



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio *in vivo* de la respuesta biológica del hueso inducida por una cerámica porosa de composición $\text{Ca}_7(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)_2$ – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ dentro del sistema binario fosfato tricálcico-silicato dicálcico.

D^a. Belén Níguez Sevilla

2016

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

FACULTAD DE MEDICINA

**Estudio *in vivo* de la respuesta biológica del hueso inducida por
una cerámica porosa de composición
 $\text{Ca}_7(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)_2 - \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ dentro del sistema binario
fosfato tricálcico-silicato dicálcico.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina
por la Universidad de Murcia.

Belén Níguez Sevilla

2016

A mi madre,
porque lo es todo para mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, el Dr. Luis Meseguer Olmo, por su gran esfuerzo, interés y dedicación en la consecución de esta tesis. Por haberme introducido en el amplio y desconocido mundo de los biomateriales. Por acompañarme en este largo viaje, y por la paciencia que ha tenido conmigo.

A mi director de Tesis, el Dr. Miguel Alcaraz Baños, por su inestimable colaboración, y sin cuya labor este trabajo no hubiera salido adelante. Por haber puesto luz en este camino cuando más oscuro estaba.

A mi directora de Tesis, la Dra. Piedad de Aza Moya, por ser un pilar fundamental de este proyecto, y atender mis dudas en este complejo mundo de la Bioingeniería.

Al Dr. José Rogelio Fernández Sánchez, por su colaboración desinteresada en este proyecto.

A Fini Parra García, por su generosa ayuda.

A mi jefe de servicio, el Dr. Manuel Medina Quirós, por su apoyo y motivación en todo momento. Por sus continuos empujones para que llegara a la meta.

A todos los miembros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, adjuntos y residentes, los que siguen y los que ya se fueron, por ser mis maestros, por todo lo compartido.

A mi madre, por haberme dedicado su vida, por ser una luchadora nata, y porque sin ella no habría llegado a donde estoy. Por ser la que aguanta todos y cada uno de mis malos momentos, y no ponerme nunca una mala cara. Por creer en mí. Por su amor incondicional.

A mi hermana, por haber sido siempre mi modelo a seguir, el objeto de mi admiración. Porque por ella estudié medicina. Por haberme dado a dos de las personitas que más quiero.

A Arturo y Alicia, mis peques, por dar color a cualquier día gris.

A mi padre, por hacerme ver que puedo superar cualquier obstáculo.

A Sonia, mi mejor amiga, mi tulipán, por transmitirme su fuerza y sus ganas de sonreírle a la vida. Por estar conmigo en los buenos y en los malos momentos.

A Andrés, mi compañero, mi amigo, por quererme con mis virtudes y mis defectos, por saber comprender mis ausencias y mi carácter.

A mi amiga Raquel, que ha sufrido muy de cerca mis momentos de locura, por haberme ayudado con su serenidad.

A mis abuelos y mi tita Juana. Os fuisteis pronto, pero siempre estáis conmigo. Abuelita Lola, te echo de menos. Abuelo Juan, sé que habrías estado muy orgulloso.

A vosotros, gracias por estar a mi lado.

ABREVIATURAS

- **BMPs:** proteínas morfogenéticas óseas.
- **C₂S:** silicato dicálcico.
- **EDS:** microanálisis por dispersión de energías de rayos X.
- **EGF:** factor de crecimiento epidérmico.
- **FC:** fosfato cálcico.
- **FGF:** factor de crecimiento fibroblástico.
- **GH:** hormona de crecimiento.
- **HA:** hidroxiapatita.
- **H-E:** hematoxilina-eosina.
- **IGF:** factor de crecimiento insulínico.
- **Micro-TC:** microtomografía computerizada.
- **MOD:** matriz ósea desmineralizada.
- **MTA:** mineral trióxido agregado.
- **PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- **PMMA:** polimetilmetacrilato.
- **PTH:** hormona paratoidea.
- **RXs:** radiología simple.
- **SEM:** microscopía electrónica de barrido.
- **TCP:** fosfato tricálcico.
- **TEM:** microscopía electrónica de transmisión.
- **TGF- β :** factor transformante beta.
- **VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular.
- **XRD:** difracción de rayos X.

ÍNDICE

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción.....	7
III.	Antecedentes.....	11
	1. El tejido óseo.....	15
	2. Tratamiento de las lesiones del tejido óseo.....	33
	3. Fisiología del injerto óseo.....	34
	4. Injertos óseos.....	36
	5. Biomateriales como sustitutos óseos.....	41
	6. Biocerámicas.....	50
	7. Biomateriales en el sistema fosfato tricálcico – silicato dicálcico.....	57
IV.	Hipótesis de trabajo y Objetivos.....	61
V.	Material y métodos.....	65
	1. Material.....	67
	2. Métodos.....	74
VI.	Resultados.....	95
	1. Caracterización.....	97
	2. Estudio radiológico.....	100
	3. Estudio anatomopatológico.....	116
	4. Estudio histomorfométrico.....	134
VII.	Discusión.....	141
VIII.	Conclusiones.....	159
IX.	Bibliografía.....	163

I. RESUMEN

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los fosfatos cálcicos son utilizados como cementos óseos y cerámicas bioactivas y biodegradables, siendo los candidatos idóneos para su empleo como andamios en la regeneración ósea. Su uso dentro del sistema binario fosfato tricálcico - silicato dicálcico puede mejorar su función dado que los iones de silicio mejoran la bioactividad del implante, la osteopromoción celular y su función como soporte, pudiendo actuar como un sustituto del injerto óseo. El objetivo de nuestro trabajo consistió en diseñar, sintetizar y caracterizar “*in vivo*” un material cerámico poroso bifásico de composición Nurse’s A Phase - Silicocarnotita dentro del sistema binario fosfato tricálcico - silicato dicálcico, utilizando un modelo animal, con vistas a su potencial aplicación clínica como sustituto del injerto óseo autólogo en el campo de la cirugía reconstructiva ósea.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han utilizado 16 conejos de raza Nueva Zelanda, distribuidos aleatoriamente en 4 grupos correspondientes a los 4 periodos de estudio establecidos (1, 3, 5 y 7 meses).

La cirugía de implantación se realizó en metáfisis proximal de tibia, mientras que en la contralateral se realizó un defecto óseo control (sin material). Al final de cada periodo de estudio, los animales fueron eutanasiados con una sobredosis de Pentobarbital sódico vía intracardiaca previa sedación. A las muestras óseas extraídas se les realizó estudio radiológico con radiología simple (RXs) y micro-tomografía computerizada (micro-TC) y, posteriormente, un estudio anatomopatológico e histomorfométrico.

RESULTADOS: En el estudio mediante RXs se pudo apreciar que la cortical externa formada sobre el defecto óseo presentaba una densidad cálcica similar a la cortical adyacente. El implante presentaba una disminución generalizada evidente de la densidad radiológica con trabéculas óseas que parecían introducirse en su interior.

El estudio con micro-TC puso de manifiesto la reabsorción, en volumen, del 70% del material implantado al finalizar el estudio, así como un incremento progresivo del hueso en el interior de la laguna ósea experimental practicada.

En el estudio anatomopatológico se observó que algunos fragmentos del material implantado habían sufrido una reabsorción casi total. El tejido óseo, con grandes trabéculas neoformadas bien ordenadas, empezaba a ser sustituido en su periferia por médula ósea hematopoyética de características normales. No se observó tejido fibroso en la interfase hueso-material. Las vísceras estudiadas no presentaron alteraciones anatomopatológicas.

En el estudio histomorfométrico se constató un incremento del 20% en la cantidad de hueso neoformado en el grupo implantado, frente a un 7% en el grupo control, así como un aumento progresivo en el contacto del hueso con el implante, al mismo tiempo que permitió cuantificar la reabsorción del implante a lo largo de todo el estudio. El defecto cortical quedó reparado en un 93% al final del estudio en las tibias implantadas frente al 67% observado en los controles.

CONCLUSIONES: La existencia de crecimiento óseo asociado a una inexistente respuesta inflamatoria en todos los periodos de estudio demuestran que el material implantado de composición Nurse A - Silicocarnotita es biocompatible, al mismo tiempo que facilita el crecimiento óseo tanto en la periferia como en el interior del material, sin apreciarse tejido óseo fibroso en la interfase hueso-material, lo que demuestra su capacidad de osteointegración. Por otro lado, el material sufre un proceso de reabsorción progresiva a lo largo del estudio sin que se originen productos intermedios. Por todo ello, a cerámica objeto de estudio puede ser considerada como una alternativa dentro de los sustitutos óseos en el campo de la cirugía ósea reconstructiva.

PALABRAS CLAVES: fosfato tricálcico, silicato dicálcico, sustitutos óseos, histomorfometría, micro- tomografía computerizada, estudio “*in vivo*”.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la Historia de la Medicina, los profesionales que han tratado la patología ósea han tenido que enfrentarse a una serie de problemas de difícil resolución, siendo uno de los más destacados los defectos óseos locales que aparecen como resultado de un tejido óseo enfermo (infecciones, resecciones tumorales) o un traumatismo de gravedad.

Para solventarlo se han empleado injertos óseos autólogos, aloinjertos y xenoinjertos, así como variantes sintéticas.

Sin embargo, ninguno de estos materiales está exento de problemas, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos materiales denominados genéricamente como sustitutos óseos, con el objetivo de conseguir una integración biológica correcta entre el material y el anfitrión.

La resurgente utilización de los materiales de fosfato cálcico como implantes óseos a lo largo de las dos últimas décadas ha permitido estudios sistematizados de los mecanismos que caracterizan la respuesta biológica a dichos compuestos.

Estos materiales han sido englobados en el concepto de biomateriales cerámicos, propuesto por la Sociedad Europea de Biomateriales en 1.986, definiéndolos como materiales inorgánicos no metálicos, en fases amorfas, poli o monocristalinas.

En nuestro estudio hemos implantado un compuesto bifásico de composición Nurse A – silicocarnotita dentro del sistema fosfato tricálcico – silicato dicálcico, en defectos óseos realizados en tibias de conejos, valorando el grado de biodegradación y osteointegración, así como la neoformación de tejido óseo en torno al mismo.

III. ANTECEDENTES

III. ANTECEDENTES

Durante siglos se ha estudiado la posibilidad de realizar la sustitución del tejido óseo, remontándose los primeros conocimientos a la Edad de Bronce, cuando se realizaron rellenos de defectos en cráneos mediante autoinjerto¹.

Sin embargo, ha sido durante el transcurso de los cien últimos años cuando esta disciplina sufre un espectacular avance. Esto se debe al desarrollo de nuevas tecnologías, así como al avance continuo que está experimentando el conocimiento científico en este tiempo, haciendo posible la extensión de la aplicabilidad de una amplia gama de materiales, tanto naturales como sintéticos, en muchos campos de la medicina moderna.

La primera referencia sobre el tratamiento de pérdidas de tejido óseo que está recogida en la bibliografía se remonta a 1668, cuando un cirujano holandés, Job van Meek'ren, describió el tratamiento de un defecto óseo en el cráneo de un soldado implantando un fragmento de cráneo obtenido de un perro. Curiosamente, este injerto se retiró dos años más tarde a petición del paciente para que se le permitiera de nuevo el acceso a su iglesia, que lo había excomulgado por ser portador de un xenoinjerto.²

En 1894, Stachow realizó experimentos en ovejas, rellenando una serie de defectos óseos con yeso de París, cemento, gutta percha (obtenido del látex de árboles de Malasia) y amalgama de plata, observando que el yeso de París era el único material que prometía unos efectos beneficiosos sobre la curación de dichos defectos.³

Posteriormente, desde que se describió el importante papel del fosfato cálcico (FC) en la fracción inorgánica de los tejidos duros del organismo humano, como huesos y dientes, diversos autores han considerado estas sales como una sustancia capaz de influir sobre el proceso de reparación del tejido óseo. Albee y Morrison fueron los primeros en comunicar el empleo de este material en 1920, realizando experimentos en conejos mediante la resección de 5 mm de diáfisis radial, e inyectando 1cc de una suspensión de fosfato tricálcico (TCP) en agua destilada en el orificio. Mientras que el radio contralateral, utilizado como control, tardó 42 días en crear un puente óseo, en los tratados con TCP se observó el puente en 31 días⁴.

Desde entonces se han ido desarrollando distintos tipos de injertos, y fabricando diferentes materiales biocompatibles (biomateriales), estudiando sus ventajas e inconvenientes tras la implantación, ya que la necesidad de sustitución ósea es común en Cirugía Ortopédica y Traumatología, así como en Neurocirugía, Cirugía Maxilofacial y Odontología.

La primera definición de biomaterial se estableció en una Conferencia de la Sociedad Europea de Biomateriales en Chester (Reino Unido) en 1986, considerando como tal a aquel *material no vivo usado como dispositivo médico y cuya finalidad es interactuar con un sistema biológico*⁵.

Esta definición se fue desarrollando con el paso del tiempo hasta llegar a una mucho más amplia surgida del consenso de especialistas en 1991, también en Chester. Desde entonces se considera como biomaterial *cualquier material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos, con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo*⁶.

Los biomateriales, por tanto, pueden constituir una alternativa a la utilización de autoinjertos y aloinjertos en la regeneración ósea, por lo que deben poseer propiedades mecánicas similares al hueso y carecer de respuesta inmunitaria en el momento de su integración en los medios biológicos.

Es por ello que la eficiencia de un biomaterial que se considere sustituto óseo debe ser evaluada a través de los resultados preclínicos y clínicos a medio y largo plazo, con el fin de poder definir las indicaciones precisas para cada material.

1. EL TEJIDO ÓSEO

1.1. COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El tejido óseo es el principal componente del esqueleto, y desempeña importantes funciones como:

- Protección de órganos vitales.
- Alojamiento de la médula ósea hematopoyética.
- Soporte de la musculatura y otros tejidos blandos.
- Sistema de palancas que amplía las fuerzas generadas por la contracción muscular.
- Depósito de calcio, fosfato y otros iones.

A pesar de su dureza y resistencia, el hueso es un tejido dinámico que está en constante proceso de renovación. Al igual que el resto de tejidos conjuntivos, está formado por una matriz extracelular donde se encuentran los distintos tipos celulares, estando los componentes extracelulares calcificados. Así, según la densidad de la matriz extracelular, el hueso puede ser compacto (gran densidad) o esponjoso (baja densidad). Ambos tipos son adyacentes, sin poder apreciar un límite claro que los separe.

Los huesos poseen un revestimiento interno (endostio) y externo (periostio), compuesto de tejido conjuntivo con células osteogénicas y una amplia red de vasos. Sus principales funciones son la nutrición del tejido óseo y el suministro de células para su crecimiento y regeneración.

A. MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz ósea tiene una gran resistencia y estabilidad, y está formada por dos componentes:

- **Componente orgánico:** proporciona la forma del hueso y contribuye a su capacidad para resistir tensiones. Está compuesto principalmente por colágeno de tipo I, así como pequeñas cantidades de colágeno tipo V y XII, constituyendo entre todos ellos el 90% de la matriz. El 10% restante está formado por glucoproteínas no colágenas que participan en la organización de la matriz, la mineralización del hueso y el comportamiento de las células. Estas proteínas incluyen la osteocalcina, osteonectina y sialoproteína, implicadas en la adhesión celular, fosfoproteínas implicadas en el inicio de la mineralización, y pequeños proteoglicanos como el biglicano y la decorina (Figura 1). También contiene factores de crecimiento tales como las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) e interleucinas 1 y 6 (IL 1-6) entre otras.

- **Componente inorgánico:** proporciona la resistencia a la compresión. Sirve de reservorio de iones y proporciona al tejido óseo la mayor parte de su rigidez y resistencia⁷. Aproximadamente el 99% del calcio, el 85% del fósforo, y entre el 40-60% del sodio y magnesio del organismo están asociados a este componente inorgánico o fase mineral del hueso⁸.

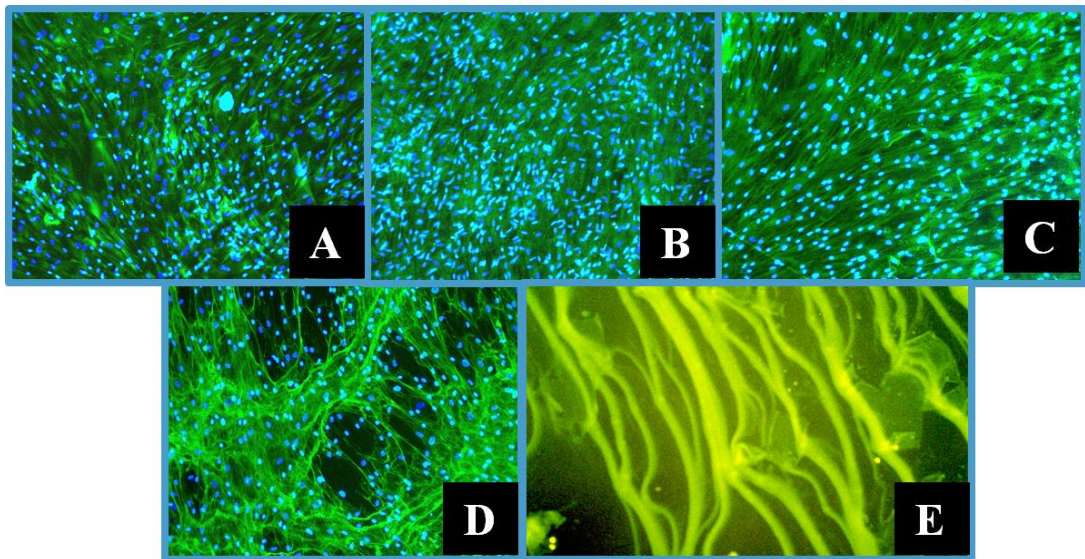


Figura 1: Imágenes con inmunofluorescencia obtenidas mediante técnicas de inmunohistoquímica de los diferentes componentes de la matriz extracelular. (A) Células expresando colágeno I. (B) Osteocalcina. (C) Osteopontina. (D) Heparansulfato. (E) Fibras de colágeno sintetizadas. (Magnificación 10X)

B. CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo contiene pocas células por unidad de volumen, contrariamente a lo que ocurre en el resto de tejidos conjuntivos⁸. Estas células llevan a cabo las funciones de formación, reabsorción, reparación del hueso y homeostasis mineral. Se originan a partir de dos linajes celulares⁹:

– **Mesenquimal**: da lugar a:

- a) **Preosteoblastos o células osteogénicas**: residen en el endostio, periostio y médula ósea⁸. Tienen una forma irregular y son mononucleadas. Se mantienen en estado indiferenciado hasta que son estimulados, momento en el que proliferan y se diferencian a osteoblastos; esto ocurre, por ejemplo, después de una fractura.

- b) ***Osteoblastos*** (Figura 2): se encuentran en la superficie de los huesos en crecimiento y, cuando están activos, les rodea una laguna de componente orgánico de la matriz, llamada osteoide, que los separa de la matriz mineralizada. Son los responsables de la síntesis y secreción de la fase orgánica de la matriz ósea, produciendo colágeno de tipo I y glucoproteínas¹⁰. Los osteoblastos activos pueden seguir tres destinos¹¹:
- Permanecer en la superficie del hueso manteniendo una actividad sintética baja.
 - Dar lugar a los osteocitos de superficie, rodearse de matriz mineralizada, y dar lugar a los osteocitos, con los que mantienen contacto a través de los canalículos.
 - Desaparecer de los lugares de formación ósea.
- c) ***Osteoblastos inactivos o osteocitos de superficie***: tienen forma alargada y extensiones citoplasmáticas que penetran en la matriz ósea y contactan con las extensiones citoplasmáticas de los osteocitos. Su función es la de atraer a los osteoclastos mediante la reabsorción del osteoide que cubre la matriz mineralizada a sitios específicos, y estimularlos para que lleven a cabo la reabsorción ósea¹¹.

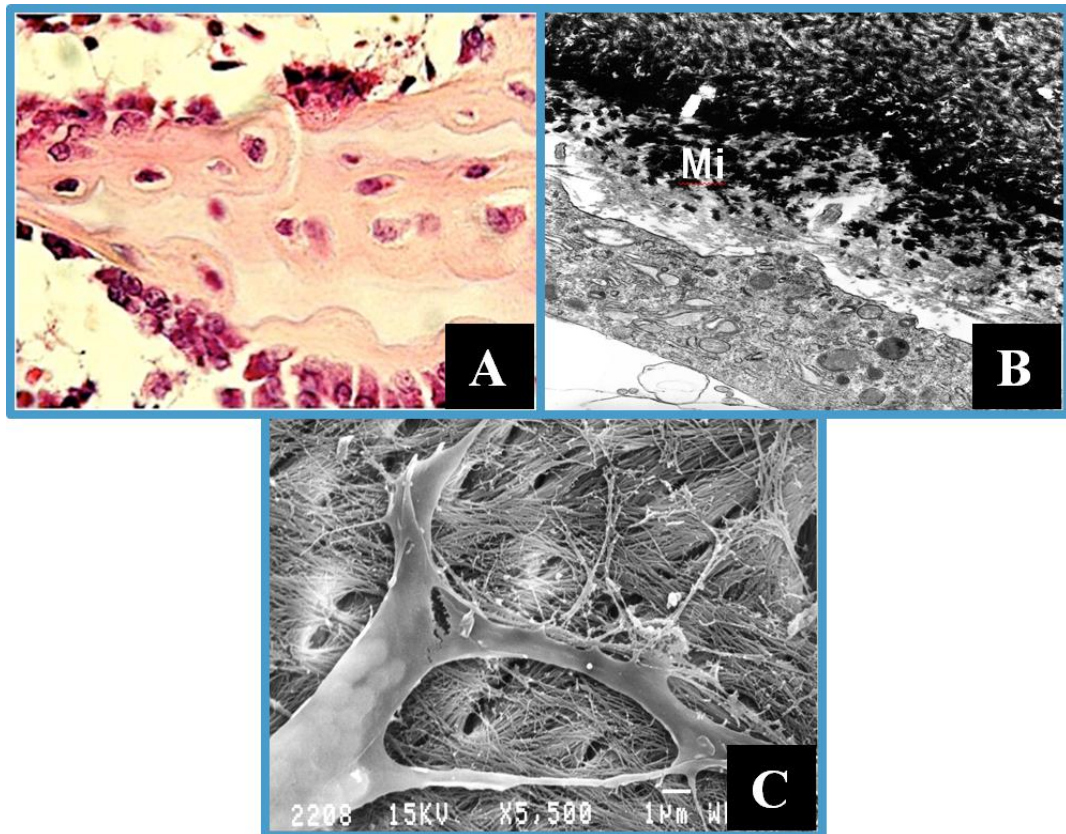


Figura 2: (A) Microfotografía de tejido óseo neoformado con osteoblastos periféricos y osteocitos redondeados. Un osteoclasto multinucleado puede observarse en la superficie superior (H-E, 200X).

(B) Microfotografía de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) donde se observa un osteoblasto junto a un área de osteoide calcificado (Mi) (Magnificación 10.000X).

(C) Microfotografía de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de un osteoblasto sobre una red de fibras de colágeno (Magnificación 5.500X).

- d) **Osteocitos** (Figura 3): representan el 90% de las células óseas del esqueleto maduro. Están alojados en lagunas de matriz ósea mineralizada, y conectan entre sí mediante prolongaciones celulares¹². Las interconexiones entre osteocitos, osteoblastos y osteocitos de superficie permiten que esta red celular detecte, por ejemplo, la deformación del hueso, coordinando la formación y reabsorción del hueso, así como el flujo de iones entre la matriz ósea y los fluidos extravasculares del hueso.

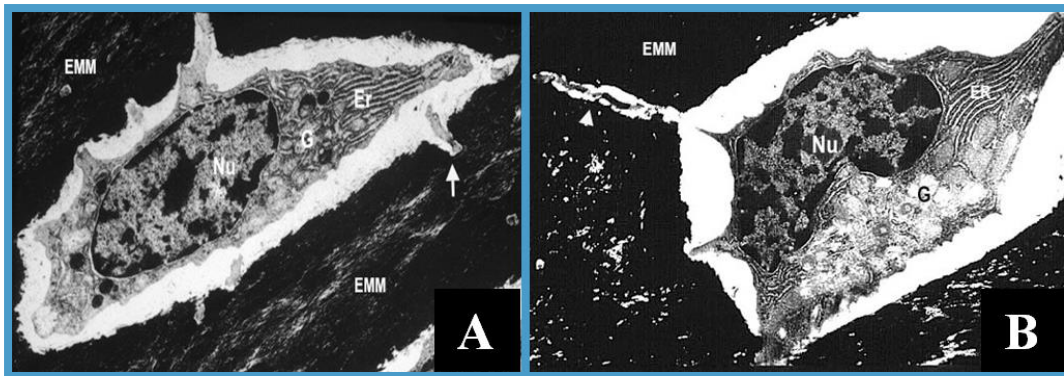


Figura 3: (A) Microfotografía mediante MET de osteocito rodeado de matriz extracelular mineralizada. El retículo endoplasmático (Er) es escaso y el aparato de Golgi (G) no está bien desarrollado. Las irregularidades de la superficie corresponden a las prolongaciones celulares mediante las cuales se conectan con otras células (flecha blanca). (B) Una prolongación celular va entrando a un canalículo a través de la matriz extracelular mineralizada (EMM) en la zona superior izquierda de la imagen (cabeza de flecha blanca). (Magnificación 10.000X)

– **Hematopoyético:** da lugar a:

- a) **Preosteoclastos:** son precursores mononucleares de la médula ósea que se encuentran en la médula o en la sangre. Al ser estimulados proliferan, migran al tejido óseo y se fusionan, dando lugar a los osteoclastos.
- b) **Osteoclastos** (Figura 4): son multinucleados, y presentan gran número de mitocondrias y lisosomas en su citoplasma¹³. Se encuentran en los lugares de reabsorción del hueso. Para destruir la matriz ósea, los osteoclastos se unen a la superficie del hueso, formando un espacio cerrado entre la célula y el hueso. A la vez, sus endosomas contienen bombas de protones de membrana que migran a la zona celular más cercana al hueso y se insertan en la membrana; esto provoca que baje el pH en el espacio existente entre el osteoclasto y el hueso, solubilizando la fase mineral del mismo¹⁴. Para degradar la fase orgánica del hueso los osteoclastos

secretan proteasas ácidas y fagocitan fragmentos de matriz, que irán degradando en las vacuolas citoplasmáticas. Una vez han completado la reabsorción, se dividen en múltiples células mononucleares a la espera de ser reactivadas para formar nuevos osteoclastos.

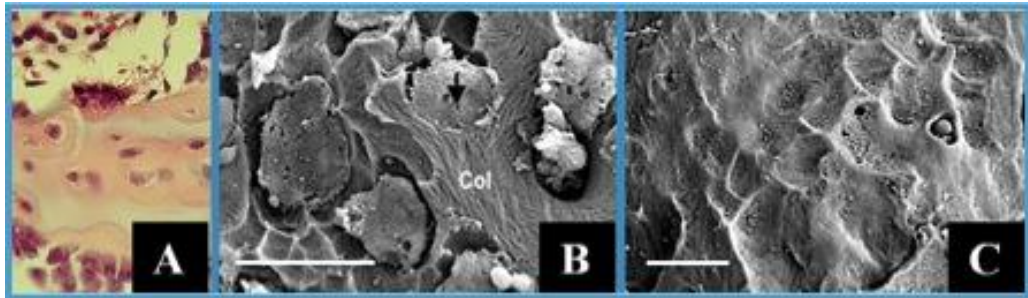


Figura 4: (A) Microfotografía de osteoclasto multinucleado en superficie trabecular (H-E, 200X). (B) Microfotografía de SEM de osteoclastos (flecha negra) destruyendo las fibras de colágeno (Col) durante el proceso de remodelado y (C) resultado final. (Magnificación, barra 20 μ m).

C. TIPOS DE TEJIDO ÓSEO

Desde el punto de vista histológico se distinguen dos tipos con la misma composición aunque de diferente densidad⁹:

- **Hueso compacto:** 10% de porosidad. Forma aproximadamente el 80% del esqueleto adulto¹¹, y contiene en su interior a la médula ósea hematopoyética. Se organiza en columnas óseas paralelas que constan de capas concéntricas dispuestas alrededor de un canal central (canal de Havers) que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, constituyendo así una osteona, unidad funcional del tejido óseo (Figura 5).

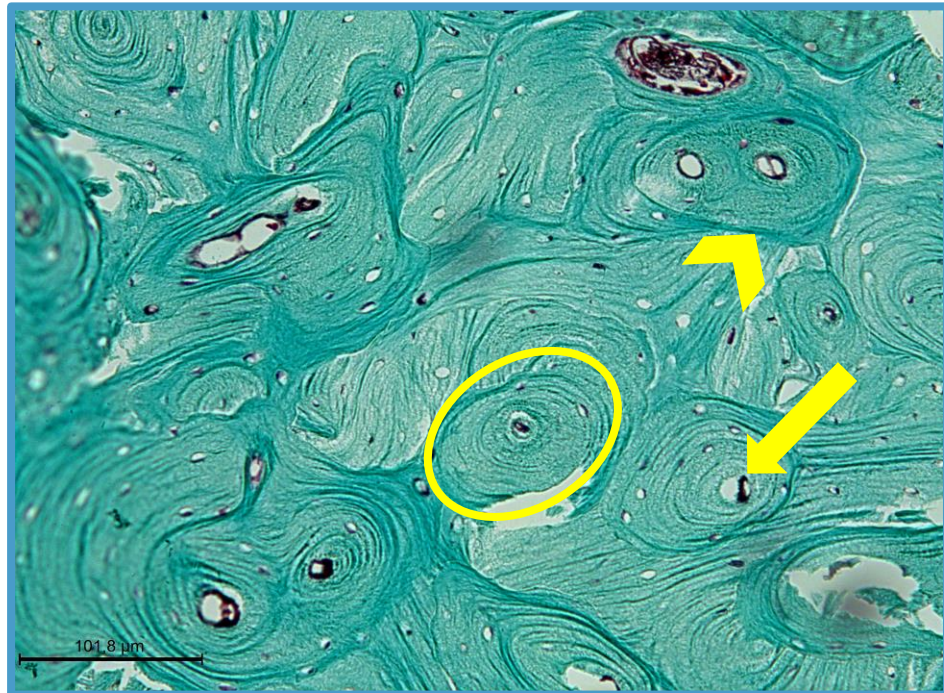


Figura 5: Microfotografía de tejido óseo compacto donde se pueden apreciar las osteonas (círculo), los canales de Havers (flecha) y líneas de cementación (cabeza de flecha). (Tricrómico de Masson, 12.5X).

- **Hueso esponjoso:** 50-90% de porosidad. Está compuesto por una red de trabéculas óseas separadas por espacios laberínticos comunicados que alojan en su interior a la médula ósea hematopoyética. Las células se encuentran en las trabéculas disponiéndose en su superficie, pudiendo estar influenciadas por las células de la médula ósea, a diferencia de lo que ocurre en el hueso compacto donde la mayoría de las células están completamente rodeadas de matriz. Es por ello que el hueso esponjoso tiene una tasa metabólica y de remodelación más elevada que el hueso compacto. (Figuras 6 y 7).

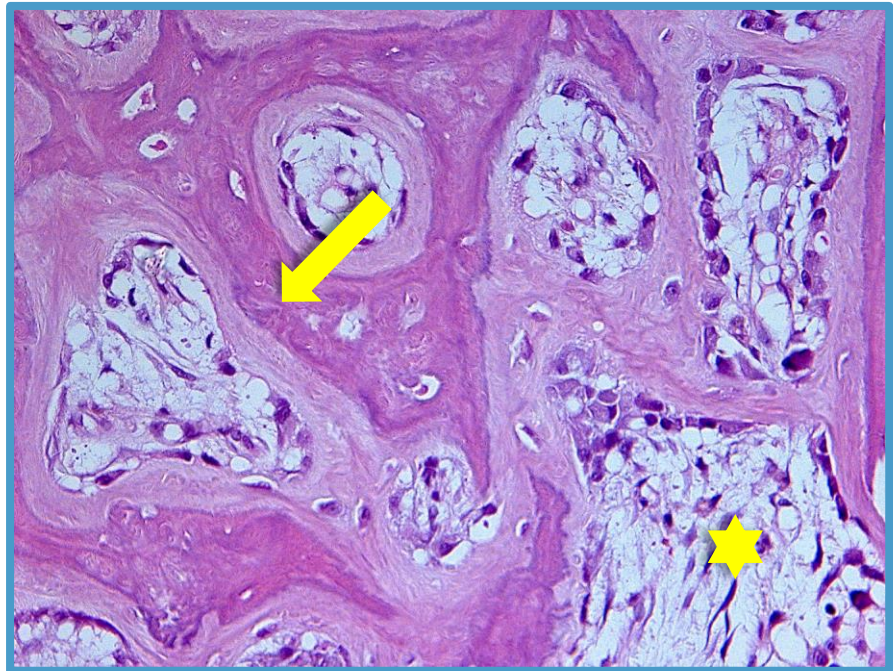


Figura 6: Microfotografía de tejido óseo esponjoso donde se pueden apreciar las trabéculas óseas (flecha) rodeando a la médula ósea hematopoyética (asterisco). (H-E, 4X).

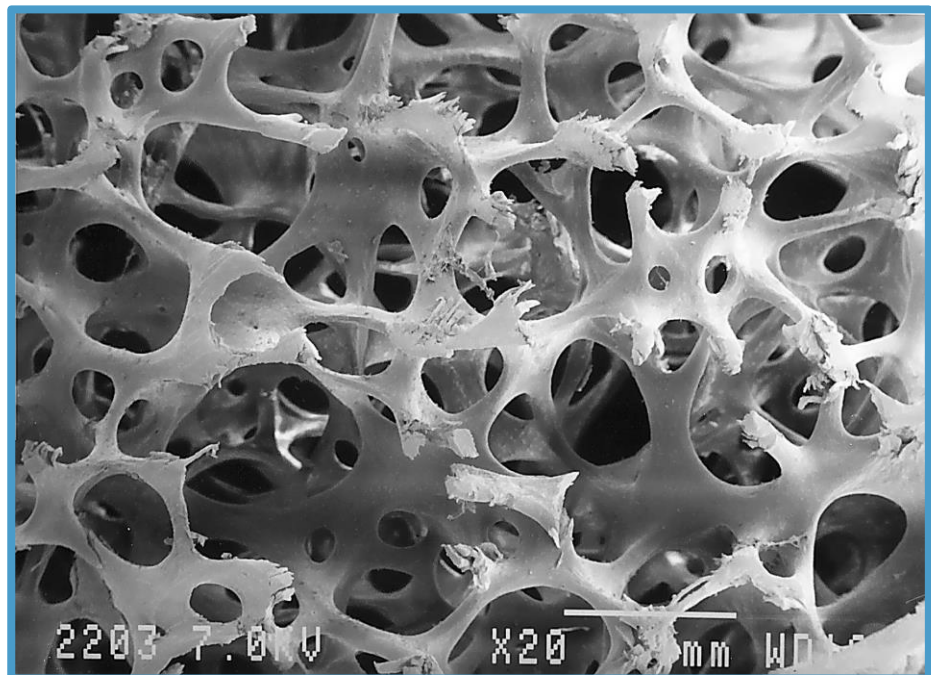


Figura 7: Microfotografía de SEM de tejido óseo esponjoso desprovisto de médula ósea hematopoyética, donde se pueden apreciar las trabéculas óseas. (Magnificación, barra 4mm).

Al ser la resistencia a la compresión proporcional a la densidad, ésta es diez veces mayor por unidad de volumen en el hueso compacto que en el esponjoso.

Los huesos también pueden clasificarse según su morfología:

- **Huesos largos:** sus extremos o epífisis están formados por hueso esponjoso, rodeados por una delgada capa superficial de tejido óseo compacto, y la porción central o diáfisis está formada casi totalmente por hueso compacto que proporciona gran resistencia a la torsión. Son, por ejemplo, el fémur, la tibia, el radio, o el húmero.
- **Huesos cortos:** tienen el centro compuesto por hueso esponjoso, y se encuentran recubiertos en toda su periferia por una capa de hueso compacto. Son, por ejemplo, los huesos del carpo y el tarso.
- **Huesos planos:** están formados por dos capas de hueso compacto separadas por hueso esponjoso. Son, por ejemplo, las costillas, el iliaco, y los huesos de la bóveda craneal.

Por otro lado, según la orientación de sus fibras de colágeno se diferencian:

- **Hueso primario o inmaduro:** forma el esqueleto del embrión que posteriormente se va reabsorbiendo y reemplazando por hueso laminar. Las fibras de colágeno se disponen irregularmente. Tiene una tasa metabólica superior a la del hueso laminar, y más osteocitos. Además, debido al alto contenido celular y de agua, es más flexible y elástico. Salvo ciertas excepciones, como son los tendones, ligamentos

y suturas craneales, el hueso inmaduro raramente está presente en el esqueleto humano a partir de los 5 años de edad. Sin embargo, también puede aparecer en respuesta a lesiones óseas.⁹

- **Hueso secundario o laminar:** en él las fibras de colágeno están organizadas en láminas que pueden permanecer paralelas las unas a las otras o disponerse en capas concéntricas en torno a los conductos por los que discurren los vasos sanguíneos, formando los denominados sistemas de Havers. Estos sistemas están interconectados a lo largo de su trayecto mediante canales de menos diámetro, denominados canales de Volkmann (Figura 8).

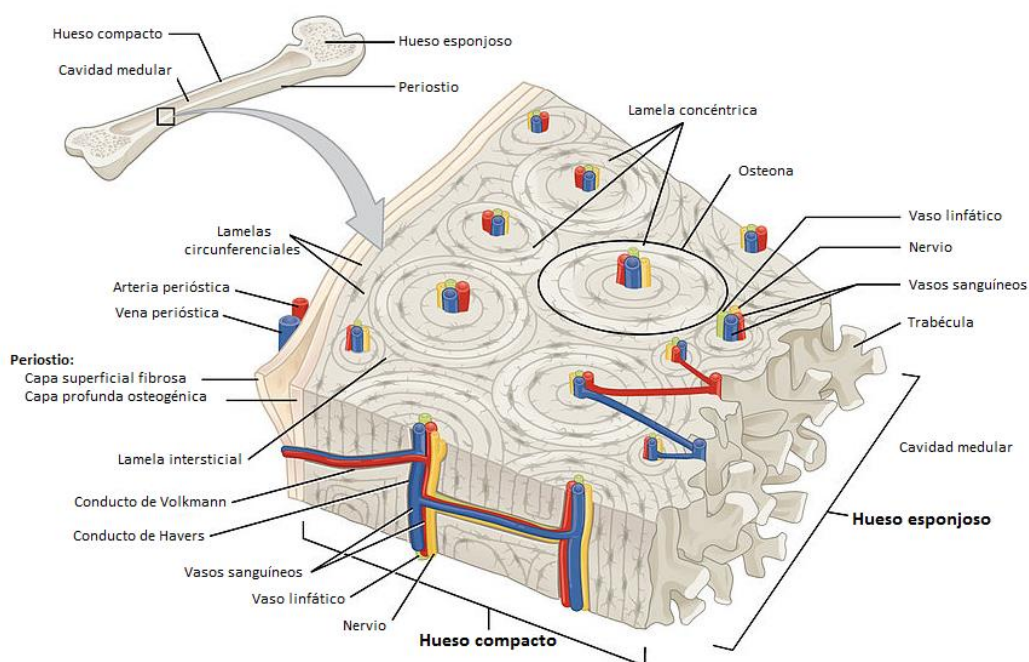


Figura 8: Esquema de la microestructura del hueso secundario o laminar. Ilustración de Anatomy & Physiology. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

1.2. FORMACIÓN Y REGENERACIÓN DEL HUESO

A. OSTEOGÉNESIS

El tejido óseo se forma a partir del tejido conjuntivo preexistente. En el embrión se observan dos tipos de osteogénesis:

a) OSIFICACIÓN INTRAMEMBRANOSA

Es el proceso mediante el cual se forman los huesos planos del cráneo y parte de la mandíbula.

Empieza cuando el tejido conjuntivo se condensa en una capa muy vascularizada, en la cual las células se unen por largas prolongaciones y depositan fibras de colágeno orientadas al azar en el espacio intercelular¹¹ (Figura 9-A)

En primer lugar aparecen unas trabéculas de matriz ósea más densas que tienden a depositarse en puntos equidistantes de los vasos, formando una estructura reticular. Paralelamente se producen cambios en las células del tejido conjuntivo vecino, las cuales se sitúan en la superficie de las trabéculas. Estas células dan lugar a osteoblastos que depositarán nueva matriz ósea, permitiendo así el engrosamiento de las trabéculas. Los osteoblastos también secretan glucoproteínas de la matriz y moléculas de colágeno, que formarán una red de fibras dispuestas al azar. Este primer hueso formado es el **hueso primario o inmaduro**. La matriz ósea depositada por los osteoblastos se mineraliza posteriormente, y algunos osteoblastos dan lugar a osteocitos que quedarán atrapados en esta matriz, manteniendo el contacto con los osteoblastos mediante delgadas prolongaciones llamadas canalículos, que quedan rodeados de matriz ósea¹⁵ (Figuras 9-B y 9-C).

En las zonas de hueso inmaduro destinadas a dar lugar a **hueso compacto** las trabéculas continúan engrosándose hasta que desaparecen prácticamente los espacios que rodean los vasos, y las fibras de colágeno de las capas del hueso depositadas sobre las trabéculas se ordenan. En las zonas destinadas a dar **hueso esponjoso** termina el engrosamiento de las trabéculas y el tejido vascular interpuesto se transforma en hematopoyético^{16, 17} (Figura 9-D).

El tejido conjuntivo que rodea al hueso en crecimiento se condensa formando periostio, mientras que los osteoblastos situados en la superficie de las trabéculas darán lugar a las células osteoprogenitoras.

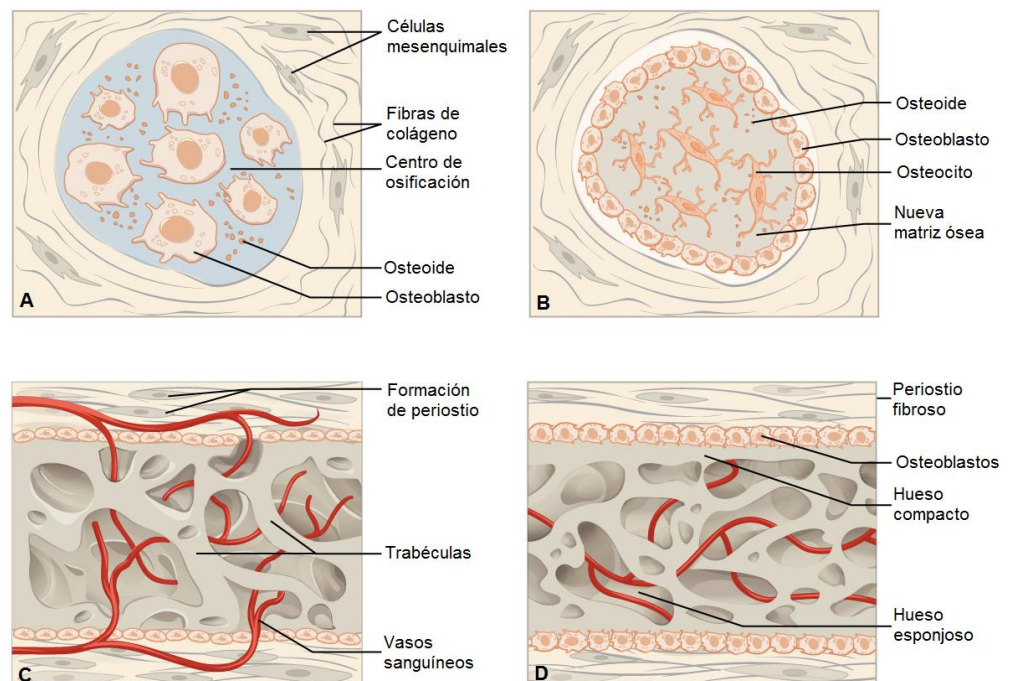


Figura 9: Osificación intramembranosa. (A) Grupos de células mesenquimales en la periferia, y formación del centro de osificación. (B) El osteoide secretado atrapa a los osteoblastos, que dan lugar a los osteofitos. (C) Formación de las trabéculas y el periostio. (D) El hueso compacto se sitúa superficial al hueso esponjoso, y los vasos sanguíneos se condensan en el tejido hematopoyético.

Ilustración de Anatomy & Physiology. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

b) OSIFICACIÓN ENDOCONDRA

Es el proceso mediante el cual se forman los huesos de la base del cráneo, la columna vertebral, la pelvis y las extremidades.

En una primera fase los condrocitos de la parte central del hueso se hipertrofian y acumulan glucógeno en su interior, formando así el centro de osificación endocondral^{16,17}. La matriz cartilaginosa se reduce y en ella se deposita fosfato de calcio, provocando que los condrocitos hipertróficos se degeneren y mueran¹⁸ (Figuras 10-A y 10-B).

Paralelamente se activa la capacidad osteogénica de las células del pericondrio (membrana de tejido conjuntivo que rodea al cartílago), que depositan una delgada capa de tejido óseo alrededor de la parte central del hueso, dando lugar al **periostio** (Figura 10-C). Los vasos sanguíneos del periostio crecen hacia la diáfisis e invaden la matriz cartilaginosa, ramificándose y formando asas capilares que se extenderán hacia los extremos del cartílago calcificado (Figura 10-D).

Posteriormente se produce la migración de células progenitoras al interior del cartílago, que darán lugar a los elementos hematopoyéticos de la médula ósea o a los osteoblastos. Estos se disponen sobre las espículas de matriz cartilaginosa calcificada y depositan matriz sobre ella, formando trabéculas óseas¹⁹.

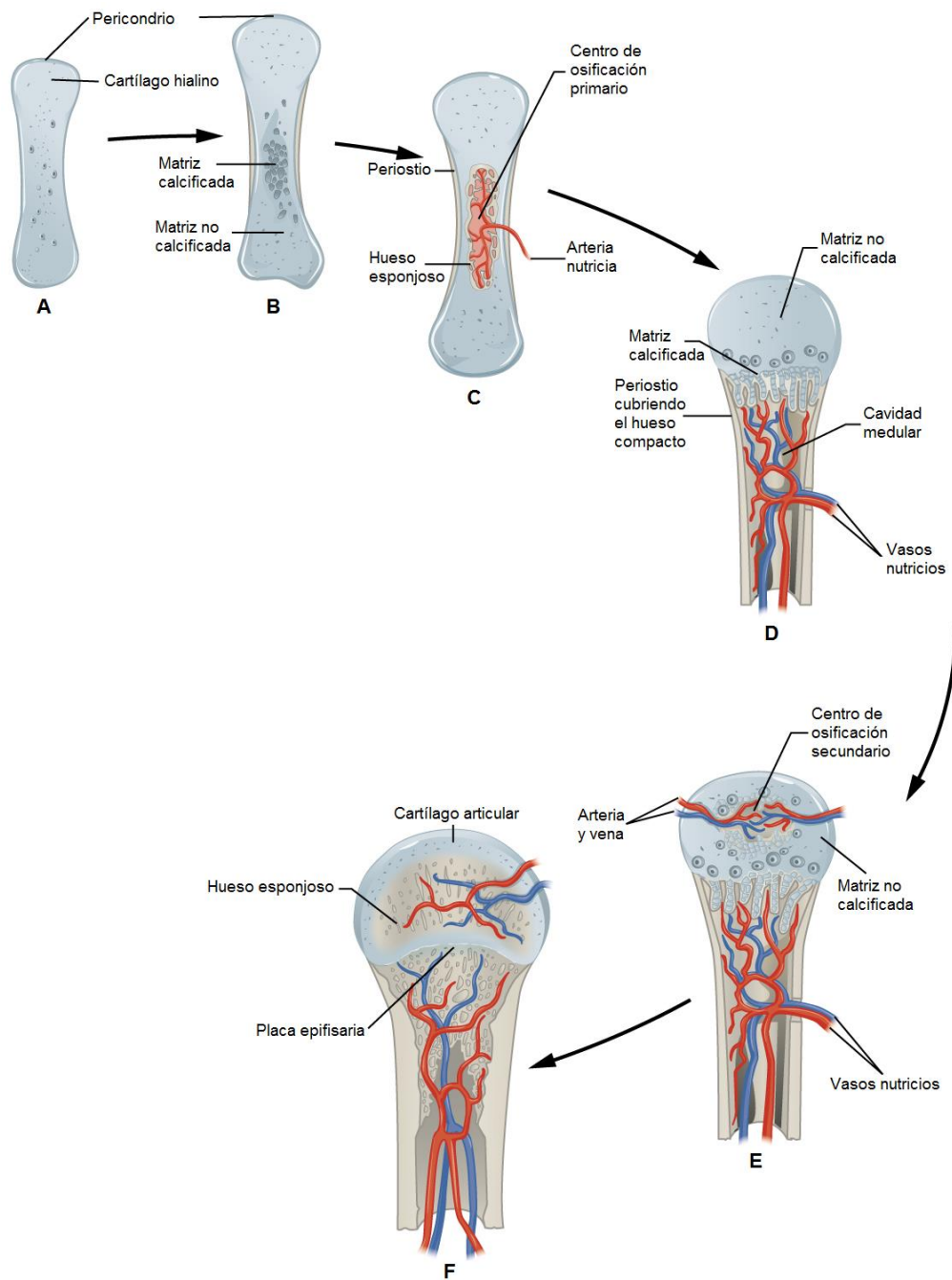


Figura 10: Osificación endocondral. (A) Las células mesenquimales se diferencian en condrocitos. (B) Formación del pericondrio. (C) Los vasos sanguíneos penetran en el cartílago. El pericondrio se transforma en periostio. Formación del centro de osificación primario. (D) El cartílago y los condrocitos continúan desarrollándose. (E) Formación del centro de osificación secundario. (F) El cartílago permanece en la placa epifisaria y en la superficie articular como cartílago articular. Ilustración de Anatomy & Physiology. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

En una segunda fase los condrocitos de las epífisis se hipertrofian y dan lugar al centro de osificación epifisario. Los vasos sanguíneos y el tejido osteogénico del pericondrio invaden estas zonas, estableciendo así los centros de osificación secundarios (Figura 10-E). La expansión de los centros secundarios sustituye todo el cartílago epifisario salvo el cartílago articular y la placa epifisaria de crecimiento (Figura 10-F). Así, el crecimiento en longitud de los huesos es el resultado de la multiplicación continuada de las células cartilaginosas de la placa epifisaria, que son sustituidas por hueso a medida que se alejan de la misma²⁰. La proliferación de condrocitos irá disminuyendo hasta cesar al final del crecimiento, por lo que se produce una sustitución de tejido cartilaginoso por hueso que concluye en la eliminación de la placa epifisaria.

Los huesos en crecimiento mantienen prácticamente la misma forma externa desde el desarrollo fetal hasta la vida adulta, aunque van cambiando continuamente su organización interna. La forma externa se mantiene gracias a un continuo remodelado de la superficie, con depósito de hueso en algunas zonas y reabsorción en otras²¹.

B. MINERALIZACIÓN

No se produce inmediatamente después de la síntesis de la matriz ósea. Este proceso se desarrolla en cuatro etapas:

a) MODIFICACIÓN DE LA MATRIZ

En esta primera fase se produce un aumento en la concentración extracelular de calcio y fosfato, así como en la síntesis de fosfoproteínas, glucoproteínas y sialoproteínas. También aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina y de las enzimas relacionadas con la hidrólisis y transporte de fosfato²².

b) NUCLEACIÓN

En este periodo se produce un cambio de estado entre las distintas formas de fosfato cálcico presentes en la matriz controlado por el colágeno tipo I. De este modo se forman varios intermediarios de la hidroxiapatita (HA) que posteriormente se ensamblan jerárquicamente, dando lugar a la HA^{8,23}.

c) CRECIMIENTO

La concentración local de calcio y fosfato disminuye. Una vez formados los primeros cristales de hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio se forman cristales adicionales de hidroxiapatita en la superficie de los primeros. La orientación de estos cristales queda determinada por la organización de la matriz de colágeno⁸.

d) REMODELACIÓN

Finalmente, la actividad de los osteoclastos permite la remodelación del hueso y el mantenimiento de su estructura (Figura 11). Este proceso estará controlado por²³:

- Hormonas reguladoras del calcio: hormona paratiroidea (PTH) y 1,25 dihidroxivitamina D₃ (calcitriol).
- Hormonas sistémicas: tiroxina, insulina, calcitonina, andrógenos, estrógenos, hormona del crecimiento (GH) y glucocorticoides.
- Factores de crecimiento: epidérmico (EGF), derivado de plaquetas (PDGF), insulínico (IGF), transformante beta (TGF-β), de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y BMPs.
- Factores locales producidos por las células del tejido óseo: prostaglandinas.

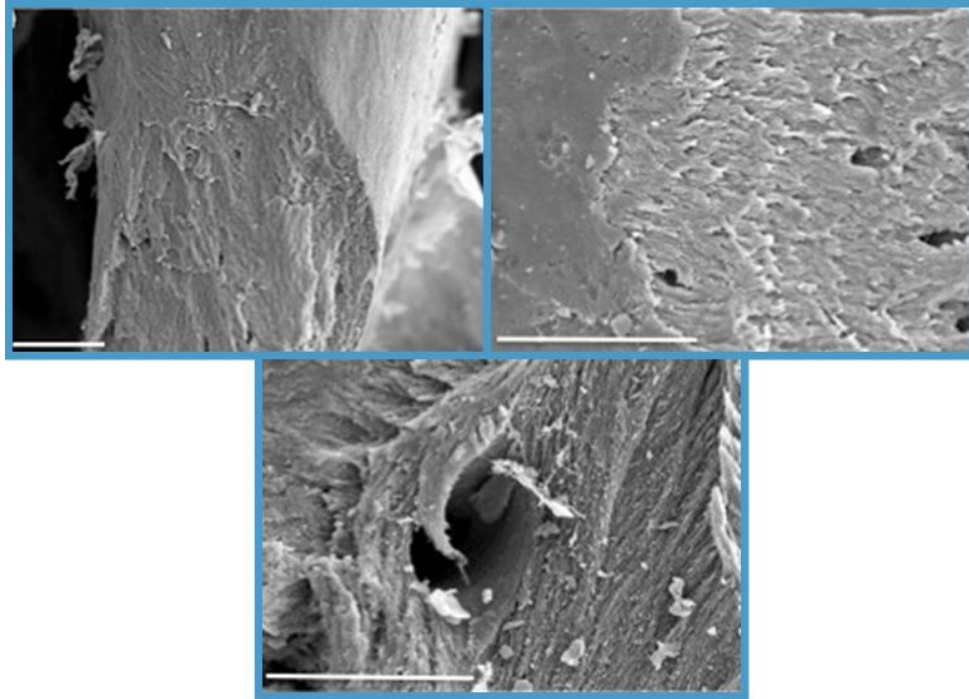


Figura 11: Microfotografía de SEM en la que se observa un frente de remodelación dejando expuestas las fibras de colágeno.
(Magnificación, barra 50 μm)

C. REPARACIÓN

Después de una fractura se produce una hemorragia local por lesión de los vasos sanguíneos, destrucción de la matriz, y muerte de células óseas. El coágulo formado por la hemorragia se organiza mediante tejido conjuntivo que se va volviendo cada vez más denso. Ese tejido da lugar a fibrocartílago, que constituirá el **callo fibrocartilaginoso**, que a su vez rellenará el espacio existente entre los extremos de la fractura¹¹.

La formación de hueso comienza al activarse las células osteoprogenitoras del periostio y el endostio¹⁹. Estas células depositan matriz ósea que formará una red de trabéculas (**callo óseo**) alrededor del callo cartilaginoso.

Al igual que ocurre en la osificación endocondral, la osificación del callo cartilaginoso se realiza mediante su sustitución gradual por hueso. Posteriormente, el hueso esponjoso formado en los dos fragmentos se une y se produce una reorganización interna que da lugar al hueso compacto.

Si hay buena aproximación de los fragmentos de la fractura el hueso puede unirse sin necesidad de formación de callo. Si la formación es deficiente o no existe, la reparación puede tener lugar solamente en forma de unión fibrosa relativamente débil.

2. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES DEL TEJIDO ÓSEO

Debido a su estructura altamente compleja y a las variadas funciones que realiza, las lesiones en el tejido óseo son comunes. Algunas de estas lesiones se curan espontáneamente mediante el proceso natural de reparación del tejido óseo descrito anteriormente, mientras que otras necesitan tratamiento más o menos complejos dependiendo de sus características anatomopatológicas.

Algunas de las fracturas que no llegan a curar espontáneamente se pueden tratar de forma conservadora, sin necesidad de llevar a cabo una intervención quirúrgica, utilizando dispositivos inmovilizadores externos como pueden ser los yesos o los distintos tipos de órtesis conformadas. Sin embargo, en determinados casos este tratamiento no es suficiente, y se recurre a la fijación interna de la fractura utilizando alguno de los numerosos métodos de osteosíntesis existentes, tanto externos (fijadores externos monolaterales, biplanares, circulares o híbridos) como internos (clavos, placas, agujas, etc.) para la estabilización del foco de fractura.

Aun así en determinadas ocasiones es preciso un tratamiento complementario, debido a una interposición de tejidos blandos en el foco de la fractura (especialmente en

tratamientos conservadores o técnicas percutáneas), fijación incorrecta de la fractura, pérdida de masa ósea (por conminución u osteolisis) o un aporte sanguíneo deficitario, que pueden dar lugar a un fracaso en el proceso de regeneración tisular que requieran la utilización de un aporte biológico por medio de un injerto de hueso o la implantación de sustitutos óseos. Este escenario puede ocurrir, además de en casos de fracturas, en aquellas situaciones clínicas en las que es preciso llevar a cabo grandes resecciones de tejido óseo, como en el caso de exéresis tumorales o en infecciones.

3. FISIOLÓGÍA DEL INJERTO ÓSEO

La biología de los injertos óseos, y por tanto de sus sustitutos, se puede estudiar a partir de la comprensión de los procesos que tienen lugar durante la formación del hueso^{24, 25} y descritos anteriormente. Tres propiedades deben concurrir en un material que se considere óptimo para influir de modo favorable en el proceso de regeneración ósea; éstas son:

A. OSTEOCONDUCCIÓN

Es el proceso por el cual el tejido óseo neoformado crece de modo centrípeta desde la superficie del material y coloniza de modo progresivo el interior del mismo, comportándose éste como una estructura porosa en 3D pasiva que facilita este crecimiento. El mecanismo se basa en una infiltración centrípeta vascular, y más tarde celular, del material desde el tejido óseo adyacente (lecho receptor).

B. OSTEOINDUCCIÓN

Es el fenómeno por el que una sustancia de origen proteico es capaz de inducir el reclutamiento de células madre mesenquimales y la diferenciación de las mismas en osteoblastos encargados de la formación de tejido óseo. Este proceso se ve facilitado por la presencia, en el caso del injerto óseo, de factores

de crecimiento, principalmente de BMPs y otros como el VEGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), TGF- β , etc.

C. OSTEOGENICIDAD

La proporcionan los elementos celulares tanto indiferenciados del mesénquima (células precursoras osteogénicas) como diferenciados (osteoblastos) incluidos en el injerto, que son capaces de sobrevivir al trasplante y sintetizar hueso nuevo en la zona receptora.

Estas tres propiedades son denominadas “*Triada de la regeneración ósea*” (Figura 12).

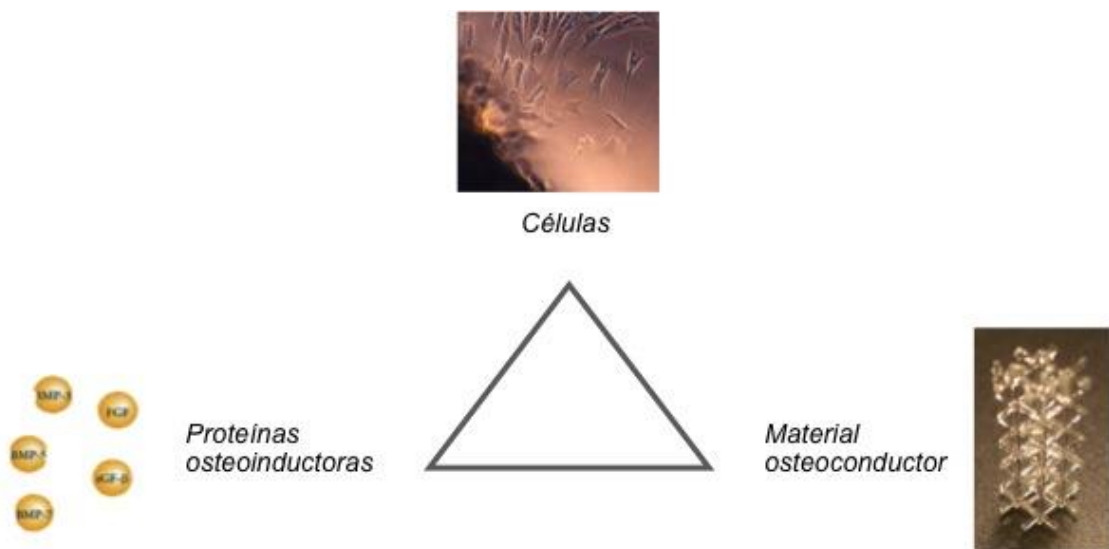


Figura 12: Representación esquemática de los elementos que componen la triada de la regeneración ósea.

4. INJERTOS ÓSEOS (Tabla 1)

4.1. AUTOINJERTOS

El injerto óseo autólogo sigue siendo hoy en día el patrón oro en la sustitución o regeneración ósea.

El autoinjerto se obtiene de una zona donante del mismo paciente, bien sea del mismo hueso o de otro.

Los injertos óseos pueden ser, según el tipo de tejido óseo que predomina, cortical, corticoesponjoso o esponjoso. En los dos primeros tipos podemos hacer a su vez una subdivisión libres o vascularizados, según asocien o no pedículo vascular que debe anastomosarse a un vaso próximo para garantizar su supervivencia.

El autoinjerto presenta grandes ventajas respecto a otros materiales para la reparación ósea, aunque no está exento de inconvenientes.

- Ventajas:
 - Aporta los tres elementos fundamentales para la regeneración ósea, también conocidos como la triada de la regeneración ósea:
 - Osteoconducción debida a la disposición tridimensional de las trabéculas óseas en las que las células pueden proliferar.
 - Osteoinducción a través de las proteínas no colágenas de la matriz ósea, que actúan como factores inductores de las células precursoras osteogénicas, facilitando su proliferación y diferenciación.
 - Osteogénesis aportada por sus numerosas células madre mesenquimales precursoras de osteoblastos.

- Es seguro y fiable para el paciente, con una mínima incidencia de infección, y la imposibilidad de transmisión de enfermedades.
 - Biocompatibilidad óptima, evitando la respuesta inmunogénica.
 - Económico, ya que no hay gastos de fabricación ni conservación.
- Inconvenientes:
 - Complicaciones en la zona donante: dolor crónico por formación de tejido heterotópico²⁶, fracturas, cicatriz, lesión nerviosa o vascular, pérdidas sanguíneas, hematomas e infección, entre otras^{27, 28}.
 - Mayor tiempo quirúrgico.
 - Reabsorción con el tiempo, en mayor o menor grado, de los autoinjertos libres²⁹.
 - La mayor parte del componente celular no sobrevive tras el trasplante³⁰.
 - Necesidad de equipo médico especializado en el caso de los injertos óseos vascularizados.
 - Reserva ósea limitada para intervenciones quirúrgicas en las que se necesitan grandes cantidades de injerto.

Mención especial en este grupo merece la inyección aislada de médula ósea autóloga extraída por punción directa de la cresta iliaca y seguidamente aplicada en el defecto óseo a reparar, en concreto en los casos de pseudoartrosis atróficas de tibia³⁰.

Otros procedimientos con igual fundamento consisten en la separación por gradiente de densidades de células mononucleadas de la médula ósea, importantes en la remodelación ósea, de otros elementos no deseables como son los hematíes y los polimorfonucleares. Así mismo este proceso puede ser llevado a cabo por filtración de la capa leucocitaria. El material resultante se puede utilizar de forma aislada o en combinación con matrices de diverso origen y características fisicoquímicas³¹.

Hoy en día esta técnica puede llevarse a cabo de forma percutánea como alternativa a la cirugía tradicional, disminuyendo las posibles complicaciones de esta última, y siendo un método simple, seguro, y con buenos resultados³².

Además tiene la ventaja de que, en caso de no producirse la consolidación ósea a pesar del tratamiento, esta técnica no interfiere en estrategias terapéuticas posteriores como sería el uso o aplicación de injertos óseos u otras técnicas reconstructivas³³.

4.2. ALOINJERTOS

Son los injertos procedentes de donantes humanos fallecidos. Al igual que los autoinjertos, se pueden clasificar en corticales, corticoesponjosos o esponjosos.

Hay distintos tipos de aloinjerto según las técnicas de conservación que se aplican:

- A. **ALOINJERTO CONGELADO:** en este caso el hueso se mantiene a -70°C , con lo que disminuye su inmunogenicidad debido a la muerte celular, sin variar con ello sus propiedades mecánicas.³⁴

- B. **ALOINJERTO LIOFILIZADO:** se elimina el agua del tejido congelado y se envasa al vacío. Son los menos inmunogénicos pero empeoran sus propiedades mecánicas y presentan menor capacidad de osteoinducción³⁵. Además, su rehidratación durante la cirugía puede favorecer la presencia de fracturas micro o macroscópicas que disminuirán aún más la resistencia del injerto³⁶.

En cuanto a las ventajas y los inconvenientes generales de los aloinjertos:

- Ventajas:
 - Biocompatibilidad.
 - Ausencia de complicaciones en la zona donante.
 - Menor tiempo quirúrgico.
 - Capacidad conductora gracias a su estructura porosa tridimensional, y capacidad osteoinductora por los factores de crecimiento inmersos en la matriz extracelular.
 - Posibilidad de sustituir grandes segmentos óseos.

- Inconvenientes:
 - Menor capacidad osteogénica por la pérdida celular durante la manipulación recibida tras la extracción.
 - Incorporación más lenta, precisando estabilizaciones más duraderas y resistentes biomecánicamente³⁵.
 - Mayor incidencia de infección y riesgo de transmisión de enfermedades.
 - Elevado gasto económico debido a la necesidad de extraer, procesar, almacenar y transportar el injerto en las condiciones adecuadas.
 - Disponibilidad variable según la cantidad de donantes y el acceso a un banco de hueso.

4.3. MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA (MOD)

Es un material de estructura porosa tridimensional que actúa como andamiaje para el crecimiento óseo, presentando además propiedades osteoinductivas.

Se produce mediante el tratamiento de un aloinjerto con ácido clorhídrico, consiguiendo así extraer la mayoría de los componentes mineralizados y reteniendo las proteínas colagénicas y no colagénicas, que incluyen los factores de crecimiento óseo³⁷.

Por tanto, presenta capacidad osteoinductora pero está desprovisto de resistencia estructural. Esta osteoinductividad será mayor que la de los aloinjertos, debido a la biodisponibilidad de los factores de crecimiento tras su proceso de elaboración.³⁴

La eficacia de la MOD para promover la neoformación de tejido óseo depende de las soluciones empleadas en el procesado, el tiempo de desmineralización, la temperatura empleada, el tamaño de las partículas de matriz y el método de esterilización³⁸.

Además, la MOD requiere de un vector o transportador que puede influir en sus propiedades inductoras según el contacto con el mismo, pudiendo extraer las BMPs con el paso del tiempo o, incluso, cambiar sus propiedades, alterando así la osteoinducción.

La MOD se utiliza por tanto para promover la regeneración ósea en defectos estables, debido a su débil resistencia estructural, asociándose generalmente a otros sustitutos óseos.

INJERTO ÓSEO	Resistencia estructural	Osteoconducción	Osteoinducción	Osteogénesis
AUTOINJERTO				
Esponjoso	No	+++	+++	+++
Cortical	+++	++	++	++
ALOINJERTO				
Esponjoso				
<i>Congelado</i>	No	++	+	No
<i>Liofilizado</i>	No	++	+	No
Cortical				
<i>Congelado</i>	+++	+	No	No
<i>Liofilizado</i>	+	+	No	No
MOD	No	+	++	No

Tabla 1: Comparativa de las propiedades de los distintos injertos óseos.²⁴

5. BIOMATERIALES COMO SUSTITUTOS ÓSEOS

Una alternativa al uso de los injertos óseos es la utilización de materiales biocompatibles de diversa naturaleza capaces de reproducir, en mayor o menor medida, las características del tejido autólogo.

El sustituto óseo ideal debe ser biocompatible, bioreabsorbible, osteoconductor, osteoinductor, estructuralmente similar al hueso, fácil de usar y coste-efectivo. Cumpliendo esos parámetros se han comercializado una gran cantidad de productos disponibles para sus distintas aplicaciones en el campo de la cirugía ortopédica, cirugía oral y maxilofacial.

Estos materiales pueden tener un origen natural o sintético.

5.1. BIOMATERIALES NATURALES

A. **XENOINJERTO:** en general proceden de hueso bovino, porcino o equino, y lleva siendo estudiado desde los años sesenta como potencial sustituto óseo. Precisan una preparación compleja, con desproteinización, eliminación de agentes infecciosos y esterilización mediante radiación gamma; tras esto persiste una tasa variable de proteínas no colagénicas y de colágeno tipo I, pero con conservación de su estructura esponjosa.^{39, 40}

- Ventajas:
 - Biocompatible.
 - Estructura porosa que favorece la osteoconducción.
 - Propiedades mecánicas análogas a las del hueso esponjoso.

- Inconvenientes:
 - Potencialmente inmunogénico.
 - Riesgo de presencia de priones, lo que requiere rigurosos análisis del tejido y tratamientos específicos para eliminar este tipo de agentes infecciosos poco convencionales. Por tanto, sólo puede comercializarse y utilizarse si obtiene previamente la calificación favorable del grupo de expertos de la OMS sobre seguridad microbiológica.⁴¹

B. **COLÁGENO:** es la proteína más abundante en la matriz ósea extracelular. Las matrices de colágeno se podrían incluir en los xenoinjertos, ya que se producen por purificación de colágeno fibrilar bovino (tipo I).

- Ventajas:
 - Biocompatible.
 - Buen osteoconductor, capaz de proporcionar un ambiente favorable tanto física como químicamente para la regeneración ósea⁴².

- Inconvenientes:
 - Baja resistencia a la compresión, menor que la del hueso esponjoso.
 - Potencialmente inmunogénico.

Debido a estas características, está siendo ampliamente estudiado como vector de transporte de BMPs en defectos óseos⁴³.

La incorporación de un compuesto colágeno-cerámica al autoinjerto como suplemento ha obtenido distintos resultados^{44, 45}.

C. CORAL NATURAL: se obtiene a partir del exoesqueleto del coral marino, de los géneros *Porite* y *Goniopora*. El carbonato cálcico del exoesqueleto se transforma en HA mediante procesos realizados a alta presión y temperatura en una solución acuosa de fosfato, permitiendo que el material mantenga su microestructura. Se comercializa en forma de gránulos o bloques. Actualmente se ensayan combinaciones de este material con BMPs.⁴⁶

- Ventajas:
 - Buena osteoconductividad, asegurada por una red porosa tridimensional interconectada, similar a la estructura del tejido óseo esponjoso⁴⁷.
 - Bajo potencial de infección e inmunogenicidad⁴⁸.
- Inconvenientes:
 - Precio elevado.

5.2. BIOMATERIALES SINTÉTICOS

Los biomateriales sintéticos ofrecen una alternativa a los materiales naturales, presentando muchas ventajas, entre las que cabe destacar:

- Reproducibilidad de su creación, debida a una composición química definida.
- Posibilidad de controlar, de manera independiente, sus propiedades mecánicas, su velocidad de degradación y su estructura.

Respecto al último punto es importante destacar la opción de poder dar distintas formas al material, lo que nos permite obtener dispositivos que se ajustan a las características y especificaciones de una lesión en concreto.

Además, la posibilidad de variar la velocidad de degradación del material nos permite individualizar los tratamientos. Ésta es una ventaja de los materiales sintéticos frente a los naturales.

Para tratar de comprender la evolución de los biomateriales y su empleo en la clínica de los últimos 60 años, podemos clasificarlos en tres generaciones, que no representan un orden cronológico sino conceptual⁴⁹; cada generación representa una evolución en los requisitos y las propiedades de los materiales involucrados, pero cada nueva generación no anula necesariamente el uso de las anteriores⁵⁰. De hecho, la investigación actual se encuentra enfocada hacia los materiales que, según sus propiedades, se considerarían de primera o segunda generación.

A. PRIMERA GENERACIÓN: cuando los materiales sintéticos fueron diseñados y desarrollados por primera vez, el único requerimiento era conseguir una combinación adecuada de las propiedades físicas del material con las del tejido reemplazado, con una toxicidad mínima⁵¹.

Los materiales de primera generación son inertes, a fin de reducir al mínimo la reacción a cuerpo extraño. En este grupo se incluyen:

a. MATERIALES METÁLICOS

Los primeros metales utilizados con éxito fueron aleaciones de cromo-cobalto y acero inoxidable. Más tarde se introdujo el titanio y el níquel; sin embargo, el efecto alergénico de este último ha obstaculizado su uso.

- Ventajas:
 - Gran resistencia a cargas

- Inconvenientes:
 - Toxicidad por los iones que se desprenden del implante con su desgaste.
 - Imposibilidad de regeneración del hueso.

b. POLÍMEROS

Su éxito se debe a la gran variedad de composiciones que ofrecen. Destacan el nylon, la silicona, los poliésteres, el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico, el politetrafluoretileno, el polietileno y el polimetilmetacrilato (PMMA), cemento usado tanto de relleno en cirugía tumoral, como de elemento de retención de prótesis articulares. Su uso está ampliamente extendido, formando parte de suturas, componentes de prótesis articulares, cementos óseos, carriers para la

liberación controlada de antibióticos (gentamicina, vancomicina, fluoroquinolonas), etc.

c. CERÁMICAS

Las más comúnmente utilizadas, en esta etapa, son la alúmina (Al_2O_3), y el zirconio (ZrO_2).

Estos materiales tienen un rango limitado de formulaciones para su fabricación.

Su microestructura es altamente dependiente del proceso de fabricación (temperatura máxima, pureza del polvo, tamaño y distribución de los granos así como su porosidad), lo cual tiene un efecto directo en sus propiedades mecánicas y biológicas⁵⁰.

Una de las primeras y principales aplicaciones de las cerámicas fue para sustituir a las clásicas cabezas femorales metálicas de las prótesis de cadera⁵². Después se empezaron a fabricar copas acetabulares, mostrando excelentes resultados, con una buena resistencia a la corrosión, buena compatibilidad y dureza. Esto supuso una gran ventaja sobre los clásicos polietilenos, responsables de reacciones a cuerpo extraño y osteolisis periimplante debidas a su desgaste; sin embargo los componentes cerámicos podían producir fallos tempranos debidos a fracturas en el material.

B. SEGUNDA GENERACIÓN: los materiales de esta generación se caracterizan por ser bioactivos, es decir, han desarrollado la capacidad de interactuar con el entorno biológico, a fin de conseguir una respuesta del mismo que facilite la unión del material al tejido humano; también son materiales bioabsorbibles, sometidos a una degradación progresiva conforme el tejido se regenera.⁵⁰

a. MATERIALES METÁLICOS

Ningún material metálico usado en nuestro campo es bioactivo por sí mismo. Sin embargo se pueden obtener metales bioactivos de dos maneras:

- Cubriendo la superficie del implante con una cerámica bioactiva mediante depósito electroforético, pulverización de plasma, radiofrecuencia, ablación láser, o con compresión isostática en caliente⁵³⁻⁵⁶.
- Modificando químicamente la superficie del material, de tal manera que se consiga el depósito de una cerámica “*in vivo*”, creando enlaces químicos directos entre el substrato y la cubierta⁵⁷.

b. POLÍMEROS

Esta segunda generación se caracteriza por el desarrollo de materiales biodegradables que permiten una descomposición química controlada y la reabsorción de las cadenas de polímeros⁵⁸.

En las últimas décadas estos materiales han sido ampliamente utilizados en ortopedia como sustitutos óseos, así como para la reparación de ligamentos, cartílago, meniscos y discos intervertebrales. Podemos encontrarlos en suturas, clavos, tornillos, pins y placas⁵⁹.

Tienen como ventajas respecto a los materiales metálicos:

- Reducción del stress shielding.
- No son necesarias nuevas cirugías para retirada del material.
- Permiten el diagnóstico por imagen postoperatorio sin crear artefactos como los metales.

c. CERÁMICAS

Dentro de este grupo se incluyen las cerámicas propiamente dichas, los vidrios y las vitrocerámicas. Son biocompatibles y osteoinductoras.

La similitud entre la fase mineral del hueso y la estructura y superficie de estas cerámicas permite, gracias a sus propiedades bioactivas, la unión al hueso sin mediación de una interfase de tejido fibroso⁶⁰.

La HA, el TCP, y sus derivados y combinaciones, son las cerámicas más utilizadas. Dependiendo del proceso de síntesis, estos materiales muestran propiedades físicas y químicas distintas.⁶¹

La HA muestra unas estupendas propiedades bioactivas, pero su estabilidad química reduce su solubilidad en comparación con el TCP, por lo que pueden quedar restos de HA integrados en el hueso nuevo, mientras que el TCP se reabsorbe por completo⁶².

C. TERCERA GENERACIÓN: estos materiales, además de ser bioactivos y bioabsorbibles, son capaces de estimular una respuesta celular específica a nivel molecular en el tejido receptor⁴⁹. Consisten en estructuras porosas tridimensionales que estimulan la invasión, adhesión y proliferación celular, con superficies con secuencias peptídicas que imitan a la matriz extracelular para estimular respuestas celulares específicas⁶³.

La liberación de factores bioquímicos y fármacos, así como el control del comportamiento celular, son algunos campos de estudio abiertos en esta materia.

Los biomateriales de tercera generación se empezaron a emplear al mismo tiempo como implantes para la ingeniería tisular, desarrollándose como alternativa a los trasplantes de tejidos e injertos.

El uso de autoinjertos y aloinjertos, como ya se ha comentado, presenta numerosas limitaciones, como las complicaciones en la zona donante, el riesgo de transmisión de enfermedades, y su variable disponibilidad, entre otras. Es por ello que aparece la ingeniería tisular y la medicina regenerativa con el fin de reparar y regenerar tejidos y órganos, usando para ello vías de señalización naturales y componentes como células, factores de crecimiento y secuencias peptídicas entre otros, en combinación con los implantes.⁶⁴

A ello hay que añadir otros procesos cruciales para la estimulación tisular que debe tener lugar tras la implantación, como son la angiogénesis y la llegada de nutrientes. Así, y aunque la ingeniería tisular ha surgido como una magnífica alternativa a los problemas relacionados con los auto y aloinjertos, su implantación de forma rutinaria es comprometida, dado que la estimulación de la angiogénesis es un tema todavía en estudio. Además, la ingeniería tisular implica la manipulación celular, procedimiento de alta complejidad que se convierte en el mayor inconveniente para su uso extendido en los hospitales.

A pesar de ello, la ingeniería tisular es un proyecto prometedor que abre numerosas posibilidades en la investigación en el campo de la medicina regenerativa.

6. BIOCERÁMICAS

La norma ISO/TR 10993-9 (1994) define una biocerámica como un material cerámico diseñado para lograr un comportamiento fisiológico específico al ser usado en la construcción de prótesis u órganos artificiales internos.

El material cerámico es muy rígido, frágil e insoluble. Su interés ortopédico se debe a que presenta una resistencia al desgaste excepcional con muy buena biocompatibilidad, ya que son los biomateriales más parecidos al componente mineral del hueso. Su uso ha estado limitado por su baja resistencia al impacto por lo que, cuando se quiere aplicar un material que debe soportar una carga importante se tiende a utilizar implantes en su mayoría metálicos, aunque no exentos de complicaciones (la gran diferencia de propiedades mecánicas entre el metal y el hueso, lo que da lugar a rupturas, y la presencia de iones que pueden ser tóxicos o perjudiciales, además de ser causa de dolor). Sin embargo, la mejor comprensión de la tecnología ha supuesto nuevas alternativas para la aplicación de las biocerámicas.

6.1. TIPOS DE BIOCERÁMICAS SEGÚN SU ESTRUCTURA

Atendiendo a su estructura las biocerámicas se pueden clasificar en ⁶⁵:

- A. Sólidos cristalinos:** son las cerámicas propiamente dichas. Hay dos formas de presentación:
- Monocristalina: zafiro.
 - Policristalina: zirconia, alúmina y fosfatos cálcicos.
- B. Biovidrios:** son sólidos amorfos con elevado desorden estructural, totalmente opuestos a las cerámicas propiamente dichas. Se obtienen mediante fusión y enfriamiento rápido, de manera que se consigue una porosidad pequeña.

C. Vitrocerámicas: son sólidos vítreos que han sido enfriados lentamente con la consiguiente nucleación de cristales en su estructura. Dependiendo de la velocidad de enfriamiento se aumenta o disminuye la cantidad de cristales, y por consiguiente se obtienen materiales con propiedades mecánicas a la carta.

6.2. TIPOS DE INTERFASES BIOCERÁMICAS-TEJIDOS

Todos los materiales implantados en un tejido vivo provocan una respuesta en el tejido huésped. Esta respuesta ocurre en la interfase implante-tejido, y depende de muchos factores, entre los que se encuentran⁶⁶:

- **Por parte de tejido:** Tipo, salud y edad del tejido, vascularización tanto del tejido como de la interfase, existencia de movimiento en la misma, estabilidad en la unión y carga mecánica.
- **Por parte del implante:** composición, morfología y porosidad.

Existen cuatro tipos generales de respuesta implante-tejido, resumidas en la tabla 2.

REACCIÓN	CONSECUENCIA
TÓXICA	Necrosis
INERTE	Encapsulación fibrosa
BIOACTIVA	Unión química interfacial
SOLUBLE	Sustitución

Tabla 2: Consecuencias de las interacciones implante-tejido.⁶⁶

Es fundamental que los implantes eviten una **respuesta tóxica** por parte del huésped, que destruya las células de los tejidos circundantes o libere sustancias químicas que puedan migrar por los fluidos tisulares y causar un daño sistémico al paciente. Este tipo de materiales no serían biocompatibles, y por tanto no se considerarían biomateriales.

La respuesta más común en los tejidos ante la presencia de un implante es de tipo inflamatorio, seguida de la **formación de una cápsula fibrosa** con la finalidad de aislar al huésped del implante como mecanismo protector. Esta respuesta es producida, por ejemplo, por los metales, algunos polímeros y dos cerámicas (alúmina y zirconia). En condiciones óptimas se formará una capa fibrosa muy fina.

El tercer tipo de respuesta ocurre cuando se produce una reacción química que da lugar a una unión interfacial entre el tejido y el implante, llamada **interfase bioactiva**. Esta unión evita el movimiento entre ambos, e imita el tipo de interfase que se forma con la reparación natural de los tejidos. Esta interfase requiere que el material tenga una tasa de reactividad química controlada. Una característica importante es que cambia con el tiempo, al igual que lo hacen los tejidos naturales, permaneciendo en un equilibrio dinámico.

Finalmente, cuando los cambios en las interfases bioactivas se producen a una velocidad suficiente el material se **disuelve o reabsorbe**, y es reemplazado por el tejido circundante. Por tanto, un biomaterial reabsorbible debe tener una composición que permita la degradación química por parte de los fluidos corporales, o que posibilite su digestión por los macrófagos. Los productos de degradación resultantes deben ser compuestos no tóxicos que puedan ser desechados sin dañar las células.

El mecanismo de interacción de los tejidos con los implantes está relacionado directamente con la respuesta tisular en la interfase. Existen tres

tipos distintos de biocerámicas según la interacción que producen con los tejidos (Tabla 3).⁶⁷

BIOCERÁMICA SEGÚN LA RESPUESTA DEL TEJIDO	TIPO DE UNIÓN	EJEMPLO
BIOINERTES	Fijación mecánica (morfológica)	Alúmina, Zirconia
BIOACTIVAS	Fijación bioactiva	Cerámicas, biovidrios, vitrocerámicas
BIODEGRADABLES	Sustitución por tejidos	Fosfato tricálcico, sulfato cálcico

Tabla 3: Tipos de unión tisular de los distintos implantes biocerámicos.

- A. Bioinertes:** son las que presentan nula o escasa influencia sobre los tejidos que las rodean. Poseen elevada estabilidad “in vivo”, gran resistencia mecánica, y aceptación biológica óptima, siendo las más conocidas la alúmina y la zirconia.

En ellas se produce un crecimiento periférico de hueso, formando generalmente una interfase o encapsulación fibrosa, de cuyo grosor dependerá la estabilidad de la fijación mecánica. Si existe cierto movimiento en la interfase, la cápsula fibrosa se engrosará y el implante fracasará en su osteointegración, aflojándose o fracturando el implante o el hueso adyacente.

- B. Bioactivas:** son cerámicas con capacidad de interactuar con los tejidos vivos y están diseñadas para estimular o modular la actividad biológica del hueso, aunque sólo en su superficie, estableciendo así, mediante un proceso físico y químico, una continuidad entre el implante y la matriz ósea extracelular. Se incluyen en este grupo cerámicas, vidrios y vitrocerámicas bioactivos.

La bioactividad se basa en su capacidad de formar una capa rica en fosfato cálcico en su superficie al entrar en contacto con un medio biológico. Esta interfase unida al tejido posee gran resistencia a la fractura, de tal manera que la ruptura se produce en el implante o en el hueso, pero casi nunca en la interfase.

La continuidad cerámica-hueso receptor se puede producir por dos procesos⁶⁵ (Figura 13):

- Fijación biológica: el implante cambia su superficie lisa por otra rugosa, y mediante un proceso de biointegración el hueso neoformado penetra en él.
- Fijación bioquímica: consiste en la formación de un enlace bioquímico entre el biomaterial y el hueso.

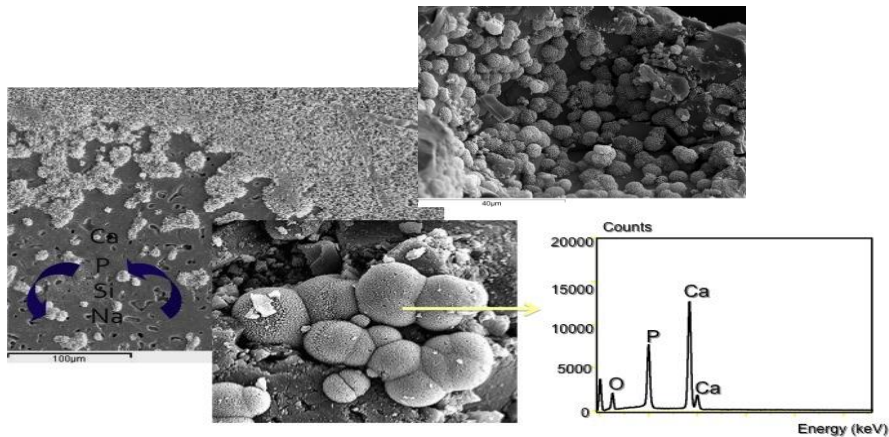


Figura 13: Microfotografía de SEM en la que se observa una capa de apatita neoformada sobre la superficie de la cerámica. Espectro obtenido con microanálisis por Espectrómetro de Dispersión de Energía (EDS) de la misma. (Magnificación, barra 100 μm)

C. Biodegradables o reabsorbibles: son cerámicas que se degradarán gradualmente y serán sustituidas por el hueso reactivo, proceso también conocido como bioabsorción. Forman parte de este grupo el TCP en sus formas activas, y el sulfato cálcico hemihidratado (yeso de París).

Este tipo de biocerámicas serían las ideales, ya que permanecen en el cuerpo sólo mientras es necesaria su función, desapareciendo conforme el tejido se regenera. Su gran inconveniente es que su resistencia también disminuye durante el proceso de reabsorción. Por tanto, lo más controvertido de su uso es la dificultad que conlleva conocer el tiempo que el material debe mantener su resistencia en el defecto óseo del huésped, ya que la velocidad de reabsorción del material tiene que ser concordante con la regeneración tisular en el organismo, la cual es muy variable (Figura 14).

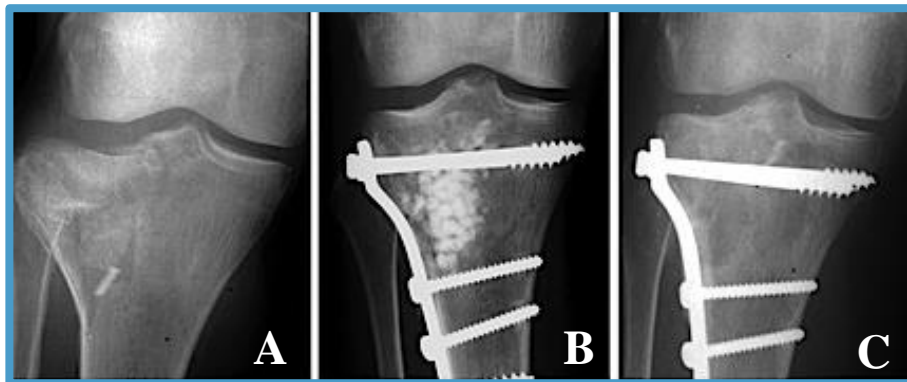


Figura 14: Imagen radiológica de un caso de fractura hundimiento de meseta tibial externa (A) con implantación metafisaria de una biocerámica de mayor densidad radiológica (B), y reabsorción de la misma y sustitución por hueso neoformado (C).

6.3. TIPOS DE BIOCERÁMICAS SEGÚN SU APLICACIÓN

Se pueden clasificar en ⁶⁸:

- A. **Estructurales:** son biocerámicas de elevada resistencia mecánica y generalmente bioinertes, como la alúmina. Son utilizadas en el diseño de prótesis articulares, principalmente como componente de la cabeza femoral.
- B. **No estructurales:** son generalmente biocerámicas bioactivas o reabsorbibles, con bajas resistencias mecánicas, ya que no tienen que soportar grandes cargas. Ejemplos típicos son la HA y el TCP. Se aplican como sustitutos óseos en forma de gránulos, bloques o cementos.

6.4. TIPOS DE BIOCERÁMICAS SEGÚN LAS CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL

Encontramos cuatro subtipos ⁶⁹:

- A. Densas inertes:** presentan una porosidad nula, por lo que su unión al hueso es morfológica y se realiza, bien por crecimiento del tejido en la superficie irregular del implante, bien por unión a través de un cemento, o por acoplamiento a presión del implante en el defecto. Un ejemplo es la alúmina monocristalina o policristalina.

- B. Porosas inertes:** la unión al hueso es mecánica y la fijación biológica, ya que se produce un crecimiento del hueso a través de los poros del implante. Ejemplo típico es la alúmina policristalina porosa.

- C. Densas o porosas bioactivas:** la unión al hueso es de tipo químico y la fijación bioactiva. A este grupo pertenecen la HA, los biovidrios y las vitrocerámicas bioactivas.

- D. Densas reabsorbibles:** el implante es reemplazado lentamente por el tejido óseo neoformado. Ejemplos típicos son el TCP y el sulfato cálcico.

7. BIOMATERIALES EN EL SISTEMA FOSFATO TRICÁLCICO – SILICATO DICÁLCICO

7.1. FOSFATO TRICÁLCICO

Actualmente los fosfatos cálcicos son utilizados como cementos óseos y como cerámicas bioactivas y biodegradables, ya que son los candidatos idóneos para su utilización como andamios o “scaffolds” en la regeneración ósea.

Desde el punto de vista químico, el fosfato tricálcico se designa como C_3P ($3CaO \cdot P_2O_5$), pero en la literatura aparece indistintamente en numerosas ocasiones como C_3P y/o TCP^{70, 71}.

Este compuesto presenta tres polimorfos, conocidos como fases β , α y α' , de menor a mayor temperatura de estabilidad respectivamente. De ellas, sólo la β y la α se utilizan como biomaterial, dado que la α' no puede mantenerse estable a temperatura ambiente. El α TCP estructura monoclinica, mientras que el β TCP tiene estructura romboédrica y puede ser compactado mejor en un defecto óseo. Además, el β TCP tiene una densidad de empaquetamiento menor, lo que hace que la tasa de reabsorción sea más rápida que la del α TCP⁷².

La mayoría de los TCP comercializados son los β , ya que su resistencia a las fuerzas de tracción y compresión es similar a la del hueso esponjoso. Sin embargo, son más débiles y frágiles a las fuerzas de cizallamiento.⁷³

El TCP se disuelve por reabsorción y fragmentación a los 6-18 meses. La reabsorción ocurre vía osteoclastos, junto a una reacción inflamatoria con células gigantes, siendo menor el volumen óseo producido que el volumen de

TCP reabsorbido. Su tasa de reabsorción es, además, más rápida que la de la HA.⁷⁴

Además, en estudios de TCP como sustituto óseo se ha demostrado que son más estables y su estabilidad es más reproducible que la de los aloinjertos⁷⁵.

7.2. SILICATO DICÁLCICO

Desde el descubrimiento del Bioglass por Hench y sus colaboradores en los años 70^{76,77}, varios tipos de vidrios y vitrocerámicas de silicato, tales como los vidrios bioactivos y las vitrocerámicas AW, han sido investigados como posibles biomateriales para la reparación y sustitución ósea. Los resultados de dichas investigaciones muestran que los biomateriales que contienen CaO y SiO₂ presentan una excelente bioactividad y poseen la capacidad de unirse al hueso vivo y a los tejidos blandos⁷⁸. Además, los estudios realizados por Liu y col. han demostrado que el silicato dicálcico en forma de recubrimiento por plasma en sustratos de aleaciones de titanio presenta una buena bioactividad⁷⁹. También el C₂S es una fase importante del cemento Portland, modificado a MTA (Mineral Trióxido Agregado) para prótesis cementadas, ampliamente utilizado en odontología^{80,81}.

7.3. SISTEMA Ca₂SiO₄ – Ca₃(PO₄)₂

El sistema binario Silicato dicálcico (Ca₂SiO₄ – C₂S) – Fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂ – TCP) se estudió por primera vez en 1887 por Stead y Ridsdale⁸², cuando la Silicocarnotita fue descrita como componente de la escoria, y fue estudiado por primera vez mediante difracción de rayos de alta temperatura en 1959 por Nurse y col.⁸³.

Estos autores identificaron dos compuestos intermedios: $2 \text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, llamado “la fase de Nurse A”, y $\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, llamado Silicocarnotita. Por debajo de la zona de líquidos encontraron una solución sólida continua de alta temperatura para cualquier proporción dada de $\text{Ca}_2\text{SiO}_4 / \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($R_{ss} = \alpha\text{C}_2\text{S} - \alpha' - \text{TCP}$). Posteriormente dicho diagrama fue modificado por Fix y col.⁸⁴, incluyendo cambios importantes en cuanto a la extensión de los campos de solución sólida:

- La fase A_{ss} funde congruentemente en lugar incongruente.
- El campo de la Silicocarnotita es más estrecho que como se había descrito anteriormente.
- El punto eutectoide Silicocarnotita-TCP también se modifica.
- Se define el campo de la metaestabilidad (a temperatura ambiente) de la solución sólida $(\alpha\text{C}_2\text{S} - \alpha' - \text{TCP})_{ss}$ llamado R, el cual modifica notablemente el diagrama originalmente propuesto por Nurse.

Más recientemente dicho diagrama ha sido modificado por Rubio y col.⁸⁵, por Martínez y col.⁸⁶ y Ros-Tárraga y col.⁸⁷, realizándose revisiones parciales de dicho sistema y modificándose los puntos invariantes eutectoides de los subsistemas $\text{C}_2\text{S} - \text{Fase A}$, Silicocarnotita – TCP.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El uso de cerámicas dentro del sistema binario fosfato tricálcico - silicato dicálcico puede constituir un método eficaz para mejorar las funciones de las cerámicas de fosfato cálcico por las razones siguientes:

- La presencia de iones de silicio en el material mejora la bioactividad del compuesto.
- La liberación iónica de silicio al medio biológico facilita la osteopromoción celular a través de la activación de células osteoprogenitoras mesenquimales ubicadas en el estroma de la medula ósea hematopoyética.
- La formulación $\text{Ca}_7(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)_2 - \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$, propuesta para este estudio, optimiza su función como soporte o andamio, para dirigir el crecimiento óseo centrípeto y la colonización del material por tejido óseo neoformado, actuando como un sustituto del injerto óseo.

2. OBJETIVOS

2.1. GENERALES

En este trabajo nos planteamos diseñar, sintetizar y caracterizar “*in vivo*” en un modelo animal, un material cerámico poroso bifásico de composición Nurse A ($\text{Ca}_7(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)_2$)- Silicocarnotita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2 \text{SiO}_4$) dentro del sistema binario fosfato tricálcico - silicato dicálcico con vistas a su potencial aplicación clínica como sustituto del injerto óseo autólogo en el campo de la cirugía reconstructiva ósea, y con ello dar solución a algunos problemas clínicos planteados anteriormente.

2.2. ESPECÍFICOS

1. Realizar la caracterización física, química y mineralógica del nuevo compuesto desarrollado objeto de estudio.
2. Determinar si el compuesto cerámico/andamio cumple de modo permanente, desde su implantación intraósea en tibias de conejo, y durante todo el proceso de biodegradación, los criterios de biocompatibilidad.
3. Estudiar los cambios físicos y químicos experimentados por el material, y determinar el grado de reabsorción del compuesto en el transcurso del experimento, así como los acontecimientos biológicos que se presentan tanto en la interfase hueso huésped-compuesto, como en el interior del mismo.
4. Evaluar la cantidad y calidad de la regeneración ósea (neoformación ósea), conseguida por la presencia del compuesto en los diferentes periodos de estudio establecidos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. COMPUESTO NURSE A – SILICOCARNOTITA DENTRO DEL SISTEMA FOSFATO TRICÁLCICO – SILICATO DICÁLCICO (TCP-C₂S)

Elegimos este compuesto debido a que el TCP es el material para implantes más conocido entre los compuestos de fosfato de calcio. Se utiliza en cerámicas de sustitución ósea, recubrimientos de prótesis metálicas, cementos y materiales compuestos. Se trata de un material que presenta bioactividad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, osteoconductividad y osteoinductividad. Todo ello le confiere la consideración como candidato óptimo para su uso como andamiaje en el proceso de la regeneración ósea.⁸⁸

Por otro lado, los ensayos realizados por Hench et al⁷⁷ en la década de los 70 han permitido afirmar que aquellos biomateriales con contenido en CaO y SiO₂

muestran un importante nivel de bioactividad y poseen la capacidad de adherirse tanto al hueso como a tejidos blandos, al mismo tiempo que promueve el proceso de osteogénesis y mejora el comportamiento del material “*in vivo*”. Es por ello que se ha escogido el C₂S, siendo éste ampliamente utilizado como componente de cementos óseos y cementos dentales (MTA).

Las proporciones de cada compuesto fueron elegidas basándonos en los resultados obtenidos en un estudio “*in vitro*” anterior realizado por nuestro grupo de investigación⁸⁹.

A. MATERIALES PRECURSORES

Las materias primas empleadas en el estudio fueron α -fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) [TCP] y silicato dicálcico (Ca₂SiO₄) [C₂S] previamente sintetizados en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández (Elche).

El α -TCP se sintetizó mediante reacción en estado sólido a partir de una mezcla estequiométrica de hidrógeno fosfato de calcio (CaHPO₄, Panreac) y carbonato de calcio (CaCO₃, Fluka), con un tamaño corpuscular medio de < 50 μ m, y un cociente Ca/P de 1.60. La mezcla se calentó en un crisol de platino a 1000 °C durante 12 horas, tras lo cual se enfrió lentamente. El material obtenido se caracterizó por difracción de rayos X (XRD).

El C₂S se obtuvo mediante reacción en estado sólido de una mezcla compuesta de carbonato de calcio (CaCO₃ > 99.0 wt%, Fluka) con un tamaño medio de partícula de 13.8 μ m, y sílice (SiO₂ > 99.7 wt%, Strem Chemicals) con un tamaño medio de partícula de < 50 μ m.

Como primer paso, el SiO₂ fue molido en un molino mezclador de laboratorio (MM 301-Retsch) usando bolas parcialmente estabilizadas con

zirconia y alcohol isopropílico como medio de suspensión. El polvo resultante se secó y se tamizó a $< 50 \mu\text{m}$. El tamaño medio de partícula final de SiO_2 , medido por difracción de rayos láser (dispositivo Mastersizer 2000E – Malvern), fue de $40 \mu\text{m}$.

A continuación se pesaron las proporciones deseadas de cada componente en una balanza analítica, y se realizó una mezcla húmeda en un molino mezclador empleando las bolas de zirconia mencionadas anteriormente. Tras ser molida, la mezcla se dejó secar y se calentó a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas para eliminar el CO_2 . El polvo resultante fue prensado isostáticamente a 200 MPa y calentado a $1525 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas, con una velocidad de calentamiento de $8,3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, seguido de un enfriamiento lento hasta temperatura ambiente mediante apagado del horno. El material obtenido fue molido y se caracterizó por XRD.

Se preparó una mezcla con un $45 \text{ wt}\%$ de C_2S y un $55 \text{ wt}\%$ de TCP. En primer lugar, los polvos de TCP y C_2S fueron molidos hasta un tamaño de partícula de $\sim 60 \mu\text{m}$, se pesaron las proporciones deseadas de cada componente en una balanza analítica, y se mezclaron con bolas de zirconia. Tras secarlas, las muestras fueron prensadas isostáticamente en barras de 200 MPa . Las pastillas obtenidas de las barras se pusieron en pequeñas láminas de crisoles de platino, que fueron suspendidas de un alambre de platino en la zona caliente de un horno eléctrico con control electrónico de temperatura ($\pm 1^\circ\text{C}$). Las pastillas se calentaron hasta $1550 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un periodo total de 6 días, con enfriamiento en nitrógeno líquido, molienda, prensado, y recalentado cada 24 horas.

El paso final de la preparación consistió en un enfriamiento en dos pasos. En primer lugar, el enfriamiento de la muestra desde $1550 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $512 \text{ }^\circ\text{C}$ dentro del horno, manteniendo esa temperatura durante 24 horas, seguido de un enfriamiento lento hasta temperatura ambiente a una velocidad

de 3 °C/min. Este tratamiento en dos fases es necesario para asegurar que se hayan alcanzado las condiciones de equilibrio.

B. PREPARACIÓN DEL IMPLANTE

El material de silicofosfato cálcico fue triturado, y el polvo resultante fue molido en un molino de atrición usando bolas de zirconia y óxido de itrio de 1 mm de diámetro en medio alcohólico (alcohol isopropílico), durante 4 horas. Las partículas resultantes tenían un tamaño de 2,1 μm , medidas con un equipo de difracción láser.

Se preparó una suspensión cerámica con un 60% de contenido sólido en un medio acuoso, añadiendo como defloculante con 1 wt% Dolapix CE-64 (Zschimmer Schwarz, Alemania) y como aglutinante con 3 wt% Optapix PAF-35 (Zschimmer Schwarz, Alemania). La relación polvo/agua fue de 60/40.

Los implantes se prepararon usando como plantilla esponjas de poliuretano con celdas abiertas (60 ppi). Las esponjas se impregnaron con la suspensión cerámica, dejándose secar durante una hora. La sinterización se llevó a cabo a 1450 °C durante dos horas con un ritmo de calentamiento y enfriamiento de 5 °C/min. Las muestras se dejaron enfriar en el horno durante 24 horas.

Finalmente, se cortaron los implantes en forma de cilindros de 6 mm de longitud y 4.5 mm de diámetro (Figura 15), se eliminaron los restos de su superficie mediante chorro de aire a presión, seguidamente fueron lavados en una solución tamponada de PBS y secados en estufa a 37 °C. Por último, las piezas se envasaron de forma individualizada para su esterilización mediante gas-plasma de peróxido de hidrógeno a baja temperatura (Sterrad® 100S, Alemania).



Figura 15: Aspecto macroscópico de los cilindros del compuesto TCP-C₂S.

C. CARACTERIZACIÓN

La caracterización del material, así como de la esponja, se llevó a cabo en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández (Prof. P. de Aza).

Dicha caracterización se llevó a cabo a distintos niveles:

- **Caracterización física**: mediante porosimetría de mercurio (Poremaster, Quantachrome, USA).
- **Caracterización química**: mediante fluorescencia de rayos X (MagiX Super Q Version 3.0 – Philips, Almelo, The Netherlands).
- **Caracterización minearológica**: mediante microscopía electrónica de barrido (SEM – Hitachi S-3500N, Ibaraki, Japan), microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDS – Inca, Oxford, UK) y difracción de rayos X (XRD – Bruker AXS D8-Advance, Karlsruhe, Germany).

1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado 16 conejos albinos de raza Nueva Zelanda (Figura 16), con un peso inicial comprendido entre 3.500 y 4.000 g., y 17-18 semanas de edad para asegurar el cierre fisario (esqueléticamente maduros).

Los animales eran de ambos sexos, ya que no se han descrito diferencias en cuanto a metabolismo óseo⁹⁰, y fueron suministrados por la granja de San Bernardo (Pamplona).



Figura 16: Conejo albino de raza Nueva Zelanda.

Los criterios seguidos para la elección de esta especie y raza han sido:

1. Bajo costo.
2. Docilidad y facilidad de mantenimiento.
3. Adecuado tamaño de su esqueleto a las necesidades del estudio.
4. Elevado metabolismo óseo, que permite estudios en cortos periodos de tiempo.
5. Resistencia a procesos infecciosos.
6. Animal muy utilizado en otros estudios, lo que permite comparar los resultados con los trabajos realizados por otros autores.

La identificación de los animales se realizó mediante numeración en la oreja con tatuador electrónico Dermotrón[®]. Esta numeración quedaba reflejada junto al nombre del investigador y el número de jaula en el libro de registro.

Cinco días antes de la intervención, los animales fueron depositados en el Animalario de la Universidad de Murcia (SAI; N° REGAES 300305440012), para su aclimatación siguiendo las pautas indicadas en la legislación vigente (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia). Para ello, los animales se colocaron de forma individual en sus respectivas jaulas de 60 x 60 x 60 cm), comenzando así el periodo de adaptación, en condiciones de temperatura estable entre 20-21 °C, fotoperiodo luz-oscuridad de 12h/12h, ruido máximo de 55 dB, iluminación 350 lux/m², y humedad relativa del aire constante (45-65%) adaptadas a esta especie, siendo estos parámetros controlados y registrados diariamente por el personal del centro.

Se les alimentó con una dieta completa de mantenimiento estándar para conejos (PANLAB[®], Barcelona), con acceso libre a agua y comida.

Las cirugías se realizaron en un quirófano de cirugía experimental convencional para pequeños animales del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, separado convenientemente de las áreas de rasurado, almacén de material quirúrgico, área de despertar, y vigilancia postoperatoria, según la normativa de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación (86/609/CEE). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la normativa de la UE (BOE 223/1988 y 265/1990) para la manipulación de animales de experimentación.

2. MÉTODOS

2.1. PLANIFICACIÓN

Para llevar a cabo este estudio los animales fueron distribuidos de modo aleatorio en cuatro grupos de evolución (Grupo I, Grupo II, Grupo III y Grupo IV) correspondientes a cada uno de los periodos de estudio establecidos (1, 3, 5 y 7 meses, respectivamente). Cada grupo estaba constituido por cuatro animales (n=4).

- Grupo I (n=4): 1 mes.
- Grupo II (n=4): 3 meses.
- Grupo III (n=4): 5 meses.
- Grupo IV (n=4): 7 meses.

La cirugía se realizó en ambas tibias. Se seleccionó la tibia derecha para llevar a cabo el defecto óseo para implantar el material objeto de estudio, y la tibia izquierda para realizar el defecto óseo control (sin material). De este modo pudimos obtener en cada periodo de estudio (Figura 17):

- Cuatro muestras óseas que contenían implantado el material TCP-C₂S.
- Cuatro muestras portadoras del defecto control (desprovistas de material).

No obstante sólo se incluyeron en el estudio tres de ellas por periodo, conservando la cuarta como reserva ante un imprevisto que obligara a retirar a algún animal del estudio.

Todos los animales utilizados en el estudio sobrevivieron hasta el momento del sacrificio, no observándose en ellos complicaciones locales o sistémicas en el periodo postoperatorio relacionadas con la cirugía que pudieran ser motivo de su exclusión del estudio.

Finalizado cada uno de los periodos de estudio citados los animales fueron sacrificados para extraerles los 2/3 proximales de ambas tibias que contenían el implante y el orificio control. En el mismo acto y mediante una laparotomía media supra-infraumbilical se abordó el interior de la cavidad abdominal y se procedió a la extracción de las biopsias de órganos (riñón, hígado, pulmón y ganglios linfáticos regionales y paraaórticos) para estudio morfológico microscópico, con el fin de determinar la presencia o ausencia de productos de degradación del material implantado durante los periodos de estudio.

A todas las piezas extraídas, y una vez desprovistas de partes blandas adheridas, se les realizó en primer lugar el estudio radiológico mediante radiología simple y micro-tomografía computerizada (micro-TC) con la intención de conseguir una mejor definición de las imágenes. Posteriormente, estas mismas piezas fueron procesadas en fresco sin descalcificar (inclusión en glicometacrilato) para estudio anatomopatológico e histomorfométrico.

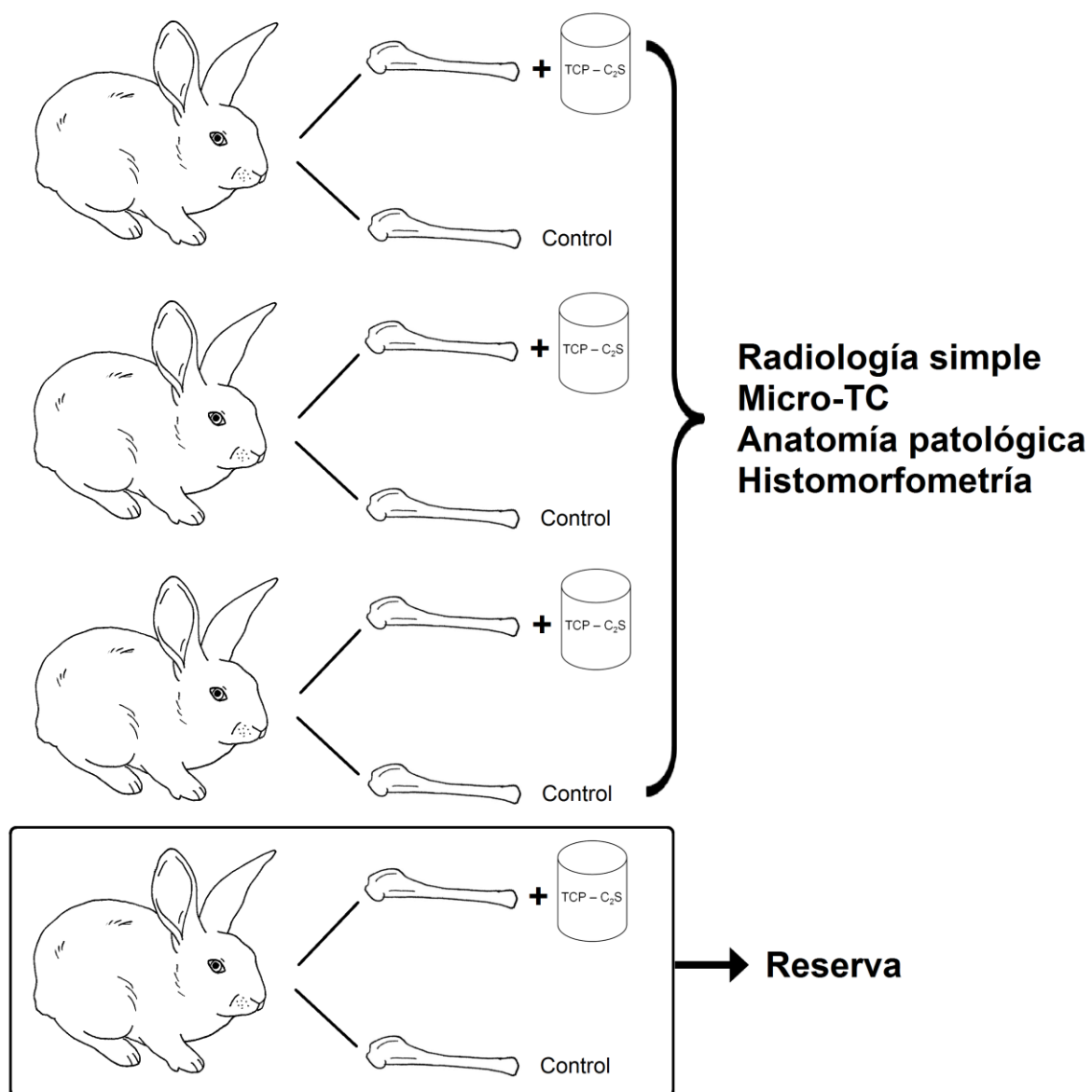


Figura 17: Representación gráfica de cada grupo de estudio. Elaboración propia.

2.2. MÉTODO ANESTÉSICO

Basándonos en los procedimientos anestésicos aplicados en similares estudios con este tipo de roedores realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación ⁽⁹¹⁻⁹⁵⁾, se aplicó el protocolo establecido por ellos, consiguiendo mínima toxicidad hepática o renal, fácil eliminación, alto margen de seguridad y mínimos efectos secundarios.

Este protocolo se basa en los siguientes principios farmacológicos:

A. PREMEDICACIÓN

- **Sulfato de Atropina** (0.3 mg/kg por vía intramuscular.): se emplea para reducir la secreción excesiva de las vías respiratorias altas, la motilidad intestinal y la bradicardia producidas por ciertos agentes anestésicos. No obstante, es preciso tener en cuenta que un 30% de estos roedores son portadores de una seroatropinasa que reduce los efectos de la atropina.
- **Hidrocloreuro de clorpromacina** (10 mg/kg por vía intramuscular): su uso permite reducir la dosis de agentes anestésicos, sobre todo barbitúricos, proporcionando una buena relajación muscular y reduciendo la ansiedad del animal. Con esta premedicación conseguimos un efecto sedante a los 10-15 minutos de su administración.
- **Profilaxis antibiótica:** Amoxicilina (0.1 ml/kg por vía intramuscular), administrada en monodosis 30 minutos antes de la intervención.

Una vez premedicado el animal, se procedió a rasurar las patas traseras a intervenir, en una zona comprendida entre el tercio proximal y el tercio distal de la extremidad.

B. INDUCCIÓN ANESTÉSICA

- **Clorhidrato de Ketamina** (50 mg/kg por vía intramuscular): se trata de un hipnótico de acción rápida y un potente analgésico, de escasa acción como relajante muscular que se potencia con la clorpromacina. No produce depresión respiratoria, no tiene efectos acumulativos y presenta un buen margen de dosificación. Se consigue una acción anestésica suficiente para la cirugía a los 15-20 minutos de su administración.

C. MANTENIMIENTO

- **Clorhidrato de Ketamina** (20 mg/kg por vía intramuscular): administración a demanda ante el menor signo de agitación del animal.

D. ANALGESIA POSTOPERATORIA

- **Hidrocloruro de mepivacaína (1%)**: 5 mg/kg inyectada localmente tras el cierre de la herida quirúrgica.
- **Hidrocloruro de buprenorfina**: 0,3 mg/kg por vía intramuscular antes de la cirugía y los tres días posteriores.

E. REVERSIÓN O DESPERTAR

Tras finalizar la cirugía, los animales se depositaron en sus respectivas jaulas, evitando manipulaciones intempestivas en las primeras horas tras la intervención. Esta fase se realizaba de forma suave y espontánea, sin precisar medicación adicional.

No se apreciaron complicaciones ni efectos tóxicos, consiguiendo un despertar suave y progresivo de los animales.

2.3. MÉTODO QUIRÚRGICO

Se seleccionó como área idónea para alojar el implante el nivel metafisario proximal de la tibia, de modo que todo el volumen del implante queda rodeado de tejido óseo después de su implantación. Para evitar variaciones del lugar para llevar a cabo el defecto óseo y unificar la zona anatómica de implantación, se tomó como referencia anatómica la tuberosidad tibial anterior (Figura 18).



Figura 18: Metáfisis proximal de tibia e implante superpuesto.

Se eligió un abordaje anteromedial para acceder a la zona metafisaria de la tibia por ser poco traumático, evitando pérdidas sanguíneas y descensos importantes de la volemia que pudiesen derivar en la formación de grandes hematomas, con posibilidad de infección local y, en el peor de los casos, en la muerte del animal.

A. PREPARACIÓN DEL CAMPO QUIRÚRGICO

La asepsia del campo quirúrgico se consiguió aplicando povidona yodada al 10%. A continuación se aisló la zona mediante un paño fenestrado estéril, dejando expuesta únicamente el área a intervenir (Figura 19).



Figura 19: Preparación del campo quirúrgico, dejando expuesta la zona distal del fémur y la proximal de la tibia.

B. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

La superficie ósea se abordó mediante una incisión cutánea directa de unos 20 mm, tomando como referencias anatómicas los relieves anterior y posterior de la tibia proximal y la rótula (Figura 20). Seguidamente se realizó una desperiostización cuidadosa hasta exponer el área para realizar el defecto óseo.



Figura 20: Abordaje medial de la tibia proximal.

A continuación, con ayuda de un punzón de 2 mm de diámetro procedimos a marcar el punto de entrada de las brocas para realizar el defecto. Utilizando brocas sucesivas de 3.2 mm y 4.5 mm de diámetro montadas en un mango en T, se perforó la cortical medial sin llegar a lesionar la cortical lateral, creando de esta forma un defecto óseo contenido que facilitó la estabilidad del material implantado en el lecho receptor (Figura 21).

Una vez conseguido el lecho apropiado (Figura 22), se realizó un lavado abundante con suero fisiológico, procurando eliminar las partículas óseas producidas durante la perforación del hueso.



Figura 21: Brocado del defecto óseo.



Figura 22: Defecto óseo.

Posteriormente, el defecto óseo se rellenó con el implante (Figura 23) o permaneció vacío, según fuese o no un sujeto control.



Figura 23: Defecto óseo con el implante ya colocado en tibia.

A continuación, la zona intervenida se lavó repetidas veces con solución salina y se procedió a realizar un cierre cuidadoso de la herida siguiendo los planos anatómicos, comenzando con el periostio con puentes sueltos de Coated Vicryl[®] 3/0, y por último del plano cutáneo con sutura continua con Vicryl rapide[®] 3/0.

Finalmente, tras el lavado de la herida, se volvió a aplicar el antiséptico povidona yodada y un apósito plástico en aerosol del tipo Nobecutan[®].

2.4. EUTANASIA. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Una vez finalizados los distintos periodos de estudio (1, 3, 5 y 7 meses), se procedió al protocolo de eutanasia de los animales mediante administración intracardiaca de una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg) Dolethal® (Lab. Vetoquinal. Cedex. Francia), previa sedación profunda.

Tras comprobar la muerte del animal, se realizaron abordajes quirúrgicos ampliados en tibias de la misma forma que los realizados para la implantación de los materiales (Figura 24), así como un abordaje central abdominal para obtener las biopsias de las vísceras.

A continuación se desprendieron las partes blandas adheridas a la superficie de la metáfisis proximal y se extrajo el segmento tibial mediante una osteotomía transversal perpendicular al eje longitudinal utilizando una sierra oscilante (Figura 25). En este mismo momento, se procedió a la toma de biopsias de ganglios linfáticos regionales y paraaórticos, hígado, riñón y pulmón.



Figura 24: Abordaje quirúrgico ampliado de la cara anterior de la rodilla para extracción de muestras.



Figura 25: Muestra de tibia desprovista de partes blandas. Restos en superficie del material implantado (flecha).

2.5. ESTUDIO CON RADIOLOGÍA CONVENCIONAL

Las imágenes radiológicas se obtuvieron mediante técnica mamográfica. Para ello se empleó un equipo Mammodiagnost UC[®] (Philips, Madrid) con película Kodak Min-R Screen[®] (Kodak Madrid), realizándose radiografías óseas iniciales con 32 kV, 40 mA, foco grueso y exposimetría automática sin rejilla antidifusora, ya que se ha utilizado técnica de manipulación con efecto GAP. (Figura 26)

Posteriormente se obtuvieron las imágenes en película fotográfica Elite Kodak para diapositivas (Kodak[®] Madrid) y se digitalizaron con un escáner de diapositivas Epson film-scan 2000 (Epson[®], Madrid) que facilitó su estudio en formatos BMP y JPG.



Figura 26: Equipo Mammodiagnost UC[®] (Philips, Madrid) empleado en la realización de las radiografías óseas.

2.6. ESTUDIO CON MICRO-TOMOGRFÍA COMPUTERIZADA

Las muestras óseas fueron escaneadas usando un micro-TC de alta resolución (Skyscan 1172[®], Bruker microCT NV, Kontig, Bélgica). La fuente de rayos X se fijó en 80 kV y 124 μ A, con un tamaño de píxel de 12 μ m y empleando un filtro de aluminio de 1 mm. La muestra ósea se colocó en una plataforma central y fue escaneada en sus 360°, adquiriendo imágenes cada 0,4°.

Tras ser escaneadas, las imágenes fueron reconstruidas basándonos en el algoritmo de Feldkamp (Donath y Breuner, 1982), usando el software NRcon (Bruker microCT NV, Kontig, Bélgica). Las imágenes reconstruidas fueron evaluadas mediante el software Data Viewer (Bruker microCT NV, Kontig, Bélgica) y posicionadas para asegurar que el biomaterial implantado se veía con su forma cilíndrica.

Una vez que las imágenes se colocaron en posición se realizó el análisis de datos. En primer lugar el volumen de interés (VOI) fue seleccionado señalando los márgenes inicial y final del material en el eje longitudinal, dibujando a mano los márgenes laterales para eliminar los tejidos blandos circundantes al material. Posteriormente las imágenes fueron segmentadas usando métodos de adaptación local del umbral y seleccionando los mejores parámetros umbrales tanto para el hueso (Figura 27) como para el material en cada muestra (Figura 28). Finalmente se realizó un análisis de las propiedades del material, analizando la calidad ósea mediante los índices estandarizados para la determinación de la microestructura del hueso esponjoso (Hildebrand y cols, 1999).

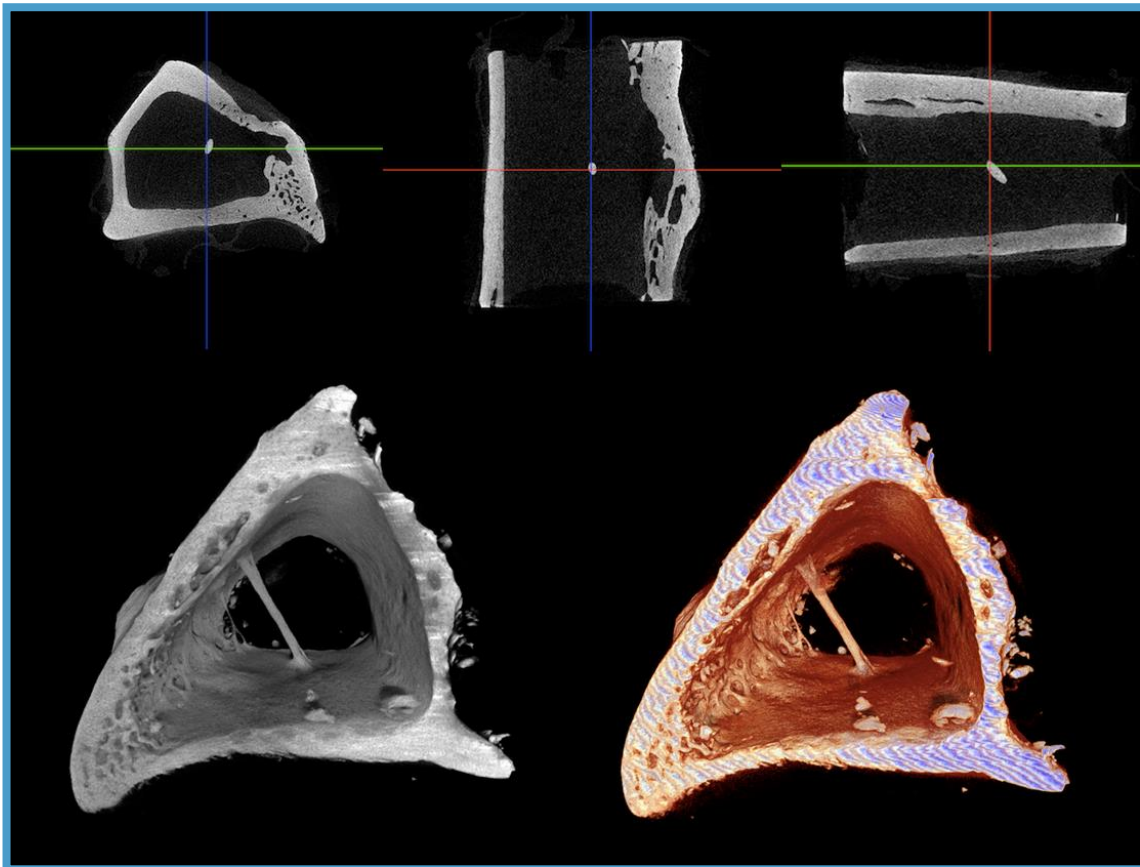


Figura 27: Estudio del defecto óseo artificial producida en los huesos controles para la determinación de superficies y volúmenes mediante la técnica de micro-TC.

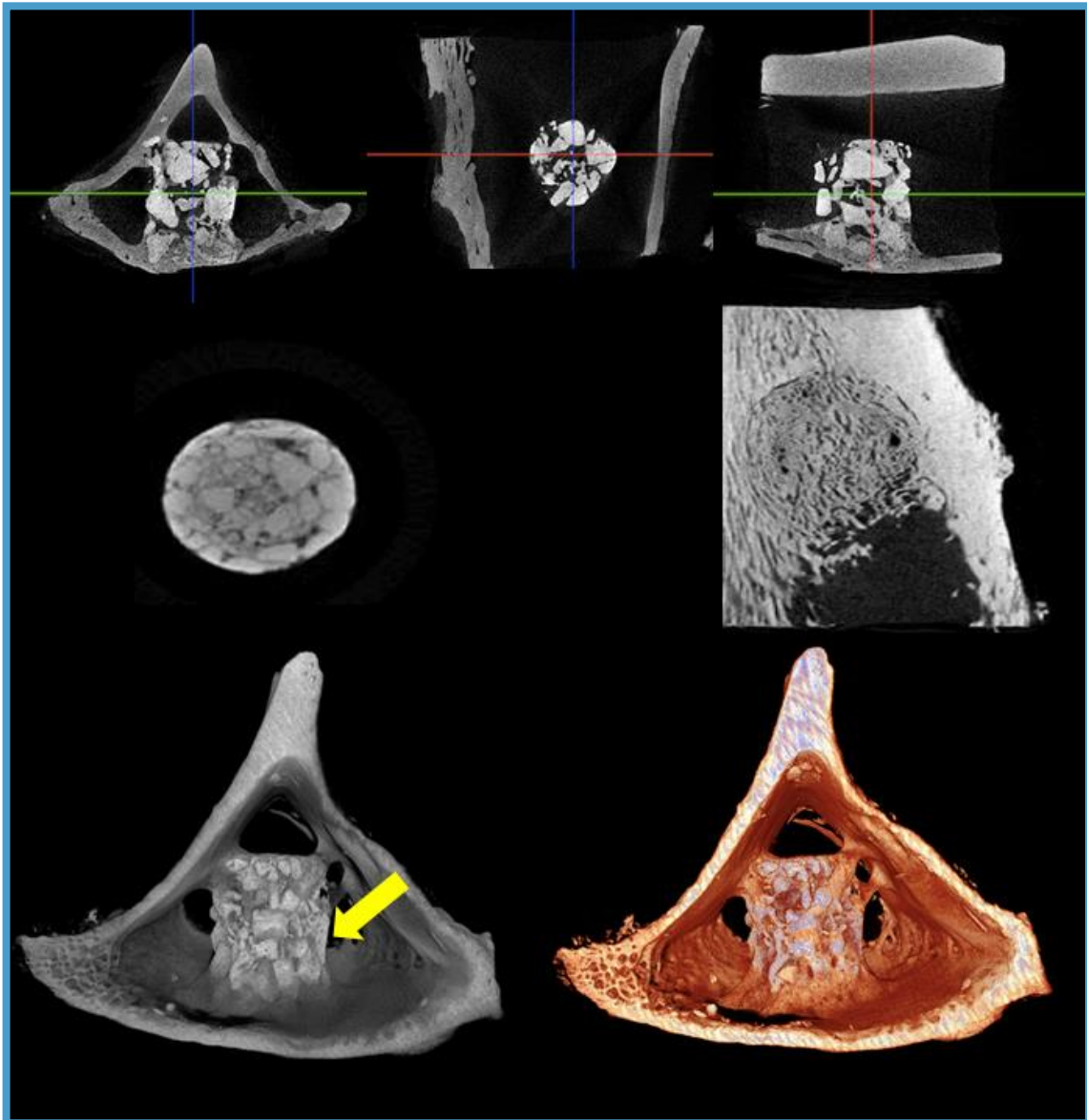


Figura 28: Estudio del implante (flecha) en el defecto óseo artificial producido en tibias, para la determinación de superficies y volúmenes mediante la técnica de micro-TC.

Para la evaluación del material implantado y del crecimiento óseo dentro del mismo, los parámetros que se han estudiado son los siguientes:

- **BV del material:** es la extensión del mismo en mm^3 .
- **BV/TV del material:** es el porcentaje del VOI que está ocupado por el material.
- **BV del hueso:** el volumen de hueso que hay dentro de los límites de la ROI (Región de Interés) en mm^3 .
- **BV/TV del hueso:** es el porcentaje del VOI que está ocupado por el hueso.

Además se han evaluado las características del material, prestando especial atención a la porosidad:

- **Po.N (cl):** número de poros cerrados, es decir, aquellos rodeados en todas las direcciones de la estructura en 3D por material.
- **Po.V (cl):** volumen del VOI ocupado por poros cerrados.
- **Po.S (cl):** superficie del VOI ocupada por poros cerrados.
- **Po (cl):** porcentaje del VOI ocupado por poros cerrados.
- **Po.N (op):** número de poros abiertos, es decir, aquellos espacios rodeados de material pero no en todas las direcciones.
- **Po.V (op):** volumen del VOI ocupado por poros abiertos.
- **Po (op):** porcentaje del VOI ocupado por poros abiertos.
- **Po.V (tot):** volumen total de la VOI ocupado por poros, tanto abiertos como cerrados.
- **Po (tot):** porcentaje del VOI ocupado por poros, abiertos y cerrados.
- **Eu.N (Euler Number):** indicador de la conectividad de una estructura tridimensional compleja. Una estructura bien conectada tendrá un Eu.N negativo grande, disminuyendo este valor a medida que se rompen las conexiones.

2.7. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO E HISTOMORFOMÉTRICO

Después de haber realizado el estudio radiológico, las piezas óseas fueron seccionadas transversalmente en un plano perpendicular al eje longitudinal del hueso, obteniendo bloques de unos 0,5 cm para llevar a cabo el estudio anatomopatológico e histomorfométrico (Figura 29).

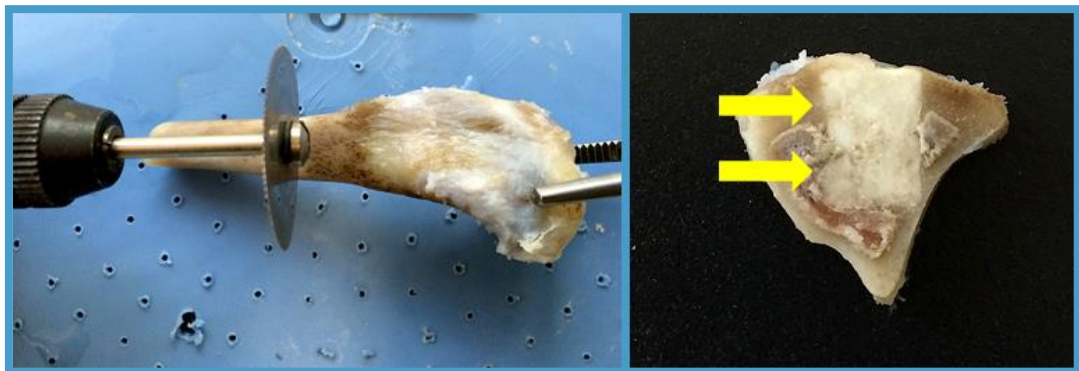


Figura 29: Sección transversal del área implantada. Tallado de las muestras previo al procesado. Las flechas amarillas indican la situación del implante de aspecto blanquecino.

Los bloques obtenidos fueron deshidratados previamente a la introducción en glicometacrilato, ya que para que el polímero penetre en el tejido óseo es fundamental extraer previamente el agua retenida en la muestra. La deshidratación se realizó introduciendo las muestras en etanol a concentraciones crecientes:

- 80% alcohol durante tres días.
- 96% de alcohol durante tres días.
- 100% de alcohol durante tres días.
- 100% de alcohol en dos pases sucesivos de tres días cada uno.

Posteriormente se realizó una infiltración plástica mezclando glicometacrilato (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Werheim, Germany) con alcohol etílico en distintas concentraciones, siguiendo la guía de Donath y Breuner⁹⁶, finalizando con dos infiltraciones con glicolmetacrilato puro. El protocolo seguido fue:

- Alcohol en proporción 30:70 durante un periodo de tres días.
- Alcohol en proporción 50:50 durante un periodo de tres días.
- Alcohol en proporción 70:30 durante un periodo de tres días.
- Alcohol al 100% durante dos pases sucesivos de tres días cada uno.

Para llevar a cabo la inclusión se introdujeron las muestras de tejido en unos moldes de polietileno que se llenaron de glicolmetacrilato bajo efecto de vacío (Technovit 7200 VLC, Heraus Kulzer, Werheim, Germany), para eliminar así las posibles burbujas existentes en el tejido y someterlas a polimerización por luz. La fotopolimerización tuvo lugar en dos pasos:

1. Aplicación de luz de baja intensidad durante 4 horas, manteniendo los moldes a una temperatura inferior a 40 °C, para que la resina se polimerizara extensamente.
2. Aplicación de luz azul ultravioleta de gran intensidad durante 12 horas, de forma que el metacrilato del interior del tejido completase su polimerización.

Por último los bloques permanecieron en una estufa a 37 °C durante 24 horas y se procedió a la retirada del molde.

Se realizaron cortes axiales de 200 µm usando una sierra de cinta (Exakt-Micro Griding System, Apparatebau, Norderstedt, Germany) y se procedió a realizar un micropulido mecánico usando lijas de carburo de silicio de grosor de

grano de 1200 y 1400 (Struers, Copenhagen, Denmark) hasta obtener muestras de un grosor aproximado de 40 μm .

Tras esto se procedió a su tinción mediante el método de Lévai-Laczkó⁹⁷ (Tabla 4) y el Tricrómico de Masson.

TINCIÓN DE LÉVAI-LACZKÓ	
Materiales	Procedimiento
<p>Solución A:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Azur II al 1% en agua destilada. • Azul de metileno al 1% en agua destilada. • Na_2CO_3 al 1% en agua destilada. <p>Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na_2CO_3 al 1%.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inmersión en peróxido de hidrógeno al 30% durante 5 minutos con movimiento constante. 2. Lavado con agua destilada dos veces. 3. Inmersión en ácido acético al 5% durante 1 minuto. 4. Lavado con agua destilada dos veces. 5. Inmersión en la solución A durante 20 minutos. 6. Lavado con agua destilada dos veces. 7. Inmersión en la solución B durante 5 segundos. Los cortes se deben sumergir individualmente en esta tinción. 8. Lavado con agua destilada y secado.
<p>Solución B:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pararosanilina al 1% en agua destilada. 	

Tabla 4: Protocolo de la tinción de Lévai-Laczkó.

Además, se analizaron las muestras procedentes de ganglios linfáticos regionales y paraaórticos, hígado, riñón y pulmón, con el fin de determinar la presencia de restos del material o de productos intermedios de degradación del mismo que se hubieran liberado después de su implantación a lo largo del estudio. En este caso las biopsias fueron fijadas en formol tamponado al 10%, deshidratadas mediante alcoholes a concentraciones crecientes e incluidas en parafina. De los bloques obtenidos se realizaron secciones de 5 μm mediante un

microtomo de rotación Minot Leitz[®]. Las secciones histológicas fueron teñidas con la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) y se observaron con un microscopio Leitz Orhoplant FSA[®] con cámara digital y con luz polarizada.

El estudio anatomopatológico cuantitativo y semicuantitativo se realizó usando un microscopio de luz motorizado y una cámara digital conectada a un sistema de captura de imagen (BX51, DP71, Olympus Corporation[®], Japan).

Los estudios anatomopatológicos que se muestran en este trabajo se han focalizado en las áreas de interés seleccionadas previamente y que incluyen las áreas periféricas del material o interfase material-tejido, el interior del mismo, y el defecto óseo creado para implantación intraósea del material (Figura 30). El análisis de la imagen se condujo basándose en el color y la forma de estas estructuras, diferenciando el hueso nuevo y laminar del tejido conectivo y vascular (Adobe Photoshop[®], CA, USA). Se evaluaron y midieron los parámetros usando el programa de análisis de imagen Cell-sens 1.5[®] (Olympus Corporation, Japan).

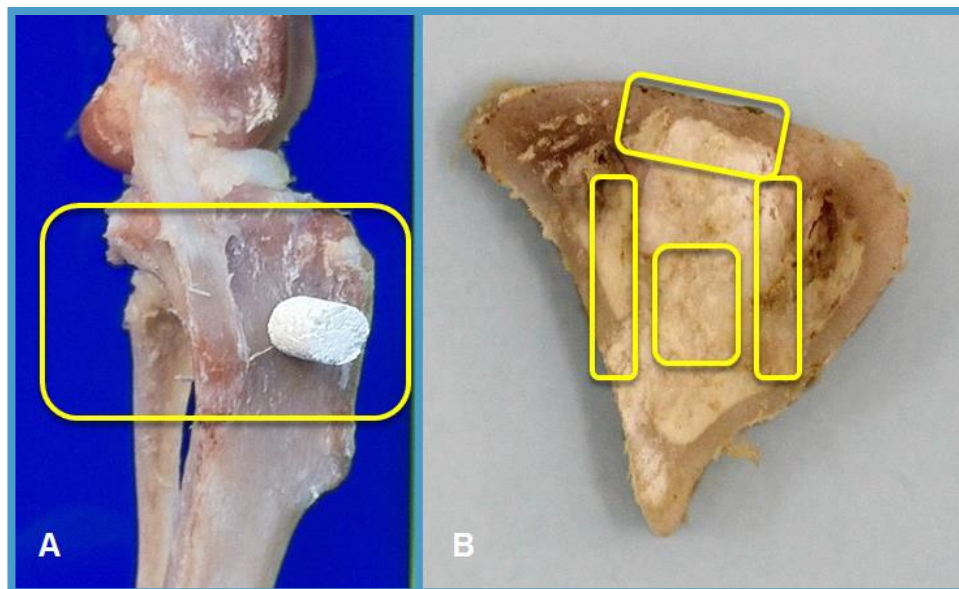


Figura 30: (A) Detalle anatómico del área de implantación del material objeto de estudio en metáfisis proximal de tibia. Implante de forma cilíndrica superpuesto. (B) Aspecto macroscópico de la sección ósea transversa a nivel de la zona de implantación y en donde se señalan las áreas de interés del estudio.

Se realizó un análisis cuantitativo de los siguientes parámetros:

- Hueso neoformado: tanto alrededor como en el interior del material.
- Material implantado.
- BIC: área de contacto entre el material y el hueso neoformado.
- Estructura del defecto óseo cortical: en términos de superficie y volumen.

Tanto el procesado de las preparaciones óseas sin descalcificar para el estudio anatomopatológico, como la captura de imágenes mediante técnicas de micro-TC, se realizaron en colaboración con la Universidad de Santiago de Compostela (Dr. Muñoz Guzón).

2.8. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos fueron estudiados estadísticamente utilizando la media, la desviación estándar (SD), la mediana, intervalo de confianza del 95% (CI) (SPSS, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se analizó mediante el test de la t de Student apareada, y test de Friedman para muestras no paramétricas en comparativa de medianas. Los resultados se consideraron significativos con $p < 0,05$.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

Presentaremos los resultados de nuestro estudio agrupados en cada uno de los cuatro periodos de estudio establecidos. En cada uno de ellos describiremos los hallazgos observados mediante técnicas radiológicas, escanográficas, anatomopatológicas e histomorfométricas,

1. CARACTERIZACIÓN

La caracterización física de los implantes mostró una densidad aparente de 75 gr/cm³, lo que implica una porosidad total del 76%. Se realizó una porosimetría de mercurio (Poremaster, Quantachrome, EEUU), que indicó que el 15% de los poros eran mayores de 1 mm, el 20% oscilaban entre 100 y 1000 µm, y el resto estaban por debajo de 100 µm, centrándose la distribución alrededor de los 10 µm. (Figuras 31 y 32).

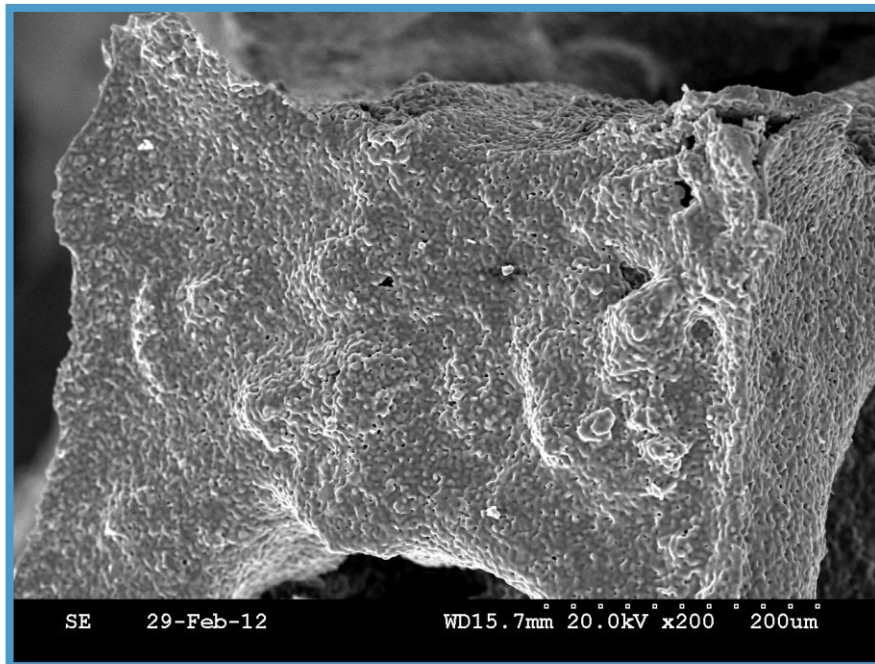


Figura 31: Imagen de SEM del implante (Magnificación 50X).

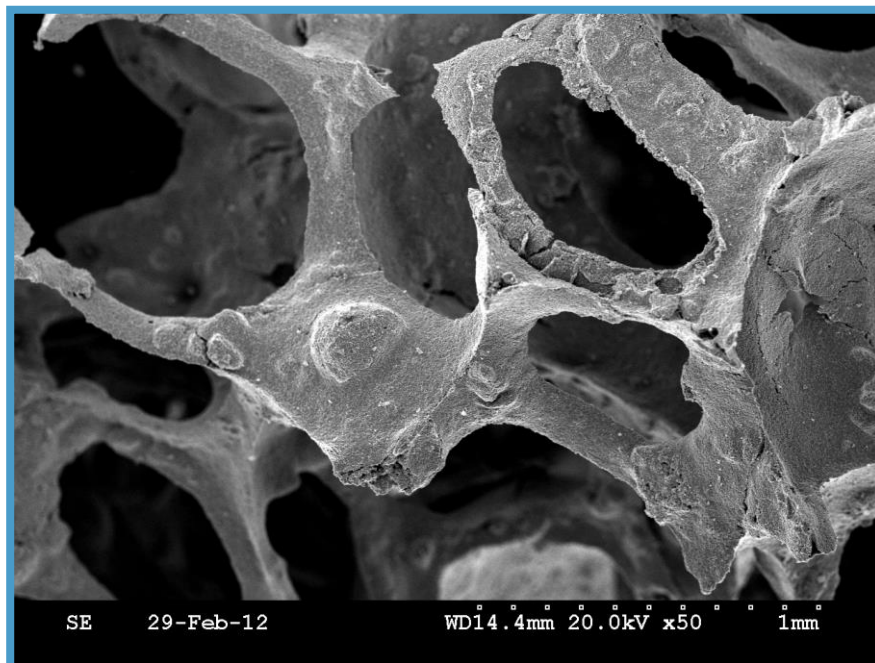


Figura 32: Imagen de SEM del implante (Magnificación 200X).

En cuanto a la composición química del material, ésta queda reflejada en la tabla 5.

ANÁLISIS QUÍMICO (wt%)	7CaOP ₂ O ₅ 2SiO ₂	5CaOP ₂ O ₅ SiO ₂
CaO	59,8	57,9
SiO ₂	18,3	11,9
P ₂ O ₅	21,5	30
MgO	0,064	0,062
Al ₂ O ₃	0,184	0,066
Na ₂ O	0,038	0,028
K ₂ O	0,007	0,005
Fe ₂ O ₃	0,036	0,032
TiO ₂	0,024	0,007
MnO	0,047	

Tabla 5: Composición química del material Nurse A – silicocarnotita.

Por último, la composición mineralógica final de la esponja, determinada mediante difracción de rayos X, se detalla en la figura 33, donde se observa que el material obtenido posee una estructura cristalina bifásica con presencia de silicocarnotita y Nurse A phase.

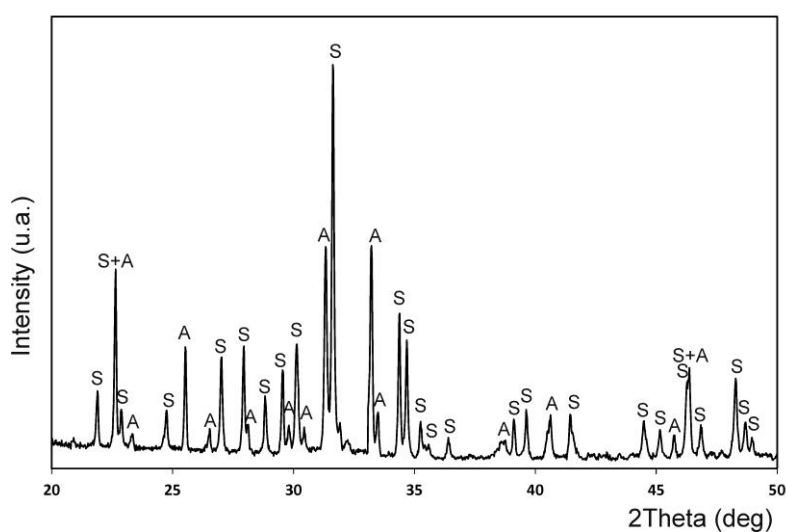


Figura 33: Patrón de difracción de rayos X del material Nurse A – silicocarnotita.

2. ESTUDIO RADIOLÓGICO

2.1. RADIOLOGÍA CONVENCIONAL

A. GRUPO CONTROL

En el estudio radiológico, el defecto óseo provocado artificialmente en el hueso ya no era evidente al mes de evolución. La cortical presentaba características radiológicas completamente normales con una morfología y densidad de características normales y similares a la presentada en animales no tratados. La evolución de dicha lesión artificial durante los diferentes períodos de estudio seguía presentando características radiológicas normales, similares al resto de hueso circundante y en donde no se apreciaba ninguna alteración en el desarrollo de la zona estudiada (Figura 34).

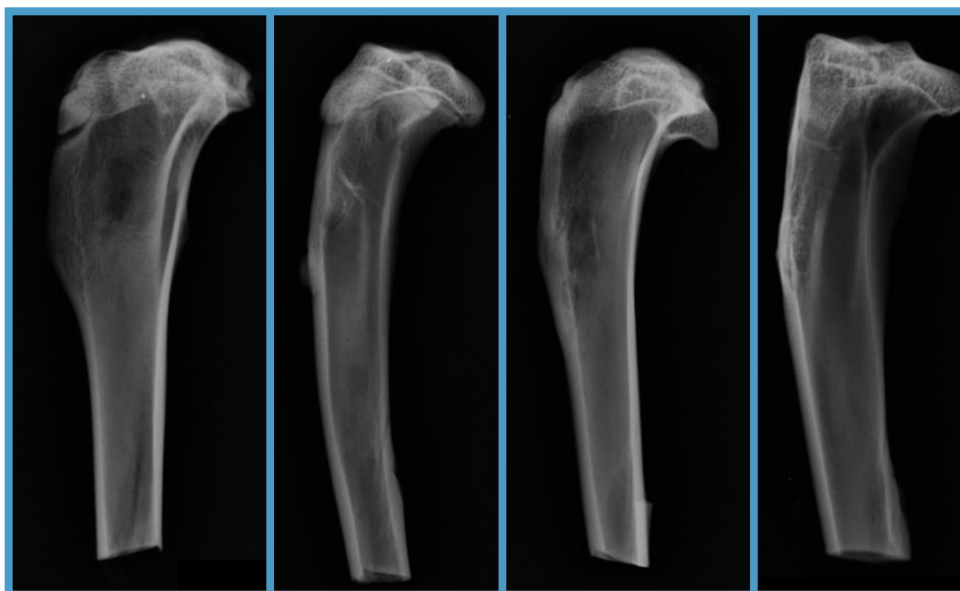


Figura 34: Radiología convencional: evolución del defecto óseo provocado para la colocación del implante en los animales controles.

B. GRUPO I: Animales con implantes de un mes de evolución.

En el estudio radiológico convencional, las características del material correspondían a la imagen de un elemento cilíndrico con una densidad radiológica superior a la densidad calcio radiológica del hueso normal, lo que permitía diferenciarlo fácilmente en el interior de la estructura ósea en la que se practicó la laguna ósea artificial en la que se implantó. El interior del implante mostraba líneas irregulares de menor densidad radiológica en forma de malla, que se correspondían con la propia estructura interna del implante.

El relleno del defecto óseo artificial practicado por el implante era prácticamente completo. El implante presentaba un aspecto granular con mínimas irregularidades en sus superficies externas. Se encontraba totalmente acoplado a la cavidad donde quedaba alojado, individualizándose perfectamente del tejido óseo normal adyacente.

Se observaba un aumento de densidad calcio en la cortical externa próxima a la apertura externa del defecto óseo practicado, pero que no cubría por completo el orificio de entrada del implante, por lo que seguía observándose una densidad radiológica inferior a la cortical ósea adyacente. (Figura 35)



Figura 35: Grupo I. Radiografía simple lateral de tibia mostrando la evolución del material implantado tras un mes de evolución.

C. GRUPO II: Animales con implantes de tres meses de evolución.

Durante este período, el defecto óseo cortical aparecía reparado completamente aunque presentaba una densidad radiológica inferior a la observada en la cortical ósea adyacente.

Se apreciaba una significativa disminución de la densidad calcio radiológica del propio implante respecto al período anterior. Destacaba que los contornos de la superficie del implante, en un principio completamente regulares y lisos, presentaban superficies más irregulares, de menor densidad radiológica, que en algunas zonas eran más difusas al entrar en contacto con las imágenes cálcicas del tejido óseo adyacente (Figura 36).



Figura 36: Grupo II. Radiografía simple lateral de tibia mostrando la evolución del material implantado tras un periodo de 3 meses.

D. GRUPO III: Animales con implantes de cinco meses de evolución.

En este periodo la densidad del material implantado era mayor a la observada en el periodo anterior, posiblemente debido a la existencia de una posible reacción ósea alrededor del implante e incluso en el interior del mismo, ya que se apreciaba un mayor incremento de las irregularidades en su superficie junto a mayores áreas radiotransparentes en su interior, que sugiere una desestructuración de la malla interna del implante mantenida hasta ahora.

La cortical externa ya reparada presentaba densidad ósea también superior a la del periodo anterior.

En algunas zonas se apreciaba continuidad del hueso adyacente con el material implantado, no permitiendo delimitar completamente la superficie del implante (Figura 37).



Figura 37: Grupo III. Radiografías simples laterales de tibia. Obsérvese la evolución del ímplate tras un período de tres meses de evolución.

E. GRUPO IV: Animales con implantes de siete meses de evolución.

La cortical externa presentaba una densidad cálcica similar a la presentada por la cortical adyacente, impidiendo delimitar el lugar del orificio de entrada al defecto óseo artificial realizado para la colocación del implante.

El implante presentaba una disminución generalizada de la densidad radiológica respecto a la observada en el grupo anterior, presentando una forma más ovalada, de bordes irregulares y difusos, y con un incremento de áreas radiotransparentes en su interior, que podían interpretarse como fenómenos de absorción del material del implante. Los límites del implante eran irregulares y no estaban radiológicamente bien definidos.

En algunas zonas se apreciaba continuidad de la cortical y del hueso adyacente con el material del implante estudiado, que parecía introducirse en el interior de los restos del material implantado, ya que se observaban imágenes de trabéculas óseas que parecían introducirse y continuar en su interior (Figura 38).

No se observaron malformaciones ni alteraciones óseas atribuibles a la presencia del implante a lo largo de los periodos estudiados. Sin embargo, tras 7 meses de evolución desde que el material del implante fue introducido en la laguna ósea artificial practicada, todavía se evidenciaban restos con densidad radiológica similar al implante original, que permanecían ubicados en la misma zona metafisaria en la que se introdujo.

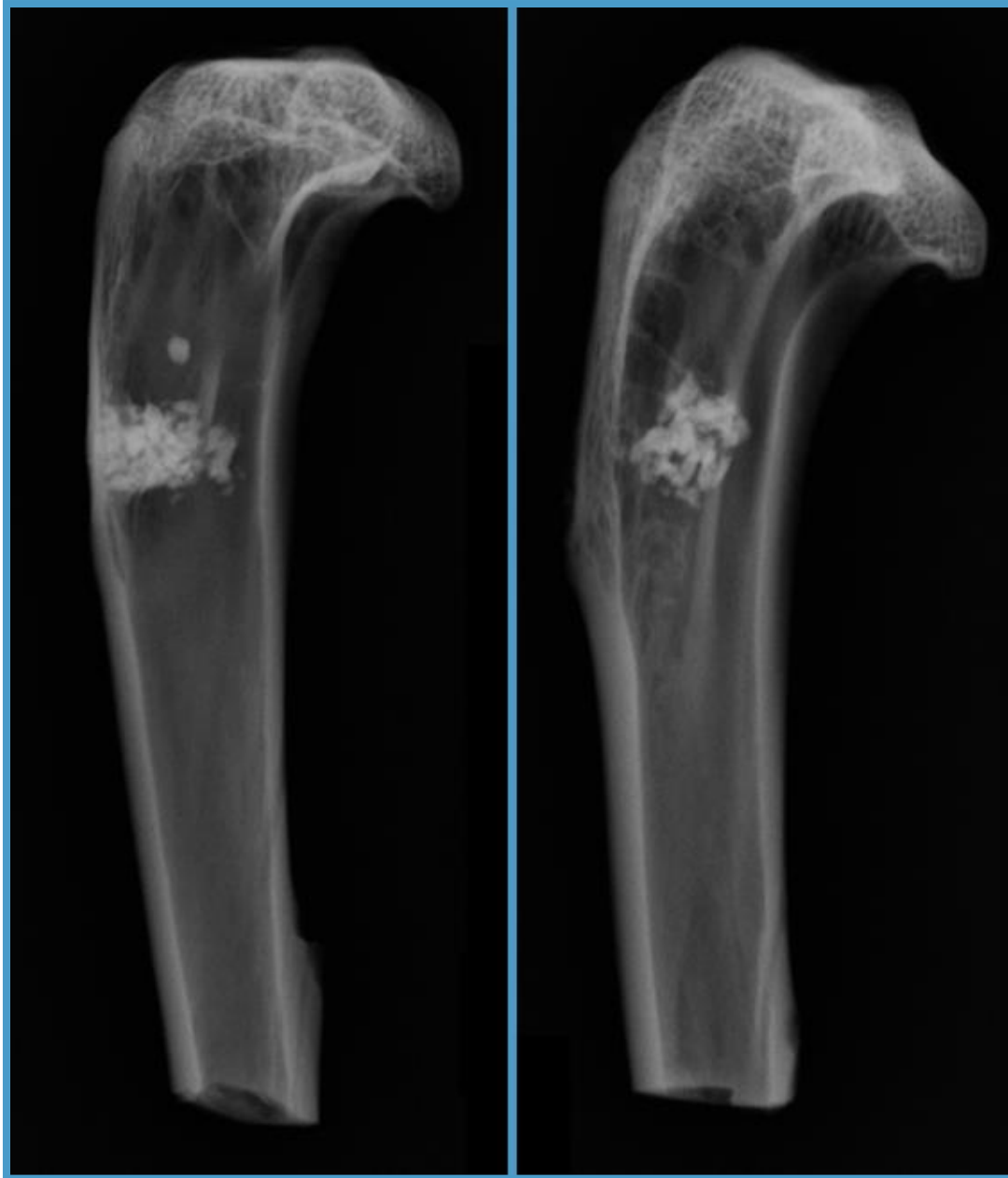


Figura 38: Grupo IV. Radiografías simples laterales de tibia mostrando la situación del material implantado tras una evolución de 7 meses.

2.2. ESTUDIO CON MICRO-TC

Los resultados obtenidos de las piezas óseas durante los diferentes periodos de nuestro estudio mediante microtomografía computerizada (micro-TC) se describen valorando las modificaciones observadas en el material implantado, el incremento de hueso formado alrededor del implante, y las modificaciones de porosidad del implante (poros abiertos y cerrados), así como la valoración estructural del defecto óseo artificial en la colocación del implante, presentado en función de los periodos establecidos en el estudio.

A. VALORACIÓN DEL IMPLANTE

Las imágenes tridimensionales del implante (3D) mostraban una progresiva reducción del material, con un incremento de las irregularidades superficiales del mismo, y un aumento de poros abiertos que todavía permanecían en los últimos estadios analizados (Figura 39).

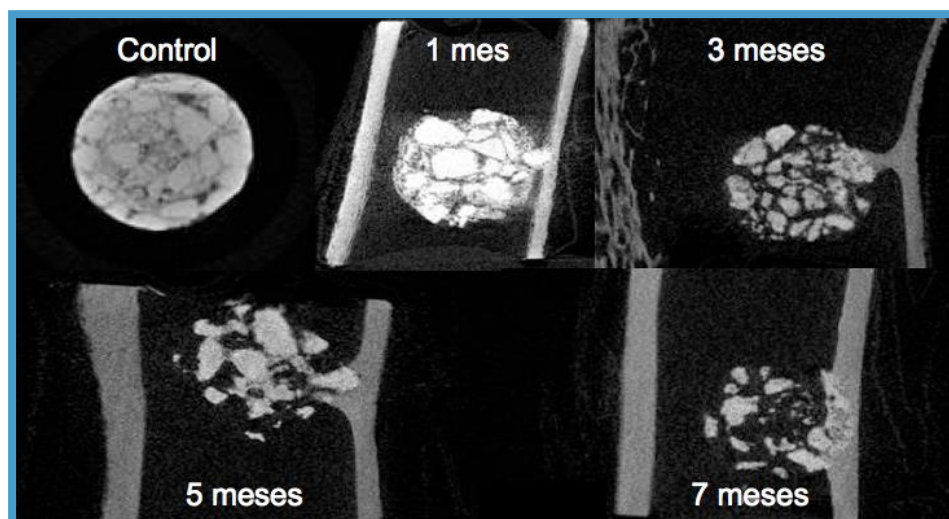


Figura 39: Estudio con micro-TC: evolución del implante en el interior del hueso durante los diferentes periodos estudiados.

En la figura 40 puede observarse una imagen renderizada (3D) de las características del implante durante los periodos estudiados.

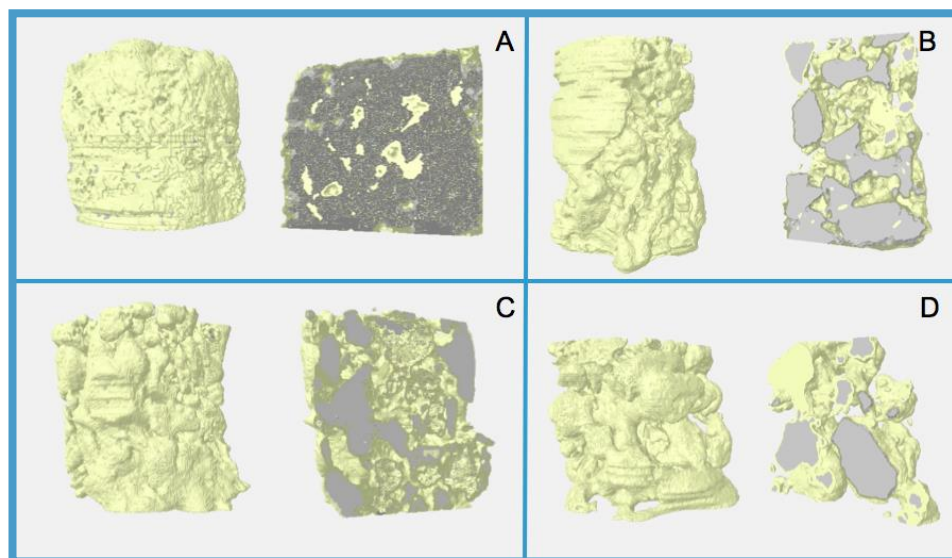


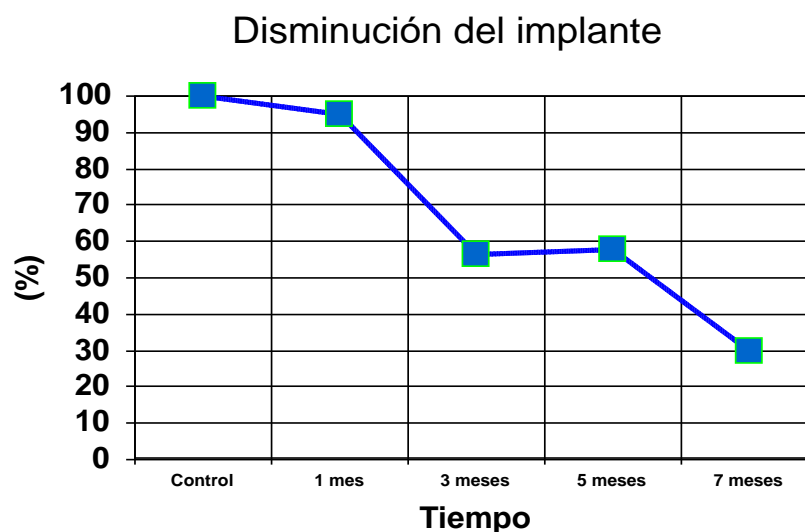
Figura 40: Imágenes en 3D de la evolución de porosidad del implante. Estudio con Micro-TC. (A) Superficie y sección longitudinal con un mes de evolución. (B) Superficie y sección longitudinal a los 3 meses. (C) Superficie y sección longitudinal a los 5 meses. (D) Superficie y sección longitudinal a los 7 meses.

En la tabla 6 se puede apreciar la disminución del material implantado durante los diferentes periodos estudiados respecto a la extensión del implante en mm^3 (BV media del material), porcentaje de volumen analizado (VOI) ocupado por el material (BV/TV media del material) y su volumen relativo (BV/TV relativo).

IMPLANTE	BV media (mm ³)	BV/TV media (%)	BV/TV relativo (%)
CONTROL	78,5	62	100
1 MES	74,6	64,6	100
3 MESES	44,2	36	58
5 MESES	44,5	39,2	63,2
7 MESES	23,9	31	50

Tabla 6: Estudio del implante en la lesión ósea artificial para la determinación de la disminución de su volumen mediante técnica de micro-TC.

Los resultados obtenidos mostraban que el volumen del material implantado se había reducido al 30% del inicial, poniendo de manifiesto la reabsorción, en volumen, del 70% del material implantado al finalizar el estudio 7 meses tras su colocación en la laguna ósea artificial practicada en el hueso, reduciendo en un 50% el volumen relativo que ocupaba en dicha lesión ósea (VOI). (Gráfica 1).



Gráfica 1: Disminución del volumen del material implantado durante las etapas del estudio determinado mediante micro-TC.

B. VALORACIÓN DEL HUESO FORMADO

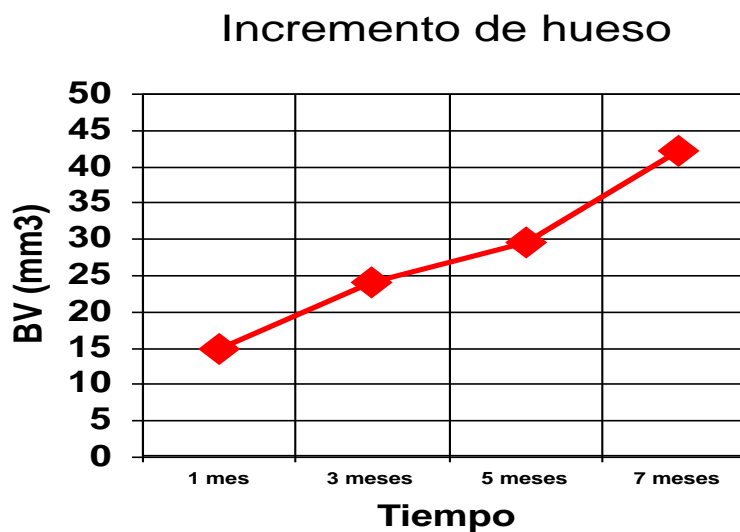
Al contrario de los resultados determinados en el material del implante, la cantidad de hueso nuevo formado fue aumentando progresivamente durante los diferentes periodos estudiados.

Los resultados mostrados en la tabla 7 ponen de manifiesto el incremento de volumen de hueso en mm^3 (BV media del hueso) que fue aumentando dentro de los límites de la zona de interés analizada (ROI), así como el porcentaje de hueso en el interior de la laguna ósea realizada que se encontraba ocupada por hueso (BV/TV media del hueso).

HUESO	BV media (mm^3)	BV/TV media (%)
1 MES	14,9	17,17
3 MESES	24	18,8
5 MESES	29,6	25,08
7 MESES	42,1	32,6

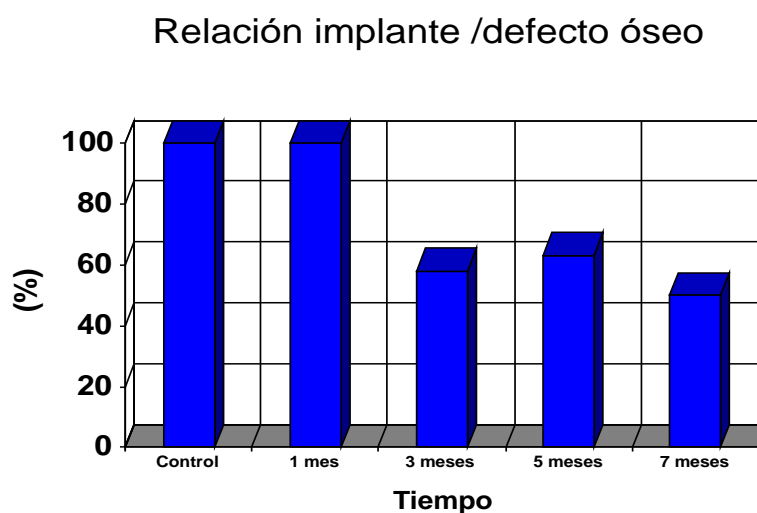
Tabla 7: Estudio del hueso en la lesión ósea artificial para la determinación del aumento de su volumen mediante técnica de micro-TC.

Estos resultados mostraban un incremento progresivo de hueso en el interior de la laguna ósea experimental practicada (Gráfica 2).



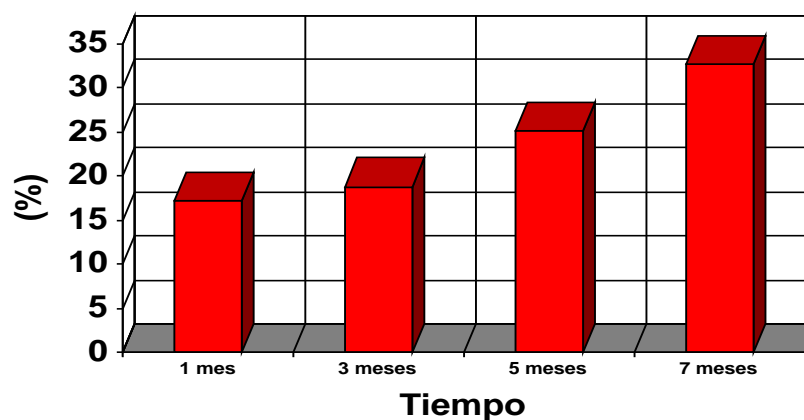
Gráfica 2: Incremento de hueso en el interior de la lesión experimental practicada (BV del hueso).

En definitiva, como el área de interés estudiada se correspondía con la laguna ósea artificial provocada experimentalmente (ROI), la micro-TC permitía valorar la disminución del volumen del implante dentro del volumen de la lesión (Gráfica 3), así como el incremento del hueso que fue progresivamente ocupando el volumen de dicha lesión (Gráfica 4).



Gráfica 3: Disminución progresiva del volumen ocupado por el implante dentro de la laguna ósea durante los diferentes periodos estudiados.

Relación hueso /defecto óseo



Gráfica 4: Incremento progresivo del volumen de hueso que va ocupando la laguna ósea durante los diferentes periodos del estudio.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que se puede determinar una reducción progresiva del volumen ocupado por el implante, que va siendo sustituido por un incremento progresivo del hueso, que va ocupando el volumen de la lesión ósea de forma lenta pero progresiva durante los diferentes periodos estudiados.

Por otro lado, el análisis de las características del material implantado mostraba un descenso del número de poros cerrados en el material (Po.N (cl): poros rodeados en todas las direcciones de la estructura en 3D por material), y un descenso del volumen de área de interés ocupado por poros cerrados del implante (Po.V (cl)), así como una reducción de la superficie de poros cerrados en el área de interés (Po.S (cl)). Por el contrario, se halló un gran incremento de poros abiertos y conectados con el tejido circundante con el paso del tiempo (Po.N (op)), así como el volumen (Po.V (op)) y porcentajes (Po (op)) de poros abiertos conectados con el tejido adyacente dentro del área de interés. Los resultados más destacables se muestran en la tabla 8.

HUESO	Po (cl) (%)	Po (op) (%)	Eu.N
1 MES	0,2	35,2	-686
3 MESES	0,01	60,02	-410
5 MESES	0,02	64,61	-314
7 MESES	0,008	68,75	-119

Tabla 8: Variaciones cuantitativas en la evolución de la porosidad del implante, y disminución de las conexiones estructurales tridimensionales en el material determinadas mediante la técnica de micro-TC.

Finalmente, el número Euler (Eu.N), que se utiliza como indicador de la conectividad de una estructura tridimensional compleja, aumentaba significativamente (Tabla 8), mostrando una mejoría importante en la conectividad de las estructuras tridimensionales que se encontraban en el interior de la laguna ósea.

3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Los estudios anatomopatológicos que se mostrarán a continuación se realizaron en las áreas de interés seleccionadas previamente.

En relación a los hallazgos microscópicos de las vísceras estudiadas, se concretan en los siguientes:

- Los ganglios linfáticos regionales mostraron alteraciones anatomopatológicas que correspondían a una adenitis crónica reactiva, caracterizada por una marcada hiperplasia folicular (predominantemente en las porciones periféricas), congestión vascular y extensa histiocitosis sinusal, tanto del seno marginal como de los senos medulares, encontrándose estos distendidos (Figura 41A).
- El hígado presentaba una arquitectura conservada sin signos de congestión vascular ni activación de las células de Kupffer (Figura 41B).
- El pulmón conservaba igualmente su arquitectura, observándose en las preparaciones histológicas secciones transversas de bronquios rodeados parcialmente por cartílago y músculo liso, así como varios espacios alveolares en la periferia de características normales (Figura 41C).
- El riñón mostraba características arquitecturales y citológicas normales. En la sección se observan glomérulos en la periferia y numerosos túbulos contorneados proximales y distales que ocupan la mayor parte de la sección histológica (Figura 41D).

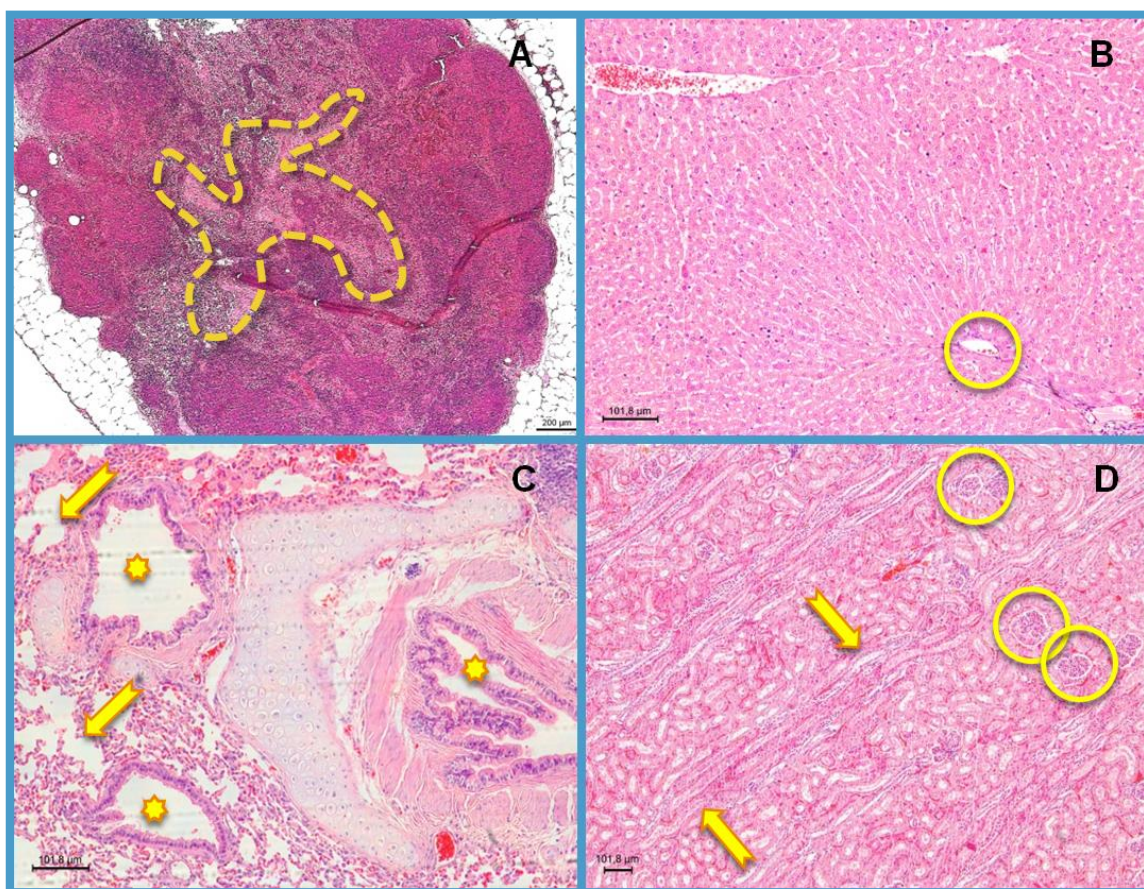


Figura 41: Biopsia de órganos. (A) Ganglio linfático con histiocitosis sinusal (línea discontinua) (31.5 X). (B) Hígado con arquitectura conservada, pudiendo observar la vena centrolobulillar (círculo) (125 X). (C) Pulmón (bronquios – asteriscos, alveolos – flechas) (200 X). (D) Riñón (glomérulos – círculos, túbulos – flechas) (125 X). (Tinción de Lévai-Lácsko).

3.1. GRUPO I: Un mes de evolución. (Figuras 42-44)

Durante este periodo de estudio, la muestra correspondiente al control presentaba el defecto cortical realizado para llevar a cabo la implantación intraósea del material. No se detectaron signos de reparación ósea (osificación endondral), tales como reacción perióstica y endóstica, presencia de tejido de granulación, islotes de cartílago, etc.

En la pieza implantada, las secciones histológicas realizadas de forma seriada se caracterizaban por abarcar todo el volumen del hueso, incluyendo la porción central del material implantado, pudiendo observar que éste adoptaba una forma cuadrangular de coloración gris oscuro en el seno de una médula ósea hematopoyética de características normales.

En el extremo externo del cilindro implantado se observaban extensas áreas de cartílago con focos de osificación en su interior.

En este periodo temprano del estudio se podía observar que el material implantado preservaba su arquitectura original, no mostrando un aspecto homogéneo en cuanto a su densidad debido a la presencia de espacios (poros) no ocupados que se comunicaban entre sí a través de todo el volumen del material (porosidad abierta).

Es de destacar la presencia, aunque no de forma abundante, de delgadas trabéculas de tejido óseo neoformado que rodeaban toda la periferia del material, y que incluso de forma discreta comenzaban a colonizar el interior del mismo a través de los poros presentes en el material.

No se observaban elementos de médula ósea hematopoyética acompañando a este fenómeno de colonización ósea.

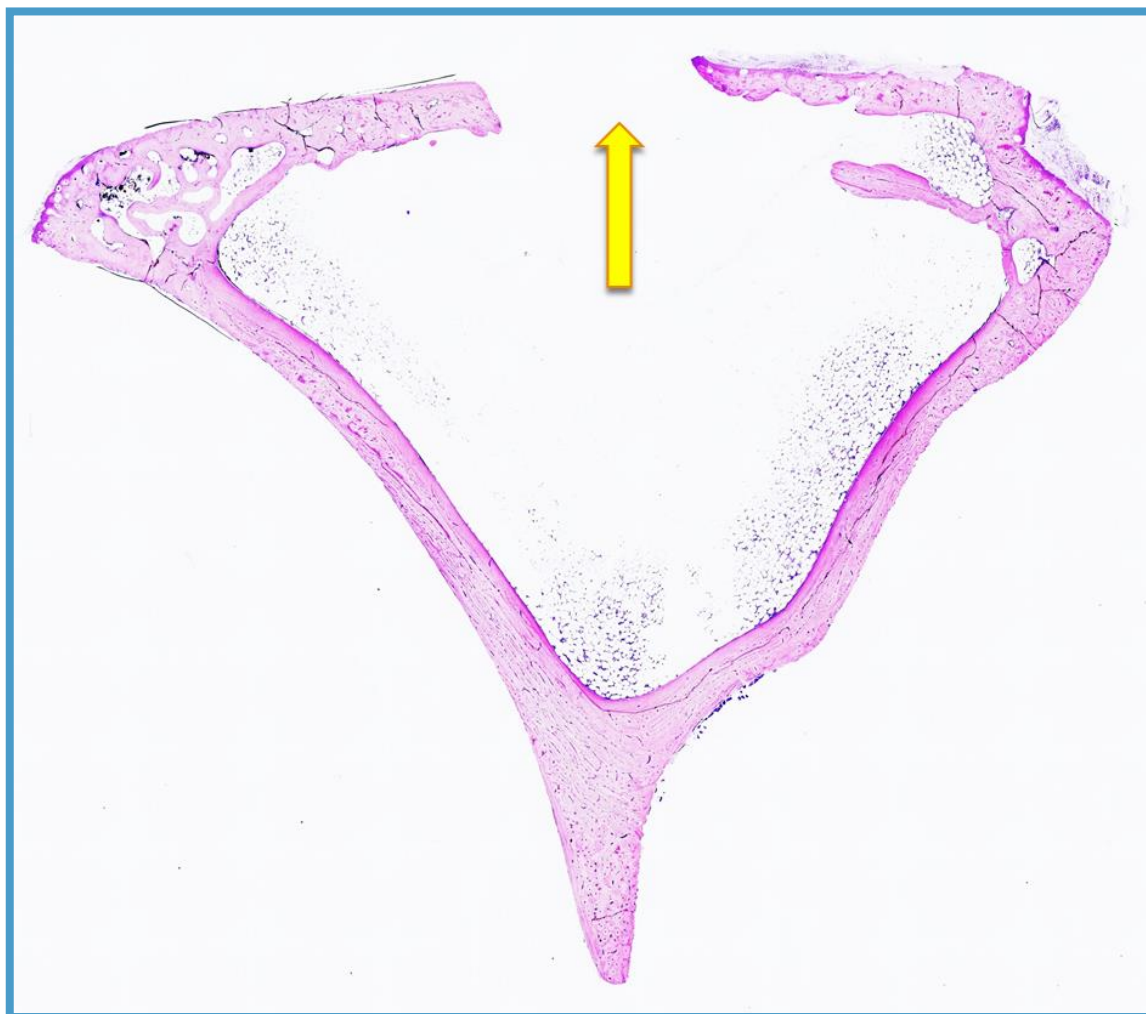


Figura 42: Grupo I – Imagen panorámica de la muestra control sin implante en la que se observa el defecto óseo creado sin reparar (flecha). (Lévai-Lácsko, 31.2X).

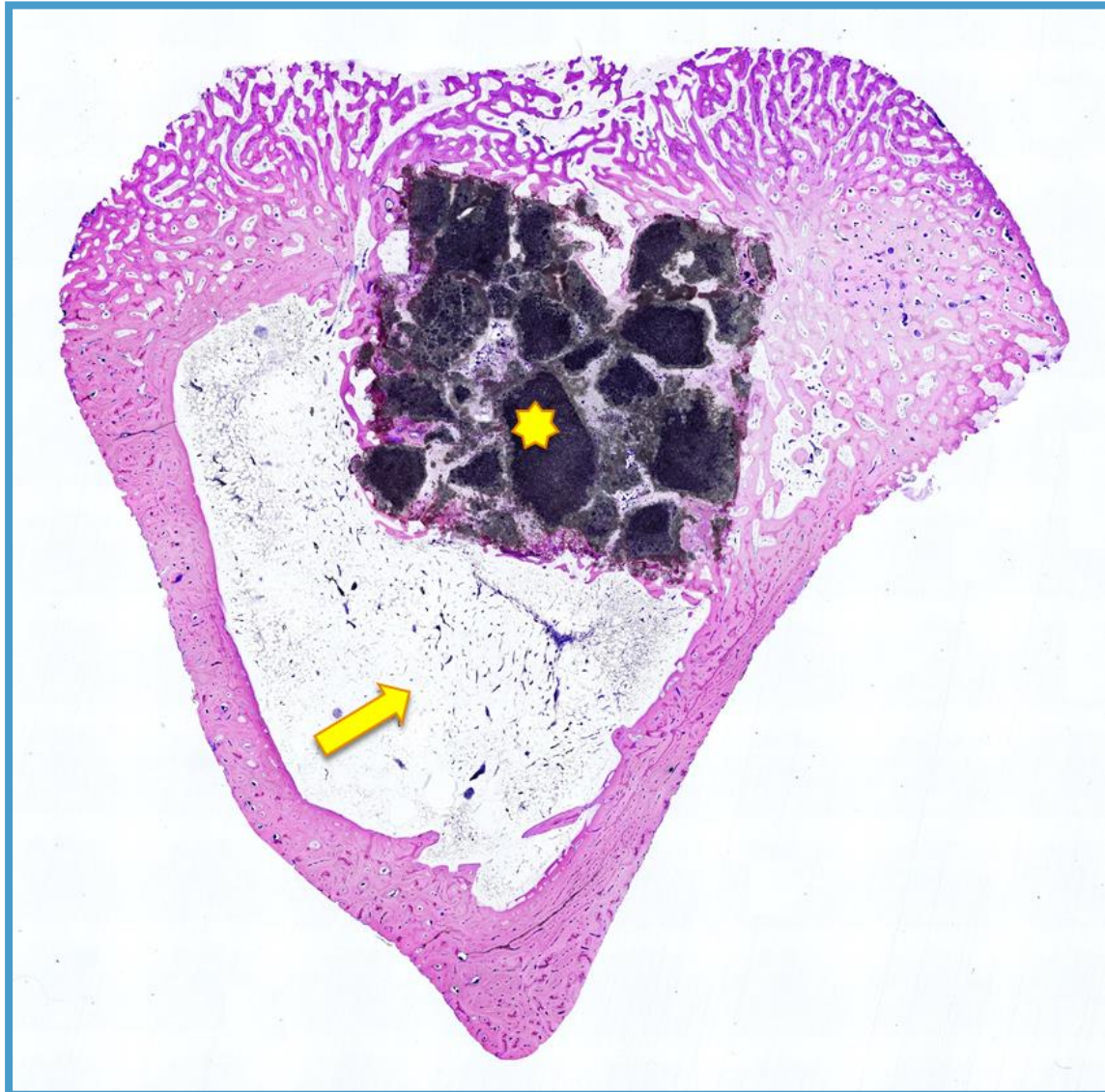


Figura 43: Grupo I – Imagen panorámica de la sección ósea que incluye el implante de morfología cuadrangular y coloración gris oscuro (asterisco) en el seno de la médula ósea hematopoyética (flecha). (Lévai-Lácsko, 31.2X).

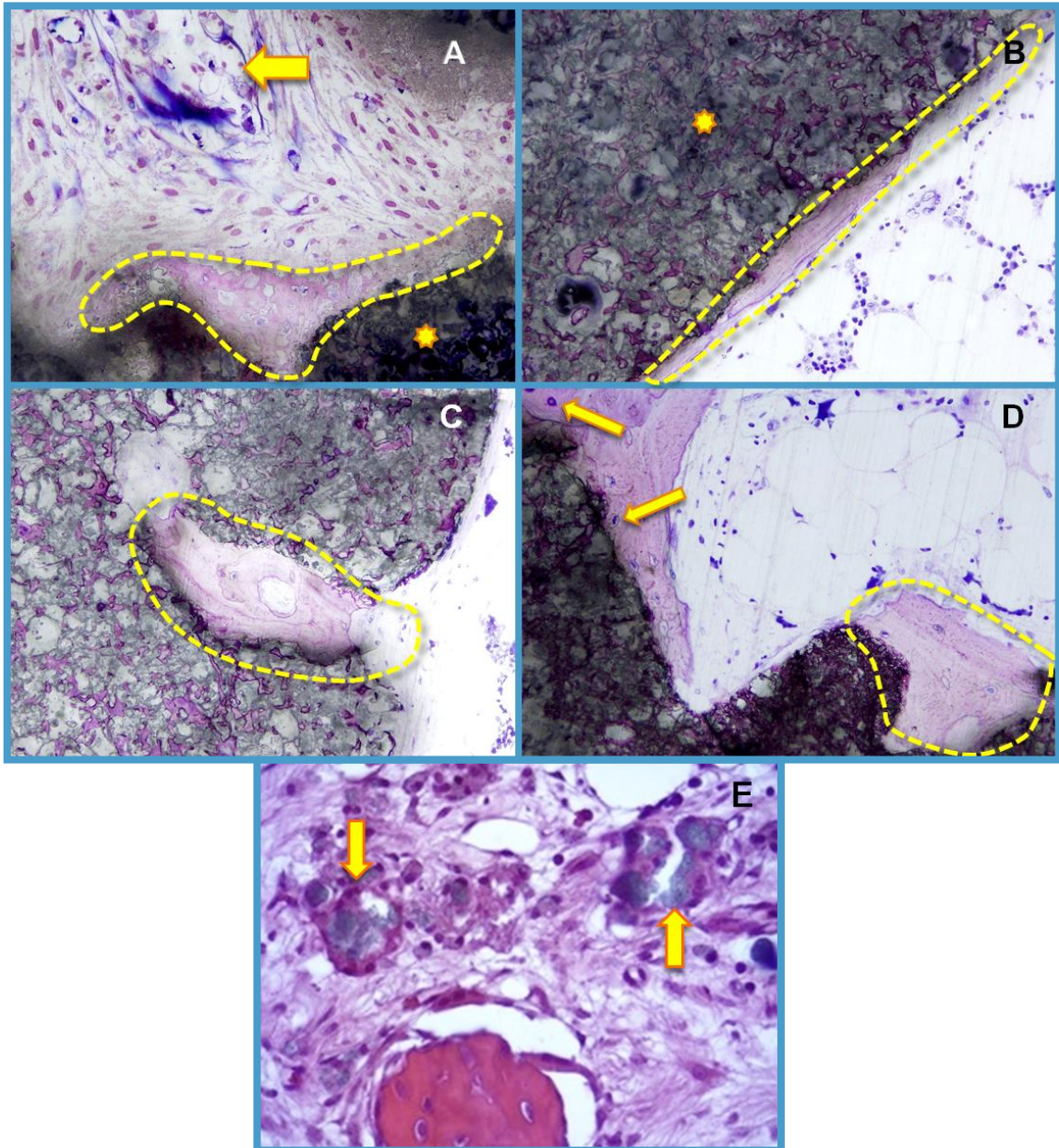


Figura 44: (A) Tejido de granulación (flecha) y pequeños depósitos de osteoide (línea discontinua) en estrecha relación con la superficie del material (asterisco). (B) Capa de tejido óseo neoformado (línea discontinua) cubriendo al material (asterisco). (C) Tejido osteoide (línea discontinua) penetrando en el interior del material a través de un poro. (D) Depósitos de tejido óseo maduro con presencia de líneas de cementación (línea discontinua) y osteocitos (flechas). (E) Células gigantes multinucleadas con material fagocitado intracitoplasmático (flechas). (Lévai-Láczo, 312.5 X)

3.2. GRUPO II: Tres meses de evolución. (Figuras 45-47)

La arquitectura del material implantado se mantenía conservada, aunque aparecían áreas de reabsorción en su interior en comparación con el periodo previo.

Destacaba la presencia de tejido de granulación constituido por numerosos vasos sanguíneos de calibre capilar, así como abundantes fibroblastos que rodeaban totalmente al implante.

Se apreciaban áreas de material osteoide en el seno del tejido de granulación que rodeaba a los cilindros implantados de mayor extensión que en el grupo anterior, y que ocupaban todo el perímetro del material. Destacaba la presencia de pequeños grupos de trabéculas óseas delgadas e intensamente eosinófilas, sin orientación uniforme.

Los extremos del cilindro implantado se mostraban en íntimo contacto con el hueso cortical neoformado, que presentaba características histológicas superponibles al tejido óseo normal adyacente. En algún caso observamos la protrusión del extremo del implante sobre la superficie cortical, donde no existía reparación total de la misma, observándose focos de osificación encondral a ese nivel.

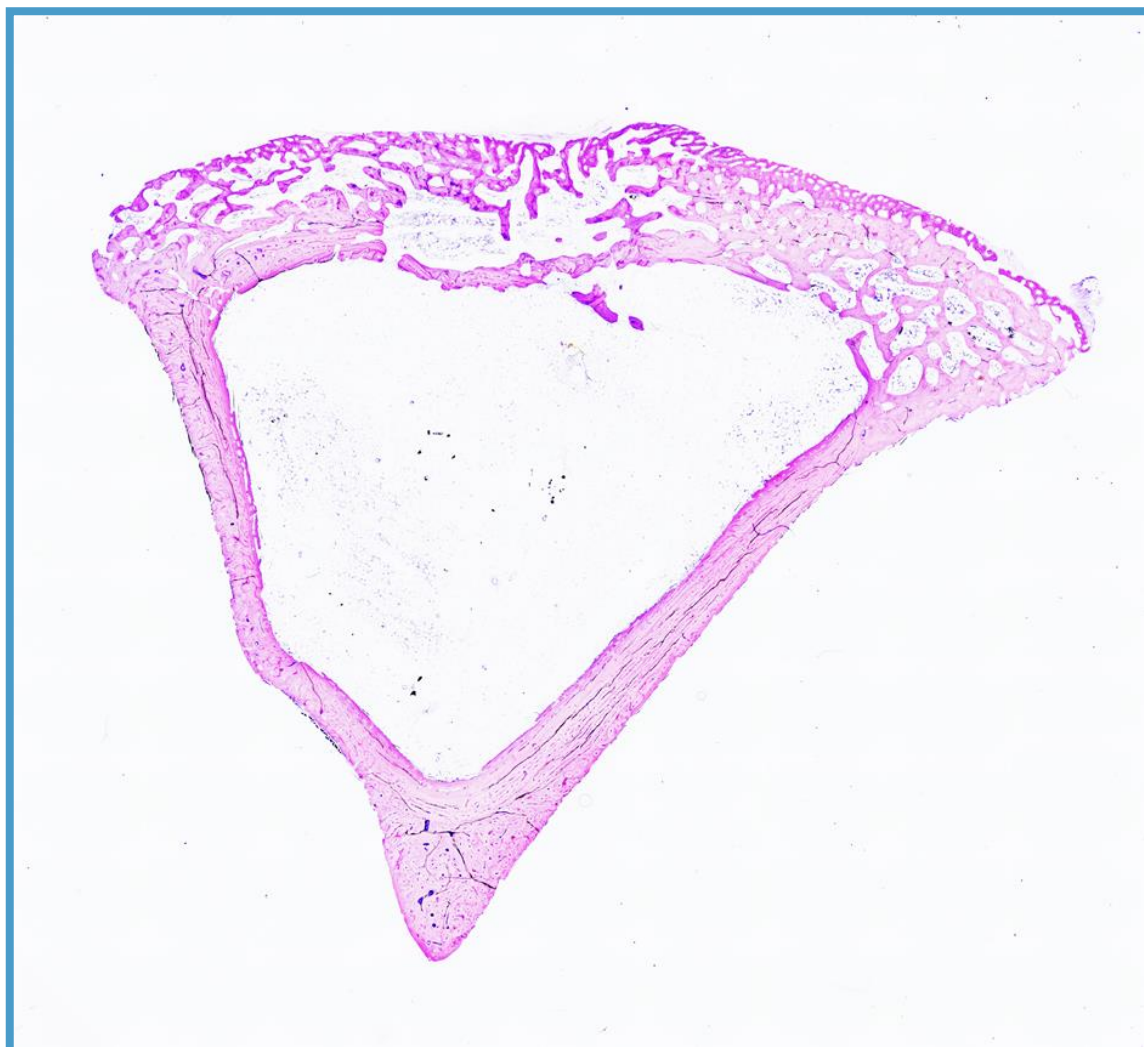


Figura 45: Grupo II – Imagen panorámica del grupo control sin implante. Reparación cortical parcial mediante tejido óseo esponjoso (Lévai-Lácsko, 31.2X).

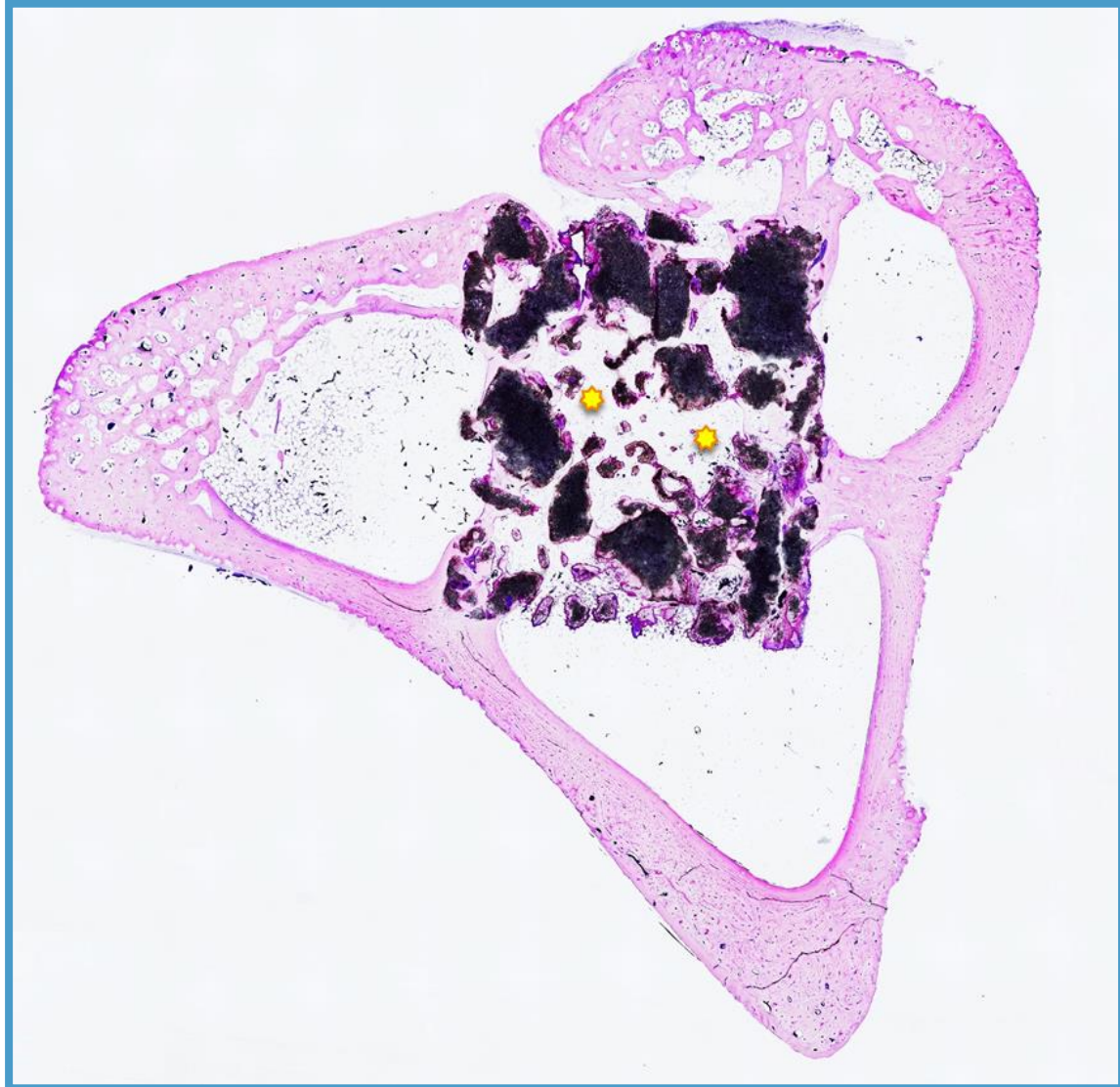


Figura 46: Grupo II – Imagen panorámica del implante en el seno de la médula ósea hematopoyética. Aumento de porosidad en el interior del material respecto al periodo previo marcado con asteriscos (Lévai-Lácsko, 31.2X).

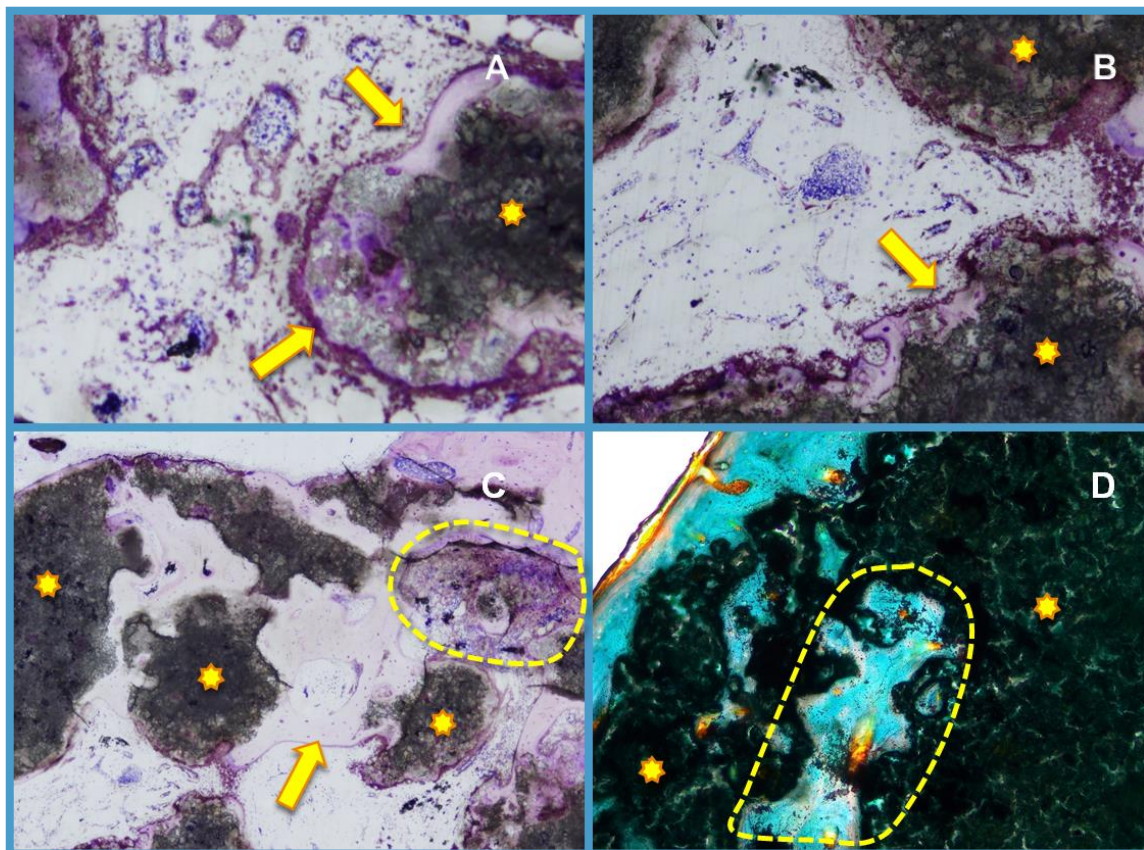


Figura 47: (A) y (B). Detalle del material (asteriscos) tapizado por una capa de osteoide mayor a la observada en el periodo anterior (flechas) (Lévai-Láczo, 312.5 X). (C) Material osteoide (flecha) en el seno del tejido de granulación que rodea al material implantado (asteriscos) en mayor extensión que en el grupo anterior. Existen trabéculas óseas sin orientación uniforme (línea discontinua) (Lévai-Láczo, 312.5 X). Material implantado (asteriscos) en cuyo interior se disponen trabéculas de hueso neoformado (línea discontinua) (Técnica de Tricrómico de Masson, 200 X).

3.3. GRUPO III: Cinco meses de evolución. (Figuras 48-50)

Se seguían observando los fenómenos descritos en el grupo anterior aunque de forma más notable. La característica más destacada era la gran extensión de los canales e islotes que llegaban a fragmentar el material de forma irregular.

Las trabéculas óseas neoformadas tendían a la coalescencia originando un entramado de aspecto reticular que ocupaba toda la extensión del implante, con mayor ordenación de las mismas respecto al periodo anterior.

Existía un aumento de porosidad del material implantado debido a la reabsorción del mismo.

La cortical ósea estaba formada por tejido óseo compacto de características normales, que se continuaba con las trabéculas óseas que rodeaban a los fragmentos de material.

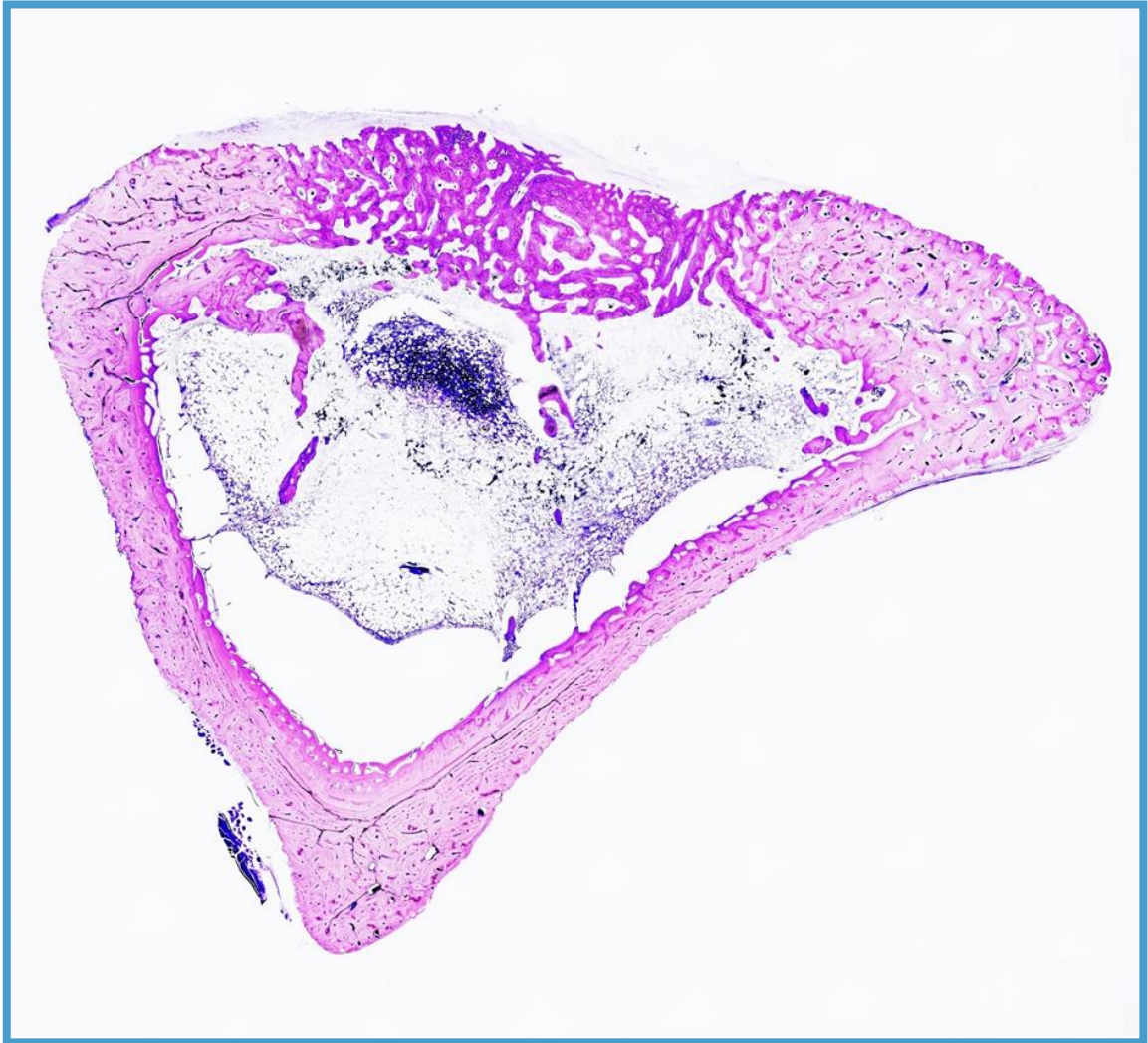


Figura 48: Grupo III – Imagen panorámica de muestra sin implante con reparación del defecto óseo. (Lévai-Lácsko, 31.2X).

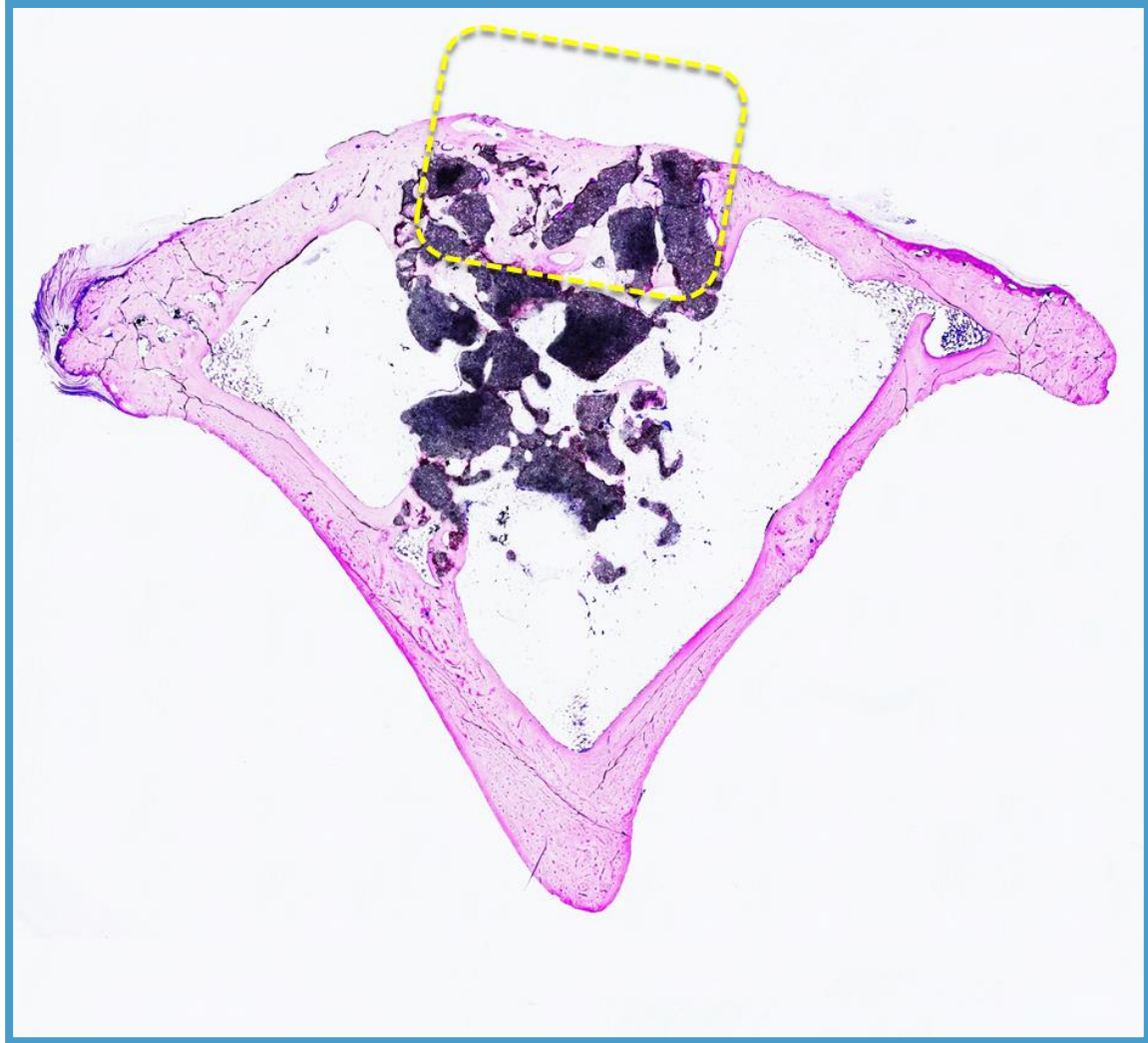


Figura 49: Grupo III – Imagen panorámica del implante en el seno de la médula ósea hematopoyética. Continuidad entre el hueso cortical reparado y la red ósea neoformada dentro del implante (línea discontinua). (Lévai-Lácsko, 31.2X).

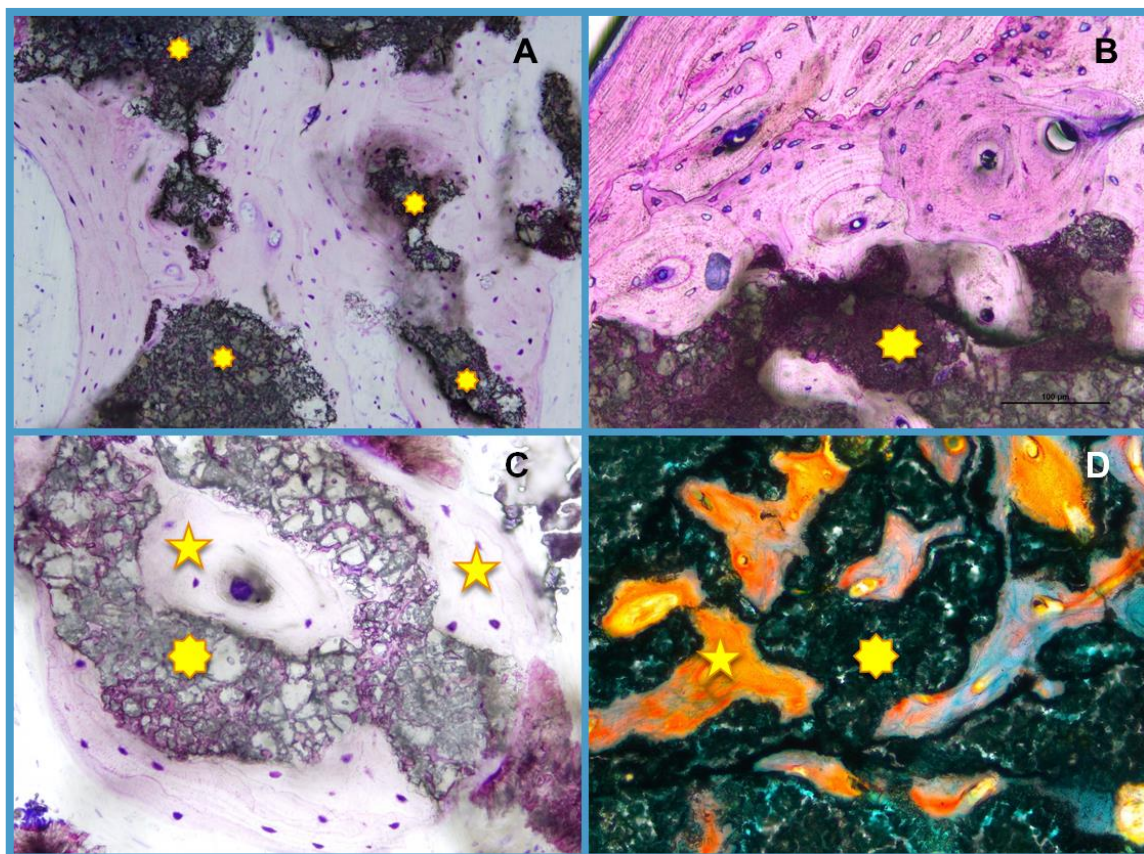


Figura 50: (A) y (B). Detalle de islotes del material implantado (asteriscos) separados y rodeados por tejido óseo neoformado (flechas) (Lévai-Láczo, 200 X). (C) y (D). Se observa un aumento de porosidad en el material (asterisco) respecto a los periodos anteriores que va siendo rellenado por una red de osteoide (estrella). (Lévai-Láczo y Tricrómico de Masson, respectivamente, 200 X).

3.4. GRUPO IV: Siete meses de evolución. (Figuras 51-54)

Al final del estudio algunos fragmentos del material implantado habían sufrido una reabsorción casi total, observándose pequeños fragmentos muy irregulares.

El material existente mostraba un aspecto finamente granular con menor densidad que en los periodos previos.

El tejido óseo, con trabéculas neoformadas de mayor tamaño y más ordenadas, empezaba a ser sustituido en su periferia por médula ósea hematopoyética de características normales.

No se observaba tejido fibroso en la interfase hueso-material.

En cuanto al control, en este periodo final el defecto óseo se encontraba totalmente regenerado y formado por tejido óseo maduro de características morfológicas normales.

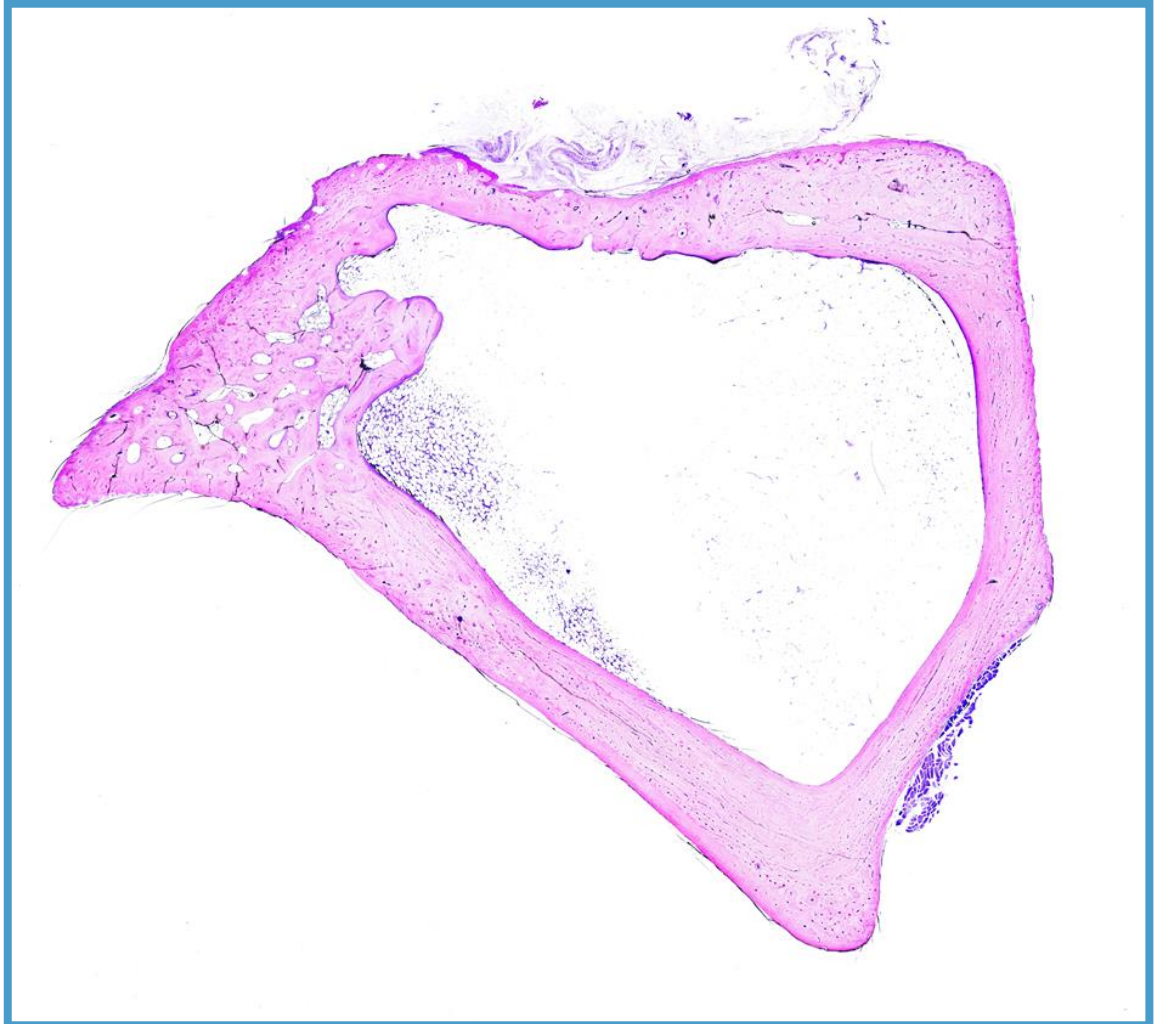


Figura 51: Grupo IV – Imagen panorámica de la muestra control y defecto óseo completamente reparado mediante tejido óseo compacto remodelado (Lévai-Láczko, 31.2X).

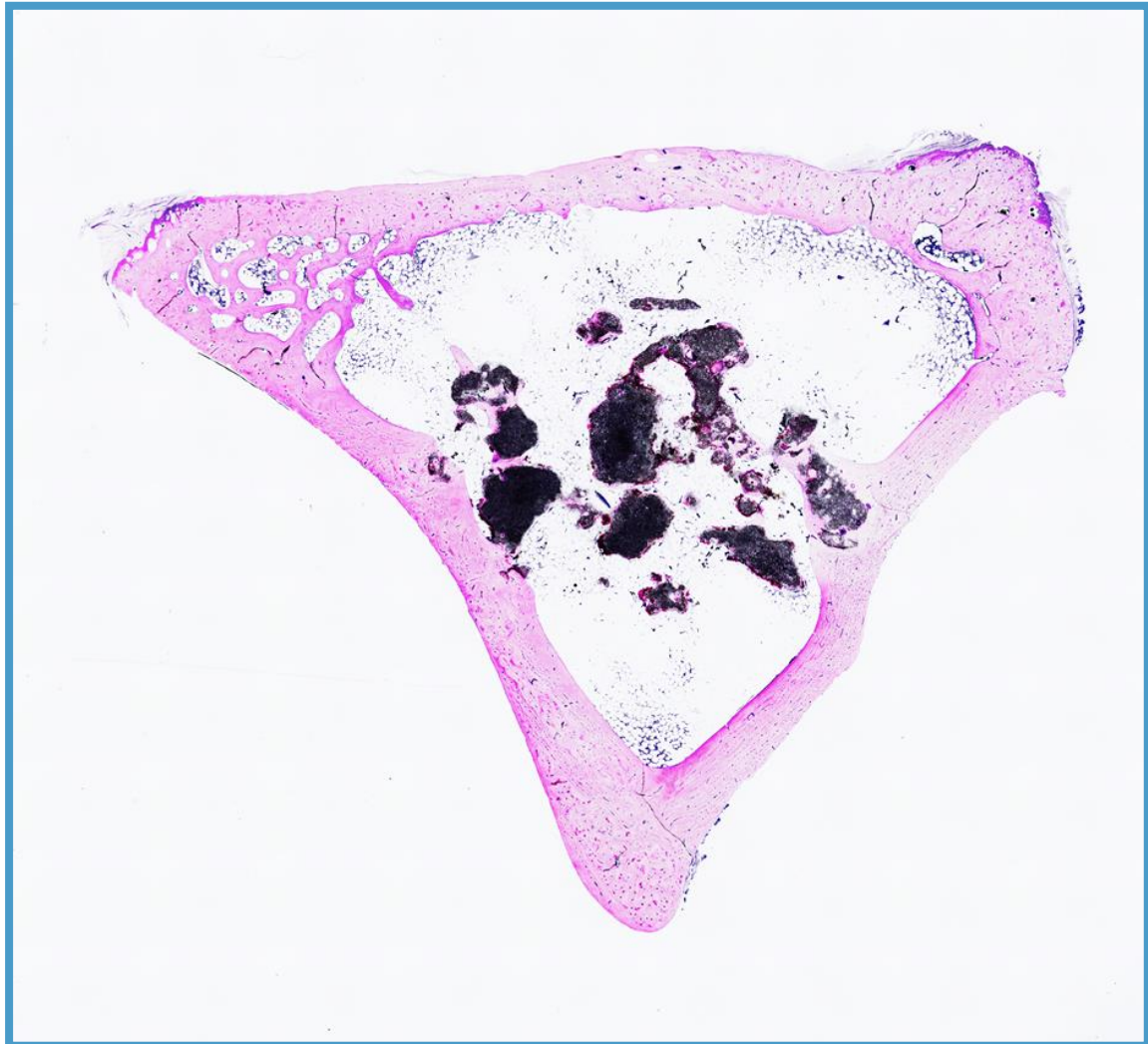


Figura 52: Grupo IV – Imagen panorámica del implante en el seno de la médula ósea hematopoyética. Destaca gran fragmentación y dispersión del material, con defecto óseo completamente reparado por tejido óseo maduro. (Lévai-Lácsko, 31.2X).

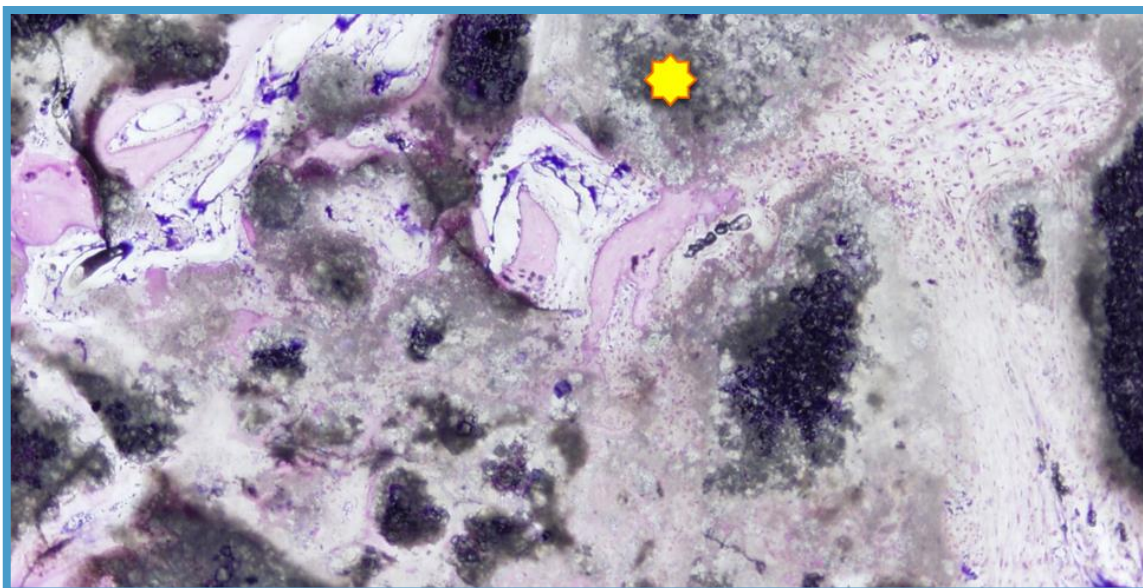


Figura 53: Disminución clara en la densidad del material (asterisco), que presenta un aspecto granular y poco compacto. (Levai-Laczko, 312,5 X)

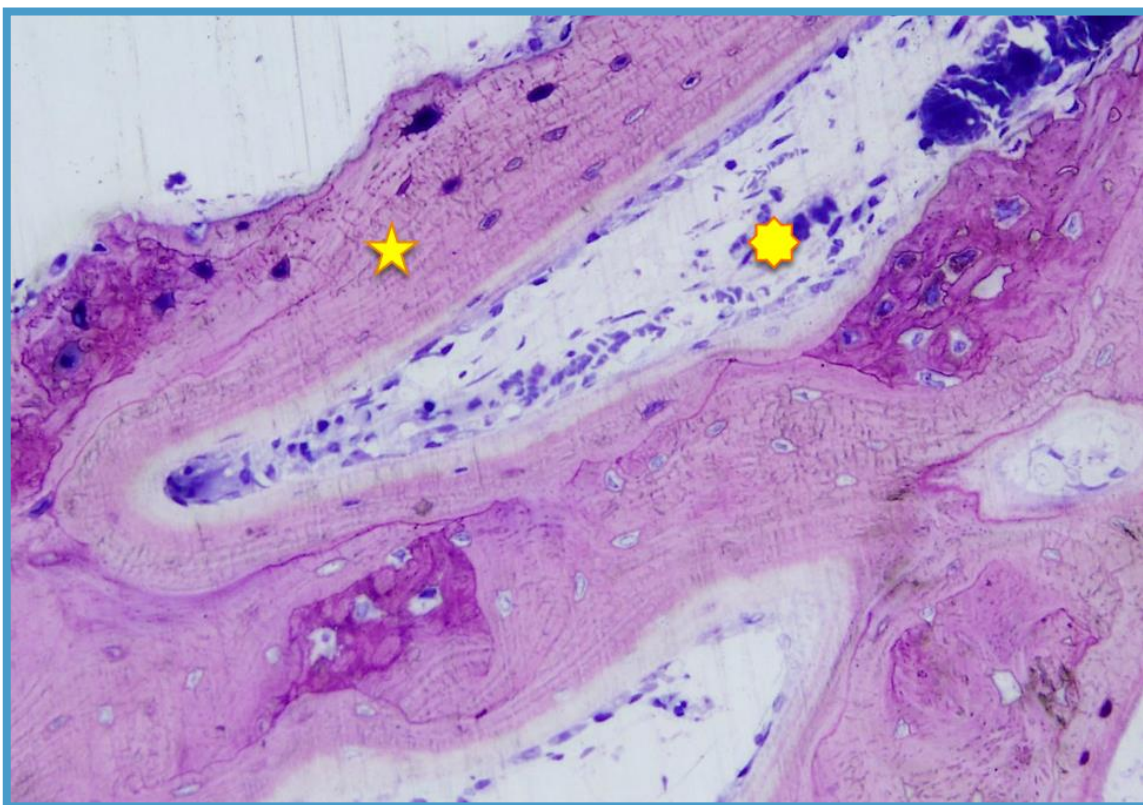


Figura 54: Tejido óseo neoformado (estrella) con trabéculas más ordenadas que en periodos anteriores, con interposición de médula ósea hematopoyética (asterisco). (Lévai-Láczo, 200 X).

4. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO

Los resultados obtenidos del análisis cuantitativo, mediante histomorfometría, de las muestras óseas en los diferentes periodos de nuestro estudio, se describen valorando las modificaciones observadas en:

1. El hueso neoformado tanto alrededor como en el interior del material.
2. El área de contacto entre el material y el hueso neoformado (BIC).
3. El material implantado.
4. La estructura del defecto óseo cortical.

4.1. Valoración del hueso neoformado

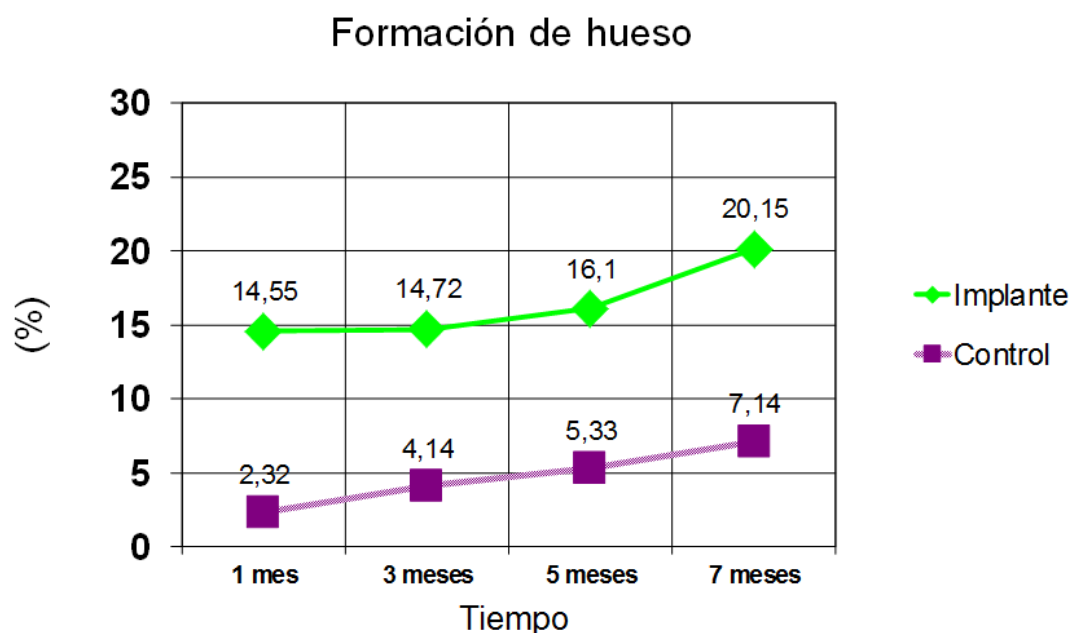
En el estudio histomorfométrico se puso de manifiesto el incremento de la cantidad de hueso neoformado en el grupo implantado con respecto al grupo control, para todos los periodos de tiempo analizados, siendo las diferencias significativas para el último periodo de 7 meses ($7,13 \pm 3,01^*$ vs $20,14 \pm 1,64^*$) y que representaban aproximadamente un 7% vs el 20%, respectivamente (Tabla 9 y Gráfica 5).

HUESO NEOFORMADO (%)	CONTROL	CON IMPLANTE
1 MES	$2,32 \pm 2,12$ (2,32)	$14,55 \pm 2,62$ (14,55)
3 MESES	$4,14 \pm 1,02$ (4,14)	$14,72 \pm 2,85$ (14,72)
5 MESES	$5,32 \pm 3,13$ (5,33)	$16,09 \pm 4,87$ (16,10)
7 MESES	$7,13 \pm 3,01^*$ (7,14)	$20,14 \pm 1,64^*$ (20,15)

Tabla 9: Análisis histomorfométrico de la muestra analizada. Hueso neoformado con valores expresados como media (%) \pm DS y mediana (X).

(*) Diferencias significativas $p < 0,05$.

Test de Friedman para muestras no paramétricas en comparativa de medianas.



Gráfica 5: Incremento de hueso neoformado en el interior de la lesión experimental practicada tanto en los huesos con implante (verde) como en las muestras control (morado).

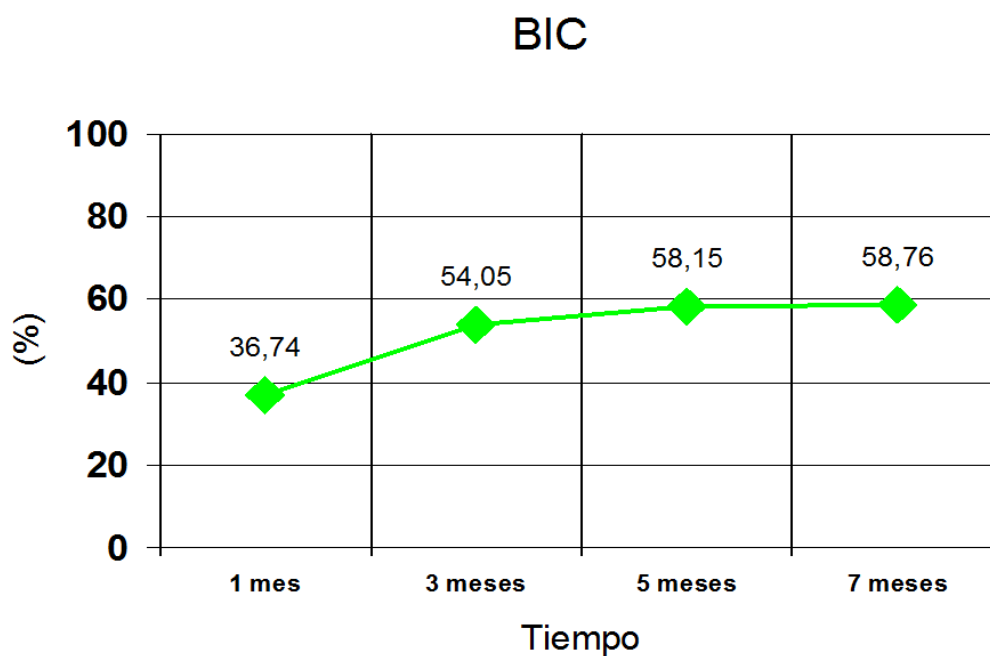
4.2. Valoración del área de contacto entre el material y el hueso neoformado

En cuanto al contacto del hueso con el implante (BIC), pudimos observar un aumento progresivo en el mismo desde el primer periodo de estudio (1 mes), con valores de $36,73 \pm 3,43\%$, llegando a alcanzar un $58,76 \pm 2,81\%^*$ en el periodo final (7 meses), debido a que existía una estrecha relación de superficie entre el hueso neoformado y el material implantado, observándose numerosas interdigitaciones en la interfase entre ambos como consecuencia de la actividad resortiva en la superficie del mismo. El patrón de reabsorción era agudo o en picos por lo que en el momento del análisis se considera de alta velocidad. (Tabla 10, Gráfica 6 y Figura 55).

	1 MES	3 MESES	5 MESES	7 MESES
BIC	36,73 ± 3,43 (36,74)	54,05 ± 2,11 (54,05)	58,16 ± 3,84 (58,15)	58,76 ± 2,81* (58,76)

Tabla 10: Análisis histomorfométrico de la muestra analizada. Área de contacto entre el material y el hueso neoformado (BIC) con valores expresados como media (%) ±DS y mediana (X). (*) Diferencias significativas $p < 0,05$.

Test de Friedman para muestras no paramétricas en comparativa de medianas.



Gráfica 6: Incremento de la superficie del implante en contacto con hueso (BIC).

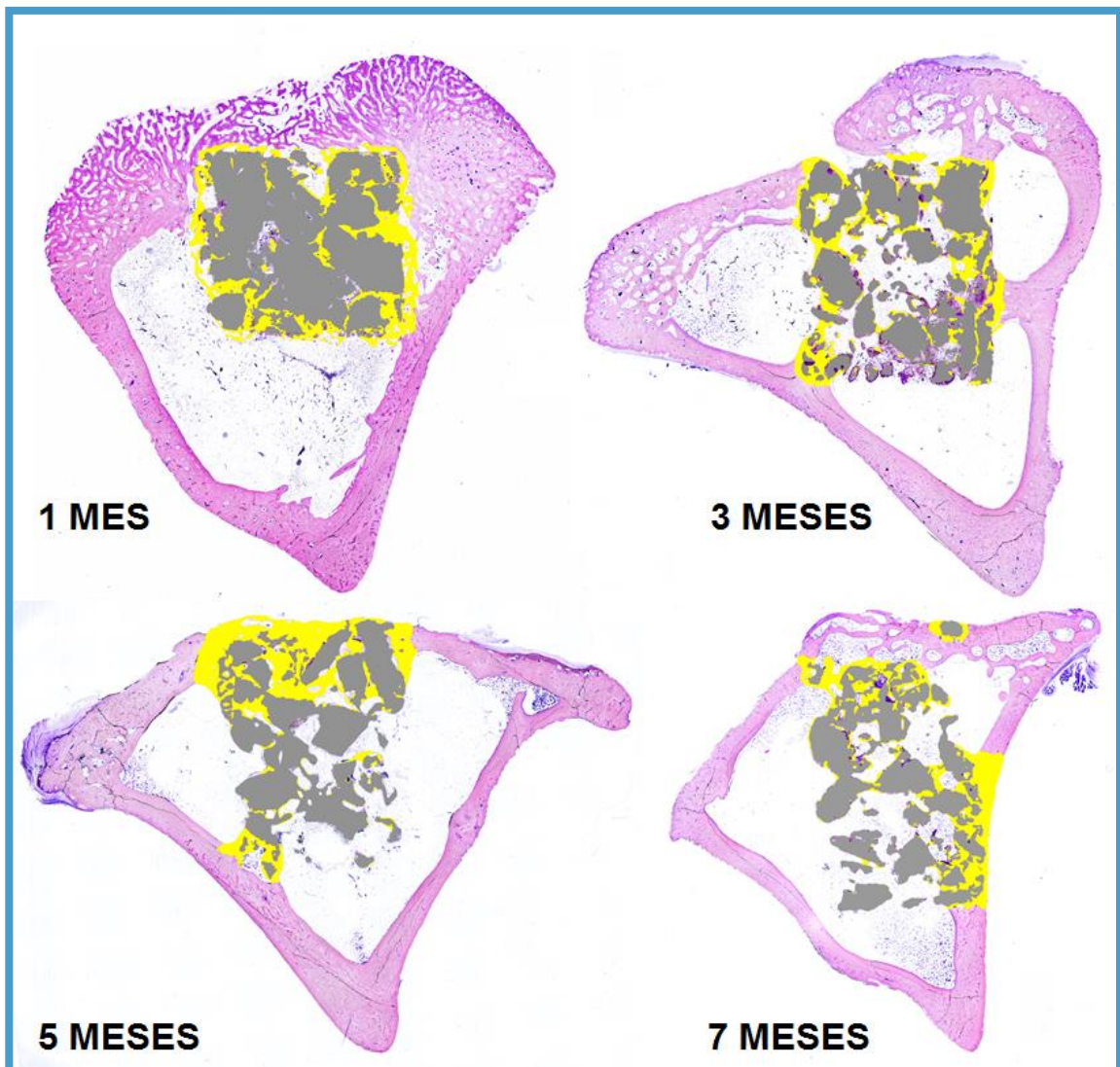


Figura 55: Microfotografías representativas de las secciones histológicas que incluyen el material implantado correspondientes a los cuatro periodos de estudio (1, 3, 5 y 7 meses). En amarillo el hueso neoformado en contacto directo con el material, en color gris el material. (Levai-Laczko, 31.2X).

4.3. Valoración del material residual

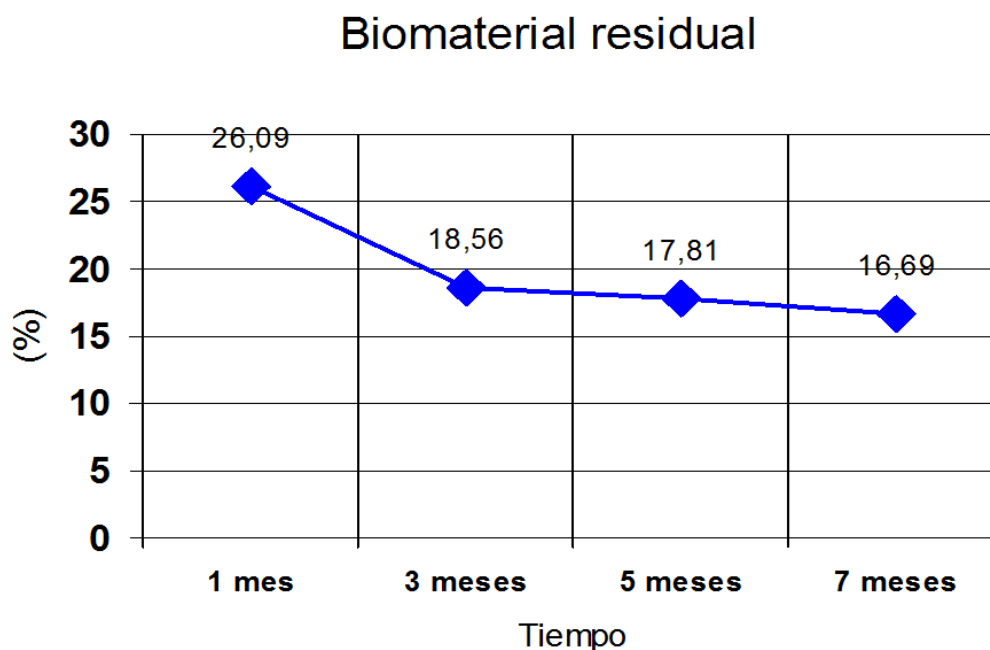
El estudio histomorfométrico mostraba una reducción del implante de forma progresiva a lo largo de todo el periodo de estudio, alcanzando en el último periodo (7 meses) un $16,69 \pm 2,16\%$, lo que suponía una reducción global del material, quedando un 16% del mismo (Tabla 11 y Gráfica 7).

	1 MES	3 MESES	5 MESES	7 MESES
IMPLANTE	$26,09 \pm 2,01^*$ (26,09)	$18,08 \pm 3,75$ (18,56)	$17,81 \pm 1,96$ (17,81)	$16,69 \pm 2,16$ (16,69)

Tabla 11: Análisis histomorfométrico de la muestra analizada. Biomaterial residual con valores expresados como media (%) \pm DS y mediana (X).

(*) Diferencias significativas $p < 0,05$.

Test de Friedman para muestras no paramétricas en comparativa de medianas.



Gráfica 7: Valores obtenidos correspondientes al material residual.

4.4. Valoración del defecto óseo cortical

Mediante estudio histomorfométrico se ha estudiado el cierre del defecto óseo cortical, tanto lineal como en volumen.

De esta manera se pudo observar que, en las muestras con implante, el hueso cortical neoformado aumentaba gradualmente, llegando a apreciarse un cierre lineal del 93% al final del estudio.

En cuanto a las muestras control también existía, a nivel del defecto óseo, un incremento de hueso cortical, aunque en menor medida que el observado en aquellas en las que se había implantado el biomaterial objeto de estudio (Tabla 12 y Gráficas 8 y 9).

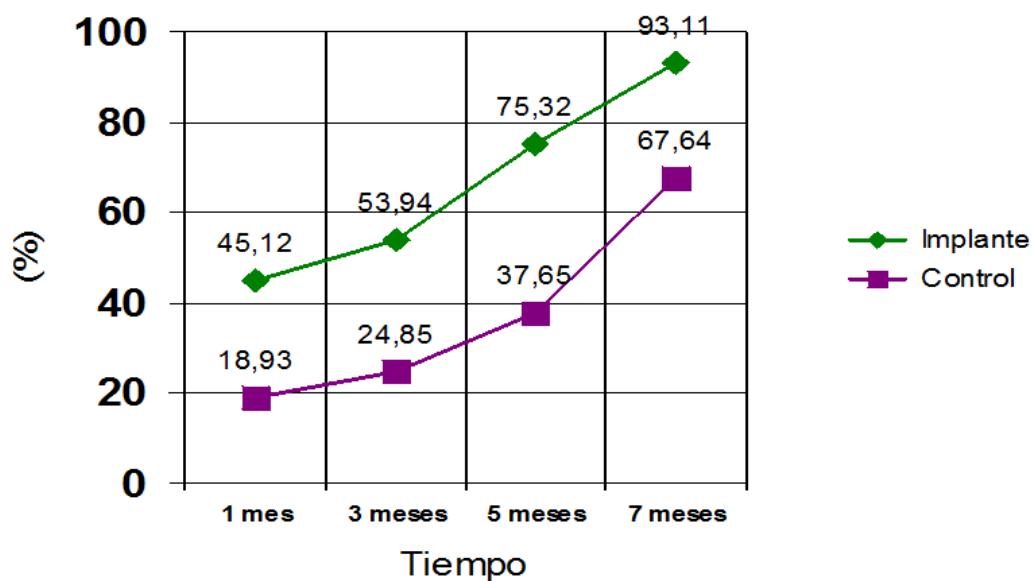
	CIERRE CORTICAL (LINEAL)		CIERRE CORTICAL (VOLUMEN)	
	CONTROL	CON IMPLANTE	CONTROL	CON IMPLANTE
1 MES	18,93 ± 2,01 (18,93)	45,12 ± 3,01 (45,12)	4,83 ± 2,01 (4,83)	18,46 ± 3,83 (18,46)
3 MESES	24,84 ± 1,69 (24,85)	53,93 ± 4,17 (53,94)	12,01 ± 1,63 (12,01)	34,65 ± 2,94 (34,65)
5 MESES	37,65 ± 3,94 (37,65)	75,32 ± 2,43 (75,32)	25,93 ± 1,32 (25,94)	46,72 ± 1,73 (46,72)
7 MESES	67,63 ± 3,70 (67,64)	93,11 ± 1,04* (93,11)	37,43 ± 2,01 (37,44)	54,81 ± 2,04* (54,81)

Tabla 12: Análisis histomorfométrico de la muestra analizada. Cierre cortical en volumen y lineal con valores expresados como media (%) ±DS y mediana (X).

(*) Diferencias significativas $p < 0,05$.

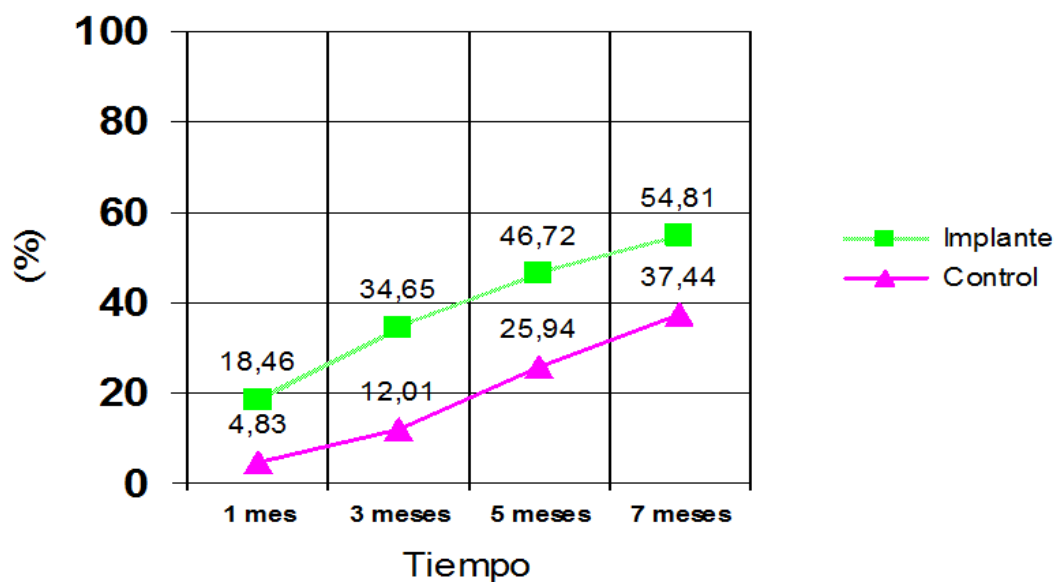
Test de Friedman para muestras no paramétricas en comparativa de medianas.

Cierre cortical lineal



Gráfica 8: Aumento en el cierre lineal de la cortical ósea tanto en los huesos con implante (verde) como en las muestras control (morado).

Cierre cortical en volumen



Gráfica 9: Aumento en el cierre en volumen de la cortical ósea tanto en los huesos con implante (verde) como en las muestras control (rosa).

VII. DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

La sustitución o reemplazamiento del tejido óseo ha sido objeto de investigación desde hace más de 30 años, dado el alto interés que suscita en el campo de la cirugía reconstructiva osteoarticular, y la evidente necesidad de resolver el problema que supone la existencia de defectos óseos secundarios a diferentes patologías, tal y como hemos mencionado anteriormente.

Hoy día, los cirujanos tienen en su arsenal terapéutico una amplia variedad de materiales para injertar, de origen biológico o sintético.

En las últimas décadas se ha incrementado de forma exponencial la utilización de tejido óseo, tanto autólogo como alogénico, en la práctica habitual de distintas especialidades, fundamentalmente Cirugía Ortopédica y Traumatología, Cirugía Maxilofacial, Neurocirugía y Odontología. El hueso esponjoso autólogo continúa siendo considerado el “gold standard”, por ser el material más fiable al poseer propiedades osteogénicas, osteoinductoras y osteoconductoras, triada de la regeneración ósea, imprescindibles para que tenga lugar el proceso de reparación de un defecto óseo

de cualquier etiología. Además, el injerto autólogo no transmite enfermedades, no causa reacciones inmunes, y es reabsorbido gradualmente mientras es reemplazado por tejido óseo neoformado. Por estas razones es el tejido más frecuentemente trasplantado después de la sangre y la piel. Sin embargo, este procedimiento presenta ciertas desventajas, como es la comorbilidad postoperatoria a nivel local en el lugar de la extracción del injerto (dolor crónico, fracturas, cicatriz, lesiones nerviosas o vasculares, pérdida sanguínea, hematomas, infección, etc) ²⁷⁻³⁰, además de una reserva ósea limitada, así como la disponibilidad variable. Por otro lado, los aloinjertos en sus diversas variantes conllevan un elevado gasto económico ³⁵. Estas han sido razones más que suficientes para impulsar la búsqueda de soluciones alternativas, como son los sustitutos óseos, tanto naturales como de síntesis.

En los años 90 surgió en el mundo científico el deseo de incorporar las propiedades más favorables de diferentes materiales para la consecución de un injerto óseo sintético verdaderamente eficaz. Para ello los estudios se han focalizado desde entonces en el desarrollo de nuevos productos de síntesis que, desde el punto de vista funcional, puedan realizar el mismo papel del injerto óseo autólogo, evitando las complicaciones o desventajas que conlleva su obtención.

Es de gran relevancia clínica que estos sustitutos, independientemente de su origen, composición, o propiedades físico-químicas, sean reabsorbibles a medio plazo, al mismo tiempo que son reemplazados por tejido óseo neoformado.

Hay diversos tipos de sustitutos óseos, con características que los individualizan, diferenciándolos de los demás, y que presentan ventajas e inconvenientes a la hora de su utilización en la práctica clínica. Sin embargo, a día de hoy, aún no se ha conseguido desarrollar el biomaterial que reúna todas las características del hueso autólogo, y que por tanto podría ser considerado como el sustituto óseo ideal. Es por ello que la tendencia actual es la experimentación con combinaciones de estos materiales, incluso asociándolos con sustancias biológicamente activas, capaces de estimular o promover la formación ósea (factores de crecimiento, trasplantes celulares, terapias de liberación génica, etc.) ⁹⁸.

En las dos últimas décadas, nuestro grupo de investigación ha centrado sus estudios en las cerámicas: fosfato tricálcico/colágena (Úbeda Martínez⁹², 1994) hidroxiapatita/colágeno (Galián Cánovas⁹³, 1995), espuma de hidroxiapatita (Lax Pérez⁹⁴, 2004), biovidrio 58S (Ros Nicolás⁹⁵, 2006), hidroxiapatita (Muñoz Ruiz-Séiquer⁹⁹, 1999), vitrocerámica del sistema $\text{CaSiO}_3\text{-SiO}_2\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)$ (Clavel Rojo¹⁰⁰, 2010), o β TCP -colágeno (Meseguer y cols¹⁰¹⁻¹⁰², 1994-1995). Resulta evidente que una gran mayoría tratan sobre las cerámicas de fosfato cálcico como potenciales sustitutos de los injertos óseos, y es que este tipo de materiales ocupan un lugar importante dentro del campo de las biocerámicas, ya que por sus propiedades químicas y biológicas, similares al componente mineral del hueso, son capaces de unirse químicamente al mismo. A su vez presentan una excelente biocompatibilidad, al no presentar toxicidad local o sistémica, respuesta inflamatoria ni reacción a cuerpo extraño; esto se debe a que los únicos metabolitos de estas biocerámicas son iones de fosfato de calcio. Además son osteoconductoras, es decir, que tienen una estructura porosa tridimensional capaz de dar soporte y dirigir el crecimiento de hueso neoformado.

Estas cerámicas se utilizan para relleno de defectos óseos bajo diversas presentaciones, bien como granulado o en forma de piezas de morfología y porosidad variables. También se usan en forma de pasta inyectable para poder adaptarlas a defectos amorfos, y pudiéndose aplicar mediante técnicas mínimamente invasivas como es la vía percutánea¹⁰³. Otra alternativa interesante, desde el punto de vista clínico, es su aplicación como recubrimiento de prótesis metálicas, con el fin de conseguir una mejor fijación biológica de éstas al hueso receptor. En nuestro caso hemos empleado piezas cilíndricas porosas que se adaptan al defecto creado en tibias de conejos.

Hoy día se ha intensificado la investigación en cerámicas basadas en fosfato cálcico dopadas con silicio, debido a la capacidad del silicio para influir en la formación de hueso, mejorando la osteogénesis. Carlisle¹⁰⁴ demostró con su trabajo que el silicio se encuentra localizado en la zona de crecimiento activo de los huesos, mejorando la tasa de reabsorción y la dureza del mismo. Por otra parte, la carencia de silicio afecta a la tasa de calcificación de los huesos, y puede ser un factor importante en los trastornos caracterizados por un desequilibrio en la formación y la reabsorción ósea⁷⁹. Es por estas

excelentes características de bioactividad y biocompatibilidad que estos materiales se han convertido en candidatos prometedores para la reparación y la sustitución ósea, y por lo que nuestro grupo de investigación, en los últimos años, ha centrado sus esfuerzos en el estudio y desarrollo del sistema TCP – silicato dicálcico, del que nos hemos ocupado en este trabajo ^{85-87, 89, 105-107}.

Sin embargo, es bien conocida la dificultad de preparar materiales cristalinos basados en silicatos y fosfatos cálcicos, motivo por el que aumenta la complejidad de la investigación de estos materiales, siendo uno de los principales problemas de estas cerámicas que no pueden mantener estructuras cristalinas monofásicas estables cuando se añade más de un 8% de silicio ¹⁰⁸.

La metodología empleada para cuantificar la formación ósea en defectos óseos creados de forma artificial es muy variable. En la literatura encontramos estudios realizados sobre diferentes especies (ratones ¹⁰⁹⁻¹¹⁰, ratas¹¹¹, cerdos ¹¹², etc). Los animales grandes como los perros o los primates requieren de la aprobación por parte de un comité central de ética para su utilización, mientras que los animales menores como las ratas, los ratones o los conejos sólo precisan una aprobación por parte de un comité local, por lo que son más accesibles ¹¹³. Por otra parte, la elección del modelo animal puede marcar diferencias en los resultados obtenidos incluso utilizando el mismo biomaterial y en los mismos periodos de estudio. Este hecho puede ser atribuido a variaciones en el proceso de reparación en cada especie animal, que incluso puede estar influenciado por el lugar anatómico en donde se ha realizado el defecto óseo. Esto significa que cualquier diferencia observada no puede ser imputada únicamente al método de obtención del material, que sin lugar a dudas puede afectar a sus propiedades mecánicas y su comportamiento biológico.

Dada la rápida actividad metabólica de los conejos albinos de Nueva Zelanda, numerosos estudios han establecido la validez de este modelo animal para el estudio experimental de biomateriales ¹¹³⁻¹¹⁶, y es el más usado en nuestro grupo de investigación. Otras ventajas de su uso son la menor agresividad de esta raza, y que

tiene menos problemas de salud comparada con otras variedades de conejos, además de presentar un ciclo vital corto y ser más económicos¹¹³.

El tipo de hueso utilizado para realizar el defecto óseo puede tener un origen mesenquimal, como la bóveda craneal^{111, 117} o la mandíbula¹¹², o de origen endcondral como el fémur¹¹⁶, la tibia¹¹⁴, el húmero, y cúbito y radio. De todos ellos, la cara interna de la tibia ha demostrado ser un modelo reproducible y fiable para la medición cualitativa (radiológica e histológica) y cuantitativa (micro-TC e histomorfometría) de la osteointegración de biomateriales, siempre que se lleve a cabo de una forma estandarizada¹¹⁸.

Además, el tamaño del defecto y su posición en el hueso difiere en los distintos estudios consultados. El diámetro medio de la diáfisis tibial de un conejo de 3 kg es de 5 mm, lo que la hace insuficiente para la implantación, mientras que los implantes en la zona epifisaria pueden afectar a la superficie articular, por lo que preferimos la metáfisis del hueso. El tamaño de los defectos en tibias para individuos de alrededor de 3 kg de peso rondan los 5 mm de diámetro, ya que presentan mayor dificultad para su cierre espontáneo, pudiendo demostrarse el potencial regenerativo del biomaterial a estudio¹¹⁹. En nuestro caso utilizamos una broca de 4,5 mm por su accesibilidad, dado su empleo en Traumatología y Cirugía Ortopédica. Sólo se atraviesa una cortical debido a que una de las mayores complicaciones de este tipo de cirugía en conejos es la fractura del hueso perforado, lo que puede derivar en la muerte del conejo debido a un embolismo graso o a un éctasis intestinal secundario¹¹³.

La ingeniería de tejidos constituye un campo emergente de la medicina regenerativa de carácter multidisciplinar, en el que confluyen la ingeniería de materiales y la química con la biología, con el fin de desarrollar construcciones biológicas con capacidad de reparar o reemplazar las funciones biológicas del tejido dañado¹²⁰. Esta innovadora tecnología utiliza matrices tridimensionales porosas o andamios para afrontar el reto de solucionar los crecientes problemas relacionados con la regeneración del tejido óseo. Las matrices permiten el desarrollo de tejido neoformado a través de su estructura, permitiéndole al implante adquirir propiedades mecánicas muy similares a

las del hueso natural, y evitando así la osteopenia asociada al uso de implantes protésicos. Para poder cumplir su cometido, las matrices deberían poseer buena bioactividad, biodegradabilidad, y biocompatibilidad, presentar una estructura porosa adecuada para permitir y promover la proliferación celular, el crecimiento vascular, y el transporte de nutrientes en su interior, poseer una morfología de superficie y unas propiedades fisicoquímicas adecuadas para estimular la señalización celular, y ser fáciles de conformar para poder personalizar la forma de las mismas y poder así adaptarlas a un daño óseo específico.

Ya vimos en el apartado de antecedentes que las cerámicas pueden presentar tres tipo de uniones tisulares: fijación mecánica (implantes bioinertes), fijación bioactiva (implantes bioactivos), y sustitución por los tejidos (implantes biodegradables). En cuanto a la **bioactividad**, tanto la HA como el TCP tienen la capacidad de interactuar con los tejidos vivos, estimulando o modulando la actividad biológica del hueso ¹²¹, frente a otros materiales bioinertes que presentan una escasa influencia sobre los tejidos que los rodean, como la alúmina o la zirconia ⁶⁵. Sin embargo, la estabilidad química de la HA reduce su solubilidad en comparación con el TCP, por lo que pueden quedar restos de HA integrados en el hueso neoformado, mientras que el TCP se reabsorbe ⁶².

La **biocompatibilidad** de las cerámicas se pone de manifiesto con la implantación del material en un tejido, generalmente hueso o músculo. Comúnmente la presencia de un material extraño en nuestro organismo provoca una respuesta inflamatoria de intensidad variable y una reacción a cuerpo extraño, fenómenos de necrosis local, seguidos de la formación de una cápsula fibrosa que aísla al huésped del implante. Este fenómeno de encapsulación, acompañado de una respuesta inflamatoria leve o moderada, se puede observar incluso en materiales biocompatibles pero de naturaleza inerte. Sin embargo, en el caso de los fosfatos de calcio, dicha cápsula fibrosa se encuentra ausente en la interfase implante-huésped, existiendo una íntima unión entre la cerámica y el tejido receptor, quedando así demostrada su **osteointegración**, tal y como se ha visto en alguno de los estudios de nuestro equipo, como los realizados por Galián Cánovas ⁹³ y Lax Pérez ⁹⁴ con compuestos de

hidroxiapatita, o en los estudios de Gatti y cols.¹²² con materiales bifásicos de hidroxiapatita y fosfato tricálcico.

En cambio, no se ha podido demostrar la osteointegración con el uso de otros materiales, observándose la presencia de una intercapa fibrosa entre estos y el tejido huésped, tal y como se ha visto, entre otros, en los estudios previos realizados por otros miembros de nuestro equipo de investigación, como García Noalvos¹²³ y Santonja Medina¹²⁴, con la utilización de esteropolímeros de ácido poliláctico (PLA).

En nuestro estudio, los hallazgos observados después de la implantación intraósea del material, han permitido establecer la biocompatibilidad del material Nurse A - Silicocarnotita, puesto que no hemos observado la existencia de una respuesta inflamatoria destacable. La interfase cerámica-hueso sufre, en los periodos iniciales, una proliferación fibroblástica, que es sustituida más tarde por tejido óseo trabecular de características normales. Tampoco hemos apreciado, en ninguna de las secciones de los estudios anatomopatológicos, la presencia, a modo de cápsula, de fibrosis entre la cerámica y el hueso huésped. Además, mediante los estudios radiológicos se ha podido comprobar que el material no provoca cambios locales desde el punto de vista macroscópico, ya que las características del hueso adyacente son iguales a las observadas en el hueso no implantado del mismo animal. Esto, junto al hecho de observar crecimiento óseo tanto en la periferia como en el interior del implante, tanto en estudios de radiología, como en los anatomopatológicos e histomorfométricos, confirma la capacidad de osteointegración del material empleado en este estudio. La principal razón de la biocompatibilidad de estos materiales con una base de fosfato cálcico, es que el fosfato cálcico es el principal componente inorgánico de los tejidos duros, y los iones liberados del material pueden incorporarse sin dificultad a las vías metabólicas de dichos tejidos. El hecho de no incluir durante el proceso de preparación componentes orgánicos, por razones técnicas relacionadas con el uso de elevadas temperaturas, no interfiere en su interacción con los tejidos circundantes.

La **osteoconducción** (capacidad de los materiales de proporcionar el andamiaje o la guía conductora que facilita que el tejido óseo crezca en su interior) es otra de las propiedades que hemos pretendido desarrollar en nuestro biomaterial. En nuestro experimento hemos tenido la ocasión de observar, en los estudios anatomopatológicos y por radiología simple, el crecimiento de tejido óseo en todas las muestras, desde el primer mes hasta la última etapa del estudio (7 meses), produciéndose éste de forma centrípeta desde la periferia del material hacia el interior del mismo. Este proceso de aposición ósea se llevó a cabo directamente sobre el material sin interposición de tejido conectivo.

En el estudio realizado en 1990 por Gatti y cols.¹²² mediante la implantación de gránulos de HA y TCP en hueso mandibular de ovejas, se pudo observar que, mientras que la HA no interactuaba con el crecimiento del hueso, en el caso del TCP se liberaban pequeños iones en su reabsorción que inducían la reconstrucción ósea, demostrando su osteoconductividad.

Hasta hace unos años, uno de los problemas más frecuentemente encontrados en la investigación de los biomateriales como sustitutos óseos, era la dificultad para cuantificar la formación de hueso nuevo, tanto en el interior como alrededor de los injertos o implantes, ya que la radiología y los estudios anatomopatológicos ofrecen resultados con un componente subjetivo importante, a pesar de que se realicen estudios a doble ciego y sean pruebas relativamente accesibles. Sin embargo, con el desarrollo de los estudios por micro-TC e histomorfométricos estos problemas se han visto resueltos, ya que podemos obtener una cuantificación objetiva de la formación de hueso, así como de otros parámetros. En nuestro estudio hemos usado ambas pruebas, pudiendo contabilizar ese incremento de hueso neoformado ya visto en los estudios anatomopatológicos y por radiología convencional. Cuando comparamos los resultados obtenidos en las muestras con el implante con los del grupo control, hemos observado un incremento mayor de volumen de hueso neoformado (20% implantados, 7% control), con un cierre cortical más rápido y con mayor cantidad de hueso (93% implantados, 67% control).

Para comprender mejor el concepto de osteoconducción debemos referirnos al término de **porosidad del material**, factor muy importante que lleva a la integración entre el tejido vivo y el implante cerámico. Hay varios aspectos influyentes, como son el tamaño del poro, la interconexión entre ellos, y el volumen total de poros del material respecto al volumen de la muestra ^{42, 91, 93, 125}.

Las cerámicas pueden presentar poros de diferente tamaño, y en ocasiones pueden carecer de interconexiones entre ellos, por lo que, cuando son usadas como injerto, durante el proceso de crecimiento óseo centrípeto, debe producirse de forma simultánea la reabsorción del material para que dicho crecimiento se produzca. Este proceso ha sido estudiado, desde hace varios años, por distintos miembros de nuestro grupo (Meseguer Olmo, Vicente Vicente, y cols ^{91, 101, 102, 126-128}).

La microporosidad juega un papel importante en el proceso de bioreabsorción del material, mientras que la macroporosidad está ligada a la osteoconducción. Así, una porosidad de entre 400 y 600 μm facilita la infiltración del material por tejido fibrovascular, así como su revascularización, permitiendo la regeneración ósea. Como contrapartida, el aumento de la macroporosidad trae como consecuencia un debilitamiento de la cerámica, ya que existe una relación inversamente proporcional entre ésta y la resistencia mecánica.

La tendencia actual es utilizar materiales con comprobada capacidad osteoconductiva, y realizar modificaciones precisas para aumentar sus propiedades como sustitutos óseos, entre las que se encuentra la porosidad global. Hemos observado en la bibliografía que se utilizan materiales con porosidades algo inferiores a nuestro estudio, como Itoh y cols ¹²⁹, que en 1994 desarrollaron una cerámica de HA con una porosidad del 70%, o Niu y cols ¹³⁰, que en 2002 crearon una cerámica de HA con porosidad de 50-70%. Ese mismo año, Li y cols ¹³¹ estudiaron la formación de una cerámica de HA macroporótica utilizando HA y PMMA en proporción 1:1, con lo que obtuvieron una cerámica con una porosidad del 50%; sin embargo, cuando intentaron aumentar la porosidad añadiendo más resina PMMA, se destruyó la muestra, lo que indica la existencia de dificultades en el proceso de conseguir aumentar la porosidad, así

como los límites entre los que puede oscilar ésta según la técnica utilizada. De esta manera, también en 2002, Rodríguez-Lorenzo y cols ¹³² describieron el medio de obtención de cerámicas macroporóticas de HA mediante la técnica de consolidación de almidón, obteniendo una porosidad del 45-70%, y al año siguiente Jun y cols ¹³³ crearon una nueva cerámica, con una porosidad del 75-90%, por medio de un método de esponja de poliuretano y técnicas de capa múltiple. En nuestro grupo Lax ⁹⁴, en 2004, desarrolló una espuma de HA con una porosidad global del 80-90%, conservando sus propiedades mecánicas y sin perder resistencia a las fuerzas de compresión.

La caracterización física de nuestro implante mediante porosimetría de mercurio muestra una porosidad total del 76%, con un 65% de poros de tamaño inferior a 100 μm , por lo que es un material altamente bioreabsorbible, además de presentar un 15% de poros mayores de 1 mm, lo que favorecería su osteoconductividad. En este sentido, en nuestro estudio también destaca el hecho de que, al contrario de algunas teorías que abogan por la dificultad de crecimiento óseo efectivo en cerámicas de poros menores de 100 μm (Klawitter y Hulbert ¹³⁴), hemos podido observar en los estudios anatomopatológicos que nuestro material presenta un gran número de interconexiones entre los poros que favorece el crecimiento óseo en su interior. Es lo que se conoce como porosidad abierta, con la que se obtiene una presión parcial de oxígeno en el interior del implante igual a la del exterior del mismo, condición que actuaría favoreciendo el crecimiento del tejido óseo en su interior. Con micro-TC pudimos comprobar, no sólo la existencia previa de poros abiertos en el material (35%), sino el aumento en el número de los mismos a lo largo de las etapas del estudio (68%), así como un aumento en la conectividad en la estructura (número Euler, que aumenta de -686 en el primer mes a -119 en el séptimo). Por el contrario apreciamos una reducción del volumen ocupado por poros cerrados, pasando de ser un 0,2% en el primer periodo de estudio, a un 0,008% en el cuarto. Esto coincide con los resultados de Schepers y col. ⁶⁰, que consideran que la existencia de conexiones interporos facilita el crecimiento óseo en su interior.

Por otro lado, con los estudios histomorfométricos hemos podido contabilizar un aumento significativo en el área de contacto del material con el hueso neoformado (del 36% en el primer mes, al 58% a los siete meses), observándose numerosas interdigitaciones en la interfase entre ambos. Este hecho confirma lo que ya había sido descrito previamente por autores como Eggli y cols.¹³⁵, quienes observaron mejores resultados con materiales con poros de 50 a 100 μm respecto a los de 200 a 400 μm . De forma adicional, en 2004, Lax⁹⁴ realizó un estudio comparativo con dos tipos de espuma de HA, observando que la neoformación de tejido óseo era más rápida y abundante en los implantes con poros de menor diámetro.

Sin embargo, nuestros estudios difieren de los publicados por Uchida y cols.¹³⁶, que en sus distintos experimentos describieron que el tamaño del poro apropiado para considerarlo como sustituto óseo debía estar comprendido en un rango de 210-300 μm . También Shimazaky y Mooney¹³⁷ observaron crecimiento óseo en mayor proporción cuando los poros del material utilizado eran superiores a 500 μm en comparación con poros de tamaño inferior.

En este punto hay que tener en cuenta que es difícil interpretar correctamente los resultados de los estudios publicados, pues existe una gran variabilidad respecto a las propiedades físicas y químicas de los materiales utilizados, siendo poco específicas, e incluso desconocidas en ocasiones, por lo que los resultados entre los distintos estudios no pueden ser comparables usando la porosidad como único parámetro de estudio.

En cuanto a la **biodegradabilidad** del material Nurse A - Silicocarnotita, este fenómeno se dio parcialmente, ya que parte del mismo permaneció en el lugar de implantación al final del estudio (7 meses). La evolución del material después de su implantación ha sido valorada mediante estudios radiológicos convencionales en los que, a los tres meses de la implantación (Grupo II), ya se observa una clara disminución significativa de la densidad radiológica, con irregularidades en su superficie que van aumentando a lo largo de las etapas de estudio hasta perder la forma cilíndrica del implante a los siete meses (Grupo IV), en los que se observan unos contornos mal definidos. A su vez, la cortical externa ya aparece reparada en el grupo II, aunque la

densidad radiológica no es máxima hasta el último periodo de estudio. Las trabéculas óseas neoformadas van presentando continuidad con el material implantado, con la presencia de trabéculas óseas en su interior.

Igualmente, en las imágenes tridimensionales del estudio con micro-TC se aprecia una progresiva reducción del material con aumento de irregularidades en su superficie. Esto se correlaciona con los resultados numéricos obtenidos en los que se aprecia la reabsorción del 70% del material al finalizar el estudio. Este volumen ocupado por el implante va siendo sustituido por un incremento progresivo de hueso que va ocupando la lesión ósea que creamos

En lo que respecta al estudio anatomopatológico, al mes de la implantación (Grupo I) se puede observar el material implantado con su arquitectura original, aunque sin ser homogéneo, dada la presencia de poros comunicados entre sí a lo largo de todo el material, como hemos visto anteriormente. Estos poros van confluyendo a lo largo del estudio dada la reabsorción del material, hasta presentar el implante un aspecto granular en el último periodo. Ya en el Grupo I se observa que las trabéculas óseas no sólo rodean el material, sino que empiezan a adentrarse en el mismo, llegando a fusionarse a los cinco meses (Grupo III), adquiriendo el aspecto de una red que ocupa toda la extensión del implante y que, a los 7 meses de la implantación, va siendo sustituida por médula ósea hematopoyética de forma centrípeta. El hecho de que, desde el primer periodo de estudio, pueda observarse un cambio en el color del material, variando del negro al grisáceo en algunas áreas, podría constituir un indicador de que se ha producido cierto grado de disolución química pasiva del material después de ser implantado. Esta observación se apoya en el hecho de que estos materiales, una vez sumergidos en un líquido tampón PBS (pH 7,4) o agua desionizada (MiliQ), muestran una superficie dinámica, en el sentido de que son capaces de liberar en estos medios iones de calcio, fósforo y silicio (datos no mostrados en este estudio), elementos que confieren anatomopatológicamente el matiz negro y la mayor densidad radiológica. Esta primera acción podría ser el origen de la producción de pequeños fragmentos, de tamaño suficiente para que se inicie la actividad fagocítica con la que se completará la reabsorción del material.

En el estudio histomorfométrico, se puede contabilizar la reducción del implante de forma progresiva a lo largo del estudio, quedando a los 7 meses un 16% del volumen del implante inicial, lo que implica una reducción casi completa.

Las características anteriormente descritas demuestran por tanto la existencia de un fenómeno de reabsorción progresiva del material caracterizado, desde los primeros periodos del estudio, por una pérdida progresiva del aspecto cilíndrico del implante, adquiriendo una forma ovalada de bordes ligeramente irregulares, que se hace más patente a partir del quinto mes de la implantación. Dicho proceso de reabsorción se realiza, principalmente, mediante un mecanismo celular de fagocitosis, que se pone de manifiesto con la aparición de lagunas o áreas de reabsorción en la superficie del material, junto a la presencia de células multinucleadas de aspecto macrofágico u osteoclástico, en las que se observan partículas de material localizadas a nivel intracelular. Al mismo tiempo que va teniendo lugar el proceso de reabsorción, el tejido óseo neoformado se va depositando, por un lado ocupando esos espacios generados, mientras que otra parte del mismo se deposita directamente sobre la superficie del material.

Los materiales altamente biodegradables son buenos candidatos para la sustitución ósea, ya que también son capaces de liberar iones, incluidos los de silicio, que pueden inducir la proliferación celular y la producción de colágeno en los osteoblastos¹³⁸⁻¹⁴⁰. Este incremento en la proliferación y la actividad de los osteoblastos puede estar mediado por el aumento de factores de crecimiento (TGF- β , BMP-2, fosfatasa alcalina) y sobreexpresión de genes que son necesarios para dicha proliferación y para el remodelado de la matriz extracelular¹⁴¹. Además, el sílice soluble ha demostrado jugar un papel esencial en el entrecruzamiento del colágeno y los proteoglicanos durante el crecimiento óseo¹⁴².

Numerosos estudios han demostrado que el α TCP presenta una tasa alta de reabsorción (Wiltfang y cols.¹⁴³, Kabe y cols.¹⁴⁴, Kihara y cols.¹⁴⁵), característica que, entre otras, lo hace un buen sustituto óseo, a pesar de que dicha tasa de reabsorción es menor que la del β TCP⁷². Sin embargo, hay que tener en cuenta que el balance existente

entre la tasa de degradación del material y el crecimiento de hueso neoformado es crucial, ya que una tasa de reabsorción del material excesivamente alta puede relacionarse, según Okuda y cols.¹⁴⁶, con un exceso de resorción del hueso neoformado. Mate Sánchez de Val y cols.¹⁴⁷, y Velásquez y cols.¹⁴⁸, concluyen en sus respectivos estudios que la tasa de disolución del α TCP disminuye cuando se incorporan iones de silicio a la estructura de la cerámica, consiguiendo un recambio óseo más progresivo y apropiado en términos de cantidad y tiempo, lo que supone una mejora en la integración y compatibilidad, y aumenta la estabilidad física del α TCP.

En nuestro estudio, el material se ha degradado parcialmente sin reabsorberse por completo. Sin embargo, esta reabsorción se produce de manera paralela al incremento de hueso deformado, por lo que podemos afirmar que se produce el fenómeno conocido como “creeping substitution”, descrito por Plemister¹⁴⁹ en 1914, que considera que la incorporación del material al hueso es favorecida por la fragmentación del mismo que produce sustitución continua por el hueso neoformado. El proceso de remodelación ósea que se observa en este fenómeno es muy parecido al que ocurre en el hueso normal, en donde se alternan fenómenos de resorción osteoclástica, creación de nuevas yemas capilares, y estimulación osteoblástica, que da lugar a nuevos sistemas de Havers en el caso de hueso compacto, o a nuevas trabéculas óseas en el caso de hueso esponjoso. Estos acontecimientos podrían explicar las propiedades osteoconductoras que poseen las cerámicas de fosfato cálcico y los biovidrios.

Por otro lado, y dado que analizamos las muestras procedentes de ganglios linfáticos, hígado, riñón y pulmón, podemos afirmar que, en el proceso de reabsorción del material, no se originaron productos intermedios de degradación que se hubieran liberado, pudiendo producir toxicidad a distancia.

Llama la atención la discrepancia existente en los resultados de las distintas pruebas en cuanto a la reabsorción del material. Y es que en la radiología simple podemos observar, al final del estudio, restos de densidad radiológica similar al implante original, lo que podría poner de manifiesto la ausencia de reabsorción o sustitución completa de dicho material por hueso neoformado. Sin embargo, estos restos

de material implantado parecen incluidos dentro de tejido óseo neoformado, lo que podría sugerir que los restos del implante se pueden encontrar incluidos dentro de tejido óseo normal que parece haber cerrado completamente el defecto óseo artificial practicado, lo que justificaría que, con la cuantificación mediante micro-Tc e histomorfometría, y con la observación microscópica de las muestras, los resultados sean distintos.

En resumen, el material Nurse A-Silicocarnotita se ha comportado, en nuestro estudio, como un material bioactivo, biocompatible y biodegradable, que no ha provocado, tras su implantación, una respuesta inflamatoria durante los siete meses de estudio, destacando la ausencia de cápsula fibrosa en la interfase hueso-huésped. Además, ha demostrado ser un biomaterial altamente osteoconductor, permitiendo la rápida formación de un tejido de granulación que es sustituido por tejido óseo trabecular, tanto en la periferia del implante como en su interior, creando una malla que lo incluye en su totalidad, lo que le confiere capacidad regenerativa. Además, es un material bioreabsorbible, tal y como han demostrado los diferentes ensayos llevados a cabo en los distintos periodos de estudio establecidos. Por lo tanto, puede ser considerado como potencial sustituto óseo.

En cuanto al **futuro**, los sustitutos óseos ofrecen hoy en día una amplia variedad de posibilidades terapéuticas para poder reemplazar a los injertos autólogos en determinadas indicaciones clínicas, siempre bajo condiciones estrictas para su uso. La combinación de cerámicas de FC con sustancias o moléculas osteogénicas u osteoinductoras están mostrando excelentes resultados en el tratamiento de grandes defectos segmentarios, donde la osteoconductividad por sí sola es insuficiente para conseguir una reparación sólida, y es en esa línea de investigación, que parece ser prometedora, en la que continuarán los estudios de nuestro equipo.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. El nuevo biomaterial sintetizado Nurse A Phase-silicocarnotita reúne las características fisico-químicas y propiedades mecánicas, porosidad variable y bioactividad adecuadas para cumplir con los estándares de calidad exigidos por las regulaciones vigentes con vistas a su potencial aplicación clínica.
2. Su implantación ósea no provoca respuesta inflamatoria local en ninguno de los periodos estudiados. La interfase cerámica-hueso huésped muestra inicialmente proliferación fibroblástica, sustituida más tarde por tejido óseo trabecular normal, que rodea y sustituye progresivamente al material, sin desarrollo de tejido fibroso, a modo de cápsula, que aisle la cerámica del hueso receptor, ocurriendo por tanto la osteointegración del material, que es colonizado por médula ósea hematopoyética de características normales.

3. El tejido óseo neoformado, desde el primer periodo de implantación, se deposita directamente sobre la superficie de la cerámica introduciéndose, durante su crecimiento, en el interior de sus poros de forma centrípeta, siendo su volumen superior en los implantados respecto a los controles, manteniéndose el crecimiento óseo hasta el final del estudio, siendo de características normales.
4. El material Nurse A Phase-silicocarnotita sufre un proceso de reabsorción parcial progresiva durante el experimento, sin que se originen productos intermedios. La ausencia de restos del material implantado en los órganos analizados, demuestra que el material es biodegradable y no genera productos intermedios citotóxicos detectables.
5. Por todo lo anterior podemos afirmar que el material Nurse A Phase-Silicocarnotita ha demostrado las propiedades que debe reunir un biomaterial óptimo para llevar a cabo la regeneración ósea; ser bioactivo, biocompatible, biodegradable, osteoconductor, osteopromotor y biofuncional, lo que lo sitúan como un óptimo candidato para aplicaciones biomédicas diversas (material de relleno en defectos óseos y recubrimiento de implantes en Cirugía Ortopédica y Traumatología, Cirugía Oral y Maxilofacial, y Neurocirugía).

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Acil Y, Terheyden H, Dunsche A. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51:703-710.
2. Albee F. Studies in bone growth: Triple Calcium P as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg.* 1920; 71:32-36.
3. Stachow, V. Versuch über knochenplombierung bei hohlenförmigen defecten des knochens. *Beitr Klin Chir.* 1984; 12:389-408.
4. Albee F, Morrison H. Studies in bone grown: triple calcium phosfate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg.* 1920; 71:32-39.
5. Williams DF, editor. Definitions in biomaterials. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials; 1986 Mar 3-5; Chester, United Kingdom. Amsterdam: Elsevier: 1987.
6. Wlliams D, Black J, Doherty P, editors. Biomaterials-Tissue Interfaces: proceedings of the ninth European Conference on biomaterials; 1991 Sept 9-11; Chester, United Kingdom. Amsterdam: Elsevier: 1992.

7. Glincher MJ. The nature of the mineral component of bone and mechanism of calcification. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism. Instr Course Lect.* 1987; 36:49-69.
8. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am.* 1984; 15:597-612.
9. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996; 45:371-86.
10. Escarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol.* 1983; 96(3):639-43.
11. Recker RR. Embriology, anatomy, and microstructure of bone. En: Coe FL, Favus MJ, eds. *Disorders of bone and mineral metabolism.* New York: Raven Press; 1992. p.219-40.
12. Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res.* 1978; 25(3):205-7.
13. Marks SC. The origin of osteoclasts: evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra-skeletal source. *J Oral Pathol.* 1983; 12(4):226-56.
14. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 1989; 245(4920):855-7.
15. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect.* 1987; 36:27-48.
16. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone.* 1992;13 Suppl 1:S3-6.
17. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. *N Engl J Med.* 1983; 309(1):29-35.
18. Wulthier RE. A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria and matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res.* 1982; 169:219-42.
19. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res.* 1989; 240:270-80.
20. Singh I. The architecture os cancellous bone. *J Anat.* 1978; 127:305-10.

21. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption: a review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 231:239-71.
22. Anderson HC. Calcification processes. *Pathol Annu* 1980; 15:45-75.
23. Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem.* 2007; 282(2):1193-204.
24. American Academy of Orthopaedic Surgeons, The Committee on Biological Implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83 Supl 2:98-103.
25. Dailiana ZH, Shiamishis G, Niokoou D, Ioachim E, Malizos KN. Heterotopic neo-osteogenesis from vascularized periosteum bone grafts. *J Trauma.* 2002; 53:934-938.
26. Ross N, Tacconi L, Miles JB. Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting. *Br J Neurosurg.* 2000; 14:476-479.
27. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop.* 1996; 329:300-309.
28. Skaggs DL, Samuelson MA, Hale M, Kay RM, Tolo VT. Complications of posterior iliac crest bone grafting in spine surgery in children. *Spine.* 2000; 25:2400-2402.
29. Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am.* 1975; 57 Supl 2:237-252.
30. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop.* 1991; 266:259-270.
31. Burwell RG: The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop* 1985; 200:125-141.
32. Gross JB, Diligent J, Bensoussan D, Galois L, Stoltz JF, et al. Percutaneous autologous bone marrow injection for treatment of delayed and non-union of long bone: A retrospective study of 45 cases. *Biomed Mater Eng.* 2015; 25(1):187-97.

33. Braly HL, O'Connor DP, Brinker MR. Percutaneous Autologous Bone Marrow Injection in the Treatment of Distal Meta-diaphyseal Tibial Nonunions and Delayed Unions. *J Orthop Trauma*. 2013;27(9):527-33.
34. Schachar NS, Henry WB Jr, Wadsworth P, Castronovo FP Jr, Mankin HJ. Fate of massive osteochondral allografts in a feline model. En: Friedlaender GE, Mankin HJ, Sell KW. *Osteochondral Allografts: Biology, Banking and Clinical Applications*. Boston: Little Brown; 1981. p.81-101.
35. Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 2000; 37:138-145.
36. Sandhu HS, Grewal HS, Parvateneni H. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am*. 1999; 30:685-98.
37. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop Clin North Am*. 1999; 30:635-645.
38. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 1999; 30:571-581.
39. Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Baslé MF, Rebel A. Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials*. 1993; 14:507-512.
40. Poumarat P, Squire P. Comparison of mechanical properties of human, bovine bone and a new processed bone xenograft. *Biomaterials*. 1993; 14(5):337-340.
41. Croes EA, Jansen GH, Lemstra AW, Frijns CJ, van Gool WA, et al. The first two patients with dura mater associated Creutzfeldt-Jakob disease in the Netherlands. *J Neurol*. 2001; 248 Suppl 10:877-880.
42. Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am*. 1999; 30:591-598.
43. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2:81-96.
44. Zerwekh JE, Kourosch S, Scheinberg R. Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *J Orthop Res*. 1992; 10:562-572.

45. Muschler GF, Negami S, Hyodo A, Gaisser D, Easley K, Kambic H. Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model. *Clin Orthop*. 1996; 328:250-60.
46. Gao T, Lindholm TS, Marttinen A, Urist MR. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *Int Orthop*. 1996; 20(5):321-5.
47. Boyan BD, McMillan J, Lohmann CH, Ranly DM, Schwartz Z. Bone Graft Substitutes: Basic information for successful clinical use with special focus on synthetic graft substitutes. En: Cato T. *Bone Graft Substitutes*. Rosemont; 2003. p. 231-259.
48. Begley C, Doherty M, Mollan R, Wilson D. Comparative study of the osseointegrative properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials*. 1995; 16:1181–1185.
49. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002; 295:1014-1017.
50. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 2008; 5:1137-1158.
51. Hench LL. *Biomaterials*. *Science*. 1980; 208:826-831.
52. Boutin P. Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1972;58(3):229-46.
53. Ducheyne P, Radin S, Heughbaert C. Calcium phosphate ceramic coating on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum sintering and “*in vitro*” dissolution. *Biomaterials*. 1990; 11:244-54.
54. Cook SD, Thomas KA, Jarcho M. Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopaedic biological attachment system. *Clin Orthop*. 1988; 230:303-12.
55. Serra J, González P, Chiussi S, León B, Pérez-Amor M. Processing of bioglass coatings by excimer laser ablation. *Key Eng Mater*. 2001; 192-5:635-8.
56. Hero H, Jorgensen RB, Ruyter IE. Hydroxyapatite coating on titanium produced by isostatic pressing. *J Biomed Mater Res*. 1994; 28:344-8.
57. Kokubo T, Miyaji F, Kim HM. Spontaneous formation of bonelike apatite on chemically treated titanium metals. *J Am Ceram Soc*. 1996; 79:1127-9.

58. Kulkarni R, Moore RG, Hegyeli AF, Leonard F. Biodegradable polylactic acid polymers. *J Biomed Mater Res.* 1971; 5:169-81.
59. Ciccone W, Motz C, Bentley C, Tasto J. Bioabsorbable implants in orthopaedics: new developments and clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001; 9:280-8.
60. Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil.* 1991;18(5):439-52.
61. En Gannham A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Exp Rev Med Dev.* 2005; 2:87-101.
62. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Control Release.* 2006; 113:102-10.
63. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2001; 55:141-50.
64. Hardouin P, Anselme K, Flautre B, Bianchi F, Bascouleguet G, et al. Tissue engineering and skeletal diseases. *Joint Bone Spine.* 2000; 67:419-24.
65. Vallet-Regi M. Cerámicas. En: Vallet M, Munuera L, editores. *Biomateriales: aquí y ahora.* Madrid: Dykinson SL; 2000. p. 78-79.
66. Hench LL, Wilson J. Introduction. En: Hench LL, Wilson J ed. *An introduction to Bioceramics.* Singapore: World Scientific; 1993. p. 1-24.
67. Hulbert SF, Bokros JC, Hench LL, Wilson J, Heimke G. Ceramics in clinical applications, past, present and future. En. P. Vincenzini, editor. *High Tech Ceramics.* Amsterdam: Elsevier Science; 1987. p.189-213.
68. Hench LL. Prosthetic implant materials. *Ann Rev Mater Sci.* 1975; 5:279-300.
69. De Aza PN, de Aza S. Biocerámicas. En: Sastre R, de Aza S, San Román J, editores. *Biomateriales.* Faenza: Faenza Eritrice Ibérica; 2004. p. 41-64.
70. Ginebra MP, Espanol M, Montúfar EB, Pérez RA, Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2010; 6(8):2863-73.
71. De Carlo B, Sauro S, Deb S, Pitzolu F, Foschi F, et al. Porosity, micro-hardness and morphology of white and gray Portland cements in relation to their potential in the development of new dental filling materials. *J Adhes Sci Technol.* 2012; 26:19-26.

72. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, et al. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res.* 2002; 63(Suppl 2):115-21.
73. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res.* 1981; 157:259-78.
74. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001; 71(Suppl 6):354-61.
75. Blom EJ, Verheij JG, de Blicck-Hogervorst JM, Di Silvio L, Klein CP. Cortical bone in growth hormone-loaded grooved implants with calcium phosphate coatings in goat femurs. *Biomaterials.* 1998; 19(Suppl 1):263-70.
76. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med.* 2006; 17:967-78.
77. Hench LL, Clark AE. Reaction mechanisms at bioceramic interfaces. *J Am Ceramic Soc.* 1970;49(4):481.
78. Liu X, Morra M, Capri A, Li B. Bioactive calcium silicate ceramics and coatings. *Biomed Pharmacother.* 2008; 62(8):526-9.
79. Liu XY, Zheng XB, Ding CX. Bioactivity and biocompatibility of plasma sprayed calcium silicate coatings. *Key Eng Mater.* 2002; 224-6:429-32.
80. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, et al. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005; 21:297-303.
81. Camilleri J, Ford TRP. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J.* 2006; 39:747-54.
82. Stead JE, Ridsdale CH. Crystals in basic converter slag. *J Chem Soc Trans.* 1887;51:601-10.
83. Nurse RW, Welch JH, Gutt W. High-temperature phase equilibria in the system dicalcium silicate-tricalcium phosphate. *J Chem Soc.* 1959; 220:1077-83.
84. Fix W, Heymann H, Heinke R. Subsolidus relations in system $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2 - 3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$. *J Am Ceramic Soc.* 1969; 52(6):346-7.
85. Rubio V, de la Casa-Lillo MA, De Aza S, De Aza PN. The system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{Ca}_2\text{SiO}_4$: The sub-system $\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - 7\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 2\text{SiO}_2$. *J Am Ceramic Soc.* 2011; 94:4459-62.

86. Martínez IM, Velásquez P, De Aza PN. The sub-system α TCP_{ss}- Silicocarnotite within the binary system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{Ca}_2\text{SiO}_4$. *J Am Ceramic Soc.* 2012; 95:1112-7.
87. Ros-Tárraga P, Mazón P, Meseguer-Olmo L, de Aza PN. Revising the Subsystem Nurse's A-Phase-Silicocarnotite within the System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Materials.* 2016; 9(5):322.
88. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinics. *J Am Ceram Soc.* 1991; 74(7):1487-1510.
89. Cragolini F. New eutectoids biomaterials in the system dicalcium silicate-tricalcium phosphate for bone regeneration. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 2012.
90. Harkness JE, Wagner JE. Biología y Manejo. En: Harkness JE, Wagner JE. *Biología y clínica de conejos y roedores.* Zaragoza: Acribia; 1980. p. 43-50.
91. Meseguer Olmo, L. Estudio morfológico de la respuesta ósea inducida por la cerámica beta fosfato tricálcico y el composite beta fosfato tricálcico y colágeno. Modelo experimental en conejo. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 1993.
92. Úbeda García, F. Respuesta ósea a implantes del compuesto “fosfato tricálcico/colágena” en defectos óseos segmentarios. Estudio experimental en ratas. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 1994.
93. Galián Cánovas, A. Respuesta biológica del hueso al compuesto Hidroxiapatita-colágeno. Estudio morfológico y ultraestructural. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 1995.
94. Lax Pérez, A. Respuesta ósea al implante de Espuma de hidroxiapatita: estudio experimental en conejos. [Tesis doctoral]. Murcia: Departamento de Cirugía, Pediatría, Ginecología y Obstetricia, Universidad de Murcia; 2004.
95. Ros Nicolás, MJ. Cerámica de Biovidrio (58S) como vector biogradable de liberación controlada de gentamicina. Estudio experimental “*in vivo*” en conejos. [Tesis doctoral]. Murcia: Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia; 2006.

96. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982; 11(4):318-26.
97. Laczkó J, Lévai G. A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissue embedded in epoxy resin. *Mikroskopie.* 1975; 31:1-4.
98. Schneider A, Taboas JM, Mcauley LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res.* 2003; 21(5):859-64.
99. Muñoz Ruiz-Séiquer J. Aislamiento y cultivo de células de estirpe osteoblástica: cinética de crecimiento sobre cerámica de hidroxiapatita. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 1999.
100. Clavel Rojo L. Respuesta ósea a la vitrocerámica del sistema $\text{CaSiO}_3\text{-SiO}_2\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Estudio experimental "in vivo". [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 2010.
101. Meseguer Olmo L, Alcaraz Baños M, Vicente Ortega V, Clavel Sáinz M, Galián Cánovas A. Respuesta ósea al implante del compuesto β -fosfato tricálcico-colágeno. Estudio "in vivo" en conejos. *Rev Esp Cir Osteoar.* 1994; 29:125-32.
102. Meseguer Olmo L, Vicente Ortega V, Alcaraz Baños M, Galián Cánovas A, Clavel Sáinz M. Estudio experimental de la respuesta ósea al implante del composite β -fosfato tricálcico-colágeno (β -FTC-C). *Rev Esp Patol.* 1995; 28:358-66.
103. Constanz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science.* 1995; 267:1796-9.
104. Carlisle EM. Proceedings: Silicon as an essential element. *Fed Proc.* 1974; 33(6):1758-66.
105. Lugo GJ, Mazón P, Baudin C, de Aza PN. Nurse's A phase: Synthesis and characterization in the binary system $\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. *J Am Ceram Soc.* 2015; 98(10):3042-6.
106. Lugo GJ, Mazón P, de Aza PN. Material processing of a new calcium silicophosphate ceramic. *Ceram Int.* 2016. 42(1):673-80.

107. Rabadán-Ros R, Velásquez PA, Meseguer-Olmo L, de Aza PN. Morphological and Structural Study of a Novel Porous Nurse's A Ceramic with Osteoconductive Properties for Tissue Engineering. *Materials*. 2016; 9(6):474.
108. Strayer M, STratilatov AD, Reid J, Calderin L, Stott MJ, et al. Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2003; 24(3):369-82.
109. Manassero M, Viateau V, Matthys R, Deschepper M, Vallefucio R, et al. A novel murine femoral segmental critical sized defect model stabilized by plate osteosynthesis for bone tissue engineering purposes. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013; 19(4):271-80.
110. Zwingenberger M, Niederlohmann E, Vater C, Rammelt S, Matthys R, et al. Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice. *J Surg Res*. 2013; 181(1):e7-e14.
111. An SH, Matsumoto T, Miyajima H, Nakahira A, Kim KH, et al. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. *Dent Mater*. 2012; 28(12):1221-31.
112. López-López J, Chimenos-Küstner E, Manzanares-Céspedes MC, Muñoz-Sánchez J, Castañeda-Vega P, et al. Histomorphological study of the bone regeneration capacity of platelet-rich plasma, bone marrow and tricalcium phosphate. Experimental study on pigs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 14(12):e620-7.
113. Mapara P, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012; 9(1):111-8.
114. Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramírez-Fernández MP, Mate-Sánchez JE, Ortiz-Ruiz A, et al. Histomorphometric and mineral degradation study of Osscerams: a novel biphasic B-tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clinical Oral Implant Research*. 2012; 23(6):667-75.
115. Savarino L, Baldinia N, Grecoa M, Capitanic O, Pinnac S, et al. The performance of poly-e-caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4. *Biomaterials*. 2007; 28(20):3101-9.

116. Soffer E, Ouhayoun JP, Meunier A, Anagnostou F. Effects of autologous platelet lysates on ceramic particle resorption and new bone formation in critical size defects: the role of anatomical sites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006; 79(1):86-94.
117. Gomes SP, Deliberador TM, Gonzaga CC, Klug LG, da Costa Oliveira L, et al. Bone healing in critical-size defects treated with immediate transplant of fragmented autogenous White adipose tissue. *J Craniofac Surg.* 2012; 23(5):1239-44.
118. Manzanares MC, Carvalho O, Torres B, González A, Fuertes S, et al. Biomaterials in critical-size bone defects: pointers for a standardized analysis. In: Natal Jorge RM, Reis Campos JC, Tavares JM, Vaz M, Santos SM, editores. *Biodental engineering II.* London: Taylor & Francis Group; 2014. p. 55-8.
119. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat.* 2015; 3(3):95-104.
120. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260(5110):920-6.
121. Lemons JE. Hydroxyapatite coatings. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 235:220-3.
122. Gatti AM, Zaffe D, Poli GP. Behaviour of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. *Biomaterials.* 1990; 11(7):513-7.
123. García Novalvos A. Ultraestructura de la respuesta ósea frente al implante de poliéster PLA 85 GA 15 y estudio cromatográfico de su degradación. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 1990.
124. Santonja Medina F. Comparación de la respuesta ósea ante el implante de los poliésteres PLA 85. GA 15 y PLA 96: estudio histológico, radiológico y cromatográfico. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 2010.
125. Zyman Z, Ivanov I, Glushko V, Dedukh N, Malyshkina S. Inorganic phase composition of remineralisation in porous CaP ceramics. *Biomaterials.* 1998; 19(4):1269-73.
126. Meseguer L, Ros MJ, Clavel M, Vicente V, Alcaraz M, et al. Biocompatibility and in vivo gentamicin release from bioactive sol-gel glass implants. *J Biomed Mater Res.* 2002; 61(3):458-465.

127. Meseguer Olmo L, Ros Nicolás MJ, Clavel-Sáinz M, Martínez Marín A, Vicente Ortega V, et al. Cerámica de biovidrio como vector biodegradable de liberación de gentamicina. Estudio experimental in vivo. *Mapfre Med.* 2003; 14(4):249-257.
128. Vivente V, Meseguer L, Martínez F, Galián A, Rodríguez J, et al. Ultrastructural study of the osteointegration of bioceramics (whitlockite and composite beta-TCP + collagen) in rabbit bone. *Ultrastruct Pathol.* 1996; 20(2):179-88.
129. Itoh H, Wakisaka Y, Ohmura Y, Kuboki Y. A new porous hydroxyapatite ceramic prepared by cold isostatic pressing and sintering synthesized flaky powder. *Dent Mater J.* 1994; 13(1):25-35.
130. Niu J, Zhang Z, Jiang D. Synthesis and characteristics of porous hydroxyapatite bioceramics. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2002; 19(2):302-5.
131. Li SH, De Wijn JR, Layrolle P, de Groot K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2002; 61(1):109-20.
132. Rodríguez-Lorenzo LM, Vallet-Regi M, Ferreira JM. Frabrication of porous hydroxyapatite bodies by a new direct consolidation method: starch consolidation. *J Biomed Mater Res.* 2002; 60(2):232-40.
133. Jun YK, Kim WH, Kweon OK, Hong SH. The fabrication and biochemical evaluation of alumina reinforced calcium phosphate porous implants. *Biomaterials.* 2003; 24(21):3731-9.
134. Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res.* 1971; 2:161-229.
135. Egli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone in growth and implant substitution. *Clin Orthop.* 1988; 232:127-38.
136. Uchida A, Nade SML, McCartney RE, Ching W. The use of ceramics for bone replacement: a comparative study of three different porous ceramics. *J Bone Joint Surg Br.* 1984; 66(2):269-75.
137. Shimazaki K, Mooney V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *J Orthop Res.* 1985; 3(3):301-10.

138. 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.
139. Valerio P, Pereirab MM, Goesc AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials.* 2004; 25(15):2941-8.
140. Kamitakahara M, Tatsukawa E, Shibata Y, Umemoto S, Yokoi T. Effect of silicate incorporation on in vivo responses of α -tricalcium phosphate ceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27(5):97.
141. Sun J, Wei L, Liu X, Li J, Li B, et al. Influences of ionic dissolution products of dicalcium silicate on osteoblastic proliferation, differentiation and gene expression. *Acta Biomater.* 2009; 5(4):1284-93.
142. Manchón A, Alkhraisat M, Rueda-Rodríguez C, Torres J, Prados-Frutos JC, et al. Silicon calcium phosphate ceramic as novel biomaterial to simulate the bone regenerative properties of autologous bone. *J Biomed Mater Res A.* 2015; 103(2):479-88.
143. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, et al. Degradation characteristics of α and β tri-calcium phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res.* 2002; 63(2):115-21.
144. Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, Meyer J, Howlett CR, et al. Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 69(1):145-54.
145. Kihara H, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Biodegradation process of α TCP particles and new bone formation in a rabbit cranial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006; 79(2):284-91.
146. Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawachi G, et al. The effect of the microstructure of β -tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomaterials* 2007; 28(16):2612-21.

147. Mate Sánchez de Val JE, Calvo Guirado JL, Delgado Ruiz RA, Ramírez Fernández MAP, Martínezz IM, et al. New block graft of α TCP with silicon in critical size defects in rabbits, chemical characterization, histological, histomorphometric and micro-CT study. *Ceram Int.* 2012; 38:1563-70.
148. Velásquez P, Meseguer Olmo L, Mate Sánchez de Val JE, Calvo Guirado JL, Delgado Ruiz RA, et al. α TCP ceramic doped with dicalcium silicate for bone regeneration applications prepared by powder metallurgy method, in vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101(7):1943-54.
149. Phemister DB. The fate of transplanted bone; and regenerative power of its various constituents. *Surg Gynecol Obstet.* 1914; 19:303-10.