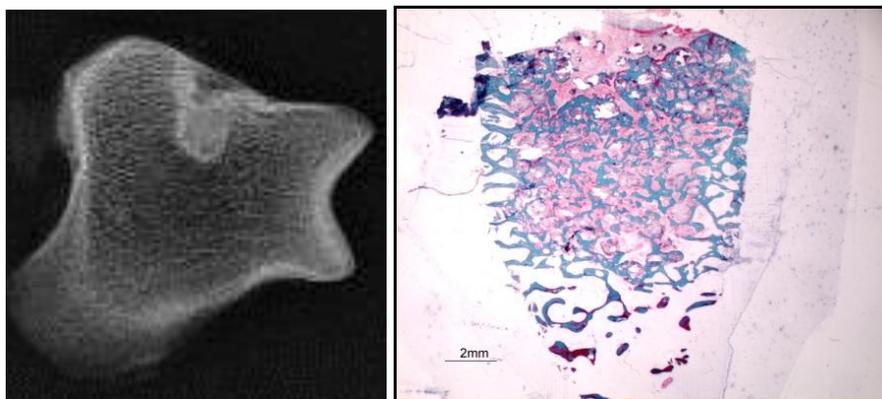


Fig.113. Imagen radiológica correspondiente al caso 1 del material *P* y su correlativa fotografía de lupa del corte histológico.

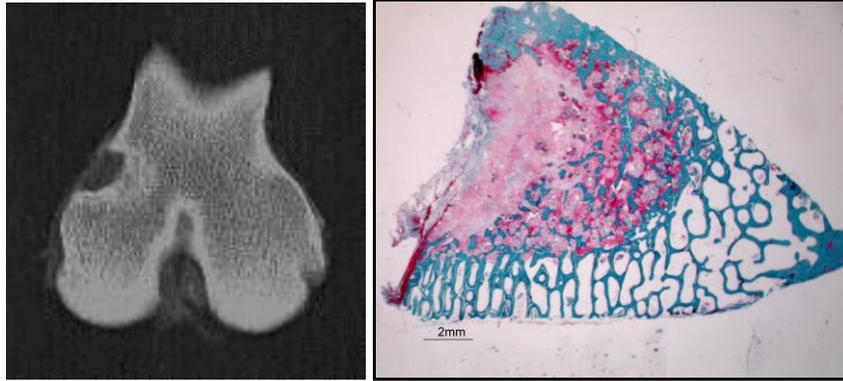


Fig.114. Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico del caso 2, material *Q*.

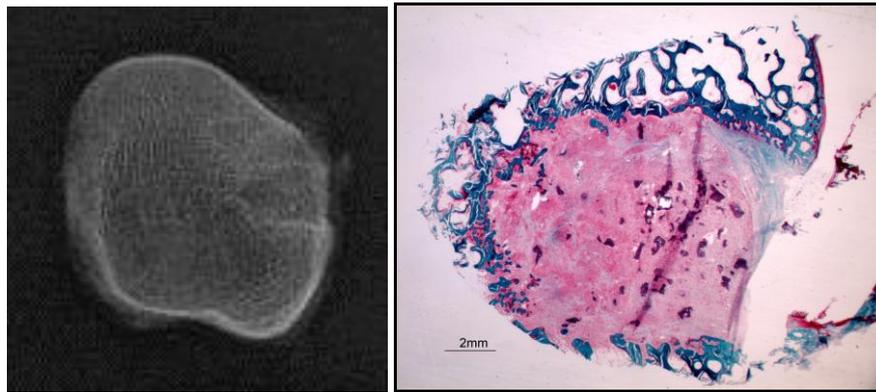


Fig.115. Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico correspondiente al caso 7 del material *Q*.

Las imágenes mostradas ilustran las respuestas predominantes presentes en los materiales del grupo IV. La radiografía de la Fig.113 corresponde a aquellos materiales que presentan las manifestaciones radiológicas de TAC expuestas en la Fig.110. En la radiografía se aprecia una elevada radiodensidad, mayor que la del hueso adyacente, que ocupa la totalidad del defecto menos la zona externa, en donde se distingue una invaginación radiotransparente. El entramado radiodenso es difuso y con aspecto granulado. La imagen de lupa de la Fig.113 pone de manifiesto que esta señal radiológica difusa radiodensa corresponde al hueso trabecular regenerado que ocupa la totalidad del defecto, salvo la zona superficial, que se mostraba radiotransparente, y en donde apreciamos el desarrollo de tejido conectivo. Podemos afirmar que se trata de manifestaciones de procesos de regeneración ósea de los defectos óseos.

Por otro lado se muestran las imágenes de la Fig.114 que estarían en concordancia con aquellos casos de los materiales que presentaban las manifestaciones de TAC mostradas en la Fig.111. La radiografía presenta en la Fig.114 se distingue la lesión ósea donde la mitad interna del defecto es radiodensa, con aspecto desorganizado y donde se diferencia un entramado trabecular en continuidad con el hueso adyacente. Sin embargo, la mitad externa del defecto no presenta reparación radiológica, ya que es radiolúcida. La observación de la imagen de lupa del corte histológico de este caso evidencia la presencia de signos de regeneración ósea, aunque en menor medida que el caso anterior, ya que el hueso trabecular regenerado sólo aparece en la mitad interior del defecto. Las trabéculas óseas regeneradas

son pequeñas, desorganizadas y el espacio medular se encuentra ocupado por tejido conectivo. Esta formación de tejido conectivo también se ha producido en la mitad externa del defecto.

Por último se muestran las manifestaciones radiológicas y la foto de lupa de aquellos casos en los que presentaban las imágenes de TAC de la Fig.112. La radiografía presenta la cavidad del defecto totalmente radiolúcida, en donde podemos apreciar el entramado trabecular radiodenso correspondiente al hueso adyacente que rodea la cavidad (Fig.115). La imagen de lupa pone en evidencia la usencia de regeneración ósea, ya que el defecto se encuentra ocupado por la formación de tejido conectivo de tipo denso con abundantes restos de material.

De este modo, mediante la valoración de las imágenes radiológicas y las fotografías de lupa de las secciones histológicas, podemos considerar que las respuestas de los materiales del grupo IV son bastante homogéneas, si no tenemos en cuenta aquellos casos en los que no se ha regenerado la lesión ósea. En general encontramos defectos regenerados casi en su totalidad, donde o bien en la zona superficial o bien en la mitad externa del defecto se ha formado tejido conectivo, pero el resto del defecto se encuentra ocupado por hueso trabecular regenerado. Y por otro lado, apreciamos defectos óseos donde no se produce una reparación radiológica y se forma tejido conectivo ocupando la totalidad del defecto.

VALORACIÓN HISTOLÓGICA.-

Mediante la observación microscópica de las secciones histológicas podemos evaluar cuál ha sido la respuesta biológica frente a la implantación de los materiales pertenecientes al grupo IV. Del mismo modo que se ha seguido hasta ahora, se van a presentar imágenes representativas de los tres comportamientos diferentes presentes en este grupo. La respuesta más favorable encontrada ha sido el casi completo restablecimiento del defecto óseo mediante el desarrollo de hueso trabecular menos en la zona cortical, donde se ha formado tejido conectivo. De hecho la mayoría de los casos de ambos materiales presentan esta respuesta menos los casos 2 y 8 del material *Q* y el caso 2 del *P*, en donde únicamente se ha regenerado la mitad interior del defecto; y los casos más adversos en los que no se ha regenerado nada el defecto, casos 3 y 7 del material *Q* y casos 3, 4 y 6 del *P*.

Comenzando con las respuestas tisulares más favorables, encontramos defectos óseos regenerados, con la formación de hueso trabecular neoformado, bien ocupando casi la totalidad del defecto, menos la zona cortical, o bien ocupando la mitad más profunda. Las trabéculas óseas regeneradas se encuentran desorganizadas, con líneas de osteoide y con pequeñas zonas con deficiencia de mineralización. Además presentan una notable osteointegración de restos de material. En los espacios medulares encontramos un infiltrado severo de células multinucleadas junto con restos de material.

La zona cortical no regenerada o aquellos casos en los que la mitad externa de la cavidad no se ha regenerado, presentan el desarrollo de tejido conectivo donde se produce una respuesta celular notable. Encontramos numerosas células multinucleadas en asociación con restos de material, los cuales también son abundantes. Otro tipo celular destacable son

los macrófagos, que incluso presentan restos de material en el interior de su citoplasma debido a procesos de fagocitosis. Además, el tejido conectivo está altamente vascularizado, mostrando vasos con paredes delgadas y grandes luces dilatadas.

Por otro lado, aquellos casos que presentan una respuesta tisular opuesta han desarrollado la formación de tejido conectivo ocupando toda la cavidad del defecto. En el tejido conectivo encontramos numerosos restos de material y una gran infiltración de células multinucleadas. Además existen macrófagos con material fagocitado y reacciones granulomatosas de tipo inflamatorio. Se trata de un tejido conectivo con una vascularización notable y numerosos restos de material. Por otro lado se aprecia una transición entre tejido conectivo y tejido adiposo. Debido a la desmoplasia desarrollada, se han detectado signos de remodelación en el hueso adyacente al defecto, además de zonas inmaduras, con deficiencia en mineralización y osteocitos inmaduros, en lagunas no calcificadas.

La única pequeña diferencia encontrada entre el material *P* y el *Q* es que en los casos 4, 5 y 6 del material *Q* se han detectado pequeños focos inflamatorios, mientras que ninguno de los casos del material *P* en los que se han producido procesos de regeneración ósea los encontramos.

En ninguno de los casos se han encontrado procesos de necrosis tisular, ni procesos inflamatorios de tipo crónico. Al igual que tampoco se ha desarrollado médula ósea hematopoyética.

Podemos concluir que la respuesta tisular de los materiales pertenecientes al grupo IV muestra una característica, que consiste en presentar un elevado número de células multinucleadas.

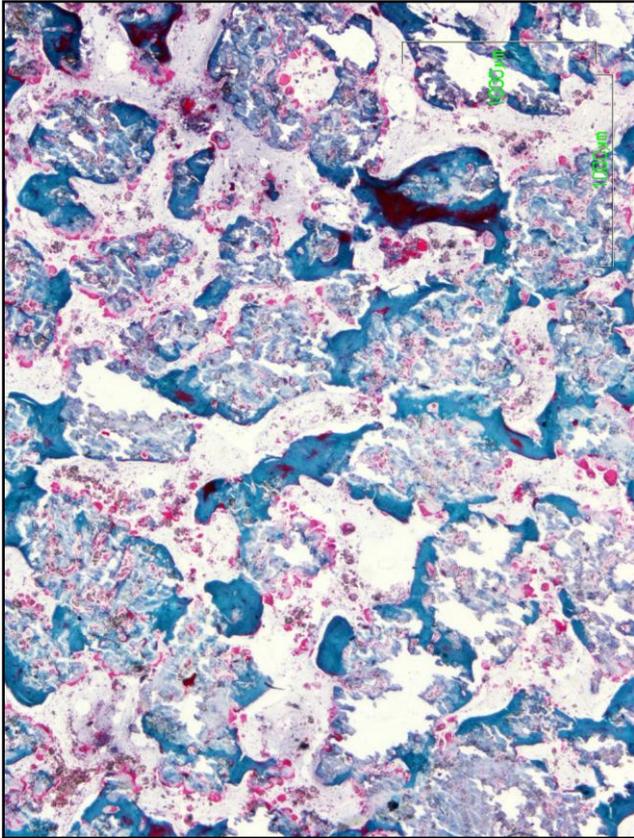


Fig.116 (2x)

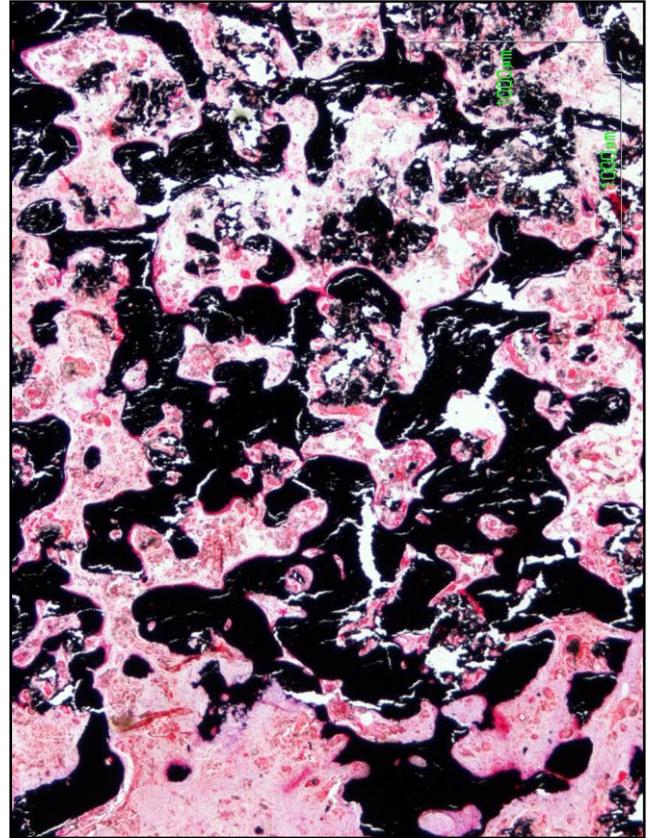


Fig.117 (2x)

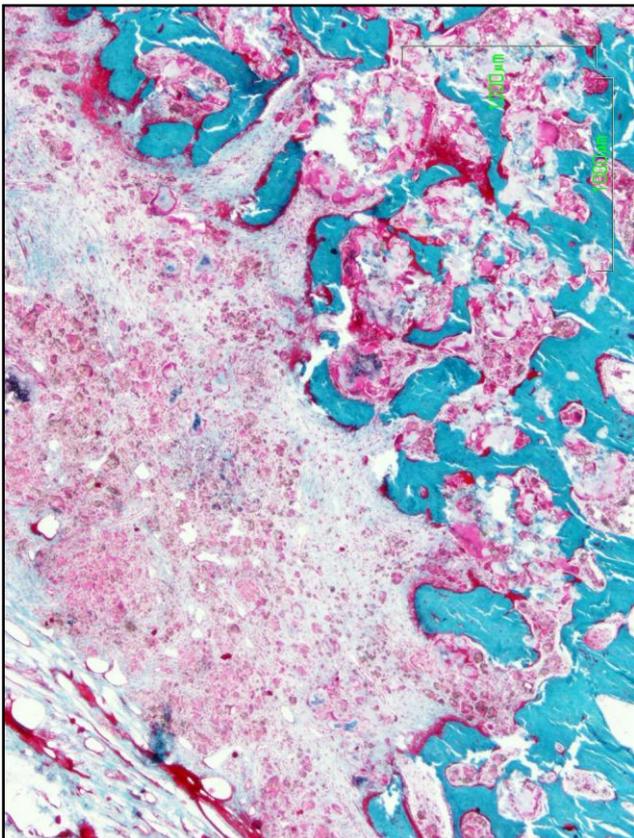


Fig.118 (2x)

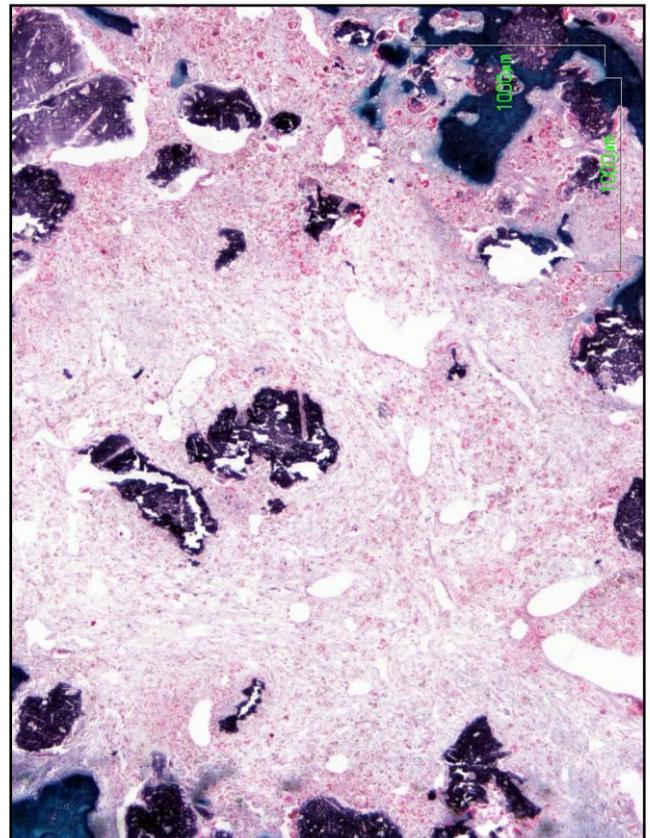


Fig.119 (2x)

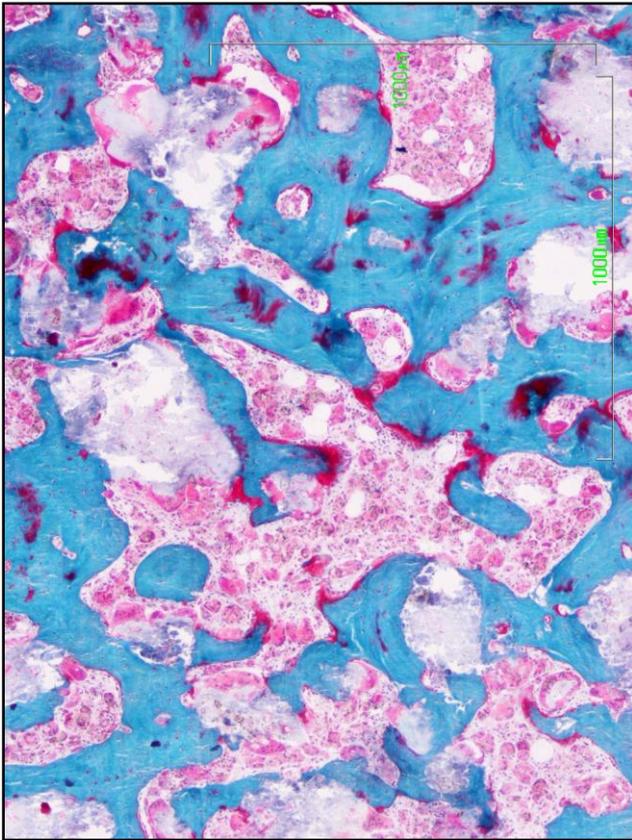


Fig.120 (4x)

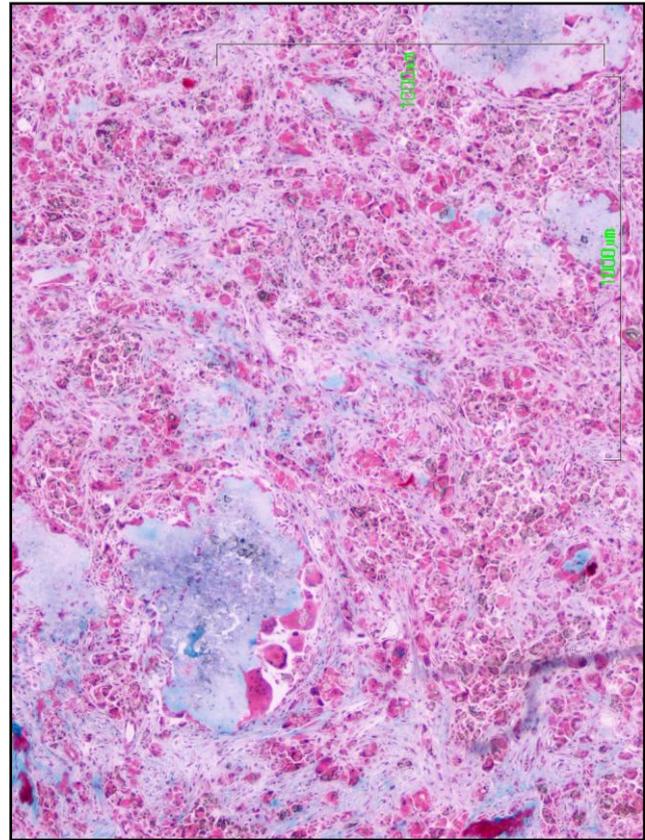


Fig.121 (4x)

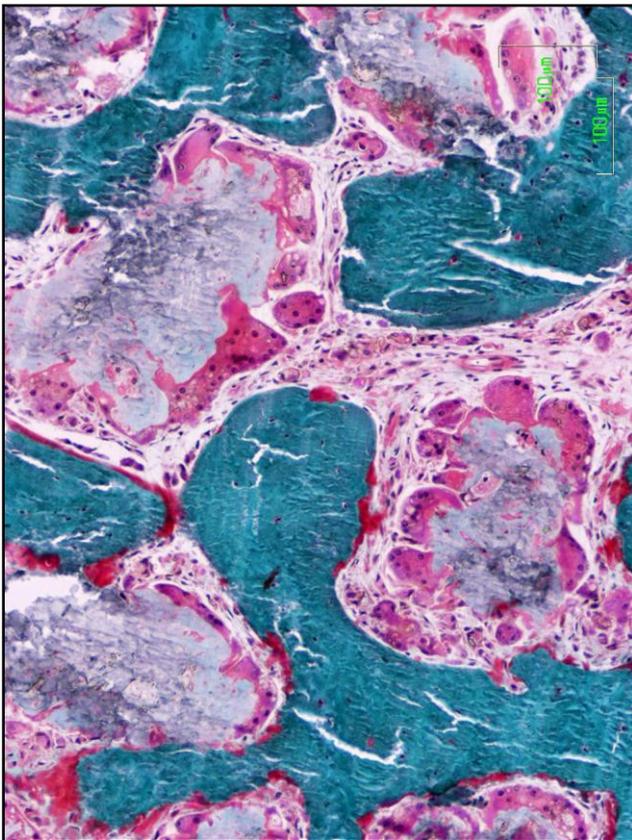


Fig.122 (10x)

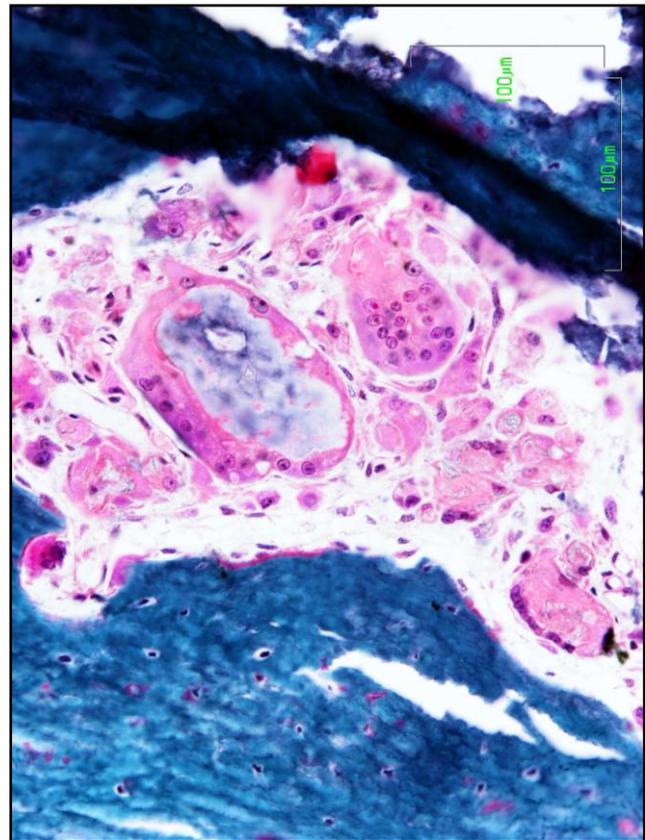


Fig.123 (20x)

Fig.116 (caso 4, Q).- Panorámica del hueso regenerado con una notable osteointegración de material. Se distinguen grandes restos de material ocupando así la totalidad de las trabéculas óseas regeneradas. Predominan los restos de material frente al hueso trabecular regenerado. Aparecen numerosas células multinucleadas en los espacios intertrabeculares, en asociación con los restos de material. Las trabéculas presentan pequeñas zonas con deficiencia de mineralización. (2x, TG).

Fig.117 (caso 5, Q).- Se muestra el grado de mineralización del hueso trabecular regenerado. Las trabéculas neoformadas son gruesas, con una distribución desordenada y con numerosas uniones entre ellas. Se aprecian también las zonas de osteointegración de material dentro de las trabéculas óseas. (2x, VK).

Fig.118 (caso 2, Q).- Imagen de la zona externa del defecto. En la zona cortical apreciamos la formación de tejido conectivo altamente vascularizado y con un infiltrado severo de células multinucleadas, junto con restos de material. El resto de la cavidad del defecto se ha regenerado, presentando trabéculas neoformadas, desorganizadas y en continuidad con las trabéculas normales del hueso adyacente. (2x, TG).

Fig.119 (caso 4, P).- Fotografía panorámica representativa de aquellos casos en los que la totalidad del defecto se encuentra ocupado por tejido conectivo altamente vascularizado. Los vasos presentan grandes luces dilatadas. Se distinguen numerosas células multinucleadas y grandes restos de material. Las trabéculas óseas que aparecen muestran restos de material osteointegrados. (2x, TG).

Fig.120 (caso 1, P).- Trabéculas óseas neoformadas, gruesas y anastomosadas, con restos de material osteointegrados. Existen pequeñas zonas dentro de las trabéculas que indican deficiencia de mineralización (color rojo). Los espacios medulares están ocupados por un profuso infiltrado de células multinucleadas. (4x, TG).

Fig.121 (caso 5, P).- Imagen de un defecto no regenerado, en donde la cavidad presenta el desarrollo de tejido conectivo con una copiosa cantidad de células multinucleadas y macrófagos con restos de material de gran tamaño. (4x, TG).

Fig.122 (caso 5, P).- Detalle de las trabéculas óseas regeneradas, con pequeñas líneas de osteoide. En los espacios intertrabeculares se ha desarrollado tejido conectivo donde se aprecian grandes restos de material delimitados por células multinucleadas, que se disponen alrededor de su superficie, aislándolos. (10x, TG).

Fig.123 (caso 7, P).- Detalle de un espacio intertrabecular, donde se distinguen células multinucleadas rodeando grandes restos de material y macrófagos con partículas fagocitadas. Además se pueden observar vasos sanguíneos. (20x, TG).

Tabla resumen del GRUPO IV: material P.-

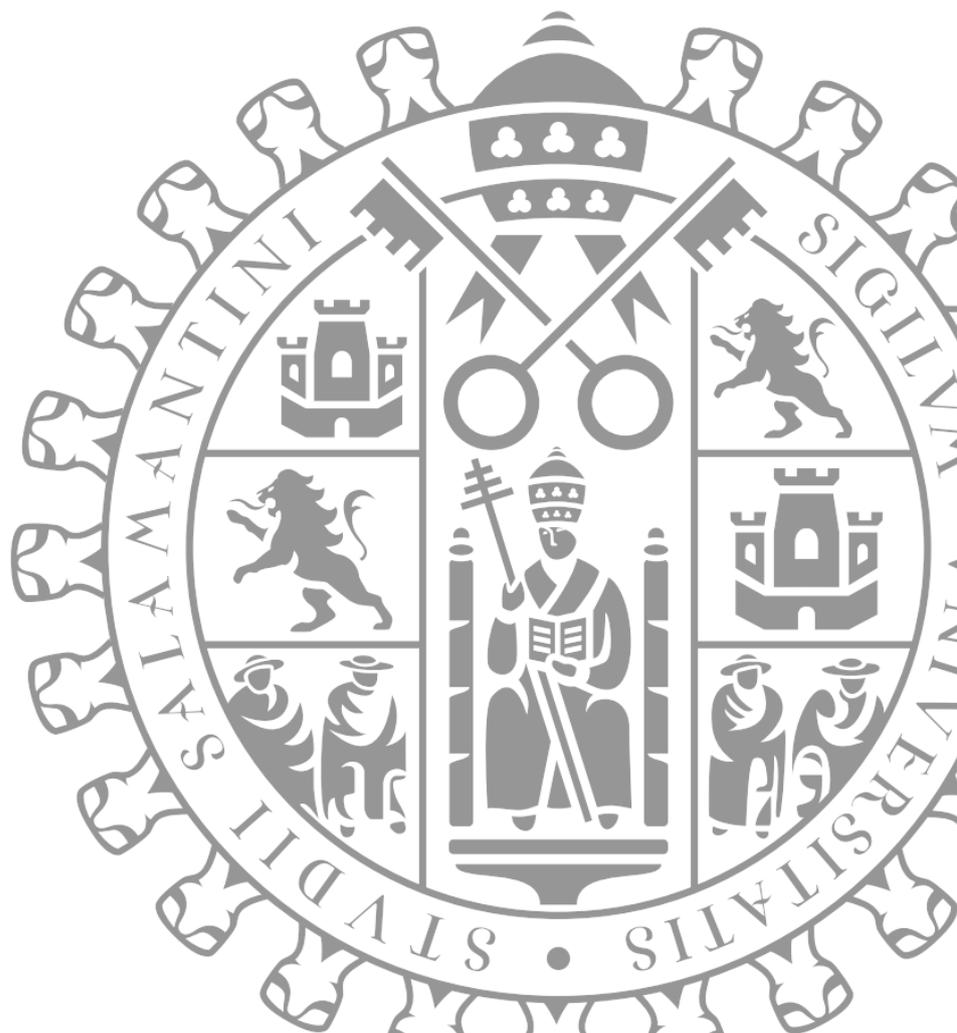
Grupo IV: material P	Ubí	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I	Radiodensidad tenue y difusa. Se distingue una línea gruesa, más radiopaca que delimita el contorno del defecto. La zona externa radiotransparente.	Mayor captación radiológica. Radiodensidad uniforme en todo el defecto, menos en la zona externa que se encuentra embebida, no alcanza la altura normal, y es radiolúcida.	Aspecto granular radiopaco menos en la zona superior que es radiolúcida.	Regeneración ósea: hueso trabecular desorganizado neoformado, con notable osteointegración de material. En la zona superficial hay tejido conectivo con restos de material.	Regeneración ósea, menos en la zona cortical, donde se ha formado tejido conectivo con restos de material. Hueso trabecular regenerado con grandes fragmentos de material osteointegrado. En espacio medular encontramos tejido conectivo y adiposo con abundante celularidad, células multinucleadas y macrófagos con material fagocitado. Trabéculas quiescentes, con poca actividad osteogénica.
Caso 2	F.I	Radiotransparente.	Radiotransparente.	Radiotransparente, se distingue un entramado trabecular radiodenso que rodea a la cavidad. En la zona más interna se aprecia un entramado trabecular fuertemente radiodenso.	Defecto no regenerado, formación de tejido conectivo con grandes restos de material asociado a numerosas células multinucleadas. Elevada vascularización. Zona que rodea al defecto: reacción del hueso adyacente, regeneración de trabéculas con gran osteointegración de material.	No regenerado. Desarrollo de tejido conectivo con muchos restos de material y células multinucleadas. Notable vascularización. Reacción del hueso adyacente: trabéculas regeneradas gruesas y desorganizadas con gran osteointegración de material. Gruesas líneas de osteoide y frentes osteoblásticos. Presencia de cavidades vasculares en las trabéculas. Médula adiposa.
Caso 3	F.D.	Miada interna del defecto muestra una ligera radiopacidad. Resto del defecto es radiolúcido.	Cavidad del defecto completamente radiotransparente.	Nula captación radiológica, cavidad del defecto radiolúcida. Aunque se aprecia un contorno óseo irregular procedente del hueso adyacente al defecto, con tenue captación radiológica.	Defecto no regenerado, aunque si se distingue formación ósea desde los laterales del defecto, pero no llega a regenerar la cavidad. Se ha formado tejido conectivo.	No regeneración ósea. Desarrollo de tejido conectivo altamente vascularizado, con restos de material y elevada celularidad, destacado las células gigantes. Material de gran y pequeño tamaño.
Caso 4	T.I	Defecto con tenue captación radiológica, ligera radiodensidad alcanzando incluso el canal medular.	Defecto con tenue captación radiológica, ligera radiodensidad alcanzando incluso el canal medular.	Defecto totalmente radiotransparente, no regenerado.	No regenerado. Formación de tejido conectivo con abundantes y grandes restos de material.	No regeneración ósea. Formación de tejido conectivo, altamente vascularizado, con muchos restos de material asociados a células multinucleadas. También se distinguen macrófagos con partículas de material de pequeño tamaño fagocitado.
Caso 5	T.D.	En la cavidad del defecto se intuye una tenue radiodensidad, que se encuentra incluso dentro de la cavidad medular.	Radiopacidad tenue e irregular que ocupa todo el defecto, alcanzando el canal medular. Alguna zona presenta una captación mayor de radiodensidad, mientras que otras se muestran más radiolúcidas.	Se distingue una radiodensidad granulosa que ocupa la totalidad del defecto, incluso dentro del canal medular.	Se ha producido una débil formación ósea, en la zona superficial del defecto. Se aprecian pequeñas y delgadas trabéculas neoformadas. Predomina el desarrollo de tejido conectivo.	Escasos procesos de regeneración ósea. En la zona superficial, intentando cerrar la cavidad del defecto encontramos el desarrollo de pequeñas trabéculas óseas. Predominio de formación de tejido conectivo vascularizado, incluso dentro del canal medular. Abundantes células multinucleadas y grandes restos de material. También hay macrófagos.
Caso 6	H.I	Cavidad radiotransparente, se intuye el contorno del defecto óseo por una línea radiodensa que delimita los bordes del defecto. En el centro de la cavidad se distingue un punto levemente radiodensa	Línea radiodensa que delimita el contorno del defecto. Se discrimina una pequeña mancha aislada, levemente radiodensa en el centro del defecto.	Defecto con contorno irregular ligeramente más radiopaco que el hueso adyacente, y con aspecto granulado radiodenso en el interior de la cavidad.	Defecto no regenerado, con desarrollo de tejido conectivo con abundantes restos de material. El contorno del defecto aparece irregular debido a la formación ósea procedente de la respuesta del hueso adyacente a la cavidad.	No regenerado, formación de tejido conectivo vascularizado. Abundantes células multinucleadas y restos de material. El hueso adyacente presenta signos de remodelación y osteointegración de material.
Caso 7	H.D.	Casi la totalidad del defecto es radiodensa, aunque la captación es difusa. La zona externa es radiotransparente.	Fuerte captación radiológica, homogénea ocupando la cavidad, aunque la zona cortical se muestra radiolúcida.	El defecto presenta signos de reparación radiológica. Radiodensidad homogénea, en continuidad con el hueso adyacente. La zona cortical se encuentra embebida y es radiotransparente.	Regeneración ósea. Zona cortical no regenerada, desarrollo de tejido conectivo. Hueso trabecular regenerado con gran osteointegración de material.	Regeneración ósea. Desarrollo de tejido conectivo vascularizado en la zona cortical, que se encuentra embebida hacia el interior. Resto del defecto regenerado, con formación de hueso trabecular desorganizado con notable osteointegración de grandes fragmentos de material. Espacio medular con tejido conectivo, restos de material en contacto con el tejido blando rodeados de células multinucleadas. Médula adiposa y hematopoyética.

RESUMEN VALORACIÓN HISTOLÓGICA MATERIAL P (GRUPO IV)						
Hueso neoformado	Tejido conectivo: denso / laxo	Material remanente	Partículas material	Vascularización	Células multinucleadas	Macrófagos
**	****	****	****	****	****	***
Caso 1 y 7. Escasas y pequeñas trabéculas: caso 5. Respuesta del hueso adyacente, caso 2, leve formación en caso 6.	Con restos de material: casos 1, 2, 5, 6 . Abundante: Casos: 3, 4. En espacio medular caso 7.	Casos 2, 3, 4, 5, 6 y 7.	Casos 2, 3, 4, 5, 6, 7.	En tejido conectivo: casos 2, 3, 4, 5, 6 y 7.	Abundantes: casos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.	Abundantes: casos 1, 4, 5.
Células plasmáticas	Necrosis	Osteoide	Deficiencia de Calcio	Osteocitos inmaduros /maduros	Médula Adiposa	Médula hematopoyética
-	-	*	-	*	**	*
		Caso 2.		En zona cortical, inmaduros: caso 1.	Caso 2. Transición con tejido conectivo: caso 1 y 7.	Caso 7.
Osteointegración	Granulomas	Encapsulación	Respuesta Inflamatoria	Osteoclastos		
**	-	-	-	-		
Grandes fragmentos: Caso 1, 2 y 7. Caso 6 en hueso adyacente.						

Tabla resumen del GRUPO IV: material Q.-

Grupo IV: material Q	Ubi	TAC 8 sem	TAC 16 sem	Radiografía	Foto Lupa	Histología
Caso 1	F.I.	Zona cortical radiotransparente. Resto de la cavidad levemente radiodensa, se aprecia el contorno del defecto.	Zona cortical radiolúcida. El resto del defecto radiodenso en continuidad con el hueso normal.	Entramado irregular radiodenso pero no está en continuidad con el hueso normal adyacente. Zona externa radiotransparente.	Regeneración ósea. Zona superficial no regenerada del todo, parte del tejido conectivo desarrollado en la zona del peritostio se introduce hacia dentro de la cavidad. Resto del defecto muestra hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas y anastomosadas.	Regeneración ósea. Cortical no compacta pero con hueso trabecular inmaduro menos en un lateral que hay una intrusión del tejido conectivo del peritostio hacia dentro de la cavidad. Abundantes restos de material. Gran osteointegración de material. Hueso regenerado con líneas de osteoide, osteocitos inmaduros y deficiencia de mineralización. Espacio intertrabecular desarrollo de tejido adiposo. Abundantes células multinucleadas asociadas a partículas de material.
Caso 2	F.D.	Radiolúcido. Laterales del defecto presentan pequeñas prolongaciones irregulares radiodensas.	Zonas externa y central del defecto radiotransparentes. Laterales y zona más interna presentan una radiodensidad difusa en continuidad con el hueso adyacente.	Entramado trabecular radiodenso en continuidad con el hueso normal. Zona externa radiotransparente.	Mitad superficial del defecto desarrollo de tejido conectivo denso. Mitad interna regenerada: trabéculas neoformadas, gruesas y anastomosadas. Espacio intertrabecular con tejido conectivo.	Mitad superficial: desarrollo de tejido conectivo denso muy vascularizado, abundantes restos de material y células gigantes. Mitad interna: hueso trabecular neoformado con líneas de osteoide y deficiencia de mineralización con abundantes células multinucleadas asociadas a restos de material y partículas. Osteointegración de material.
Caso 3	T.I.	Radiolúcido, de gran tamaño. Zona medular punto radiodenso. En la zona superficial, los laterales de la cavidad se han formado prolongaciones radiodensas intentando cerrar la cortical.	Radiopaco menos zona externa que es radiotransparente.	No regenerado, radiotransparente.	Vacío, no regenerado, desarrollo de tejido conectivo.	No regenerado. Desarrollo de tejido conectivo con abundantes restos de material. Granulomas. Abundantes células multinucleadas. Transición de tejido conectivo a adiposo. Macrófagos con material fagocitado. Inflamación.
Caso 4	T.I.	Radiodenso.	Radiopaco menos zona externa que es radiotransparente.	Regenerado, entramado trabecular radiolúcida. Entramado trabecular radiodenso en continuidad con el hueso normal, formada la cortical, aunque un poco más baja.	Regeneración ósea. Cortical embebida hacia dentro, desarrollo de escaso tejido conectivo. Defecto regenerado, trabéculas neoformadas, aunque parece que predominan los restos de material frente a la cantidad de hueso neoformado. Gran osteointegración. Espacio intertrabecular con abundantes restos de material.	Zona cortical embebida: formación de tejido conectivo muy vascularizado, con muchas partículas de material y células gigantes. Defecto regenerado con trabéculas pequeñas con abundante osteointegración de material. Numerosas células gigantes. Macrófagos con material fagocitado. Pequeños focos inflamatorios.
Caso 5	T.D.	Radiodensidad difusa, contorno del defecto delimitado por una línea gruesa radiodensa.	Defecto radiodenso salvo un lateral de la parte superficial, que es radiolúcido.	Defecto regenerado, zona cortical radiolúcida. Entramado trabecular fuertemente radiodenso que ocupa todo el defecto, alcanza el canal medular.	Zona cortical desarrollo de tejido conectivo con restos de material, formación de granulomas. Resto del defecto regenerado, con hueso trabecular neoformado, pequeñas trabéculas con grandes restos de material.	Zona cortical: tejido conectivo con numerosas células gigantes y muchos restos de material. Focos inflamatorios. Granulomas. Macrófagos con material fagocitado. Hueso regenerado con líneas de osteoide, asociación células multinucleadas-material en espacios intertrabeculares. Gran osteointegración.
Caso 6	T.D.	Radiodensidad difusa, menos en un lateral de la parte externa que presenta un punto radiopaco. El contorno del defecto se encuentra delimitado por una línea gruesa radiodensa.	Radiodensidad difusa, menos en un lateral de la parte externa que presenta un punto radiopaco. El contorno del defecto se encuentra delimitado por una línea gruesa radiodensa.	Regenerado, presenta un entramado trabecular desorganizado, radiodenso, en continuidad con el hueso adyacente. Zona cortical radiotransparente, embebida hacia dentro.	Zona externa formación de tejido conectivo. Resto del defecto regenerado, hueso trabecular neoformado, con trabéculas gruesas, anastomosadas, con gran osteointegración de material.	Cortical no cerrada del todo, hay un hueso con tejido conectivo vascularizado y abundantes restos de material asociados a células multinucleadas. Focos inflamatorios. Superficie ósea en contacto con el tejido conectivo presenta signos de reabsorción, hay osteoclastos. Resto del defecto hueso trabecular regenerado, con líneas de osteoide, gran osteointegración. Espacio intertrabecular hay restos de material con células multinucleadas.
Caso 7	H.I.	Línea radiodensa delimita la cavidad del defecto. En el centro de la cavidad hay un punto radiodenso asilado, sin continuidad con el hueso adyacente. Resto de la cavidad radiolúcida.	Línea radiodensa delimita la cavidad del defecto. En el centro de la cavidad hay un punto radiodenso asilado, sin continuidad con el hueso adyacente. Resto de la cavidad radiolúcida.	Radiolúcido.	No regenerado. Desarrollo de tejido conectivo, restos de material. Granulomas	No regenerado. Desarrollo de tejido conectivo denso muy vascularizado, abundantes restos de material en asociación con células multinucleadas, macrófagos con material fagocitado. Granulomas. Hueso que rodea al defecto presenta signos de remodelación: líneas de osteoide, osteocitos inmaduros y deficiencia de mineralización. También presenta células multinucleadas. Osteointegración de material en hueso. Transición de tejido adiposo a conectivo.
Caso 8	H.D.	Línea radiodensa que delimita el contorno del defecto. Punto radiodenso en la parte central del defecto.	Defecto radiotransparente, prolongaciones difusas levemente radiodensas que salen de los laterales del defecto. Contorno del defecto delimitado por una línea radiodensa.	Parece como si la mitad interna estuviera regenerada, ya que presenta un entramado radiodenso granular. Zona cortical radiotransparente.	Mitad superficial desarrollo de tejido conectivo denso. Mitad interna regeneración ósea. Trabéculas neoformadas, gruesas y anastomosadas.	Zona superficial no regenerada. Desarrollo de tejido conectivo con un gran infiltrado de células multinucleadas asociadas a numerosos restos de material. Transición tejido conectivo a adiposo. Mitad interna: presenta hueso trabecular regenerado, con líneas de osteoide. Espacios intertrabeculares con abundantes células multinucleadas en asociación con restos de material y macrófagos con material fagocitado.

DISCUSIÓN



Vi.~ DISCVSIÓN:

El diseño y fabricación por AzureBio S.L.(Madrid) de los biomateriales basados en diferentes tipos de fosfatos de calcio, sobre todo monetita, y compuestos de silicio en proporciones determinadas estudiados en este trabajo, se ha llevado a cabo con el objetivo de conseguir biomateriales sintéticos reabsorbibles, osteoconductores, osteogénicos y osteoinductores como alternativa a los materiales ya existentes en el mercado, como son los controles utilizados en este trabajo Bio-Oss® (155, 156, 157) y Cerasorb® (158), ampliamente aplicados en la cirugía dental y maxilofacial y comercializados en forma de gránulos de diferentes tamaños comprendidos entre 150 y 2000 μm . El Bio-Oss® es una matriz mineral ósea, porosa, no antigénica y natural. Se produce mediante la extracción de todos los componentes orgánicos del hueso bovino. Debido a su estructura natural, Bio-Oss® es física y químicamente comparable a la matriz mineralizada del hueso humano. La capacidad osteoconductora del Bio-Oss® en humanos, se ha puesto de manifiesto en procesos de regeneración de defectos periodontales, en la reconstrucción ósea peri-implante y en el aumento del cresta alveolar, aunque en estos dos últimos procesos se pueden encontrar reacciones adversas que hacen peligrar el éxito del tratamiento. En relación a la reparación ósea posterior a la extracción de piezas dentarias, pocos son los trabajos que demuestren que el Bio-Oss® pueda reducir la reabsorción de la placa bucal y consiga mantener el volumen óseo (159). Además, hay que destacar la escasa reabsorción que sufre el material Bio-Oss®, ya que en trabajos realizados en procedimientos de elevación del seno maxilar en humanos, aún se detectan restos 10 años después (160). Por otro lado, la aplicación clínica del Cerasorb®, material sintético compuesto por una fase pura de β -TCP, muestra su reabsorción y capacidad de regenerar hueso en humanos en los defectos alveolares causados por la extracción de dientes (161) y en procesos de aumento del suelo sinusal (162).

Los materiales de este trabajo se han sintetizado en forma de gránulos, de tamaño comprendido entre 250 y 1000 μm , para su posible aplicación en clínica odontológica. Este tipo de materiales son demandados para el relleno de cavidades óseas provocadas por extracción de piezas dentarias, por deficiencia en la cantidad ósea requerida para la colocación de implantes o puentes dentales, o incluso para el relleno de defectos óseos debido al desarrollo de quistes o tumores.

Uno de los factores clave en el desarrollo de biomateriales aplicados en regeneración ósea reside en la porosidad. Los gránulos sintetizados en este trabajo presentan una porosidad intragranular, de forma que el propio grano tiene poros, e intergranular, constituido por los espacios libres que quedan entre los gránulos. La porosidad intergranular es la que proporciona la interconexión entre los poros y es de gran importancia, de manera que permite la distribución y migración de las células, y la formación *in vivo* de vasos sanguíneos necesarios para sustentar la neoformación del tejido óseo y su remodelación (163). Un tamaño de poro entre 200 y 400 μm es suficiente para permitir la osteogénesis (164). Una macroporosidad interconectada superior a 100 μm es la que permite la

colonización de células (57, 165). Por lo tanto no es solo importante el tamaño de poro sino también las características de las interconexiones; el tamaño de las interconexiones, más que el tamaño de poro, puede determinar el grado de osteoconducción (55). Como nuestros materiales son granulados, la interconexión está garantizada de forma natural.

Por otra parte, la porosidad intragranular es la que permite que se produzca un intercambio de fluidos e iones con el medio. En sistemas reabsorbibles tanto la densidad de poro como de interconexiones es más importante que el tamaño de las mismas (57). La forma granulada de los materiales proporciona porosidad aumentando considerablemente la superficie de contacto del material en el lugar de implantación, y la superficie susceptible de interactuar con las células de los tejidos circundantes. Además la forma granulada proporciona un área superficial específica elevada, proporcionando a los materiales una elevada solubilidad y reactividad. Materiales con mayor área específica, tendrán mayor reactividad y por tanto mayor reabsorción, provocando una mejora en la capacidad de osteoinducción (166).

Además, la porosidad afecta al grado de osteointegración ósea del material *in vivo*, de forma que la macroporosidad afecta al volumen final de hueso regenerado, y por otro lado, el tamaño de poro, la fracción del volumen de porosidad y el tamaño y densidad de interconexión afectan a la calidad de hueso neoformado (167).

Todos estos factores influyen en que los biomateriales puedan presentar una propiedad importante a la hora de conseguir la regeneración ósea, que es la osteoinducción. Los materiales derivados de fosfatos de calcio son osteoconductores y en general no se consideran osteoinductores. Sin embargo algunos trabajos (168) ponen de manifiesto que poseen la capacidad de formar hueso en tejidos extraesqueléticos, sin la adición de factores osteogénicos, si se combinan adecuadamente características como la topografía, geometría, composición, tamaño de macroporo y porcentaje de porosidad del fosfato de calcio. Esta geometría sería la responsable de captar y de concentrar a los factores de crecimiento y células osteoprogenitoras circulantes, proporcionando las propiedades osteoinductoras a los fosfatos de calcio (165).

El proceso de síntesis de monetita utilizado en este trabajo, basado en una reacción de cementación ácido-base, es igual que el empleado por Gbureck y cols. (169). Estos autores en su trabajo utilizan un proceso que combina la impresión tridimensional de polvos con la reacción cementación de β -TCP y ácido fosfórico. En primer lugar obtienen brushita, la cual mediante una conversión hidrotérmica es transformada en monetita. El proceso de conversión se realiza en un autoclave por esterilización con vapor (20 min a 121°C) consiguiendo la deshidratación de la brushita y por lo tanto su transformación en monetita. Este proceso de síntesis ha sido probado en un trabajo de Dorozhkin y cols. (170), donde se han estudiado las transformaciones químicas de tres materiales de fosfato de calcio, como son la Brushita, BCP y CDA.

El proceso de autoclavado utilizado en este trabajo para convertir la brushita en monetita, hace que obtengamos un biomaterial con propiedades mejoradas. De forma que, mediante el proceso de deshidratación térmica de la brushita, se mantienen las condiciones

de presión y temperatura elevadas, previniendo la contracción del material, sin alterar la geometría macroscópica de la brushita. Además de la deshidratación, el proceso de autoclavado que transforma la brushita en monetita, induce un aumento de la densidad, la porosidad y el área superficial específica (169). Todo ello conlleva a que presente un mayor grado de reabsorción *in vivo*. Tamimi y cols. (78) evaluaron si la aplicación local de gránulos de monetita, conseguidos mediante la conversión térmica de un cemento de brushita, podría inducir la regeneración ósea en defectos óseos de tamaño crítico en la bóveda craneal de conejo, logrando resultados positivos a las 8 semanas de experimentación.

La obtención de la monetita por este procedimiento presenta ciertas limitaciones a la hora de su aplicación clínica, ya que disminuye sus propiedades mecánicas y no permite su administración como una pasta inyectable o como relleno óseo, ya que tiene que ser prefabricada, impidiendo su uso en defectos óseos irregulares según Tamimi y cols. (171).

El material ideal en la regeneración ósea debe combinar las propiedades de osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción, del mismo modo que debe de ser reabsorbido *in vivo* para ser reemplazado por hueso regenerado. Además deben ser reabsorbidos y gradualmente reemplazados por el nuevo hueso formado (18). Los biomateriales de fosfato de calcio son candidatos excelentes para la regeneración ósea debido a su probada biocompatibilidad, osteoconducción y algunas veces osteoinducción. Sin embargo, a menudo su capacidad de reabsorción *in vivo* es reducida, de modo que es un factor limitante en procesos de restauración ósea donde el material tiene que ser reemplazado progresivamente por hueso autólogo funcional. Por ello en este trabajo se han combinado diferentes composiciones de fosfato de calcio, intentando así modular la progresiva reabsorción del material empleado.

Los distintos compuestos basados en silicio, como la ps-wollastonita, el gel de sílice y el biovidrio, se han elegido por las propiedades bioactivas e osteoinductivas que presentan, al ser capaces de liberar iones al medio, formando una capa de HA sobre su superficie y así favorecer la formación ósea (25, 42, 172).

Por último, se han realizado sustituciones iónicas de Zn^{2+} o Mg^{2+} en la monetita, porque en materiales basados en fosfato de calcio se ha postulado que la adición de estos iones puede mejorar las propiedades biológicas y favorecer la regeneración ósea (173). Sobre todo se ha estudiado el efecto de las sustituciones iónicas de Zn^{2+} y Mg^{2+} en la HA, que inhiben la cristalización de la HA, de forma que en el caso de los cementos de brushita, conlleva a que disminuya su cristalinidad y aumente la solubilidad del material (174).

Debido a las distintas combinaciones posibles entre los diferentes componentes comentados anteriormente, los candidatos a estudio se agruparon, atendiendo a su composición, en 4 grupos. Todos ellos tienen en común la presencia de monetita, que puede presentar o no sustituciones iónicas parciales, y gel de sílice. A continuación se exponen las bases de formulación y el criterio de selección de los distintos materiales.

GRUPO I:

La composición de los materiales del grupo I está basada en la formación de granulados de monetita a partir de la reacción de la ps-wollastonita con el ácido fosfórico. Como se ha comentado anteriormente, al tratarse de materiales granulados, hace que presenten una elevada área superficial específica. Un aumento de este área provoca una mayor expresión de genes osteogénicos *in vitro* (175). Así mismo, la liberación de iones al medio al solubilizarse el material, puede influir en la expresión de estos genes. Se ha estudiado que la monetita obtenida mediante la conversión hidrotérmica de cementos de brushita se reabsorben más rápidamente *in vivo* que los cementos originales de brushita, mostrando una mayor infiltración ósea; aunque hay que tener en cuenta que el número de animales utilizados fue reducido (171). A su vez la monetita presenta una mayor solubilidad que otros fosfatos de calcio como OCP, TCP e HA. De hecho el interés que recae sobre el uso de la monetita, se debe a que cementos de monetita presentan una mayor reabsorción *in vivo* que los cementos de HA (176).

La reacción entre la ps-wollastonita y el ácido fosfórico es muy rápida, provocando la formación de elevadas cantidades de gel de sílice (cerca al 30% en peso), consiguiendo únicamente concentraciones de monetita de alrededor del 60% en peso. Estudios preliminares *in vitro* de la ps-wollastonita demostraron que se trata de un material potencialmente bioactivo ya que promueve la formación de una capa de HA en contacto con fluido biológico simulado (FBS) con una concentración de iones, pH y temperatura virtualmente idénticos a lo que tiene el plasma sanguíneo humano. Los cristales de HA se formaban sobre una capa intermedia de sílice amorfa (177, 178). Así mismo se comprobó *in vitro* su bioactividad en saliva de humanos (179) e *in vivo* en tibias de rata (49). La formación de la capa de HA es un requisito esencial para que un biomaterial sea utilizado como un sustituto óseo bioactivo. Por otro lado Sarmiento y cols. (48) demostraron la biocompatibilidad y osteoconducción de la ps-wollastonita al realizar ensayos *in vitro* con cultivos celulares de osteoblastos. Sin embargo, otro trabajo (180) pone de manifiesto que, debido a la rápida disolución de la superficie de la capa de gel de sílice y el aumento local del pH, previo a la formación de la capa bioactiva de apatita, dificulta la adhesión de osteoblastos en los primeros periodos de inmersión en el medio de cultivo en estudios *in vitro*; ya que la formación de la capa de apatita favorecería la adhesión celular (47).

El material A (monetita 58% en peso, gel de sílice 34% en peso y ps-wollastonita 8% en peso), ha sido considerado en este grupo como el material de referencia. Los materiales B, C y D presentan una composición muy similar a la del material A, exceptuando la presentación de sustituciones iónicas en la monetita. En los materiales B y C, la monetita presenta la sustitución parcial de Ca^{2+} por Zn^{2+} , mientras que el material D, la monetita presenta Mg^{2+} . Se seleccionaron estos iones porque intervienen en el metabolismo celular. El magnesio es un catión intracelular esencial, que interviene en muchas funciones celulares, como el transporte de iones (K^+ y Ca^{2+}), y modula el metabolismo energético y la proliferación celular (181). Una deficiencia de magnesio puede llevar a una disfunción celular, pudiendo alterar el metabolismo óseo (182). Además interviene en los procesos de deposición y mineralización ósea (88). En relación al zinc, este forma parte de 300 enzimas, incluida la fosfatasa alcalina (182). Se ha comprobado que *in vitro* estimula la proliferación y

diferenciación osteogénica hacia células osteoblásticas e inhibe la reabsorción mediada por los osteoclastos (90) e *in vivo* estimula la formación y mineralización ósea (91).

Así mismo se ha demostrado que la presencia de diversos iones (estroncio, pirofosfato o silicio), durante la reacción de síntesis de cementos puede tener efectos tanto en la propia reacción como en las propiedades finales del material (183, 184). En el proceso de síntesis de nuestros materiales, los iones metálicos han sido incorporados a los componentes sólidos de la reacción en forma de sales, que contienen el ión deseado, siendo este mismo método el utilizado en la adición de Sr^{2+} y Mg^{2+} a sistemas cementantes (77). Hay trabajos en los que se han probado distintas sustituciones iónicas en otros fosfatos de calcio, como la HA y el β -TCP, mostrando la influencia sobre su biodegradabilidad. En el caso de la incorporación de iones como el Mg^{2+} y el Sr^{2+} en HA y CDHA, aumentaban su solubilidad, y por lo tanto la biodegradación de ambos (174). Pero, al contrario de lo que sucede en las apatitas, la solubilidad del β -TCP disminuye al incorporar iones de Mg^{2+} o Zn^{2+} (91, 165). En el diseño de los materiales estudiados en este trabajo, se pensó que sustituciones iónicas parciales de la monetita podrían mejorar las propiedades osteoinductoras y osteoconductoras, al igual que una solubilidad menor en comparación con la monetita sin sustituir.

En el material *C* existe una diferencia adicional, consistente en que en la reacción de síntesis se incorporó en exceso CDHA para obtener un material con menor grado de solubilidad y así poder estudiar su posible efecto. Se seleccionó CDHA porque es una HA no estequiométrica, siendo más parecida a la HA biológica en cuanto a su estequiometría y cristalinidad, características que hacen que sea más reactiva en medio biológico (84). La HA biológica es nanocristalina, deficiente en calcio y con varias sustituciones iónicas; sin embargo, la HA estequiométrica suele ser mucho más cristalina, con menor desorden estructural y menos reactiva. Además, la HA estequiométrica comercial suele estar sinterizada (tratada a altas temperaturas), de forma que son muy poco reabsorbibles y reactivas, por lo que si la usáramos no se obtendría un material reabsorbible.

Al hilo de esta idea, y para evitar la formación excesiva de gel de sílice, se incorporó a la reacción de síntesis otro fosfato de calcio, el β -TCP, obteniendo el material *E* (monetita 63% en peso, gel de sílice 19% en peso y β -TCP 18% en peso) y el material *F* (monetita 49% en peso, gel de sílice 14% en peso, β -TCP 30% en peso y CDHA 2% en peso). Ambos materiales presentan una concentración de gel de sílice menor que *A*, *B*, *C* y *D*, contrarrestada por la presencia de β -TCP, proporcionando así distintos grados de solubilidad, ya que en el caso del material *F*, la concentración de β -TCP es mayor que en *E*. Se ha elegido la combinación de diversos fosfatos de calcio, como la monetita, β -TCP y CDHA, por sus diferentes ratios de solubilidad ($\text{CDHA} < \text{TCP} < \text{DCPA}$) (27, 98, 185), que permite modular la solubilidad del material final, por composición, que es similar al componente mineral óseo, y por sus propiedades osteoconductoras (186).

Por último, en el material *F* se observó la formación de una pequeña cantidad de CDHA (2% en peso). Esta CDHA puede haberse formado como resultado de un aumento local del pH debido a la hidrólisis de la ps-wollastonita, ya que en el rango de pH entre 6,5-9,5 la CDHA es la fase menos soluble, siendo más estable a estos pH que la monetita, que precipita a pH más ácidos (187).

GRUPO II:

El grupo II, formado por los materiales *G*, *H*, *I*, *J* y *K*, se caracteriza por utilizar un biovidrio bioactivo como precursor de la formación de monetita y gel de sílice, en lugar de la ps-wollastonita empleada en el grupo I, además de por presentar este biovidrio como parte de su composición final. Concretamente se utiliza el biovidrio con la fórmula $70\%SiO_2/30CaO$ (% mol) obtenido por el método de sol-gel, debido a la simplicidad de su composición y a su bioactividad comprobada (188). Del mismo modo que en el grupo anterior, se estudió la influencia de las sustituciones iónicas parciales del Ca^{2+} en la monetita por Zn^{2+} o Mg^{2+} , así como la combinación de monetita con fosfatos de calcio menos solubles como el β -TCP y la CDHA.

El material *G* está compuesto por un elevado contenido en monetita (74% en peso), debido a que en su reacción de síntesis se llevaron a cabo dos reacciones. Por un lado el vidrio, añadido en exceso, reacciona con el ácido fosfórico y el agua, formando una mínima parte de la monetita y todo el gel de sílice (18% en peso) presente en este material, quedando una pequeña cantidad de vidrio sin reaccionar (2% en peso). Este vidrio presenta mucho más silicio que calcio en su composición por lo que su reacción con el ácido fosfórico da lugar a materiales con un alto contenido de gel de sílice y poca monetita. Para compensar las pequeñas concentraciones de monetita, se incorpora al proceso de síntesis una reacción con un fosfato de calcio, el β -TCP con el ácido fosfórico, obteniéndose así una mayor concentración final de monetita.

Los materiales *H* y *I* se sintetizaron, al igual que el material *G*, partiendo de un exceso de vidrio bioactivo que daría lugar a la formación de pequeñas cantidades de monetita (alrededor del 50% en peso), y en mayor medida gel de sílice, (alrededor del 38% en peso). Pero en estos materiales, para aumentar la concentración de monetita, se realiza una reacción entre la CDHA y el ácido, de forma que es posible aumentar la cantidad de monetita obtenida. Los materiales *H* y *I* son iguales salvo que en el caso del material *I* el Ca^{2+} de la monetita está parcialmente sustituida por Zn^{2+} , para así poder estudiar sus posibles efectos, como se ha comentado previamente en el grupo I.

En los materiales *G*, *H* y *I* la reacción entre el vidrio y el ácido provoca un aumento de pH, alcalinizando el medio, llegando a formar pequeñas cantidades de CDHA como producto final de la reacción, al ser más estable a este pH la CDHA que la monetita, como se ha comentado anteriormente (187).

Sin embargo, como los materiales *H* y *I* presentaban un contenido en gel de sílice elevado (alrededor del 38% en peso), se realizó una modificación en el proceso de síntesis obteniendo los materiales *J* y *K*, que presentan un contenido de gel de sílice (alrededor del 15% en peso), similar al material *G*. En la síntesis de los materiales *J* y *K* se buscó la combinación de monetita con β -TCP, y así tener sistemas con diferente grado de solubilidad. Esto se llevó a cabo también mediante dos reacciones en donde se utilizó ps-wollastonita como precursor del gel de sílice y de la monetita (45% en peso) en lugar del vidrio. Con la ps-wollastonita se garantiza que se forme el gel de sílice (15% en peso), ya que es más reactiva, como se ha comentado anteriormente. Y por otro lado, el β -TCP fue utilizado como

precursor de la monetita y, al añadirlo en exceso, se presenta también como parte de la composición final (β -TCP 35% en peso), pues queda sin reaccionar junto con el vidrio (5% en peso), añadido también en exceso. El material *K* tiene la misma composición que el material *J*, salvo que en *K* el Ca^{2+} de la monetita está parcialmente sustituido por Mg^{2+} .

GRUPO III:

Este grupo se diseñó con el fin de sintetizar materiales cuyo componente mayoritario fuera la monetita, con o sin sustituciones parciales del Ca^{2+} por Zn^{2+} , y presentarán una cantidad mínima y constante de gel de sílice (7% en peso), siendo además la única fuente de silicio. Además se combinó la presencia de monetita con CDHA para así obtener materiales con diferente grado de solubilidad. Con estos sistemas podíamos estudiar el efecto de elevadas cantidades de monetita (entre 63 y 93% en peso), bajas concentraciones de gel de sílice, y además, la influencia de la CDHA en la composición final a mayores concentraciones que en grupos anteriores (el 15 o el 30% en peso).

Dentro de este grupo, el material *L* es el más sencillo ya que está formado únicamente por monetita (93% en peso) y gel de sílice (7% en peso). Los demás materiales del grupo III, *M*, *N*, \tilde{N} y *O* presentan en su composición monetita (63 o 78% en peso) y CDHA, en un 15% en peso en los materiales *M* y *N* y en un 30% en peso en \tilde{N} y *O*. Los materiales *M* y *N*, presentan la misma composición, salvo que en *M* la monetita presenta sustituciones iónicas parciales de Zn^{2+} ; y lo mismo ocurre entre los materiales \tilde{N} y *O*, donde la monetita en *O* es la que presenta Zn^{2+} .

GRUPO IV:

Este grupo se caracteriza porque en el proceso de síntesis se utilizó el fosfato monocalcico (MCP) en vez del ácido fosfórico. La razón de este cambio es poder obtener materiales con una mayor proporción de ps-wollastonita residual que los obtenidos en el grupo I. Este grupo IV se diseñó para obtener una composición final de monetita (60% en peso), gel de sílice (17% en peso) y ps-wollastonita (23% en peso). Dada la propia estequiometría de la reacción entre la ps-wollastonita y el ácido fosfórico, no es posible obtener esta composición, por lo que se utilizó como alternativa el MCP, con el que se podía obtener una menor cantidad de gel de sílice y un alto contenido de ps-wollastonita. En este caso es necesario añadir agua a la reacción de síntesis, ya que tanto el componente ácido, MCP, como básico, ps-wollastonita, son sólidos.

Sin embargo, el propósito de mantener concentraciones de monetita alrededor del 60% en peso no pudo conseguirse y los materiales presentaron una composición muy diferente a la deseada, es decir, una menor proporción de monetita, la formación no esperada de CDHA y un contenido de ps-wollastonita menor de lo esperado. Después de estudiar la causa de este resultado, parece que la formación de CDHA se debe al aumento local de pH producido por la hidrólisis de la ps-wollastonita, como se ha comentado en los grupos I y II, y cuya concentración es elevada, dando lugar a la precipitación de CDHA en lugar de monetita. Así mismo, este proceso se ve favorecido en este grupo ya que se utilizó MCP como ácido y la reacción entre la ps-wollastonita y el MCP es más lenta que con el ácido

fosfórico, favoreciendo que estos aumentos locales de pH se mantuvieran por más tiempo. Además, el contenido de CDHA puede aumentar durante el envejecimiento, ya que la ps-wollastonita en exceso reacciona con la monetita transformándose en CDHA. La composición final de los materiales fue la siguiente: *P* (monetita 35% en peso, gel de sílice 22% en peso, CDHA 24% en peso y ps-wollastonita 18% en peso) y *Q*, que presenta la sustitución iónica parcial del Ca^{2+} de la monetita por Zn^{2+} (monetita 20% en peso, gel de sílice 27% en peso, CDHA 46% en peso y ps-wollastonita 7% en peso).

Resumiendo, en este trabajo se han sintetizado materiales con diferentes composiciones basadas en distintos fosfatos de calcio, como la monetita, β -TCP y CDHA, que presentan diferentes grados de solubilidad, compuestos basados en silicio, como el gel de sílice y la ps-wollastonita, que se caracterizan por ser bioactivos, y se han realizado sustituciones iónicas parciales del Ca^{2+} en la monetita por Zn^{2+} y Mg^{2+} .

Modelo experimental:

Animal de experimentación:

El animal de experimentación, utilizado para realizar el estudio *in vivo* de la respuesta tisular que provocan los materiales sintetizados en esta tesis, es adecuado para responder las cuestiones de biocompatibilidad, velocidad de reabsorción del material, formación de nuevo hueso y estudiar las reacciones celulares producidas frente a la implantación de los materiales (189, 190, 191, 192). Las ovejas son consideradas como una buena especie para la investigación ósea, ya que su metabolismo óseo es comparable al humano, permitiendo su comparación con los humanos; Willie y cols. (193) describen un patrón de crecimiento óseo en implantes porosos en oveja similar al humano, si bien la composición ósea y la regeneración probablemente sean diferentes en función de la localización en el esqueleto de la oveja, al igual que sucede en otras especies (194). Se considera un modelo prometedor en el área de la investigación por varias razones, ya que son dóciles, fáciles de manipular y albergar, son relativamente económicas y están disponibles en grandes cantidades (152). Las diferencias en la formación de nuevo hueso y reabsorción del material entre cada oveja entra dentro de las variaciones biológicas. Pueden esperarse incluso diferencias en relación a la localización ósea de cada material, debido a la diferente vascularización en el lugar de la implantación. Áreas con una gran vascularización, como es el caso de la metafisis proximal del húmero, puede acelerar el proceso, como se ha comprobado al compararlo con otros estudios donde la implantación se realizó en los condilos femorales que presentan un patrón vascular más pobre (190).

La oveja es un ejemplo de modelo animal con una actividad de remodelación ósea haversiana similar a la de los humanos. La distribución de los canales de Havers en la oveja normalmente es menos densa y más irregular en comparación con la de los humanos (195). Se han realizado estudios de comparación de mineralización secundaria en hueso cortical y trabecular de oveja, poniendo de manifiesto que los procesos de remodelación entre ambos de tipos de hueso son diferentes, sin embargo no existen diferencias en relación a los procesos de mineralización secundaria. El ratio de aposición de mineralización secundaria es el mismo en el hueso cortical y trabecular de la oveja (196).

Otra de las ventajas del uso de ovejas en experimentación es que permite realizar un mayor número de defectos óseos, de forma que en un mismo animal se pueden evaluar diferentes materiales, en comparación, por ejemplo, con los roedores que requieren un mayor número de ejemplares por estudio, debido a la limitación anatómica y su tamaño, no permitiendo realizar una valoración de múltiples materiales a la vez. Además los roedores tienen un ciclo de remodelación más rápido en comparación con el de los humanos; asimismo no sufren procesos de remodelación cortical y presentan un déficit de hueso trabecular (197). Estos factores hay que tenerlos en cuenta a la hora de realizar ensayos con estos animales, ya que presentan un metabolismo óseo diferente al del humano.

Además, debido al tamaño de la oveja se pueden realizar defectos de gran tamaño en comparación con los que se podrían hacer en animales más pequeños, como los conejos.

Los mamíferos tienen una temperatura y una concentración de iones en suero estables, de modo que cuando un biomaterial es implantado *in vivo*, su velocidad de reabsorción puede depender de su propia solubilidad, su geometría (porosidad y área superficial), y del intercambio iónico. Por lo tanto, la reabsorción de un biomaterial *in vivo* puede estar influenciado tanto por el material en sí como por el intercambio de agua específico de la especie animal en donde el material se ha implantado. La reabsorción parece ser mayor en animales pequeños con masas óseas pequeñas ya que implica un ratio de intercambio de agua mayor, que depende de su demanda calórica. Por ello se explica el comportamiento variable pueden presentar los materiales al implantarse en diferentes especies animales o en humanos (81). Aunque en nuestro caso, al utilizar ovejas, las diferencias no son tan marcadas, en comparación con los humanos. El uso de primates en experimentación se ve reducido debido a cuestiones éticas, económicas, problemas de estabulación y escasa disponibilidad de centros experimentales, además de que hay que dar preferencia al empleo de animales alternativos, en la medida de lo posible.

Tipo de lesión y cirugía:

Las zonas anatómicas de implantación de los materiales seleccionadas fueron la epífisis proximal de la tibia, la epífisis distal del fémur y la diáfisis proximal del húmero, ya que a la hora de realizar los defectos óseos en los extremos de los huesos encontramos los dos tipos de hueso, tanto cortical como trabecular.

Los defectos óseos realizados en este trabajo, que presentaron procesos de regeneración ósea, ésta se manifiesta mediante la formación de hueso de tipo trabecular. En ninguno de los casos, a las 16 semanas de estudio, se consigue la regeneración completa del defecto, apareciendo en la zona superficial el desarrollo de tejido conectivo. Asimismo, en ese tiempo de experimentación no se alcanza la diferenciación a un hueso de tipo cortical. Esta respuesta tisular la encontramos en el trabajo de Patel y cols. (198) donde realizaron defectos óseos en el cóndilo femoral de ovejas y se implantaron gránulos de HA e HA sustituida por sílice durante 6 y 12 semanas. La regeneración ósea de estos defectos óseos se realizó desde la profundidad del defecto y las paredes laterales del defecto. No obstante, en las zonas media y superficial, se produjo una infiltración de médula activa impidiendo la regeneración completa del defecto, no formando hueso de tipo cortical. Sin embargo, en el

trabajo de Braye y cols. (199) defectos óseos realizados en el hueso cortical del fémur de ovejas donde se implantaron cilindros porosos de HA, presentaban la completa osteointegración de la HA y la formación de hueso maduro en los poros situados en la zona de la corteza a las 20 semanas de estudio. A los 7 y 9 meses de experimentación, todos los poros se encontraban rellenos de hueso maduro. Debido a esto, cabe pensar que el proceso de formación de hueso maduro cortical a las 16 semanas de estudio en nuestro trabajo aún no se ha producido, y que con el tiempo llegaría a formarlo.

Además del tamaño del defecto óseo, existen otros factores que también regulan la calidad y cantidad de hueso regenerado en condiciones experimentales. De hecho el lugar anatómico donde se realiza el defecto óseo y su estabilidad son factores importantes, ya que la fuerza muscular y de cargas junto con el grado de movilidad, pueden alterar el resultado. En relación a la localización anatómica del defecto óseo, únicamente se podría indicar que de forma bastante frecuente en los defectos de las tibias, éstos alcanzan el canal medular, por lo que los materiales implantados entran en contacto con la médula ósea. Esto se debe a que en la epífisis proximal de la tibia donde se han realizado los defectos, encontramos además del estrecho hueso cortical, escaso hueso trabecular, siendo más accesible el canal medular a la hora de realizar los defectos óseos. Este fenómeno ha llevado a descartar aquellos casos implantados en tibia que presentaran un comportamiento diferente a la tendencia general del resto, debido a la posible influencia del contacto directo con la médula ósea.

A pesar de la posible influencia de la localización anatómica ósea donde se han realizado los defectos, la capacidad de reparación del defecto óseo depende principalmente del tamaño de la herida ósea. Teóricamente, un daño óseo experimental realizado para el estudio de mecanismos de reparación debe ser lo suficientemente grande como para no permitir una regeneración espontánea del defecto. Por ello se recurre a la creación de defectos óseos de tamaño crítico, el cual se define como “la herida ósea de menor tamaño que se realiza en un hueso y una especie animal en particular, la cual no sufrirá una regeneración espontánea durante la vida del animal” (200). El defecto de tamaño crítico es aquel que presenta una regeneración ósea menor al 10% durante la vida del animal. En el trabajo de investigación de Nuss y cols. (201) se confirma la utilidad del uso de ovejas con defectos óseos de tamaño crítico de 8 mm de diámetro y 13 mm de largo realizados en la parte proximal y distal de húmero y fémur, para el estudio de la biocompatibilidad de biomateriales aplicados a la regeneración ósea. Estas dimensiones del defecto óseo coinciden con las de los defectos realizados en este trabajo.

Por otro lado, para realizar una correcta evaluación de los procesos de reparación ósea sin interferencia de los procesos de crecimiento fisiológicos, la reparación de los defectos óseos deben estudiarse en animales esqueléticamente maduros (202). El hueso compacto inicial formado en la oveja es predominantemente plexiforme, el cual se mineraliza a medida que el animal crece, alcanzando la madurez esquelética entre los 3 y 4 años de edad (203). En nuestro trabajo, la edad media de las ovejas es de 4 años.

En relación a la cirugía de la realización de los defectos óseos, hay que tener en cuenta factores que puedan afectar a la respuesta tisular frente al material implantado. Estos factores pueden ser: desviaciones anatómicas de la localización de los defectos, que el

defecto no se encuentre en un lecho óseo lo suficientemente vascularizado, debido a procesos de abrasión o que no hayan sido bien lavados, o que incluso a la hora de implantar los gránulos de material, este se haya compactado demasiado, reduciendo su porosidad. Algunos de los defectos óseos se han realizado en las proximidades de la zona metafisaria del hueso, mostrando osificación endocondral y por lo tanto interfiere a la hora de realizar una valoración adecuada. Este fenómeno ocurre en: material *E* (caso 4), material *F* (caso 1), material *G* (caso 5), material *I* (casos 3 y 6) y material *K* (caso 3). Es preciso reseñar que todos los casos corresponden a defecto óseos realizados en tibias, menos los de los materiales *G* y *K*, que fueron realizados en húmeros.

Técnicas de estudio:

Radiología: TAC y Rx:

Estas técnicas de diagnóstico por imagen no invasivas realizadas, en el caso de los TAC, en el postoperatorio inmediato, mensuales hasta las 16 semanas de experimentación y después del sacrificio de los animales, nos ha proporcionado una secuencia temporal de imágenes mediante las cuales hemos podido ver cómo ha evolucionado el relleno del defecto óseo a distintos tiempos a lo largo de todo el experimento. Aun teniendo las imágenes de TAC, que nos proporcionan una mayor resolución en comparación a las radiografías, también se ha recurrido a la realización de radiografías, una vez extraídas las piezas óseas con los defectos óseos y finalizado el tiempo de experimentación, como un sistema de control rutinario con fines de orientación para la toma de muestra. Además de los TACs, las radiografías nos han permitido establecer una correlación con los resultados obtenidos mediante la evaluación histológica de los defectos óseos, ya que la valoración de la respuesta tisular se ha realizado en un único tiempo de estudio, correspondiente a 16 semanas de implantación de los materiales, duración final del ensayo. Esta combinación de técnicas no se ha encontrado en otros trabajos, aunque otras técnicas como μ -CT sí (81, 204), pero se ha considerado que las técnicas empleadas en este trabajo son suficientes para poder realizar una evaluación completa de la respuesta tisular ósea frente a los materiales implantados.

De este modo se establece una relación entre la presencia de radiodensidad en las imágenes, índice de la presencia de calcio, con una distribución homogénea y continua con el hueso adyacente a los bordes del defecto óseo, siendo por lo tanto un signo de regeneración ósea. O de lo contrario, la ausencia de radiopacidad en el defecto óseo, es un signo de ausencia de calcio y por lo tanto se trata de un defecto no regenerado.

Técnica histológica:

El propósito de realizar el estudio histológico sobre muestras incluidas en metilmetacrilato (205, 206) que no estuvieran descalcificadas se debe a diversas razones. Una de ellas es debido a la composición química de los granulados estudiados en este trabajo. Al ser compuestos basados en fosfato de calcio, requieren que las muestras no se encuentren descalcificadas, puesto que si lo estuvieran además de eliminar el componente cálcico del hueso, perderíamos también nuestro material, tanto si estuviera integrado en el hueso regenerado o como si hubiera material remanente, impidiendo por lo tanto realizar una

adecuada valoración y estudio. Otra de las razones por las que las muestras se han incluido en metilmetacrilato es por su capacidad de infiltración de muestras de gran tamaño y la última razón se debe a la gran versatilidad de tinción de este tipo de muestras. Además, las muestras óseas no descalcificadas incluidas en metilmetacrilato pueden cortarse en secciones de 3-5 μm de grosor, utilizando equipos relativamente convencionales como los empleados en este trabajo, tales como sierras de cadena y micrótomo (207).

Por otro lado, la preparación de muestras óseas descalcificadas incluidas en parafina (206) por ejemplo, ha sido durante mucho tiempo una técnica histológica rutinaria en hospitales y centros de investigación, pero presenta el inconveniente de modificar la estructura de la fase mineral del tejido óseo. Por ello, la utilización de muestras óseas calcificadas permite mantener intacta la fase mineral del tejido óseo y realizar tinciones específicas, como las realizadas en este trabajo, tinción de Von Kossa y tinción de tricrómico de Goldner (208). La tinción de Von Kossa, específica para tejidos mineralizados, nos permitió discriminar el tejido calcificado que adquiere una coloración negra del resto que no lo está y se tiñe de rojo. La técnica de Von Kossa está basada en la reacción de la plata que tiñe las calcificaciones, y utiliza las reacciones químicas entre los iones de calcio y los reactivos, adquiriendo un color entre negro y marrón oscuro (209). Mientras que la técnica de tricrómico de Goldner permite distinguir la matriz orgánica, denominada osteoide, teñida de rojo, de la matriz ósea madura mineralizada, teñida de verde. Además discrimina fibras colágenas, el tejido conectivo y los conductos vasculares, que adquieren una tonalidad roja. Por último proporciona una buena tinción del componente celular del hueso como los osteoblastos y osteoclastos debido a uno de los componentes de la tinción, la hematoxilina férrica (208).

Valoración histológica:

Respuesta tisular frente a los gránulos implantados:

Para comparar la capacidad regeneradora de nuestros materiales y su bioreabsorbibilidad, se ha realizado el estudio teniendo como control dos materiales ampliamente utilizados en odontología y que presentan una reabsorción muy dispar. El BioOss®, al tratarse de una HA de origen bovino, es muy estable y es el menos reactivo de todos los materiales estudiados en este trabajo. El BioOss® presenta una topografía rugosa que favorece la unión de osteoblastos, su proliferación y la síntesis de matriz ósea sobre su superficie (210). En la valoración histológica se observa perfectamente la notable osteointegración de partículas de BioOss® en las trabéculas óseas neoformadas. Las trabéculas regeneradas adquieren una morfología característica debido a la forma artificial de este material, siendo irregulares, abruptas y con formas poligonales. La notable osteointegración de los gránulos de BioOss® en el hueso se debe a que es un material muy estable, un biomaterial basado en HA, y por tanto menos susceptible a sufrir los procesos de reabsorción. Este comportamiento se ha puesto de manifiesto en numerosos artículos (211), (212) donde se refleja el potente poder osteoconductor de BioOss®, sirviendo mayoritariamente como soporte y no como promotor de la neoformación ósea. Se trata de un material que se integra en el hueso regenerado pero que debido a su baja tasa de reabsorción, se mantiene durante largos periodos de tiempo (213, 214). Hay trabajos en donde no se

aprecian, o son limitados los fenómenos de biodegradación de BioOss® después de 15 meses, en casos de elevación del piso del seno alveolar, en defectos de tamaño crítico, y en bóveda craneal (215). En otro trabajo, Tamimi y cols. (81), implantaron gránulos de HA bovina y monetita en defectos óseos alveolares de pacientes humanos, después de 6 meses de estudio, se observaron numerosos gránulos remanentes de HA bovina, mientras que no se encontraron gránulos de monetita. Además, los estudios histológicos mostraban signos de reabsorción por macrófagos u osteoclastos en la superficie de los gránulos de monetita, mientras que los de HA bovina no presentaban estos signos. La monetita al tratarse de un biomaterial más reabsorbible, proporciona tanto la liberación de iones (Ca^{2+} y PO_4^{3-}) como el espacio suficiente para permitir la formación de nuevo hueso. Por contra, la HA bovina es prácticamente no reabsorbible *in vivo* y por lo tanto deja un espacio limitado para la formación ósea. Así, Orsini y cols. (216), pusieron de manifiesto la nula reabsorción de partículas de BioOss® aplicadas en la cirugía de elevación del seno maxilar en humanos, donde tanto a los 20 meses como a los 7 años de estudio, encontrando gránulos de BioOss® perfectamente osteointegrados. Las diferencias entre los dos tiempos de estudio era el tipo de hueso neoformado que rodeada a los gránulos integrados, siendo inmaduro a los 20 meses de estudio, mientras que a los 7 años de implantación, el hueso era de tipo laminar. Las partículas en ambos tiempos de estudio se encontraban en contacto directo con el hueso y sin ningún tipo de gap en la interfase hueso-partícula.

Los casos adversos del control BioOss®, descritos en el apartado de resultados, pueden atribuirse a posibles complicaciones en la cirugía, a la hora de realizar los defectos óseos, localizados en la tibia, zona descrita anteriormente como susceptible de provocar reacciones adversas al poder influir el contacto directo del material con el canal medular, y en húmero, localización anatómica con una gran vascularización asociada. Ambos factores han podido provocar que en las imágenes de TAC a las 4 semanas de estudio no existan zonas radiodensas, al haber desaparecido completamente los gránulos de BioOss®, que son altamente radiodensos. Además encontramos defectos óseos de grandes dimensiones, quizás debidos a procesos asociados de osteolisis.

Sin embargo, por otro lado, disponemos del material Cerasorb® utilizado también como control. El Cerasorb® está compuesto por β -TCP, completamente reabsorbible y cuya disolución, al ser β -TCP en fase pura, no presenta impurezas como HA o α -TCP que pudieran provocar cambios en la degradación y reabsorción del material (217). Esta composición, garantiza una respuesta celular adecuada (218) y su completa reabsorción *in vivo*, permitiendo la formación de hueso de forma simultánea a la reabsorción del material (219). En el estudio histológico de forma homogénea se han puesto de manifiesto procesos de regeneración ósea, aunque no se ha conseguido regenerar el defecto óseo por completo. En todos los casos, la imagen de TAC a partir de la 8ª semana de experimentación presenta una acusada pérdida de radiodensidad, mostrando únicamente la zona interior radiodensa, que se mantiene así hasta las 16 semanas de experimentación. Esta manifestación radiológica se traduce en el estudio histológico en que la zona exterior del defecto ha desarrollado tejido conectivo, altamente vascularizado, con escasos restos de material, en asociación con células multinucleadas. En relación a la formación de tejido óseo, encontramos procesos de regeneración avanzada, formándose hueso cortical inmaduro con abundantes cavidades vasculares, en transición con hueso trabecular, con trabéculas regeneradas gruesas,

desorganizadas y anastomosadas. Algunas partículas de Cerasorb® se encuentran osteointegradas en las trabéculas óseas neoformadas. La causa de que no se haya conseguido la completa regeneración del defecto óseo podría ser atribuida a la pérdida del material en la zona superficial del defecto, tal y como se pone de manifiesto radiológicamente ya a la 8ª semana, a diferencia de la manifestación radiológica del control BioOss® que se mantiene fuertemente radiodensa durante todo el ensayo. Además el Cerasorb® es un biomaterial altamente radiopaco, y debido a su alto contraste en radiografías, se puede seguir perfectamente la dinámica del proceso de la regeneración ósea (220).

Cabe indicar que sólo uno de los casos, el 4, del control con implantación de Cerasorb® muestra una respuesta tisular dispar, formando tejido conectivo en la zona interna del defecto con abundantes restos de material. Esto es debido a la localización anatómica del defecto realizado en la tibia. La tibia presenta escaso hueso trabecular, por lo que al realizar el defecto se ha alcanzado el canal medular, alterándose así la respuesta celular.

Ambos controles son materiales utilizados clínicamente como relleno y reconstrucción de defectos óseos principalmente en cirugía oral y maxilofacial, como se ha comentado anteriormente. El uso de estos controles nos permite evaluar y comparar la respuesta tisular de nuestros materiales a estudio frente a estos controles que presentan diferentes grados de reabsorción, siendo más similares el comportamiento de los materiales estudiados en este trabajo a los gránulos de Cerasorb®, ya que son más reabsorbibles que el BioOss®.

El tercer control empleado en este estudio consiste en dejar el defecto óseo vacío, sin implantar ningún biomaterial granulado, para poder confirmar que las dimensiones del defecto creado (13x8mm) presenta propiedades de defecto óseo crítico (200), y por lo tanto no sufre procesos de regeneración espontánea. Tras el estudio histológico del control vacío se ha confirmado que en ninguno de los casos se ha producido la regeneración del defecto y únicamente se ha desarrollado tejido adiposo. En algunos casos se ha apreciado una neoformación ósea en la zona superficial del defecto, desde la superficie perióstica, cerrando la cavidad; se trataría por tanto, posiblemente de un proceso de osificación perióstica.

Los mecanismos que llevan a la inducción de la formación ósea mediante el uso de materiales sintéticos son complejos, ya que puede deberse a múltiples factores como: procesos de disolución/ precipitación, la porosidad, la química, el área superficial específica, la topografía superficial y/o la geometría.

Biocerámicas de monetita preparadas a partir del proceso de autoclavado de cementos de brushita, han mostrado la estimulación del aumento vertical óseo y la regeneración de defectos óseos en conejos (78, 221) al igual que en humanos (81). En los últimos años se han publicado diversos trabajos realizados *in vivo* donde se ponen de manifiesto las propiedades osteoconductoras y osteoinductoras de la monetita, además de su capacidad de ser reabsorbida por el animal implantado (78, 169, 222).

Seguidamente se discutirán los resultados experimentales de cada grupo de materiales, obtenidos tras la valoración histológica de la respuesta tisular producida frente a los gránulos estudiados en este trabajo.

GRUPO I:

Los materiales que conforman el grupo I se pueden subdividir en dos grupos atendiendo a la cantidad de β -TCP que presentan en su composición. Así, agrupamos por un lado los materiales *A*, *B*, *C* y *D*, y por otro a los *E* y *F*. Es preciso recordar que tanto en la valoración de las imágenes de TAC como radiológicas, las respuestas eran similares en todos los materiales del grupo I, pero en relación a la evaluación histológica se encontraron ligeras diferencias. En los materiales *A*, *B*, *C* y *D* se encontraron las partículas de material, asociadas a una respuesta celular, constituida fundamentalmente por macrófagos y células multinucleadas. En ocasiones se observaron procesos de fagocitosis de material como atestiguan la presencia de restos de éste dentro del citoplasma de estas células.

El otro subgrupo compuesto por los materiales *E* y *F*, presenta un mayor contenido en β -TCP, a expensas de un descenso en la concentración de monetita. Como es sabido, la monetita presenta un mayor grado de solubilidad que el β -TCP (98), y puede que debido a esto, en los materiales *E* y *F*, detectemos restos de material de mayor tamaño. Esto conlleva a que la respuesta tisular encontrada presente además de macrófagos y células multinucleadas, células plasmáticas. De hecho, hay que destacar que en caso del material *F* se han encontrado fenómenos más marcados que en *E*, pudiendo influir el hecho de que *F* presenta en su composición una mayor cantidad de β -TCP.

Los procesos de biodegradación de los compuestos de fosfato de calcio se pueden dividir en dos procesos: primero, una disolución fisicoquímica que depende de la solubilidad del material, y el segundo consiste en la desintegración en pequeñas partículas, en donde según sea su diámetro puede inducir una respuesta por parte de los macrófagos o inducir una respuesta inflamatoria (217). La ausencia de osteoconductividad del β -TCP en estos casos, se puede deber a que el tamaño de partícula del β -TCP fuese demasiado pequeño, y al estar en mayor concentración hace que los materiales tengan una cohesión menor, provocando este comportamiento.

La reabsorción de los materiales de fosfato de calcio *in vivo* se realiza mediante la combinación de mecanismos de disolución pasiva, que libera iones, y reabsorción mediada por células (223).

En el trabajo de Xu y cols. (204) se comparan materiales porosos de silicato de calcio, como la ps-wollastonita y el β -TCP, poniendo de manifiesto que la capacidad de formación ósea, a lo largo de 16 semanas de estudio, en la reconstrucción de defectos óseos en bóveda craneal de conejos, es mayor para compuestos como la ps-wollastonita que para el β -TCP. Del mismo modo, también es mayor el grado de reabsorción de la ps-wollastonita, encontrando una menor cantidad de material remanente de ps-wollastonita que de β -TCP, a las 16 semanas. Se ha comprobado que esta reabsorción está mediada, además de por procesos químicos de disolución, por células gigantes multinucleadas, que se han detectado

sobre la superficie de materiales con silicio. Además la ps-wollastonita es capaz de regenerar hueso no solo a partir de los laterales óseos sino también de la parte central, debido a su capacidad bioactiva y osteoinductiva, al liberar iones calcio y silicio, y formar una capa de HA sobre su superficie, la cual favorece la formación ósea sobre esta capa, al favorecer la proliferación de osteoblastos.

Otra consideración en relación a las diferencias entre los subgrupos del grupo I es que los materiales *B*, *C* y *D* han formado tejido conectivo mayoritariamente de tipo denso, siendo esto un índice de que la reabsorción del material ha sido rápida, y ha evolucionado más el tejido conectivo, formando fibras colágenas organizadas. En el caso de los materiales *E* y *F*, al presentar más restos de material y de mayor tamaño asociados a la respuesta celular inflamatoria, el desarrollo del tejido conectivo de tipo denso no ha tenido lugar.

En el grupo I se han encontrado reacciones biológicas adversas graves, ya que en alguno de los casos de todos los materiales, menos en *D* y *F*, se han producido procesos de necrosis tisular. La ausencia de procesos de necrosis en los materiales *D* y *F* es signo de diferente evolución de los procesos inflamatorios, llegando a ser más acusados en el resto de materiales, que puede provocar fenómenos necróticos.

Tal y cómo se indicó en el apartado de resultados, es preciso comentar la respuesta encontrada en algunos de los casos de dos de los materiales del grupo I, concretamente los casos 1, 7 y 9 del material *A*, y casos 2 y 4 del material *B*. En estos casos se han producido fenómenos de regeneración ósea, sin llegar a rellenar la totalidad del defecto, ya que en la zona superficial encontramos tejido conectivo, también detectable en los espacios medulares. En el tejido conectivo siempre se encuentran numerosos macrófagos y células multinucleadas asociados a restos de material de pequeño tamaño. El desarrollo de esta respuesta diferente a la que presenta el resto de los casos de los mismos materiales y en definitiva, de los demás materiales del grupo I, hace pensar que puedan haber influido factores biológicos intrínsecos de la oveja en la que se realizaron los defectos óseos. En el caso del material *B* coincide que todos los casos se han realizado en dos ovejas distintas, de forma que los casos 2 y 4 se han realizado en la misma oveja. Dos de los restantes casos realizados en esta misma oveja, junto con los casos 2 y 4 del material *B*, son defectos realizados como controles vacíos, en cuyos casos la zona superficial del defecto se encuentra cerrada por la formación de un puente óseo. Esto lleva a pensar que factores propios de esta oveja, hayan favorecido la formación ósea frente a la aparición de fenómenos adversos.

GRUPO II:

A este grupo pertenecen aquellos materiales que presentan en su composición un vidrio bioactivo, monetita y gel de sílice; además de ps-wollastonita y combinaciones con diferentes fosfatos de calcio, como la CDHA o el β -TCP.

Salvo por el contenido de vidrio, los materiales del grupo I y II difieren muy poco en relación a su composición química. De tal forma que también se pueden hacer subdivisiones dentro del grupo II atendiendo a la presencia de CDHA (materiales *G*, *H* e *I*) o β -TCP (materiales *J* y *K*) en su composición final. Los materiales *J* y *K* tienen concentraciones de

β -TCP similares a las del material *F* del grupo I (35% en peso).

A diferencia del comportamiento de los materiales del grupo I, en el grupo II los restos de material son escasos; únicamente se han encontrado restos de material asociados a células multinucleadas en algunos de los casos del material *J*. Sorprende la inexistencia de restos en el material *K*, aunque su contenido de β -TCP es elevado. Tal y como se comentó anteriormente en relación al grupo I, la presencia de restos de material en el material *J* puede ser debido a su elevado contenido en β -TCP, el cual presenta un grado de solubilidad menor (98), que el del resto de sus componentes, provocando su permanencia hasta las 16 semanas de experimentación y su asociación a células multinucleadas. Este comportamiento también se observó en el trabajo de Frayssinet y cols. (224), donde se implantaron cilindros de β -TCP en fémures de ovejas durante 1, 2, 4 y 9 meses. No se encontró una gran reabsorción del material y la degradación de los implantes de β -TCP se realizó mediante dos procesos: disolución, debido a la naturaleza y superficie del material, y biodegradación, mediante la actividad de células multinucleadas.

Las manifestaciones tanto de las imágenes de TAC como las radiológicas del grupo II son idénticas a las que presentan los materiales del grupo I, de forma que en los TAC a partir de la 8ª semana de estudio, el defecto era totalmente radiotransparente o bien se apreciaba una progresiva pérdida de radiodensidad hasta únicamente presentar un pequeño punto radiodenso en el centro de la cavidad a las 16 semanas, detectable también en las radiografías.

La respuesta tisular predominante frente a la implantación de los materiales del grupo II es la de la formación de tejido conectivo de tipo denso, sobre todo, y con un gran componente inflamatorio, con predominio de leucocitos y macrófagos, éstos últimos muy abundantes en los materiales *G*, *H* e *I*, estos materiales son los que presentan un mayor grado de reabsorción debido a que en su composición química encontramos monetita y elevados valores de gel de sílice. Esta respuesta coincide con los materiales análogos del grupo I, materiales *A*, *B*, *D* y sobre todo el *C*, que presentaba además pequeñas cantidades de CDHA en su composición. El material *G* es el que difiere un poco en relación a la composición ya que presenta un elevado contenido en monetita y menor cantidad de gel de sílice. En relación a la respuesta biológica provocada en todos los casos del material *G* cabe destacar que se han producido procesos inflamatorios de tipo crónico, debido a la presencia de un elevado infiltrado perivascular de células plasmáticas.

Además los grupos I y II muestran en común respuestas tisulares como el desarrollo de granulomas y una notable vascularización del tejido conectivo formado.

En relación a los dos casos en los que se han encontrado procesos de osteogénesis, casos 4 (*J*) y caso 1 (*K*), ambos se han realizado en la misma oveja, junto con el caso 3 del control Cerasorb®, que también muestra signos de regeneración ósea y osteointegración de material; sin embargo en relación a los otros 3 defectos óseos restantes, realizados en esa misma oveja, no presentan esta evolución, sino que han desarrollado una respuesta tisular distinta, ya que se ha formado tejido conectivo. Por lo que no es de esperar que factores debidos al animal de experimentación puedan haber influido en el desarrollo de esta

respuesta. Además, las localizaciones anatómicas, en el caso 1(*K*) y 3 (Cerasorb®) coinciden, ambos han sido realizados en tibias, mientras que el caso 4 (*J*), fue realizado en el fémur, por tanto no podemos establecer una relación en función del lugar anatómico donde se realizaron los defectos óseos.

GRUPO III:

Dentro de este grupo encontramos aquellos materiales que presentan elevados contenidos de monetita, con o sin sustitución iónica parcial de Zn^{2+} , un contenido fijo de gel de sílice (7% en peso) y concentraciones variables de CDHA (15% ó 30% en peso). El material más simple, en relación a su composición, es el *L*, y es el único que presenta una respuesta tisular desfavorable, no habiendo regenerando el defecto óseo, sino que se ha formado tejido conectivo fibrovascular y con escasos restos de material asociados a macrófagos y células multinucleadas. Lo curioso, es que a diferencia de los materiales de otros grupos, que presentaban también desarrollo de tejido conectivo, no se han encontrado procesos inflamatorios extensos, sino que se manifiestan en forma de pequeños y escasos focos de células inflamatorias. Esta escasa respuesta celular puede deberse a que el material *L*, al estar formado mayoritariamente por monetita, esta se ha reabsorbido rápidamente de tal forma que no ha proporcionado un medio adecuado para desarrollar la osteoconducción, no permitido el crecimiento óseo. Además, debido al bajo contenido de gel de sílice presente, no ha provocado una respuesta inflamatoria marcada, tal y como ocurría en los materiales de los grupos anteriormente descritos. El resto de materiales del grupo III no presentan procesos inflamatorios hecho que podría atribuirse a que la CDHA disminuye el proceso de reabsorción del material y, al ser similar a la HA biológica, es biocompatible. Además podemos reseñar que el contenido de gel de sílice en estos materiales es escaso, no pudiendo promover respuestas adversas de los tejidos.

El análisis de las imágenes de TAC y radiológicas de los materiales del grupo III, a excepción del *L*, muestra manifestaciones distintas en comparación con lo comentado sobre los grupos anteriores; en el grupo III la cavidad del defecto presenta una fuerte radiodensidad, mayor que la del hueso adyacente y en continuidad con este, bien ocupando todo el defecto o todo menos la zona superficial, donde se distinguía una zona radiolúcida.

Estas características radiológicas diferentes se deben a que los materiales pertenecientes al grupo III (*M*, *N*, *Ñ* y *O*), han promovido la regeneración ósea del defecto. La respuesta tisular encontrada frente a la implantación de estos materiales está caracterizada por procesos de osteogénesis y neoformación de hueso trabecular, con una notable actividad osteosintética y restos de material osteointegrados. Hay que reseñar que en ninguno de los casos la regeneración del defecto es completa en el periodo evaluado, ya que no se consigue restituir el hueso cortical y en algunos casos en la zona superficial, existe tejido conectivo vascularizado.

Estas respuestas tisulares ponen de manifiesto que la combinación de diferentes fosfatos de calcio, como son la monetita y la CDHA, al presentar distintos grados de solubilidad, permiten un equilibrio entre los procesos de disolución y bioreabsorción, mediada por células, de forma que proporcionan el soporte y el espacio suficiente que

permite el crecimiento óseo.

GRUPO IV:

Este grupo está formado por los materiales *P* y *Q* que presentan una reducida concentración de monetita, a favor de mayores cantidades de CDHA, que son superiores, en el caso *Q*, a las de los materiales del grupo III. También están compuestos por ps-wollastonita y un elevado contenido en gel de sílice, similar a los grupos I y II.

La respuesta tisular encontrada frente a la implantación de estos materiales es la regeneración ósea, con neoformación de hueso trabecular con abundantes restos de material osteointegrados. Sin embargo, los espacios medulares están ocupados por una gran cantidad de macrófagos y células multinucleadas junto con numerosos restos de material. A pesar del bajo contenido en monetita, éste se ve compensado con elevadas concentraciones de CDHA, siendo quizás, este equilibrio entre ambos fosfatos de calcio el que haya permitido la regeneración del defecto óseo. La gran respuesta celular de cuerpo extraño desarrollada hace pensar en que los compuestos de silicio como son el gel de sílice y la ps-wollastonita, sean los responsables de la reacción celular. De hecho, en todos los grupos, excepto el III que no presenta ps-wollastonita en su composición y la cantidad de gel de sílice es mínima y constante (7% en peso), se han encontrado grandes reacciones celulares. Este factor común hace que señalemos a estos compuestos como una posible causa de reacciones tisulares desfavorables.

Una vez discutida la reacción histológica de los diferentes grupos pasamos a relacionar el comportamiento de los distintos grupos entre sí, haciendo constar la limitación que supone la escasez o ausencia de fuentes previas en la bibliografía.

En nuestro trabajo, la aplicación de compuestos basados en silicio con propiedades bioactivas busca favorecer una unión más rápida entre el hueso y los materiales implantados, asegurando la osteointegración del material y reduciendo el riesgo de que falle el implante (225). Sin embargo, la presencia de silicio, presente en la ps-wollastonita, en el vidrio y/o en el gel de sílice, ha desencadenado respuestas desfavorables, apreciables en aquellos grupos en los que se encontraban en mayor concentración, como son los grupos I, II y IV.

En relación a las sustituciones iónicas parciales del calcio de la monetita por Mg^{2+} o Zn^{2+} , no se han encontrado referencias bibliográficas relacionadas con las que comparar nuestros resultados, y debido a que en la evaluación histológica, no hemos podido determinar diferencias en función de una posible influencia de estas sustituciones iónicas, no podemos concluir que hayan tenido algún efecto en relación a la modificación de su biodegradabilidad ni a la capacidad osteoconductora ni osteogénica.

La elevada solubilidad de la mayoría de los materiales estudiados en este trabajo, reduce la habilidad regeneradora del hueso local mediante tres vías: por una persistencia insuficiente del soporte osteoconductor que permita la aposición del hueso, desestabilización de la aposición del hueso temprano debido a la desintegración del soporte, y la estimulación de una respuesta inflamatoria debida a elevados niveles de productos de degradación (226).

Los procesos de bioreabsorción, mediada por la actividad celular, dependen del tamaño de partícula, de su composición y de la porosidad del material. Si el grado de reabsorción es elevado, aunque los materiales de fosfato de calcio sean osteoconductores, al reabsorberse rápidamente no es posible la unión de las células a su superficie, provocando una infiltración linfoide, que conlleva a resultados insatisfactorios, relacionados con procesos inflamatorios (227).

Estas respuestas biológicas son las que encontramos en los materiales de los grupos I y II, que presentan la combinación de la monetita con otro fosfato de calcio, el β -TCP. Entre ambos fosfatos de calcio existe diferente grado de solubilidad, aunque con menor diferencia que la que existe entre la monetita y CDHA, ya que el β -TCP es más soluble que la CDHA, y por lo tanto este sistema se reabsorbe antes que la combinación presente en el grupo III. Como el β -TCP es menos reabsorbible que la monetita, a las 16 semanas de estudio aún encontramos restos de material en estos grupos. Debido al grado de reabsorción y al tamaño de partícula pequeño, el β -TCP ha podido desencadenar las respuestas adversas encontradas en los grupos I y II, en donde la tendencia general es la formación de tejido conectivo por todo el defecto óseo, sin provocar procesos de osteosíntesis. Estos factores pueden, por tanto, inducir una respuesta inflamatoria que puede desencadenar la formación de tejido cicatricial provocando una escasa formación ósea (228).

En el trabajo de Nery y cols. (229) se estudió la respuesta tisular frente a cerámicas de fosfatos de calcio bifásicas implantadas en defectos óseos periodontales en perros durante 6 meses, y el estudio histológico reveló que según se aumentaba la proporción de β -TCP, llegando incluso hasta el 100% de composición de β -TCP, se formaba tejido conectivo. En combinaciones de HA y β -TCP se conseguía la unión de células, revascularización y osteogénesis, mientras que esto no ocurría en los casos con 100% de β -TCP. Esto era debido a que la disolución de la cerámica era tal que no permanecía en el tejido el tiempo suficiente como para permitir la unión de células y la revascularización, es decir no presentaba propiedades osteoconductoras apropiadas. Además presentaban procesos de reabsorción mediada por células multinucleadas.

Por otro lado, Frayssinet y cols. (230) estudiaron la capacidad de osteointegración de un fosfato de calcio bifásico (75% HA-25% β -TCP) en forma de cilindros implantados en defectos realizados en cóndilos de ovejas. A los 60 días de estudio los defectos presentaban tejido conectivo y macrófagos fagocitando los cristales de fosfato de calcio. Estas cerámicas se probaron también en combinación con un cemento de brushita, no presentando estas respuestas, sino promoviendo la formación ósea.

El grado de reabsorción debe de ser idealmente el mismo que el grado de formación de nuevo hueso, con el fin de conseguir una reparación estable, constante y un defecto óseo completamente reparado sin restos de material sintético. Se produce una mayor reabsorción del material en zonas donde no se ha formado o se ha formado poco hueso (222). Este fenómeno origina que al reabsorberse más rápido el material, no ejerce su función de soporte para permitir el crecimiento óseo, y por lo tanto conlleva a un desequilibrio, que se inclinará hacia una mayor reabsorción y desencadenará respuestas indeseables, como la formación de

tejido conectivo en vez de tejido óseo. Aunque la necesidad de tener una superficie reactiva es obvia también lo es que sea lo suficientemente estable para facilitar el crecimiento óseo.

El comportamiento encontrado en la mayoría de los casos en los que el defecto se ha regenerado, en los grupos III y IV, es que la zona superior del defecto no se ha regenerado, sino que se encuentra ocupada por tejido conectivo. Esta respuesta tisular, concuerda con la expuesta en el trabajo de Cacchioli y cols. (231) donde a las 6 semanas de producirse un defecto óseo de tamaño crítico la regeneración es parcial, desarrollándose tejido óseo primario, tejido fibroso y granulomatoso. La formación de hueso se produce desde las superficies del endostio y del periostio más que desde los márgenes del defecto óseo. De hecho en la zona más interna del defecto óseo encuentra el predominio de la proliferación ósea endóstica, mientras que en la zona más superficial del defecto predomina la formación de tejido fibroso altamente vascularizado originado desde la capa del periostio. De hecho la formación de tejido conectivo puede originarse desde la superficie perióstica y penetrar dentro del defecto óseo (200). Además, la aparición de tejido conectivo se debe a que éste se regenera más rápido que el hueso ya que el tejido conectivo presenta una mayor plasticidad.

La aparición de células multinucleadas está relacionada con la química superficial de biomaterial y la adsorción de proteínas que ocurre sobre la superficie del material antes de la adhesión celular. En relación a estas proteínas, influye tanto su conformación como su composición a la hora de proporcionar ligando o señales que provoquen la unión de monocitos o macrófagos a su superficie, o la unión de macrófagos entre ellos formando células gigantes multinucleadas (232).

En el trabajo de Vogel y cols. (233) se estudia la respuesta tisular frente al material Bioglass® implantado con diferentes grados de solubilidad y expone que el número de células multinucleadas está relacionado tanto con el tiempo de implantación del material como de la solubilidad de éste. De forma que a mayor solubilidad del material mayor es el número de células multinucleadas. Las células gigantes multinucleadas se desarrollan tanto en superficies formadas por Ca y P como aquellas que presentan Si, mientras que los osteoclastos únicamente se encuentran sobre superficies formadas por Ca y P. Además de la composición química, también influye el tamaño de la partícula. De esta forma los osteoclastos reabsorben partículas pequeñas, de tamaño similar a los cristales de HA ósea, mientras que las células gigantes se pueden encontrar sobre superficies de partículas de mayor tamaño, no reabsorbibles por los osteoclastos. Así se pone de manifiesto la influencia del tamaño de partícula frente a la reacción celular de los macrófagos.

En relación a los casos adversos encontrados en la evaluación de los diferentes materiales, pensamos que estas respuestas en algunos de los casos podrían deberse a la localización anatómica ósea donde se ha realizado la implantación del material, ya que defectos realizados en tibias y húmeros han sido más susceptibles de presentar respuestas desfavorables, debido a que en la tibia el hueso trabecular es escaso, el defecto óseo puede alcanzar el canal medular, alterando por tanto la respuesta celular. En cuanto al húmero, se trata de una zona altamente vascularizada, fenómeno que también puede influir en la respuesta biológica. Otra de las causas que pueden desencadenar estas respuestas desfavorables, podrían ser variaciones en la precisión quirúrgica o complicaciones asociadas

a la cirugía, sin descartar también la posible influencia de factores intrínsecos del animal de experimentación en particular, que hacen que los defectos evolucionen hacia respuestas biológicas indeseables, incluso en casos donde se implantaron materiales control como el BioOss®, que debería presentar una respuesta favorable.

Una vez analizada la respuesta *in vivo* de los biomateriales basados en monetita estudiados en este trabajo mediante la evaluación histológica de los distintos grupos, se ha observado que el grupo III es el que presenta las respuestas más favorables, promoviendo la regeneración ósea del defecto. El grupo III, sin tener en cuenta el material *L* el cual ha presentado una respuesta opuesta al resto de materiales integrantes del grupo, está formado por materiales en cuya composición presentan la combinación de dos fosfatos de calcio diferentes, la monetita y la CDHA. La principal diferencia entre ambos fosfatos de calcio está en relación con su solubilidad (187), siendo más soluble la monetita que la CDHA. Esta combinación ha llevado a que estos biomateriales presenten adecuadas propiedades osteoconductoras, permitiendo que el ritmo de disolución sea tal, que permita un equilibrio entre la disolución del material dentro del defecto y la formación de nuevo hueso, al rellenar los espacios que van quedando vacíos dejando al degradarse el material. Ambos compuestos son biocompatibles y presentan propiedades osteoconductoras y osteogénicas. La monetita es un material biocompatible, como demuestran los estudios *in vitro* (80), al no desencadenar ni respuestas inflamatorias ni formación de tejido conectivo, y biodegradable, ya que se han detectado marcas de reabsorción sobre su superficie (78). La CDHA presenta una composición muy similar a la HA biológica, provocando una respuesta tisular favorable en respuesta a la implantación de los materiales *M*, *N*, *Ñ* y *O* (grupo III).

La solubilidad de los materiales, conlleva a que al disolverse estos se produce un intercambio de iones que junto con la reactividad superficial, hace que se vaya degradando el material. La solubilidad del material depende de la composición del material, del medio en contacto con él y del lugar de implantación (98). Se cree que a mayor área específica superficial los compuestos proporcionan una mejor respuesta biológica de los fosfatos de calcio (52). El área superficial específica, que depende de las características de la superficie y del tamaño partícula, en los gránulos de BioOss® es de $60\text{m}^2/\text{g}$ (234), ya que contiene hueso trabecular con una superficie rugosa, y la de los gránulos de monetita evaluados en este trabajo es de media en el grupo I, materiales *A*, *B*, *C* y *D* $100\text{m}^2/\text{g}$ y materiales *E* y *F* $50\text{m}^2/\text{g}$, en el grupo II $80\text{m}^2/\text{g}$, en el grupo III $55\text{m}^2/\text{g}$ y en el grupo IV $100\text{m}^2/\text{g}$; presentando valores superiores aquellos grupos con un contenido de gel de sílice mayor.

En materiales del grupo III las respuestas adversas encontradas son leves y escasas, encontrando pocos y pequeños focos inflamatorios. Los escasos restos presentes aún a las 16 semanas de experimentación, se encuentran osteointegrados formando parte del componente óseo de las trabéculas neoformadas, o asociados a procesos de biodegradación mediada por macrófagos y procesos de fagocitosis, y/o por células multinucleadas, que los rodean y delimitan, aislándolos del tejido adyacente.

Con las técnicas utilizadas en este estudio y en este modelo animal, no nos ha sido posible determinar si presentar una mayor concentración de CDHA, como en el caso de los materiales *Ñ* y *O*, o menor, en materiales *M* y *N*, potencia la capacidad osteosintética, ya que

todos los materiales presentan una respuesta tisular favorable, con procesos de regeneración ósea, y similar en todos ellos.

Además de conseguir una adecuada combinación entre dos fosfatos de calcio con diferente grado de solubilidad, consideramos que presentar además una concentración baja y fija de gel de sílice, hace que se liberen menos iones al medio al implantar los materiales, lo cual evita las respuestas indeseables debidas a la gran reactividad asociada al gel de sílice.

En el caso de los materiales del grupo IV, aunque también presentan la combinación de fosfatos de calcio (monetita y CDHA), estos se encuentran en menor concentración que en los materiales del grupo III, ya que la proporción de gel de sílice es mayor y presentan ps-wollastonita. Además, la respuesta tisular del grupo IV es más heterogénea que la que hemos encontrado en el grupo III, ya que el grupo IV presenta tanto procesos de osteogénesis como formación de tejido conectivo. El elevado número de macrófagos y células multinucleadas asociados a restos de material y ocupando la totalidad del espacio medular, ha provocado que los procesos de osteogénesis hayan sido menores, formando hueso con trabéculas neoformadas delgadas, al no encontrar espacio suficiente para su crecimiento debido a los restos de material y elementos tisulares presentes. Esto hace que se descarten estos materiales como buenos candidatos a la hora de aplicarlos en procesos de regeneración ósea.

La presencia en mayor concentración de compuestos de silicio, como son el gel de sílice y la ps-wollastonita, hace pensar que es la liberación de estos iones, de forma demasiado rápida debido a la alta reactividad del gel de sílice, los que provocan que se desencadenen respuestas adversas en este grupo. Al no desarrollar respuestas inflamatorias hace pensar que el severo infiltrado de células multinucleadas está relacionado con la composición del material remanente, que es probable que sea CDHA, al ser menos soluble que la monetita, al no haber sido reabsorbida por completo después de 16 semanas de experimentación. Hay que reseñar que aunque el grupo III también presenta en su composición CDHA, esta gran infiltración de células multinucleadas no se ha desarrollado.

En relación al estudio histológico de los controles, el caso del control vacío confirma que las dimensiones de la cavidad ósea realizada pueden considerarse de tamaño crítico (200, 201) , ya que no se ha producido una regeneración espontánea del defecto. Por otro lado los materiales considerados como controles que inducen la regeneración ósea, se aprecian distintos patrones de formación ósea. En el caso de la implantación de los gránulos de Bio-Oss® observamos que el defecto queda relleno prácticamente por completo, alcanzado incluso la zona superficial. El hueso regenerado es muy diferente al hueso normal, presentando trabéculas finas con gran presencia de material osteointegrado, adquiriendo una morfología característica del Bio-Oss®, con bordes afilados y aciculares (235). Sin embargo, en el caso de implantación de gránulos de Cerasorb®, la regeneración que se consigue no es total, ya que en la mayoría de los casos la zona externa se encuentra ocupada por la formación de tejido conectivo. El hueso regenerado presenta una morfología normal, con gruesas trabéculas anastomosadas y con cierta osteointegración de material, aunque es menos pronunciada que la que presenta el Bio-Oss®.

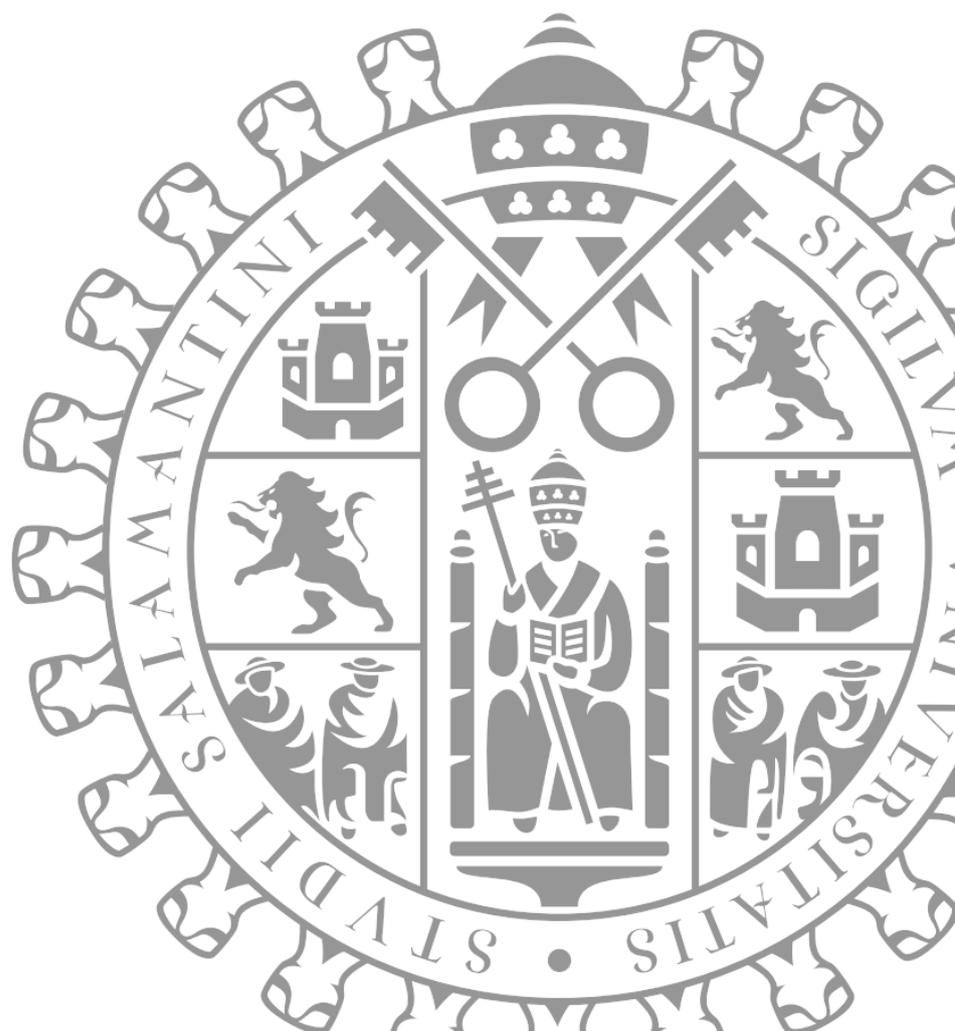
Por lo que, en definitiva, en relación a la regeneración ósea de los controles, encontramos comportamientos opuestos, ya en aquellos casos donde se ha empleado el material Bio-Oss®, se consigue un relleno casi completo del defecto y no se desarrolla tejido conectivo; aunque existe gran cantidad de material remanente, osteointegrado, que aún no se ha reabsorbido. Por otro lado, el Cerasorb® no regenera por completo la cavidad del defecto, desarrollando tejido conectivo en la zona superficial, pero sin embargo, las trabéculas óseas regeneradas son más gruesas, la actividad osteogénica ha sido mayor, en comparación con el Bio-Oss® y la osteointegración de material es mucho menor, predominando la osteogénesis.

Una de las ventajas que presentan los materiales estudiados en este trabajo, en concreto los pertenecientes al grupo III, a excepción del material *L*, en relación al control BioOss® es, que este último está considerado como un material no reabsorbible ya que necesita varios años (3-6 años) de implantación para que se reabsorban debido a la actividad osteoclástica (236). La presencia de gránulos no reabsorbibles dentro del hueso neoformado es indeseable porque interfiere con el crecimiento del nuevo hueso, con el proceso de remodelación ósea y compromete las propiedades del tejido resultante, afectando a su capacidad de osteointegración en la implantación dental (237).

Por otra parte Tamimi y cols. (71) compararon el comportamiento de gránulos compuestos por una combinación de brushita y β -TCP, con gránulos de BioOss® implantados en cilindros de titanio en defectos óseos realizados en bóveda craneal de conejos. Dado que la brushita- β -TCP combina dos materiales con diferente solubilidad, al igual que se ha hecho en los materiales de esta tesis. El material resultante presentó mayor reabsorción *in vivo* y un aumento de la neoformación ósea de estos materiales en comparación con BioOss®. En otro trabajo también se compararon gránulos de monetita con gránulos de HA bovina, siendo los de monetita más porosos, con mayor área superficial específica y mayor porosidad, poniendo de manifiesto su capacidad de reabsorberse y presentar propiedades osteoconductoras y osteoinductoras (81). Además se ha demostrado que bloques tridimensionales de monetita presentan valores similares a los que presentan los injertos de hueso autólogo en formación de hueso vertical (221).

La selección del biomaterial óptimo de entre todos los estudiados en este trabajo, incluiría los pertenecientes al grupo III (*M*, *N*, \tilde{N} y *O*), ya que su evaluación histológica demuestra una gran capacidad de regeneración ósea en ausencia de procesos de toxicidad local, inflamación aguda o crónica, reacciones de cuerpo extraño y/o procesos de necrosis tisular. Se puede concluir que los biomateriales compuestos por monetita, CDHA y gel de sílice en las proporciones de los materiales *M*, *N*, \tilde{N} y *O*, son biocompatibles, biodegradables, osteoconductores, osteogénicos y osteoinductores, y por lo tanto pueden proponerse como candidatos prometedores en la práctica clínica.

CONCLUSIONES



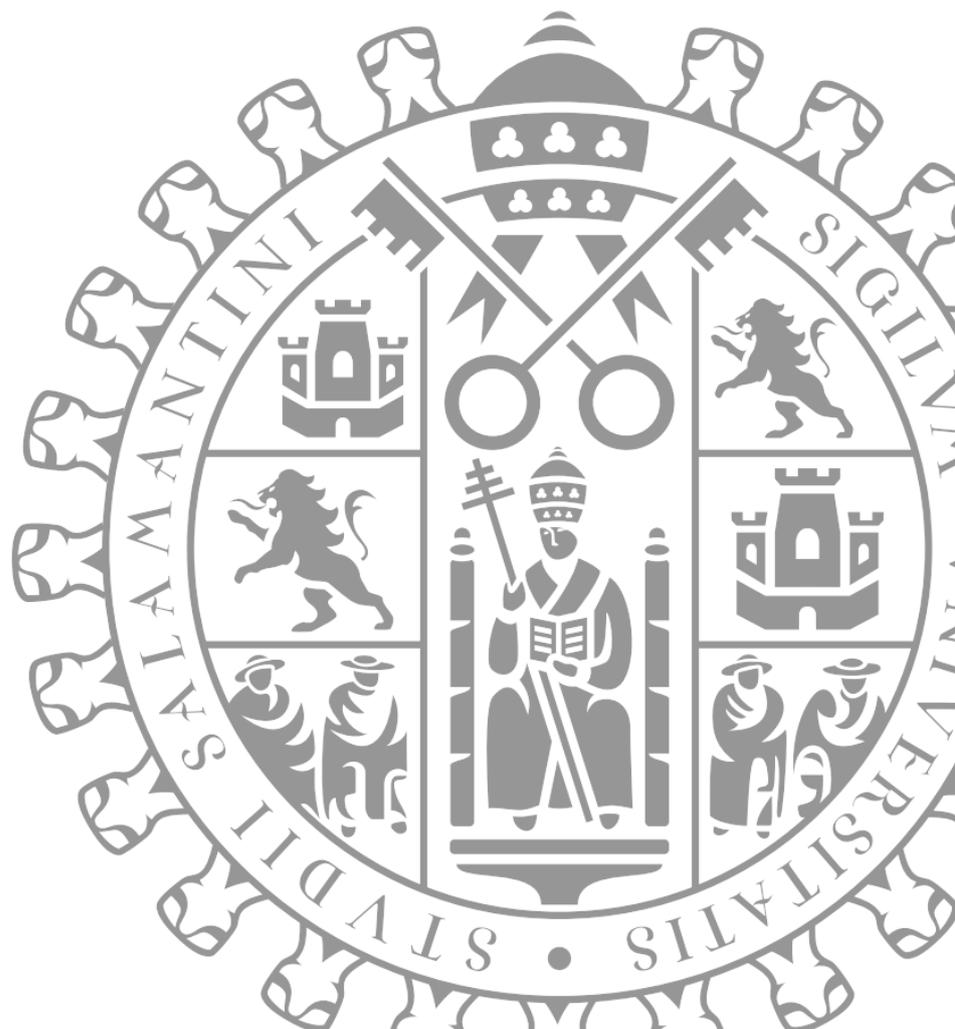
Vii.~ CONCLUSIONES:

- I.** Se ha conseguido un material que cumple los requisitos planteados inicialmente: Ser biocompatible, no provocando efectos adversos como procesos inflamatorios, fibrosos o necrosis tisular. Ser osteogénico, osteoinductor, osteoconductor, osteointegrable y reabsorbible, permitiendo un equilibrio entre los procesos de formación ósea y reabsorción del biomaterial.

Estas propiedades las presentan los materiales *M*, *N*, *Ñ* y *O*, pertenecientes al grupo III, cuya composición es: monetita (de 63 a 78% en peso), CDHA (de 15 a 30% en peso) y gel de sílice (7% en peso).

- II.** La monetita es un derivado de fosfato de calcio adecuado como material de regeneración ósea.
- III.** El aumento relativo de gel de sílice, resultante del proceso de síntesis en algunos materiales, incrementa notablemente la velocidad de reabsorción del biomaterial, que desaparece precozmente y provoca reacciones tisulares desfavorables.
- IV.** La incorporación de β -TCP, menos reabsorbible que la monetita, disminuyó ligeramente la capacidad de reabsorción del biomaterial, pero provocó el desarrollo de tejido conectivo fibrovascular, reacciones de cuerpo extraño y respuestas inflamatorias. Disminuyendo así la capacidad osteoconductora e impidiendo el crecimiento óseo.
- V.** Los materiales a los que se añadió CDHA presentaron una velocidad de reabsorción adecuada, lográndose un equilibrio entre el proceso de formación y mineralización ósea y la reabsorción del material. Además de observarse angiogénesis y una buena osteointegración del material remanente.
- VI.** En aquellos materiales que presentaban sustituciones iónicas parciales del calcio en la monetita por Zn^{2+} o Mg^{2+} , no ha sido posible objetivar una potenciación de la osteoconducción y/u osteoinducción de estos materiales.

ABREVIATURAS



Viii.~ ABREVIATURAS:

1, 25-(OH)₂ D: Vitamina D biológicamente activa.

ACP: Fosfato de calcio amorfo.

BCP: Fosfato de calcio bifásico.

BMP: Proteína morfogenética ósea.

Ca²⁺: Calcio.

CDA: Apatita deficiente en calcio.

CDHA: Hidroxiapatita deficiente en calcio.

CFU-F: Unidades formadoras de colonias fibroblásticas.

CMM: Células madre mesenquimales.

CSF-M: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

DCP: Fosfato dicálcico.

DCPA: Fosfato dicálcico anhidro o Monetita.

DCPD: Fosfato dicálcico dihidratado o Brushita.

DMP1: Proteína de la matriz dentaria 1.

FBS: Fluido biológico simulado.

HA: Hidroxiapatita.

IGF: Factor de crecimiento tipo insulina.

IL: Interleucina.

INF: Interferón.

MCPM: Fosfato monocálcico monohidratado.

Mg²⁺: Magnesio.

MMP: Matriz metalo-proteinasas.

MSC: Célula madre mesenquimal.

OCP: Fosfato octacálcico.

OCPs: Precursores de osteoclastos.

OPG: Osteoprotegerina.

OSF-1: Factor estimulador de osteoblastos.

P: Fósforo.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PGE: Prostaglandina.

PHA: Hidroxiapatita precipitada.

PMMA: Polimetilmetacrilato.

PNT: Pleitropina.

Ps-wollastonita (ps-W): pseudo-wollastonita.

PTH: Hormona paratiroidea.

RANK: Receptor activador del factor nuclear k B.

RANKL: Ligando de RANK.

Si: Silicio.

TCP: Fosfato tricálcico.

TG: Tinción de Tricrómico de Goldner.

TGF-β: Factos de crecimiento transformante tipo β.

TNF: Factor de necrosis tumoral.
TRAP: Ácido fosfatasa tartrato resistente.
TTCP: Fosfato tetracálcico.
UBM: Unidad básica multicelular.
VK: Tinción de Von Kossa.
Zn²⁺: Zinc.

Leyenda de las tablas resumen de la valoración histológica:

-: nulo o inexistente.

*: escasa.

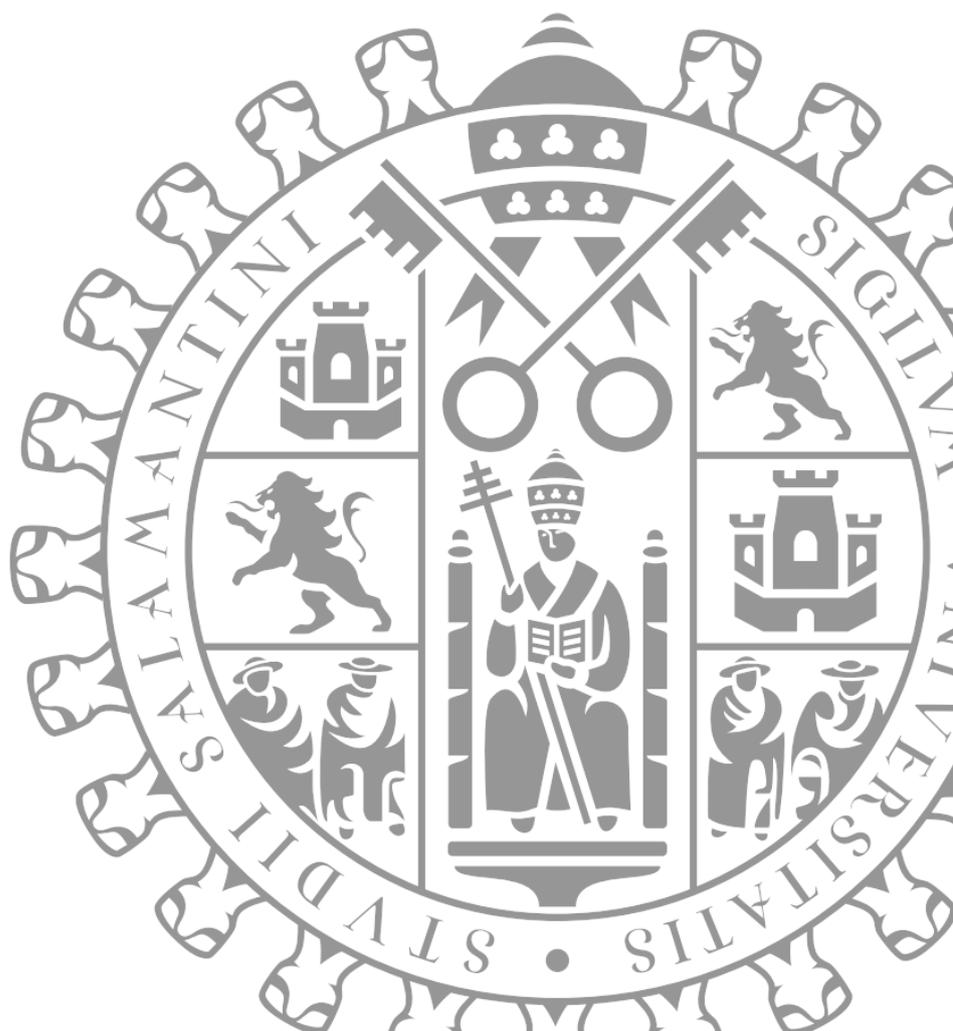
** : mínimo o leve.

***: frecuente.

****: abundante.

*****: intenso.

BIBLIOGRAFIA



IX.~ BIBLIOGRAFÍA:

1. Hanker JS, Giammara BL. Biomaterials and Biomedical devices. Science. 1988;11(242):885-92.
2. El futuro de los biomateriales. Tendencias tecnológicas a medio y largo plazo. Fundación OPTI. 2004.
3. Williams DF. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University press. 1999.
4. Sastre R, De Aza S, San Román J. Biomateriales. Ed CYTED. 2004.
5. Wilson J. Biocompatibility and tissue response to implants. Anales de Química International edition.93(Sup.1.):S15-S6.
6. Hench LL, Wilson J. An introduction to bioceramics. Advanced series in ceramics Vol.1. 1993.
7. Hench LL. Biomaterials. Science. 1980;208(826-831).
8. Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery. Overview and regulatory considerations,. Clinical Orthopaedics and related research. 2002;395:11-22.
9. Vallet-Regí M. Biomaterials. Anales de Química International edition Sup1. 1997;93:S6-S14.
10. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. ANZ Journal of Surgery. 2001;71(6):354-61.
11. Albrektsson, Johansson. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. European Spine Journal. 2001;10(0):S96-S101.
12. Kurz LT, Garfin SR, Booth JR. Harvesting autogenous iliac bone grafts: A review of complications and techniques. Spine. 1989;14:1324-31.
13. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. The journal of Foot and Ankle Surgery. 1996;35(5):413-7.
14. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long term results of allograft replacement in the management of bone tumors. Clinical Orthopaedics and related research. 1996;324:86-97.
15. Precheur HV. Bone Graft Materials. Dental clinics of North America. 2007;51(3):729-46.
16. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965;150:893-9.
17. Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. The orthopedic clinics of North America. 2000;31(3):389-98.
18. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. Injury. 2005;36(3, Supplement 1):S20-S7.
19. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. Proc Inst Mech Eng H. 2010;224(12):1329-43.
20. Charnley J. Acrylic cement in orthopaedic surgery. . British Journal of Surgery. 1970;57(11):874-.
21. Kenny SM, Buggy M. Bone cements and fillers: A review. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2003;14:923- 38.
22. Lewis G. Properties of acrylic bone cement: State of the art review. Journal of

- Biomedical Materials Research. 1997;38(2):155-82.
23. Helsén JA, Breme HJ, editors. *Metals as biomaterials*. New York 1998.
 24. Strnad Z, Strnad J, Povysil C, Urban K. Effect of plasma sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. *The international Journal of Oral Maxillofacial implants*. 2000;15:483-90.
 25. De Aza PN, De Aza AH, De Aza S. Crystalline Bioceramic Materials. *Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio*. 2005;44(3):135-45.
 26. Hench LL. Sol-gel materials for bioceramic applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 1997;2(5):604-10.
 27. LeGeros RZ, editor. *Calcium phosphates in oral biology and medicine*.: New York University College of Dentistry.; 1991.
 28. García Carrodeguas R. *Cementos óseos de fosfatos de calcio*. Tesis doctoral. Universidad de la Habana. 2000.
 29. LeGeros RZ. Biodegradation and Bioresorption of Calcium Phosphate Ceramics. *Clinical Materials*. 1993;14(1):65-88.
 30. Albee F, Morrison M. Studies in bone growth, triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Annals of surgery*. 1920;71:32-8.
 31. Lange TA, Zerwekh JE, Peek RD, Mooney V, Harrison BH. Granular tricalcium phosphate in large cancellous defects. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 1986;16(467-472):467.
 32. LeGeros RZ. Materials for bone repair, augmentation, and implant coatings. *Biomechanics in Orthopedics*. 1992:147-74.
 33. Ray RD, Ward AAJ. A preliminary report on studies of basic phosphate in bone replacement. In *Surgical Forum, American College of Surgeons*. 1951:429-34.
 34. Kobayashi T, Shingaki S, Nakajima T, Hanada K. Chin augmentation with porous hydroxyapatite blocks. *J Long Term Eff Med Implants*. 1993;3(4):283-94.
 35. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1971;5(6):117-41.
 36. Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *Journal of Applied Biomaterials*. 1991;2(4):231-9.
 37. Filho OP, La Torre GP, Hench LL. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1996;30(4):509-14.
 38. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft and graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 2010;132:15-30.
 39. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;276(2):461-5.
 40. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;55(2):151-7.
 41. Hench L, Kokubo T, editors. *Handbook of biomaterials properties*. London 1998.
 42. de Aza PN, de Aza AH, Pena P, de Aza S. Bioactive glasses and glass-ceramics. *Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio*. 2007;46(2):45-55.
 43. Brömer H, Deutscher K, Blenke B, Pfeil E, Strunz V. Properties of the bioactive

implant material Ceravital. *Science of Ceramics*. 1977;9:219-25.

44. Kokubo T, Ito S, Sakka S, Yamamuro T. Formation of High Strength Bioactive Glass-Ceramic in the System MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅. *Journal of Materials Science*. 1986;21:536-40.

45. Kokubo T, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Bonding between Bioactive Glass, Glass-Ceramic or Ceramics in Simulated Body Fluid. *Yogyo-Kyokai-hi*. 1987;95(8):785-91.

46. Ohura K, Nakamura T, Yamamuro T, Kokubo T, Ebisawa T, Kotoura Y, et al. Bioactivity of CaO-SiO₂ glasses added with various ions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1992;3:95-100.

47. Garcia Carrodegua R, De Aza PN. Main contributions to bioceramics by Salvador De Aza. *Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio*. 2011;50(6):219-28.

48. Sarmiento C, Luklinska ZB, Brown L, Anseau M, De Aza PN, De Aza S, et al. In vitro behavior of osteoblastic cells cultured in the presence of pseudowollastonite ceramic. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004;69A(2):351-8.

49. De Aza PN, Luklinska ZB, Martínez A, Anseau MR, Guitián F, De Aza S. Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone. *Journal of Microscopy*. 2000;197(1):60-7.

50. Peltier LF. The use of plaster of paris to fill large defects in bone. *American journal of surgery*. 1959;97(3):311-5.

51. Mousset B, Benoit MA, Bouillet R, Gillard J. Plaster of Paris: a carrier for antibiotics in the treatment of bone infections. *Acta Orthopaedica Belgica*. 1993;59(3):239-48.

52. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31(Suppl. 4):37-47.

53. Egli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. *Clinical Orthopaedics and related research*. 1988;232:127-38.

54. Dean-Mo L. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials*. 1996;17(20):1955-7.

55. Chang B-S, Lee, G, Inits, C.K, Fnm, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*. 2000;21(12):1291-8.

56. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, et al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;59(1):110-7.

57. Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Descamps M, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1999;10(2):111-20.

58. Smith DC. A new dental cement. *British Dental Journal*. 1968;125:381-4.

59. Lawrence LG, Beagrie GS, Smith DC. Zinc polyacrylate cement as an alloplastic bone implant. *Dental Journal*. 1975;41(8):456-61.

60. Wilson AD, Kent BE. The glassionomer cement, a new translucent dental filling material. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*. 1971;21:313.

61. Lewandrowski K, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DL. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: an histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid) based cement implants in rats. *Biomaterials*.

2000;21(8):757-64.

62. Blades MC, Moore DP, Revell PA, Hill R. In vivo skeletal response and biomechanical assessment of two novel polyalkenoate cements following femoral implantation in the female New Zealand White rabbit. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1998;9(12):701-6.

63. Gruninger SE, Siew C, Chow LC, O'Young A, Ts'ao NK, Brown WE. Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cement. *Journal of dental research*. 1984;63:63-200.

64. Driessens FC, Fernández E, Ginebra MP, Boltong MG, Planell JA. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anales de Química*. 1997;93:S38-S43.

65. Driessens FCM, Verbeeck RMH. *Biomaterials*. CRC Press, Boca Raton. 1990.

66. Low KL, Tan SH, Zein SHS, Roether JA, Mouriño V, Boccaccini AR. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010;94B(1):273-86.

67. Driessens FC, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proc Instn Mech Engrs*. 1998;6:427-35.

68. del Real RP, Ooms E, Wolke JGC, Vallet-Regí M, Jansen JA. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;65A(1):30-6.

69. Takagi S, Chow LC. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2001;12(2):135-9.

70. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:2863-73.

71. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulate. *Journal of Clinical Periodontology*. 2006;33(12):922-8.

72. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphate Cements and Concretes. *Materials*. 2009;2:221-91.

73. Bohner M, van Landuyt P, Merkle HP, Lemaître J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium orthophosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1997;8:675-81.

74. Penel G, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaître J, et al. Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model. *Bone*. 1999;25(2 Suppl.):81 S-4 S.

75. Tamimi F, Torres J, Tresguerres I, Jerez LB, Cabarcos EL. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;81A(1):93-102.

76. Bohner M, Theiss F, Apelt D, Hirsiger W, Houriet R, Rizzoli G, et al. Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials*. 2003;24(20):3463-74.

77. Tamimi F, Sheikh Z, Barralet J. Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(2):474-87.

78. Tamimi F, Torres J, Kathan C, Baca R, Clemente C, Blanco L, et al. Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. *Journal of Biomedical Materials*

Research Part A. 2008;87A(4):980-5.

79. Alshaaer M, Cuypers H, Rahier H, Wastiels J. Production of monetite-based Inorganic Phosphate Cement (M-IPC) using hydrothermal post curing (HTPC). *Cement and Concrete Research*. 2011;41(1):30-7.

80. Klammert U, Reuther T, Jahn C, Kraski B, Kübler AC, Gbureck U. Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(2):727-34.

81. Tamimi F, Torres J, Bassett D, Barralet J, Cabarcos EL. Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients. *Biomaterials*. 2010;31(10):2762-9.

82. Vallet-Regí M, Victoria C, Salinas AJ. Glasses with medical applications. *European journal of inorganic chemistry*. 2003:1029-42.

83. Shimazaki K, Mooney V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *Journal of orthopaedic research*. 1985;3(3):301-10.

84. Solís Moré Y, García Carrodegua R, Davidenko N, Peniche Covas C, Camerón R. Preparación y caracterización de composites de hidroxiapatita deficiente en calcio y quitosana. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2008;39(1).

85. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of Bone Biology*, 3rd Edition. Academic press; 2008.

86. Hesaraki S, Safari M, Shokrgozar M. Composite bone substitute materials based on β -tricalcium phosphate and magnesium-containing sol-gel derived bioactive glass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009;20(10):2011-7.

87. Klammert U, Gbureck U, Vorndran E, Rödiger J, Meyer-Marcotty P, Kübler AC. 3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2010;38(8):565-70.

88. Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, et al. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. 2010;31(6):1260-9.

89. Pina S, Vieira SI, Torres PMC, Goetz-Neunhoeffler F, Neubauer J, da Cruz e Silva OAB, et al. In vitro performance assessment of new brushite-forming Zn- and ZnSr-substituted β -TCP bone cements. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010;94B(2):414-20.

90. Yamaguchi M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 1998;11(2-3):119-35.

91. Kawamura H, Ito A, Miyakawa S, Layrolle P, Ojima K, Ichinose N, et al. Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;50(2):184-90.

92. Moore KL. *Anatomía con orientación clínica*. Ed Médica Panamericana-Sans Tache-Williams et Wilkins, Buenos Aires, 3ª Edición. 1993.

93. Sobotta J, Welsch U. *Histología*. Ed Médica Panamericana, 2ª Edición. 2009.

94. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1092(1):385-96.

95. Carrascal E. *Histología humana I*. LC1ª Edición. 2001.

96. Ueno T, Kagawa T, Mizukawa N, Nakamura H, Sugahara T, Yamamoto T. Cellular origin of endochondral ossification from grafted periosteum. *The Anatomical Record*. 2001;264(4):348-57.

97. Stevens A, Lowe J. *Histología Humana*. Harcourt-Brace 2ª Edición. 1998.

98. Barrère F, Blitterswijk C, Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine*. 2006;1(3):317-32.
99. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American society of nephrology*. 2008;3:S131-S9.
100. Wuttke M, Müller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural Characterization of Human Recombinant and Bone-derived Bone Sialoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(39):36839-48.
101. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical journal*. 1996;317:59-64.
102. Boskey AL. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone and Mineral*. 1989;6(2):111-23.
103. Gómez-Ochoa I, López-Lahoz P, Cativielac E, Villarroya-Aparicio A, Marín-Redondo M. Células mesenquimales y fibrocitos en sangre periférica. *Condiciones de cultivo*. *Reumatología clínica*. 2007;3(5):200-3.
104. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
105. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*. 2000;28(8):875-84.
106. Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcified tissue international*. 1978;25(1):205-7.
107. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008;42(4):606-15.
108. Nakahama K-i. Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010;67(23):4001-9.
109. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical Pathology*. 2008;61(5):577-87.
110. Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Oral Surgery*. 2006;11:151-7.
111. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*. 2007;130(3):456-69.
112. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics*. 2006;235(1):176-90.
113. Bonewald LF. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1116(1):281-90.
114. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(1):1-8.
115. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB Journal*. 1999;13:S101-S12.
116. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcified tissue international*. 1981;33:509-12.
117. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;473(2):188-92.
118. Kogianni G, Noble BS. The biology of osteocytes. *Current osteoporosis reports*.

2007;5(2):81-6.

119. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;55(3):287-99.
120. Cullinane DM. The role of osteocytes in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. 2002;2(3):242-4.
121. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;328(3):709-20.
122. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;335(4):1095-101.
123. Baron R, Neff L, Phuc Tran V. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *American Journal of Pathology*. 1986;122(2):363-78.
124. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*. 2000;113(3):377-81.
125. Helfrich MH, Nesbitt SA, Lakkakorpi PT, Barnes MJ, Bodary SC, Shankar G, et al. β 1 integrins and osteoclast function: Involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone*. 1996;19(4):317-28.
126. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
127. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2009;19(3):171-80.
128. Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *The Journal of Pathology*. 2000;192(1):4-13.
129. Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science*. 1997;11(276):266-9.
130. Cohen Jr MM. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006;140A(23):2646-706.
131. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
132. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
133. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology*. 1999;27(8):1229-41.
134. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005;5(6 SPEC. ISS.):618-25.
135. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2008;19(5):444-51.
136. Neyro JL, Cano A, Palacios S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Revista de osteoporosis y metabolismo mineral*. 2011;3(2):105-12.
137. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(33):25103-8.
138. Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*. 2000;26(1):1-6.
139. Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *Journal of Cell Science*. 1985;VOL. 76:155-65.

140. Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*. 2009;44(6):1026-33.
141. Kamkin A, Kiseleva I, editors. *Mechanobiology of Bone Tissue and Bone Cells*. Moscow 2005.
142. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its clinical applications. *The Anatomical Record*. 2001;262(4):398-419.
143. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *The Anatomical Record*. 1987;219(1):1-9.
144. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *The journal of bone and joint surgery British volume*. 1978;60(2):150-62.
145. Munuera L. *Introducción en la traumatología y cirugía ortopédica*. Mc Graw-Hill-Interamericana. 1997.
146. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional*. Elsevier 7ª Edición. 2005.
147. Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation*. 2002;82(5):521-33.
148. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: Complexity in Action. *Annual Review of Immunology*. 2002;20(1):825-52.
149. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica*. 3ª ed. : Elsevier 2012.
150. Majno G. Chronic Inflammation: Links with Angiogenesis and Wound Healing. *The American Journal of Pathology*. 1998;153(4):1035-9.
151. Majno G, Joris I. *Cells: Tissues and Disease: Principles of General Pathology*. Cambridge, MA Blackwell Science. 1996.
152. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. 1995;16(4 Suppl):277S-84S.
153. Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti GC, Piancastelli A, Bacchini B, Montanari L, et al. Mineral evolution of bone. *Biomaterials*. 1996;17(6):617-22.
154. Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G, Delmas PD, Chapuy MC, Meunier PJ. Effects of ossein-hydroxyapatite compound on ewe bone remodeling: biochemical and histomorphometric study. *Clinical Rheumatology*. 1991;10(3):269-73.
155. Hassan KS, Marei HF, Alagl AS. Composite bone graft for treatment of osseous defects after surgical removal of impacted third and second molars: case report and review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2011;112(6):e8-e15.
156. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®. *Clinical Oral Implants Research*. 2003;14(2):137-43.
157. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*. 2012:n/a-n/a.
158. Dieter B. Material de relleno sintético combinado con factores de crecimiento autólogo, estabilizado mediante una membrana de titanio. *Casística de casos clínicos*. . *Dent Implantol*. 2001;5:198-207.
159. Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dental Materials*. 2011;27(1):61-70.

- 160.** Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clinical Oral Implants Research*. 2003;14(3):369-72.
- 161.** Horowitz RA, Mazor Z, Miller RJ, Krauser J, Prasad HS, Rohrer MD. Clinical evaluation alveolar ridge preservation with a beta-tricalcium phosphate socket graft. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*. 2009;30(9):588-606.
- 162.** Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M. Effect of β -tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials*. 2008;29(14):2249-58.
- 163.** Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007;22(1):1-6.
- 164.** Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(12):685-97.
- 165.** Dorozhkin SV. Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics. *BIO*. 2011;1:1-51.
- 166.** Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005;26(17):3565-75.
- 167.** Hing KA. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. 2005;2(3):184-99.
- 168.** LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chemical Reviews*. 2008;108(11):4742-53.
- 169.** Gbureck U, Hölzel T, Klammert U, Würzler K, Müller FA, Barralet JE. Resorbable Dicalcium Phosphate Bone Substitutes Prepared by 3D Powder Printing. *Advanced Functional Materials*. 2007;17(18):3940-5.
- 170.** Dorozhkin SV, Schmitt M, Bouler JM, Daculsi G. Chemical transformation of some biologically relevant calcium phosphates in aqueous media during a steam sterilization. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2000;11(12):779-86.
- 171.** Tamimi F, Nihouannen DL, Eimar H, Sheikh Z, Komarova S, Barralet J. The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: Brushite vs. monetite. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(8):3161-9.
- 172.** Arcos D, Vallet-Regí M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(8):2874-88.
- 173.** Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(6):1882-94.
- 174.** Lilley K, Gbureck U, Knowles J, Farrar D, Barralet J. Cement from magnesium substituted hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005;16(5):455-60.
- 175.** Zhang N, Molenda JA, Fournelle JH, Murphy WL, Sahai N. Effects of pseudowollastonite (CaSiO₃) bioceramic on in vitro activity of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(30):7653-65.
- 176.** Mizuno M. *Advances in Bioceramics and Biocomposites II. A self-setting monetite cement for skeletal repair.*: Wiley; 2007.
- 177.** de Aza PN, Guitian F, de Aza S. Bioactivity of wollastonite ceramics: In vitro evaluation. *Scripta Metallurgica et Materiala*. 1994;31(8):1001-5.

- 178.** de Aza PN, Luklinska ZB, Anseau M, Guitian F, de Aza S. Morphological studies of pseudowollastonite for biomedical application. *Journal of Microscopy*. 1996;182:24-31.
- 179.** De Aza PN, Luklinska ZB, Anseau MR, Guitian F, De Aza S. Bioactivity of pseudowollastonite in human saliva. *Journal of Dentistry*. 1999;27(2):107-13.
- 180.** Carrodeguas RG, De Aza AH, De Aza PN, Baudín C, Jiménez J, López-Bravo A, et al. Assessment of natural and synthetic wollastonite as source for bioceramics preparation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;83A(2):484-95.
- 181.** Saris N-EL, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta*. 2000;294(1-2):1-26.
- 182.** Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. Second edition. Volume 1.: Academic press; 2001.
- 183.** Alkhraisat MH, Mariño FT, Rodríguez CR, Jerez LB, Cabarcos EL. Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cements. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(3):664-70.
- 184.** Huan Z, Chang J. Novel bioactive composite bone cements based on the β -tricalcium phosphate–monocalcium phosphate monohydrate composite cement system. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(4):1253-64.
- 185.** Dorozhkin SV, Epple M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*. 2002;41(17):3130-46.
- 186.** LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2002;395:81-98.
- 187.** Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1999;10(3):169-76.
- 188.** Gil-Albarova J, Salinas AJ, Bueno-Lozano AL, Román J, Aldini-Nicolo N, García-Barea A, et al. The in vivo behaviour of a sol–gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials*. 2005;26(21):4374-82.
- 189.** Gatti AM, Zaffe D, Poli GP. Behaviour of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. *Biomaterials*. 1990;11(7):513-7.
- 190.** Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Böhner M, et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2004;25(7-8):1439-51. Epub 2003/12/04.
- 191.** Bodde EWH, Wolke JGC, Kowalski RSZ, Jansen JA. Bone regeneration of porous β -tricalcium phosphate (Conduit™ TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel®) in trabecular defects in sheep. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;82A(3):711-22.
- 192.** van der Pol U, Mathieu L, Zeiter S, Bourban PE, Zambelli PY, Pearce SG, et al. Augmentation of bone defect healing using a new biocomposite scaffold: an in vivo study in sheep. *Acta Biomater*. 2010;6(9):3755-62. Epub 2010/03/30.
- 193.** Willie BM, Bloebaum RD, Bireley WR, Bachus KN, Hofmann AA. Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004;69A(3):567-76.
- 194.** Aerssens J, Boonen S, Joly J, Dequeker J. Variations in trabecular bone composition with anatomical site and age: potential implications for bone quality assessment. *Journal of Endocrinology*. 1997;155(3):411-21.

- 195.** Hillier ML, Bell LS. Differentiating Human Bone from Animal Bone: A Review of Histological Methods. *Journal of Forensic Sciences*. 2007;52(2):249-63.
- 196.** Bala Y, Farlay D, Delmas PD, Meunier PJ, Boivin G. Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone*. 2010;46(4):1204-12.
- 197.** Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative medicine*. 2008;58(5):424-30.
- 198.** Patel N, Brooks RA, Clarke MT, Lee PM, Rushton N, Gibson IR, et al. In vivo assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16(5):429-40. Epub 2005/05/06.
- 199.** Braye F, Weber G, Irigaray JL, Frayssinet P. Osseointegration in cortical sheep bone of calcium phosphate implants evaluated by PIXE method and histology. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;36(3):315-24.
- 200.** Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery* 1990;1(1):60-8.
- 201.** Nuss KM, Auer JA, Boos A, Rechenberg Bv. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disorders*. 2006;67(7).
- 202.** Kilborn SH, Trudel G, Uthhoff H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 2002;41(5):21-6.
- 203.** Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative Medicine*. 2001;51(4):292-9.
- 204.** Xu S, Lin K, Wang Z, Chang J, Wang L, Lu J, et al. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials*. 2008;29(17):2588-96.
- 205.** Peris JL, Prat J, Comin M, Dejoz R, Roger I, Vera P. Técnica histológica para la inclusión en metilmetacrilato de muestras óseas no descalcificadas. *Revista española de cirugía osteoarticular*. 1993;231-238(28).
- 206.** Yuehuei HA, Martin KL. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Chapter 11: Principles of embeddind and common protocols.: Human press; 2003.
- 207.** Yuehuei HA, Martin KL. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Chapter 14: Techniques for sectioning undecalcified bone tissue using microtomes.: Human press; 2003.
- 208.** Yuehuei HA, Martin KL. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Chapter 1: introduction to experimental bone and cartilage histology. Chapter 23: staining techniques for plastic-embedded specimens.: Human press; 2003.
- 209.** Yuehuei HA, Martin KL. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Chapter 22: Histochemical and Immunohistochemical staining of cartilage sections.: Human press; 2003.
- 210.** Açil Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;51(4):703-10.
- 211.** Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss® collagen: A 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*. 2009;20(5):433-40.
- 212.** Orsini G, Traini T, Scarano A, Degidi M, Perrotti V, Piccirilli M, et al. Maxillary

sinus augmentation with Bio-Oss® particles: A light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2005;74B(1):448-57.

213. McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Buck D, Hollinger JO, Lynch SE. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 1999;14(3):361-8.

214. Ewers R, Goriwoda W, Schopper C, Moser D, Spassova E. Histologic findings at augmented bone areas supplied with two different bone substitute materials combined with sinus floor lifting. Report of one case. *Clinical Oral Implants Research*. 2004;15:96-100.

215. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;41(1):114-20.

216. Orsini G, Scarano A, Degidi M, Caputi S, Iezzi G, Piattelli A. Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss® particles in sinus augmentation. *Oral Diseases*. 2007;13(6):586-93.

217. Peters F, Reif D. Functional materials for bone regeneration form Beta-Tricalcium Phosphate. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 2004;35(4).

218. Palm F. Cerasorb M – a new synthetic pure-phase -TCP ceramic material in oral and maxillofacial surgery – An open study of 121 patients. . *Implantologie journal*. 2006;4:6-12.

219. Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2003;23(1):69-77.

220. Bilk D. Cerasorb M in Dental Surgery – Post-marketing surveillance study with 148 patients. . *EDI Journal* 2007;3(4):40-6.

221. Tamimi F, Torres J, Gbureck U, Lopez-Cabarcos E, Bassett DC, Alkhraisat MH, et al. Craniofacial vertical bone augmentation: A comparison between 3D printed monolithic monetite blocks and autologous onlay grafts in the rabbit. *Biomaterials*. 2009;30(31):6318-26.

222. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*. 2008;29(7):944-53.

223. Driessens FCM, Verbeeck RMH. "Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates". . C de Putter GdL, K de Groot and AJC Lee, editor. Elsevier. Amsterdam 1988.

224. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*. 1993;14(6):423-9.

225. Vallet-Regı M, Arcos D. Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants. *Journal of Materials Chemistry*. 2005;15:1509-16.

226. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal*. 2007;7(4):475-90.

227. Rohn AR, Khodadoostan MA, Reza Rasouli Ghahroudi AA, Motahhary P, Kharrazi Fard MJ, De Bruyn H, et al. Bone Formation with Two Types of Grafting Materials: A Histologic and Histomorphometric Study. *the Open Dentistry Journal*. 2011;5:96-104.

- 228.** Sinikovic B, Kramer FJ, Swennen G, Lubbers HT, Dempf R. Reconstruction of orbital wall defects with calcium phosphate cement: clinical and histological findings in a sheep model. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(1):54-61. Epub 2006/09/13.
- 229.** Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. *Journal of Periodontology.* 1992;63(9):729-35.
- 230.** Frayssinet P, Mathon D, Lerch A, Autefage A, Collard P, Rouquet N. Osseointegration of composite calcium phosphate bioceramics. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2000;50(2):125-30.
- 231.** Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C. The critical sized bone defect: morphological study of bone healing. *Annales Fac Medecine veterinaire di Parma.* 2006;26:97-110.
- 232.** Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Current opinion in hematology.* 2000;7(1):40-7.
- 233.** Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Müller-Mai CM. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass® particles in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2004;70A(3):370-9.
- 234.** Figueiredo M, Henriques J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes—Comparison with human bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 2010;92B(2):409-19.
- 235.** Araújo MG, Carmagnola D, Berglundh T, Thilander B, Lindhe J. Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss®. *Journal of Clinical Periodontology.* 2001;28(1):73-80.
- 236.** Taylor JC, Cuf fSE, Leger JP, Morra A, Anderson GI. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.* 2002;17(3):321-30.
- 237.** Duda M, Pajak J. The issue of bioresorption of the Bio-Oss xenogeneic bone substitute in bone defects. *Annales Universitatis Mariae Curie Skłodowska Sectio D Medicina.* 2004;59(1):269-77.