

**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.UN  
ANÁLISIS CON FLUOROCROMOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Francisco de Paula Collía Martin**

**SALAMANCA, 2017**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS REACCIONES  
BIOLÓGICAS DEL TEJIDO ÓSEO FRENTE A  
BIOMATERIALES BASADOS EN MONETITA.UN  
ANÁLISIS CON FLUOROCROMOS**

**Francisco de Paula Collía Martin**

**DIRECTORES:**

**Dra. D<sup>a</sup>. L. Benito Garzón**

**Dr. D. F. Collía Fernández**



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

**SALAMANCA, 2017**



UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA  
E HISTOLOGÍA HUMANAS

DR. D. FRANCISCO DE PAULA COLLÍA FERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y DRA. DÑA. LORENA BENITO GARZÓN, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

**CERTIFICAN:**

Que la memoria de la Tesis titulada “ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS REACCIONES BIOLÓGICAS DEL TEJIDO ÓSEO FRENTE A BIOMATERIALES BASADOS EN MONETITA. UN ANÁLISIS CON FLUOROCROMOS” ha sido realizada por D. Francisco de Paula Collía Martín, bajo su dirección; considerando que reúne los requisitos y méritos suficientes para que el autor de la misma, pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, se expide el presente certificado,

Salamanca, 6 de junio de 2017

Fdo.: Dr. D. F. Collía Fernández

Dra. Dña. L. Benito Garzón

*La moderación es cosa fatal.  
Nada tiene más posibilidades de éxito que el exceso.*  
Oscar Wilde

# AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Collía, científico altruista, por su fiel y espartano compromiso con los ideales del saber y la justicia, y su incansable alma universitaria, con la promesa sincera de caminar algún día como él lo ha hecho, por el cielo de estos Estudios Generales.

A la Dra. Benito, por su inspirador entusiasmo y su infatigable motivación, parte importante del presente trabajo.

A mi padre, por su insaciable curiosidad, su frenética genialidad, su compulsiva generosidad y su concepto heroico de la vida. Un hombre capaz de bosquejar la morfología del pensamiento humano en menos de una hora sin perder por un momento la esperanza en la humanidad.

A mi madre, cuya interpretación sincera y precisa de los afectos de este mundo no ha menguado su carácter bondadoso, su sereno porte, su trato humilde y preciosamente inocente, su apasionado temple y su graciosa espontaneidad.

A mi hermano, perfecta representación de esta familia, animándole en el camino que yo inicio, para que disfrute de lo arduo de un paisaje con desniveles pero de dulces recompensas.

A Mikel Oñate, por su carácter valeroso, por su apoyo callado e incondicional, y por su ejemplo.

A Javier Sánchez, por su primor en la técnica, su virtuosismo y su carácter amable.

A Rosa Sepúlveda, por su tesón y su paciencia, cualidades sin las cuales la ciencia nunca habría nacido.

A Marta Ortiz, por su inestimable ayuda con el tratamiento estadístico de este trabajo.

A mis antepasados. A la abigarrada memoria de las generaciones pasadas, cuyas penas y alegrías son hoy para mí imagen de una vida fugaz.

A la humanidad del futuro, para que no subestime los esfuerzos del pasado, y no agote con soberbia las cuestiones de la ciencia.

A la Universidad de Salamanca, en el comienzo de su octavo centenario.

*De un lisonjero clavel,  
que hermoso a la vista engaña,  
una dulce, otra cruel,  
saca ponzoña el araña,  
la abeja destila miel.*

Pedro Calderón de la Barca

# ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1. Injertos óseos</b> .....	<b>6</b>
Autoinjertos .....	6
Aloinjertos .....	7
Xenoinjertos .....	8
<b>3.2. Biomateriales en regeneración ósea</b> .....	<b>8</b>
Biopolímeros .....	10
Biomateriales metálicos.....	11
Biocerámicas .....	12
Fosfatos de calcio .....	12
Cementos de fosfato de calcio (CPC).....	15
Cementos de DCPD (brushita) y su derivado DCPA (monetita) en forma granulada .....	17
<b>3.3. Introducción Fluorocromos</b> .....	<b>20</b>
Historia .....	20
Concepto, Tipos y Descripción.....	21
Indicaciones .....	22
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1. Biomateriales granulados basados en monetita</b> .....	<b>25</b>
Composición.....	26
<b>4.2. Animal de experimentación</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3. Instalaciones</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4. Protocolo quirúrgico</b> .....	<b>28</b>
Material quirúrgico .....	28
Técnica quirúrgica .....	28
<b>4.5. Protocolo anestésico</b> .....	<b>31</b>
Anestesia y analgesia.....	31
Monitorización .....	31
<b>4.6. Seguimiento y recogida de muestras</b> .....	<b>32</b>
<b>4.7. Estudio radiológico</b> .....	<b>33</b>
<b>4.8. Protocolo histológico</b> .....	<b>33</b>
Inclusión .....	33
Corte de las muestras .....	35
Protocolo tinciones .....	36
Técnica fotográfica.....	37
<b>4.9. Marcado fluorescente y morfometría</b> .....	<b>37</b>
Análisis estadístico .....	40

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Estudio con técnicas de diagnóstico por imagen, histología y morfometría .....</b>	<b>43</b>
Bio-Oss® .....	43
Grupo I: materiales Z-2 y C-5 .....	50
Material C-5.....	51
Material Z-2.....	56
Grupo II: materiales 00-4, V-6, PP-8, LL-9 y AA-10.....	61
Material AA-10.....	62
Material LL-9 .....	67
Material OO-4 .....	72
Material PP-8.....	77
Material V-6 .....	82
Grupo III: materiales U-3 y NN-7 .....	87
Material NN-7 .....	88
Material U-3 .....	93
<b>5.2. Resultados del análisis estadístico .....</b>	<b>98</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>108</b>
<b>6.1. Modelo experimental .....</b>	<b>108</b>
Animal de experimentación.....	108
Cirugía y tipo de lesión.....	109
Técnicas de estudio.....	111
Técnicas de diagnóstico por imagen TAC y Radiología simple.....	111
Técnica histológica .....	111
Fluorocromos.....	112
Morfometría.....	112
<b>6.2. Valoración de los resultados.....</b>	<b>113</b>
Resultados histológicos .....	113
Grupo I.....	114
Grupo II .....	115
Grupo III.....	116
Resultados con fluorocromos .....	121
Resultados estadísticos .....	122
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>124</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>126</b>

# JUSTIFICACIÓN

# 1. JUSTIFICACIÓN

La ingeniería tisular ósea es una ciencia en rápido desarrollo que aplica los principios de la ingeniería y la biología a la investigación del potencial regenerativo del tejido óseo. Desde los trabajos de Urist (1), a mediados de los 60, se han incrementado notablemente nuestros conocimientos sobre el tema, y el número de publicaciones sobre la materia ha aumentado de forma exponencial de año en año (2).

Una de las piedras angulares en la investigación de la ingeniería ósea, es la histología, que proporciona una información crucial con respecto a la naturaleza, calidad y cantidad del hueso neoformado (3). Sin embargo una de las mayores desventajas de la histología es que para la obtención de la muestra, y posterior procesamiento de la misma, es necesaria la fijación que implica la muerte celular y la detención de la actividad biológica, obteniéndose una foto fija finalizando así el experimento. Dicho de otra manera, la histología convencional, solo proporciona una medición, la del momento de la toma, infiriéndose los sucesos anteriores y los posteriores, con el riesgo interpretativo y diagnóstico subsecuente (3). Para paliar este inconveniente se ha diseñado un experimento de regeneración ósea sobre un sustrato de biomaterial, asociado a la administración secuencial de marcadores fluorescentes (4-7), sustituyendo así la imagen estática por una secuencia dinámica, susceptible además de medición y por tanto cuantificación de los resultados obtenidos. La aplicación de este procedimiento redundaría en una mayor exactitud y objetividad en la valoración de los resultados, con la consiguiente mejora a la hora de seleccionar un biomaterial para su empleo en la práctica clínica.

# OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

Actualmente son muchos los biomateriales que se están desarrollando para su utilización en el área de la regeneración ósea. Dentro de esta gran variedad, existen algunos que presentan ventajas osteogénicas, osteointegradoras, osteoinductoras y/u osteoconductoras. Pero además debe considerarse otro parámetro, el grado de reabsorción, ya que algunos perduran notablemente en el tiempo y otros se reabsorben a gran velocidad con los inconvenientes biológicos derivados de estas propiedades. A grandes rasgos, los objetivos de esta Tesis podrían resumirse en:

- Cuantificación, mediante la administración y medida de varios fluorocromos, del hueso neoformado tras la colocación de un determinado biomaterial.
- Dicha cuantificación abarca la cantidad total de hueso neoformado y su localización relativa.
- El grado de producción del nuevo hueso, en relación con el tiempo, determinado por las diferencias entre las distintas líneas de demarcación de los fluorocromos.
- Discriminación, en función de los criterios anteriores de la adecuación de un biomaterial para su empleo en la clínica.

# INTRODUCCIÓN

### 3. INTRODUCCIÓN

Durante muchos siglos, cuando un tejido u órgano sufría una alteración severa o una enfermedad de cierta gravedad, el médico se encontraba con la limitación de disponer escasas alternativas para poder afrontarlas. En la mayoría de los casos se encontraba con la única opción de la inevitable amputación de un miembro o extirpación del tejido o del órgano dañado. Esta práctica podía salvar vidas en muchos de los casos, pero la calidad de vida de los pacientes se veía claramente desmejorada.

Es en la segunda mitad del siglo XX cuando se produjeron cambios importantes debido al descubrimiento de antibióticos como la penicilina, ampicilinas, sulfamida; a la concienciación y empleo de normas de higiene, no solo en centros hospitalarios sino también en el ambiente doméstico; además del desarrollo y aplicación de vacunas que presentaron una gran eficacia. Todo ello desencadenó una notable mejora en la calidad de vida, lo que ha provocado un aumento en la esperanza de vida. 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.

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. Inicialmente los biomateriales eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el criterio de que fueran capaces de cumplir ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. Sin embargo, hoy en día muchos biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación en el campo médico.

En la actualidad disponemos de múltiples estrategias para superar las condiciones inadecuadas que dificultan el proceso de regeneración ósea. Pueden ser utilizadas como técnicas aisladas o combinadas para conseguir un ambiente óptimo que facilite el ambiente reparativo. Entre estas estrategias se incluyen la utilización de injertos óseos autólogos, aloinjertos óseos, andamios osteoconductores sintéticos, factores de crecimiento osteoinductores, aplicación de células osteoprogenitoras... Debido al tema de estudio del presente trabajo nos centraremos en aquellos biomateriales compuestos por fosfato de calcio destinados a la regeneración del tejido óseo. Pero primeramente hablaremos de aquellos recursos de los que disponemos de forma natural, como son los injertos óseos de origen humano y animal.

## 3.1. INJERTOS ÓSEOS

Desde el punto de vista biológico, sabemos que el hueso es un tejido dinámico, en constante formación y reabsorción, y metabólicamente activo que tiene la capacidad de autoregenerarse. Sin embargo en ciertas situaciones, como fracturas o enfermedades óseas, el hueso pierde esta capacidad. Es en estos casos cuando se recurre a la utilización de injertos o sustitutos óseos para promover la regeneración ósea.

Un injerto óseo se define como cualquier material implantado que promueve la reparación ósea, bien por sí solo o en combinación con otro material (8). La reparación ósea en el lugar de implantación sucede mediante uno o más de los siguientes mecanismos: osteoinducción, osteogénesis y osteoconducción, que se detallarán a continuación.

Para la elección de un injerto o sustituto óseo se deben tener en cuenta las diferencias existentes entre los diferentes tipos de hueso. El hueso puede ser cortical o esponjo y en función de cómo sea el hueso a sustituir, reparar o regenerar éste debe presentar unas características u otras.

### Autoinjertos

Los autoinjertos son aquellos que provienen del hueso perteneciente al mismo individuo que recibe el injerto. El injerto de tejido autólogo o autoinjerto plantea muy pocas dificultades en cuanto al comportamiento inmunológico y a cuestiones éticas.

Un injerto óseo ideal debe presentar cuatro características básicas: (9, 10)

- Osteointegración, o capacidad de unirse químicamente a la superficie del hueso sin la formación de una capa de tejido fibroso intermedia.
- Osteoconducción, o capacidad de sostener el crecimiento del hueso sobre su superficie.
- Osteoinducción, habilidad de inducir la diferenciación de células madre pluripotentes de tejidos adyacentes, a células osteoprogenitoras con la capacidad de generar nuevo hueso.
- Osteogénesis, o propiedad para promover la formación de nuevo hueso por células osteoblásticas presentes dentro del injerto.

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 (11). 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 (12). 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 (11) y en ocasiones de resorción ósea, así como el compromiso del comportamiento biomecánico, han favorecido el desarrollo de nuevas alternativas de sustitutos óseos.

## **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 tantas limitaciones de disponibilidad. Esta alternativa ofrece las mismas características que el autoinjerto: osteointegración, osteoconducción y osteoinducción, salvo que 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 (13). 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  $-60^{\circ}\text{C}$ , 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 (14). 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.

## **Xenoinjertos**

Otra alternativa a los autoinjertos son los xenoinjertos. Estos sustitutos óseos se obtienen de una especie diferente a la humana como el hueso bovino o porcino que puede ser liofilizado o desmineralizado y desproteínizado. En cuanto a las ventajas de este tipo de injertos óseos encontramos que son osteoconductores y osteoinductores, presentan una alta disponibilidad y bajo coste. Sin embargo, también presentan ciertas limitaciones como la falta de propiedades osteogénicas, riesgo de inmunogenicidad y de transmisión de enfermedades infecciosas y zoonóticas. Además de que los rechazos son más frecuentes y agresivos (15). Existe preocupación por aquellos xenoinjertos de origen bovino, debido a la transmisión de enfermedades zoonóticas e infecciones por priones como la encefalitis espongiforme bovina (EEB).

## **3.2. BIOMATERIALES EN REGENERACIÓN ÓSEA**

Debido a las limitaciones que presentan los injertos óseos tanto de origen humano como animal, se ha producido un gran impulso hacia el desarrollo de nuevas técnicas en el ámbito de la biomedicina, a la hora de sintetizar nuevos materiales artificiales de aplicación en regeneración ósea.

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 (9).

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” (16). 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” (17).

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 (18). 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 (19).

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 (20). 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 (20). 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 (21). 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.

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 (22). Estos 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.) o facilitar la recuperación de traumatismos y heridas (suturas, placas y tornillos) (23).

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.

En el presente trabajo comenzaremos hablando de biomateriales orgánicos como los polímeros, inorgánicos como metales y cerámicas, y por último de los cementos de fosfato de calcio (CPC), sobre todo los que tienen como producto final brushita (DCPD). 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 combinaciones de monetita con otros compuestos de calcio bioactivos como biomateriales de regeneración ósea.

## **Biopolímeros**

Su unidad básica estructural son los monómeros. Se consideran moléculas gigantes de gran peso molecular. 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 (24). 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 (25, 26).

## **Biomateriales metálicos**

Presentan enlaces atómicos de tipo metálico, y entre sus propiedades destaca la buena conductividad térmica y eléctrica, elevada rigidez, su ductilidad y su resistencia al impacto. De ellos debemos resaltar que suelen utilizarse de forma combinada a modo de aleaciones. De los biomateriales metálicos, cabría señalar, en términos generales, que el número de elementos metálicos que se utilizan en la fabricación de implantes es muy limitado, si tenemos en cuenta que más de tres cuartas partes del sistema periódico lo son. 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 (27).

El primer requisito para su utilización es que sean tolerados por el organismo, por lo que es muy importante la dosis que puedan aportar a los tejidos vivos.

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.

Otro requisito también imprescindible es que tengan una buena resistencia a la corrosión. 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 (17). La corrosión es un problema general de los metales, más aún si están inmersos en un medio hostil como es el organismo humano, y a temperaturas del orden de 37 °C. Sin embargo, algunos metales se escapan, por lo menos en principio, a este problema, como son los metales preciosos. Otros, al formar una capa de óxido en su superficie, la pasivan, protegiendo el interior del metal al evitar que avance la corrosión, como ocurre en el titanio.

Otro de sus grandes inconvenientes es, además de la corrosión, su falta de bioactividad. 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. Actualmente, las

investigaciones en este campo van encaminadas a buscar nuevas técnicas de procesamiento 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 (28).

## **Biocerámicas**

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. Sin embargo, la fragilidad de las biocerámicas restringió, en gran medida, su campo de aplicación, seleccionando sólo funciones que no necesitaran elevadas prestaciones mecánicas, a excepción de la alúmina y la zirconia, que se emplearon y emplean en articulaciones de cadera.

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, definidos con anterioridad: bioinertes, bioactivas o reactivas superficialmente y reabsorbibles o biodegradables (29).

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 ( $\beta$ -TCP o  $\alpha$ -TCP) o la combinación de las dos, fosfato de calcio bifásico (BCP), además de que son biocompatibles, bioactivas y osteoconductoras.

## **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 del tejido óseo (30).

Se han preparado sustitutos óseos basados en mezclas de HA y  $\beta$ -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,  $\beta$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  al medio local. Este material se puede utilizar conformado en piezas, en forma de recubrimientos o inyectado.

Actualmente se acepta que las cerámicas de HA son bioestables, a diferencia de las BCP y del  $\beta$ -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 (31).

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 (28).

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, 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 (29).

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 (32).

Una de las propiedades que pueden presentar cierto tipo de biocerámicas corresponde a la capacidad de ser 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 (29). 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: MCPM > TTCP =  $\alpha$ -TCP > DCPD > DCP > OCP >  $\beta$ -TCP > PHA > HA (33).

La biodegradación o reabsorción de los fosfatos de calcio se puede producir mediante tres procesos: (34)

- 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.

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.

## Cementos de fosfato de calcio (CPC)

Una alternativa a los tradicionales granulados y piezas en que comúnmente se emplean las cerámicas de fosfato 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 cerámicas. Los cementos se diferencian de las cerámicas, en que éstos se producen por cristalización directa *in vivo*, a temperatura ambiente, y por lo tanto no requieren altas temperaturas para la formación de un soporte estructuralmente estable.

En la actualidad, 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. Grüninger y cols. (35) 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 hidroxiapatita u otro tipo de fosfato de calcio (36).

Un sistema cementante se basa en la mezcla de un polvo con un líquido, dando lugar a una masa plástica. 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; se obtiene una pasta rígida. En la segunda etapa tiene lugar la consolidación, aumentando la dureza y la resistencia mecánica hasta obtenerse una consistencia sólida, obteniendo una masa resistente. Estas dos etapas se conocen como los procesos de fraguado y endurecimiento, respectivamente (36).

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:

- 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.

- 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.
- 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.
- Otra consecuencia de las características del material es su fácil manipulación. Esta propiedad es importante si se considera, por contraste, la fragilidad 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.
- 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. 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  $\text{pH}$  comprendidos entre 5 y 7 el Fosfato octacálcico (OCP) es la fase favorecida, mientras que a valores de  $\text{pH}$  más elevados se ve favorecida la precipitación de CDHA, y a  $\text{pH}$  aún más elevado precipita HA (37).

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 (38).

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 (39).

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.

### **Cementos de DCPD (brushita) y su derivado DCPA (monetita) en forma granulada**

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.

La utilización de biomateriales granulados, 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 osteointegración. 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 (40).

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 (41).

Debido a nuestro tema de estudio, a continuación nos centraremos en aquellos cementos cuyo producto final mayoritario es la brushita (DCPD) y de los que obtenemos su forma deshidratada, denominada monetita (DCPA).

En 1987 Mirtchi y Lemaitre e independientemente Bajpai y cols. introdujeron por primera vez los cementos de brushita (42). 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 (43).

Se ha estudiado que la brushita *in vivo* se transforma en HA (44). 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* (45). 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 (46). 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 (47). 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 (48). 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 (49).

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 (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* (47). Estudios *in vitro* han comparado la biocompatibilidad y la capacidad biodegradable de la monetita y la brushita (50) 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 (51, 52).

En este trabajo se han estudiado gránulos de monetita mejorados a partir de la introducción de otros compuestos bioactivos que modulan la velocidad de degradación del material resultante y promueven la regeneración ósea. Los materiales están basados en elementos biocompatibles, biodegradables, osteoconductores y osteoinductores. Estos compuestos bioactivos incluyen la ps-wollastonita (53, 54), y/o gel de sílice (55).

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 y/o fosfatos cálcicos, como la hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA). Este método de síntesis permite la fabricación de materiales de monetita que contienen más de un compuesto bioactivo. 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 ( $\alpha-CaSiO_3$ ), 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 CDHA. La CDHA presenta una composición similar a las apatitas biológicas en cuanto a su estequiometría y cristalinidad, por lo que la hacen más reactiva en el medio biológico (56).

Además, estos materiales de monetita pueden incorporar sustituciones con iones metálicos divalentes como el zinc, el cual está involucrado en el metabolismo óseo y juega un papel fisiológico en la angiogénesis, crecimiento y mineralización del tejido óseo. El ión Zinc ( $Zn^{2+}$ ) puede interactuar con las células óseas, y si su metabolismo se ve alterado puede que altere la función de los osteoblastos y osteoclastos (57). El Zinc *in vitro* estimula la proliferación y diferenciación osteogénica hacia células osteoblásticas e inhibe la reabsorción mediada por los osteoclastos (58), (59), e *in vivo* estimula la

formación y mineralización ósea (60). Es por ello que se incorpora el  $Zn^{2+}$  a los materiales de estudio, para intentar aprovechar la capacidad estimulante y/o aceleradora de los mecanismos de regeneración ósea atribuida a dicho elemento, 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  $Zn^{2+}$ , y/o que presenten ps-wollastonita y CDHA. 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. Estos materiales basados en monetita tienen como finalidad conseguir la regeneración ósea. 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, además de otras aplicaciones donde sea necesaria una regeneración de hueso.

### 3.3. INTRODUCCIÓN FLUOROCROMOS

#### Historia

Históricamente, los antecedentes en el uso de las técnicas de marcado, empleando fluorocromos para estudios óseos *in vivo*, se remonta a la segunda mitad del siglo XVIII, en relación con la Alizarina, colorante derivado de la rubia (*Rubia Tinctorum*), descrito por Hunter en estudios de remodelado óseo (3). Esta sustancia comparte sus propiedades quelantes del calcio con la familia de antibióticos de las tetraciclinas que fueron introducidas como agentes terapéuticos, además de fluorocromos a mediados del siglo XX (1948-1953) (3). Las tetraciclinas, productos de la fermentación de *Streptomyces*, son agentes quelantes capaces de incorporar iones metálicos como el calcio a su estructura anular (3). En 1957 se publicó el trabajo de Milch et al. (61) sobre la captación de distintas tetraciclinas por huesos de varias especies animales de laboratorio. Esta investigación actuó como detonante de la utilización de los fluorocromos en la investigación del metabolismo óseo (61). El descubrimiento de que la tetraciclina se depositaba en las áreas de mineralización del hueso y del cartílago, hizo posible además, la utilización en el humano debido a la escasa toxicidad de estos compuestos, en comparación con la Alizarina que solo podía emplearse en estudios animales. Uno de los grandes pioneros en utilizar esta técnica, fue H. Frost (3) que la utilizó en sus estudios sobre osteomalacia, osteoporosis, osteopetrosis y osteogénesis imperfecta (6, 62-65).

Otro de los grandes adalides del procedimiento, aunque más centrado en la cuantificación, en la denominada histomorfometría dinámica fue A.M. Parfitt, con numerosas contribuciones al estudio de la modelación y remodelación ósea (66-69). Finalmente, la posibilidad de emplear múltiples fluorocromos de distintos colores, ha

permitido abordar diseños experimentales más complejos en el estudio de procesos metabólicos fisiológicos y patológicos (70).

## Concepto, Tipos y Descripción

La señalización del esqueleto con sustancias marcadoras intravitalmente, permite la medición cuantitativa de la formación ósea y la dinámica de remodelación ósea. Estas propiedades han hecho de las técnicas de marcado óseo *in vivo* una técnica estándar en investigación esquelética (71-73). El prototipo de estas sustancias son los **Fluorocromos**, sustancias quelantes de calcio que se incorporan en el frente de calcificación de las superficies óseas o cartilaginosas en mineralización (5, 74-76), las cuales pueden ser observadas en las preparaciones histológicas debido a la fluorescencia que presentan tras excitación, con luz ultravioleta o azul (77).

Tras administración por vía oral o parenteral, los fluorocromos entran en la corriente sanguínea y se fijan preferentemente en las localizaciones donde se está originando nuevo tejido mineralizado en el esqueleto (62, 65, 77) y en las piezas dentarias (78). Los fluorocromos se fijan al nuevo mineral óseo merced a una relación quelante de los iones de calcio en la superficie de los cristales de apatita recién formados. La razón para la unión selectiva de los fluorocromos a estas superficies, en el hueso, dentina, cemento y esmalte parece estar en relación con el menor tamaño de los cristales de apatita recién formados (5, 6, 62, 79) en relación con los existentes en los tejidos esqueléticos maduros (80, 81). A diferencia de otras sustancias, como el calcio radioactivo, los fluorocromos se unen irreversiblemente con el tejido óseo neoformado (7). Las marcas de los fluorocromos se depositan en forma de bandas en los cortes de tejido óseo. La anchura de estas bandas depende de la velocidad de mineralización y del tiempo que circule el fluorocromo en el líquido extracelular. Además en circunstancias patológicas, como la hipovitaminosis D que cursa con retraso en la mineralización, también se incrementa el espesor de las bandas (80). Los fluorocromos incorporados a la matriz ósea permanecen en ella hasta que es reabsorbida o remodelada por los osteoclastos, la cantidad liberada es tan escasa que no presenta problemas de nuevo marcaje y por tanto no contamina el estudio (5, 82).

Generalmente los fluorocromos se agrupan en cuatro categorías (5), que son las Tetraciclinas, Fluoresceínas, Alizarinas y Otros.

- Las **Tetraciclinas** se desarrollaron inicialmente por su capacidad antibiótica, además tiene capacidad para formar complejos con iones metálicos como el Calcio, Zinc, Manganeso, y Hierro, y muestran fluorescencia tras la excitación con luz ultravioleta (390-430 nm). En los años 50 se describió la capacidad de estos compuestos para incorporarse al hueso (61), lo cual permitió utilizarlos como marcadores de la actividad metabólica esquelética. De las tetraciclinas utilizadas normalmente como antibióticos, se han utilizado como fluorocromos, la **tetraciclina**, la

**clortetraciclina**, la **oxitetraciclina** y la **demeclociclina**. El color de emisión varía desde el amarillo verdoso al dorado amarillento, lo cual permite distinguir las distintas variedades, pero más interesante es el hecho de que pueden administrarse oralmente y no presentan problemas en el humano, lo que los convierte en los fluorocromos de elección en estudios clínicos (4, 6, 64, 67). No obstante las tetraciclinas pueden teñir los dientes y los defectos del esmalte, lo cual desaconseja su uso en niños y en mujeres embarazadas o en periodo de lactación (5). En experimentación animal, sin embargo hay que ser cauto, ya que a determinadas dosis pueden resultar tóxicas, como se ha publicado en caballo, rata y anfibios (5).

- Las **Fluoresceínas**, representadas por la **calceína** que presenta una intensa fluorescencia de color verde, al ser excitada por la luz ultravioleta-azul. El estudio y desarrollo de la **calceína** como fluorocromo se remonta a los años 60, 70 del pasado siglo (79). Debido a su intensa fluorescencia y su resistencia a la disminución de la señal, es el fluorocromo de elección para los estudios en animales, no habiéndose publicado efectos indeseables a las dosis utilizadas como marcador (79, 83).
- Las **Alizarinas**, son colorantes naturales derivados de una planta, que empleados como fluorocromos muestran una fluorescencia roja a la luz ultravioleta. En la actualidad, se emplea la **Alizarin complexona** por presentar una fluorescencia más intensa y una menor toxicidad, ya que la dosis recomendada no muestra efectos indeseables en una gran variedad de especies animales (5).
- Finalmente dentro de la categoría de otros fluorocromos destaca el **Xilenol Orange**, que muestra una fluorescencia roja o anaranjada, ha sido empleado en una gran variedad de animales y no parece presentar efectos tóxicos, no obstante caso de poder elegir, es mejor utilizar Alizarina, porque la dosis a administrar es menor (84).

## Indicaciones

Básicamente, los fluorocromos se han utilizado para los estudios dinámicos óseos en clínica humana y en estudios experimentales animales. En clínica humana (5), la finalidad más frecuente es la valoración del recambio del hueso trabecular o endocortical en biopsias de cresta ilíaca (4). Para ello, normalmente se utilizan dos fluorocromos de la familia de la tetraciclina, para evitar o minimizar los efectos tóxicos de la utilización de otros fluorocromos (7). Muchas veces se utiliza la misma tetraciclina dos veces, para evitar un error adicional de cantidad de marcado, ya que existe evidencia de que distintas tetraciclinas tienen distinta capacidad de marcado (64, 67).

En estudios experimentales con animales el espectro de aplicación es

notablemente más amplio que en la clínica humana (5). Así en los experimentos animales, el marcaje con fluorocromos puede utilizarse para estimaciones de la formación del hueso trabecular, endocortical, intracortical y perióstico. También puede utilizarse para la valoración del crecimiento óseo en longitud, y para la reabsorción ósea y finalmente puede utilizarse para diseños de múltiple marcado (70, 78, 85).

Si utilizamos como índice de clasificación las distintas entidades fisiopatológicas en humano o en animales de experimentación, encontramos que en humano, el marcado fluorescente se ha utilizado para el estudio de la remodelación ósea (6), la osteoporosis general (64) o la vertebral (68) y la postmenopáusica (69). En los animales de laboratorio, la lista es más larga, y así en rata, con mucho el animal más frecuentemente utilizado, se ha aplicado el marcado fluorescente al estudio de la remodelación (6), el crecimiento de la dentina (79), los efectos de la deficiencia en vitamina D (80), la hipofosfatemia (81), la diabetes (83), el hipoestrónismo generado hormonalmente (86), la osteogénesis y osificación endocondral (87), las diferencias entre la modelación y la remodelación (88), el crecimiento del hueso alveolar dental (89), las deficiencias androgenicas y la remodelación en ratas viejas (90, 91). La oveja se ha utilizado para el estudio de la adaptación del hueso trabecular (92), la reparación ósea mandibular (93), la osteointegración de cilindros huecos colocados en vertebra (94). El cobaya se ha empleado para el estudio de la osificación coclear (72). La gallina para estudiar la relación entre la dinámica ósea y la puesta de huevos (95). También se han utilizado para valorar el desarrollo del frente de calcificación *in vitro* (77, 96). El estudio del microdaño óseo por carga o fatiga (97-99). La reacción a distintos tipos de implantes (100-102) generalmente con resultados poco discriminativos. Y finalmente, problemas técnicos derivados del empleo de los fluorocromos, como el espesor de corte (103), la correlación del marcado con el tipo de corteza ósea (104) y la cantidad de marcado en relación con la biología ósea, modelación y remodelación (105).

En nuestra revisión bibliográfica hemos encontrado pocas referencias al empleo de los fluorocromos en el estudio de la osteointegración (75, 92, 93, 100) y todos ellos con resultados poco concluyentes, así que reservaremos el análisis de estos trabajos y sus resultados al apartado de discusión.

# MATERIAL Y MÉTODOS

# 4. MATERIAL Y MÉTODOS

## 4.1. BIOMATERIALES GRANULADOS BASADOS EN MONETITA

En este trabajo se han evaluado materiales diseñados y fabricados por Azurebio S.L. (Madrid), basados en monetita ( $\text{CaHPO}_4$ ) y gel de sílice ( $\text{H}_2\text{SiO}_3$ ). Algunos de ellos contienen además otro compuesto de silicio como la ps-wollastonita ( $\alpha\text{-CaSiO}_3$ ), capaz de liberar especies iónicas de silicio al medio biológico y estimular la regeneración ósea. Por otro lado pueden contener otro fosfato de calcio, además de monetita, como hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA;  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ) que debido a su diferente grado 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 zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), para aprovechar la capacidad osteoinductora atribuida a dicho elemento.

En total se han estudiado nueve 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.

Como **control** se han rellenado los defectos óseos de tamaño crítico por un material granulado comercial denominado **Bio-Oss**<sup>®</sup> (n=4), que es hidroxiapatita de origen bovino.

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 los materiales **Z-2** (n=6) y **C-5** (n=5) compuestos por gránulos de monetita, que pueden presentar o no sustitución iónica de zinc, y como fuente de silicio presentan ps-wollastonita y gel de sílice.
- **Grupo II:** Formado por cinco materiales: **OO-4** (n=7), **V-6** (n=7), **PP-8** (n=7), **LL-9** (n=7) y **AA-10** (n=10). Son gránulos de monetita, con o sin sustitución iónica, y gel de sílice, como única fuente de iones de silicio. Todos, menos el material **V-6**, presentan CDHA.
- **Grupo III:** Formado por los materiales **U-3** (n=7) y **NN-7** (n=7), en cuya composición muestran un porcentaje muy bajo de monetita (sustituida por Zinc en el material **U-3**), CDHA y como fuente de silicio, ps-wollastonita y de gel de sílice.

Debido a que no es el tema ni propósito de esta tesis el estudio de la síntesis de los materiales, no se van a describir los procesos de síntesis de éstos basados en una reacción de cementación. No obstante el lector interesado podrá encontrar la descripción pormenorizada en el texto que se cita a continuación (106). Lo que si mostraremos serán unas tablas indicando la composición de cada material, clasificados en grupos como anteriormente se ha comentado.

## Composición

La clasificación de los materiales atendiendo a su composición final es la siguiente:

### Grupo I:

Los materiales **Z-2** y **C-5** son muy similares en composición, la mayor diferencia es que el material **Z-2** presenta sustitución iónica de la monetita.

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

GRUPO I	M (%)	M-Zn (%)	GS (%)	ps-W (%)
Z-2		60	34	6
C-5	58		34	8

### Grupo II:

A este grupo pertenecen aquellos materiales que están formados por altos contenidos de monetita y solo un 7% de compuestos de silicio, en concreto gel de sílice.

Este es un sistema más sencillo que el anterior, donde el objetivo era estudiar la influencia de sustituciones iónicas como el  $Zn^{2+}$  (materiales **OO-4** y **AA-10**), así como la influencia de la sustitución de parte de la monetita por la CDHA que presenta una reabsorción menor que la monetita. El material **V-6** es el único de este grupo II que no presenta CDHA en su composición.

**Tabla 2.** Composición final de los materiales del grupo II.

GRUPO II	M (%)	M-Zn (%)	CDHA (%)	GS (%)
OO-4		63	30	7
V-6	93			7
PP-8	63		30	7
LL-9	78		15	7
AA-10		78	15	7

### Grupo III:

Formado por los materiales **U-3** y **NN-7** caracterizados por presentar poca cantidad de monetita, en comparación con los otros dos grupos, y un elevado contenido de gel de sílice. Además están compuestos por CDHA y ps-wollastonita. El material **3** tiene monetita sustituida por  $Zn^{2+}$ .

**Tabla 3.** Composición final de los materiales del grupo III.

GRUPO III	M (%)	M-Zn (%)	GS (%)	CDHA (%)	ps-W (%)
U-3		20	27	46	7
NN-7	35		22	24	18

## 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 12 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 (107), lo cual no es posible en razas más pequeñas.

La composición mineral no difiere significativamente entre el humano y los animales (108), considerándose la oveja como un modelo válido para evaluar la regeneración ósea y la actividad de remodelación en humanos (109).

## 4.3. 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 m<sup>2</sup>. 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 (Piensos 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.

## 4.4. PROTOCOLO QUIRÚRGICO

### Material quirúrgico

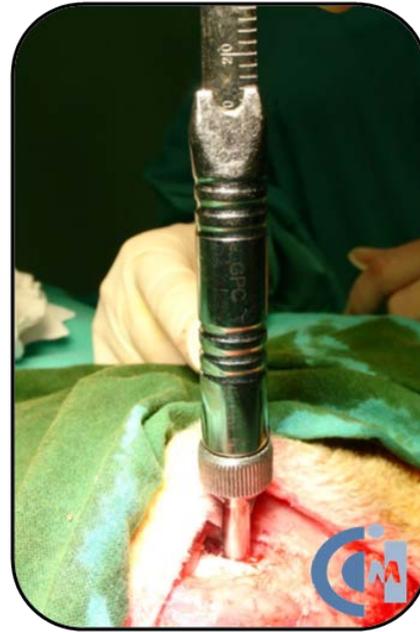
- Bisturí con hoja del nº 11 y 22.
- Pinzas de Adson sin dientes.
- Pinzas sin dientes.
- Pinzas con dientes.
- Tijera de disección.
- Porta-agujas.
- Tijera de hilo.
- Pistola de motor neumático con brocas de distinto tamaño: 2.5,4,5.5,6.5 y 8 mm.

### 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.I-III**). Estos orificios se marcaron inicialmente con una guía y se fueron ampliando progresivamente con varias brocas de menor a mayor tamaño. Esta dimensión de los defectos óseos se considera crítica de forma que no se pueda producir una regeneración ósea espontánea. En caso de sangrado se introducía una pieza de Espongostan® (Nycomed Pharma) retirándose a los 2 minutos. Posteriormente se procedió al relleno de defectos óseos con gránulos de los diferentes materiales, compactándolo constantemente con la superficie lisa de la broca para asemejar la cantidad de material colocado en todos los orificios, y localización aleatoria (**Fig.IV**).



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



**Fig.II.** Medida de las dimensiones del defecto.

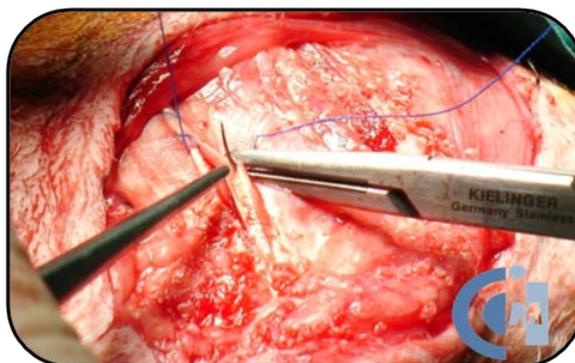


**Fig.III.** Defecto óseo de tamaño crítico.



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

Tras la implantación del material se colocó 1 cm<sup>2</sup> 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. V**). El tejido subcutáneo y la piel (**Fig. VI**) se cerraron con material trenzado absorbible 2/0 (Polysorb™, Covidien) y 0 (Polysorb™, Covidien), respectivamente.



**Fig.V.** Cierre del tejido muscular.



**Fig.VI.** Sutura simple discontinua en piel.

Los animales se vendaron 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.VII**).



**Fig.VII.** 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 Ceftiofur (Excenel<sup>®</sup>RTU 50mg/ml. Pharmacia Spain, S.A.) vía IM a dosis de 1mg/kg/día durante 7 días, analgésica con buprenorfina (Buprex<sup>®</sup>. Shering-Plough, S.A.) vía IM a dosis de 0.01mg/kg/12h durante 3 días y anti-inflamatoria con Carprofeno (Rymadil<sup>®</sup>. Pfizer S.A.) vía IM a dosis de 2mg/kg/12h durante 7 días.

## **4.5. PROTOCOLO ANESTÉSICO**

### **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.

### **Monitorización**

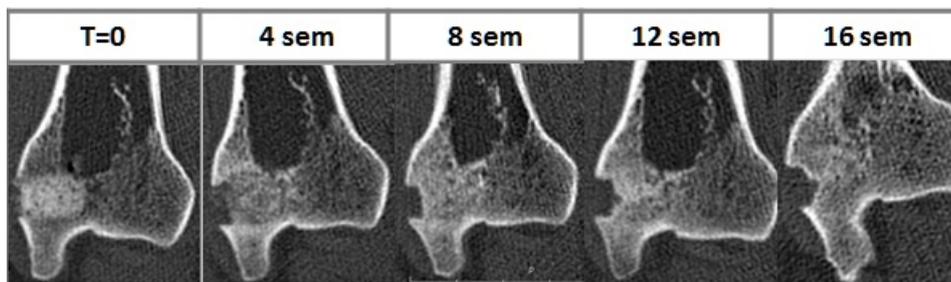
Durante el mantenimiento anestésico se registraron los siguientes parámetros en diferentes tiempos a lo largo del estudio:

- 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 cardiaca 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.

## 4.6. SEGVIMIENTO 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.VIII**), 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. Aprovechando esta circunstancia, a la vez que se realizaban los TAC se realizó la administración de los marcadores fluorescentes, con la siguiente pauta: a las 4 semanas de implantación de los materiales se administró la tetraciclina, a las 8 semanas la calceína, a las 12 semanas el xilenol orange y por último a las 15 semanas el marcador alizarin complexona, aunque aquí no se realizó el TAC, ya que el último TAC se realizó *post mortem* a las 16 semanas de experimentación.



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

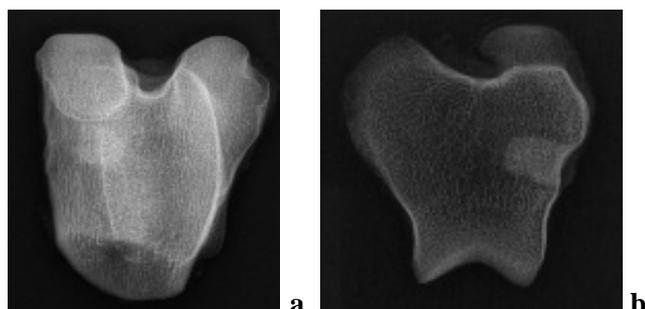
Una vez finalizado el periodo de estudio, 16 semanas, los animales fueron sacrificados humanitariamente procediendo a la extracción en bloque del tejido óseo de las zonas implantadas en cada animal. El método eutanásico que se utilizó consistió en una inyección intravenosa de cloruro potásico una vez 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 10%.

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.

## 4.7. 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.IXa**) y después se hicieron cortes, obteniendo 3 partes del hueso, para tomar una segunda radiografía de la loncha que presenta el defecto (**Fig.IXb**), para una mejor demostración del lugar de implantación.



**Fig.IX.** 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.

## 4.8. PROTOCOLO HISTOLÓGICO

Una vez radiografiados, los huesos se 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.

### **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 (110).

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.X**).



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

## 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.XI**).



**Fig.XI.** 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  $\mu\text{m}$  hasta llegar a la pieza ósea, vigilando y mojando con alcohol. Una vez se llega a la pieza, se empieza a cortar a 5  $\mu\text{m}$ , desechando los primeros cortes que salen. Los cortes de 5  $\mu\text{m}$  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  $\rightarrow$  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.

## **Protocolo tinciones**

Las microfotografías que se presentan en este trabajo están realizadas con las técnicas (111) que se exponen a continuación, por lo que se obviará su descripción en cada una de las figuras presentadas.

### **Tricómico 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.

### **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.

### **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.

## **4.9. MARCADO FLUORESCENTE Y MORFOMETRÍA**

En la realización de este trabajo se administraron cuatro fluorocromos, secuencialmente a intervalos de un mes, menos el intervalo entre el penúltimo (Xilenol orange) y último marcador (Alizarin Complexone) que fue de tres semanas, como se ha comentado anteriormente en el apartado de seguimiento y recogida de muestras. Por lo que la dinámica de administración de los fluorocromos fue la siguiente: Tetraciclina a las 4 semanas, Calceína a las 8 semanas, Xilenol Orange a las 12 semanas y Alizarin Complexone a las 15 semanas. Los detalles se resumen a continuación en **tabla 4**, y el protocolo que seguimos fue el utilizado por la mayoría de los autores, concretamente el expuesto por Erben (5) y confirmado por Van Gaalen (3).

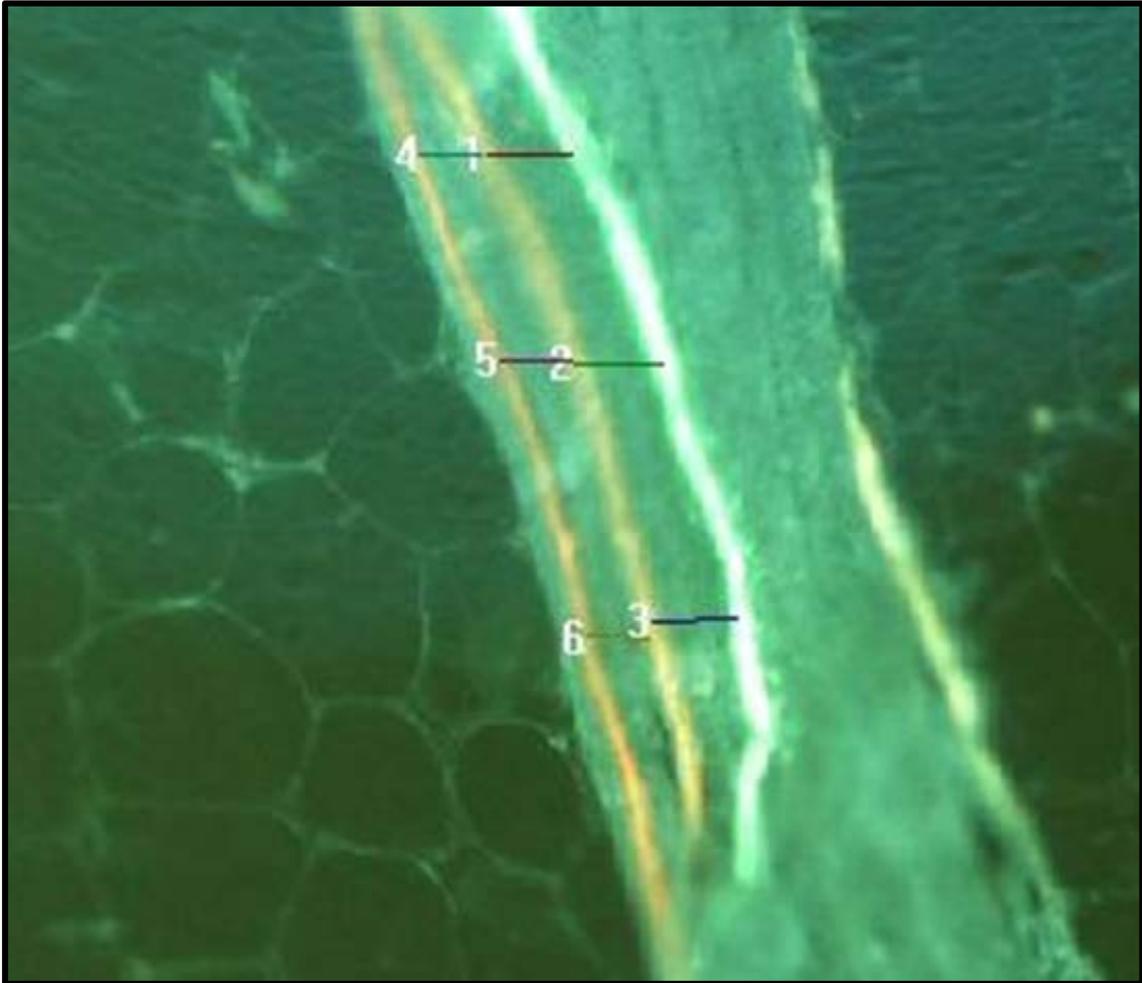
**Tabla 4.** Preparación y administración de fluorocromos.

	<b>Tetraciclina</b>	<b>Calceína</b>	<b>Xilenol orange</b>	<b>Alizarin complexone</b>
<b>Medio de preparación</b>	Suero salino fisiológico (NaCl 0.9% ), ajustar pH 6-6.5	NaHCO <sub>3</sub> 1.4%	NaHCO <sub>3</sub> 1.4%	NaHCO <sub>3</sub> 1.4%
<b>Concentración</b>	25 mg/mL	20 mg/mL	90 mg/mL	30 mg/mL
<b>Dosis</b>	25 mg/Kg	10mg/Kg	90 mg/Kg	25 mg/Kg
<b>Precauciones</b>	Preparar al momento o el día antes. No almacenar ( <b>no es estable</b> ). Utilizar <b>agua para inyección libre de endotoxina</b>	Disoluciones en NaHCO <sub>3</sub> producen CO <sub>2</sub> por lo que es necesario <b>abrir el vial</b> para liberar el gas antes de administrar.		
<b>Esterilización</b>	mediante un <b>filtro de 0.22 µm</b>			
<b>Almacenamiento</b>	en <b>oscuridad</b> y a <b>4°C</b>			
<b>Administración</b>	Administración vía intravenosa, debe ser una <b>administración muy lenta (5 min)</b> . Puede formar quelatos de calcio en la sangre por lo que existe riesgo de hipocalcemia severa que pueden resultar fatales en algunos casos. Las dosis a utilizar en el ensayo han resultado seguras para ovejas, hay estudios que utilizan concentraciones de casi el doble de las utilizadas aquí.			

La preparación de las muestras, básicamente fue similar a la utilizada para la histología convencional, ya descrita, pero una vez obtenidos los cortes, estos no fueron teñidos sino que se colocaron sobre el porta objetos, humedecidos con una mezcla de agua y glicerina, hasta su observación y fotografía. Por precaución para evitar la pérdida de señal, las muestras se guardaron en cajas histológicas envueltas en papel de aluminio, en la nevera (las muestras así preservadas han mantenido la señal, al menos dos años).

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se captaron por microscopia de fluorescencia utilizando los filtros (BV-2A (400-440nm), FITC (465-495) y G-2A (510-560nm) con una máquina fotográfica Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon eclipse 90i, y un objetivo de 10x.

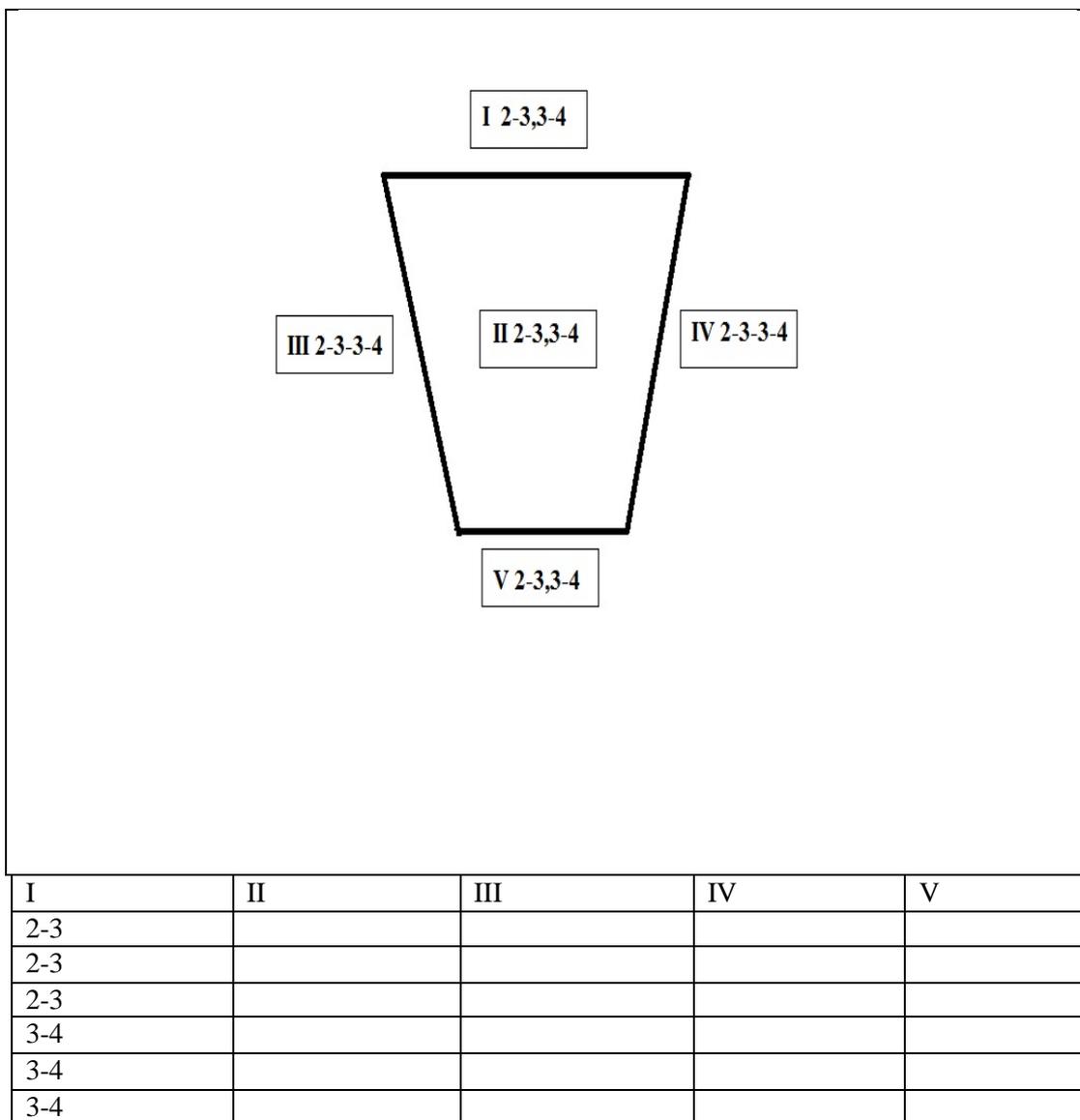
Las fotografías obtenidas de las zonas de los distintos casos de los materiales fueron medidas con el programa MetaMorph Meta Imaging Series 6.1 y las mediciones llevadas a plantillas se trasladaron a hojas de Excel para su análisis estadístico.



**Fig.XII.-** Microfotografía de fluorescencia que muestra tres bandas de fluorocromos en la estructura ósea, la banda más interna de color amarillo verdoso corresponde a la Calceína, la banda intermedia de color naranja corresponde al Xilenol Orange y la banda más externa, yuxtamedular corresponde a la Alizarin Complexone. Se observan las barras correspondientes a las mediciones de las distancias entre las bandas **1, 2 y 3** medición entre Calceína y Xilenol Orange (2-3) y **4, 5 y 6** entre Xilenol Orange y Alizarin Complexone (3-4). Filtro de fluorescencia: BV-2A (400-440nm).

A continuación se mostrará la plantilla utilizada para las mediciones de los fluorocromos. En la porción superior, en negrita se representa el contorno idealizado de la lesión ósea. De la lesión se seleccionaron cinco áreas, en romanos I-V correspondientes a la porción superficial de la cortical ósea (I), el centro de la lesión (II), los bordes laterales (III-IV) y finalmente la porción profunda (V). Se obtuvieron fotografías de las distintas zonas que mostraban bandas más o menos paralelas de los fluorocromos, fácilmente reconocibles por la localización relativa en la estructura ósea y la distinta coloración de las mismas (**Fig.XII**). La distancia entre las bandas (2-3 y 3-4) fue medida en tres intervalos (**Fig.XII**. líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6) y registrada en la plantilla adjunta al esquema de la lesión en cada una de las zonas.

Debido a la evolución temporal de la síntesis y remodelado óseo hubo que renunciar al estudio de la primera zona de marcado (Tetraciclina), bien por ausencia debido a remodelado o por irregularidades en la presencia que impedían las medidas regladas interbandas (112-115).



### Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos se almacenaron en una hoja de cálculo (Microsoft Excel 2010 para Windows®) y se realizó un análisis de parámetros descriptivos básicos a partir de los cuales se elaboraron histogramas de Barras a partir de las medias correspondientes y su error típico. Los datos almacenados en las correspondientes hojas de cálculo fueron exportados a la aplicación estadística SPSS statistics®. Para evaluar la normalidad de los datos se aplicó el test Kolmogorov-Smirnov obteniéndose un p valor mayor de 0,05 con lo cual se asume que la variable se ajusta a la normalidad. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza de

una entrada (ANOVA1). A continuación, se aplicó el test de Tukey que permite comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Se consideró significativo un valor de p menor que 0,05. Los resultados se expresaron como media más menos error estándar de la media (EEM).

Las comparaciones entre materiales, zonas y los distintos tiempos, se llevaron a cabo mediante un Análisis de la Varianza de dos vías. Para las comparaciones múltiples se consideró la corrección de Bonferroni. Todos los procedimientos estadísticos fueron realizados utilizando IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2014. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) con un nivel de significación de  $p=0.05$ .

En este apartado no se consideró al material 2, debido a que no obtuvimos un tamaño muestral suficiente.

# RESULTADOS

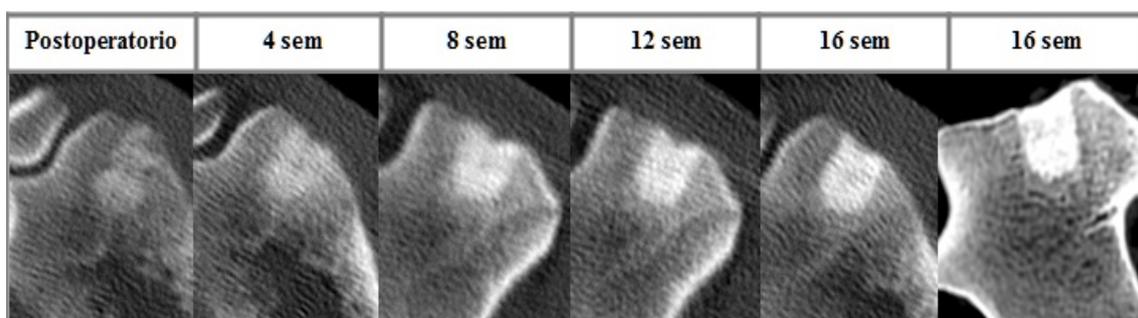
## 5. RESULTADOS

La exposición de los resultados se realizará en distintos apartados correspondientes, en primer lugar a los hallazgos obtenidos mediante histología convencional y morfología de los fluorocromos acompañada de la morfometría ilustrada en diagramas de barras para cada compuesto, es decir, primero el producto comercial, Bio-Oss®, y luego los tres grupos I, II y III de los tipos de granulados utilizados en este estudio. En segundo lugar se expondrán los resultados estadísticos, acompañados de su significación en relación con la composición química, los periodos de tiempo y las distintas zonas sujetas a medición.

### 5.1. ESTUDIO CON TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEN, HISTOLOGÍA Y MORFOMETRÍA

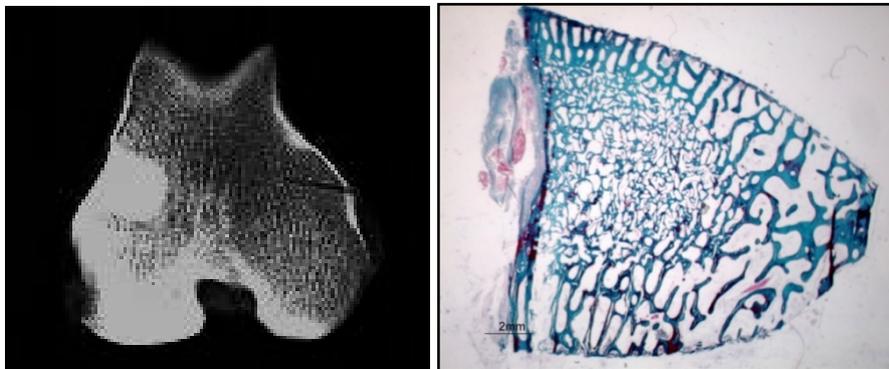
#### Bio-Oss®

Se ha realizado el estudio de los granulos de Bio-Oss®, (HA bovina) como material de referencia del resto de los grupos experimentales. Las imagenes correspondientes al estudio con TAC (Fig.A) muestran secuencialmente una progresiva densificación del área del defecto, desde el postoperatorio hasta las 16 semanas, observandose una zona mas clara en la porción central del defecto equivalente a la zona II de nuestro estudio (ver maqueta de material y metodos). La última imagen, mas nítida corresponde a la pieza quirurgica extraída tras el sacrificio.



**Fig.A.-** Secuencia de TAC realizados del caso 174 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.

En la Fig.B se muestra la radiología de la sección gruesa, similar a la última imagen de TAC. La imagen de lupa de la Fig.B muestra la génesis ósea en las distintas áreas de estudio, cortical (I), lesión (II), laterales (III y IV) y fondo (V). Notese como la zona de implantación muestra una regeneración ósea, a expensas de una red de trabéculas mas finas que las que forman el hueso esponjoso adyacente.



**Fig.B.-** Imagen radiológica y foto de lupa correspondiente al Caso 169.

El estudio histológico mediante inclusión en plástico, obviando la descalcificación y tinción con la técnica de Goldner (Figs.1-6), muestra las imágenes de las distintas zonas objeto de este trabajo.

La Fig.1 corresponde a la zona (I) cortical superficial que muestra dos zonas de osteoide en rojo intenso, una corresponde a la zona subperióstica (banda inferior) y otra a la zona endóstica.

La Fig.2 corresponde a la zona central (II) de la lesión, que presenta alguna franja osteoide, así como una partícula de material asociada a varias células multinucleadas.

Las Figs.3 y 4 que corresponden a las zonas laterales (III y IV) muestran escasa sustancia osteoide, espacios medulares, restos de Bio-Oss® (Fig.3) y espacios medulares y trabéculas de pequeño tamaño.

La Fig.5 corresponde al fondo de la lesión (área V), presenta muy escasa osteoide y restos de biomaterial asociados a células multinucleadas.

La Fig.6 corresponde a hueso esponjoso normal alejado de la lesión, muestra fina sustancia osteoide correspondiente a la remodelación normal y espacios medulares más amplios y de contornos más redondeados que los observados en las zonas de lesión (Fig.1 y 2).

Las Figs.7-12 muestran imágenes de las distintas áreas de la lesión mostrando los fluorocromos con el filtro BV-2A (400-440nm), que permite la identificación de los cuatro empleados: Tetraciclina (amarillo), Calceína (amarillo verdoso), Xilenol Orange (naranja) y Alizarin Complexona (naranja), estos dos últimos podían diferenciarse por la posición relativa de las marcas o utilizando un filtro de discriminación.

La Fig.7, correspondiente a la zona cortical (I) muestra los tres fluorocromos, estudiados estadísticamente, como líneas paralelas, la Calceína, amarillo-verdosa la más interna, luego el Xilenol Orange y finalmente en localización yuxtaperióstica, la Alizarin Complejona, el periostio no da señal fluorescente.

La Fig.8 muestra los tres fluorocromos en la zona central (II) de la lesión, la disposición circular del 3º fluorocromo ilustra remodelación osteonal, no lineal.

Las Figs.9 y 10 (correspondientes a las zonas III, y IV) ilustran la distribución lineal de los tres fluorocromos en zonas claramente trabeculares.

La Fig.11 corresponde al fondo de la lesión (V), y presenta muy poca distancia entre la 2ª y 3ª líneas de marcado.

La Fig.12 muestra las líneas de marcado en una trabécula normal a distancia de la lesión.

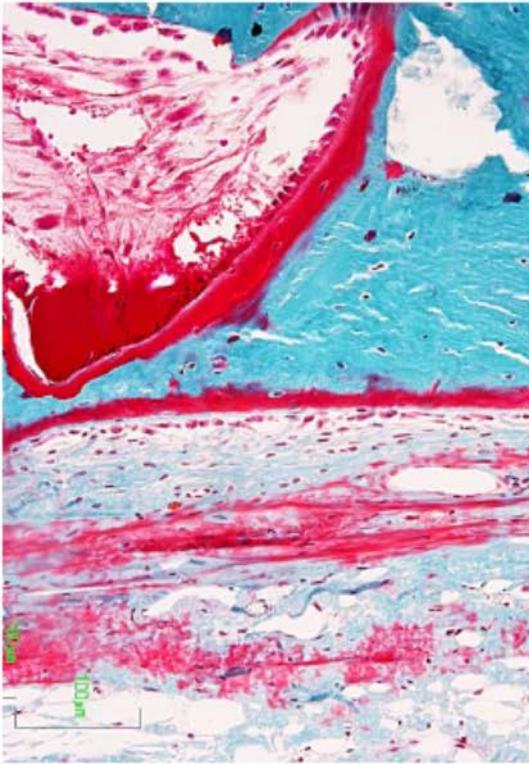


Fig.-1

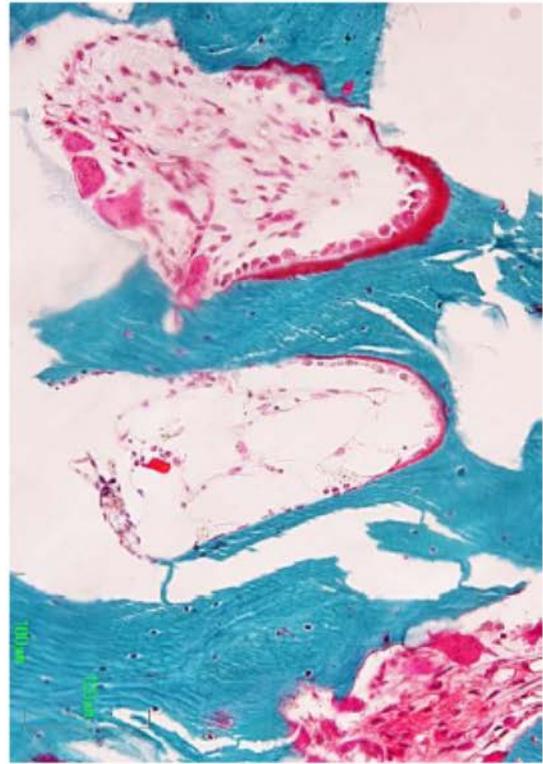


Fig.-2

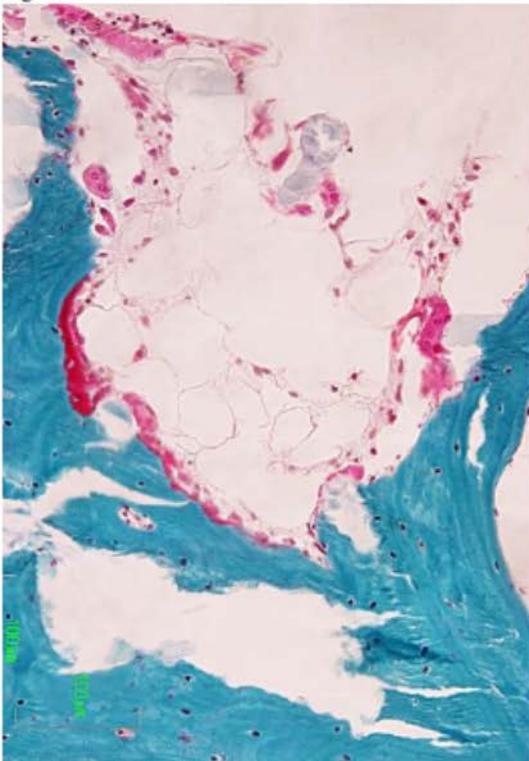


Fig.-3

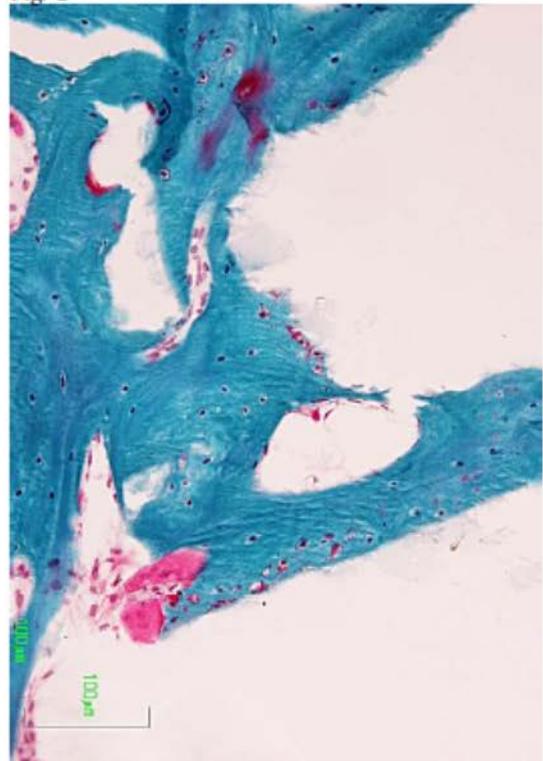


Fig.-4

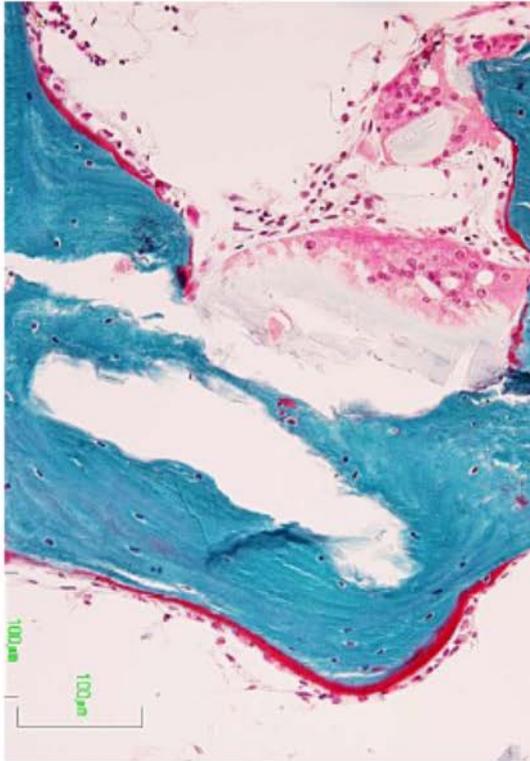


Fig.-5

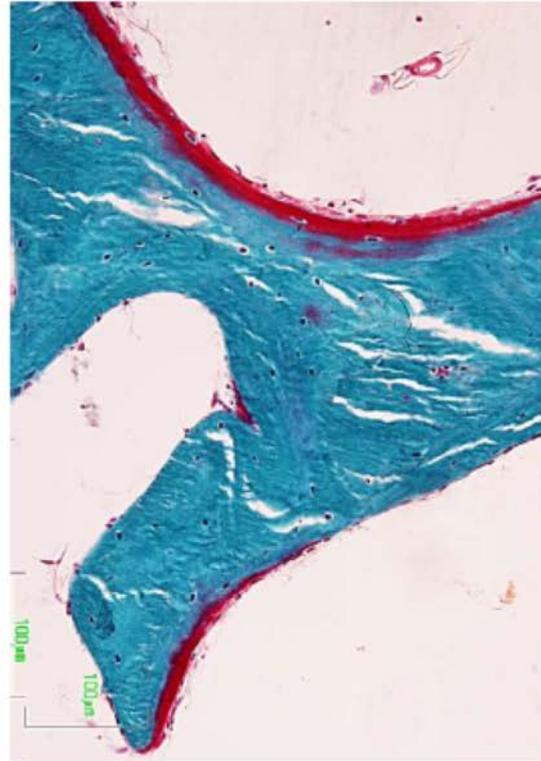


Fig.-6

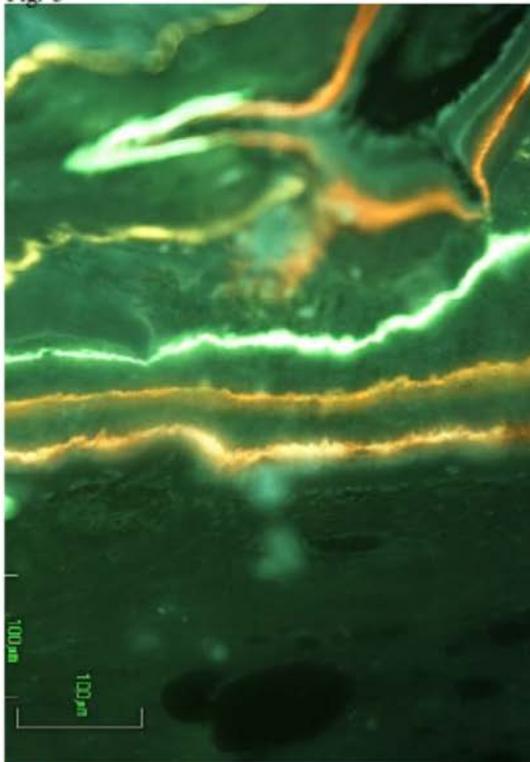


Fig.-7

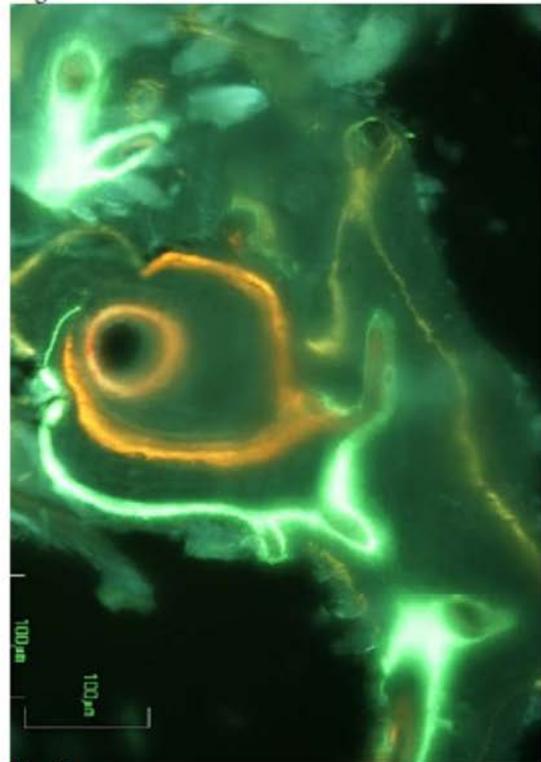


Fig.-8

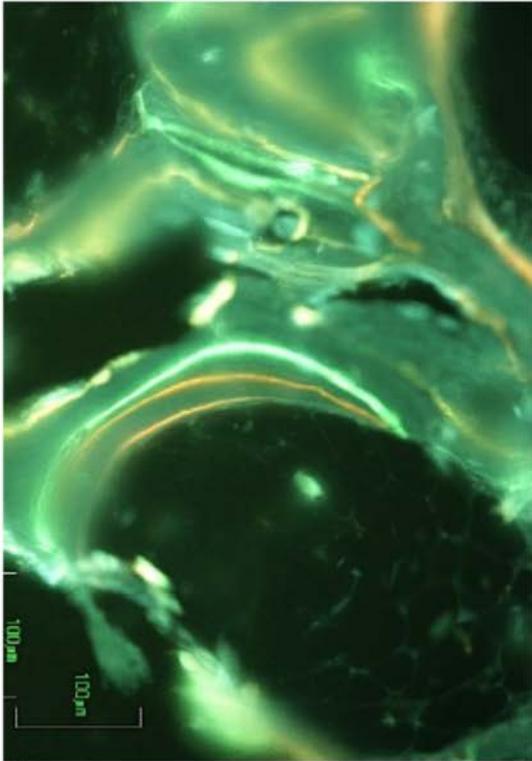


Fig.-9

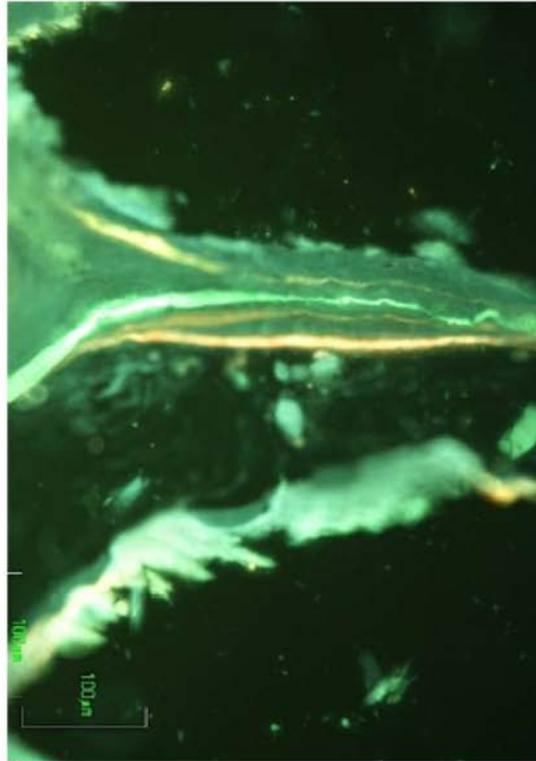


Fig.-10

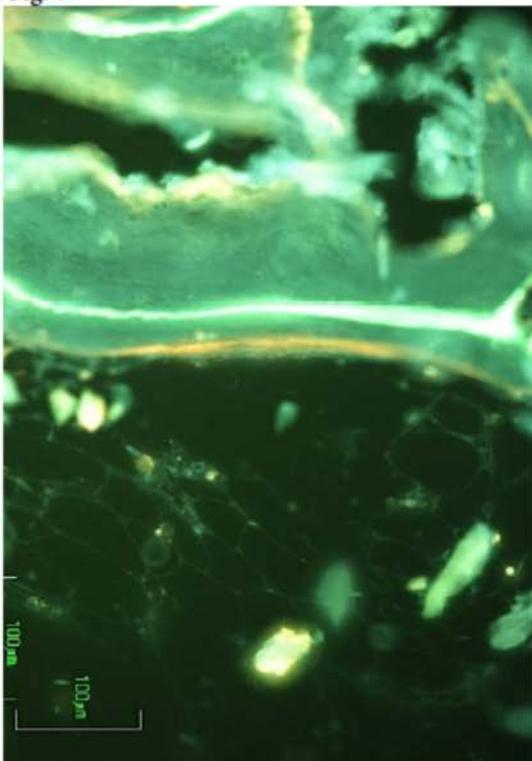


Fig.-11

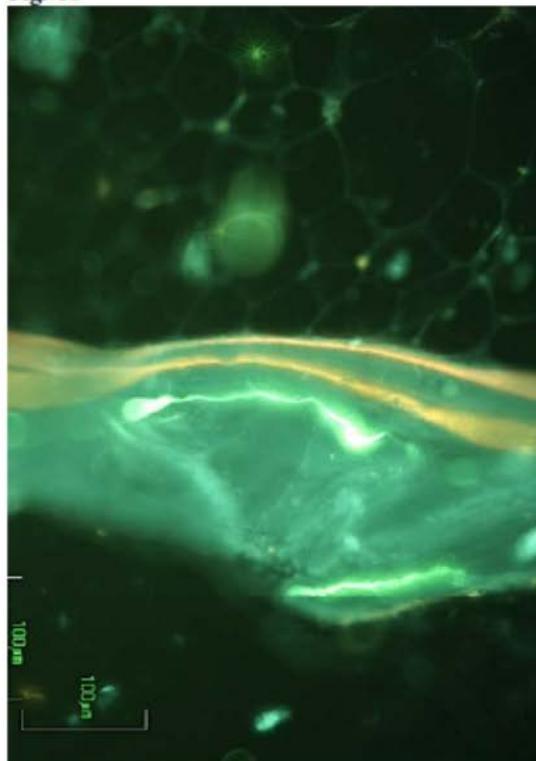


Fig.-12

Las medidas de las distancias entre las bandas de fluorocromos, se representaron en diagramas de barras (Diagramas 1 y 2). El examen del diagrama 1, demuestra una mayor formación de hueso en la zona I en el primer intervalo medido (2-3 versus 3-4), esta diferencia se invierte en la zona central de la lesión (II) y las diferencias no son muy grandes en las zonas laterales (III- y IV) y el fondo de la lesión (V).

El diagrama 2 muestra que la zona I es la que posee mayor cantidad de hueso neoformado, y que todas las áreas de la lesión poseen más hueso neoformado que las trabéculas normales de hueso esponjoso.

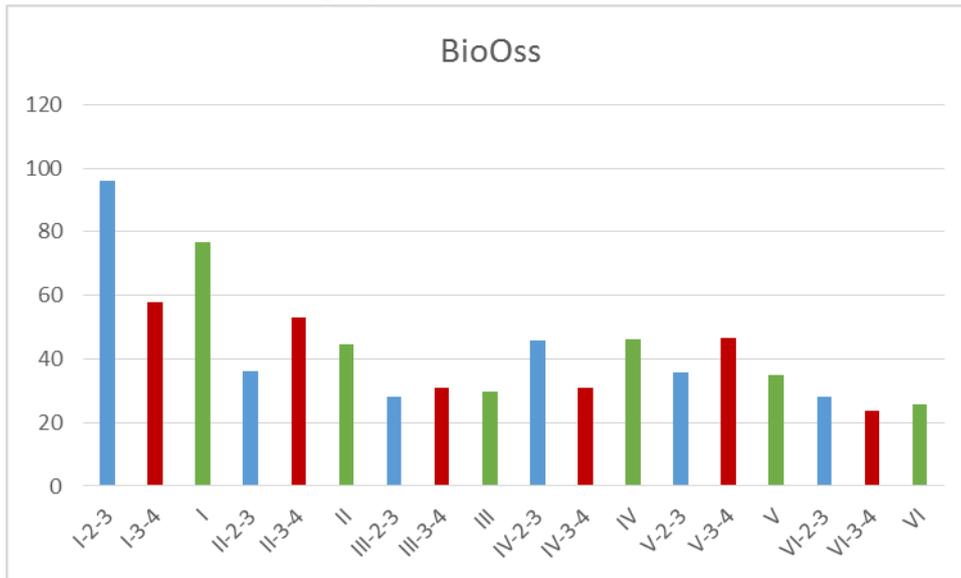


Diagrama 1.- Muestra en el eje de abscisas los valores de medición obtenidos: 2º y 3º fluorocromo (azul), 3º -4º fluorocromos (rojo) y el promedio de la zona (verde). Eje de ordenadas aparece la cantidad relativa.

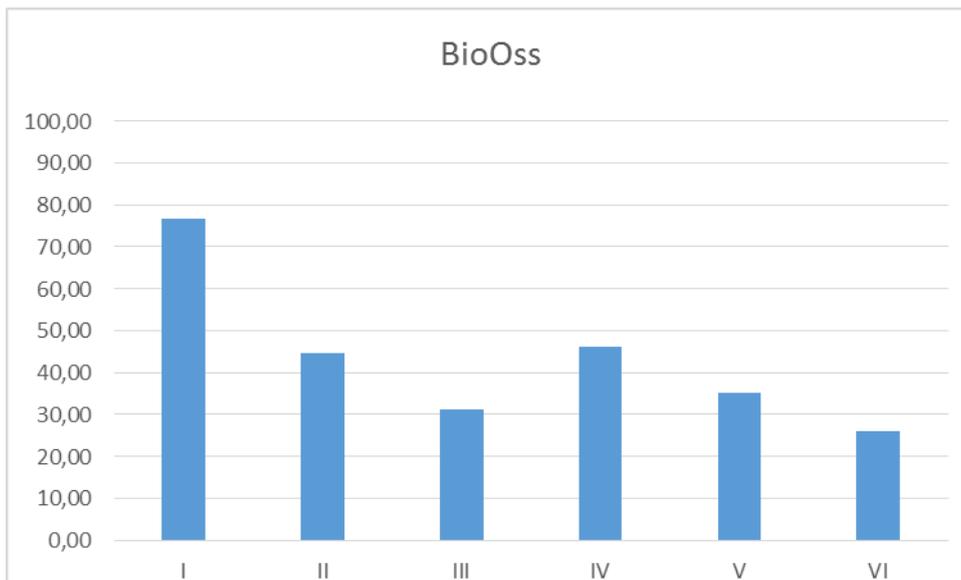
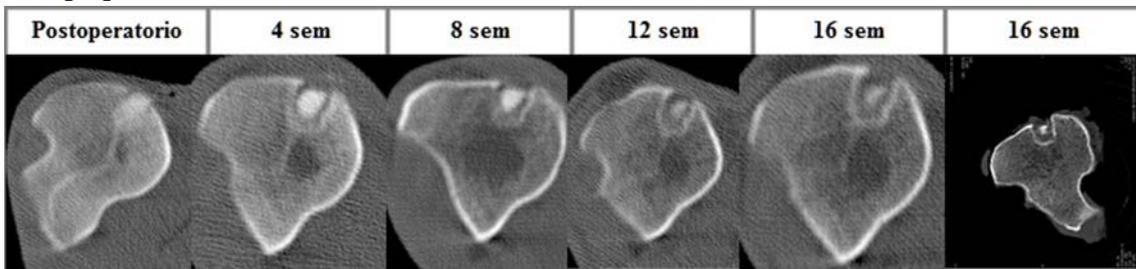


Diagrama 2.- Muestra los promedios de las distintas áreas (azul).

## Grupo I: materiales Z-2 y C-5

En el Grupo I se estudiaron dos materiales **Z-2** y **C-5** cuya diferencia fundamental reside en la monetita (**C-5**) y monetita con sustitución de Zn (**Z-2**). A continuación se exponen los resultados obtenidos con técnicas de imagen, histología convencional y marcado con fluorocromos.

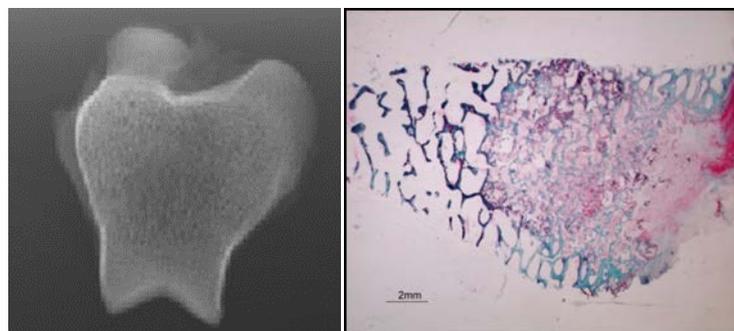
En la Fig.C se ilustra la secuencia de las imágenes de TAC del material **Z-2** que presentan en el área de lesión un núcleo central de densidad similar a la cortical ósea, rodeado de un halo claro de densidad similar al conectivo. En la Fig.D se ilustra la secuencia de TAC del material **C-5** que muestra en el defecto una densidad similar a la cortical ósea, si bien en la porción superficial la densidad es menor y similar a las partes blandas. La Fig.E muestra la radiología y la imagen de lupa del defecto del material 5 con una red trabecular parecida al hueso esponjoso normal aunque con cavidades medulares más pequeñas.



**Fig.C.-** Imagen de TAC del caso 191 del material **Z-2**.



**Fig.D.-** Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 180 del material **C-5**.



**Fig.E.-** Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico correspondiente al caso 180 del material **C-5**.

### **Material C-5**

El análisis histológico convencional correspondiente al material **C-5** (Caso 180), de los cortes teñidos con la técnica de Goldner (Figs.13-18), en las distintas zonas estudiadas (I-VI) muestra abundante tejido óseo neoformado (Figs.13 y 14), así como una buena integración del material (Figs.13 y 14) tanto en la superficie cortical como en el área central de la lesión, y en el fondo de la misma (Fig.17). Se encuentran células gigantes multinucleadas prácticamente en todas las áreas estudiadas (Figs.13-17). Las zonas de sustancia osteoide son más frecuentes en la zona central del defecto y en los bordes laterales (Figs.14, 15 y 16). Las trabéculas óseas del tejido óseo normal muestran escasa actividad de remodelación ósea (Fig.18).

El marcado con fluorocromos (Figs.19-24) muestra una discreta actividad de crecimiento óseo con las tres bandas características de los fluorocromos Calceína (amarillo verdoso), Xilenol Orange (naranja) y Alizarin Complexona (naranja). En el defecto, en varias zonas existen zonas de síntesis ósea después de la administración del último fluorescente (Figs.19-21). Las trabéculas óseas del hueso normal adyacente muestran escasa actividad como se demuestra por la existencia de únicamente dos bandas correspondientes al 2º y 3º fluorocromos.

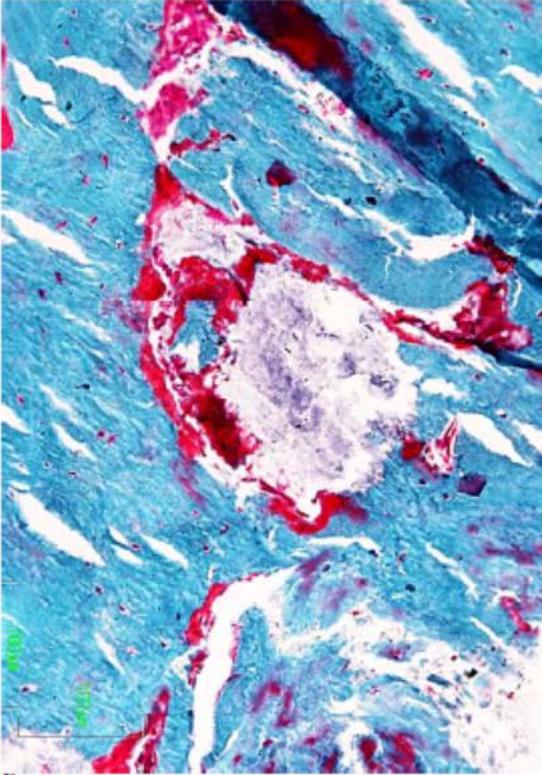


Fig.-13

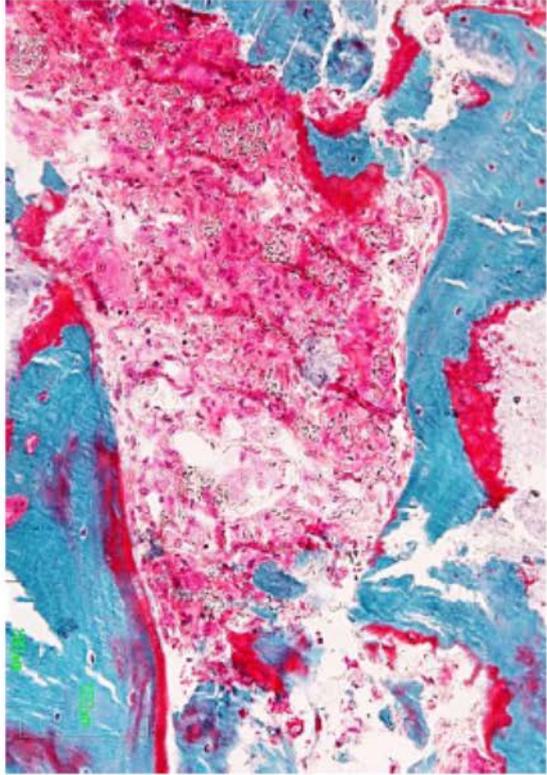


Fig.-14

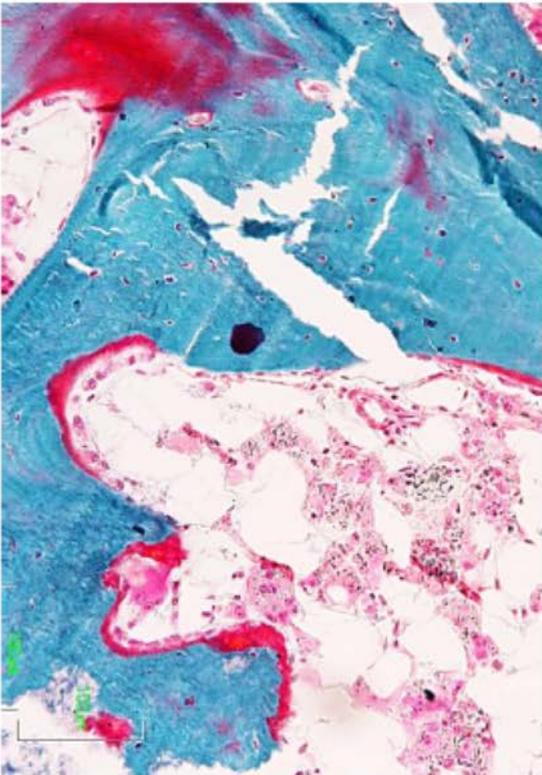


Fig.-15

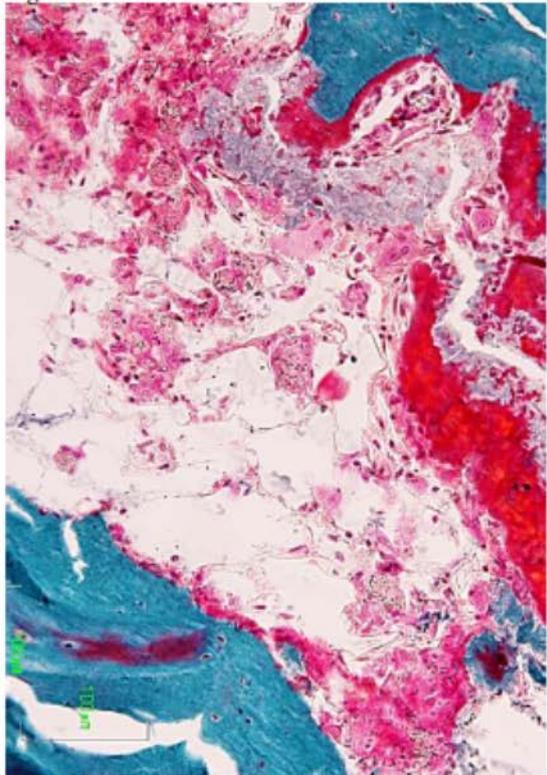


Fig.-16

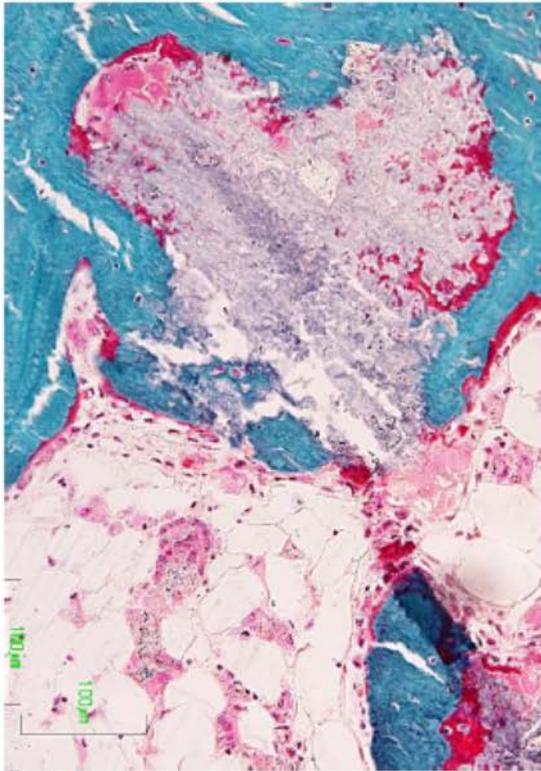


Fig.-17

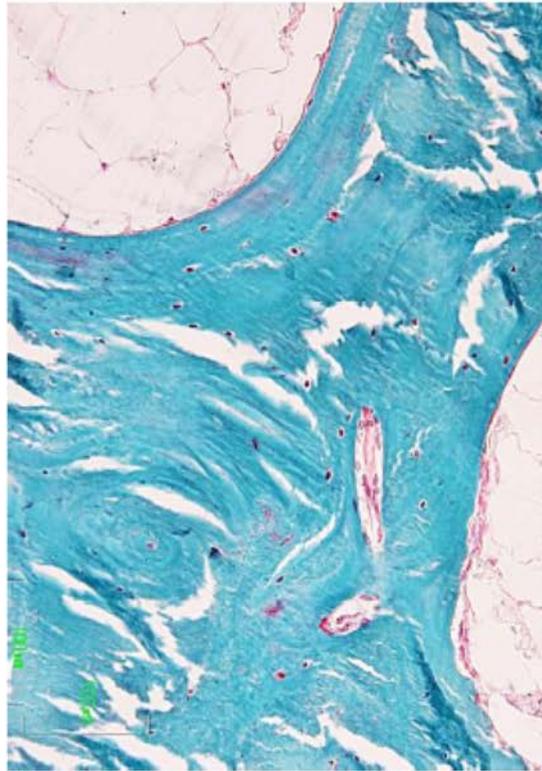


Fig.-18

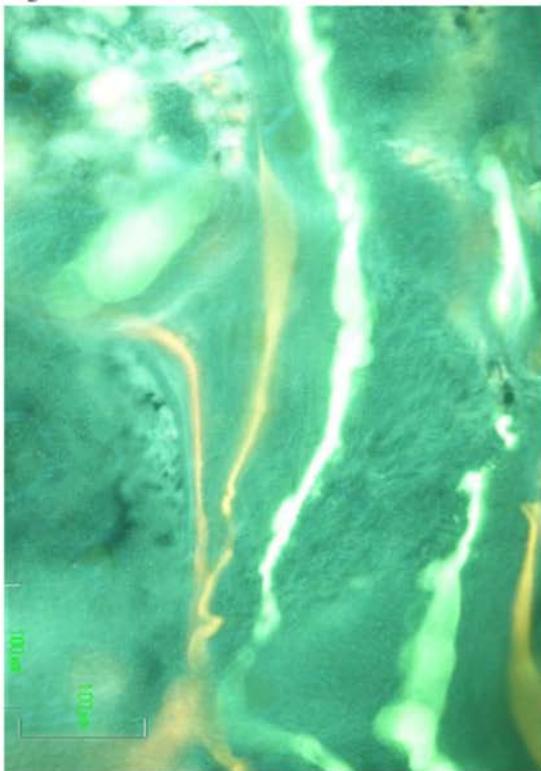


Fig.-19

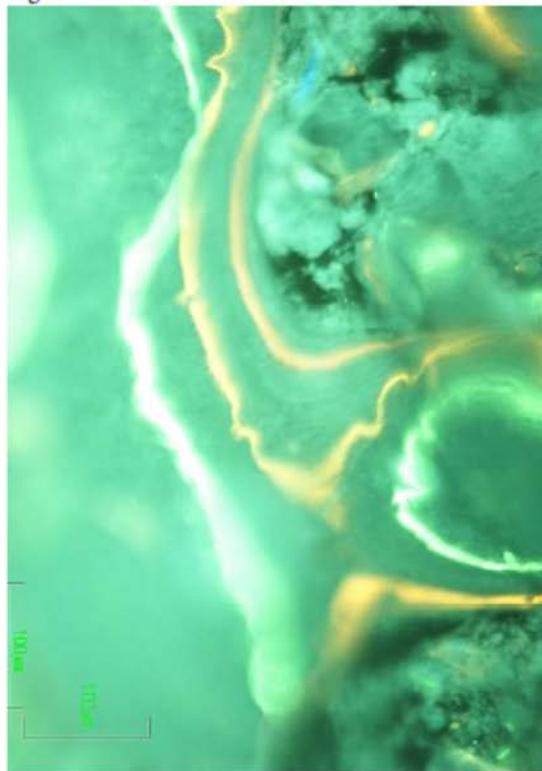


Fig.-20

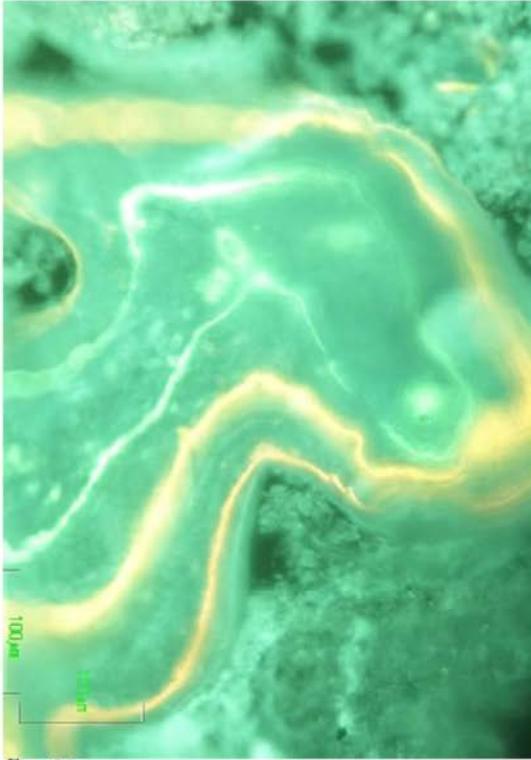


Fig.-21

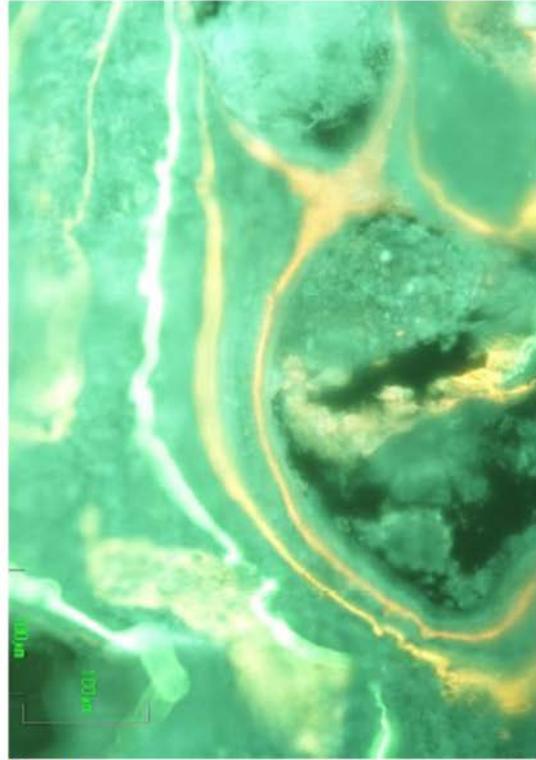


Fig.-22

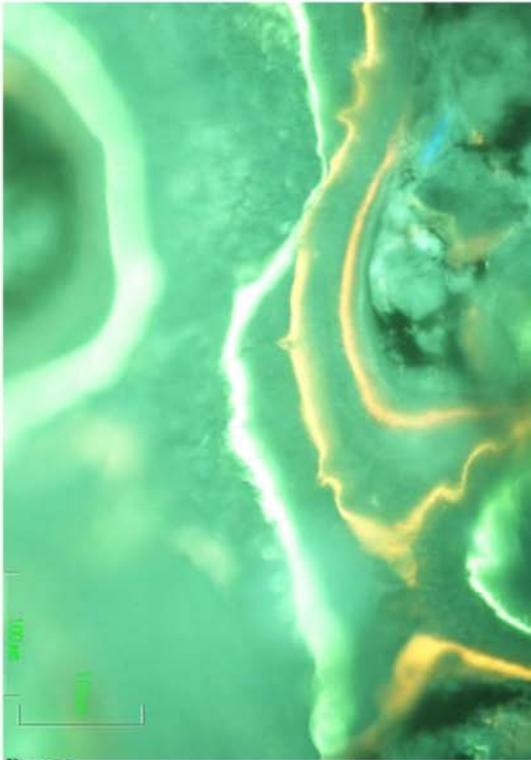


Fig.-23

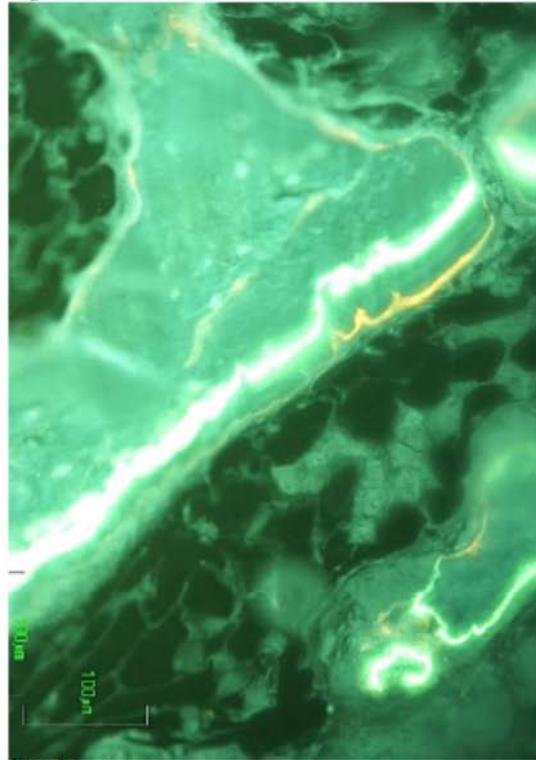


Fig.-24

En relación a los diagramas, se representan los datos morfométricos, correspondientes al material **C-5** de las medidas de las distintas zonas I-VI, bien por periodos 2º-3º y 3º-4º fluorocromo y promedio (Diagrama 3) o promedios (Diagrama 4).

En el diagrama 3, la formación ósea es menor en el segundo periodo (rojo) que en el primero (azul), con la excepción de la zona superficial cortical (I), donde es mayor en el segundo periodo.

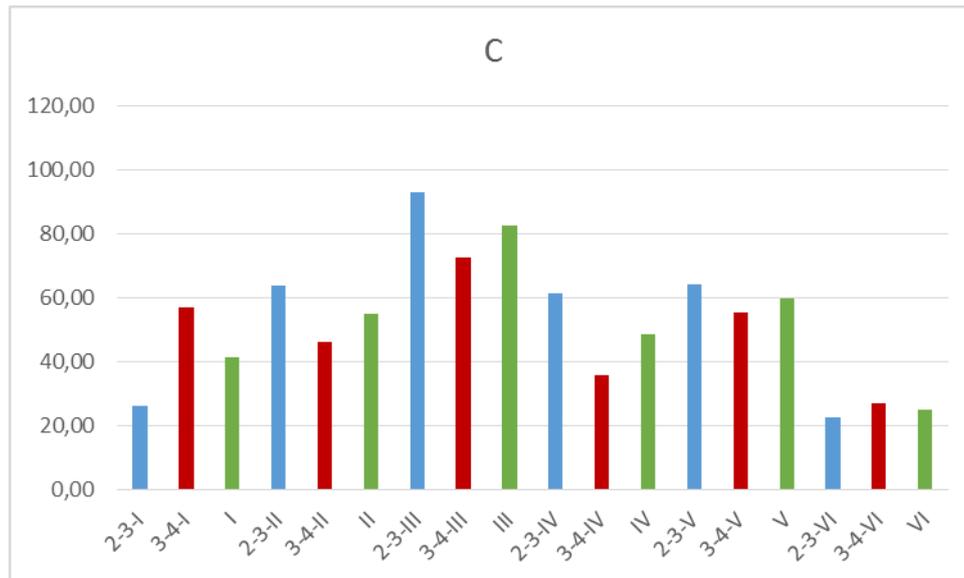


Diagrama 3.- Representación de las medidas en las distintas áreas de la colocación del material **C-5** (caso 180), primer periodo (2-3, en azul), segundo periodo (3,4, en rojo), promedio (verde).

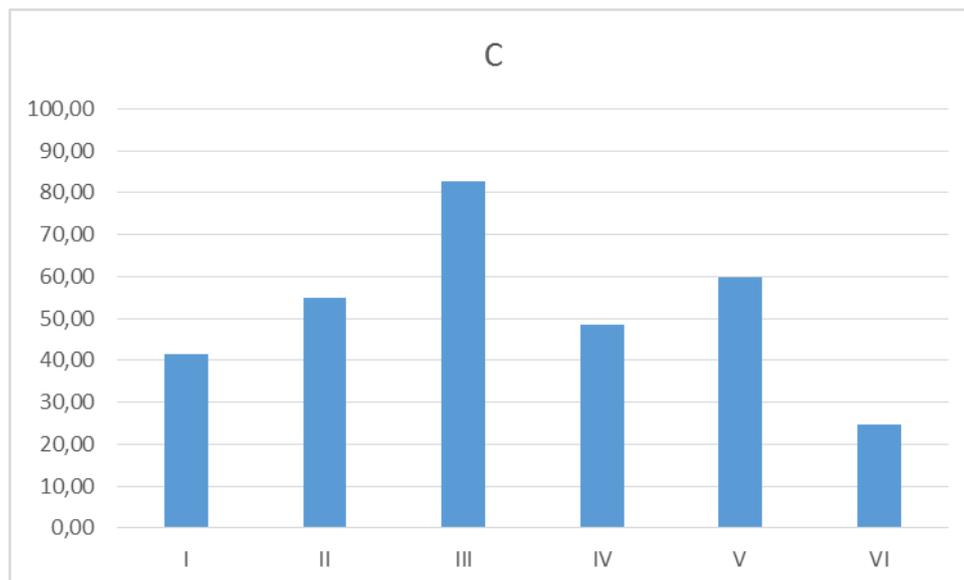


Diagrama 4.- Promedios de las medidas en las distintas zonas estudiadas en el material **C-5** (caso 180).

## **Material Z-2**

El estudio del material **Z-2** (Caso 191) mediante los cortes histológicos teñidos con Goldner, en las distintas zonas del material implantado (Figs.25-30) muestra una muy escasa e irregular síntesis de hueso (Figs.26-29). Se observan grandes focos de material, parcialmente osteointegrado (Figs.26-29), así como numerosos residuos de material, refringentes, de pequeño tamaño (Figs.25 y 29). Son frecuentes asimismo las células multinucleadas (Figs.25-29) y existe un infiltrado difuso de células inflamatorias redondas (Figs.25 y 28). Las trabéculas óseas adyacentes presentan escasa o nula actividad de remodelación ósea (Fig.30).

Las imágenes obtenidas con microscopia de fluorescencia (Figs.31-35) presentan una gran irregularidad en la disposición de las bandas con muy escasa coincidencia de los tres fluorocromos, debido a la escasez de tejido óseo formado (Fig.33), o a la formación extremadamente anárquica del nuevo hueso, lo cual hizo muy difícil realizar medidas (Figs.32, 34 y 35).

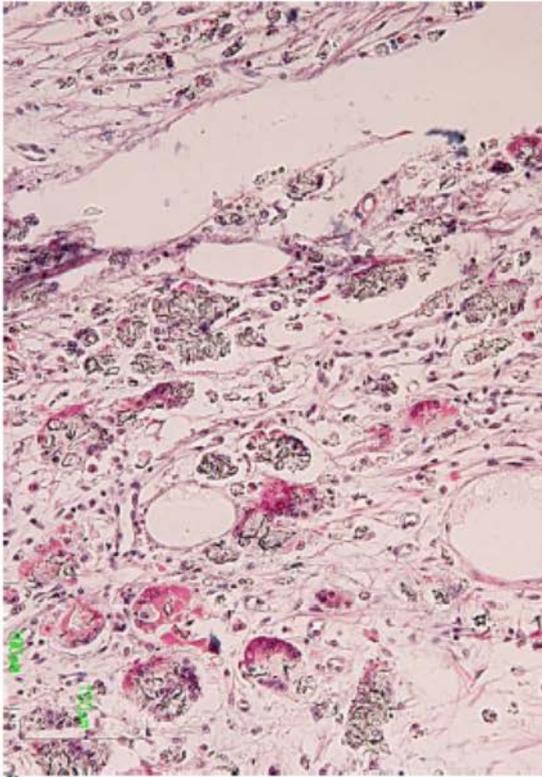


Fig.-25

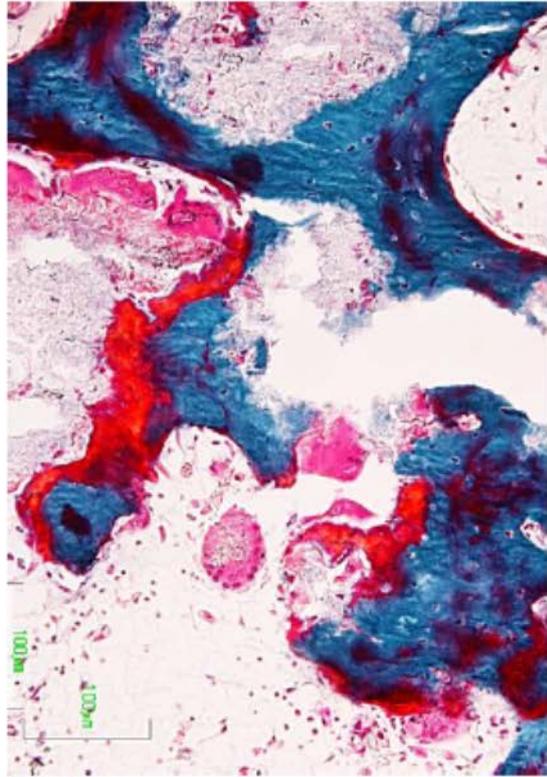


Fig.-26

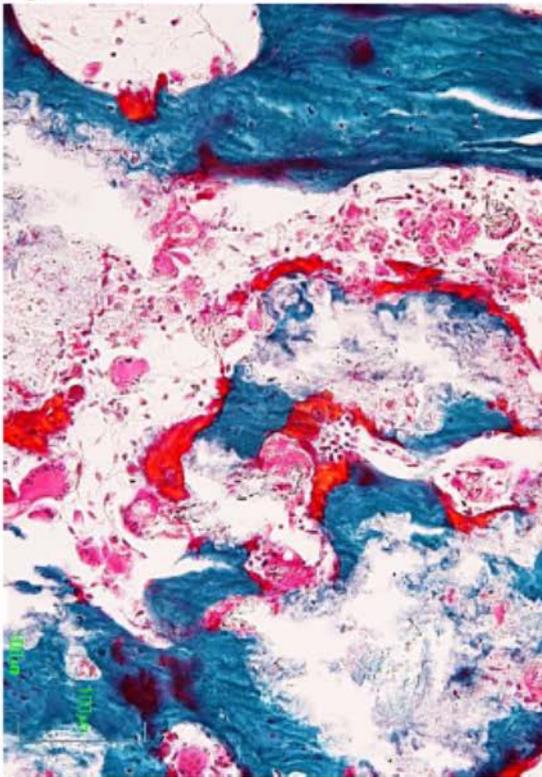


Fig.-27

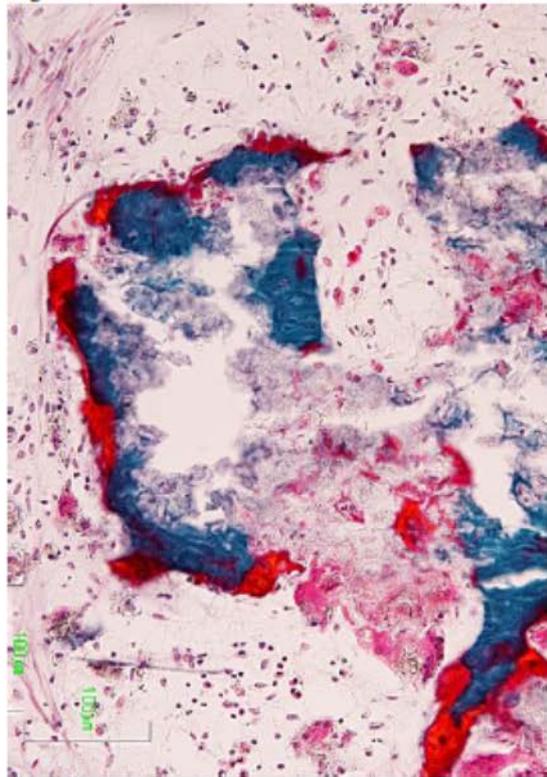


Fig.-28

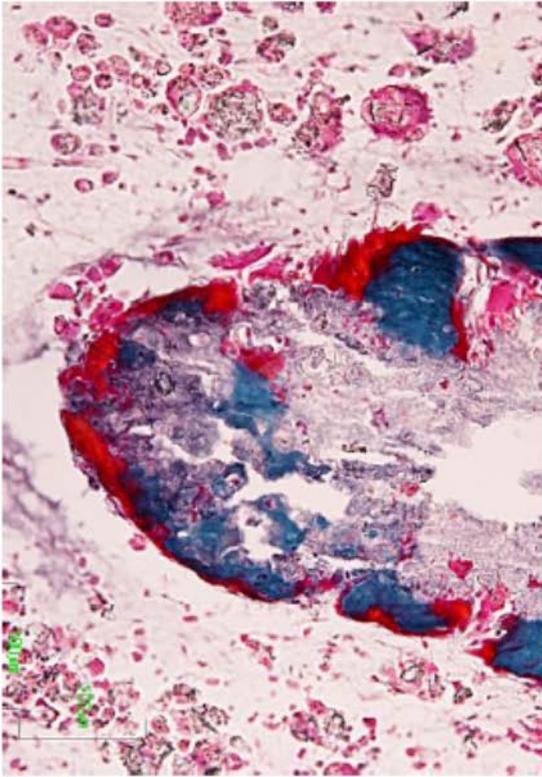


Fig.-29

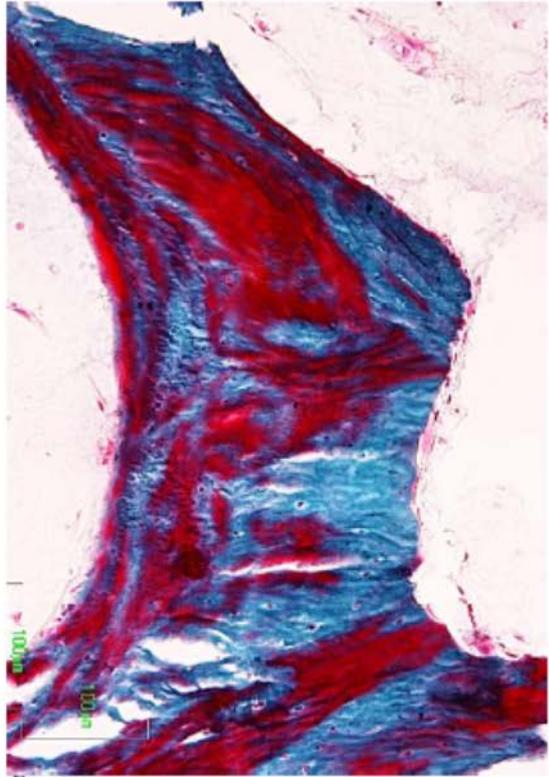


Fig.-30

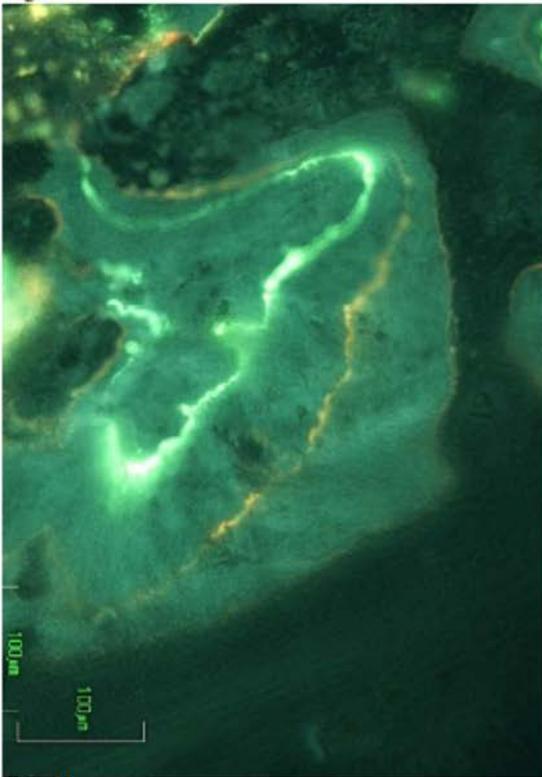


Fig.-31

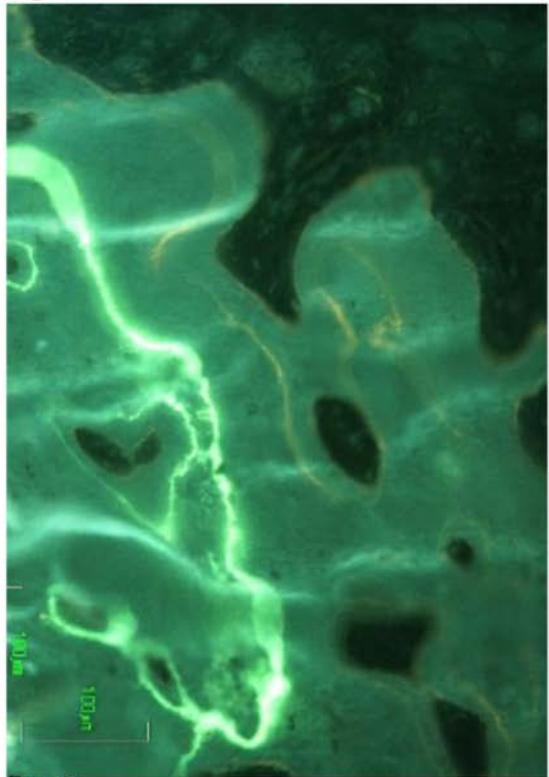


Fig.-32

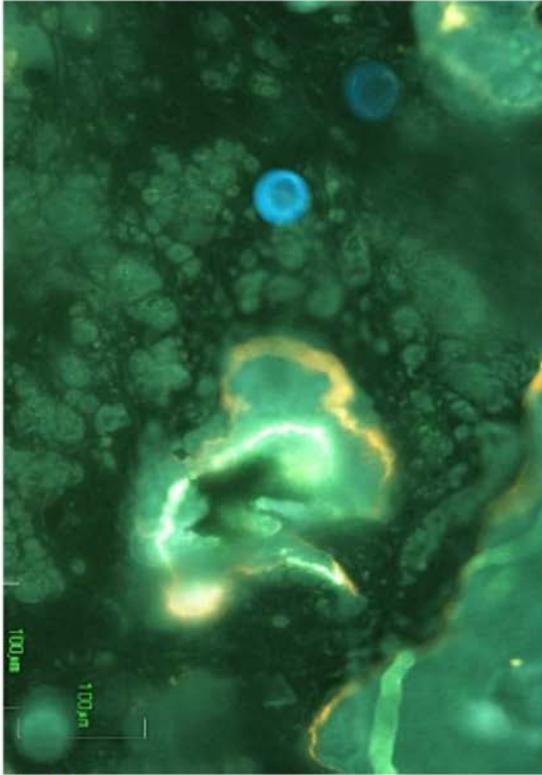


Fig.-33

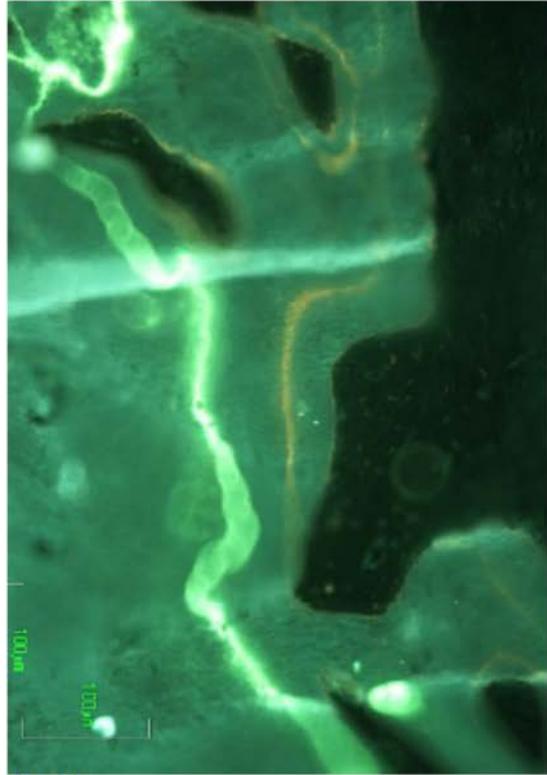


Fig.-34

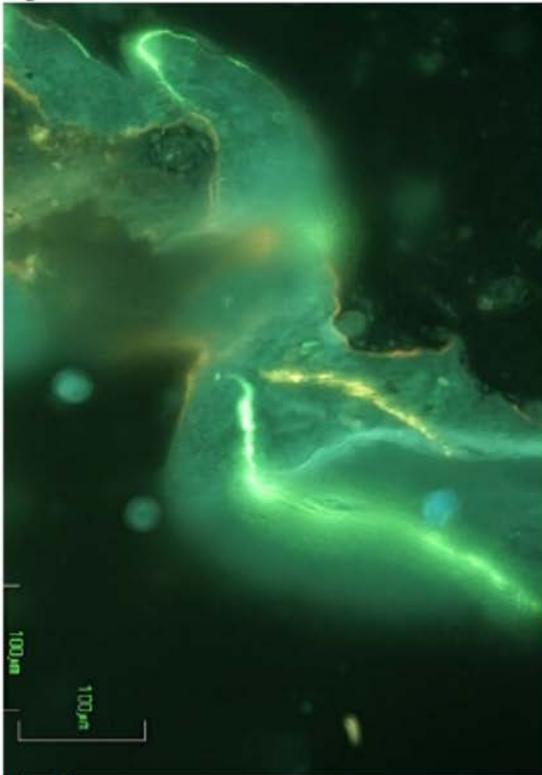


Fig.-35

La dificultad en la obtención de medidas se traduce en los diagramas de barras 5 y 6. Las medidas correspondientes a la zona cortical (I) no eran fiables y las obtenidas del resto de las zonas eran muy pequeñas e irregulares. A pesar de intentar representarlos, estos datos y todos los casos (191, 149, 142) de este material 2 tuvieron que ser excluidos del estudio estadístico.

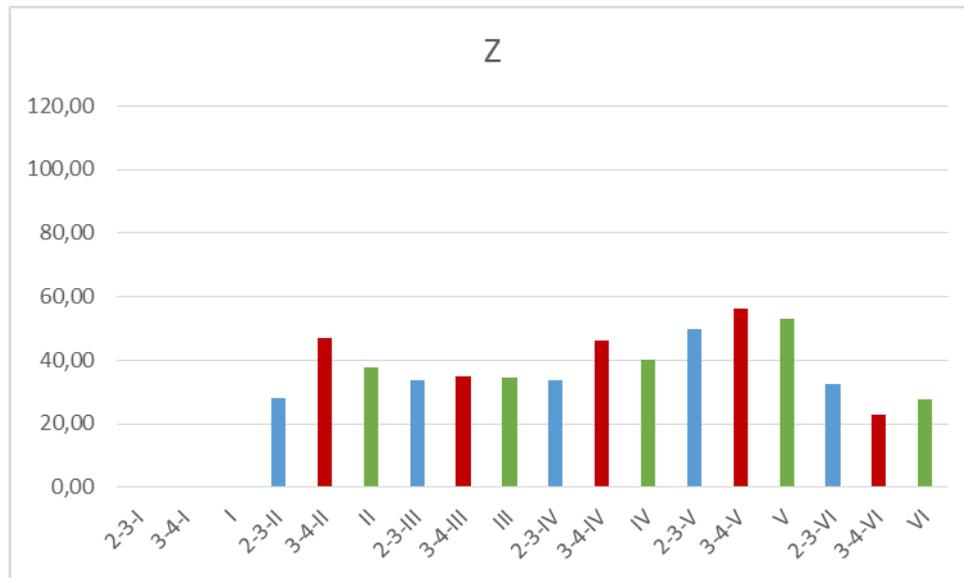


Diagrama 5.- Representación de las medidas de las distintas zonas del material **Z-2**.

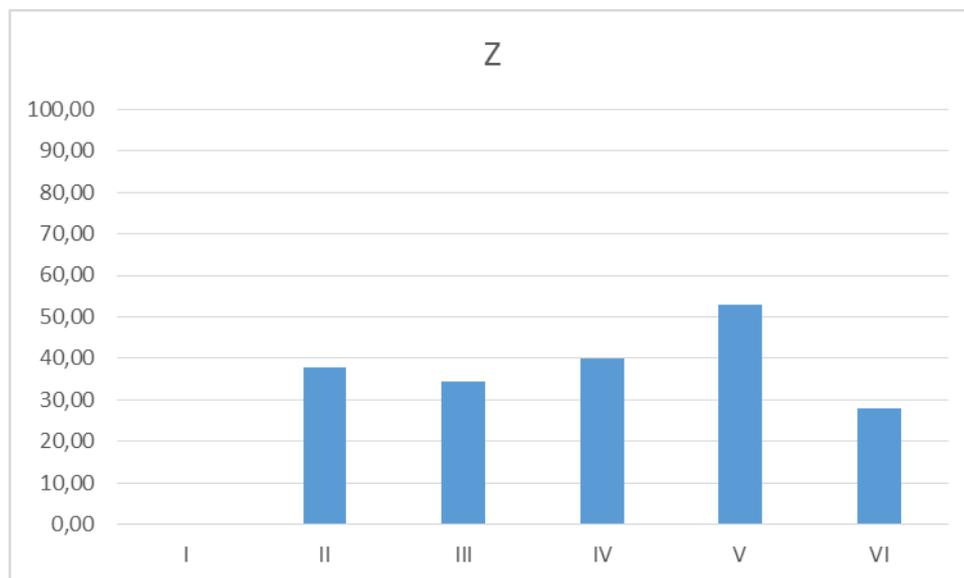
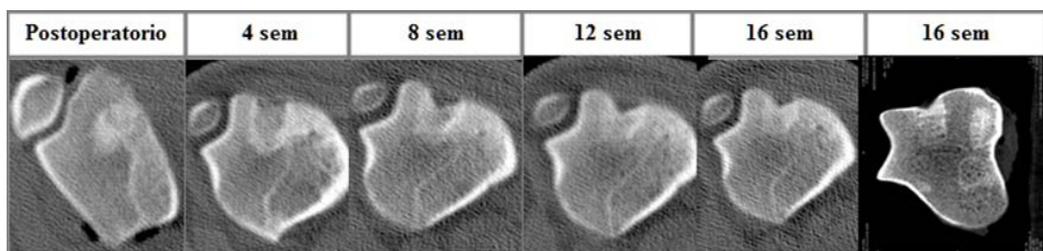


Diagrama 6.- Representación de los promedios de las medidas de las distintas zonas estudiadas en la implantación del material **Z-2**.

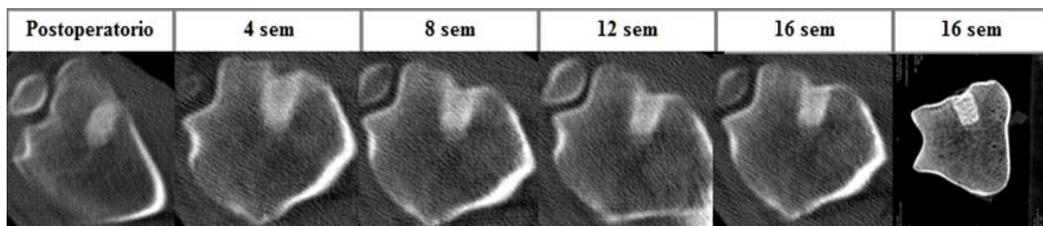
## Grupo II: materiales 00-4, V-6, PP-8, LL-9 y AA-10

Este grupo está formado por cinco materiales, compuestos por gránulos de monetita con o sin sustitución iónica, que tienen en común la adición de un pequeño porcentaje de gel de sílice (7%) y a excepción de uno (material V-6) presentan entre un 15% (LL-9 y AA-10) y un 30% (PP-8 y OO-4) de hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA).

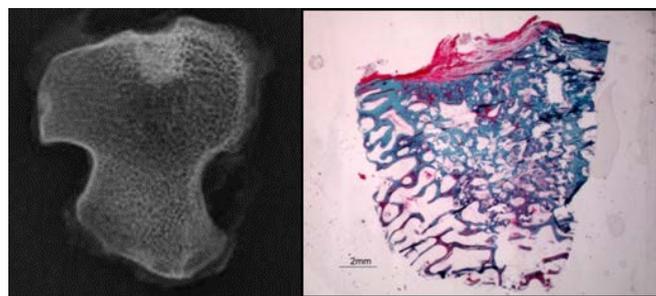
A continuación se muestran las imágenes de TAC que ponen de manifiesto la evolución del área de implantación de AA-10 y OO-4 (Figs.F y G) y la radiología y la foto de lupa de otros dos materiales, LL-9 y PP-8 (Figs.H e I).



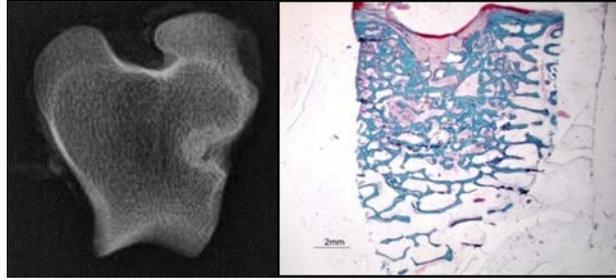
**Fig.F.-** Imágenes de TAC del caso 143 del material AA-10, mostrando una densificación progresiva del área de implantación, aunque inferior a la densidad del hueso cortical.



**Fig.G.-** Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 221 del material OO-4, con la densificación progresiva del área implantada hasta alcanzar la densidad de la cortical ósea.



**Fig.H.-** Imagen radiológica correspondiente al caso 208 del material LL-9 y su fotografía de lupa del corte histológico. La densidad del área de implantación se corresponde con la formación de hueso.



**Fig.I.-** Imagen radiológica correspondiente al caso 203 del material **PP-8** y su fotografía de lupa del corte histológico. El área densificada se corresponde con una red trabecular ósea.

### **Material AA-10**

Las microfotografías del material **AA-10**, realizadas en las preparaciones teñidas con la técnica de Goldner (Figs.-36-41) muestran como factor común la existencia de zonas de material osteointegrado, rodeado por hueso maduro sin transición (Figs.-36-40). Las líneas de sustancia osteoide son finas en general, con excepción de la zona cortical (Fig.-36, correspondiente a la zona I del estudio estadístico), donde además se encuentran zonas de hueso inmaduro (Fig.-36). Las células multinucleadas son escasas y en general en relación con los restos de biomaterial (Figs.-39 y 40) y no existe infiltrado inflamatorio en ninguna de las áreas estudiadas. La actividad de remodelación en las trabéculas óseas del hueso normal es escasa o nula (Fig.-41).

Las imágenes correspondientes a las bandas de fluorocromos en los distintos territorios (Figs.-42-47) muestran un intervalo amplio en la zona I, cortical (Fig.42) con producción de hueso u osteoide después del último marcado coincidiendo con lo observado con la técnica de Goldner (Fig.36). La zona central del defecto (II) presenta zonas de material integrado, así como las tres bandas características de los 2º, 3º y 4º fluorocromos y neoformación ósea postmarcado. Las zonas laterales (III y IV) presentan escasa actividad, aunque una de ellas la IV es más abigarrada, con contornos de marcado más cortos e irregulares (Fig.45). El fondo del defecto, también presenta irregularidad focal (Fig.46). En las trabéculas adyacentes (Fig.47) se encuentran actividad de los tres fluorocromos en contraste con la falta de actividad que se observa con la técnica de Goldner (Fig.41).

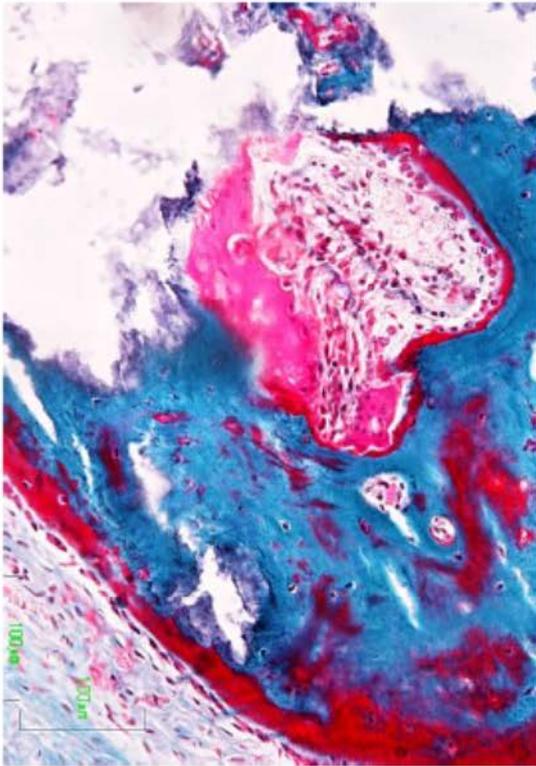


Fig.-36

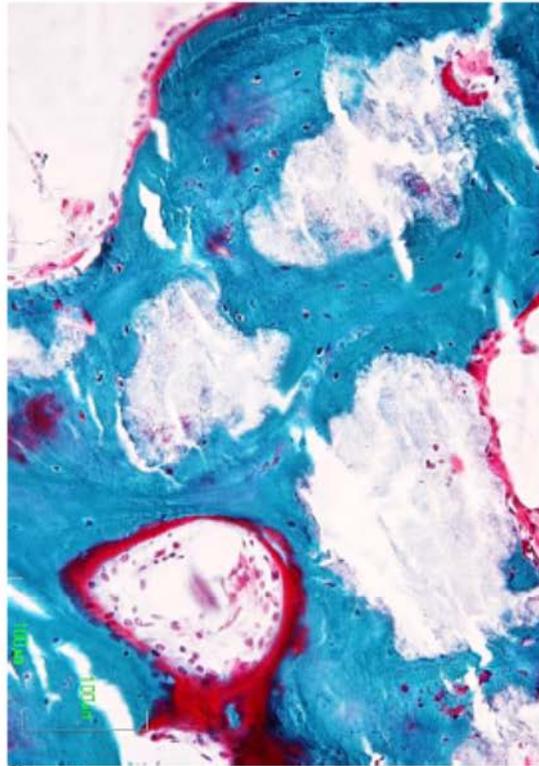


Fig.-37

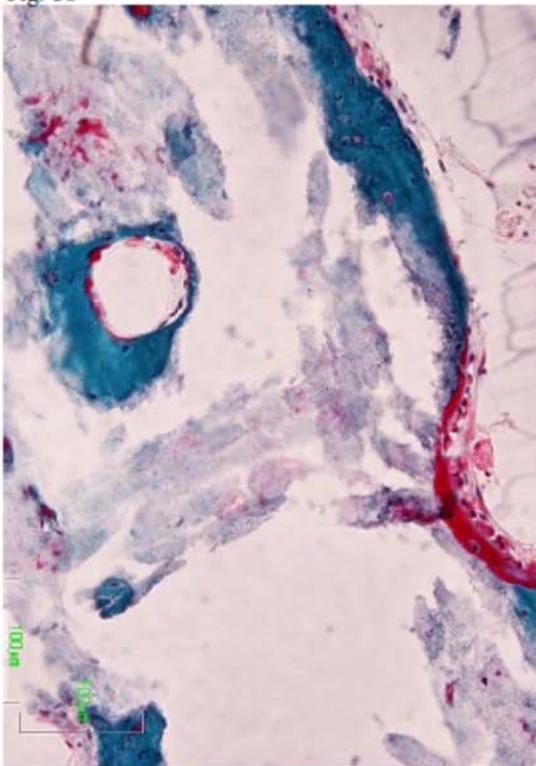


Fig.-38

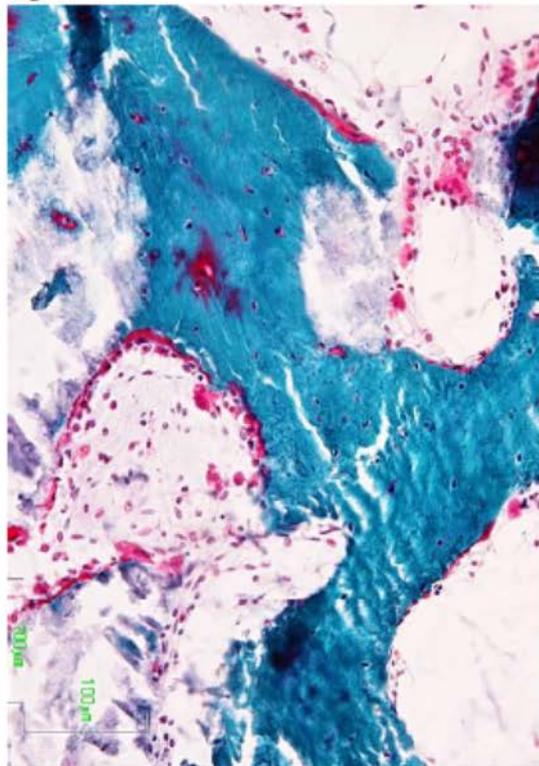


Fig.-39

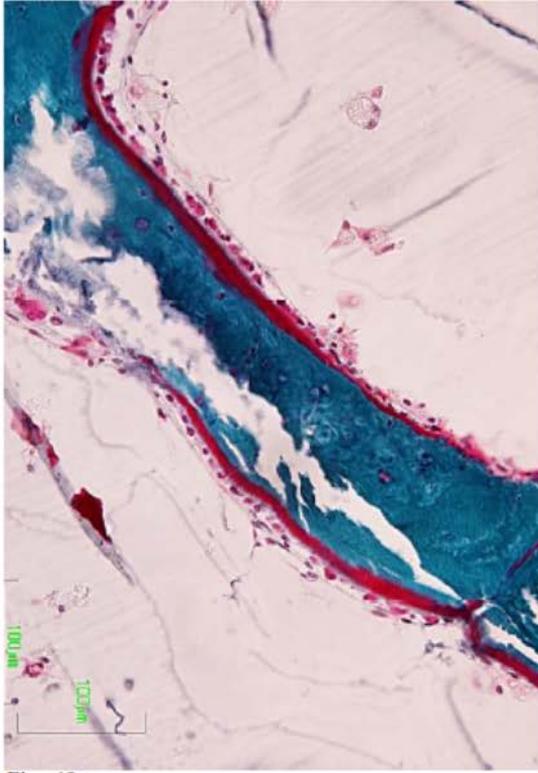


Fig.-40

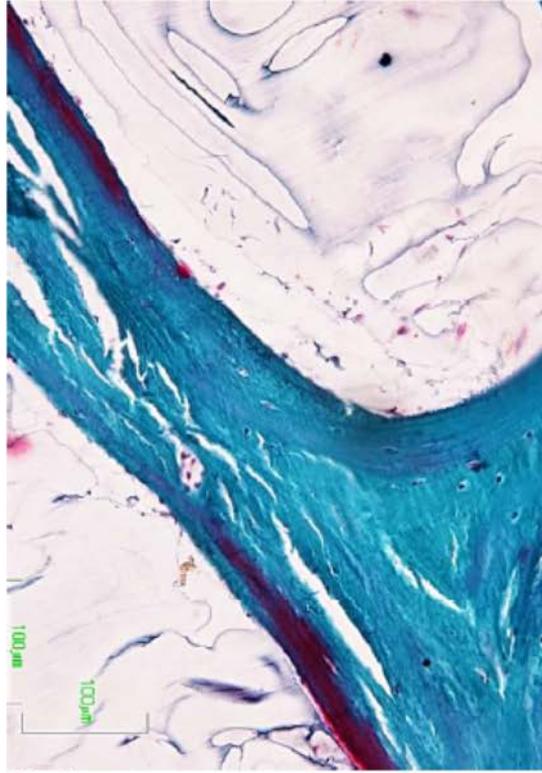


Fig.-41

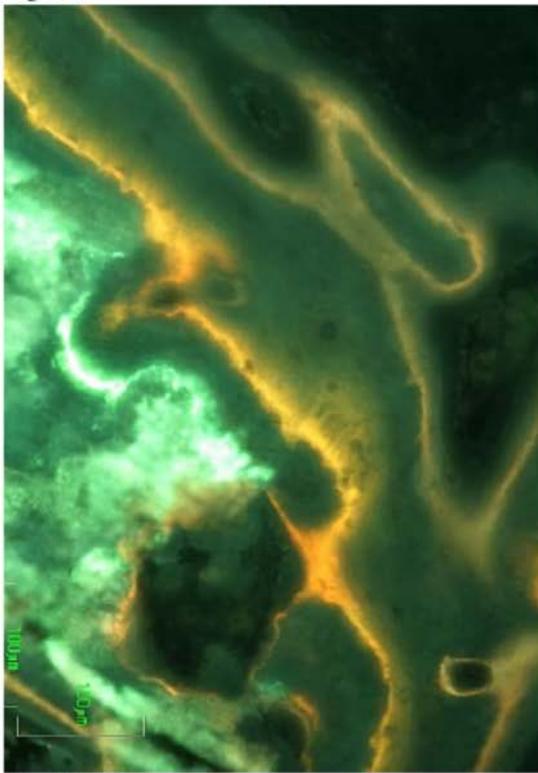


Fig.-42

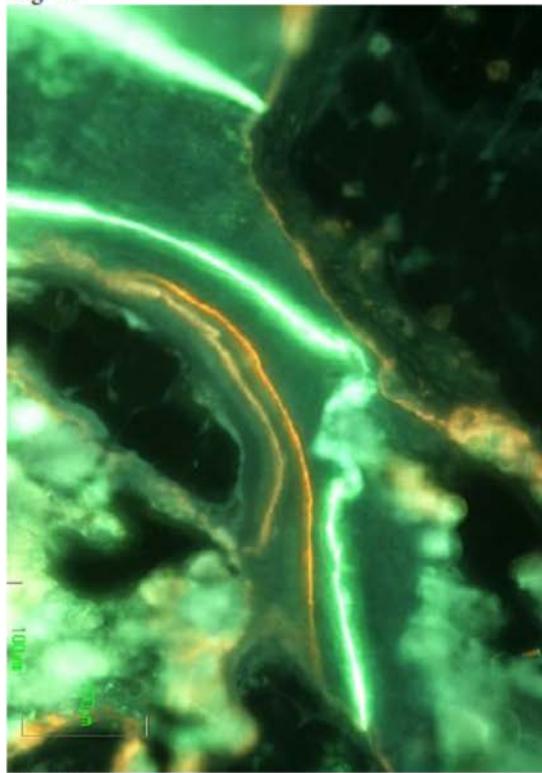


Fig.-43

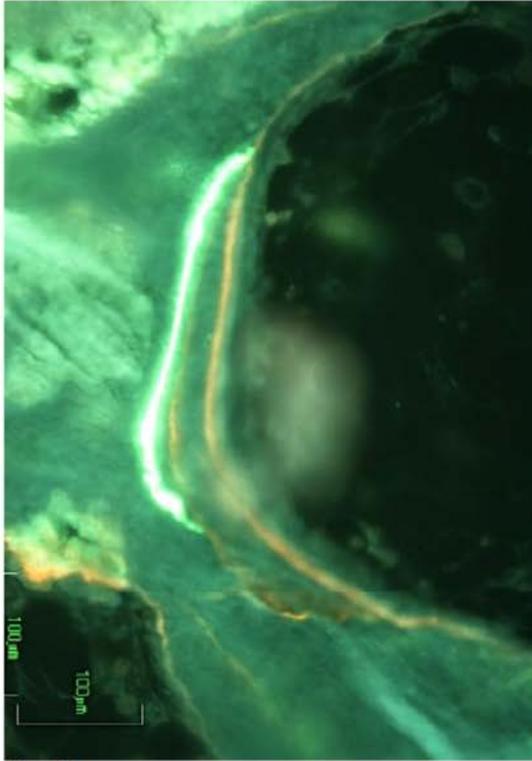


Fig.-44

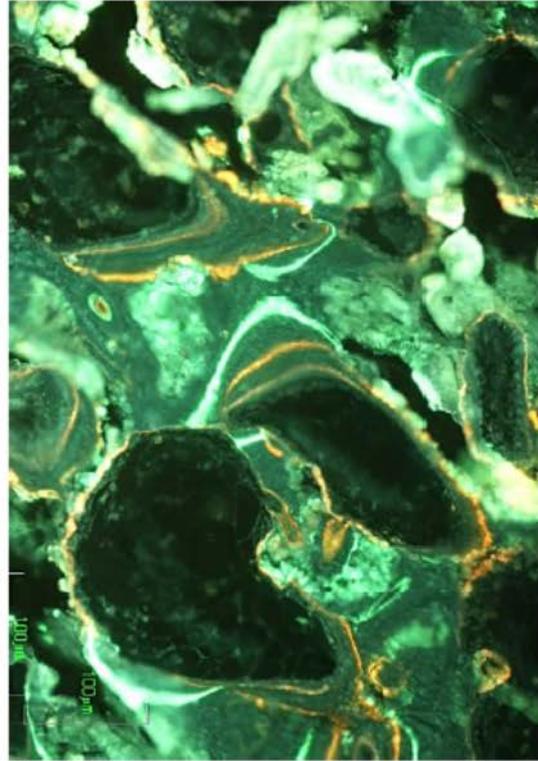


Fig.-45

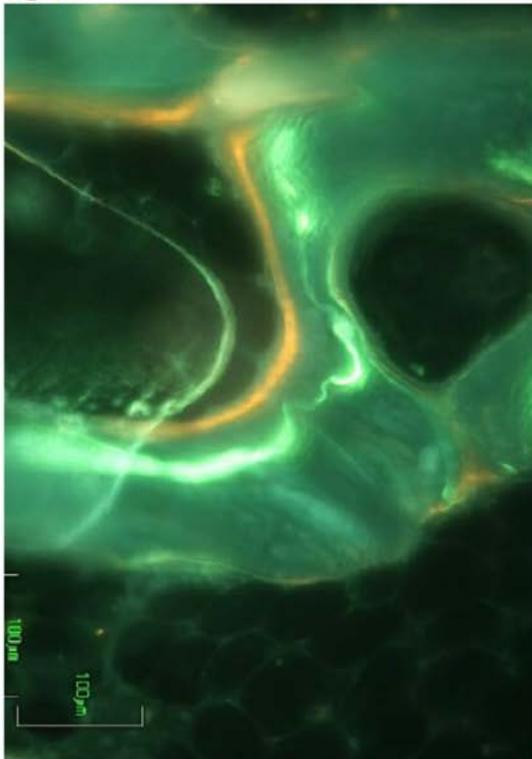


Fig.-46

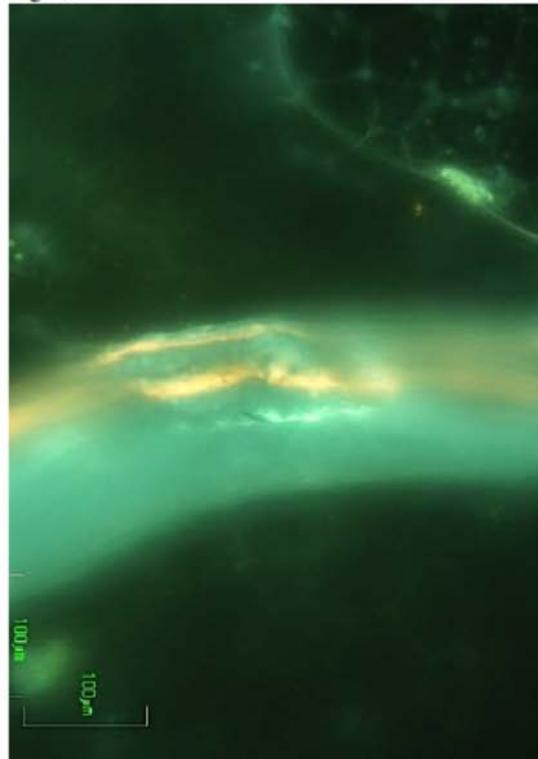


Fig.-47

Los diagramas de barras (7 y 8) de los valores por intervalos presentan poca variación entre la distancia 2-3 y la 3-4, excepción hecha de los valores de las trabéculas normales. Respecto a los promedios tienen un mayor valor las zonas I y II, que las laterales y el fondo (III, IV, y V). Dicho de otro modo, las zonas que no están en contacto con hueso preexistente forman más hueso que las que se encuentran adyacentes al mismo.

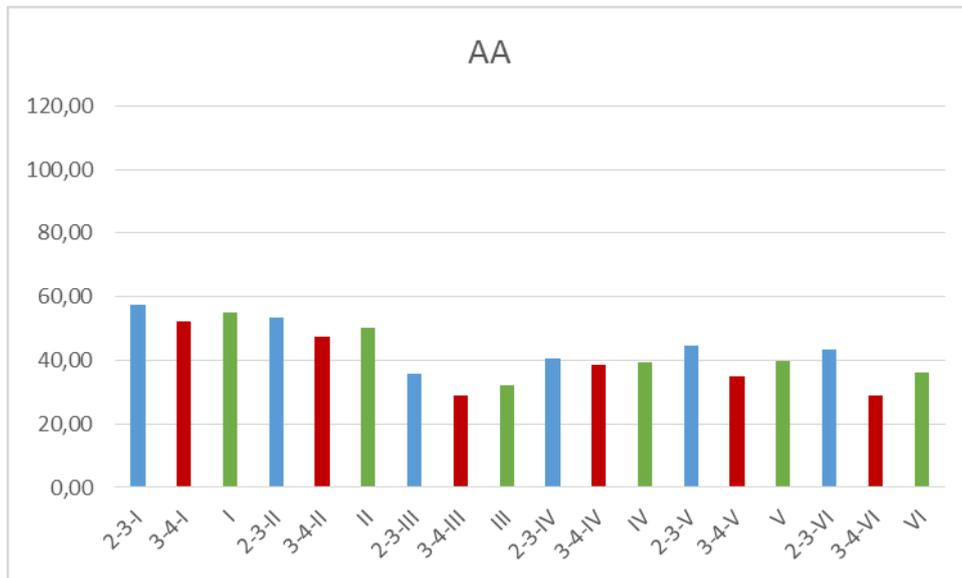


Diagrama 7.- Representación de los valores por intervalos 2º-3º y 3º-4º fluorocromos en los territorios estudiados del material **AA-10**, caso 143.

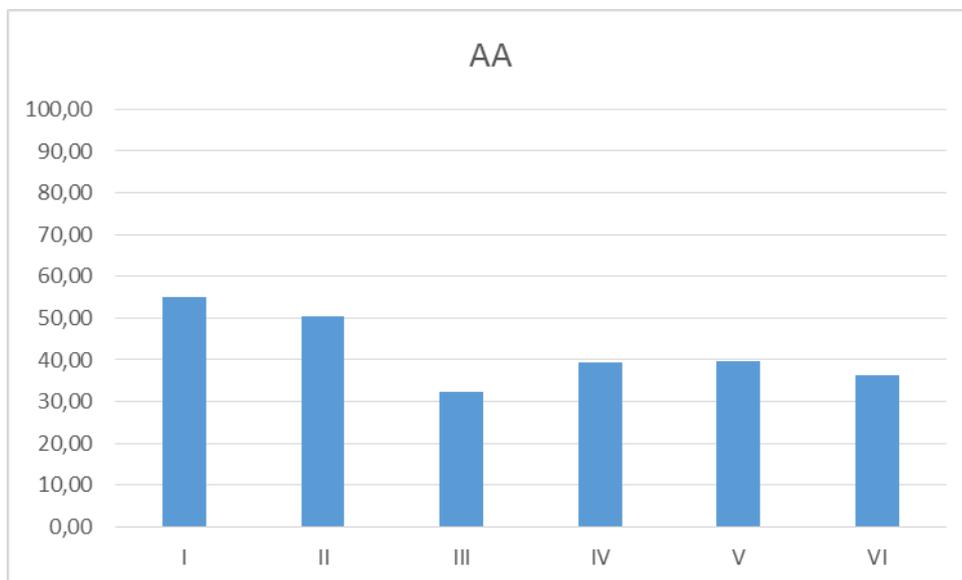


Diagrama 8.-Promedios de las áreas I-VI del material **AA-10**, caso 143.

### **Material LL-9**

Las microfotografías correspondientes a la técnica de Goldner (Figs.48-53) del material **LL-9**, muestran una notable solidez de la red de trabéculas neoformadas en concordancia con la foto panorámica de lupa (Fig.H). En general se observan signos de actividad osteoformadora caracterizada por la presencia de sustancia osteoide e hileras de osteoblastos (Figs.48-51), espacios medulares relativamente pequeños de contornos redondeados (Figs.48 y 49), restos de material en forma de grandes agregados de varios centenares de micras de eje mayor, frecuentemente osteointegrados, asociados focal y ocasionalmente a células multinucleadas (Fig.50). No se observan infiltrados medulares de células inflamatorias. Tanto el fondo del defecto, área VI, como las trabéculas óseas adyacentes presentan un aspecto quiescente.

El estudio microscópico de los fluorocromos muestra bandas significativas correspondientes a los tres fluorocromos estudiados, en las zonas I y II (Figs.54 y 55). Las bandas también están presentes en las zonas marginales II, IV y V, adoptando un contorno más lineal sobre las del 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> fluorocromos (Figs.56-58). En las trabéculas del hueso esponjoso normal se encuentran linealmente las tres bandas de fluorocromos (Fig.59), actividad que contrasta con la imagen obtenida con la técnica de Goldner (Fig.53).

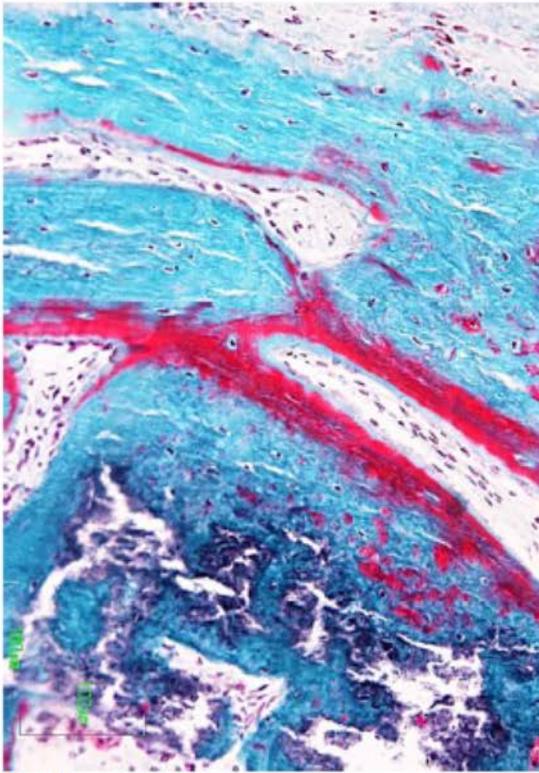


Fig.-48

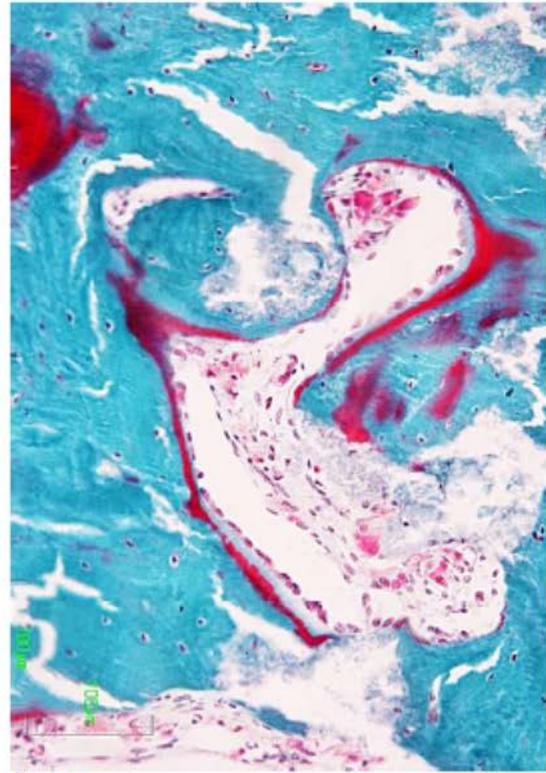


Fig.-49

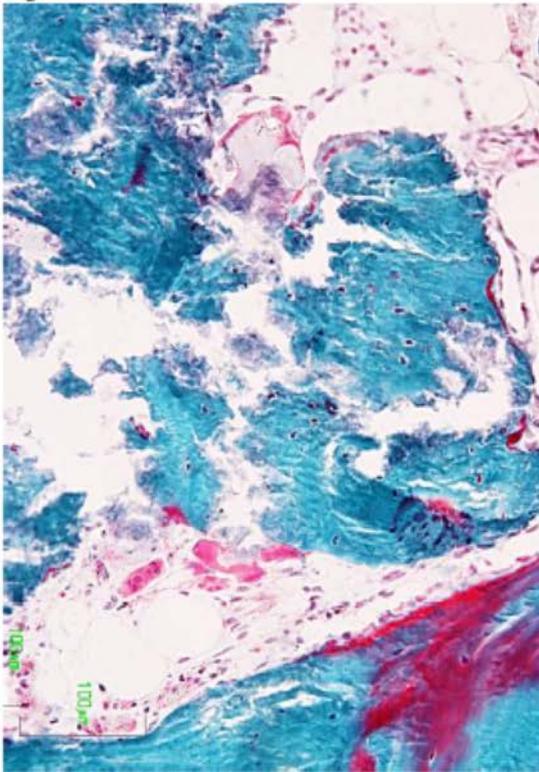


Fig.-50

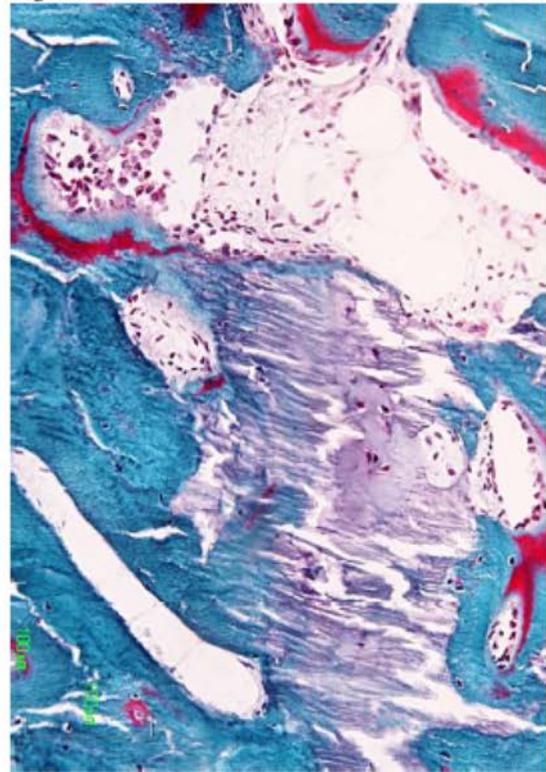


Fig.-51

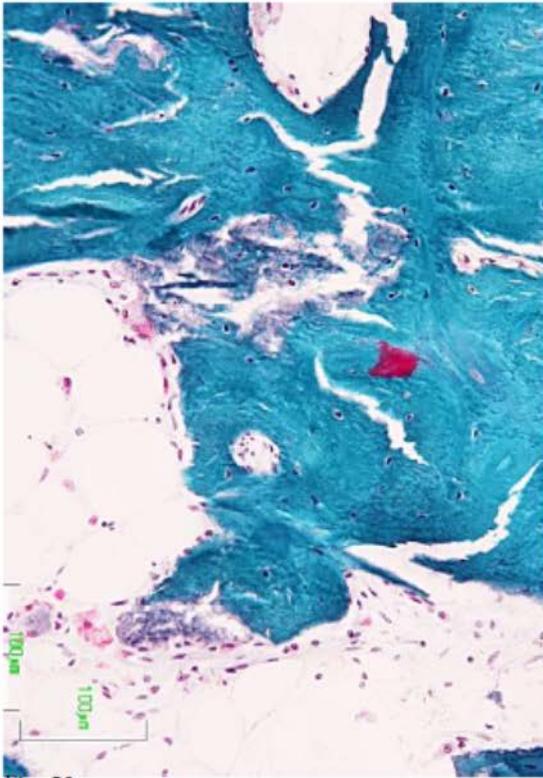


Fig.-52

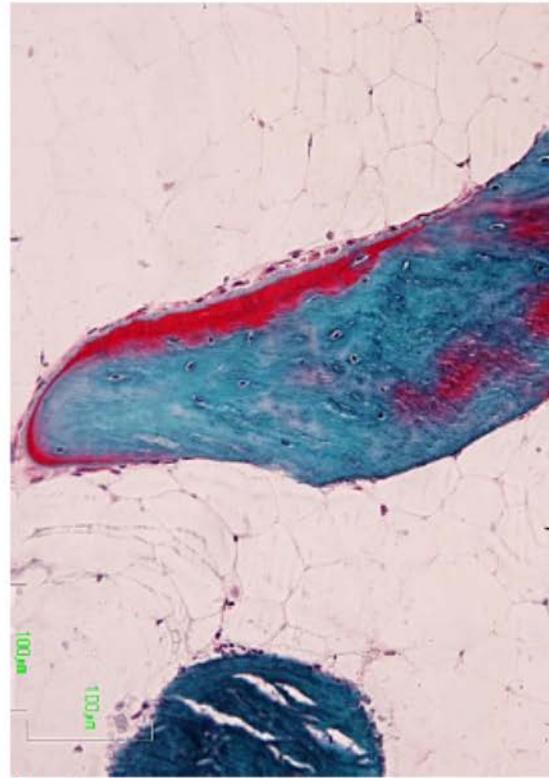


Fig.-53

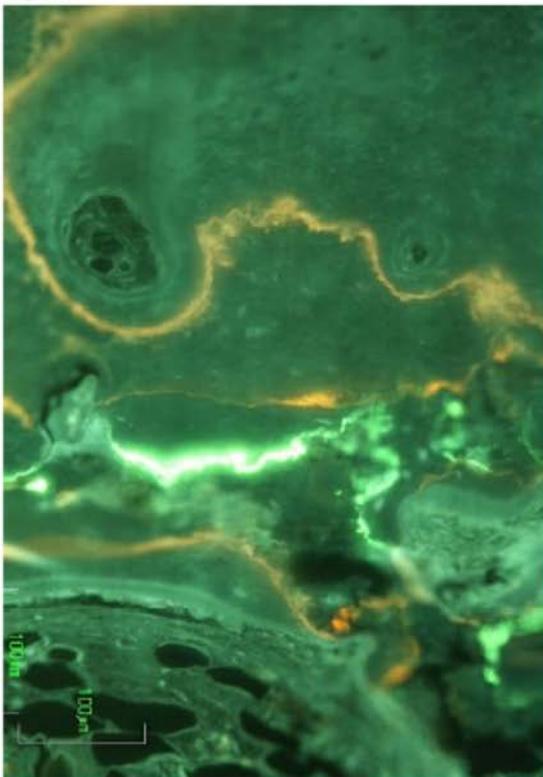


Fig.-54

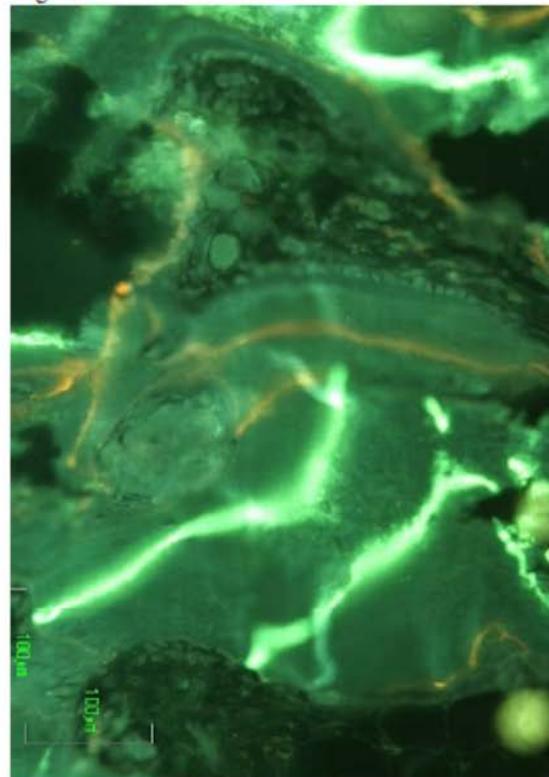


Fig.-55

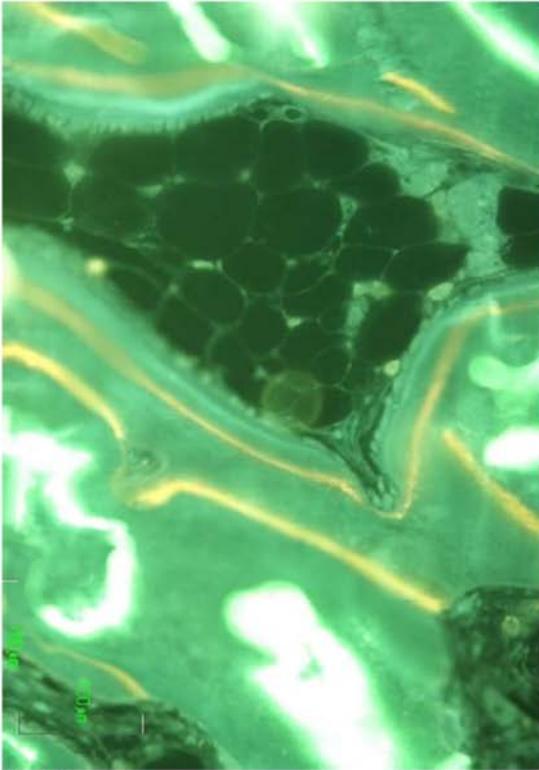


Fig.-56

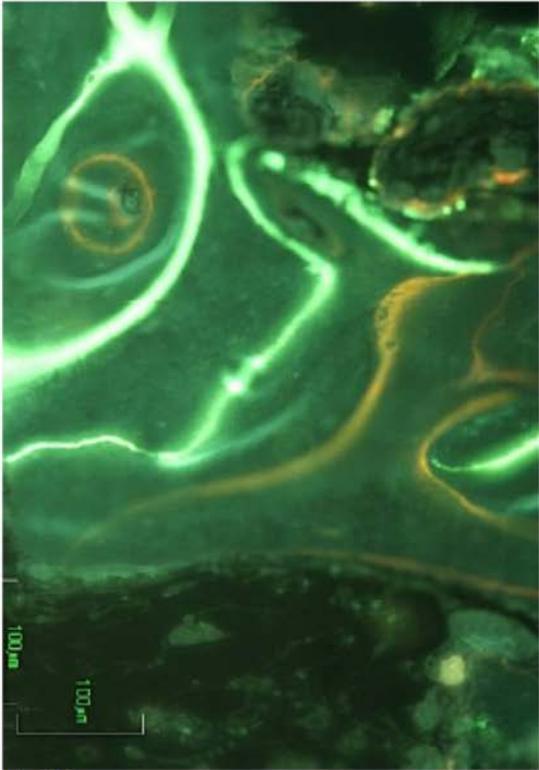


Fig.-57

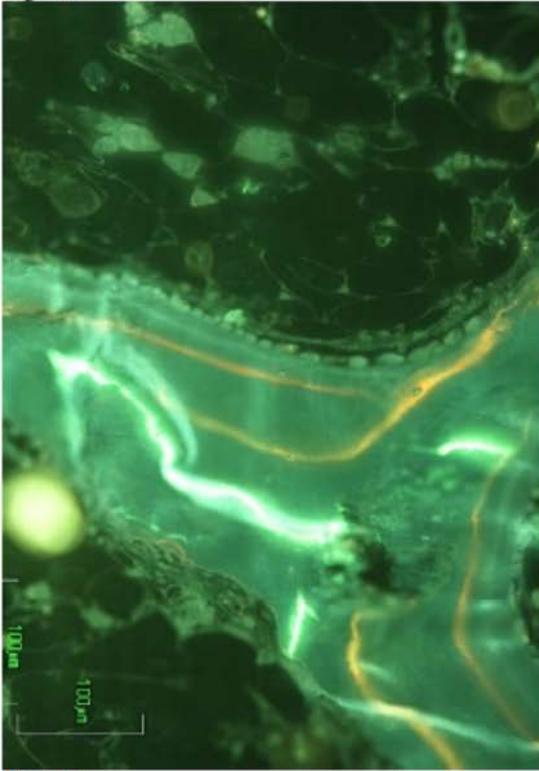


Fig.-58

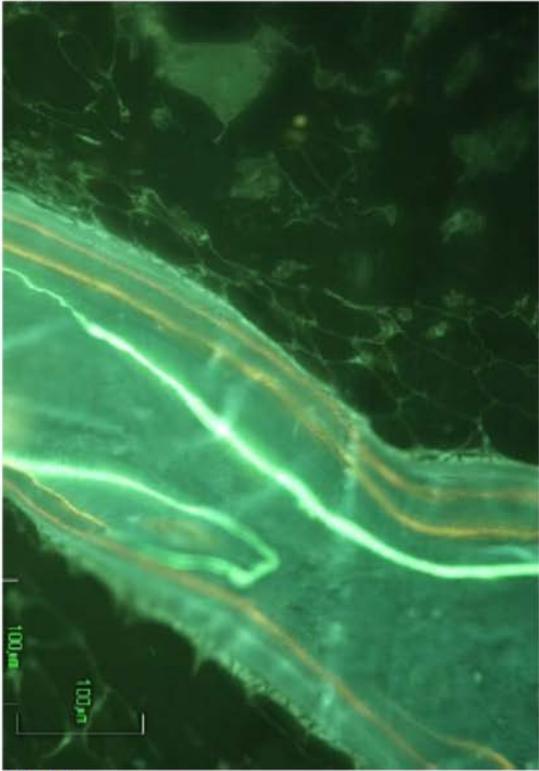


Fig.-59

Los diagramas de barras (9 y 10) muestran escasas diferencias entre los valores obtenidos en las distintas áreas, con la excepción de los correspondientes a las trabéculas. Es interesante reseñar que los valores correspondientes al primer intervalo, es decir las bandas correspondientes a los fluorocromos 2º y 3º (Diagrama 9, azul) son mayores que las correspondientes al segundo intervalo (Diagrama 9, rojo).

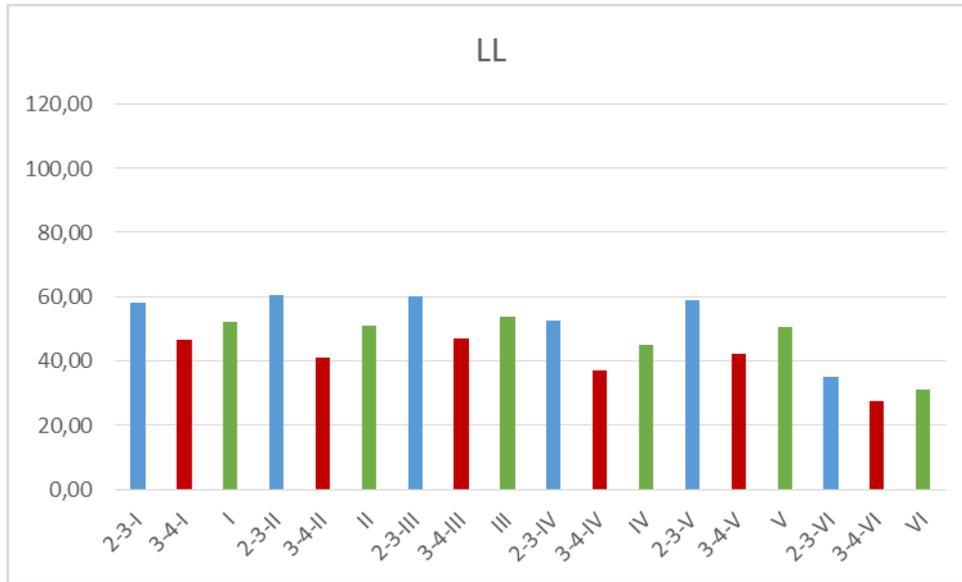


Diagrama 9.- Representación de las medidas obtenidas por periodos, 2-3 (azul) y 3-4 (rojo), y promediadas (verde). No existen grandes diferencias entre las distintas zonas, salvo con la correspondiente a las trabéculas (VI), aunque las correspondientes al primer intervalo (2-3) son mayores que las del segundo intervalo (3-4).

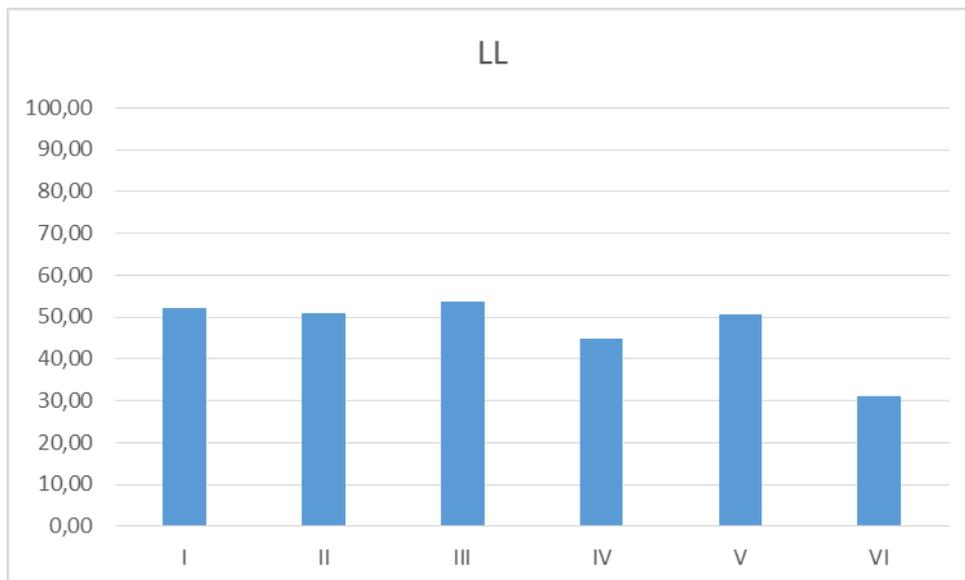


Diagrama 10.- Diagrama de barras del material **LL-9** en promedios.

### **Material OO-4**

La histología convencional de los cortes del material **OO-4**, teñidos con la técnica de Goldner, ilustrados a partir del caso 221, presenta frecuentes ribetes osteoides contorneando los espacios medulares, redondeados (Figs.60-62), pero lo que más caracteriza a este material es la presencia de grumos más o menos redondeados de 200-250µm, osteointegrados (Figs.60-64), que en el caso de estar en contacto con espacios medulares, están asociados a células multinucleadas, sugiriendo reabsorción de los mismos (Figs.62 y 63). En las trabéculas del hueso esponjoso, normales se observan procesos de remodelación (Fig.65).

El estudio con marcadores fluorescentes, de secciones del mismo caso, 221, muestran con nitidez las tres bandas de los fluorocromos, en todos los territorios (Figs.66-71), apreciándose de manera intuitiva, una mayor distancia entre la primera (Calceína) y la segunda (Xilenol Orange), que entre esta y la tercera (Alizarin Complexona).

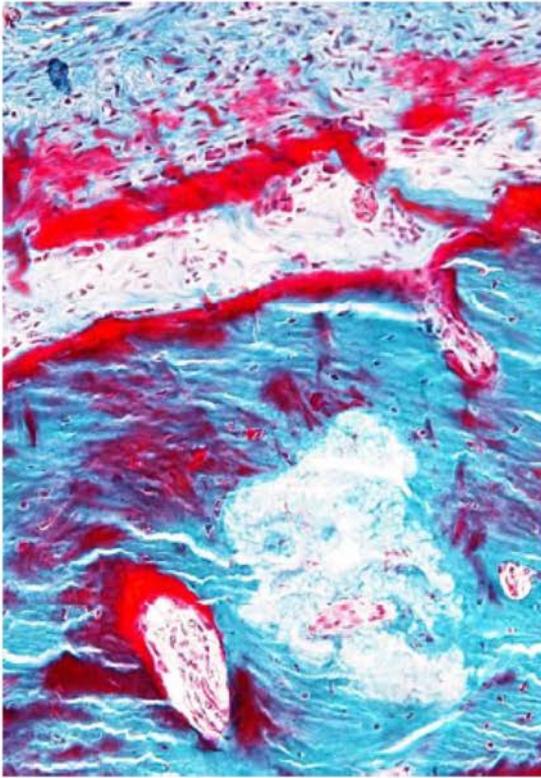


Fig.-60

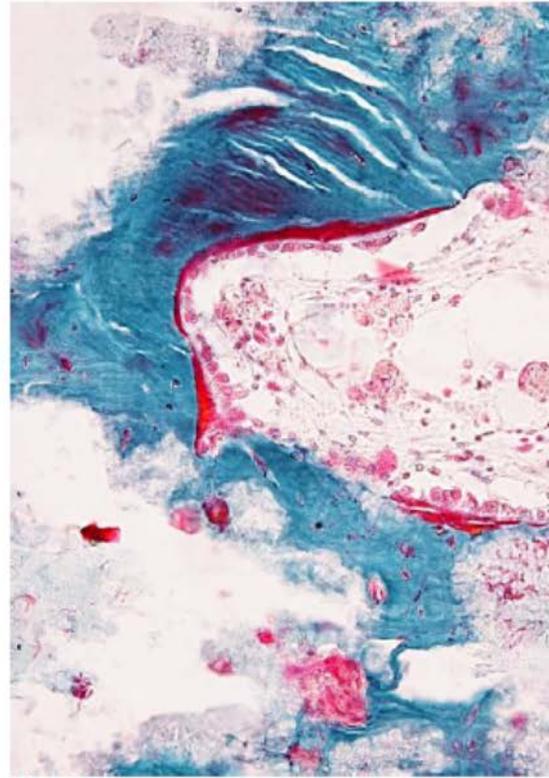


Fig.-61

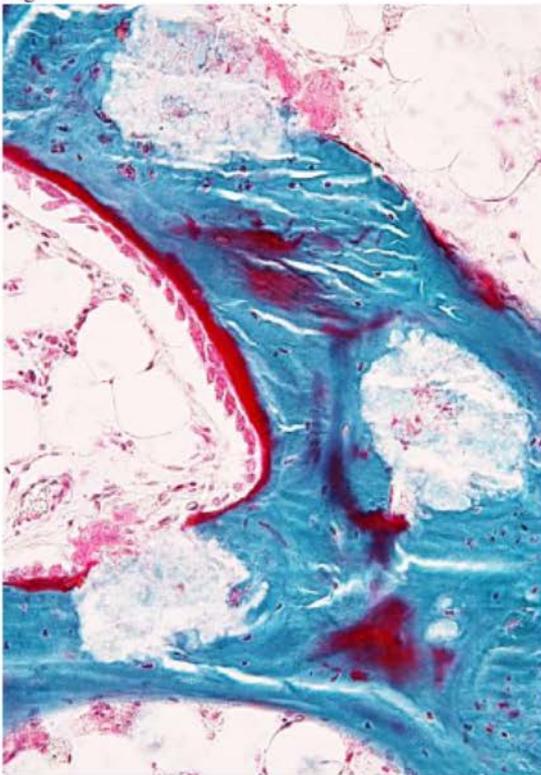


Fig.-62

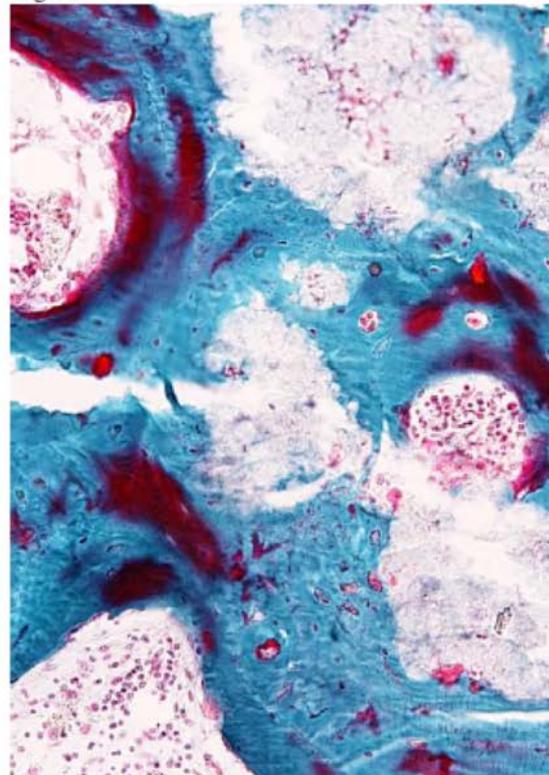


Fig.-63

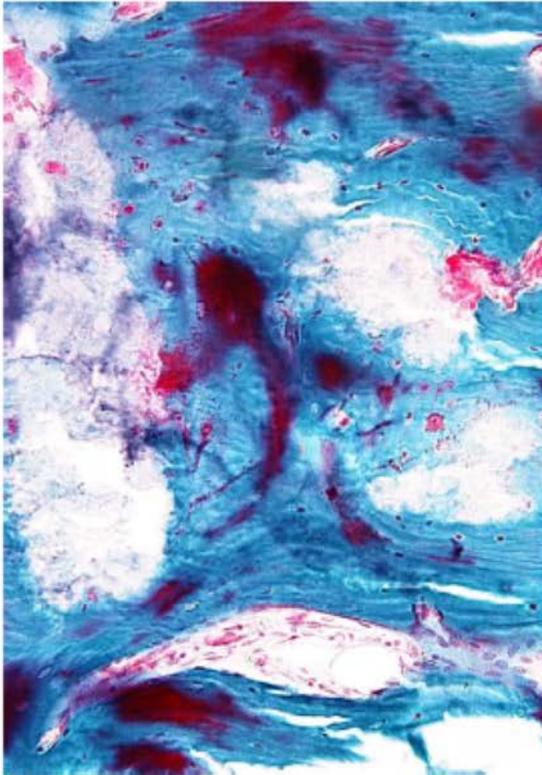


Fig.-64

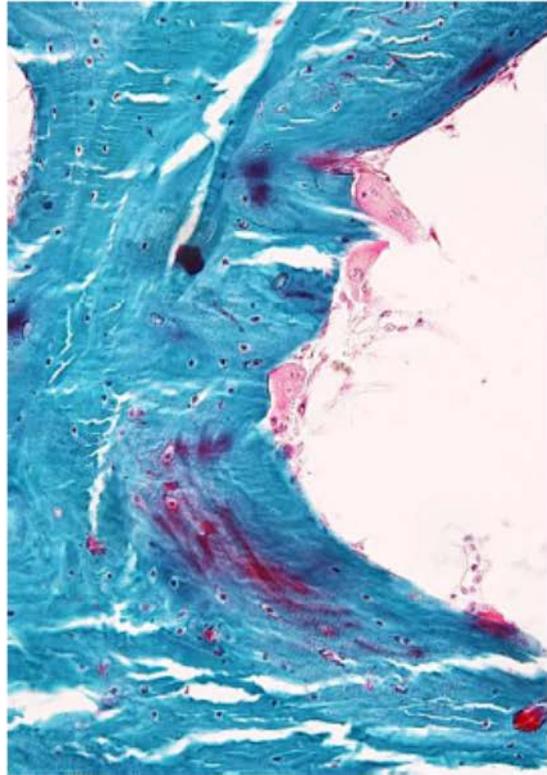


Fig.-65

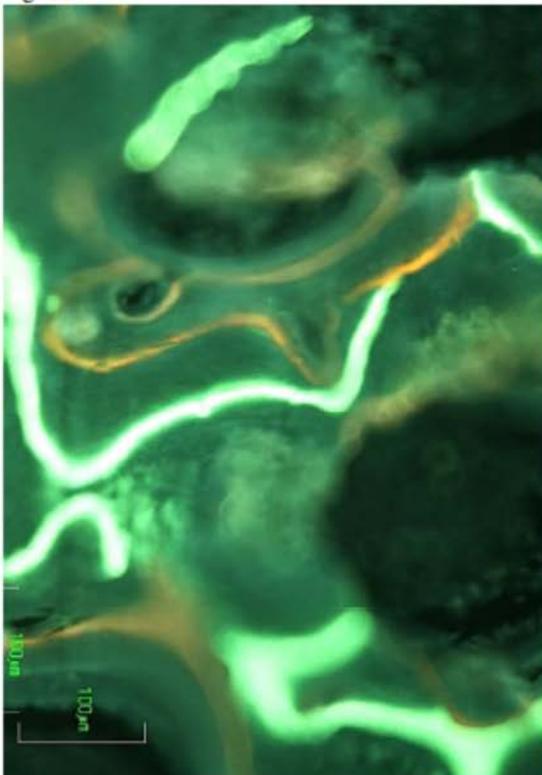


Fig.-66

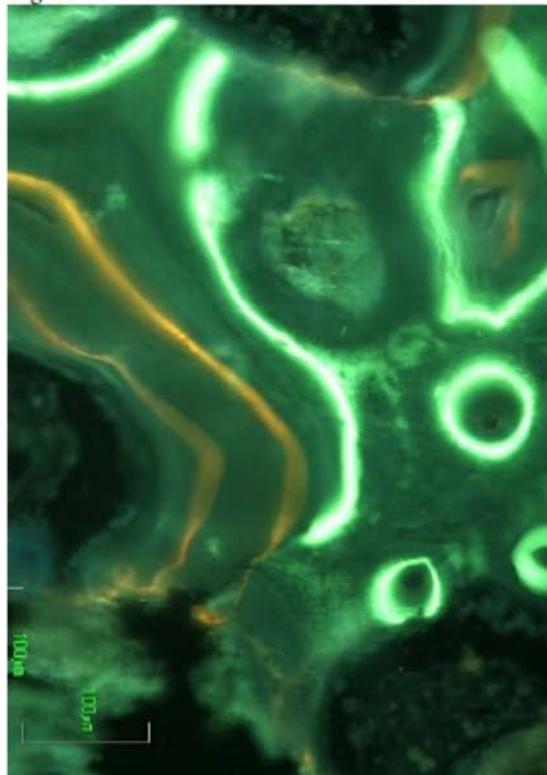


Fig.-67

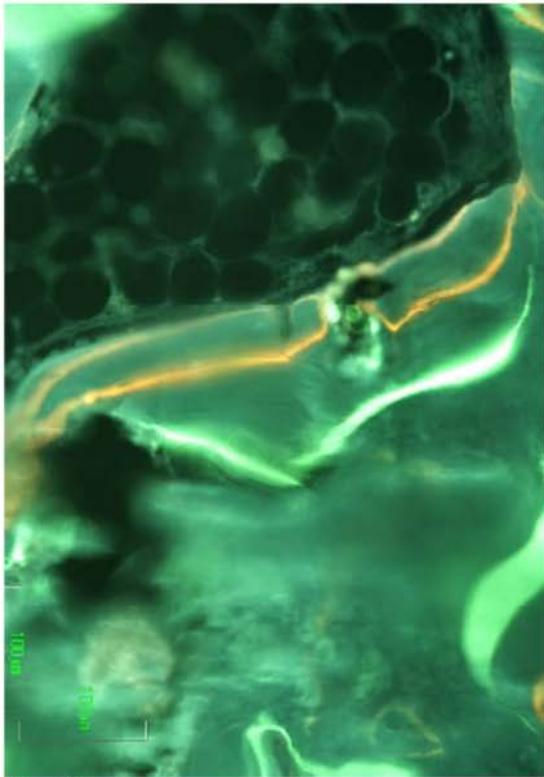


Fig.-68

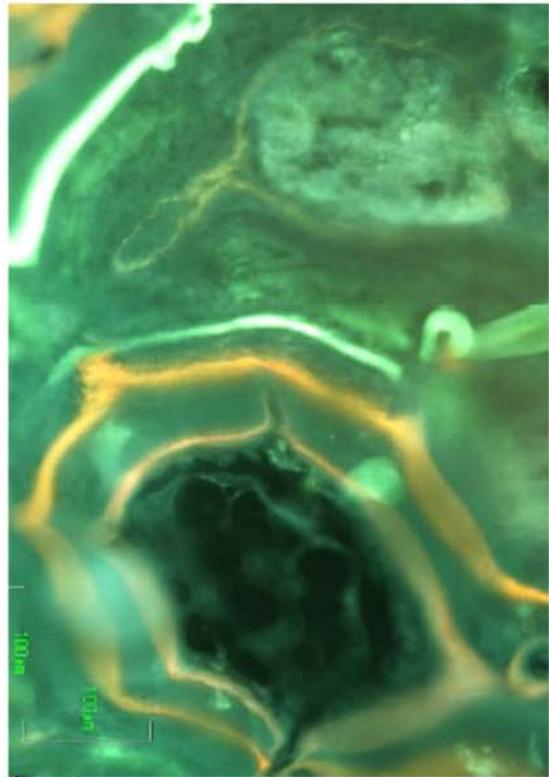


Fig.-69

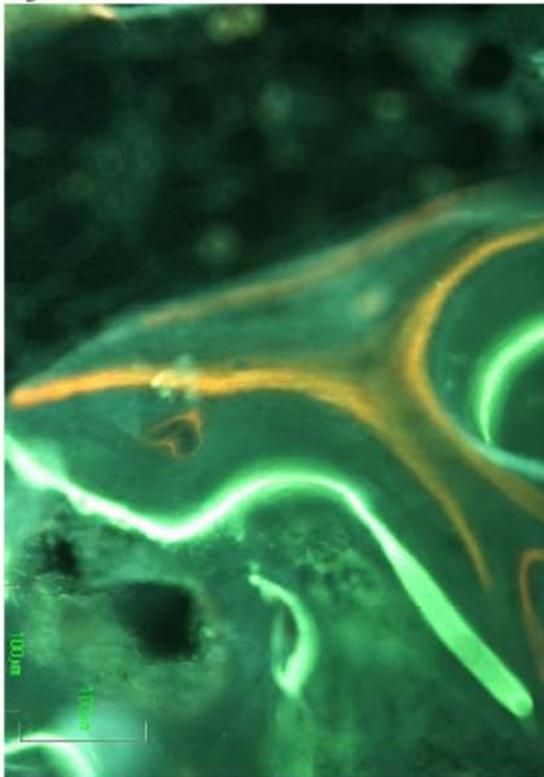


Fig.-70

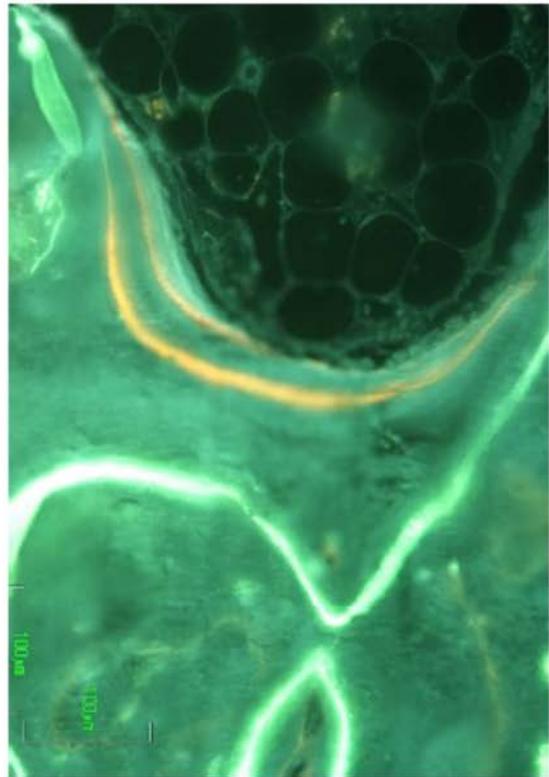


Fig.-71

A continuación se muestra la representación mediante diagramas de barras (diagramas 11 y 12) de los valores morfométricos obtenidos a partir de las preparaciones fluorescentes del material **OO-4**, caso 221, en las distintas zonas estudiadas en el defecto.

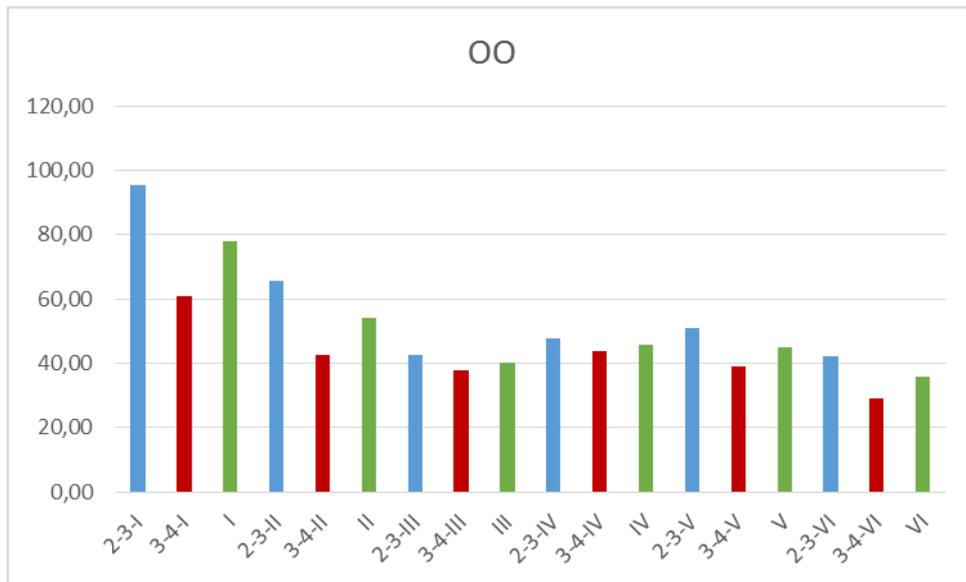


Diagrama 11.-Representación en barras de la distribución por zonas de las distancias entre las bandas de fluorocromos. Nótese que en todas las zonas estudiadas los valores entre el 2º-3º fluorocromos (azul) son mayores que entre el 3º-4º (rojo).

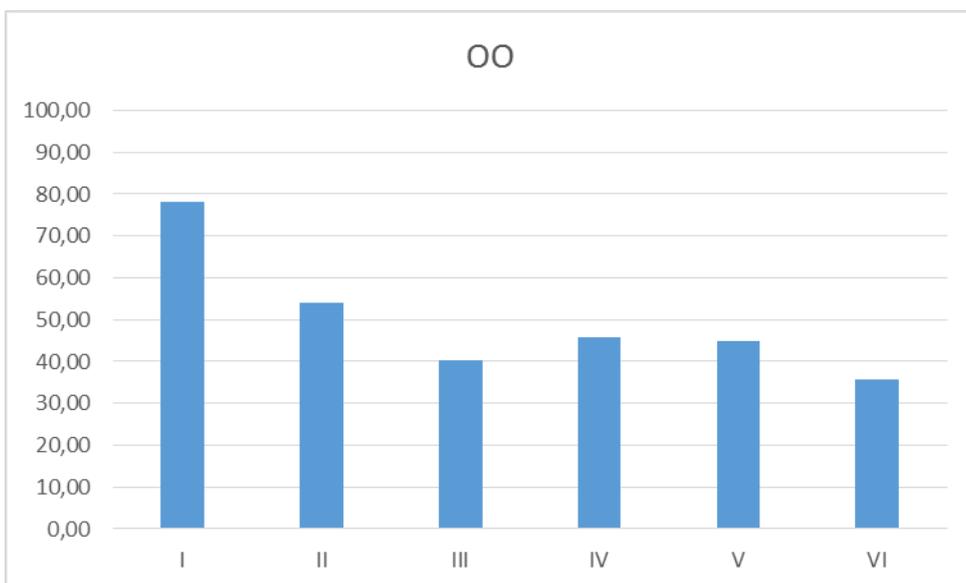


Diagrama 12.- Distribución promediada de las distintas áreas del defecto implantado, destacando el mayor valor de las zonas I y II.

### **Material PP-8**

Los cortes de material **PP-8**, incluido en plástico y teñidos con Goldner (caso 203), muestran similitudes con el material estudiado anteriormente el **OO-4**, consistentes en la presencia de grumos de material osteointegrados (Figs.72-75), si bien estas estructuras presentan diferencias consistentes en una mayor fragmentación de los grumos, invadidos por elementos celulares (Figs.72 y 73) o por espículas óseas neoformadas (Fig.75). El componente de células multinucleadas (Figs.73 y 76) es más marcado que en el material **OO-4**. La sustancia osteoide, aunque presente, es relativamente escasa y forma bandas finas (Figs.72, 73 y 75). Parte del hueso neoformado presenta caracteres de inmadurez (Fig.72 y 73, porciones superiores). Las trabéculas adyacentes muestran signos de remodelación (Fig.77).

El estudio de las bandas de fluorocromos (caso 203) en las distintas áreas del defecto (Figs.78-83) presenta una irregularidad mayor que en el material anterior, aunque también es posible distinguir una mayor distancia entre las bandas 2ª y 3ª, que entre la 3ª y la 4ª (Fig.79). En general, existe poca actividad tras la administración del 4º fluorocromo (Fig.79).

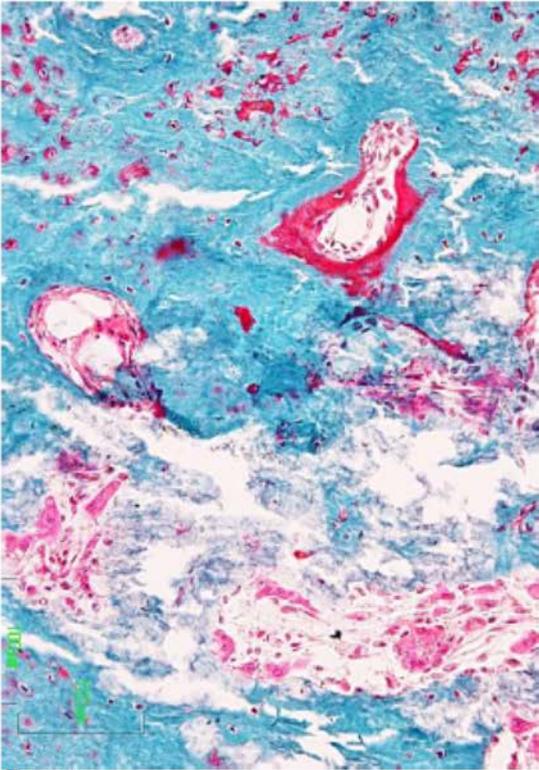


Fig.-72

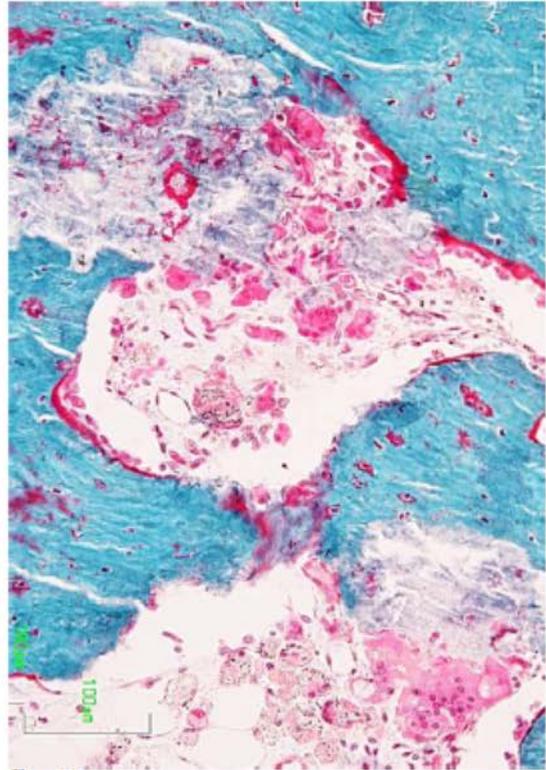


Fig.-73

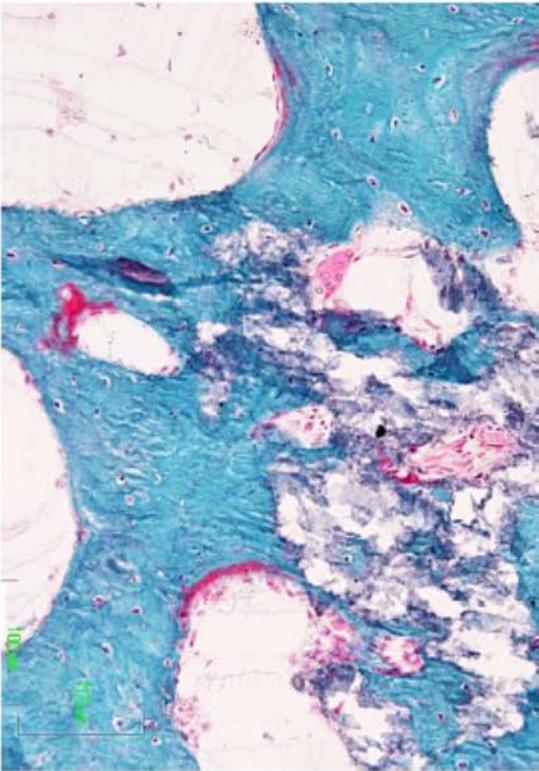


Fig.-74

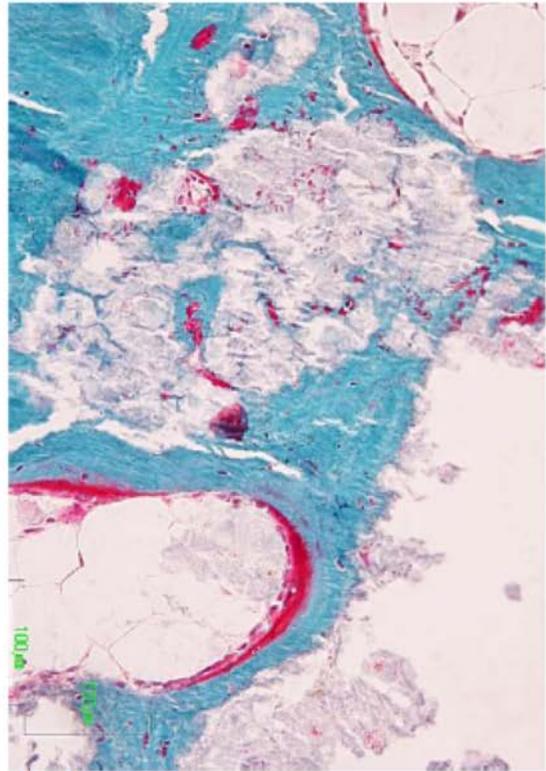


Fig.-75

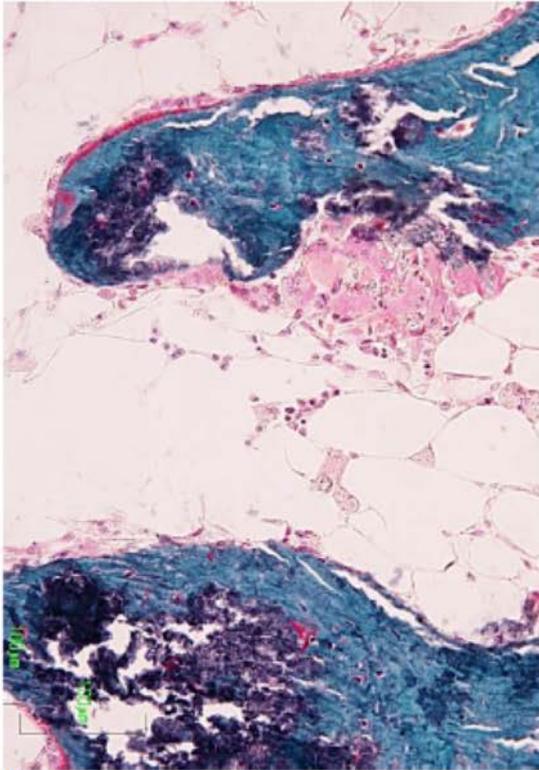


Fig.-76

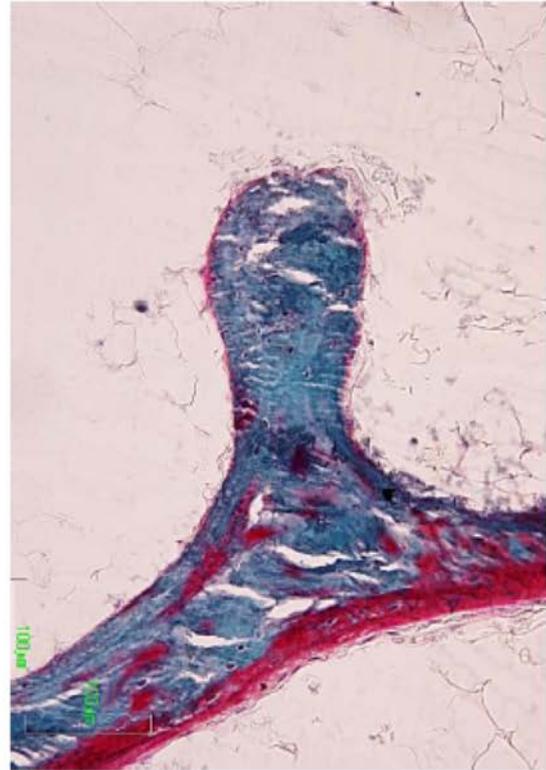


Fig.-77

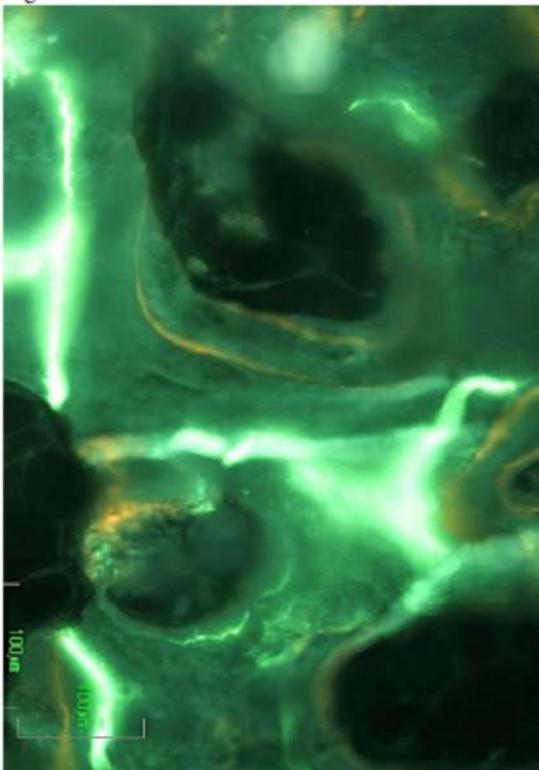


Fig.-78

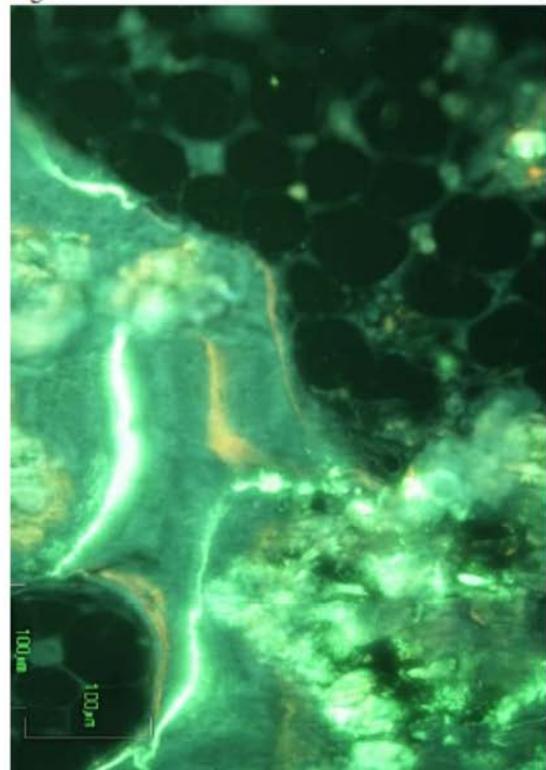


Fig.-79



Fig.-80

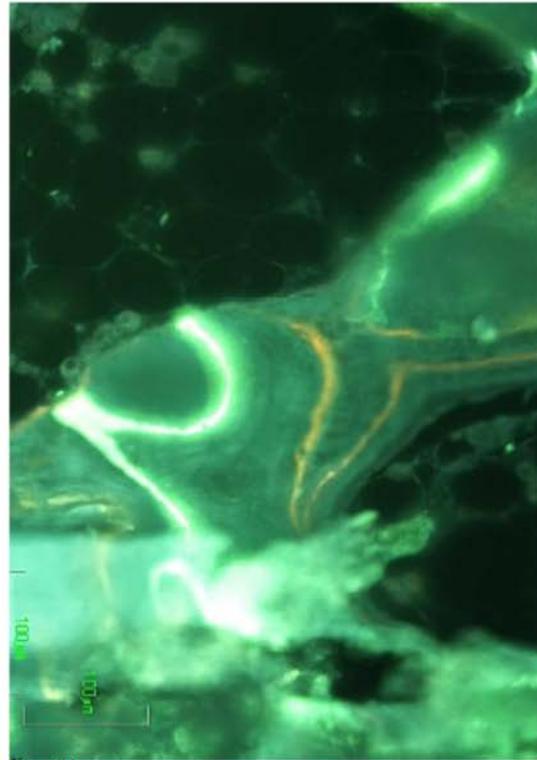


Fig.-81

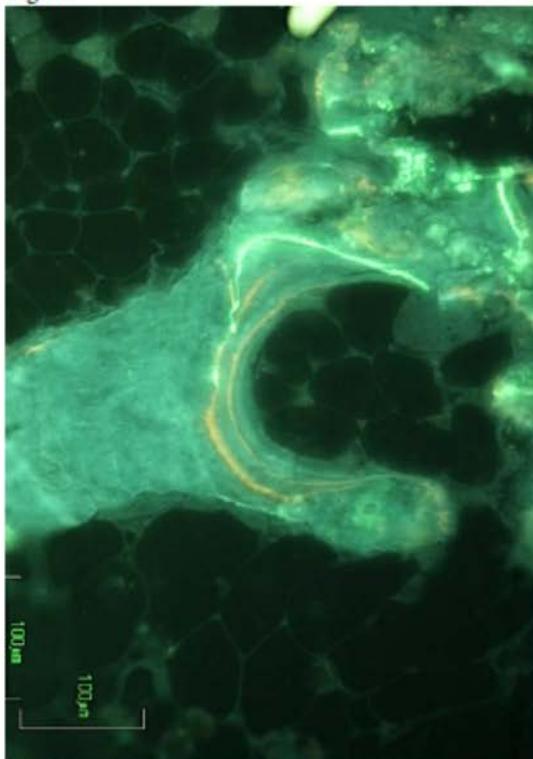


Fig.-82

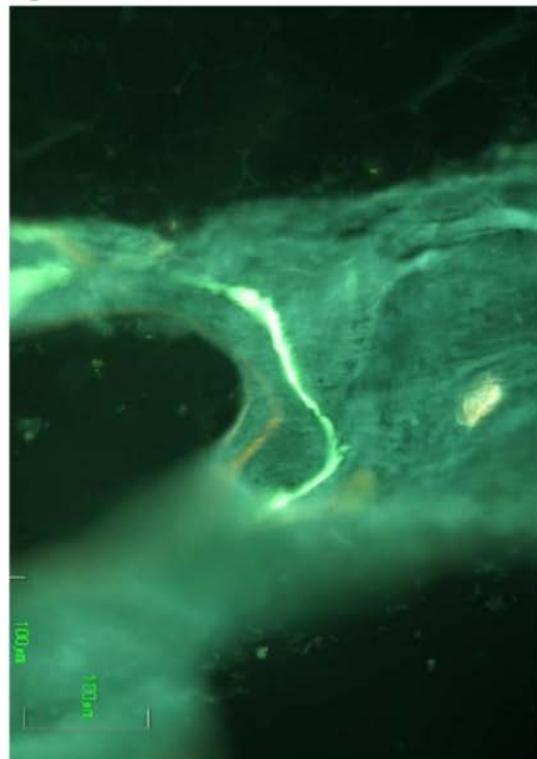


Fig.-83

Seguidamente se muestran los diagramas de barras mostrando los valores de las medidas de los fluorocromos en las distintas áreas, bien por intervalos (Diagrama 13) como promediadas (Diagrama 14).

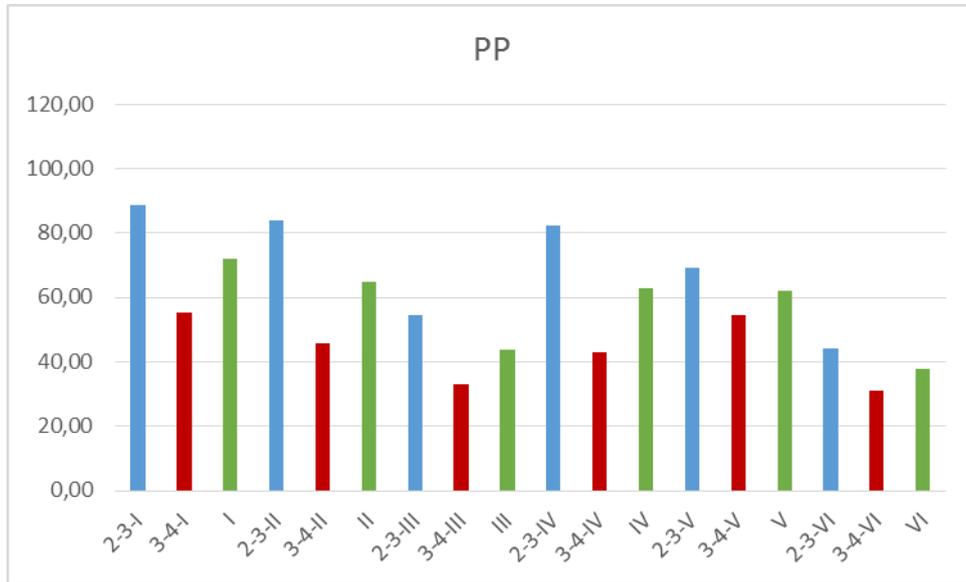


Diagrama 13.- Representación por intervalos de las medidas de las distintas zonas del defecto. Nótese que las del primer intervalo (azul) son mayores que las del segundo (rojo).

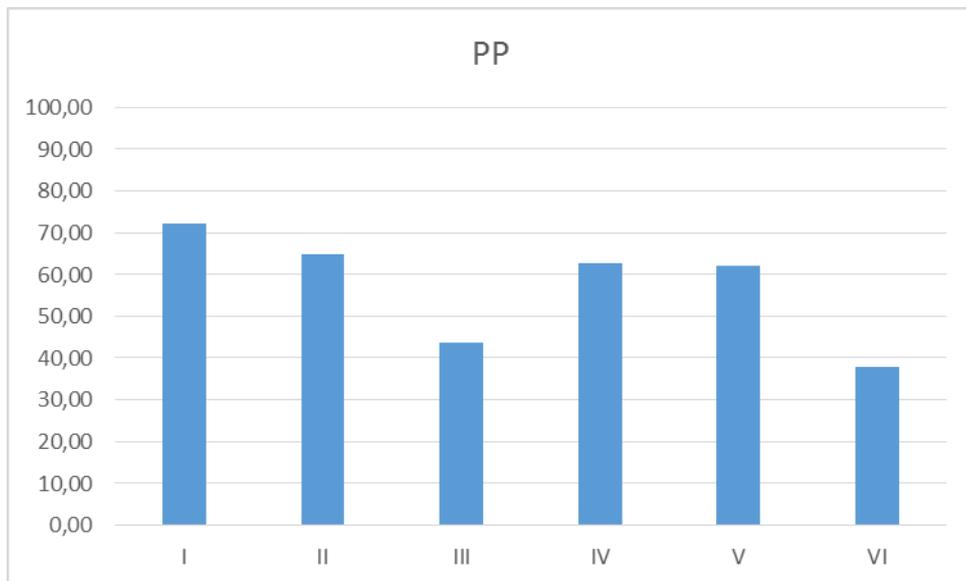


Diagrama 14.- Valores promediados de las distintas zonas de estudio. Todos son mayores que los del hueso trabecular normal. También las medias de las zonas I y II, cortical y centro de lesión, son mayores que las de las zonas periféricas.

### **Material V-6**

El último material de este grupo, se caracteriza por no poseer en su composición hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), desde el punto de vista de la histología (caso 182) convencional, presenta grumos de material integrados en hueso (Figs.84-88) e invadidos por espículas de hueso vascularizadas (Figs.86 y 88). Las células multinucleadas son pequeñas y se encuentran fundamentalmente en los espacios medulares (Figs.84 y 87), la actividad osteosintética traducida por la cantidad de sustancia osteoide es escasa (Figs.84, 87 y 88).

El estudio con fluorescencia (caso 180) muestra la presencia de las bandas características en las distintas zonas (Figs.90-94), si bien los contornos son más irregulares en las zonas I y II (Fig.90 y 91). En la Fig.95 se ilustra una imagen de remodelación osteonal haversiana, en el hueso normal.

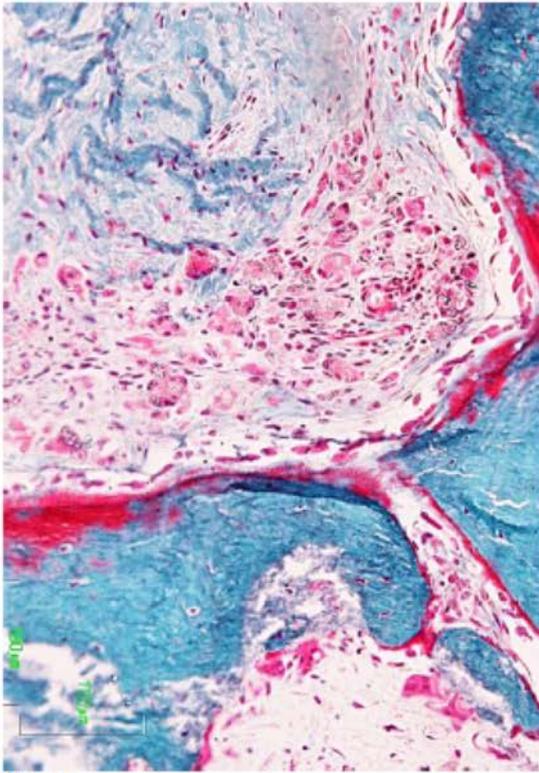


Fig.-84

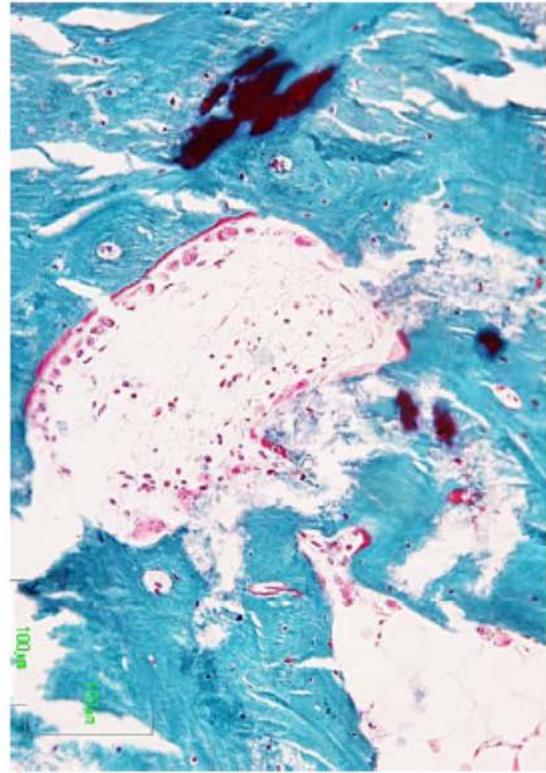


Fig.-85



Fig.-86

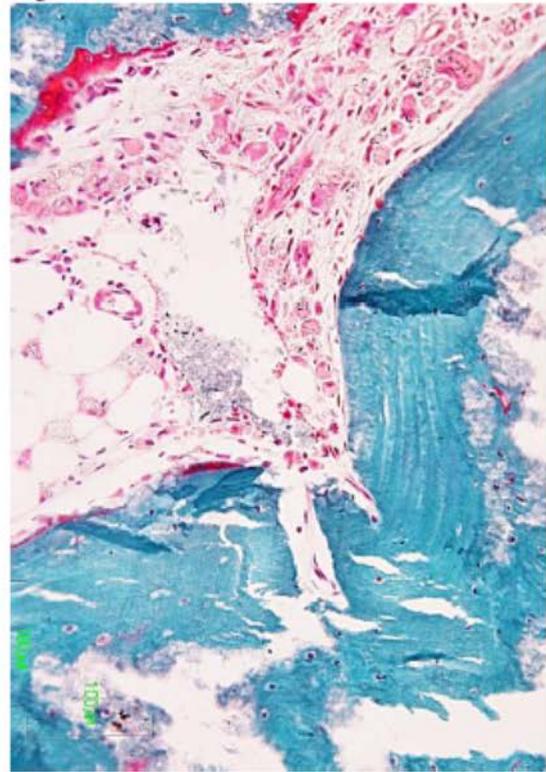


Fig.-87

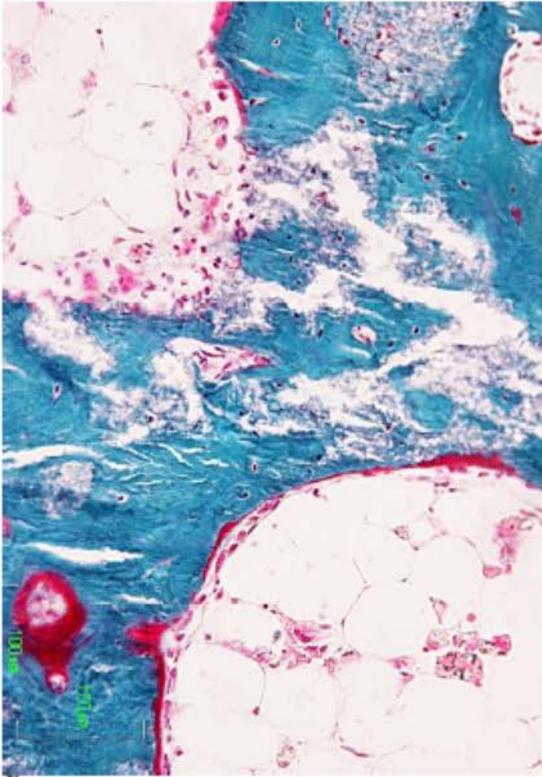


Fig.-88

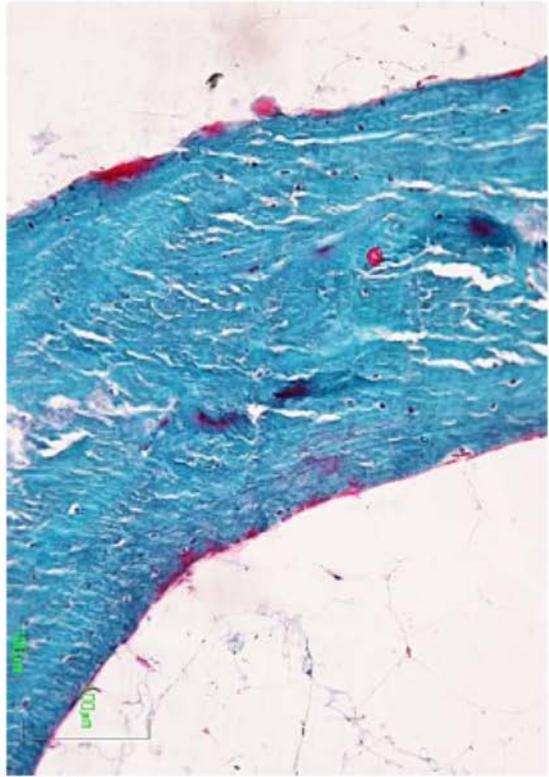


Fig.-89

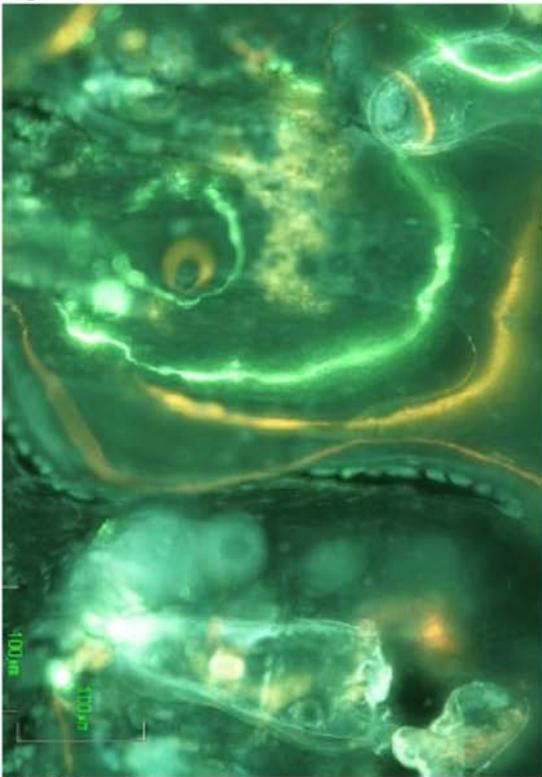


Fig.-90

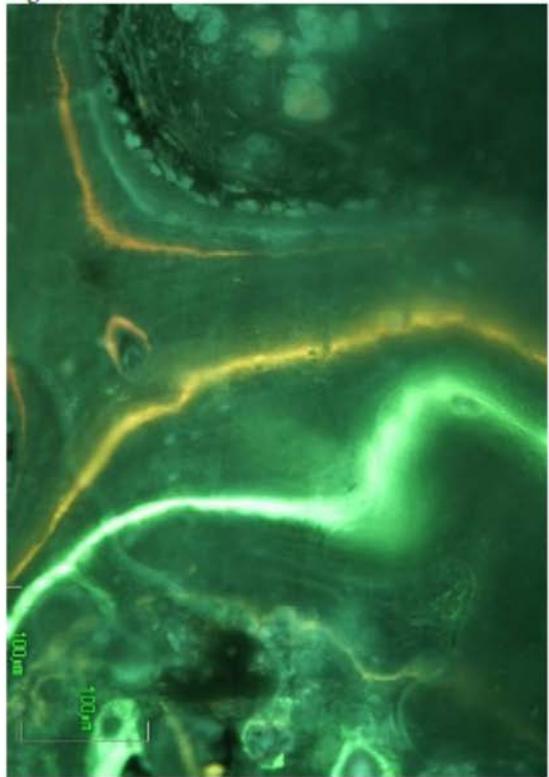


Fig.-91

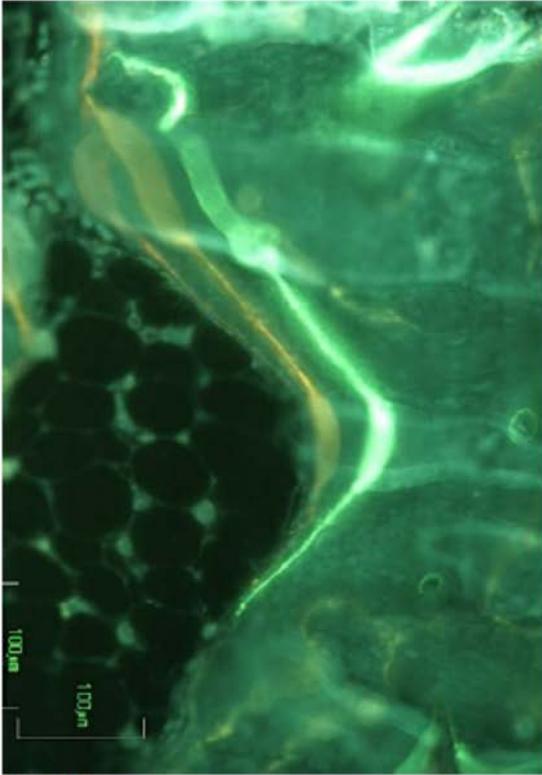


Fig.-92

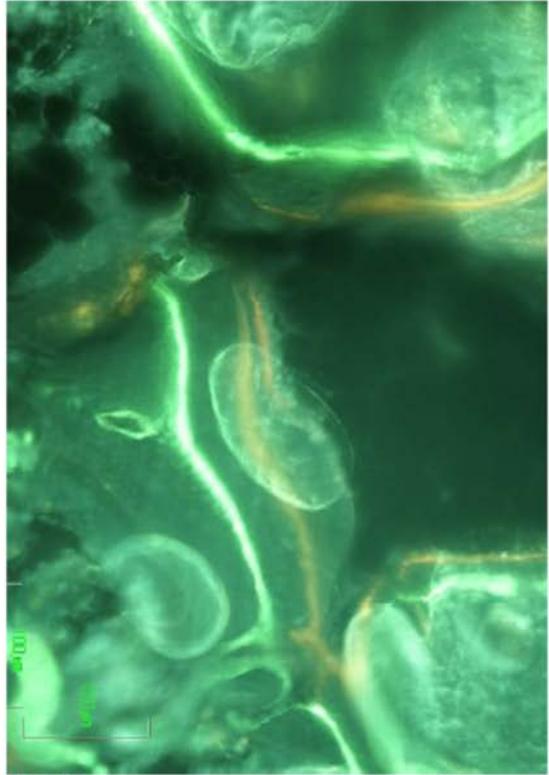


Fig.-93

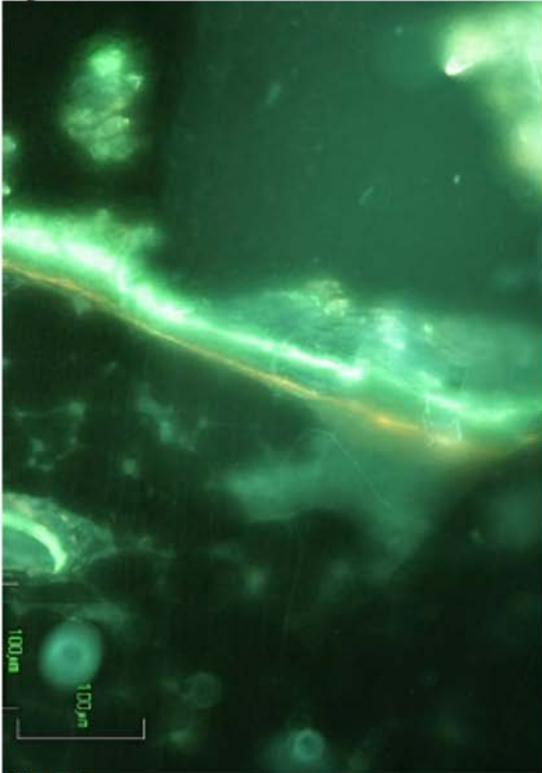


Fig.-94

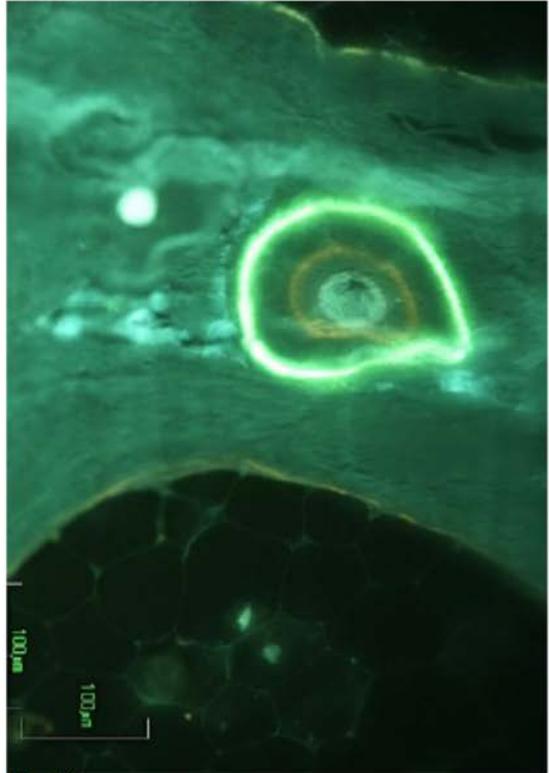


Fig.-95

El estudio morfométrico (diagramas 15 y 16), si bien presenta una actividad global mayor en el área I, esta, al menos en parte parece debida al segundo periodo de marcado, asimismo la zona IV, registra un comportamiento infrecuente en cuanto a la cantidad, notablemente mayor que las otras zonas periféricas (III y V).

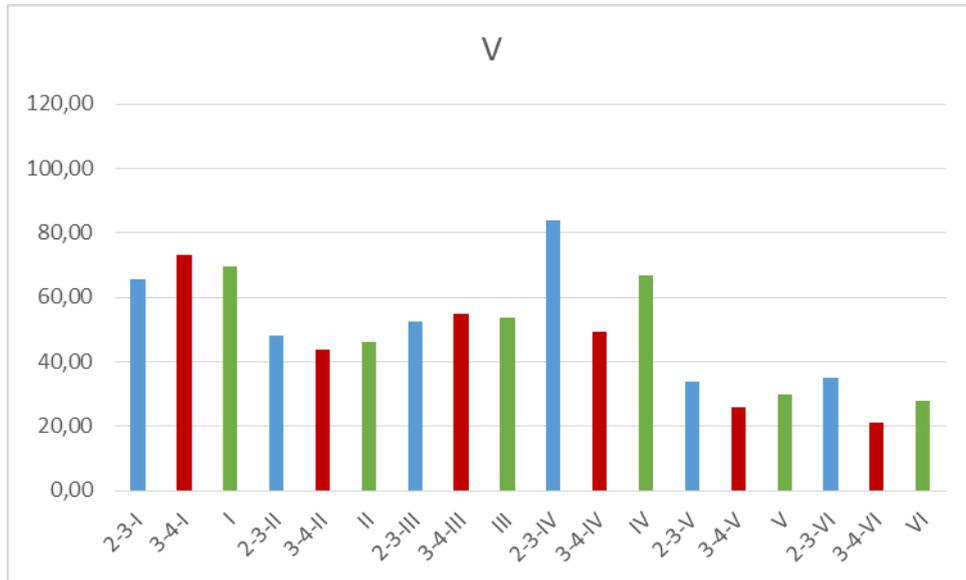


Diagrama 15.- El diagrama segregado muestra una mayor amplitud en el segundo periodo en las zonas I y III, mientras que la IV muestra una actividad inversa. Las áreas II, IV, V y VI siguen el patrón habitual de mayor amplitud en el primer periodo.

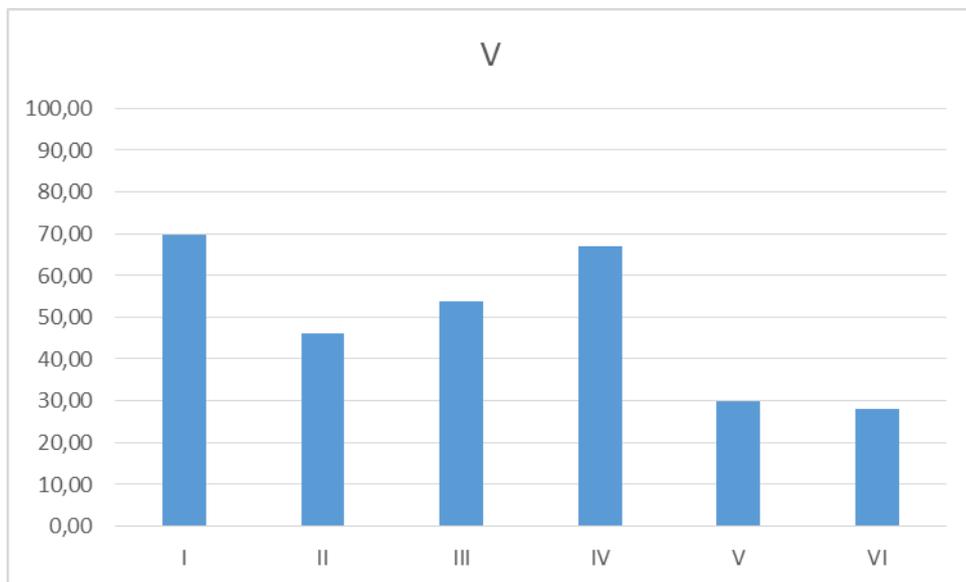
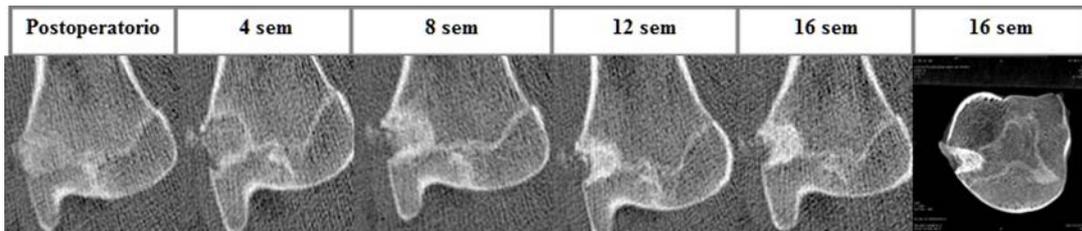


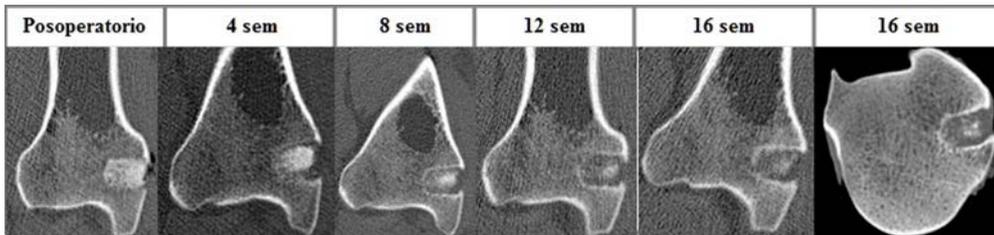
Diagrama 16.- La estructura de los promedios muestra una mayor actividad de la zona I, cortical.

### Grupo III: materiales U-3 y NN-7

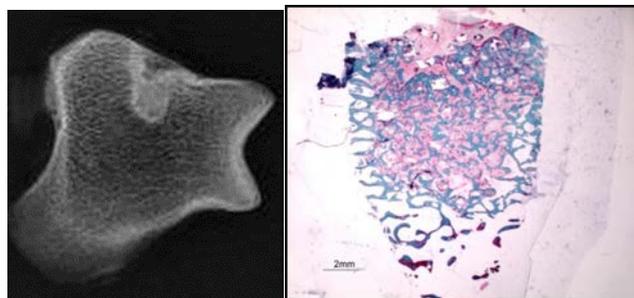
En este último grupo se estudian dos materiales, el NN-7 y el U-3, cuyas características son el aumento del gel de sílice, en torno a un 25% y de la hidroxiapatita deficiente en calcio, un 24% en el caso del material NN-7 y un 46% en el caso del material U-3. A continuación se expondrán como en grupos anteriores y siguiendo las misma sistemática, las características de las pruebas por imagen, la histología y la morfometría de los casos de este grupo. Imágenes de TAC (Figs.J y K), y Radiología y Lupa (Figs.L y M) de NN-7 y U-3.



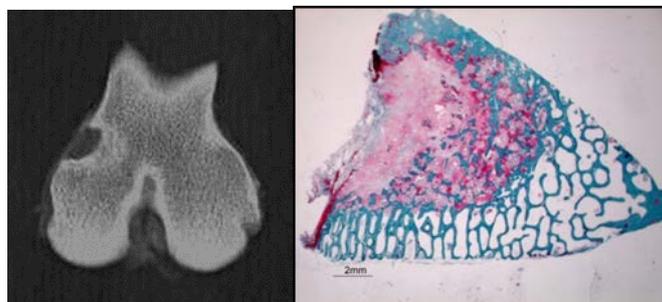
**Fig.J.-** Secuencia de imágenes de TAC correspondientes al caso 197 del material NN-7.



**Fig.K.-** Imágenes de TAC del caso 186 del material U-3.



**Fig.L.-** Imagen radiológica correspondiente al caso 197 del material NN-7 y su correlativa fotografía de lupa del corte histológico.



**Fig.M.** Imagen radiológica y foto de lupa del corte histológico del caso 157, material U.

La secuencia de las imágenes de TAC de los dos materiales de este grupo presentan una diferencia, ya que mientras las del material NN-7 van presentando una densificación progresiva que al final de la experiencia es similar a la densidad cortical ósea (Fig.J), las correspondientes al material U-3 van perdiendo densidad periférica progresivamente, aunque el límite del defecto presenta también una densificación (Fig.K). Lo mismo puede decirse de las imágenes radiológicas y de lupa, (Figs.L y M) donde la red trabecular del material NN-7 (Fig.L) es relativamente fina y uniforme continuándose con las trabéculas del hueso adyacente, mientras que la red del material U-3 es deficitaria superficialmente y en profundidad está constituida por trabéculas más gruesas mostrando rarefacción en la periferia del defecto (Fig.M).

### **Material NN-7**

El estudio histológico de las preparaciones del material NN-7, caso 197, muestra la existencia de grumos muy grandes de material residual (Figs. 97-100), de unas 400 $\mu$ m de eje mayor, en ocasiones parcialmente osteointegrados (Fig. 98, 99 y 100), y en otras alojados en espacios medulares (Fig.97). Las superficies libres, no osteointegradas de estos grumos de material, se encuentran siempre en relación con numerosas y grandes células multinucleadas (Figs.96-100), aunque a veces también se encuentran células multinucleadas, sin asociación aparente con estos grandes grumos. La actividad osteosintética es escasa existiendo poca sustancia osteoide (Figs.98-100), con la excepción de la zona cortical (Fig.96). Las trabéculas de hueso adyacente presentan una estructura similar a la de otros materiales (Fig.101).

El estudio con fluorescencia (caso 197) muestra la existencia de las tres bandas presentes en los distintos materiales, en todas las áreas estudiadas (Figs. 102-107), si bien en la zona I las distancias interbandas son mayores (Fig.102).

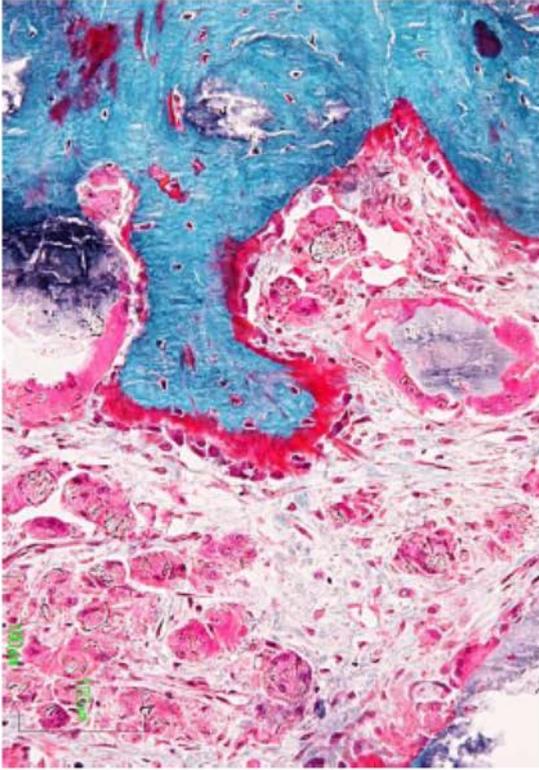


Fig.-96

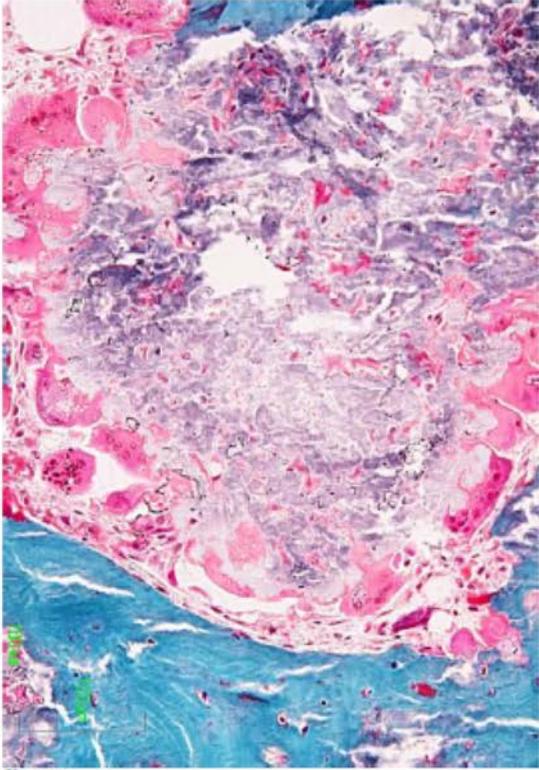


Fig.-97

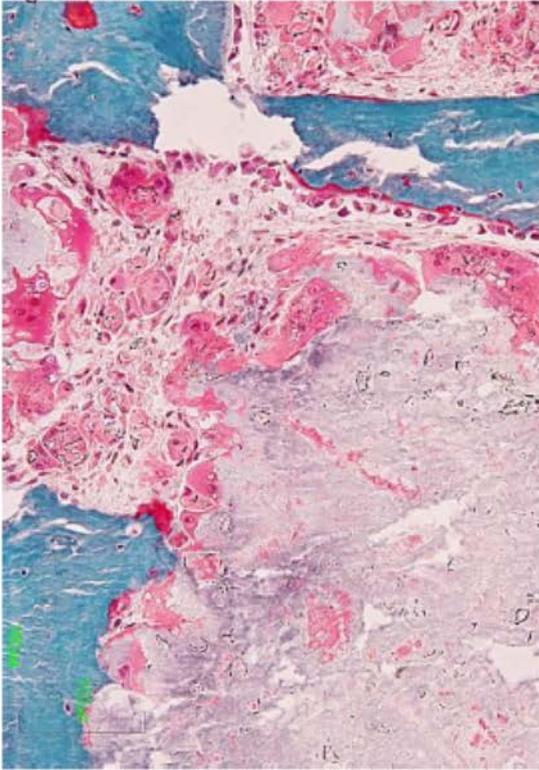


Fig.-98

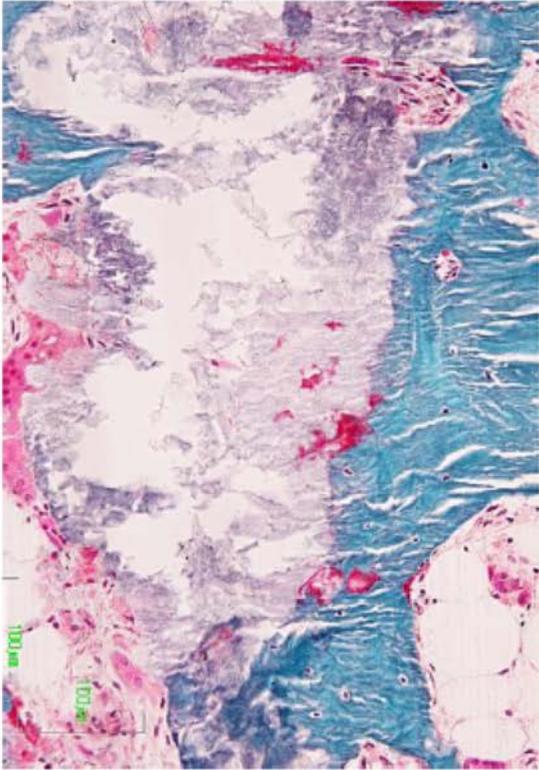


Fig.-99

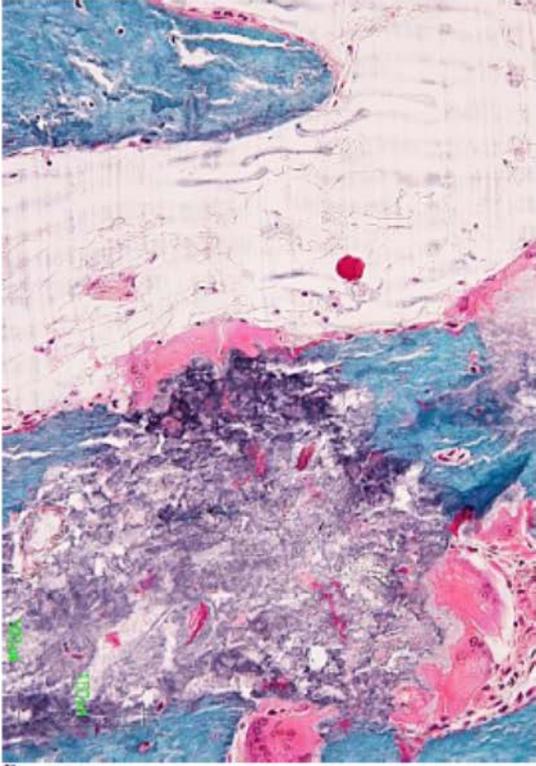


Fig.-100

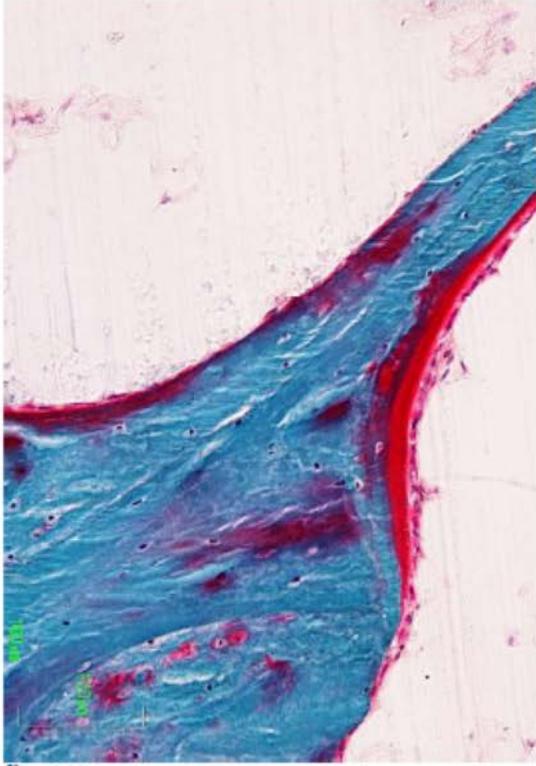


Fig.-101

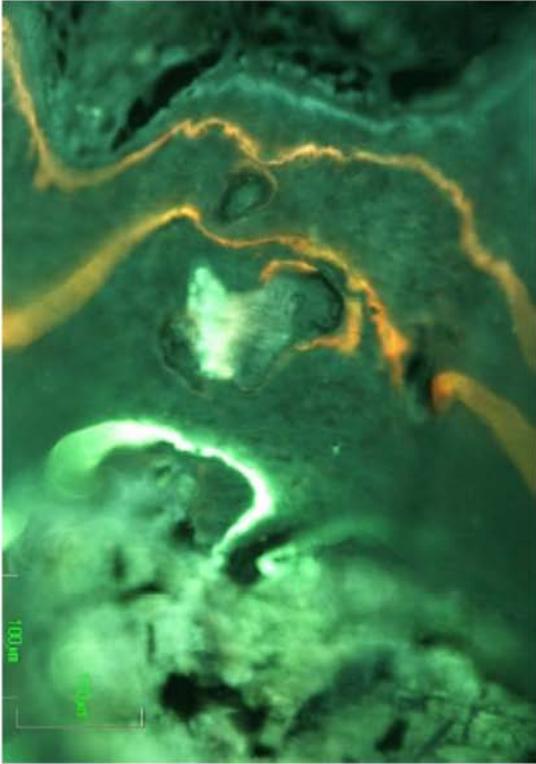


Fig.-102

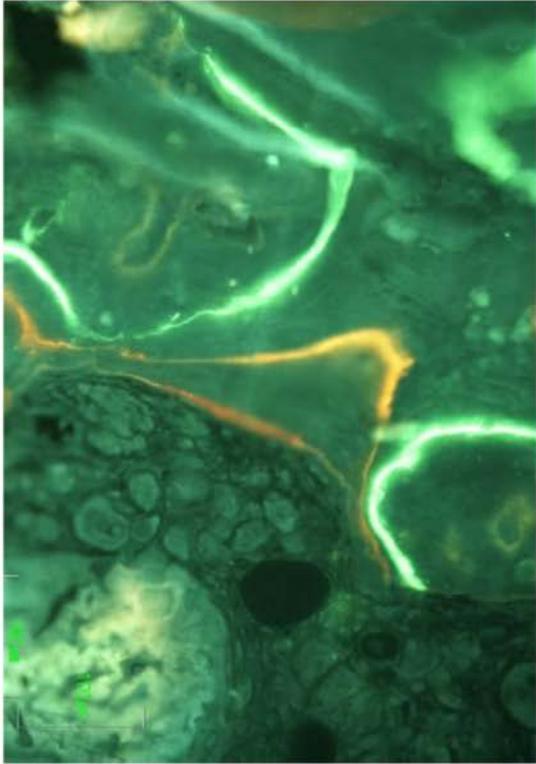


Fig.-103

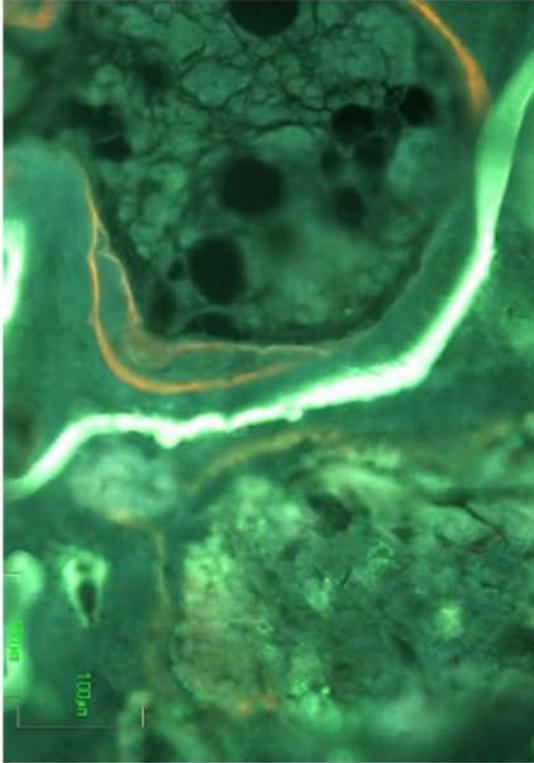


Fig.-104

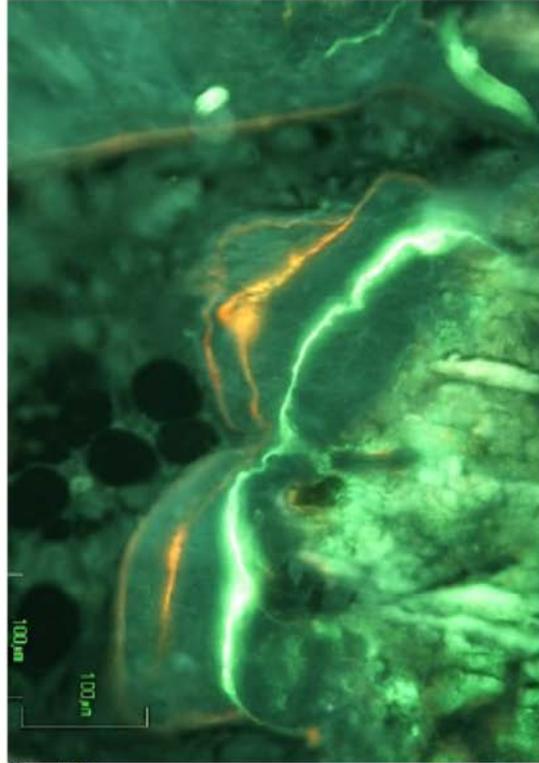


Fig.-105

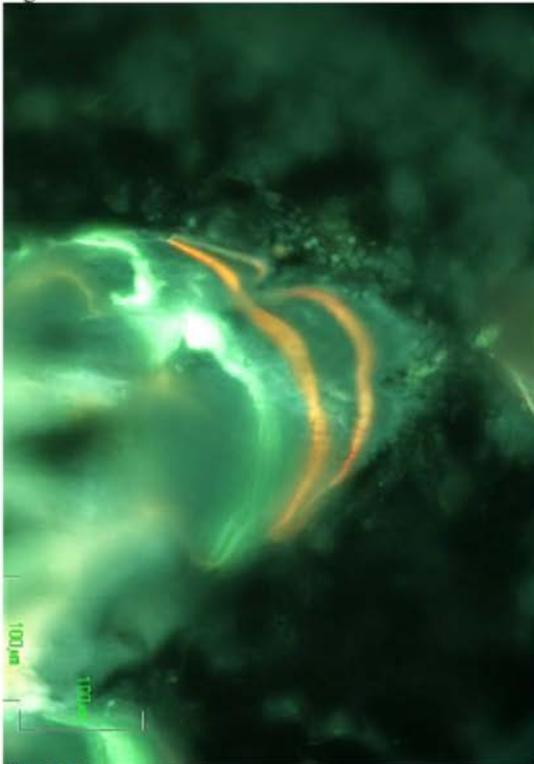


Fig.-106

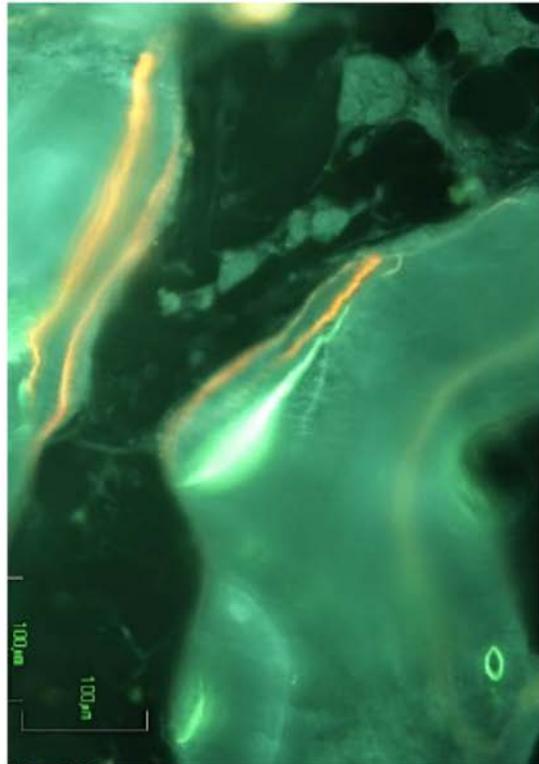


Fig.-107

Representación en diagramas de barras (diagrama 17 y 18) de las medidas de las distintas zonas del defecto estudiadas.

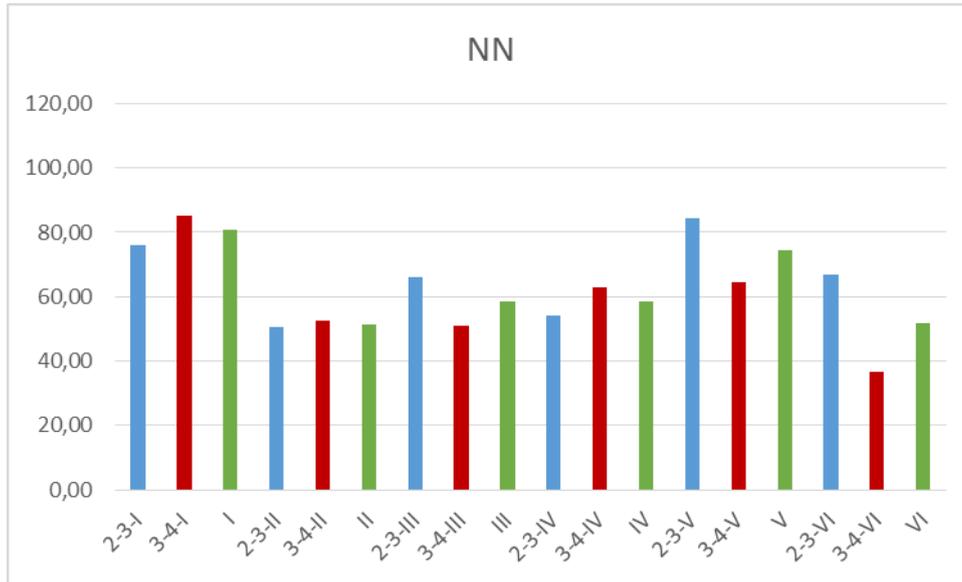


Diagrama 17.- Las barras del eje de abscisas muestran un discreto aumento de actividad en el segundo intervalo de medida en las zonas I y II.

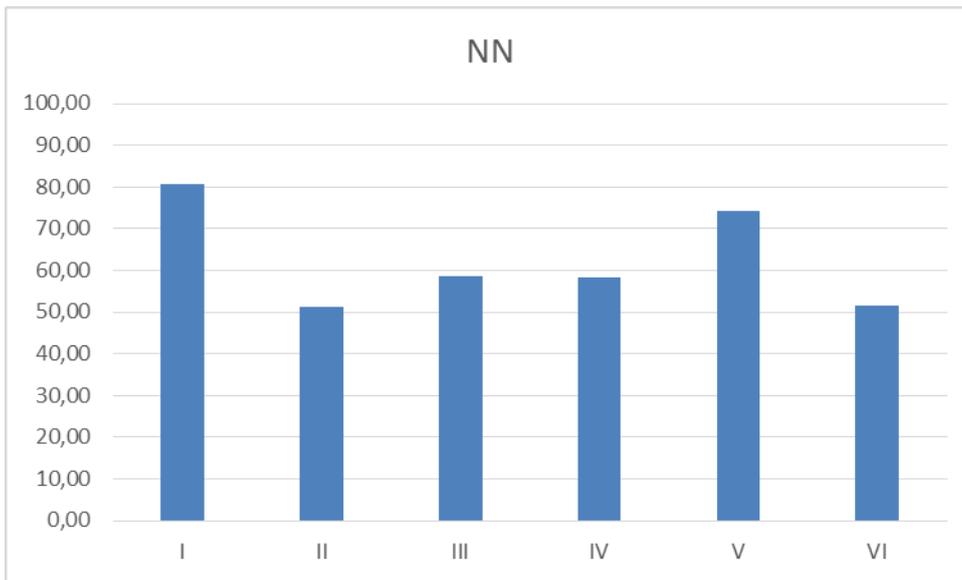


Diagrama 18.- Las barras promediadas muestran un mayor valor en las áreas I y V, cortical y profundidad de la lesión.

### **Material U-3**

Las características histológicas de este material residen en que pueden apreciarse grandes grumos parcialmente osteointegrados pero fragmentados e invadidos por células mononucleadas y pequeños vasos (Figs.108, 109, 111 y 112). En las zonas donde estas estructuras asoman a los espacios medulares se les asocian grandes células mononucleadas (Figs.110-112). Además, en los espacios medulares es frecuente encontrar un material mucho más pequeño refringente asociado a pequeñas células multinucleadas y macrófagos (Figs.109-111). La actividad osteosintética es muy escasa, y no se identifican hileras osteoblásticas ni sustancia osteoide (Figs.106-112).

El estudio de los fluorocromos (Figs.114-119) permite observar la distribución de las bandas, en general, de disposición irregular (Figs.114, 115 y 116).

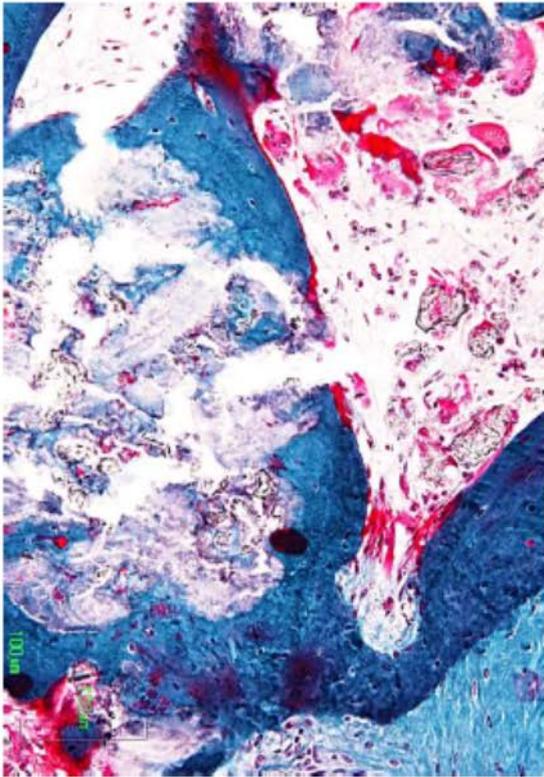


Fig.-108

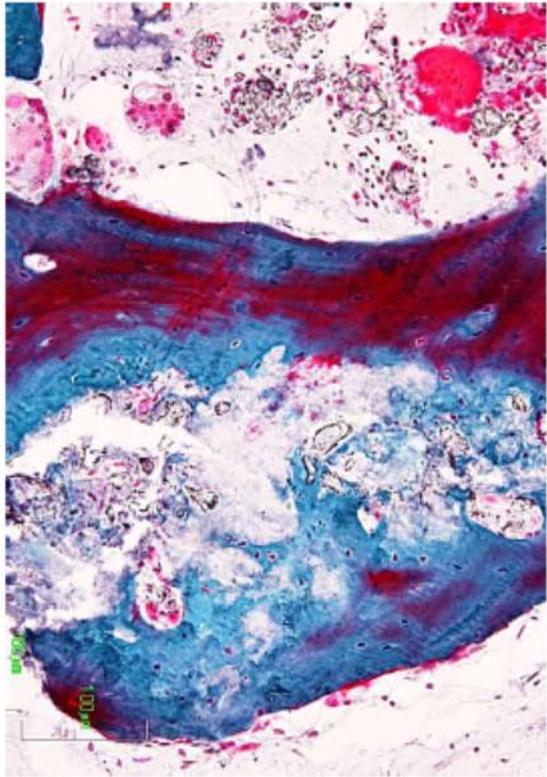


Fig.-109

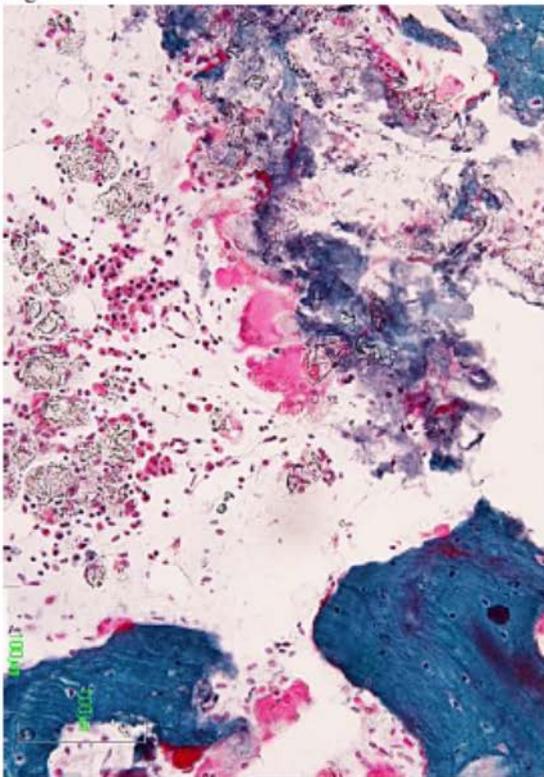


Fig.-110

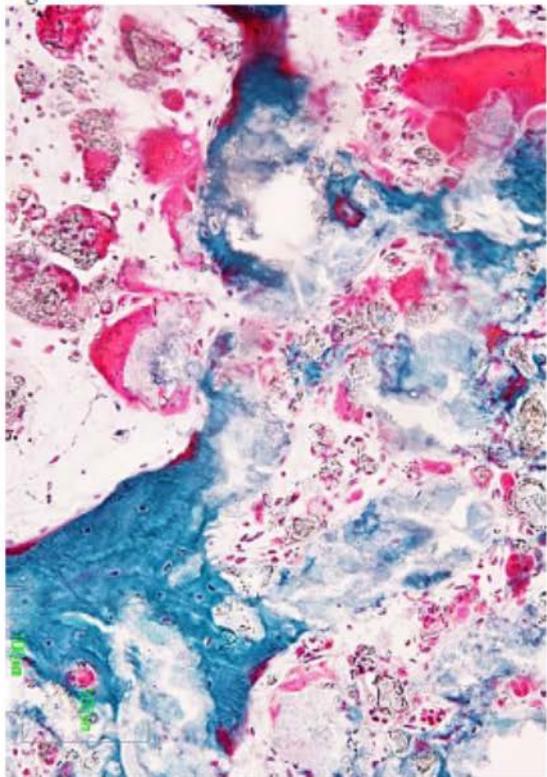


Fig.-111

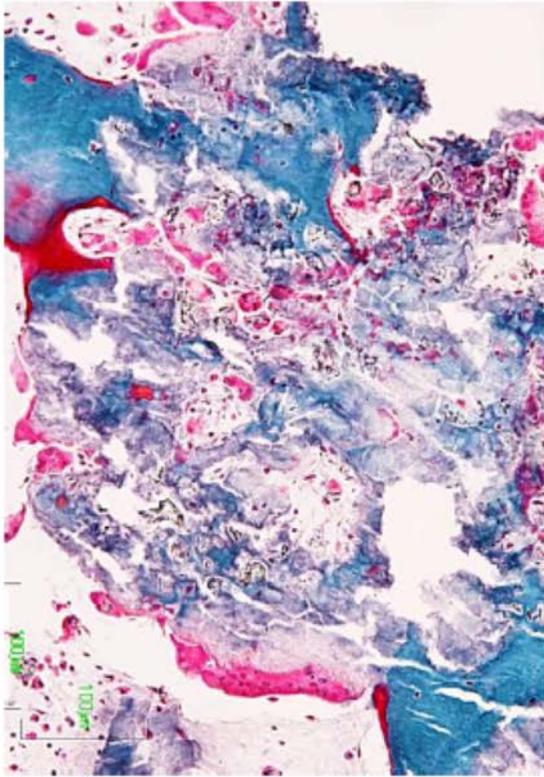


Fig.-112

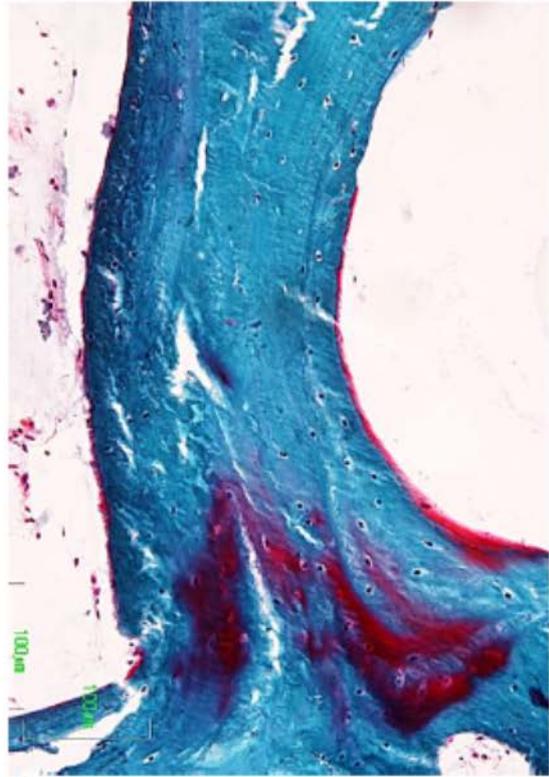


Fig.-113

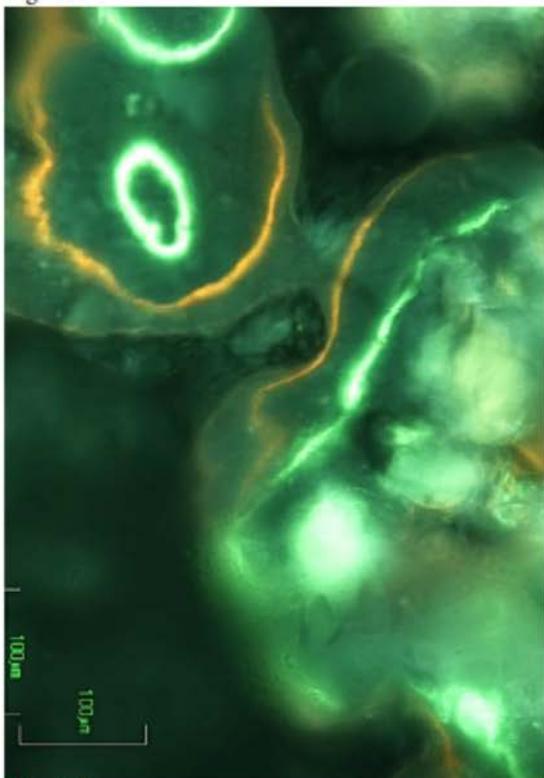


Fig.-114

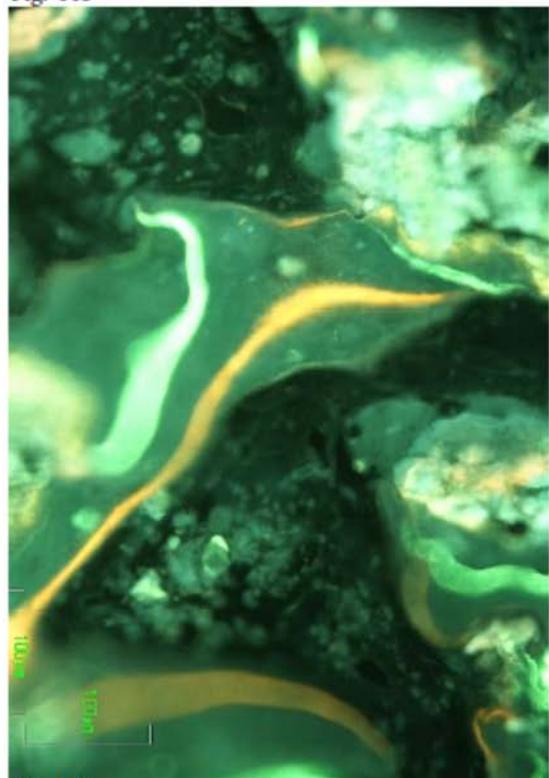


Fig.-115

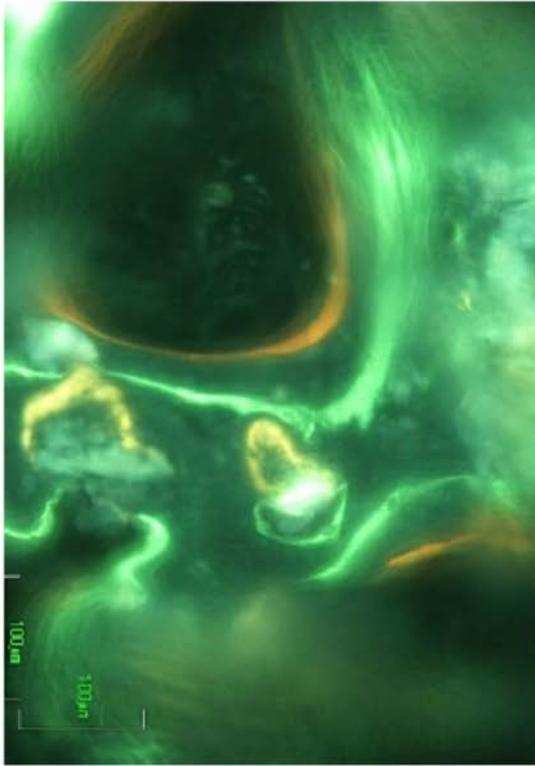


Fig.-116

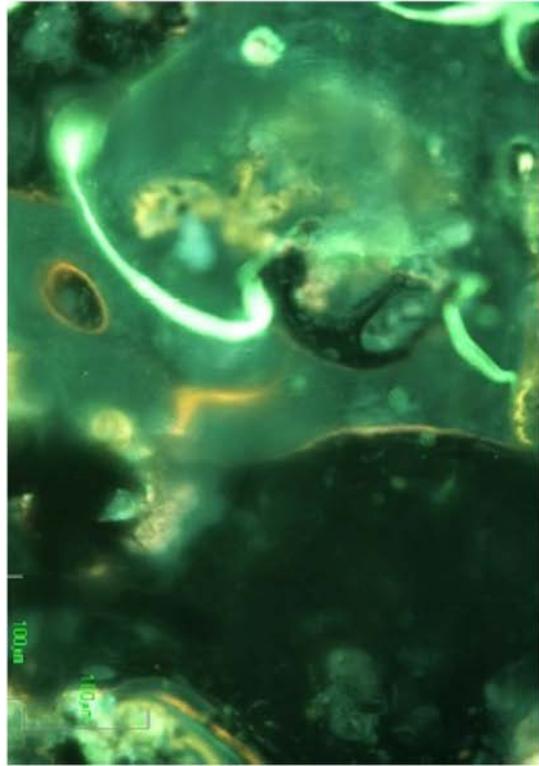


Fig.-117



Fig.-118

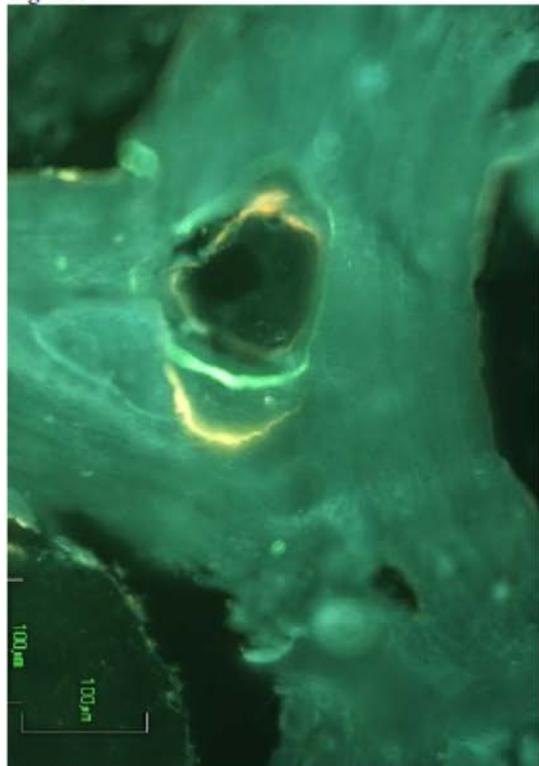


Fig.-119

A continuación se muestra una representación (Diagramas 19 y 20).de las medidas morfométricas obtenidas en los distintos casos del material **U-3**. Los datos obtenidos morfométricamente, muestran en prácticamente todas las áreas estudiadas una mayor actividad sintética en el primer intervalo, entre el 2º y 3º fluorocromo, y también una mayor actividad en el área I.

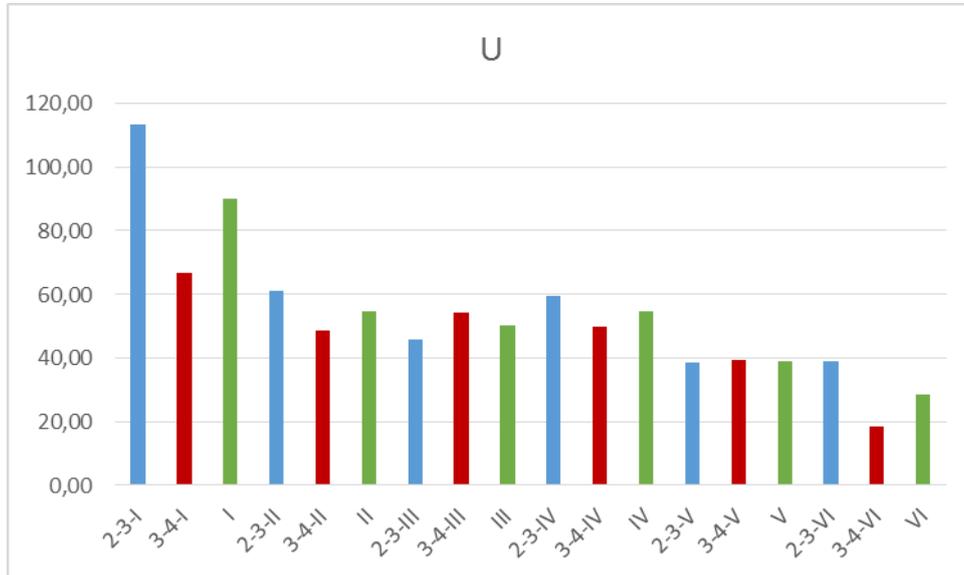


Diagrama 19.- Las barras mostradas presentan una mayor actividad en el primer intervalo de las bandas fluorescentes (azul) que en el segundo (rojo).

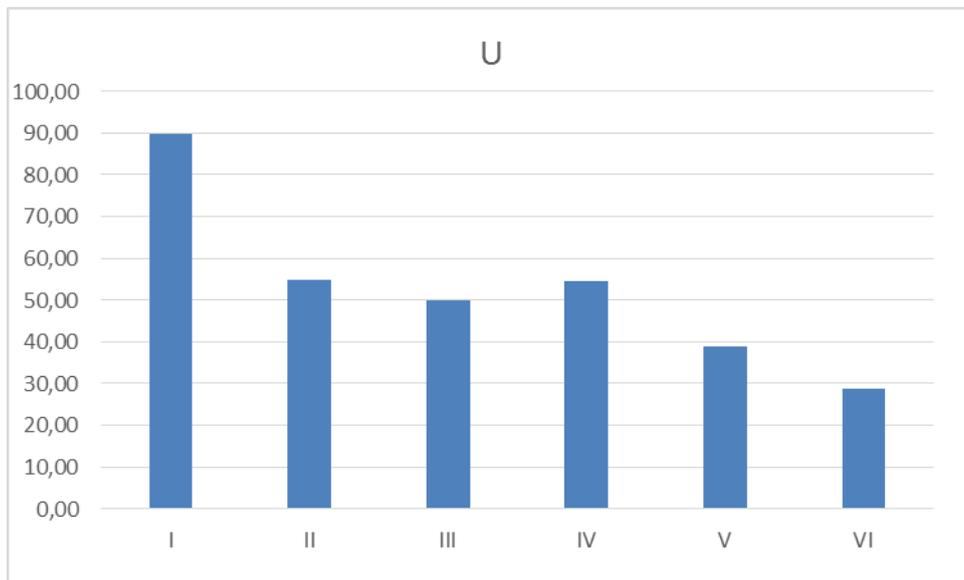
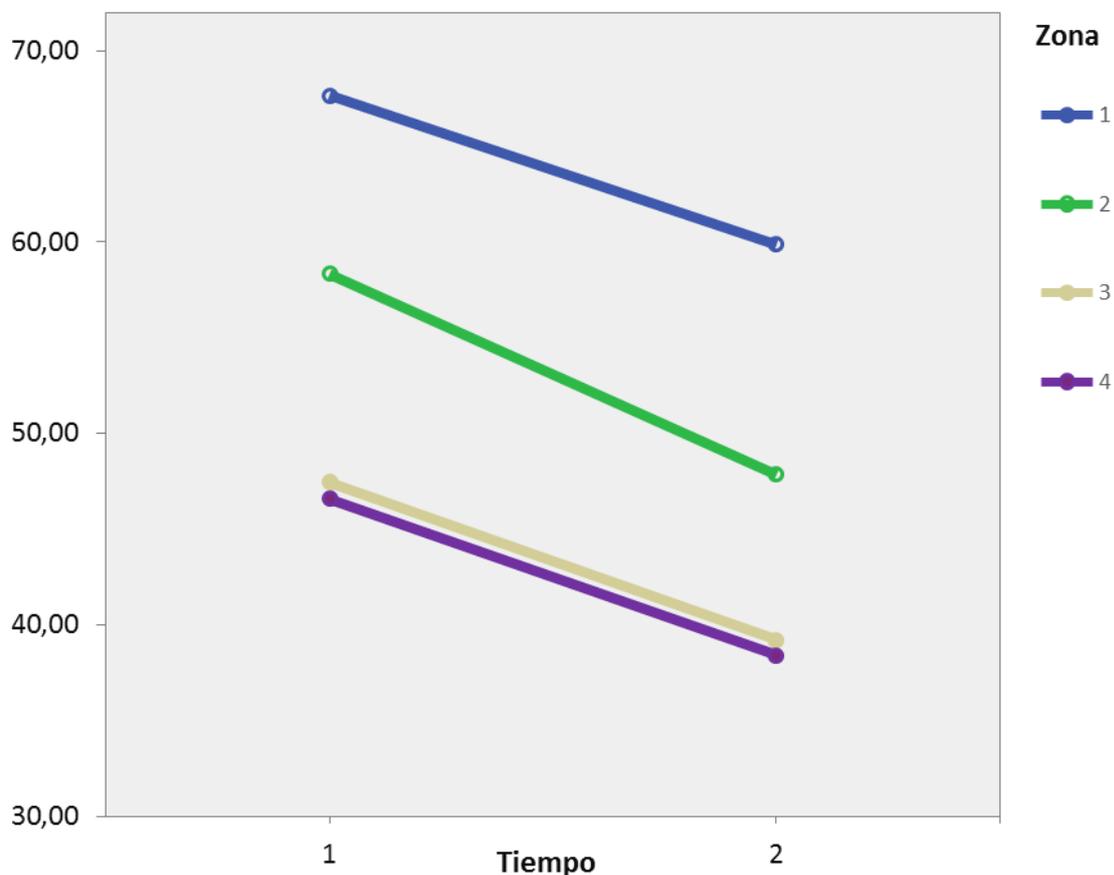


Diagrama 20.- Los datos morfométricos promediados muestran una mayor actividad en la zona I, cortical, con respecto al resto de las áreas estudiadas.

## 5.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

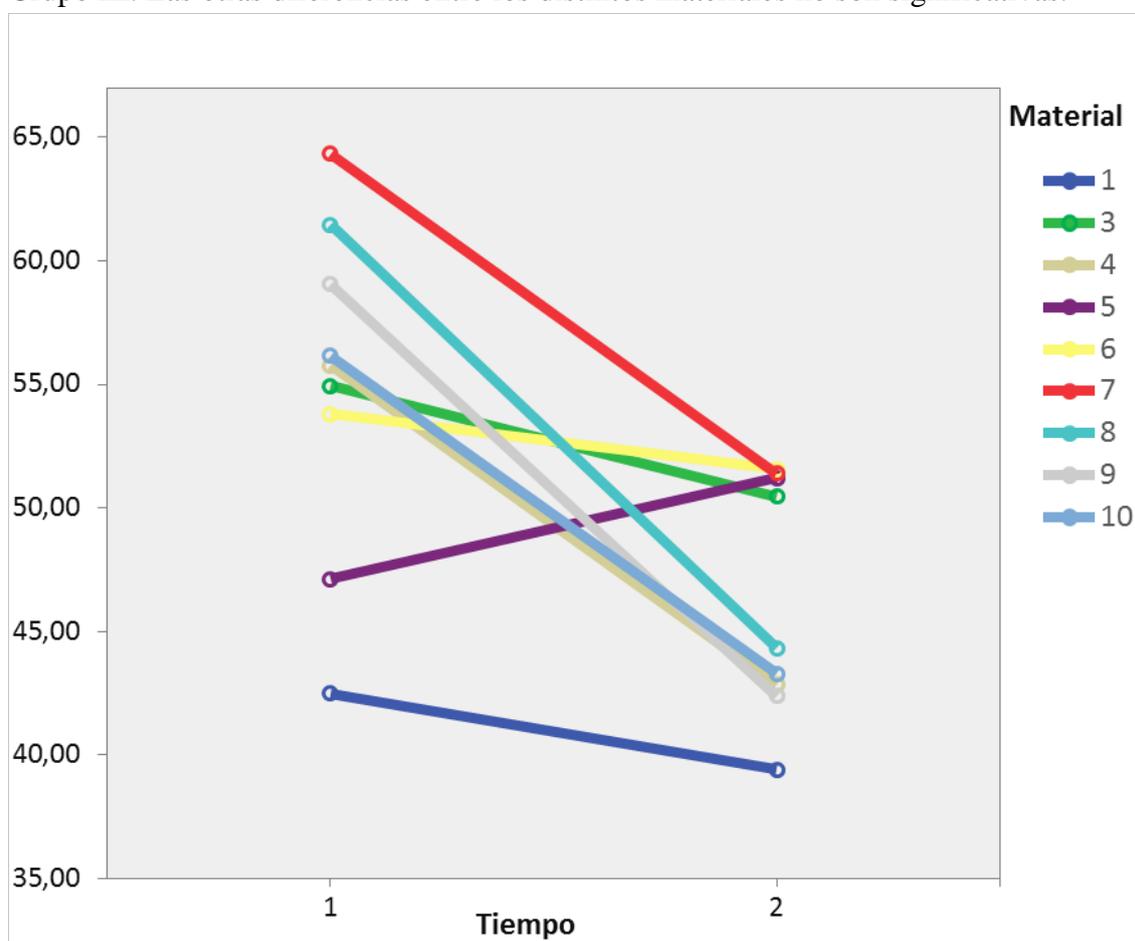
En la Gráfica 1 se muestra que si consideramos los intervalos de tiempo (1 y 2 en el eje de abscisas) la síntesis ósea disminuye en todas las áreas (1, 2, 3 y 4) a lo largo del tiempo estudiado. Por otra parte si consideramos el eje de ordenadas vemos que independientemente del tiempo estudiado la síntesis ósea es mayor en la zona I que en la II, seguida del promedio III+IV, y que globalmente la zona donde menor síntesis se produce es la V. Con respecto a la significación estadística, el análisis en el primer intervalo de tiempo revela que la síntesis ósea es significativamente diferente en la zona I con respecto a las otras zonas, lo mismo sucede con la zona II, sin embargo, las zonas III+IV y la V no muestran diferencias significativas entre ellas. Si consideramos el segundo intervalo temporal, a pesar de la caída en la síntesis ósea global, las significaciones estadísticas son similares.



Gráfica 1.- Se representa en el eje de abscisas los dos intervalos de tiempo medidos, 1 corresponde al periodo entre la administración del 2º y 3º fluorocromos, y 2 corresponde al periodo entre la administración del 3º y 4º fluorocromos. En el eje de ordenadas se representan los valores cuantitativos de las distintas zonas estudiadas que se han agrupado en cuatro. La 1 (azul) corresponde a la zona I de la lesión, la zona más externa, subperióstica o cortical. La 2 (verde) corresponde a la zona II, centro de la lesión. La 3 (caqui) corresponde al promedio de las medidas de las zonas laterales de la lesión (III y IV) y finalmente la zona 4 (violeta) corresponde a la línea de las medidas del fondo

de la lesión (V).

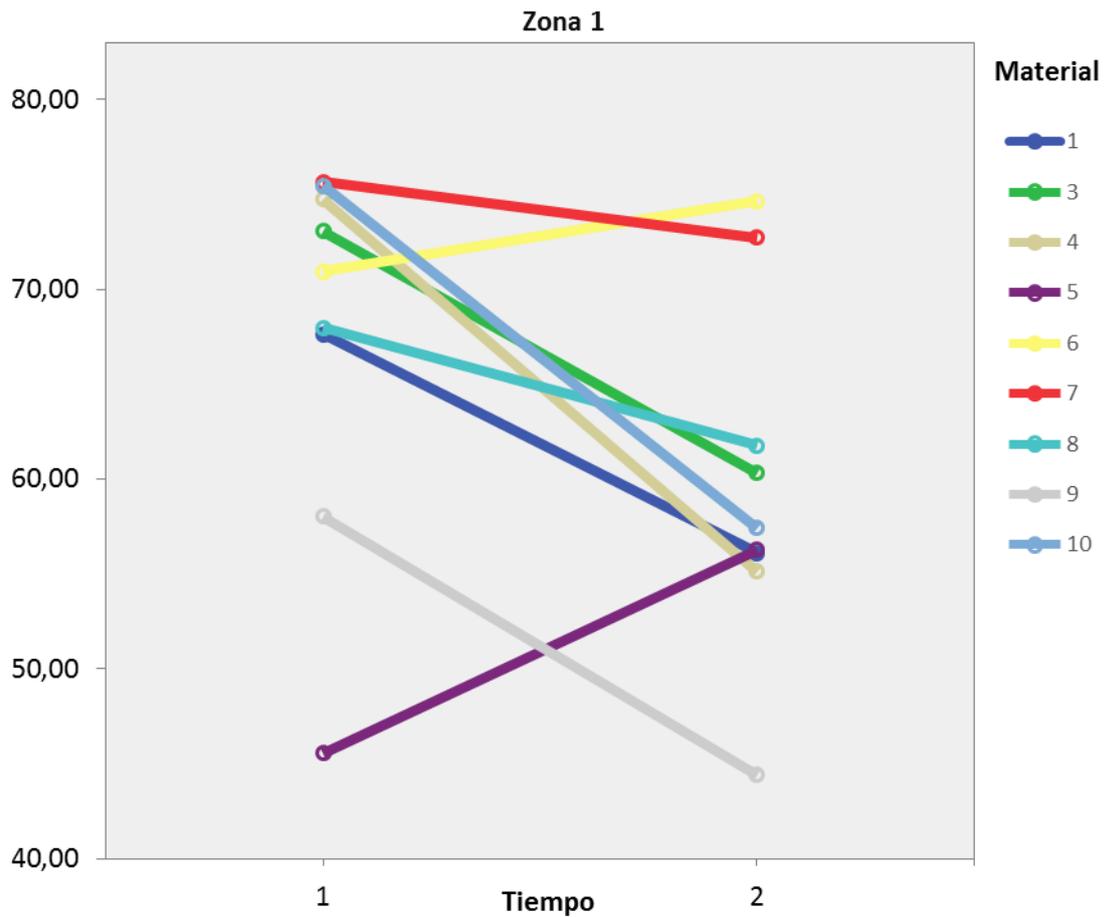
La Gráfica 2, representa la evolución de la síntesis ósea en los dos periodos de tiempo estudiados, representando las líneas los distintos tipos de material estudiados. Con respecto a la significación estadística, en el intervalo 1, la síntesis ósea realizada entre la administración del 2º y 3º fluorocromo, el material Bio-Oss® (1) es significativamente menor que el 4, 8, 9 y 10, todos ellos pertenecientes al Grupo II y el 7 perteneciente al Grupo III. A pesar de ser menor, las diferencias con los otros materiales 3 (Grupo III), 5 (Grupo I) y 6 (Grupo II) no son significativas. En resumen existen pocas diferencias significativas, fundamentalmente el material 1 con casi todos los del Grupo II. En el intervalo 2, la síntesis ósea corresponde a la realizada entre el 3º y 4º fluorocromos, las diferencias significativas se centran entre el material 1 y el 6 del Grupo II y los 3 y 7 del Grupo III. Las otras diferencias entre los distintos materiales no son significativas.



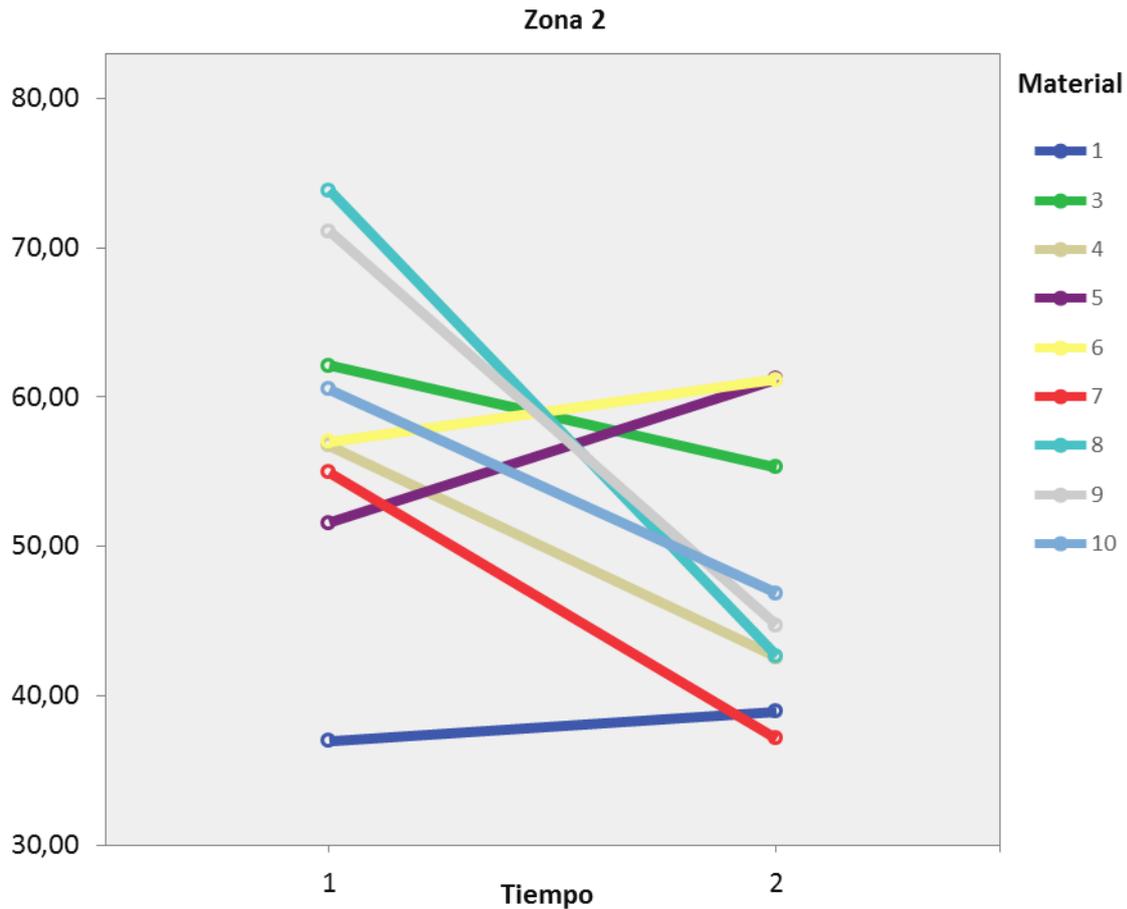
Gráfica 2.- En esta gráfica se muestran en el eje de abscisas los dos intervalos de tiempo estudiados (1 y 2) y en el eje de ordenadas la cuantificación del hueso neoformado en los dos intervalos. Los materiales se representan con líneas de colores que serán distintos para cada tipo e iguales para todas las gráficas: (1) Bio-Oss®, azul marino, (3) Material U, grupo III, verde, (4) Material OO grupo II, caqui, (5) Material C, grupo I, Índigo, (6) Material V, grupo II, amarillo, (7) Material NN, grupo III, rojo, (8) Material PP, grupo II, azul celeste, (9) Material LL, grupo II, gris, (10) Material AA, grupo II, lavanda. El material Z, Grupo I, no fue representado por no alcanzar los valores obtenidos suficiente tamaño muestral.

En las Gráficas 3, 4, 5 y 6 se muestran el crecimiento óseo en relación con los distintos materiales según las distintas zonas de lesión, en relación con los dos intervalos de tiempo representados en el eje de abscisas:

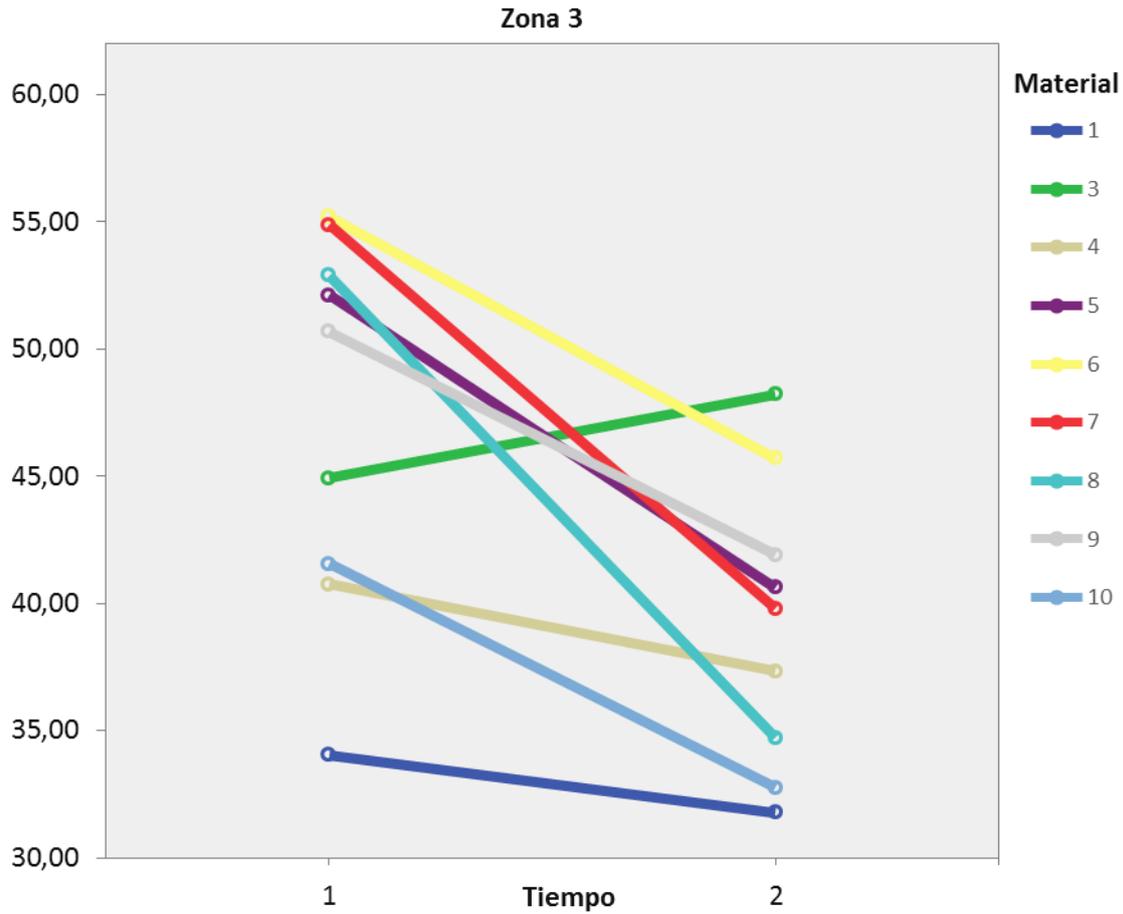
- **Zona 1 (I) Gráfica 3**, en el **tiempo 1** no existen diferencias significativas, en el **tiempo 2** los materiales 6 y 7 son significativamente mayores que el 9.
- **Zona 2 (II) Gráfica 4** en el **tiempo 1** los materiales 3, 8, 9 y 10 son significativamente mayores que el 1 y en el **tiempo 2** el material 1 es significativamente menor que el 6, el 4 menor que el 6, el 5 mayor que el 7, el 6 mayor que el 1, 4, 7, y el 7 menor que el 5 y 6.
- **Zona 3 (III+IV) Gráfica 5** en el **tiempo 1** el material 1 es significativamente menor que el 6, 7, 8 y 9, y el material 4 es significativamente menor que el 6 y en el **tiempo 2** el material 1 es menor que el 3 y el 6, el 3 es mayor que el 1, 4, 8, 10, el material 4 es menor que el 3, el material 6 es mayor que el 1 y el 10 y el material 9 mayor que el 10.
- **Zona 4 (V) Gráfica 6**, en el **tiempo 1** el material 1 es significativamente menor que el 4, 7, 9, el 3 es menor que el 7 y 9, el 4 es mayor que el 1 y el 6 y menor que el 7, el 5 es menor que el 7, el 6 es menor que el 4, 7 y 9, el 7 es mayor que el 1, 3, 4, 5, 6, y 10, el 9 es mayor que el 1, 3 y 6, y el 10 es menor que el 7 y en el **tiempo 2**, el material 7 es mayor que 1, 3, 4, 6, 8, 9 y 10, y el 6 es menor que el 5 y el material 9.



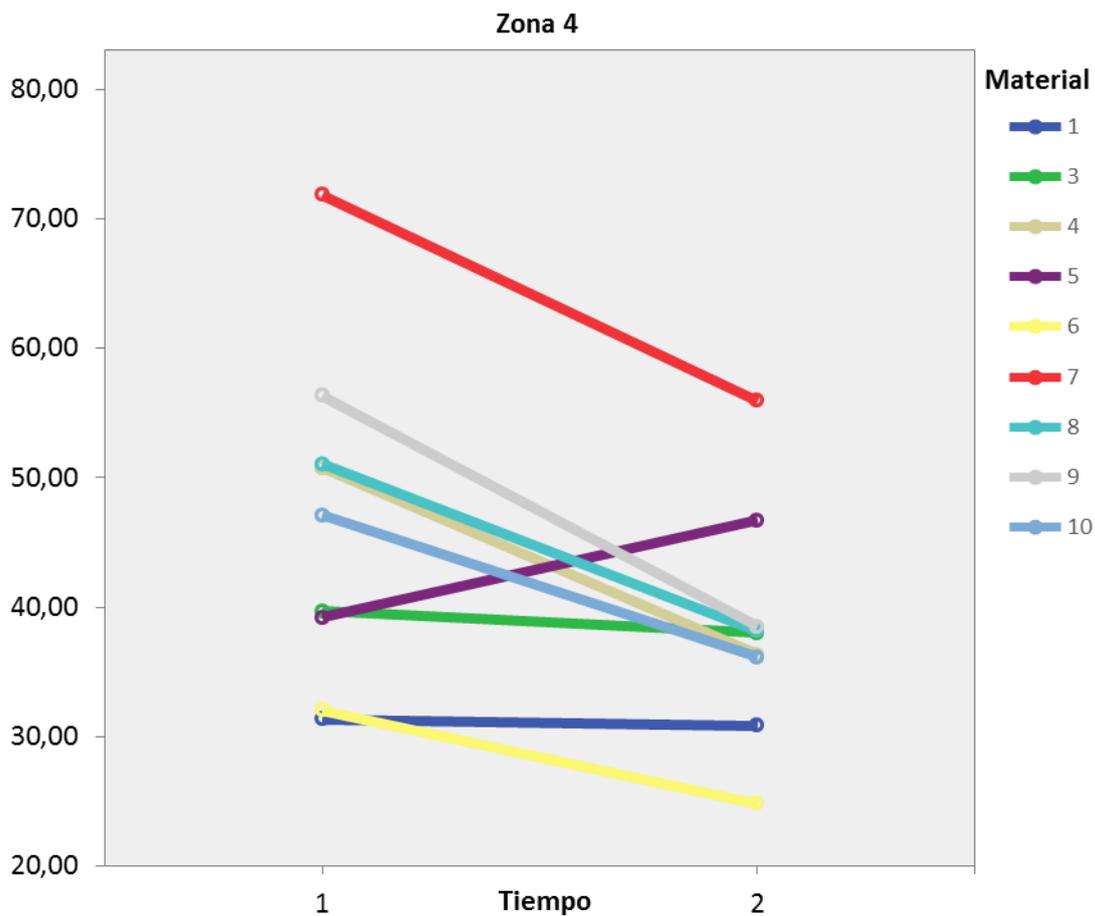
Gráfica 3.- La gráfica muestra en el eje de abscisas el comportamiento respecto a la síntesis ósea, de los distintos materiales en los tiempos 1 y 2, y en el eje de ordenadas la cuantificación de cada uno. Todo ello referido a la Zona 1, es decir el área cortical subperióstica (I). (1) Bio-Oss®, azul marino, (3) Material U, grupo III, verde, (4) Material OO grupo II, caqui, (5) Material C, grupo I, Índigo, (6) Material V, grupo II, amarillo, (7) Material NN, grupo III, rojo, (8) Material PP, grupo II, azul celeste, (9) Material LL, grupo II, gris, (10) Material AA, grupo II, lavanda.



Gráfica 4.- La gráfica muestra en el eje de abscisas el comportamiento respecto a la síntesis ósea, de los distintos materiales en los tiempos 1 y 2, y en el eje de ordenadas la cuantificación de cada uno. Todo ello referido a la Zona 2, es decir el área central de la lesión (II). (1) Bio-Oss®, azul marino, (3) Material U, grupo III, verde, (4) Material OO grupo II, caqui, (5) Material C, grupo I, Índigo, (6) Material V, grupo II, amarillo, (7) Material NN, grupo III, rojo, (8) Material PP, grupo II, azul celeste, (9) Material LL, grupo II, gris, (10) Material AA, grupo II, lavanda.

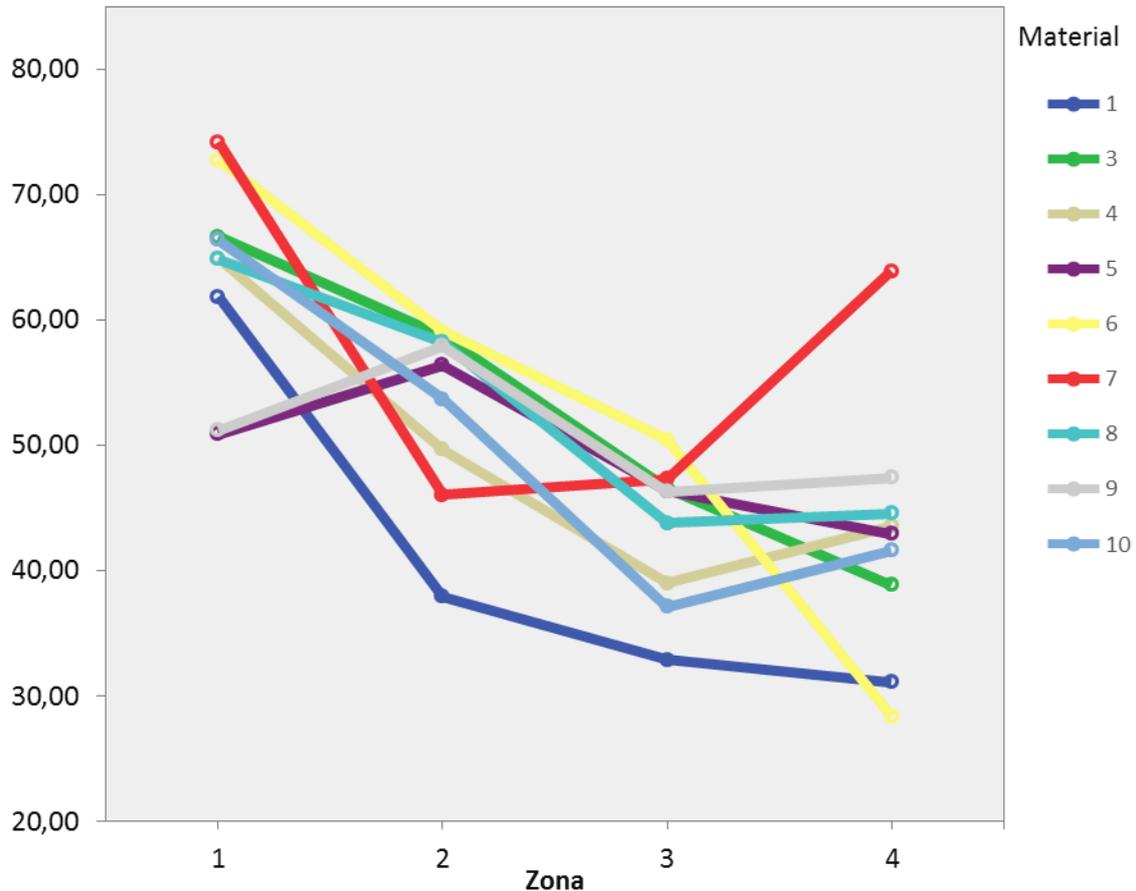


Gráfica 5.- La gráfica muestra en el eje de abscisas el comportamiento respecto a la síntesis ósea, de los distintos materiales en los tiempos 1 y 2, y en el eje de ordenadas la cuantificación de cada uno. Todo ello referido a la Zona 3, es decir el área promedio de las zonas laterales de la lesión (III+IV). (1) Bio-Oss®, azul marino, (3) Material U, grupo III, verde, (4) Material OO grupo II, caqui, (5) Material C, grupo I, Índigo, (6) Material V, grupo II, amarillo, (7) Material NN, grupo III, rojo, (8) Material PP, grupo II, azul celeste, (9) Material LL, grupo II, gris, (10) Material AA, grupo II, lavanda.



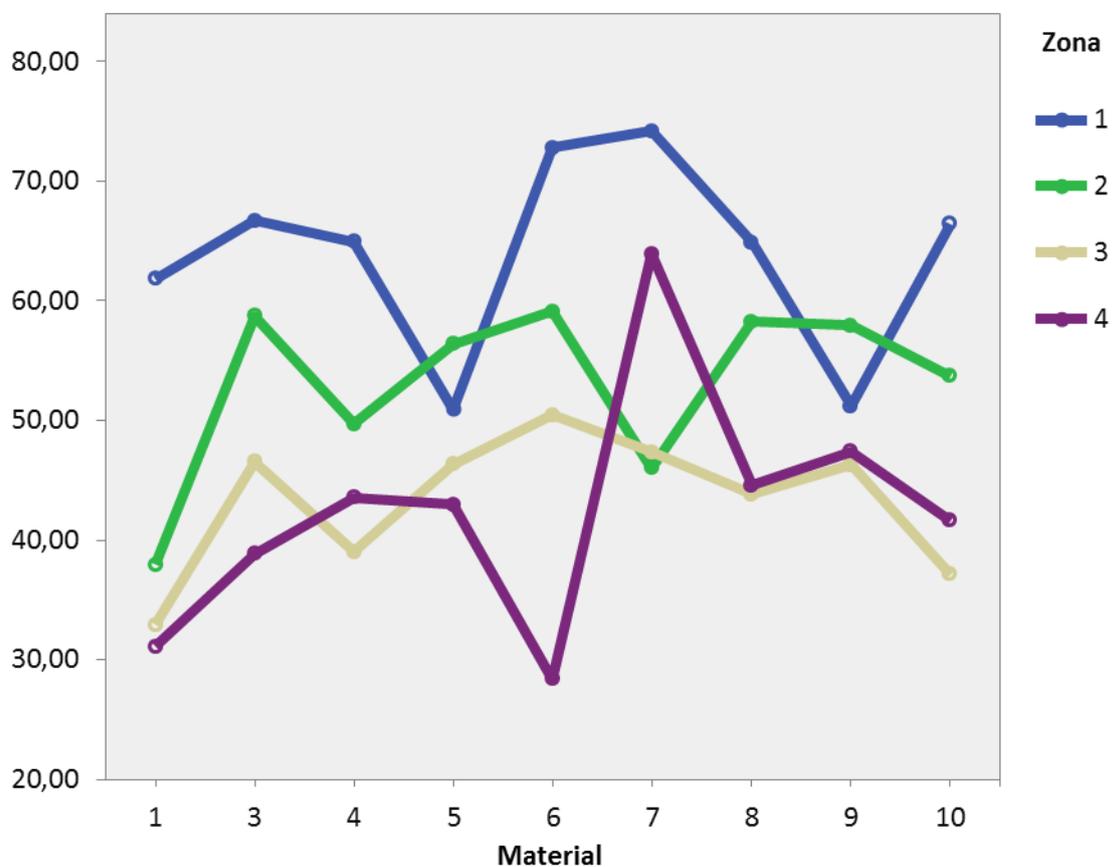
Gráfica 6.- La gráfica muestra en el eje de abscisas el comportamiento respecto a la síntesis ósea, de los distintos materiales en los tiempos 1 y 2, y en el eje de ordenadas la cuantificación de cada uno. Todo ello referido a la Zona 4, es decir el área profunda de la lesión (V). (1) Bio-Oss®, azul marino, (3) Material U, grupo III, verde, (4) Material OO grupo II, caqui, (5) Material C, grupo I, Índigo, (6) Material V, grupo II, amarillo, (7) Material NN, grupo III, rojo, (8) Material PP, grupo II, azul celeste, (9) Material LL, grupo II, gris, (10) Material AA, grupo II, lavanda.

En la Gráfica 7, el análisis estadístico muestra que en la **Zona 1(I)** el material 9 es significativamente menor que los materiales 6, 7 y 10. En la **Zona 2 (II)** el material 1 es menor que 3, 6, 8 y 9. En la **Zona 3 (III+IV)**, el material 1 es menor que 3, 5 y 9, y 6 es mayor que 1, 4 y 10. En la **Zona 4 (V)** el material 6 es menor que 4, 7, 8, 9, y 10, el material 7 es mayor que todos los otros, el material 9 es mayor que 1, y el material 10 es mayor que 8 y menor que 7.



Gráfica 7.- En esta gráfica se representan en el eje de abscisas las zonas estudiadas, 1 corresponde al área cortical subperióstica (I), 2 el área central de la lesión (II), 3 la media de las áreas laterales (III+IV), y 4 la porción profunda de la lesión (V). En el eje de ordenadas se muestra la cuantificación de la síntesis ósea global en tiempo 1 y 2 y los materiales en distintos colores, (1) Bio-Oss®, azul marino, (3) Material U, grupo III, verde, (4) Material OO grupo II, caqui, (5) Material C, grupo I, Índigo, (6) Material V, grupo II, amarillo, (7) Material NN, grupo III, rojo, (8) Material PP, grupo II, azul celeste, (9) Material LL, grupo II, gris, (10) Material AA, grupo II, lavanda.

En la Gráfica 8 cuyo objetivo es cuantificar los materiales en las distintas zonas, encontramos que con respecto al **material 1**, la cantidad de hueso es mayor que en las Zonas 2, 3 y 4. En el **material 3**, la zona 1 es mayor que la 3 y 4. La zona 2 es también mayor que 3 y 4. El **material 4** muestra más síntesis en la zona 1 que en las 2, 3 y 4, la zona 2 más que en la 3. El **material 5** no muestra diferencias significativas en las distintas zonas. El **material 6** muestra que la zona 4 es mayor que la 1, 2 y 3 y, la 3 menor que la 1. El **material 7** presenta mayor síntesis en la zona 1 que en la 2 y la 3, y la zona 4 también es mayor que la 2 y la 3. El **material 8** en la zona 1 muestra más síntesis que en la 3 y 4, y la zona 2 también muestra mayor síntesis que en la 3 y 4. El **material 9** muestra más actividad en la zona 2 que en la 3 y la 4. Finalmente el **material 10** muestra más cantidad de hueso en la zona 1 que en la 2, 3 y 4, y la zona 2 muestra mayor actividad que la 3 y la 4.



Gráfica 8.- La gráfica representa en el eje de abscisas los distintos materiales, (1) Bio-Oss®, (3) Material U, grupo III. (4) Material OO grupo II, (5) Material C, grupo I, (6) Material V, grupo II, (7) Material NN, grupo III, (8) Material PP, grupo II, (9) Material LL, grupo II, (10) Material AA, grupo II, y en el de ordenadas las cantidades de hueso neoformadas. Las líneas en número de cuatro representan las variaciones de las distintas zonas. Zona 1 (I) azul marino, Zona 2 (II) verde, Zona 3 (III+IV) caqui y Zona 4 (V) índigo.

# DISCVSIÓN

## 6. DISCVSIÓN

La discusión de este trabajo se organizara analizando sucesivamente el modelo de experimentación, abarcando el animal de experimentación, la cirugía y tipo de lesión y las distintas técnicas de estudio, técnicas de imagen, TAC y radiología, histología y fluorocromos para posteriormente centrarse en los resultados histológicos y los obtenidos mediante la aplicación de fluorocromos, morfometría y análisis estadístico.

### 6.1. 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 (116-119). Las ovejas son consideradas como una especie adecuada para la investigación ósea, ya que su metabolismo óseo es similar al humano, permitiendo la extrapolación de los resultados; Willie y cols. (120) 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 (121). Se considera un modelo prometedor en el área de la investigación por varias razones, ya que son dóciles, fáciles de manipular y estabular, son relativamente económicas y están disponibles en número adecuado (107). 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 distintos factores como la vascularización en el lugar de la implantación. Áreas con una gran vascularización, como es el caso de la metáfisis proximal del húmero, pueden acelerar el proceso, como se ha comprobado al compararlo con otros estudios donde la implantación se realizó en los cóndilos femorales que presentan un patrón vascular más pobre (116).

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 (122). 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 (123).

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; no sufren procesos de remodelación cortical y presentan un déficit de hueso trabecular (124). 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 receptora. 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 que pueden presentar los materiales al implantarse en diferentes especies animales o en humanos (51). 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.

## **Cirugía y tipo de lesión**

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, estos presentan los dos tipos de hueso, tanto cortical como trabecular.

A demás 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” (125). 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. (126) 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.

Otros factores que también pueden regular la calidad y cantidad de hueso regenerado en condiciones experimentales son las características biomecánicas. 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.

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 (127). 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 (128). 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. La identificación de dichos casos, asociada a una conducta biológica atípica, hizo que se descartaran en el estudio final (106).

## **Técnicas de estudio**

### **Técnicas de diagnóstico por imagen TAC y Radiología simple**

Estas técnicas de diagnóstico no invasivas realizadas, en el caso de los TAC, en el postoperatorio inmediato, y mensualmente hasta el fin del experimento, 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 periodo experimental. 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 TAC, 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  $\mu$ -CT sí (51, 129), 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 (106).

De este modo se establece una relación entre la presencia de radiodensidad en las imágenes, normalmente asociada a 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 radiodensidad en el defecto óseo, es un signo de ausencia de calcio y por lo tanto presumiblemente se trata de un defecto no regenerado (106).

### **Técnica histológica**

El propósito de realizar el estudio histológico sobre muestras incluidas en metilmetacrilato (110, 130) 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 5-10  $\mu$ m de grosor, utilizando equipos relativamente convencionales como los empleados en este trabajo, tales como sierras de cadena y micrótopo (131).

Por otro lado, la preparación de muestras óseas descalcificadas incluidas en parafina (132) 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 (133). 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 (134). Mientras que la técnica de tricrómico de Goldner permite distinguir la matriz orgánica recién formada y no calcificada, denominada osteoide, teñida de rojo, de la matriz ósea madura mineralizada, teñida de azul verdoso. 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 (133).

### **Fluorocromos**

En nuestro estudio se ha utilizado una combinación de cuatro fluorocromos, Tetraciclina, Calceína, Xilenol Orange y Alizarin Complexona, administrados secuencialmente a intervalos de 1 mes desde la operación hasta el sacrificio. Este patrón ha sido ampliamente utilizado, tanto en animales grandes (cabra, perro) como pequeños (conejo, rata, ratón) (3, 5, 7, 74, 84). La vía de administración y la dosificación, detallados en el apartado material y métodos, no produjeron efectos colaterales en los animales y todos presentaron un marcado satisfactorio objetivo. La inclusión en plástico también permitió obtener secciones delgadas minimizando posibilidades de error (74) Una de las ventajas de utilizar este grupo de fluorocromos consiste en que la visualización puede realizarse conjuntamente con un solo filtro (3,5) pudiendo fotografiarse simultáneamente, facilitando así el procesamiento posterior (morfometría). El primer fluorocromo administrado, la tetraciclina, aunque se observaba ocasionalmente, no daba imágenes de marcado en bandas coherentes, probablemente debido a procesos de remodelación ósea, lo cual obligó a descartarlo del estudio morfométrico. Otro de los problemas que citan los autores es la pérdida de señal con el tiempo (3,5), en nuestra experiencia, hemos podido observar preparaciones de más de un año sin pérdida de señal apreciable, siempre guardando las preparaciones en la oscuridad y en nevera.

### **Morfometría**

Hemos realizado un sistema de medidas simple consistente en medir la distancia interbandas en tres zonas distintas (62, 63, 67, 68). Los datos así obtenidos se procesaron estadísticamente y por irregularidad e insuficiencia de datos hubo que descartar un material, el Z-2 del grupo I, que fue excluido del estudio estadístico.

## 6.2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS

### Resultados histológicos

Desde el punto de vista del tipo de hueso neoformado, en 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 neto. Esta respuesta tisular la encontramos en el trabajo de Patel y cols. (135) 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 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. (136) 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 formarse.

El análisis de la respuesta tisular frente a los gránulos implantados se efectuó para comparar la capacidad regeneradora de nuestros materiales y su bioreabsorbilidad, teniendo como control un material utilizado en clínica odontológica y que presenta una escasa reabsorción, el BioOss®, ya que 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 (137). 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 ha sido puesto de manifiesto en numerosos artículos (138, 139) 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 (140, 141). 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 (142). En otro trabajo, Tamimi y cols. (51), 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 ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) 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. (143), 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, siguieron encontrando gránulos de BioOss®, por otra parte perfectamente osteointegrados. Las diferencias entre los dos tiempos de estudio era el tipo de hueso neoformado que rodeada a los gránulos integrados, siendo inmaduro o primario a los 20 meses de estudio, mientras que a los 7 años de implantación, el hueso era de tipo laminar o secundario. Las partículas en ambos tiempos de estudio se encontraban en contacto directo con el hueso y sin ningún tipo de separación en la interfase hueso-partícula.

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**

Desde el punto de vista de la respuesta Histopatológica los dos materiales, que constituyen este grupo presentaron 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 atestigua la presencia de restos de éste dentro del citoplasma de estas células. 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 (144).

En el trabajo de Xu y cols. (129) se comparan materiales porosos de silicato de calcio, como la ps-wollastonita y el  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

Tal y cómo se indicó en el apartado de resultados, es preciso comentar la respuesta encontrada en el material Z-2, con escasa regeneración ósea, que no llega 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 refringentes y 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 Z-2 coincide que todos los casos se han realizado en dos ovejas distintas. Esto lleva a pensar que factores propios de esta oveja, hayan favorecido la formación ósea frente a la aparición de fenómenos adversos. En cualquier caso las peculiaridades de los casos de este material hicieron que fuera rechazado para el estudio estadístico por la insuficiencia e irregularidad de las medidas.

## **Grupo II**

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 V-6, y es el único que presenta una respuesta tisular desfavorable, no habiendo regenerado 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 V-6, 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 permitiendo 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 II 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 siendo suficiente para provocar respuestas adversas de los tejidos.

El análisis de las imágenes de TAC y radiológicas de los materiales del grupo II, a excepción del V-6, muestra manifestaciones distintas en comparación con lo comentado sobre los grupos anteriores; en el grupo II 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 distingue una zona radiolúcida.

Estas características radiológicas diferentes se deben a que los materiales pertenecientes al grupo II (LL-9, AA-10, PP-8 y OO-4), 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 III**

Este grupo está formado por los materiales NN-7 y U-3 que presentan una reducida concentración de monetita, a favor de mayores cantidades de CDHA, que son superiores, en el caso del material U-3, a las de los materiales del grupo II. También están compuestos por ps-wollastonita y un elevado contenido en gel de sílice, similar al grupo I.

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 II 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.

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 (145). Sin embargo, la presencia de silicio, presente en la ps-wollastonita, y 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 y III.

En relación a las sustituciones iónicas parciales del calcio de la monetita por  $Zn^{2+}$ , 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 osteoconductor 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 (146).

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 linfomonocitaria, que conlleva a resultados insatisfactorios, relacionados con procesos inflamatorios (147).

Por otro lado, Frayssinet y cols. (148) estudiaron la capacidad de osteointegración de un fosfato de calcio bifásico (75% HA-25%  $\beta$ -TCP) en forma de cilindros implantados en defectos realizados en cóntilos 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 (149). 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 II y III, 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. (150) 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 (125). 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 (151).

En el trabajo de Vogel y cols. (152) 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 II es el que presenta las respuestas más favorables, promoviendo la regeneración ósea del defecto. El grupo II, sin tener en cuenta el material V-6 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 (153), 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 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* (50), al no desencadenar ni respuestas inflamatorias ni formación de tejido conectivo, y biodegradable, ya que se han detectado marcas de reabsorción sobre su superficie (48). La CDHA presenta una composición muy similar a la HA biológica, provocando una respuesta tisular favorable en respuesta a la implantación de los materiales LL-9, AA-10, PP-8 y OO-4 (grupo II).

La solubilidad de los materiales, conlleva el 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 (154). Se cree que a mayor área específica superficial los compuestos proporcionan una mejor respuesta biológica de los fosfatos de calcio (33). El área superficial específica, que depende de las características de la superficie y del tamaño partícula, en los gránulos de BioOss® es de  $60\text{m}^2/\text{g}$  (155), 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  $100\text{m}^2/\text{g}$ , en el grupo II  $55\text{m}^2/\text{g}$  y en el grupo III  $100\text{m}^2/\text{g}$ ; presentando valores superiores aquellos grupos con un contenido de gel de sílice mayor.

En los materiales del grupo II 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.

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 III, aunque también presentan la combinación de fosfatos de calcio (monetita y CDHA), estos se encuentran en menor concentración que en los materiales del grupo II, ya que la proporción de gel de sílice es mayor y presentan ps-wollastonita. Además, la respuesta tisular del grupo III es más heterogénea que la que hemos encontrado en el grupo II, ya que el grupo III 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 de los espacios medulares, 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 y no haber sido reabsorbida por completo después de 16 semanas de experimentación. Hay que reseñar que aunque el grupo II también presenta en su composición CDHA, esta gran infiltración de células multinucleadas no se ha desarrollado.

En relación al estudio histológico del control 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 (156).

Una de las ventajas que presentan los materiales estudiados en este trabajo, en concreto los pertenecientes al grupo II, a excepción del material V-6, 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 (157). 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 (158).

Por otra parte Tamimi y cols. (41) compararon el comportamiento de gránulos compuestos por una combinación de brushita y  $\beta$ -TCP, con gránulos de BioOss® implantados en cilindros de titanio en defectos óseos realizados en bóveda craneal de conejos. Dado que la brushita- $\beta$ -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, poniendo de manifiesto su capacidad de reabsorberse y presentar propiedades osteoconductoras y osteoinductoras (51). 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 (159).

La selección del biomaterial óptimo de entre todos los estudiados en este trabajo, incluiría los pertenecientes al grupo II (LL-9, AA-10, PP-8 y OO-4), 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 LL-9, AA-10, PP-8 y OO-4, son biocompatibles, biodegradables, osteoconductores, osteogénicos y osteoinductores, y por lo tanto pueden proponerse como candidatos prometedores en la práctica clínica.

## **Resultados con fluorocromos**

La utilización de fluorocromos como marcadores presenta como toda técnica ventajas y desventajas. En primer lugar como acabamos de ver la histología nos proporciona una imagen diagnóstica certera, pero únicamente del final de la experiencia (3), mientras que el marcado con fluorocromos, en sus distintas variantes, fluorocromo único en intervalos de tiempo distintos (7) o marcado con distintos fluorocromos a distintos intervalos de tiempo (5) nos permite obtener en una sola imagen el comportamiento en distintos momentos del hueso, mostrando así las etapas de formación del mismo (3). Esta ventaja también plantea problemas, como la dificultad de cálculo del patrón de administración de los fluorocromos (62, 64, 65) y así en nuestro material, probablemente debido a procesos de remodelación ósea y/o reabsorción del material nos vimos obligados a renunciar a la medición del primer fluorocromo, la Tetraciclina. Otro problema lo constituye la remodelación ósea, con la dinámica de renovación que conlleva, esta propiedad fuerza para este tipo de estudios la utilización de animales con remodelación haversiana como la oveja, más próxima en su comportamiento osteodinámico a la especie humana (5, 64, 68, 69), ya que la utilización de pequeños animales como la rata, es insatisfactoria ya que solo poseen remodelación endóstica y

perióstica y no haversiana (80, 83, 87, 88, 160-162). Además en toda especie animal, e individualmente y dentro de las distintas piezas óseas existen ciclos de destrucción/formación de hueso, de ahí la necesidad de colocar los materiales en localizaciones distintas y en distintos animales (5,63 ,67) como se realizó en nuestro trabajo (163-165).

Dejando aparte las dificultades técnicas, en nuestro material obtuvimos resultados coherentes que nos permitieron realizar el estudio morfométrico, aunque tuvimos que renunciar a un marcador (Tetraciclina), y utilizar las medidas conseguidas para realizar el estudio estadístico, renunciando también a un material (Z-2 del grupo I).

## **Resultados estadísticos**

Dentro de los distintos parámetros analizados, en primer lugar contemplaremos el factor tiempo, que en nuestro ensayo cubre dos etapas, en la primera el crecimiento óseo es significativamente mayor que en la segunda en todas las zonas estudiadas (**Gráfica 1**). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fu y cols. (100) en un ensayo en conejos comparando la zona periimplante rellena con HA o HA sustituida con Sr, si bien su estudio es de menor duración, dos meses, pero esto parece hacer predecible una ralentización progresiva de la génesis ósea, independientemente de los materiales empleados. En otros estudios la adición de plasma enriquecido con plaquetas (75) o de proteína morfogenética ósea, parece no tener efecto, atribuyendo esta inactividad a diferencias interespecificas (93).

En segundo lugar, si analizamos el comportamiento de las distintas zonas del defecto (I-V), observamos que la síntesis ósea es significativamente mayor en la zona superficial cortical I que en la II y las dos son significativamente mayores que las periféricas III, IV, y V.

Finalmente la cuestión clave es responder a si la utilización de los fluorocromos permite discriminar entre los distintos materiales empleados, utilizando como criterio la producción de hueso, y así si examinamos la **Gráfica 2** vemos que del grupo II, cuatro de los cinco materiales (PP-8, LL9, AA-10, OO-4) producen significativamente más hueso que el control Bio-Oss® y el quinto material del grupo V-6, no presenta diferencias significativas, hecho que refrenda el diagnóstico histológico previo. Tampoco son significativas las diferencias con el material U-3 (Grupo III) y C-5 (Grupo I). El material NN-7 (Grupo III) si presenta valores significativos pero ello es debido a la rarefacción de las zonas periféricas (III, IV, y V) debido a una segregación del material con respecto al hueso adyacente.

En definitiva, el empleo de fluorocromos permite, asociado a métodos de cuantificación estadísticos, confirmar el diagnóstico histológico de la adecuación de distintos materiales para su uso en la clínica médica.

# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

1. La técnica de múltiple marcado con fluorocromos es útil para la valoración del comportamiento *in vivo* de los materiales utilizados en este estudio.
2. La técnica de múltiple marcado con fluorocromos es útil para la cuantificación del hueso neoformado tras la administración de biomateriales.
3. La cantidad de síntesis ósea, en nuestro estudio, disminuye a lo largo del intervalo de tiempo observado.
4. Globalmente, la síntesis ósea es mayor en la zona cortical (I), seguida de la zona central del defecto (II) y significativamente menor en las zonas laterales (III y IV) y el fondo del defecto (V). No existen diferencias significativas entre las zonas laterales (III y IV) y el fondo del defecto (V).
5. El empleo de fluorocromos no excluye la utilización de los medios de diagnóstico por imagen, en el estudio de la dinámica ósea.

# BIBLIOGRAFÍA

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150:893-9.
2. Jansen JA, Mikos AG, Johnson PC. A new focus on the methods of tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008;14(1):1.
3. Van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, de Bruijn JD, Alblas J, Dhert WJ. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):209-17.
4. Dempster DW. Histomorphometric Analysis of bone remodelling. *Principles of bone biology*. 3rd ed: Academic Press; 2008. p. 447-63.
5. Erben RG. Bone-Labeling Techniques. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, New Jersey: Humana Press 2003. p. 99-117.
6. Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res*. 1969;3(3):211-37.
7. Treharne RW, Brighton CT. The use and possible misuse of tetracycline as a vital stain. *Clin Orthop Relat Res*. 1979(140):240-6.
8. Elsalanty ME, Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. *Cranio-maxillofacial trauma & reconstruction*. 2009;2(3):125-34.
9. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 2001;71(6):354-61.
10. Albrektsson, Johansson. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001;10(0):S96-S101.
11. Kurz LT, Garfin SR, Booth JR. Harvesting autogenous iliac bone grafts: A review of complications and techniques. *Spine*. 1989;14:1324-31.
12. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Res*. 1996;35(5):413-7.
13. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;324:86-97.
14. Precheur HV. Bone Graft Materials. *Dent Clin North Am*. 2007;51(3):729-46.
15. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014;9(1):18.
16. Williams DF. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press. 1999.
17. Sastre R, De Aza S, San Román J. *Biomateriales*. Italia: Faenza Editrice Iberica; 2004.
18. Wilson J. Biocompatibility and tissue response to implants. *Anales de Química Int Ed*. 1997;93 Suppl.1:S15-S6.
19. Hench LL, Wilson J. An introduction to bioceramics. *Advanced series in ceramics*. Scientific W, editor. Singapore 1993.
20. Hench LL. Biomaterials. *Science*. 1980;208(826-831).
21. Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery. Overview and regulatory considerations. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;395:11-22.
22. 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.
23. Vallet-Regí M. Biomaterials. *Anales de Química International Edition Supl*.

- 1997;93:S6-S14.
24. Charnley J. Acrylic cement in orthopaedic surgery. *Br J Surg.* 1970;57(11):874.
  25. Kenny SM, Buggy M. Bone cements and fillers: A review. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14:923- 38.
  26. Lewis G. Properties of acrylic bone cement: State of the art review. *J Biomed Mater Res.* 1997;38(2):155-82.
  27. Helsen JA, Breme HJ. *Metals as biomaterials.* Sons JW, editor. New York 1998.
  28. Strnad Z, Strnad J, Povysil C, Urban K. Effect of plasma sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15:483-90.
  29. De Aza PN, de Aza AH, de Aza S. Crystalline Bioceramic Materials. *Bol Soc Esp Ceram Vidr.* 2005;44(3):135-45.
  30. LeGeros RZ. *Calcium phosphates in oral biology and medicine:* New York University College of Dentistry; 1991.
  31. LeGeros RZ. *Biodegradation and Bioresorption of Calcium Phosphate Ceramics.* *Clin Mater.* 1993;14(1):65-88.
  32. 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.
  33. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury.* 2000;31 Suppl. 4:37-47.
  34. Garcia Carrodegua R. *Cementos óseos de fosfatos de calcio [tesis doctoral].* La Habana: Universidad de la Habana; 2000.
  35. 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. *J Dent Res.* 1984;63:63-200.
  36. Driessens FCM, Fernández E, Ginebra MP, Boltong MG, Planell JA. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *An Quim Int Ed* 1997;93:S38-S43.
  37. Driessens FCM, Verbeeck RMH. *Biominerals.* CRC Press, Boca Raton. 1990.
  38. Low KL, Tan SH, Zein SHS, Roether JA, Mouriño V, Boccaccini AR. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;94B(1):273-86.
  39. del Real RP, Ooms E, Wolke JGC, Vallet-Regí M, Jansen JA. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65(1):30-6.
  40. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2010;6:2863- 73.
  41. Tamimi F, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel  $\beta$ -TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol.* 2006;33(12):922-8.
  42. Dorozhkin SV. *Calcium Orthophosphate Cements and Concretes.* *Materials.* 2009;2:221-91.
  43. Bohner M, Van Landuyt P, Merkle HP, Lemaître J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium orthophosphate cement. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8:675-81.
  44. 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 Suppl.2:81-4.
  45. Tamimi F, Torres J, Tresguerres I, Jerez LB, Cabarcos EL. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. *J Biomed Mater Res A.* 2007;81A(1):93-102.

46. 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.
47. Tamimi F, Sheikh Z, Barralet J. Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. *Acta Biomater*. 2012;8(2):474-87.
48. Tamimi F, Torres J, Kathan C, Baca R, Clemente C, Blanco L, et al. Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87A(4):980-5.
49. 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.
50. 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 Biomater*. 2009;5(2):727-34.
51. 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.
52. Padilla S, Garcia de Castro A, Garzón-Gutiérrez A, Benito L, Enciso S, Canillas M, et al. Novel nanostructured Zn-substituted monetite based biomaterial for bone regeneration. *J Nanomed Nanotechnol*. 2015;6(325).
53. De Aza PN, Luklinska ZB, Martinez A, Anseau MR, Guitian F, De Aza S. Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone. *J Microsc*. 2000;197(1):60-7.
54. Garcia Carrodegua R, De Aza PN. Main contributions to bioceramics by Salvador De Aza. *Bol Soc Esp Ceram Vidr*. 2011;50(6):301-9.
55. 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(2):461-5.
56. Solís Y, Carrodegua RG, Davidenko N, Peniche C, Camerón R. Preparación y caracterización de composites de hidroxiapatita deficiente en calcio y quitosana. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2008;39(1):17-22.
57. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of Bone Biology*. 3rd Ed. Academic Press; 2008.
58. Pina S, Vieira SI, Torres PMC, Goetz-Neunhoffer F, Neubauer J, da Cruz e Silva OAB, et al. In vitro performance assessment of new brushite-forming Zn- and ZnSr-substituted  $\beta$ -TCP bone cements. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94(2):414-20.
59. Yamaguchi M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. *J Trace Elem Exp Med*. 1998;11(2-3):119-35.
60. 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. *J Biomed Mater Res*. 2000;50(2):184-90.
61. Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Bone localization of the tetracyclines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1957;19(1):87-93.
62. Frost HM. Bone Histomorphometry: choice of marking agent and labelling schedule. In: Recker RR, editor. *Bone Histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Ratón (Florida): CRC Press; 1983. p. 37-52.
63. Frost HM. Bone histomorphometry: correction of the labelling "escape error". In: Recker RR, editor. *Bone Histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Ratón (Florida): CRC Press; 1983. p. 133-42.

64. Villanueva AR, Ilnicki L, Duncan H, Frost HM. Bone and cell dynamics in the osteoporoses: a review of measurements by tetracycline bone labeling. *Clin Orthop Relat Res.* 1966;49:135-50.
65. Frost HM. Relation between bone tissue and cell population dynamics, histology and tetracycline labeling. *Clin Orthop Relat Res.* 1966;49:65-75.
66. Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int.* 1984;36(1):S37-S45.
67. Parfitt AM, Foldes J, Villanueva AR, Shih MS. Difference in label length between demethylchlortetracycline and oxytetracycline: implications for the interpretation of bone histomorphometric data. *Calcif Tissue Int.* 1991;48(2):74-7.
68. Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. Relations between histologic indices of bone formation: Implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1995;10(3):466-73.
69. Recker RR, Kimmel DB, Parfitt AM, Davies KM, Keshawarz N, Hinders S. Static and tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. *J Bone Miner Res.* 1988;3(2):133-44.
70. Mendes M, Pritzker KPH. Optimizing multiple fluorochrome bone histodynamic markers. *Bone.* 1993;14(3):537-43.
71. Modis L, Petko M, Foldes I. Histochemical examination of supporting tissues by means of fluorescence. II. Fluorochromes as an indicator of lamellar bone mineralization. *Acta Morphol Acad Sci Hung.* 1969;17(2):157-66.
72. Saunders JE, Emmanuel J, McElveen JT, Jr. Triple fluorochrome labeling of cochlear bone growth. *Hear Res.* 1992;57(2):276-80.
73. Tonna EA, Singh I, Sandhu HS. Non-radioactive tracer techniques for calcified tissues. In: Dickson GR, editor. *Methods of calcified tissue preparation.* Amsterdam: Elsevier; 1984. p. 333-67.
74. Goldschlager T, Abdelkader A, Kerr J, Boundy I, Jenkin G. Undecalcified bone preparation for histology, histomorphometry and fluorochrome analysis. *J Vis Exp.* 2010(35):1707.
75. Sánchez AR, Sheridan PJ, Eckert SE, Weaver AL. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts in periimplant defects: a vital fluorescence study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2005;7(2):61-9.
76. Velasquez-Forero FH. Histomorfometría de la biopsia-osea previo marcaje y procesada sin decalcificar. *Patol Rev Latinoam.* 2009;47(2):108-17.
77. Aaron JE, Makins NB, Francis RM, Peacock M. Staining of the calcification front in human bone using contrasting fluorochromes in vitro. *J Histochem Cytochem.* 1984;32(12):1251-61.
78. Pautke C, Tischer T, Vogt S, Haczek C, Deppe H, Neff A, et al. New advances in fluorochrome sequential labelling of teeth using seven different fluorochromes and spectral image analysis. *J Anat.* 2007;210(1):117-21.
79. Rasmussen P. Effect of oxytetracycline and purified calcein (DCAF) on the apposition and mineralization of rat incisor dentin. *Scand J Dent Res.* 1975;83(1):233-7.
80. Baylink D, Stauffer M, Wergedal J, Rich C. Formation, mineralization, and resorption of bone in vitamin D-deficient rats. *J Clin Invest.* 1970;49(6):1122-34.
81. Baylink D, Wergedal J, Stauffer M. Formation, mineralization, and resorption of bone in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest.* 1971;50(12):2519-30.
82. Cheng W, Yue Y, Fan W, Hu Y, Wang X, Pan X, et al. Effects of tetracyclines on bones: an ambiguous question needs to be clarified. *Pharmazie.* 2012;67(5):457-9.
83. Hammer WS, Soni NN, Fraleigh CM. Quantitative study of bone activity in the

- diabetic rat mandible: triple fluorochrome study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973;35(5):718-29.
84. Rahn BA, Perren SM. Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol.* 1971;46(3):125-9.
85. Pautke C, Vogt S, Tischer T, Wexel G, Deppe H, Milz S, et al. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: Enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone.* 2005;37(4):441-5.
86. Bell KL, Loveridge N, Lindsay PC, Lunt M, Garrahan N, Compston JE, et al. Cortical remodeling following suppression of endogenous estrogen with analogs of gonadotrophin releasing hormone. *J Bone Miner Res.* 1997;12(8):1231-40.
87. Engesaeter LB, Underdal T, Langeland N. Effects of oxytetracycline on mineralization of bone in young rats. *Acta Orthop Scand.* 1980;51(3):459-65.
88. Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: Modeling or remodeling? *Anat Rec.* 1996;246(1):39-46.
89. Gomes-Filho JE, de Moraes Costa MMT, Cintra LTA, Duarte PCT, Takamiya AS, Lodi CS, et al. Evaluation of rat alveolar bone response to angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. *J Endod.* 2011;37(2):250-4.
90. Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric Study. *J Bone Miner Res.* 2000;15(6):1085-98.
91. Reim NS, Breig B, Stahr K, Eberle J, Hoeflich A, Wolf E, et al. Cortical bone loss in androgen-deficient aged male rats is mainly caused by increased endocortical bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 2008;23(5):694-704.
92. Ma B, Sampson W, Wilson D, Wiebkin O, Fazzalari N. A histomorphometric study of adaptive responses of cancellous bone in different regions in the sheep mandibular condyle following experimental forward mandibular displacement. *Arch Oral Biol.* 2002;47(7):519-27.
93. Abu-Serriah MM, Odell E, Lock C, Gillar A, Ayoub AF, Fleming RH. Histological assessment of bioengineered new bone in repairing osteoperiosteal mandibular defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2004;42(5):410-8.
94. Goldhahn J, Neuhoff D, Schaeren S, Steiner B, Linke B, Aebi M, et al. Osseointegration of hollow cylinder based spinal implants in normal and osteoporotic vertebrae: a sheep study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2006;126(8):554-61.
95. Hudson HA, Britton WM, Rowland GN, Buhr RJ. Histomorphometric bone properties of sexually immature and mature White Leghorn hens with evaluation of fluorochrome injection on egg production traits. *Poult Sci.* 1993;72(8):1537-47.
96. Schliephake H, Neukam FW, Hutmacher D, Wüstenfeld H. Experimental transplantation of hydroxylapatite-bone composite grafts. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(1):46-51.
97. Burt-Pichat B, Follet H, Toulemonde G, Arlot M, Delmas P, Chapurlat R. Methodological approach for the detection of both microdamage and fluorochrome labels in ewe bone and human trabecular bone. *J Bone Miner Metab.* 2011;29(6):756-64.
98. Lee TC, Staines A, Taylor D. Bone adaptation to load: microdamage as a stimulus for bone remodelling. *J Anat.* 2002;201(6):437-46.
99. Zarrinkalam KH, Kuliwaba JS, Martin RB, Wallwork MA, Fazzalari NL. New insights into the propagation of fatigue damage in cortical bone using confocal microscopy and chelating fluorochromes. *Eur J Morphol.* 2005;42(1-2):81-90.
100. Fu D-l, Jiang Q-h, He F-m, Yang G-l, Liu L. Fluorescence microscopic analysis of bone osseointegration of strontium-substituted hydroxyapatite implants. *J Zhejiang*

Univ Sci B. 2012;13(5):364-71.

101. Schemitsch EH, Turchin DC, Kowalski MJ, Swiontkowski MF. Quantitative assessment of bone injury and repair after reamed and unreamed locked intramedullary nailing. *J Trauma*. 1998;45(2):250-5.

102. Tisdell CL, Goldberg VM, Parr JA, Bensusan JS, Staikoff LS, Stevenson S. The influence of a hydroxyapatite and tricalcium-phosphate coating on bone growth into titanium fiber-metal implants. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(2):159-71.

103. Birkenhager-Frenkel DH, Birkenhager JC. Bone appositional rate and percentage of doubly and singly labeled surfaces: comparison of data from 5 and 20 microns sections. *Bone*. 1987;8(1):7-12.

104. Poussa M, Rubak J, Ritsila V. The effect of the thickness of the cortical bone on bone formation by osteoperiosteal grafts. A comparative study employing routine histological stains and triple fluorochrome labelling. *Acta Orthop Scand*. 1980;51(1):29-35.

105. Martin RB. Label escape theory revisited: the effects of resting periods and section thickness. *Bone*. 1989;10(4):255-64.

106. Benito L. Estudio histológico de las reacciones biológicas del tejido óseo frente a biomateriales basados en monetita. [tesis doctoral]. Salamanca: Universidad de Salamanca. Facultad de Medicina; 2013.

107. 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.

108. Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti GC, Piancastelli A, Bacchini B, Montanari L, et al. Mineral evolution of bone. *Biomaterials*. 1996;17(6):617-22.

109. Chavassieux P, Pastoureaux P, Boivin G, Delmas PD, Chapuy MC, Meunier PJ. Effects of ossein-hydroxyapatite compound on ewe bone remodeling: biochemical and histomorphometric study. *Clin Rheumatol*. 1991;10(3):269-73.

110. An YH. Principles of embedding and common protocols. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, New Jersey: Humana Press 2003. p. 185-97.

111. Helen E. Basic staining and histochemical techniques and immunohistochemical localizations using bone sections. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2003. p. 281-6.

112. Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Mesa F, Aguilar M, et al. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(1):122-8.

113. Maia LP, Reino DM, Novaes Junior AB, Muglia VA, Taba Junior M, Grisi MF, et al. Influence of periodontal biotype on buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with a xenograft: a histomorphometric and fluorescence study in small dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17 Suppl 1:e221-35.

114. Nkenke E, Kloss F, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Loos K, et al. Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteotome technique. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13(6):595-602.

115. Sanchez AR, Sheridan PJ, Eckert SE, Weaver AL. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts in periimplant defects: a vital fluorescence study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005;7(2):61-9.

116. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate

- cements. *Biomaterials*. 2004;25(7-8):1439-51.
117. Bodde EWH, Wolke JGC, Kowalski RSZ, Jansen JA. Bone regeneration of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate (Conduit™ TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel®) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A*. 2007;82A(3):711-22.
  118. Gatti AM, Zaffe D, Poli GP. Behaviour of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. *Biomaterials*. 1990;11(7):513-7.
  119. 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.
  120. Willie BM, Bloebaum RD, Bireley WR, Bachus KN, Hofmann AA. Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69A(3):567-76.
  121. Aerssens J, Boonen S, Joly J, Dequeker J. Variations in trabecular bone composition with anatomical site and age: potential implications for bone quality assessment. *J Endocrinol*. 1997;155(3):411-21.
  122. Hillier ML, Bell LS. Differentiating Human Bone from Animal Bone: A Review of Histological Methods. *J Forensic Sci*. 2007;52(2):249-63.
  123. 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.
  124. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008;58(5):424-30.
  125. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60-8.
  126. Nuss KM, Auer JA, Boos A, Rechenberg Bv. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord*. 2006;67(7).
  127. Kilborn SH, Trudel G, Uthoff H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2002;41(5):21-6.
  128. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med*. 2001;51(4):292-9.
  129. 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.
  130. Peris JL, Prat J, Comin M, Dejoz R, Roger I, Vera P. Técnica histológica para la inclusión en metilmetacrilato de muestras óseas no descalcificadas. *Rev esp cir osteoartic*. 1993;231-238(28).
  131. Ries WL. Techniques for sectioning undecalcified bone tissue using microtomes. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa, New Jersey: Human Press; 2003. p. 221-32.
  132. Yuehuei HA, Martin KL. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Chapter 11: Principles of embedding and common protocols.: Human press; 2003.
  133. Scarano A. Staining techniques for plastic-embedded specimens. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa, New Jersey: Human Press; 2003. p. 315-20.
  134. Nerlich AG. Histochemical and Immunohistochemical staining of cartilage sections. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa, New Jersey: Human Press; 2003. p. 295-314.
  135. 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.
136. Braye F, Weber G, Irigaray JL, Frayssinet P. Osseointegration in cortical sheep bone of calcium phosphate implants evaluated by PIXE method and histology. *J Biomed Mater Res*. 1997;36(3):315-24.
137. Açıl Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res*. 2000;51(4):703-10.
138. Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss® collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(5):433-40.
139. 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. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74B(1):448-57.
140. 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. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:96-100.
141. 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. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(3):361-8.
142. 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. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(1):114-20.
143. 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 Dis*. 2007;13(6):586-93.
144. Driessens FCM, Verbeeck RMH. "Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates". In: Putter C, Lange GL, Groot K, Lee AJC, editors. *Implant materials in Biofunction*. Elsevier. Amsterdam 1988. p. 105-11.
145. Vallet-Regí M, Arcos D. Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants. *J Mater Chem*. 2005;15:1509-16.
146. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J*. 2007;7(4):475-90.
147. 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. *Open Dent J*. 2011;5:96-104.
148. Frayssinet P, Mathon D, Lerch A, Autefage A, Collard P, Rouquet N. Osseointegration of composite calcium phosphate bioceramics. *J Biomed Mater Res*. 2000;50(2):125-30.
149. 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.
150. Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C. The critical sized bone defect: morphological study of bone healing. *Ann Fac Med Vet di Parma*. 2006;26:97-110.
151. Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol*. 2000;7(1):40-7.
152. 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. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70A(3):370-9.
153. Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *J Mater Sci*

Mater Med. 1999;10(3):169-76.

154. Barrère F, Blitterswijk C, Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):317-32.

155. 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. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92B(2):409-19.

156. Araújo MG, Carmagnola D, Berglundh T, Thilander B, Lindhe J. Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss®. *J Clin Periodontol*. 2001;28(1):73-80.

157. 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. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(3):321-30.

158. Duda M, Pajak J. The issue of bioresorption of the Bio-Oss xenogeneic bone substitute in bone defects. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med*. 2004;59(1):269-77.

159. 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.

160. Benito L, Collía F, Sanz Giménez-Rico JR, Del Pino Montes J, Cardoso A, De Pedro JA. Sobre la remodelación ósea haversiana en la rata albina. En: Libro de Ponencias: XVI Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM). La Coruña.2011. p. 10-24.

161. Benito L, Julián J, Juanes J, Sánchez-Martín L, Cardoso A, Martín P, et al. Técnicas de marcado fluorescente óseo, aplicadas al estudio de la remodelación en la rata albina. En: Libro de Ponencias: XXXIII Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales (SIBB). Valencia.2010.

162. Benito L, Sánchez-Martín L, Martín P, Domínguez J, Collía F, De Pedro JA. Múltiple marcaje fluorescente de la remodelación ósea. En: Libro de Ponencias: 48 edición Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SECOT). Oviedo.2011.

163. Benito L, De Pedro JA, Guadilla Y, Collía-Martín F, Padilla S, Carrodegas RG, et al. Evaluation of a new calcium phosphate biomaterial by multiple fluorescence bone-labelling. In: Libro de ponencias: 20TH Annual Meeting European Orthopaedic Research Society (EORS). Amsterdam.2012. p. 33.

164. Benito L, De Pedro JA, Vázquez-Lasa B, Collía-Martín F, Del Pino J, Padilla S, et al. Estudio de la dinámica de regeneración ósea del Sil-oss® mediante múltiple marcaje fluorescente. En: Libro de Ponencias: XVII Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM). Cuenca.2012.

165. Benito L, De Pedro JA, Vázquez-Lasa B, Collía-Martín F, Padilla S, Carrodegas RG, et al. Marcaje fluorescente para el estudio de la capacidad regeneradora de biomateriales. En: Libro de Ponencias: XXXV Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales (SIBB). Madrid.2012.