

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA



**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA**

**Respuesta ósea a la vitrocerámica del sistema
 $\text{CaSiO}_3 - \text{SiO}_2 - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)$. Estudio experimental
“in vivo”.**

Tesis Doctoral

Luis Clavel Rojo

MURCIA, 2010

ÍNDICE

I. Introducción.....	7
II. Antecedentes.....	19
Autoinjerto.....	22
Aloinjerto.....	25
Resto de sustitutos óseos naturales.....	28
Biocerámicas.....	37
Biocerámicas reabsorbibles usados en humanos.....	42
Biovidrio.....	51
Vitrocerámicas	65
III. Objetivos.....	79
IV. Material y Métodos.....	85
Material.....	87
Vitrocerámica.....	87
Animales de experimentación.....	95
Métodos.....	96
Planificación.....	96
Cuidados preoperatorios.....	97

Método anestésico.....	98
Método quirúrgico.....	103
Método radiológico.....	109
Método anatomopatológico.....	110
V. Resultados.....	117
Período 2 meses.....	120
Período 4 meses.....	128
Período 6 meses.....	135
Período 8 meses.....	141
Período 12 meses.....	148
VI. Discusión.....	161
VII. Conclusiones.....	181
VIII. Abreviaturas.....	187
IX. Bibliografía.....	193

I. INTRODUCCIÓN

En la práctica ortopédica y traumatológica los defectos óseos son un problema habitual. Estos pueden ser debidos a múltiples causas como infecciones, tumores, fracturas, defectos congénitos, recambios protésicos, pseudoartrosis o artrodesis.

El rango de estos defectos varía desde pequeñas pérdidas metafisarias (que no tienen gran relevancia clínica) a grandes defectos segmentarios cuya resolución es muy compleja. Podemos encontrar defectos que por su tamaño y localización el hueso de forma espontánea no va a conseguir repararlos. Estos defectos óseos limitantes son los que constituyen en la actualidad un reto terapéutico para el cirujano ortopédico.

Las posibilidades para rellenar estos defectos óseos actualmente pasan por el uso de injerto óseo autólogo, aloinjertos y sustitutos óseos.

Actualmente se considera como “patrón oro” (Gold Standard) para la reconstrucción ósea el injerto óseo esponjoso autólogo ya que proporciona las tres características requeridas para la regeneración ósea: Osteoconducción, Osteoinducción y Osteogénesis, y además aporta integridad estructural, importante en la reconstrucción de grandes defectos óseos (**Gómez y Rodríguez, 2000**). El problema que encontramos es que su obtención es limitada en cantidad y tiene una morbilidad no desdeñable (aproximadamente en el 20 % de los casos) como dolor, infección, hematoma, hernias abdominales, fracturas de estrés de espina ilíaca antero-superior, inestabilidad pélvica, síndrome fémoro-cutáneo, complicaciones vasculares, secuelas cosméticas, lesiones de la articulación sacro-ilíaca, alteraciones en la musculatura, formación de hueso heterotópico, fístulas arterio-venosas, mayor tiempo quirúrgico y lesiones de la uretra (**Andrew y Crenshaw, 1998**).

Por su parte, el aloinjerto no tiene las limitaciones que presenta el autoinjerto pero en cambio tiene otras como la potencial transmisión infecciosa, VIH, el elevado coste, la respuesta inflamatoria por intolerancia, efectividad cuestionada del proceso de congelación y congelación-secado para esterilización y disminución de la respuesta antigénica así como el desacuerdo ético, social o religioso, por parte de algunos pacientes de usar tejidos de pacientes fallecidos. Otras de las limitaciones del aloinjerto son secundarias a sus propiedades biológicas ya que se trata de un injerto óseo osteoconductor pero no tiene capacidad osteoinductora ni osteogénica.

Es ante estas serie de limitaciones, cuando el cirujano ortopédico se plantea el uso de sustitutos sintéticos de los injertos óseos. Para tal función se usan los biomateriales que tienen que ser biocompatibles tanto *química* como *mecánica* y *médicamente*, y poseer un carácter bien *inerte* o *tolerable*, o bien *bioactivo*, y sus productos de degradación no deben originar toxicidad.

Los biomateriales los podemos clasificar en dos grandes grupos:

1.- Naturales: coral, colágeno, seda, nácar, concha de moluscos.

2.- Sintéticos:

- **Metales:** Titanio, aleaciones de titanio, aleaciones de Cr-Co, aceros inoxidable, oro, platino, plata, etc. Son componentes de prótesis articulares, material de osteosíntesis y material para ortodoncia.

- **Polímeros:** Nylon, silicona, poliésteres, polietileno, polimetacrilato de metilo, politetrafluoretileno. Utilizados en suturas, componentes de prótesis articulares, cementos óseos, liberación de fármacos, ingeniería de tejidos.

- **Compuestos:** Carbono-carbono, resinas, epoxy-grafito, etc. Intervienen en la fabricación válvulas cardiacas, poste intrarradiculares, materiales de restauración dental, etc.

- **Cerámicas:** Son los biomateriales cerámicos sobre los que vamos a centrar nuestro estudio.

La Sociedad Europea de Biomaterias (S.E.B.) en 1986 definió los biomateriales cerámicos como “compuestos de materiales inorgánicos no metálicos, integrados por enlaces iónicos que pueden presentarse tanto en formas cristalinas (mono o policristalinas) como amorfas (vítreas)”. Dentro de este grupo encontramos la hidroxiapatita, el sulfato cálcico, el fosfato cálcico, el fosfato tricálcico, los vidrios y las vitrocerámicas.

Atendiendo a su estructura se pueden clasificar en tres grupos (Vallet-Regi):

A.- Sólidos cristalinos: cerámicas. Hay dos formas de presentación: monocristalina (zafiro) y policristalinas (zirconia, alúmina (Al_2O_3) e hidroxiapatita HA). Las cerámicas basadas en fosfatos de calcio son particularmente interesantes en el campo de sustitutos óseos.

B.- Sólidos amorfos: biovidrios. Totalmente opuestos a las cerámicas. Se consideran sólidos con elevado desorden estructural o líquidos con elevada viscosidad. Se obtienen con fusión y enfriamiento rápido de manera que se consigue una porosidad pequeña.

C.- Sólidos amorfos con núcleos de cristalización: vitrocerámicas.

Otra forma de clasificar los materiales cerámicos es según su bioactividad:

I.- Bioinertes: Nula o escasa influencia sobre los tejidos que le rodean. Poseen elevada estabilidad in vivo, gran resistencia mecánica y aceptación biológica óptima. Las más conocidas son el óxido de aluminio “alúmina”, el óxido de zirconio “zirconia”. Por su mínima reactividad no enlazan con tejidos vivos, por lo que a largo plazo fracasan o producen inflamaciones crónicas

II.- Bioactivas: Son cerámicas interactivas, se enlazan con tejidos vivos, diseñados para estimular o modular la actividad biológica del hueso, lo que supone *el establecimiento, mediante un proceso físico-químico, de la continuidad entre el implante y la matriz ósea*. La bioactividad supone la formación de una capa rica en fosfato cálcico (similar a la HA carbonatada) en su superficie al entrar en contacto con un medio orgánico. Esta continuidad cerámica-implante puede producirse por dos procesos diferentes:

- **Fijación biológica:** El implante cambia su superficie lisa por otra rugosa, y mediante un proceso de *osteointegración*, el hueso penetra en ella, quedando “colonizado”.
- **Fijación bioquímica:** Formación de un enlace bioquímico entre el biomaterial y el hueso. Este proceso se conoce como *osteoconducción*, y se refiere a materiales de estructura tridimensional, similar a la estructura del hueso esponjoso, que con una porosidad adecuada, facilita o provoca en su superficie el crecimiento vasos, tejidos mesenquimales y células osteoprogenitoras.

III.- Biodegradables: característica que se define como *“rotura de un material mediado por un sistema biológico”*, por lo que el biomaterial es sustituido por el hueso reactivo, proceso también llamado *bioabsorción*, completando el proceso de la osteoconducción.

Esta publicado que la historia de los biovidrios, comienza en 1967 cuando el profesor **Larry Hench** aprendió del terrible coste de las heridas en la guerra del Vietnam en termino de amputaciones. La necesidad del desarrollo de materiales que pudieran ayudar a la reparación de los tejidos formando una unión directa con ellos, más que una escara interfascial como ocurría alrededor de los metales y polímeros en aquella época. **Hench** y col. en 1969 descubrieron que ciertas composiciones de vidrios se enlazaban al hueso. A dichos vidrios se les denominó *vidrios bioactivos* (*45S5 BioGlass®*). La unión con el hueso se produce a través de una capa de hidroxicarbonatoapatita formada en la superficie de los vidrios bioactivos cuando entran en contacto con los fluidos biológicos.

Los biovidrios se preparaban en la década de los 70 por el método tradicional de fusión y enfriamiento rápido, desde los años 90 se utiliza el método sol-gel, que mejora las propiedades texturales del material mejorando la superficie, volumen y distribución del poro, características fundamentales en la respuesta del implante.

La investigación a raíz del descubrimiento del BioGlass®, que demostraba una excelente bioactividad, fue dirigida a reforzar las características mecánicas de de estos vidrios de fusión. Fue **Tadashi Kokubo** quien en 1982 en Japón describe el comportamiento de la vitrocerámica “A-W glass-ceramic”.

Las *vitrocerámicas* son cerámicas policristalinas obtenidas por cristalización controlada de vidrios, donde coexisten fases amorfas y cristalinas. Se obtienen sometiendo los vidrios a un tratamiento térmico adecuado, de tal forma que se logre cristalizar, aproximadamente, el 90% de la masa vítrea. Estas vitrocerámicas poseen excelentes propiedades térmicas y mecánicas en comparación con las cerámicas tradicionales. Siendo especialmente útiles en las localizaciones sometidas a transmisión de fuerza y carga de peso.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido estudiar la respuesta ósea de una vitrocerámica, con una composición de 54% de pseudowallastonita, 38% de wollastonita, 4% cristobalita, 4% de fosfato tricálcico, en defectos óseos realizados en fémures de conejos. Además, se pretende determinar si el material cumple los requisitos de biocompatibilidad y biofuncionalidad y por tanto, si es idóneo para su utilización como sustitutos de los injertos óseos.

II. ANTECEDENTES

SUSTITUCION ÓSEA

Se consideran injertos óseos a los materiales que se utilizan como suplementos para el proceso de consolidación ósea en el tratamiento de un gran espectro de lesiones óseas. Se pueden usar para reconstruir o remplazar defectos óseos de cualquier etiología y para fortalecer una artrodesis.

Se pueden considerar dos grandes grupos: los sustitutos naturales y los sintéticos. Comenzaremos a describir los naturales, para más tarde pasar a los sintéticos y dentro de ellos, hacer especial hincapié en los biovidrios y vitrocerámicas.

A) Autoinjertos.

Como ya adelantábamos en la introducción, el “gold standard” de la sustitución ósea sigue siendo el injerto autólogo de hueso esponjoso. Las técnicas de uso de autoinjertos óseos consisten en la toma de tejido óseo de otra zona del esqueleto del mismo paciente o zona dadora, ya sea del mismo hueso o de otro. Este tejido óseo extirpado puede corresponder a hueso estructural cortical, corticoesponjoso o bien a tejido esponjoso aislado. Cuando se trata de tejido estructural cortical o corticoesponjoso, éste puede ser a su vez libre (sin pedículo vascular) o vascularizado que a su vez puede ser vascularizado localmente o a distancia; este último con un pedículo arteriovenoso que es necesario anastomosar mediante técnicas de microcirugía a otro pedículo arteriovenoso local que se sacrifica para tal fin. Sus propiedades biológicas y mecánicas se muestran en la tabla 1.

Propiedades	Esponjoso	Cortical No vascularizado	Cortical vascularizado
Osteoconducción	++++	+	+
Osteoinducción	++	+/-	+/-
Osteogénesis	+++	-	+
Fuerza inmediata	-	+++	+++
Fuerza 6 meses	--	++	+++
Fuerza 1 año	---	+++	++++

Tabla 1: Propiedades y tipos de injerto óseo autólogo (modificada de **Gazdag**, 1995).

Las ventajas fundamentalmente son:

- El autoinjerto aporta los tres elementos esenciales para la regeneración ósea “Triada de la Osteogénesis” (**Gómez y Rodríguez, 2000**):
 1. Osteoconducción aportada por la disposición tridimensional de las trabéculas óseas.
 2. Osteoinducción a través de la proteínas no colagénicas de la matriz ósea que actúan como factores ó señales inductoras sobre las células precursoras osteogénicas, como son los factores de crecimiento en especial el BMP y TGF- β y otros como FGF, PDGF, IGF (**Canalis, 1990**).
 3. Osteogénesis por sus numerosas células madre mesenquimales precursoras de los osteoblastos.

Es además :

- Seguro y fiable, para el paciente, ya que presenta una incidencia mínima de sobreinfección y no transmite enfermedades.
- Presenta óptima biocompatibilidad evitando el peligro de respuesta inmunogénica donante- receptor.
- Además es el más económico, no hay gastos de conservación, mantenimiento, como ocurre con el aloinjerto, ni de fabricación como en los sintéticos
- Y presenta gran resistencia a las cargas de compresión si se usa el injerto cortical.

Los principales inconvenientes de los autoinjertos son:

- Los provenientes de la búsqueda y sacrificio de la zona dadora con una comorbilidad de hasta el 25% (**Summers, 1889**) tales como:
 - fracturas de estrés
 - hematoma importante
 - hipersensibilidad, anestesia
 - fractura pélvica
 - herniaciones
 - alteraciones cosméticas
 - pérdidas sanguíneas
 - lesión ureteral
 - lesión nerviosa, vascular
 - autotransmisión, trasplante tumoral
 - infección postoperatoria
 - dolor crónico de la zona dadora del injerto (**Arrington, 1996, Andrew y Crenshaw, 1998, Skaggs, 2000**). Se ha atribuido a la formación de tejido óseo heterotópico (**Ross, 2000**).
 - extracción dificultosa en niños pequeños, ancianos y pacientes con enfermedad metastásica.
- Mayor tiempo quirúrgico. Sobre todo cuando se usan injertos óseos vascularizados (se necesita un equipo médico especializado).
- Otro de los problemas de los injertos óseos autólogos libres es que se reabsorben en mayor o menor grado con el tiempo. La fase de reabsorción del injerto ocurre entre los 6 y 18 meses y en ella se pierde más de 1/3 de la

fuerza (**Enneking**, 1975). Además hay que tener en cuenta que a pesar de la capacidad osteogénica hay estudios que aseveran que gran parte del componente celular no sobrevive tras el trasplante (**Sandhu**, 1999).

- Disponibilidad limitada cuando se necesitan grandes cantidades de injerto como en artrodesis de muchos segmentos (**Gau**, 1991), debido al pequeño tamaño de la cresta pélvica que además podría debilitarse.

Debido a todos estos inconvenientes de los autoinjertos es por lo que a lo largo de los años se han estudiado distintas formas de sustitutos óseos que a continuación se enumeran:

B) Aloinjerto.

Es el injerto óseo procedente de cadáver humano. Al igual que el autoinjerto puede utilizarse como tejido óseo estructural cortical, corticoesponjoso o bien como tejido esponjoso en sus diversas presentaciones; bloques y chips.

Está disponible en fresco, congelado o liofilizado.

El aloinjerto en *fresco* produce una gran inmunogenicidad, lo que lo hace claramente inferior al autoinjerto y su uso está restringido a pocos casos de trasplante de superficie articular (**Ehrler**, 2000).

El aloinjerto *congelado* se mantiene a temperaturas menores de - 60°C con lo que disminuye la degradación enzimática y la inmunogenicidad sin variar sus propiedades mecánicas (**Schachar**, 1981). Tienen una vida media de un año si se conservan a -20°C y de cinco años si se hace a -70°

El *liofilizado* (congelado-secado) consiste en la eliminación del agua del tejido congelado, envasado al vacío y almacenado durante 5 años. Son los menos inmunogénicos aunque presentan menor capacidad de osteoinducción y peores propiedades mecánicas y de resistencia a la fuerza. Tiene una vida media indefinida (**Ehrler**, 2000)

La esterilización adicional de los aloinjertos liofilizados con óxido de etileno o con irradiación gamma también pueden disminuir la osteoinductividad de los mismos y ocasionar daño estructural (**Sandhu**, 1999), además la rehidratación de estos injertos puede favorecer la presencia de fracturas macro o microscópicas que disminuyen aún más la resistencia a la fuerza de compresión y cizallamiento llegando hasta el 50% (**Pelker**, 1987, **Sandhu**, 1999).

Con todas estas técnicas se destruyen las células osteoprogenitoras.

Los aloinjertos se pueden usar con propósitos no estructurales como reconstruir defectos tras curetages de neoplasias benignas y quistes óseos al tiempo de realizar una atroplastia o bien con propósitos estructurales.

Las ventajas de los aloinjertos son:

- Su estructura porosa tridimensional y por tanto la capacidad conductiva, y también los factores de crecimiento inmersos en la matriz extracelular (**Sandhu**, 1999) que le hacen osteoinductor.
- No hay morbilidad en zona dadora.

- En sustitución de grandes segmentos óseos se suele asociar con una tasa de éxito en el seguimiento del 60 al 90% (**Friedlaender**, 1999).
- Disminuye el tiempo quirúrgico, el sangrado, y las complicaciones de la zona donante antes descritas.

Las principales desventajas descritas son:

- Peor calidad del tejido debida al tratamiento post-extracción.
- Riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas que puedan poner en peligro, posteriormente, la vida del paciente (**Vehmeyer**, 2002, **James**, 2003). También existe riesgo de transmisión de otras enfermedades óseas e incluso tumores (**Palmer**, 1999). Además han sido descritos casos de transmisión del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) al utilizar aloinjertos congelados, mientras que no se ha presentado ningún caso con los liofilizados (**Ehrler**, 2000).
- Incorporación más lenta, por lo que precisan estabilizaciones más duraderas (**Ehrler**, 2000, **Pelker**, 1987). Además de lenta en los casos de injertos masivos, a los cinco años de implantados solo queda incorporado un 20% del volumen inicial del injerto (**Gouin**, 1996). Cuando se usan como grandes injertos estructurales aparecen tasas del 10% de pseudoartrosis, 5-15% de fracturas y 10-15% de infección (**Sim**, 1993).
- El elevado gasto económico que supone el procesamiento del tejido.
- La disponibilidad, depende de la cantidad de donantes y la cercanía del banco donde se procesan y almacenan.

C) Matriz ósea desmineralizada.

La matriz ósea desmineralizada (MOD) consiste en un material de estructura porosa tridimensional que actúa como andamiaje para el crecimiento óseo y que presenta propiedades osteoinductivas.

Se trata de un producto procedente del aloinjerto pero lo clasificamos en un grupo aparte de los aloinjertos por sus características específicas.

Se obtiene de aloinjerto mediante el tratamiento con ácido clorhídrico. De modo que se extraen la mayoría de los componentes mineralizados quedando el tejido óseo desprovisto de ellos reteniendo las proteínas colagénicas (colágeno I) y no colagénicas, incluyendo los factores del crecimiento osteoinductivo (BMP). La FDA (Food and Drug Administration) exige que este proceso se realice en el banco de huesos.

Su primer uso fue realizado por **Urist** a mediados de los 60, cuando halló que la implantación de varias preparaciones de hueso bovino desmineralizado en músculo de rata daba lugar a la formación de un osículo con estructuras corticales, esponjosa y médula ósea en su interior, y, tras investigar la causa, descubrió que se debía a la influencia de proteínas presentes en la matriz ósea extracelular del hueso y que fue caracterizando posteriormente y denominándolas proteínas morfogenéticas (**Urist**, 1965).

La eficacia de la MOD para promover la formación de tejido óseo nuevo depende de diversos factores, como las soluciones empleadas en el procesado, el tiempo de desmineralización, las temperaturas extremas a las que son sometidas, el tamaño de las partículas de MOD y el método de esterilización final (**Boyce**, 1999).

Además, la necesidad de utilizar un vector o transportador (como el glicerol, ácido hialurónico, sulfato cálcico o la gelatina) también influye en sus propiedades inductoras, de modo que, dependiendo de la extensión del contacto de éste con la MOD, le puede extraer las proteínas morfogenéticas con el transcurso del tiempo, o incluso, cambiar sus propiedades alterando la osteoinducción.

Desde principios de la década de los 90, se están utilizando ampliamente productos de MOD en cirugía ortopédica (**Sandhu**, 1999).

La primera MOD disponible en el mercado fue el gel Grafton®, en 1991, (**Sassard**, 2000) que consistía en partículas de MOD con un excipiente portador a base de glicerol y con diversas presentaciones comerciales.

A continuación aparecieron muchas otras como DynaGraft® (y sus distintos formas, DynaGraft® Gel, DynaGraft® Putti, OrthoBlast™, y CollaPro™ Matrix), Osteofil® (MOD + gelatina) , Allomatrix® (MOD + sulfato cálcico) y DBX® (MOD + ácido hialurónico).

Para demostrar la variabilidad en cantidad y tipos de factores de crecimiento de las distintas comercializaciones de MOD **Wildemann** (2006) analizó 10 lotes de tres de ellas (Allomatrix®, DBX®, Grafton®). Mediante cuantificaciones de BMP-2, TGF- β ,IGF-I, FGF, VEGF y PDGF demostró diferencias significativas entre las distintas comercializaciones y entre los distintos lotes de una misma comercialización. Esto explica en parte los diferentes resultados observados en estudios clínicos.

La MOD se utiliza para promover la regeneración ósea en defectos óseos estables debido a su débil resistencia estructural. Se suele asociar a fijaciones internas estables y a otros sustitutos óseos (en un proceso de aumentación de injerto)

Presenta mayor osteoinductividad potencial que el aloinjerto debido a la biodisponibilidad aumentada de los factores de crecimiento después de someter al aloinjerto utilizado para su obtención al proceso de desmineralización (**Sandhu**, 1999), mientras que los inconvenientes son similares a los del aloinjerto liofilizado, además de presentar menor resistencia mecánica.

D) Xenoinjertos.

El hueso bovino ha sido investigado como potencial sustituto óseo desde los años sesenta. Al ser productos de origen bovino, desde el 7 de octubre de 1997, solo pueden comercializarse y utilizarse si han obtenido previamente la calificación favorable de un grupo de expertos sobre la seguridad microbiológica (**Chappard**, 1993). Están comercializados con diferentes nombres: Oxbone®, Lubbock®, Surgibone®, Orthoss®, etc. Precisan una preparación compleja consistente en desproteínización, eliminación de agentes infecciosos y esterilización con radiación gamma, tras la cual, persiste una tasa variable de proteínas no colagénicas y de colágeno tipo I, pero con conservación de la estructura esponjosa (**Chappard**, 1993).

Presentan biocompatibilidad con los osteoblastos humanos (**Doherty**, 1994), además tienen una porosidad elevada del orden del 60% y propiedades mecánicas similares al hueso trabecular.

Los principales problemas se deben a la intensa respuesta inflamatoria (**Begley**, 1995) y el riesgo de infección acrecentado por la encefalopatía espongiiforme bovina (**Croes**, 2001).

E) Matrices de Colágeno.

Se trata de xenoinjertos, ya que se producen de la purificación de colágeno fibrilar bovino (tipo I) que se combina con hidroxiapatita sola o asociada a fosfato tricálcico.

La primera matriz aprobada por la FDA fue el Collagraft® en 1991, que estaba formada por gránulos de cerámica de fosfato cálcico (65% HA y 35% β -FTC) y colágeno fibrilar (más del 95% tipo I). Posteriormente aparecieron el NeuGraft®, Healos®.

Actúan principalmente como osteoconductores. Su fuerza a la compresión es menor que el hueso esponjoso.

Chapman (1997) en un estudio multicéntrico concluyó que para defectos traumáticos de huesos largos el Collagraft® es seguro y efectivo sin la comorbilidad del autoinjerto. El Collagraft® también ha sido estudiado en combinación con médula ósea con buenos resultados, sin presentar diferencias significativas en los resultados funcionales y radiológicos en fracturas de huesos largos con el hueso esponjoso de cresta ilíaca (**Cornell**, 1991, **Kocialkowski**, 1990).

No deberían usarse en pacientes con historia de múltiples alergias o cuadros de anafilaxis. Un bajo porcentaje de los pacientes pueden desarrollar anticuerpos contra colágeno tipo I bovino, pero no se observan reacciones cruzadas al colágeno humano (**Cornell**, 1999).

La incorporación de un compuesto de colágeno-cerámica al autoinjerto como suplemento ha obtenido resultados diferentes en dos experimentos realizados por diferentes autores en fusión vertebral en perros (**Muschler**, 1996, **Zerwekh**, 1992).

Una nueva e interesante aplicación de las matrices de colágeno es la de vector de transporte de BMP en defectos óseos, que está siendo ampliamente estudiada (**Bessa**, 2008).

Las ventajas e inconvenientes del colágeno se deducen de las características del mismo. Entre las ventajas: es totalmente biocompatible y es osteoconductor. Y los principales inconvenientes son su escaso o nulo soporte estructural inicial y su potencial inmunogenicidad.

E) Hidroxiapatita Coralina.

Se produce a partir del exoesqueleto del coral marino del género *Goniospora* que tiene una estructura porosa muy regular que asemeja al hueso esponjoso. El tamaño del poro es de 500µm lo que favorece la invasión ósea..

El carbonato cálcico del exoesqueleto es convertido en hidroxiapatita en proceso de alta presión y temperatura en una solución acuosa de fosfato, que mantiene su microestructura.

Tiene muy bajo potencial de infección e inmunogenicidad (**Begley**, 1995).

Ha demostrado capacidad osteoinductura en múltiples estudios animales y también como material de relleno en cirugía maxilofacial (**Byrd**, 1993).

La primera hidroxiapatita coralina aceptada por la FDA fue el Pro Osteon® en 1992, se presenta en gránulos o bloques de distintos tamaños, se puede tallar pero como es frágil se puede romper en el proceso. Radiológicamente puede seguir apareciendo a los 10 años. Usando otro procesamiento se consigue el Pro Osteon 500R® que se reabsorbe el primer año.

Una ventaja de estos materiales consiste en que los poros están interconectados y, por tanto, el hueso neoformado puede crecer en los intersticios de los implantes de modo centrípeto (**Boyan**, 2003). Actualmente se ensayan combinaciones de este biomaterial con proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

F) Médula ósea.

La médula ósea contiene células osteoprogenitoras del orden de 1 cada 50.000 células nucleadas y se han usado técnicas que aumentan este número en cinco veces.

Se puede utilizar de forma aislada o en combinación de matrices (**Burwell**, 1985; **Salama and Weissman**, 1978).

Se han realizado múltiples estudios demostrando el uso de la médula ósea en el tratamiento de pseudoartrosis con buenos resultados. Se han estudiado con distintos tipos de células madre y diversos vectores de transporte (Tseng, 2008).

	Propiedades			VENTAJAS	DESVENTAJAS
	Osteo-génico	Osteo-inductor	Osteo-conductor		
Autoinjerto	Si	Si	Si	No rechazo. No transmisión enfermedades.	Más morbilidad. Disponibilidad limitada.
Alonjerto	No	Si, débil.	Si	Disponibilidad. Moldeado del injerto. No morbilidad zona donante.	Reacción inmunológica. Transmisión enfermedades. Caro.
M. O. D.	No	Si	Si	Fácil uso. Menor tiempo qx.	No resistencia estructural.
Xenoinjertos	No	No	Si	Estructura porosa. Propiedad mecánicas	Riesgo infeccioso. Caro.
Colágeno	No	No	Si	Biocompatibilidad	Estructura débil. Inmunógeno.
Coral	No	No	Si	Porosidad. Uso en composites.	Caro.
Médula Ósea	Si	Si	Si	Disponibilidad.	Precisa grandes cantidades

Tabla 2. Características principales de los distintos tipos de biomateriales.

Hasta ahora, los primeros seis grupos tratados, están obtenidos principalmente de tejido humano, de animales en el caso de xenoinjertos y también de tejidos de otros seres vivos como el caso de los productos derivados del coral natural.

Otros biomateriales naturales que actualmente están siendo ampliamente investigados son la seda, el nácar y la tela de araña. Sus posibilidades terapéuticas son muy amplias pero no las detallaremos en esta tesis por no tratarse propiamente de sustitutos óseos.

A continuación vamos a abordar los sustitutos óseos creados de forma sintética:

Como ya adelantamos en la introducción, los biomateriales se pueden clasificar en dos grupos fundamentales que son *naturales* y *sintéticos*. Dentro de los sintéticos atendiendo a la composición existen cuatro grandes grupos (**Cordero J, 2000**):

- *Metálicos*: Aunque más de las tres cuartas partes del sistema periódico corresponden a metales, tan solo una docena de ellos tienen aplicaciones médicas. Lo primero que se les exige es tolerancia por parte del organismo y lo segundo resistencia a la corrosión. Entre ellos destacan las aleaciones de titanio, aleaciones de cromo-cobalto, aceros inoxidables, oro, platino, plata, etc. Usualmente forman parte de componentes de prótesis articulares, material de osteosíntesis y para ortodoncia, son especialmente útiles cuando se deben someter a cargas. Sus inconvenientes se deben a sus propiedades mecánicas que son muy diferentes al hueso, tienen elevado riesgo de rotura y los

iones que se desprenden del implante con su desgaste pueden ser tóxicos o perjudiciales además de producir dolor (metalosis) y por último es imposible que regeneren el hueso natural.

- *Polímeros*: ampliamente utilizados en la clínica. Su éxito se debe a la gran variedad de compuestos y a las distintas posibilidades de fabricarlos. Pueden ser *bioestables* (con carácter permanente) o *biodegradables* (carácter temporal) según la función para la que estén diseñados. Destacan: nylon, silicona, poliésteres, ácido poliglicólico, politetrafluoretileno, polietileno y polimetilmetacrilato (PMMA) o cemento acrílico (usado como sustituto óseo en cirugía tumoral y revisiones de prótesis total de cadera). Utilizados en suturas, componentes de prótesis articulares, cementos óseos, liberación de fármacos, ingeniería de tejidos.
- *Composites*: Carbono-carbono, resinas, epoxy-grafito, etc. Intervienen en la fabricación de válvulas cardiacas, materiales de restauración dental, etc.
- *Cerámicos*.

Para centrarnos en el tema que nos atañe obviaremos los tres primeros grupos y pasaremos a revisar los biomateriales cerámicos.

BIOCERÁMICAS

Clásicamente las cerámicas tendían a ser definidas por exclusión. Los metales y los polímeros eran fácilmente definidos por sus mecanismos de unión y sus propiedades mecánicas, eléctricas, etc. El resto de materiales que no eran metales o polímeros eran las cerámicas.

La palabra cerámica proviene del griego *κέραμος (keramos)* que significa tierra cocida.

La Sociedad Europea de Biomaterias (S.E.B.) en 1986 definió los biomateriales cerámicos como “compuestos de materiales inorgánicos no metálicos, integrados por enlaces iónicos que pueden presentarse tanto en formas cristalinas (mono o policristalinas) como amorfas (vítreas)”.

Las cerámicas biocompatibles utilizadas en cirugía ortopédica incluyen: las cerámicas reabsorbibles como el fosfato tricálcico en su forma activa (β), la hidroxiapatita, el sulfato cálcico, las cerámicas con superficies altamente reactivas como los vidrios bioactivos y vitrocerámicas, y cerámicas cuya superficie no reacciona o lo hace muy poco con los fluidos biológicos (**Hulbert**, 1987).

El clásico material cerámico es muy rígido, frágil, e insoluble. Su interés ortopédico se debe a su excepcional resistencia al desgaste, y su excelente biocompatibilidad, ya que es insoluble e inerte químicamente. Su uso ha estado limitado por su fragilidad y la dificultad para formar dispositivos libres de defectos.

Sin embargo, la mejor comprensión de la tecnología y procesamiento de la misma, ha supuesto nuevas alternativas para la aplicación en la ortopedia clínica.

Las cerámicas menos reactivas como la alúmina (óxido de aluminio; Al_2O_3) y el circonio (óxido de zirconio; ZrO_2), son usadas en el diseño de prótesis articulares, principalmente como componente de la cabeza femoral, y las más reactivas se aplican como sustitutos óseos en forma de gránulos, bloques o cementos.

Las biocerámicas se pueden clasificar siguiendo distintos parámetros.

Atendiendo a su estructura se pueden clasificar en tres grupos (**Vallet-Regi, 1997**):

A.- Sólidos cristalinos: son las *cerámicas* propiamente dichas. Hay dos formas de presentación: monocristalina (zafiro) y policristalinas (zirconia (ZrO_2); alúmina (Al_2O_3) y FTC e HA). Las cerámicas basadas en fosfatos de calcio son particularmente interesantes en el campo de los sustitutos óseos.

B.- Sólidos amorfos: *biovidrios*. Totalmente opuestos a las cerámicas. Se consideran sólidos con elevado desorden estructural o líquidos con elevada viscosidad. Se obtienen mediante fusión y enfriamiento rápido de manera que se consigue una porosidad pequeña.

C.- Sólidos amorfos con núcleos de cristalización: *vitrocerámicas*.

Otra forma de clasificar los materiales cerámicos es según su bioactividad:

I.- Bioinertes: son los que presentan nula o escasa influencia sobre los tejidos que le rodean. Poseen elevada estabilidad in vivo, gran resistencia mecánica y aceptación biológica óptima. Las más conocidas son el óxido de aluminio “alúmina” (Al_2O_3), el óxido de zirconio “zirconia” (ZrO_2). En ellos se produce un crecimiento periférico del hueso, formando generalmente una interfase o encapsulación fibrosa, que provoca una *fijación mecánica* débil. Por su mínima reactividad no enlazan con los tejidos vivos, por lo que a largo plazo fracasan o producen inflamaciones crónicas

II.- Bioactivas: Son cerámicas interactivas, que se enlazan con tejidos vivos. Están diseñadas para estimular o modular la actividad biológica del hueso, lo que supone el establecimiento, mediante un proceso físico-químico, de una continuidad entre el implante y la matriz ósea. La bioactividad supone la formación de una capa rica en fosfato cálcico (similar a la HA carbonatada) en la superficie de la cerámica al entrar en contacto con un medio orgánico. Esta continuidad cerámica-implante puede producirse por dos procesos diferentes (**Vallet-Regi, 1997**):

- **Fijación biológica:** El implante cambia su superficie lisa por otra rugosa, y mediante un proceso de *osteointegración*, el hueso penetra en ella, quedando el implante “colonizado”. La osteointegración es la unión molecular entre el hueso y otra sustancia; la unión es tan fuerte que supera las propiedades mecánicas del hueso y del material, y es muy difícil conseguir la separación de ambos a nivel de la interfase.

- Fijación bioquímica: Formación de un enlace bioquímico entre el biomaterial y el hueso. Este proceso se conoce como *osteoconducción*, y se refiere a materiales de estructura tridimensional, similar a la estructura del hueso esponjoso, que con una porosidad adecuada, facilita o provoca en su superficie el crecimiento de vasos, tejidos mesenquimales y células osteoprogenitoras.

III.- Biodegradables: son las cerámicas que presentan la característica que se define como "*rotura de un material mediado por un sistema biológico*", por lo que el biomaterial es sustituido por el hueso reactivo, proceso también llamado *bioabsorción*, que completa el proceso de la osteoconducción.

La otra forma de clasificar las biocerámicas sería por la generación a la que pertenecen:

1. **1º Generación:** Son la alumina (Al_2O_3), la zirconia (ZrO_2) y carbones. Son cerámicas casi inertes. Desarrollados en la década de los 60 y 70. No hay interacción ni unión con el tejido circundante.

2. **2º Generación:** Son las cerámicas bioactivas (se unen al hueso por reactividad de su superficie) y degradables (después de un tiempo específico). Dentro de este grupo se incluyen fosfatos de calcio, vidrios y vitrocerámicas. En estos la unión cerámica- hueso puede ser tan fuerte que no se puedan separar sin romper el hueso circundante.

3. **3º Generación:** Son las matrices de moléculas biológicamente activas, que además de ser bioactivas y reabsorbibles, estimulan la regeneración de tejidos vivos. Son los biomateriales de 3ª generación, los que estimulan una respuesta celular específica, y los preferidos para ser utilizados como matrices en la ingeniería tisular. Los criterios específicos para que un biomaterial sea utilizado como matriz o "scaffold" en ingeniería tisular son los siguientes: tener una estructura tridimensional similar al hueso a sustituir, posibilidad de liberar células, excelente conductibilidad, buena biodegradabilidad, adecuadas propiedades mecánicas, estructura altamente porosa de 50% del volumen, porosidad bimodal con macroporos de 100-500 micras (que permiten la entrada de vasos sanguíneos y células al interior de la matriz) y microporos de 10 -50 micras(que favorecen la unión de proteínas y células al implante), posibilidad de fabricación con superficie irregular (donde las células se depositan mejor) y potencial comercialización.

La porosidad de estas matrices se puede conseguir añadiendo a los polvos de vidrio polietileno, partículas de almidón o esponjas de poliuretano que desaparecerán y dejaran su hueco con el tratamiento térmico (**Vitale-Brovarone**, 2009).

A continuación vamos a revisar algunas características de las principales biocerámicas utilizadas en humanos.

SULFATO CÁLCICO

Uno de los primeros materiales investigados como sustituto del tejido óseo fue el yeso de París ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$). Se obtiene por proceso de calcinación de la gipsita natural a temperatura de 110-130°C con el que se pierde el 75% del agua. Fue usado por primera vez en 1892, por **Dreesman**, para rellenar defectos óseos creados por la osteomielitis tuberculosa.

Su proceso de reabsorción provoca un aumento controlado de la porosidad a la vez que se forma hueso nuevo. Ha caído en desuso por su rapidez de absorción (4-8 semanas) y por su pobre estabilidad estructural que lo hace propenso a las fracturas cuando se inicia la carga.

No obstante, **Coetzee** presentó en 1980 una serie de 110 pacientes en los que usó el sulfato cálcico en la reparación de defectos craneales, observando sustitución por hueso en 8 semanas (desde entonces no se ha vuelto a publicar resultados tan positivos).

Se ha utilizado también en combinación con matriz ósea desmineralizada (Osteoset®) y con hidroxiapatita y fosfato tricálcico (OsteoMax®) y con proteína osteogénica bovina-1 (BMP-7) (**Damien**, 1990).

CERÁMICAS DE FOSFATO CÁLCICO

El componente mineral del hueso es el fosfato cálcico. Los tipos de cerámicas de fosfato cálcico más ampliamente utilizadas son las de fosfato tricálcico (FTC) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)]$ e hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$.

Hay una amplia variación de propiedades físico-químicas dentro de estos dos fosfatos cálcicos sintéticos. Esta variación es resultado de una diferencia en densidad y estructura cristalina que resulta del distinto modelo de procesamiento.

Las cerámicas de fosfato cálcico son manufacturas a través de procesos de cocción o calentado a temperaturas muy altas. Los polvos cerámicos se obtienen por precipitación de una solución acuosa, por ejemplo añadiendo fosfato amónico $[(\text{NH}_4)\text{HPO}_4]$ a una solución de nitrato cálcico $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$ con un pH de 11-12 (**Wintermantel**, 1998). Los polvos son compactados y posteriormente se someten a altas temperaturas entre 1000-1500°C (sin llegar a la temperatura de fusión) produciendo la unión de los cristales. Este proceso se conoce con el nombre de *sinterización*.

Con este proceso se consigue un material denso con una porosidad del 1-5% del volumen (dependiendo de parámetros como la temperatura y el tiempo de sinterización). Se puede conseguir mayor porosidad si en el proceso de fabricación se añade glucosa (que se expande con el calor y posteriormente se consume), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o naftaleno (**Ravaglioli**, 1992). Esta mayor porosidad es muy importante para la función osteoconductora de la cerámica.

Tsugura (1997) demostró la importancia de la porosidad para la osteoconducción, comparando cerámicas con distinto tamaño de poro observó que

con tamaño de poros de 500 μm obtenía mejor crecimiento óseo que con tamaños menores. Esta porosidad también producía un mayor grado de reabsorción (debido a un proceso de disolución y de fagocitosis).

La tasa de reabsorción también está determinada por el área de superficie del material. El proceso de fagocitosis esta llevado a cabo por células gigantes y osteoclastos (excepto en el caso de la HA en el que los osteoclastos no intervienen).

La tasa de disolución de FTC es mucho mayor que la de la HA, siendo 12 veces mayor en una solución ácida, 22 veces en una básica y 25 veces en una solución acuosa a 37°C y pH 7'3 (Jarcho, 1981, Kay, 1990).

En ciertas circunstancias puede ser deseable para un ímplate cuya función es la sustitución ósea ir reabsorbiéndose de forma lenta mientras se reemplaza por hueso natural. Sin embargo es necesario encontrar la tasa de reabsorción adecuada al ritmo de formación ósea. Cuando la solubilidad de una cerámica de fosfato cálcico es mayor que la tasa de formación ósea, solo podrá ser usada en cavidades óseas o relleno de defectos.

Existen bastantes intentos de, a partir de mezclas bifásicas de fosfatos de calcio, sintetizar el componente mineral del hueso. Así se han preparado sustitutos óseos basados en mezclas entre hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico que evolucionan, bajo condiciones fisiológicas, a carbonatoapatita. Estas reacciones están basadas en equilibrios entre la fase más estable, *hidroxiapatita*, y la más reabsorbible, *β -fosfato tricálcico*, que dan lugar a una mezcla que sufre una progresiva disolución en el cuerpo humano, sirviendo como semilla de formación de nuevo hueso y aportando iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} al medio local. Este material se puede

utilizar conformado en piezas, en forma de recubrimientos o inyectado. En la actualidad, se están preparando muy diversas mezclas bifásicas con distintos fosfatos de calcio, vidrios, y sulfatos de calcio entre otros (**Vallet-Regi**, 2000) .

Bouler (1996) estudió en una cerámica bifásica los distintos parámetros que afectaban a su resistencia a la compresión. Los factores más determinantes para una mayor debilidad fueron la mayor macroporosidad y la menor temperatura final de sinterización. Así mismo disminuía la resistencia el mayor porcentaje de FTC frente al de HA. También se ha estudiado la influencia de la concentración de ambos componentes, demostrándose que ha mayor concentración de FTC mayor tasa de disolución.

La principal limitación de las cerámicas de fosfato cálcico es la resistencia mecánica inicial, sin embargo una vez incorporados y remodelados presentan características similares al hueso esponjoso. Por esto, hasta que no aparece crecimiento óseo en su interior se debe retrasar la carga y mantener una estabilización rígida.

Tanto la HA como el FTC han demostrado en marcada osteointegración y osteoconducción radiológica e histológica en múltiples estudios en humanos y animales (**Uchida**,1984; **Oonishi**, 1992; **Ransford**, 1998; **Bertrand**, 1996; etc.).

Las fases estables de estas biocerámicas dependen considerablemente de la temperatura y de la presencia de agua, tanto durante el procesamiento como en el medio donde luego se utilizarán. Es importante entender la estrecha dependencia entre relación Ca/P, pH y solubilidad: cuanto menor sea la relación Ca/P, el nivel de pH disminuirá (mayor acidez) y la solubilidad aumentará (**Vallet-Regi**, 1997).

Muchos estudios recogidos en la bibliografía observan formación ósea sin formación de tejido fibroso (**Jarcho**,1976; **Daculsi**, 1990). Pero otros describen que inicialmente aparece una capa de tejido fibroso seguida de reabsorción de algunas áreas y formación de osteoide y hueso en otras (**Galgut**, 1990).

Los fosfatos cálcicos, en la actualidad, se utilizan para una gran variedad de aplicaciones como artrodesis vertebral, reconstrucción cráneo-máxilo-facial, tratamiento de fracturas, artroplastias (como aumentación ósea) y artroplastias de revisión. Solo algunas composiciones de fosfatos cálcicos son utilizadas como implante en humanos. Las composiciones con una relación Ca/P menor de 1 no son adecuadas como implante biológico por su gran solubilidad.

El comportamiento mecánico de las cerámicas de fosfato de calcio influye enormemente en sus aplicaciones como implantes. Tanto la resistencia a tensión como a compresión y a fatiga dependen del volumen total de porosidad del material, la cual puede venir dada en forma de microporos (< 1 mm en diámetro) o en forma de macroporos (> 100 mm en diámetro).

Los implantes de fosfato cálcico (HA en particular) son usados como recubrimiento de implantes metálicos, relleno en matriz poliméricas, cemento óseo, gránulos o estructuras conformadas (pe: cuñas para relleno de osteotomías) (**Cordero J**, 2000)

A.- Hidroxiapatita

La HA $[Ca_{10} (PO_4)_6(OH)_2]$ tiene una composición teórica de Ca 39'68% y P 18'45% (% de peso); una razón de peso Ca/P de 2'151 y una razón molar Ca/P de

1'67. También tiene mayor estabilidad que otras cerámicas de fosfato cálcico en un rango de pH de 4'2-8'0.

El principal componente inorgánico del hueso humano es la apatita biológica que es un derivado de la HA con otros iones (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- y Cl^-) incorporados en la superficie o en la estructura cristalina, con alguna sustitución de iones fosfatos (PO_4)³⁻ por carbonato (CO_3)²⁻, y que no es estequiométrica (cuando la relación cuantitativa de reactivos y productos no proporcional).

Como señalamos previamente la relación molar de la HA estequiométrica es de 1'67 y la de la apatita biológica de 1'72-1'80 (**Rawlings**, 1992).

En los años 80s y 90s hubo un gran interés por el uso de la HA lo que se demuestra por la gran cantidad de estudios por grupos como los de **Jarcho** 1976, **Bonfield** 1978, **DeGroot** 1988, **Driessens** 1988 y **Wang** 2007.

La estructura cristalina de la HA puede soportar sustituciones iónicas por grupos Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- . Estos cambios afectan a la estructura, cristalinidad, solubilidad y estabilidad térmica. En 1960, **LeGeros** fue la primera investigadora en caracterizar la HA carbonatada en aplicaciones biomédicas. Hay dos tipos de sustitución carbonatada, CO_3^{2-} por OH^- (tipo A) y CO_3^{2-} por PO_4^{3-} (tipo B). Esta sustitución ha demostrado tener una mayor tasa de aposición ósea en comparación con la HA pura, probablemente debida a la mayor solubilidad de la HA carbonatada (**Barralet**, 2002).

Shepers (1991) implantó gránulos (400-800 μm) de HA en mandíbula de perros, y observaron crecimiento óseo a través de las partículas en la proximidad del tejido óseo, sin embargo no hubo crecimiento más allá de 1mm tras 12 semanas.

B.- Fosfato tricálcico.

El FTC [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] está compuesto por un 39% del peso de calcio y un 20% de fósforo.

El FTC tiene 4 morfotipos, los más comunes son las formas α y β . El FTC- α tiene forma poligonal y mientras que el FTC- β es esférico, tiene mayor porosidad y puede ser compactado mejor en un defecto óseo. FTC- β tiene una microestructura más fina lo que hace que la tasa de reabsorción sea más rápida que el FTC- α (Wiltfnag, 2002).

La mayoría de los FTC comercializados son los β . Su fuerza a la tracción y a la compresión es similar a la del hueso esponjoso (Jarcho, 1981). Son más débiles y frágiles a las fuerzas de cizallamiento. Los FTC están comercializados por gran cantidad de empresas y con distintos nombres y presentaciones como Vitoss® (Orthovita; bloques y granulos), ChronOS® (Synthes, bloques y cuñas), Conduit® (DePuy, granulos), etc.

El Vitos® presenta un 90% de interconexión. Aproximadamente el 75% de los poros son entre 100 y 1000 μm , tamaño adecuado para el crecimiento óseo en su interior y cumplir su función osteoconductora. El 25% restante son menores de 100 μm , que aunque no favorecen directamente la osteoconducción, facilitan el flujo de fluidos a través de la matriz y mejoran el desarrollo metabólico celular en su interior (Bulchoz, 2002).

El FTC se disuelve por reabsorción y fragmentación a los 6-18 meses. La reabsorción ocurre vía osteoclastos junto a una reacción inflamatoria con células

gigantes. El volumen óseo producido es siempre menor que el volumen de FTC reabsorbido (**Moore**, 2001).

El FTC con un ratio Ca/P de 1.5 se reabsorbe de forma más rápida que la HA.

En estudios de FTC como sustitos óseos, **Blom** (1998) demostró que son más estables y que presentan una estabilidad más reproducibles que el aloinjerto.

C.- Fosfato Cálculo

Se trata de una pasta inyectable y fosfato y calcio inorgánico que se endurece in situ por una reacción de cristalización de la dalita $[\text{CaCO}_3-2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$.

Tras endurecerse presenta una fuerza a la compresión de 4 a 10 veces mayor que el hueso esponjoso. Por esta característica puede ser usado para evitar desplazamientos secundarios de fracturas articulares.

El primer fosfato cálcico disponible en el mercado fue el Norian SRS® (Synthes®), aunque actualmente se han comercializado más de características similares.

Estudios en animales han demostrado una remodelación similar al hueso normal. Con el paso del tiempo sufre una reabsorción osteoclástica seguido de una invasión de microvascularización (**Frankenburg**, 1998).

Las limitaciones de este material son las siguientes:

- Necesitar de una osteosíntesis rígida previa.
- Extravasación en tejidos adyacentes. Debido a que inicialmente se introduce en estado líquido. En largas series de fractura de radio distal ocurre en un 70% (Cassidy,2003).
- Lenta tasa de reabsorción.

El cemento de fosfato cálcico ofrece la mayor fuerza mecánica a la compresión de todos los osteoconductores. Esto lo hace espacialmente útil en ancianos donde la descarga es difícil de conseguir y en áreas metafisarias donde se busca una movilidad precoz sin colapso.

	Nombre comercial	Fuerza compresión respecto hueso esponjoso	Tasa de reabsorción	Ventajas	Desventajas
SC	Osteoset® OsteoMax® BonePlast®	Similar	Muy Rápida 4-12 sem	Disponible en pastillas, polvos e inyectable	Drenaje seroso. Reabsorción excesivamente rápida
HA	Pro Osteon®	Ligeramente mayor	Mayor de 10 a 500R= 12 m	Efectividad en estudios prospectivos	Frágil. Material residual
FTC	Vitos® ChronOS® Cerasorb®	Ligeramente menor	Lenta 6-18 meses	Disponible en varias formas	Fragilidad
FC	Norian SRS® Bone Source® Mimix®	4-10 veces mayor	Lenta 30-60% en 1a	Fuerza. Permite RHB y carga en 2 sem	Extravasación a tejidos vecinos

Tabla 3: Resumen de las características principales de las cerámicas reabsorbibles comercializadas (modificación de Hak, 2007).

BIOVIDRIO

Dentro de los materiales cerámicos, en el extremo opuesto desde el punto de vista microestructural a las cerámicas propiamente dichas (sólidos cristalinos) se encuentran los vidrios (sólidos amorfos), que pueden considerarse bien como sólidos con elevadísimo desorden estructural o bien como líquidos con elevadísima viscosidad.

En 1971 **Hench** y col. descubrieron que ciertas composiciones de vidrios se enlazaban al hueso. A estos vidrios se les denominó vidrios bioactivos. La unión con el hueso se producía a través de una capa de hidroxicarbonatoapatita formada en la superficie de los vidrios bioactivos cuando entraban en contacto con los fluidos biológicos. Dicha capa se formaba como consecuencia de la alta reactividad de los vidrios en un medio acuoso, que propicia un rápido intercambio de los iones de la superficie del vidrio con los de los fluidos circundantes. Este proceso producía una variación de la concentración iónica del fluido y, simultáneamente, la formación de una capa de gel de sílice en la superficie del vidrio, favoreciendo ambos efectos la cristalización de la hidroxicarbonatoapatita. Esta apatita crecida sobre la superficie de las piezas de vidrio es semejante a las apatitas biológicas, esto es, nanocristalina y no estequiométrica con presencia de carbonato.

Durante las décadas de los 70 y los 80, los vidrios bioactivos se obtenían exclusivamente por el método tradicional de fusión y enfriamiento rápido, produciéndose materiales con superficie específica y porosidad muy pequeñas. La investigación en vidrios de fusión se ha dirigido principalmente en dos direcciones: una, reforzar las propiedades mecánicas sin perder la bioactividad, lo que se ha

abordado generalmente preparando vitrocerámicas, y la otra, estudiar la influencia de la composición en la bioactividad.

Por otra parte, desde principios de los años 90 se han comenzado a preparar vidrios bioactivos utilizando el *método sol-gel*. Todavía no se ha aprobado la utilización en clínica humana de ningún vidrio sol-gel pero, teniendo en cuenta que la cinética de formación de hidroxicarbonatoapatita observada en los ensayos *in vitro* es superior a la de los vidrios de fusión, y que la velocidad de crecimiento de hueso en los ensayos preliminares realizados en animales también lo es, no resulta aventurado suponer que los vidrios sol-gel serán utilizados clínicamente en un futuro muy próximo.

El incremento de bioactividad de los vidrios sol-gel se explican sabiendo que las propiedades texturales del material como son el *área superficial, el volumen de poro y la distribución de tamaño de poro* tienen gran influencia en su reactividad. El comportamiento de la *superficie* de las biocerámicas es un factor clave en la respuesta del implante. Por eso su caracterización es imprescindible. Cuanto mayor superficie específica y porosidad, mayor reactividad y, por tanto, cinética más rápida en la respuesta. Por otro lado, las células tienen claras preferencias por la forma de la superficie y su terminación, *lisa* o *rugosa*. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la superficie específica y porosidad elevadas de los vidrios sol-gel tienen una marcada influencia en la cinética de formación de hidroxicarbonatoapatita.

EL biovidrio descrito por **Hench** y cols tiene una composición de $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$, siendo el único material cerámico cuya composición consta fundamentalmente de óxidos de silicio, calcio y sodio. El óxido de silicio que actúa

como vitrificante, el óxido de calcio que actúa como estabilizador y el óxido de sodio que actúa como elemento de fusión; el óxido de fósforo no se considera imprescindible al estar presente en los líquidos intersticiales.

El vidrio bioactivo modelo, que se toma de referencia para comparar los demás es el 45S5 Biovidrio[®], que contiene 45% de SiO₂, 24.5% de CaO, 24.5% de Na₂O, y un 6% de P₂O₅.

Otros vidrios activos son:

- 45S5.4F Biovidrio[®]: Semejante pero con menor cantidad de CaO, (14.5%) y un 9.8% de contenido en CaF₂.
- 458.15S5 Biovidrio[®] con menor cantidad de SiO₂, (30%) y un 15% de B₂O₃.
- 52S4.6 Biovidrio[®] con mayor cantidad de SiO₂, (52%) y menor de CaO y Na₂O (21%).
- 55S4.3 Biovidrio[®], muy parecido al anterior aumentando más aún el SiO₂, (55%) y aún menos de CaO y Na₂O, (19.5%).

En la medida en que se diferencian en su composición al 45S5 Biovidrio[®], varía su comportamiento bioactivo.

Muchos vidrios con sílice bioactivos están basados en la fórmula denominada "45S5", que significa: "45" que el 45% del peso es SiO₂, la "S" hacía referencia a la capacidad de estos vidrios de formar un entramado en forma de red, y "5" a la razón 5:1 molar de Ca respecto a P (Ca:P) que contenían. Los vidrios con razones molares Ca:P sustancialmente menores (en forma de CaO y P₂O₅) no se unen al hueso (Hench, 1973).

Hench en 1972 también observó que existían tres características clave de la composición de estos vidrios que los distinguían de los vidrios tradicionales de sosa-cal-sílice: contener menos del 60% molar de SiO_2 , alto contenido en Na_2O y CaO , y elevada relación $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$. Estas características de la composición hacían la superficie altamente reactiva cuando se exponían a un medio acuoso.

Existe una dependencia entre la composición (en porcentaje del peso) y la unión ósea para los vidrios de $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ de modo que según la proporción de esta composición cambia el comportamiento de los mismos: Los vidrios que contienen un 6% del peso de P_2O_5 forman unión con el hueso. La unión es rápida si el porcentaje de silicio es del 42-53%; del 54-60% necesita 2-4 semanas para unirse.

Los que contienen mayor contenido en SiO_2 y menor en CaO y Na_2O (como los vidrios de las botellas) se comportan como materiales casi inertes y provocan la formación de una cápsula fibrosa en la zona de unión implante-tejido. Los vidrios con mayor porcentaje en su peso de SiO_2 y Na_2O y menor de CaO son reabsorbibles y desaparecen de 10 a 30 días tras la implantación. Los que contienen menor porcentaje de SiO_2 y mayor de CaO y/o Na_2O no han sido experimentados como implantes.

En la tabla 4 se resumen los cambios dependientes del tiempo de la formación de apatita fundamental para la bioactividad de los vidrios bioactivos y vitrocerámicas. La tabla representa los estadios que ocurren en la superficie de un material vítreo o amorfo en una sola fase. Si se desea conocer el comportamiento de los implantes bioactivos multifase, como el Ceravital[®], A-W glass-ceramic[®], o un compuesto bioactivo, es necesario establecer los cambios que se producen en su superficie dependientes del tiempo para cada fase de la reacción en la zona de unión

implante-hueso y para cada caso. El entorno biológico puede degradar una fase o una zona de contacto o unión preferencialmente resultando en una degradación en la periferia en grano para ciertas vitrocerámicas bioactivas (**Gross, 1988**).

Estadio 1	$\text{Si-O-Na}^+ + \text{H}^+ + \text{OH}^- \longrightarrow \text{Si-OH}^+ + \text{Na}^+ (\text{solución}) + \text{OH}^-$
Estadio 2	$\text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Si-OH}$
Estadio 3	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O-Si-OH} \\ \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO-Si-O} \\ \\ \text{O} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{O-Si-O-Si-O} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array} + \text{H}_2\text{O} $
Estadio 4	$\text{Ca}^{2+} \text{ y } \text{PO}_4^{3-} \longrightarrow \text{CaO-P}_2\text{O}_5$
Estadio 5	$\text{CaO-P}_2\text{O}_5 \text{ OH}^- + \text{CO}_3^{2-} + \text{F}^- \longrightarrow \text{hidroxil/carbonato/fluorapatita}$

Tabla 4: Estadios de la reacción de un implante bioactivo:

- Estadio 1: Intercambio rápido de Na^+ o K^+ con H^+ o H_3O^+ de la solución. Este estadio está controlado normalmente por difusión [**Hench, 1978, Douglas, 1967 y Jantzen, 1984**].
- Estadio 2: Pérdida de sílice soluble en forma de Si(OH)_4 hacia la solución, resultante de la ruptura de los enlaces de Si-O-Si, y formación de Si-OH (silanoles) en la zona de contacto entre el vidrio y la solución. Este estadio está controlado por la reacción de la zona de unión (**Hench, 1978**).
- Estadio 3: Condensación y polimerización de una capa rica en SiO_2 en una superficie ya muy poco rica en álcalis y en cationes alcalinos.

- Estadio 4: Migración de grupos de Ca^{2+} y PO_4^{3-} hacia la superficie a través de la capa rica en SiO_2 formando una película rica en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ sobre esta capa rica en SiO_2 , seguida del crecimiento de una película amorfa rica en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ mediante la incorporación de calcio y fosfatos solubles desde la solución (**Ogino**, 1980, **Clark**, 1976 y **Kim**, 1989).
- Estadio 5: Cristalización de la película amorfa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ mediante incorporación de iones OH^- , CO_3^{2-} , o F^- de la solución para formar una capa mixta de hidroxil, carbonato y fluorapatita (**Kim**, 1989).

Uno de los biovidrios que presentan este comportamiento y del cual se describe la cinética de la reacción de superficie es el Bioglass 45S5[®]. Este biovidrio original ha sido utilizado como base para la mayoría de los estudios de superficie porque tiene solamente cuatro componentes (Na_2O , CaO , P_2O_5 , SiO_2) y una sola fase. Esta composición simple tiene el índice más alto de bioactividad in vivo, como se describe a continuación.

Existen varios estudios (**Kim**, 1989, **Clark**, 1990 y **Anderson**, 1990) que muestran de una forma bastante clara la secuencia de la reacción producida cuando el Bioglass 45S5[®] se expone a una solución tamponada sin contenido en iones Ca y P ("tris buffer"). Para determinar las reacciones producidas en la superficie utilizaban la espectroscopía de transformación de infrarrojos de Fourier (FTIR) sobre esta reacción de la superficie del biovidrio de forma seriada de manera que obtenían un valor determinado en cada tiempo de exposición. Los cinco estadios de la reacción

estaban bien definidos por los cambios en los modos de vibración de los compuestos químicos.

Clark, en 1976, mostró en un estudio en una superficie de prueba que ésta seguía enriqueciéndose en fosfato y calcio incluso durante 2 minutos hasta una profundidad de 20 nm. y **Ogino** (1980) demostró que la capa seguía creciendo hasta tener a la hora, 200 nm de espesor. En el crecimiento de esta capa rica en Ca-P se incorporan los constituyentes orgánicos que contienen C y N. A los 40 minutos, las uniones P-O son fuertes y se va enriqueciendo la capa en fosfato cálcico. A la hora y media, las uniones P-O asociadas a la capa de fosfato cálcico amorfo se van sustituyendo por apatita cristalina. Coincidiendo con la aparición de la cristalización de la apatita (Estadio 5 en la tabla IV) ocurre incorporación de CO_3^{2-} en el entramado del cristal de apatita (**Le Geros**, 1978 y **Kim**, 1989). Ocurre así el crecimiento de la capa de apatita de hidroxil-carbonato (HCA) y a las 10 horas, la capa de HCA ha crecido hasta un espesor de $4\mu\text{m}$ (**Ogino**, 1980). A las 100 horas, la capa de HCA policristalina es lo suficientemente gruesa para producir una difracción de rayos X (**Hench**, 1972), en 2 semanas, es equivalente a las apatitas biológicas que crecen *in vivo* (**Le Geros**, 1978).

La bioactividad ocurre solamente dentro de ciertos límites de la composición y razones de óxidos muy específicas en los sistemas $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{MgO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$. Sin embargo, la extensión de estos límites en la composición y las razones fisicoquímicas y bioquímicas para éstos no están totalmente estudiadas. Para una unión con los tejidos, se tiene que formar una capa de hidroxilcarbonato de apatita (HCA). Quizás ésta es la única característica común de todos los implantes de materiales bioactivos.

Gross (1985) demostró que la concentración inicial de células presente en la interfase (células madre, osteoblastos, condroblastos, y fibroblastos) varía en función del ajuste del implante en el defecto que se rellena y las condiciones de dicho defecto. Por consiguiente, todos los implantes bioactivos requieren un periodo de incubación antes de que el hueso proliferare y se una. La longitud de este periodo de incubación varía en un gran rango dependiendo de la composición del implante, la cual controla la cinética de las reacciones de superficie, Estadios 1-5. Para que el material sea bioactivo y forme una intercara de unión, el tiempo de los Estadios 4 y 5 debe coincidir con el tiempo de biomineralización que ocurre normalmente “*in vivo*”. Si la superficie de reacción se forma demasiado rápida el implante es reabsorbible. Si las reacciones son lentas, por el contrario, el implante no es bioactivo.

Existen unos valores críticos determinados dentro de los cuales la bioactividad se restringe a la formación de una unión estable con el hueso y los tejidos blandos dependiendo del tipo de células progenitoras que esté en contacto con el implante (**Wilson**, 1990).

El espesor de la zona de unión entre un implante bioactivo y el hueso es proporcional a su índice de bioactividad. Dicha zona de unión, cuando el implante es Bioglass[®] y está implantado en hueso, está formada por una capa rica en sílice y una capa de HCA (Ca y P). Las células óseas vivas (osteocitos) también están en esta zona de intercara. No hay tejido fibroso en esta zona de interfase (**Hench**, 1982 y **Gross**, 1988). El espesor de la capa de unión es aproximadamente de 100 a 150 μm .

El mecanismo de unión de los vidrios bioactivos se produce por una secuencia de 11 reacciones. Las cinco primeras reacciones se corresponden con los cinco estadios descritos previamente. Las reacciones comprendidas entre la seis y la once se corresponden al proceso de unión al hueso propiamente dicho.

El primer paso ocurre en la superficie del material y produce un rápido intercambio iónico de Na^+ con H^+ y H_3O^+ seguido de una reacción de policondensación de SiOH para crear una gran área de superficie de gel de silicio, que proporciona una gran cantidad de lugares para la cristalización de una capa de hidroxicarbonatoapatita similar a la fase mineral inorgánica del hueso. El crecimiento de esta capa de hidroxicarbonatoapatita favorecen las siguientes reacciones de colonización de osteoblastos seguidos de la proliferación y diferenciación del células para formar hueso nuevo que estará fuertemente unido al implante (Tabla 5).

1 y 2	Formación de uniones SiOH.	
3	Policondensación de $\text{SiOH} + \text{SiOH} \Rightarrow \text{Si-O-Si}$.	1 h
4	Absorción de $\text{Ca} + \text{PO}_4 + \text{CO}_3 + \text{OH}$ amorfo.	
5	Cristalización de la HCA.	2 h
6	Absorción de componentes biológicos en la capa de HA.	10 h
7	Acción de los macrófagos.	
8	Adhesión de células madre.	20 h
9	Diferenciación de células madre.	
10	Generación de la matriz.	100 h
11	Cristalización de la matriz y crecimiento óseo.	

Tabla 5: Secuencia de las fases de la reacción de superficie implicadas en la formación de la unión entre el tejido y las cerámicas bioactivas (modificada de **Hench**, 1997).

La dependencia de estas fases con el tiempo es lo que se denomina *índice de bioactividad (Ib)* (**Li y Hench**, 1991). Cuando las fases se enlentecen en el tiempo, los valores de índice de bioactividad disminuyen dramáticamente. Y si son las fases 4 y 5 las que se retrasan demasiado tiempo, el implante no será bioactivo. El valor $Ib = 100/\text{tiempo}$ que tarda el 50% de la interfase en crear una unión bioquímica al hueso. Los valores de las biocerámicas más conocidas se muestran en la tabla 6.

BIOCERÁMICA	VALOR Ib
45S5 Bioglass®	12'5
Ceravital®	5'6
Vitrocerámica A/W	3'2
Hidroxiapatita	3'1
Alúmina	0

Tabla 6: Valores de los Índices de Bioactividad de las algunas biocerámicas (modificada de **Li y Hench**, 1991).

Según estos valores, el Bioglass 45S5® es la más bioactiva de las biocerámicas más utilizadas en experimentación para la sustitución ósea.

En 1986, **Hench** clasificó los materiales bioactivos según su bioactividad en Clase A y Clase B (**Hench**, 1997) y antes, en 1994 **Rehman** había descrito los mecanismos de formación y crecimiento de HA sobre las superficies de los vidrios bioactivos.

La bioactividad de Clase A es el proceso mediante el que una superficie biológica es colonizada por células progenitoras osteogénicas que no existían en el defecto creado quirúrgicamente en el momento de la implantación. Ocurre una respuesta intra y extracelular en la zona adyacente a la periferia del implante. Estos materiales se denominaron osteoproductivos.

La bioactividad de Clase B es la que permite el crecimiento del tejido óseo a lo largo de la zona adyacente al implante. El material solamente induce una respuesta extracelular en la periferia. Por ello los materiales que la poseen se denominan osteoconductivos.

Los materiales de HA son osteoconductivos, mientras que los vídrios bioactivos son osteoconductivos y osteoproductivos. Ninguno es osteoinductivo ya que ello requiere la presencia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y otros factores que solamente están presentes en el hueso natural. Las BMPs producen multiplicación celular de las células óseas, por ello incrementan la tasa de formación de la matriz ósea intercelular mediante la activación de las células precursoras (células mesenquimales) que se convierten en células osteogénicas (**Pinholt, 1992**). Los biomateriales osteoproductivos favorecen que las células óseas ya existentes produzcan matriz ósea, y un incremento en la tasa de proliferación de las células progenitoras ya existentes pero no inducen a las células precursoras hacia células osteogénicas.

Andersson en 1990 propuso una clasificación de los vidrios según su bioactividad, creando una escala arbitraria según su “*número de reacción*”. El número de reacción es calculado a partir de la composición del vidrio (en % de peso).

$$NR = 88,3875 - 0.0116272 (SiO_2)^2 - 0.890188 (Na_2O) - 1.12306 (CaO) - 1.20556 (P_2O_5) - 0.560527 (B_2O_3)^2 - 2.08689 (Al_2O_3).$$

- a) NR=1 : vidrios casi inertes.
- b) NR=2 : vidrios solubles, hay contacto pero no hay unión al hueso (se forma la capa de silicio sin acumulo de Ca ni P).
- c) NR=3 : son como los tipo b, pero con pequeños cúmulos de Ca y P.
- d) NR=4 : hay formación de capa de Ca y P pero no unión al hueso.
- e) NR=5 : son los vidrios bioactivos con capa y Ca y P y unión al hueso.

La fórmula es particularmente útil en vidrios que solo posean los grupos que se valoran en la fórmula y cuando el contenido de CaO y Na₂O es elevado (mayor del 10%).

Otra fórmula propuesta para valorar la bioactividad de un vidrio está basada en el número de iones con puente de oxígeno por poliedro (**Strnad**, 1992). Según este modelo el vidrio es bioactivo con un valor de Y menor de 3, siendo $Y = 2Z_m - 2R$ y siendo Z_m =el número de todos los tipos de oxígenos por tetraedro y R= la razón

entre el número total de oxígenos y el número total de cationes. De todas formas no parece que esta fórmula sea más predictiva que la anterior.

La otra posibilidad de predecir la bioactividad se basa en que el vidrio tenga un potencial iónico menor o igual a 17.5 nm^{-1} o que el campo de fuerza sea menor o igual a 103 nm^{-2} (**Rawlings**, 1993).

Los vidrios bioactivos también se unen a tejidos blandos. Fue **Wilson** en 1990, el primero que observó que se podía formar una interfase adherente entre los vidrios bioactivos y los tejidos blandos conectivos si la intercara entre el tejido y el implante permanecía inmóvil durante los primeros días de la cicatrización. Son los vidrios bioactivos de Clase A con valores muy altos de I_b , >8 los que tienen también la propiedad de unirse a tejidos blandos. No se produce inflamación, el implante se estabiliza mediante una unión adherente a las fibras de colágeno del tejido conectivo. La fuerza adhesiva de las fibras de colágeno con las capas de la unión de la superficie de los vidrios bioactivos es mayor que la fuerza adhesiva de las fibras de colágeno entre sí. Las fases de la reacción implicadas en la formación de la unión con el tejido blando son equivalentes a las que forman la unión con el hueso (**Wilson**, 1990). Sin embargo, el espesor de la intercara de unión con dichos tejidos blandos es mayor que la de la unión con el hueso. Estos hallazgos relativos a la estabilidad de la interfase o intercara de unión con los tejidos blandos son especialmente importantes clínicamente debido a que en muchas ocasiones los implantes estarán en contacto con hueso pero también con tejido conectivo blando. Solamente si las dos intercaras de unión son estables, el implante estará inmóvil y mantendrá su función fisiológica. El éxito a medio y largo plazo de prótesis auditivas, alveolares,

etc, se debe a la formación de las intercaras de unión con ambos tejidos, el óseo y el conectivo.

El comportamiento de los biovidrios ha sido estudiado en relación otras cerámicas y materiales (**Oonishi**, 1997) siendo muy destacable los estudios realizados con los cultivos celulares (**Price**, 1997) en los que los osteoblastos formados como respuesta al “frente de calcificación” exhiben un fenotipo más expresivo que frente ante la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico (**Vrouwenvelder**, 1994). Influye en ello (**El-Ghannam**, 1997) la mayor absorción de fibronectina por el biovidrios, y esta mayor absorción está justificada por la presencia de los péptidos RGD, receptores celulares de la misma (**Garcia**, 1998). Asimismo hay estudios sobre el crecimiento óseo de gránulos de distintas cerámicas de varios tamaños, siendo el biovidrio 45S5 el que estimulaba más rápidamente el crecimiento óseo, además con la HA no se forma en las primeras horas la fase de apatita que se forma con los biovidrios.

Cuando se valora el comportamiento de biovidrios “in vivo” ha podido apreciarse que el 90% del implante está cubierto de hueso a las 4 semanas, mientras que con la HA sólo hay un recubrimiento del 60% a las 16 semanas (**Yamamuro**,1994). Nunca hay encapsulación fibrosa (**Ito**, 1987). En comparación con la HA y fosfatos de calcio la superficie del material sufre un proceso de degradación y el hueso reactivo crece en las irregularidades de sus superficies (**Neo** 1992, **Bagambisa**, 1993), mientras que en el biovidrio se observado que la unión implante-hueso se realiza en el espesor, no sólo en la superficie de las muestras.

VITROCERÁMICAS

Desde el descubrimiento del *Bioglass*[®] por **Hench** en 1971 se ha demostrado la buena unión del biovidrio al hueso, pero con escasas propiedades mecánicas que han limitado su aplicación; la investigación con vitrocerámicas busca reforzar sus propiedades mecánicas sin perder sus características bioactivas.

Las vitrocerámicas son cerámicas policristalinas obtenidas por cristalización controlada de vidrios donde existen fases amorfas y cristalinas (90%). Su historia comienza con **Kokubo** en 1982 en Japón, él es el primero en publicar la producción y el comportamiento de “*A-W glass-ceramic*”, esta tiene un módulo de Young, resistencia a la rotura y a la tensión superiores al biovidrio, lo que permite ser usado en zonas sometidas a compresión. Su composición fue 34% β -Wollastonita ($\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$), 38% Oxifluoroapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O}, \text{F}_2)$] y 28% Biovidrio de partida (MgO 17%, CaO 24%, SiO_2 59%).

El hueso natural es un microcomposite en el cual pequeñas partículas de apatita están reforzadas por fibras colágenas. Bajo esta premisa **Kokubo** y cols sintetizaron en 1982 un material con pequeñas cantidades de apatita reforzadas por β -wollastonita ($\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$) con una estructura de cadena silicato, mediante cristalización de un vidrio $\text{MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$. El resultado es que sin cambiar la bioactividad, aumenta mucho la resistencia mecánica. Esta además, disminuye muy poco en situaciones de carga.

Hay dos procesos de formación de vitrocerámicas:

- A. Convencional: Fundir el vidrio de origen y después cristalizar, es esencial que los núcleos de cristalización estén en interior del bloque y que haya pocos en la superficie ya que esto empeora sus propiedades mecánicas.
- B. Convertir en polvo el vidrio de origen, este es prensado y calentado para sinterizar las partículas vítreas en un componente sólido y por último se vuelve a calentar para la cristalización. El proceso de prensado y sinterizado se puede realizar a la misma vez (prensado-caliente). Este es el proceso usado por **Kokubo** y cols en 1982 para evitar las pobres propiedades mecánicas cuando aparecían núcleos de cristalización en superficie por el proceso convencional.

La bioactividad de la vitrocerámica no se atribuye a la capa de apatita que presente la vitrocerámica de origen, sino a la formada posteriormente con el contacto con los fluidos biológicos. Se considera, como se explicó anteriormente, que la disolución de iones calcio y silicio juegan un papel importante en la formación de la capa de apatita.

La vitrocerámica *A-W* tiene varias ventajas como que se puede manufacturar de múltiples formas (incluso en el interior de tornillos) y presenta además una resistencia a la flexión es de unos 200 MPa lo que es casi el doble de la hidroxiapatita sintética y mayor que los 160 Mpa del hueso cortical humano. Cuando se introduce en defecto tibiales de conejos, a las 8 semanas se observa contacto directo con el

hueso (sin tejido fibroso) con una unión muy fuerte que hace que al aumentar la carga, la fractura no se produzca en la interfase vitrocerámica-hueso (teóricamente más débil) sino por el hueso circundante (**Nakamura**, 1985). La tasa de formación de hueso es mucho más rápida que la HA sintética (**Ono**, 1990)

En la interfase vitrocerámica A-W – hueso, siempre se observa una delgada capa rica en Ca (cálcio) y P (fósforo) y pobre en Mg (magnesio) y Si (silicio). El grosor varia de 0,5 – 100 μm dependiendo del tipo de animal, el hueso elegido y el tiempo post implantación (**Kitsugi**, 1986). Esta es la misma capa que se observa en vidrios del tipo Bioglass® y otras vitrocerámicas, lo que nos indica que la condición esencial para la unión al hueso de las cerámicas bioactivas es la formación de la capa de apatita.

Para valorar la importancia de la capa de apatita en la unión de las vitrocerámicas se colocaron dos piezas de A-W sumergidas en fluido humano simulado durante 1 mes y la unión obtenida no se podía separar de forma manual (**Kokubo**, 1987).

Como ya hemos comentado los iones calcio y silicio son muy importantes para la formación de la capa de apatita. La disolución del silicio favorece la nucleación de la apatita en la superficie de la vitrocerámica, y la disolución del calcio sobresatura el fluido circundante. El Ca y el Si en disolución provienen del vidrio residual y de la wallastonita (**Kokubo**, 1990)El ión fosfato necesario para la formación de la apatita esta suministrado por el fluido fisiológico circundante, por lo que no es necesario que la vitrocerámica posea ión fosfato en su composición para formar la capa de apatita (**Ohura**, 1991).

Cuando una vitrocerámica bioactiva es implantada en tejido óseo vivo, la superficie de la misma se disuelve lentamente liberando hacia el fluido corporal adyacente varios iones de los que contiene (**Yamamuro**, 1994). La velocidad de esta disolución y liberación iónica es diferente en cada tipo de biocerámica; en el caso del Bioglass[®], Ceravital[®] y A-W glass-ceramic[®] es más rápida que en el de la HA sintética. Cuando se le añade a la composición de las cerámicas pequeñas cantidades de determinado tipo de componentes metálicos tales como el óxido de aluminio o el óxido de titanio, la liberación iónica desde la superficie de la cerámica queda inhibida de forma importante impidiendo que se produzca la unión de esta cerámica al tejido óseo (**Ogino**, 1980 y **Kokubo**, 1990).

Este hecho sugiere que la bioactividad de las cerámicas bioactivas se deriva de la liberación local de iones. Cuando el Si está presente entre los iones liberados sobresaturando el entorno de la cerámica, como es el caso del Bioglass[®], Ceravital[®] y A-W glass-ceramic[®], estos iones de Si parecen actuar como núcleos para la cristalización de apatita (**Yamamuro**, 1994). En el caso de la HA, al no contener iones de Si, es necesario más tiempo para formar estos cristales de apatita sobre su superficie “in vivo”.

Por otra parte, al mismo tiempo que se produce la regeneración ósea, la actividad osteoblástica aumenta en la zona de la superficie de corte del hueso en contacto con el implante y se produce matriz ósea de forma activa por estos osteoblastos que juegan un papel decisivo en la formación de hueso nuevo hacia la superficie de la cerámica. La apatita formada en la matriz ósea se denomina “apatita biológica” para distinguirla de la “apatita química” formada en la superficie del implante. Sin embargo, cuando el nuevo hueso mineralizado alcanza la superficie de

la cerámica, que se encuentra ya cubierta completamente por la capa de “apatita química”, no se observa casi la aparición de células cerca de la zona de unión (intercara o interfase). Tanto la “apatita química” como la “apatita biológica” son idénticas cristalográficamente, de forma que cuando entran en contacto parecen madurar en un cristal de apatita común resultando en una unión químicamente firme entre la cerámica bioactiva y el tejido óseo (**Yamamuro**, 1994).

La composición de la mayoría de las vitrocerámicas es la misma que la de su vidrio de procedencia, pero generalmente con mayor cantidad de P_2O_5 y menor cantidad de Na_2O . Para estas vitrocerámicas el P_2O_5 actúa como agente de nucleación y es también un importante constituyente de la fase cristalina de la apatita, en la cual, dependiendo de la composición de su vidrio original, puede ser hidroxiapatita, hidroxilcarbonatoapatita o fluorapatita. La efectividad del P_2O_5 como agente de nucleación generalmente se ha atribuido a la elevada fuerza de campo del ion P^{5+} .

Por tanto se pueden desarrollar a partir de vidrios $CaO.SiO_2$ distintos compuestos bioactivos con diferentes composiciones (**Kokubo**, 1991), como por ejemplo:

- cerámicas, metales y polímeros orgánicos revestidos con apatita tras colocarlos en la vecindad de un vidrio $CaO.SiO_2$ en fluido humano simulado.

- cementos bioactivos que se endurece en 4 minutos, se une al hueso y una resistencia a la compresión de 80 Mpa. Sintetizado al mezclar polvos de un vidrio $CaO.SiO_2$ con una solución de fosfato amónico.

- vitrocerámicas biactivas y ferromagnéticas con Fe_3O_4 obtenida por tratamiento térmico de un vidrio $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CaO.SiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$, útil en el tratamiento hipertérmico del cáncer.

Al inicio del capítulo definíamos las vitrocerámicas como materiales policristalinos formados a partir de vidrios de adecuada composición que se someten a tratamientos térmicos para su cristalización. Sin embargo, no todos los vidrios pueden cristalizarse para producir vitrocerámicas, ya que algunos son demasiado estables.

La cristalización es una transformación heterogénea en la que ocurre un proceso de nucleación y otro de crecimiento vítreo sobre los lugares de nucleación. Hay una temperatura de nucleación T_N y otra de crecimiento vítreo T_G . Hay vitrocerámicas cuyas temperaturas son muy próximas por lo que con un solo proceso térmico T_H se completa la cristalización (Fig. 1).

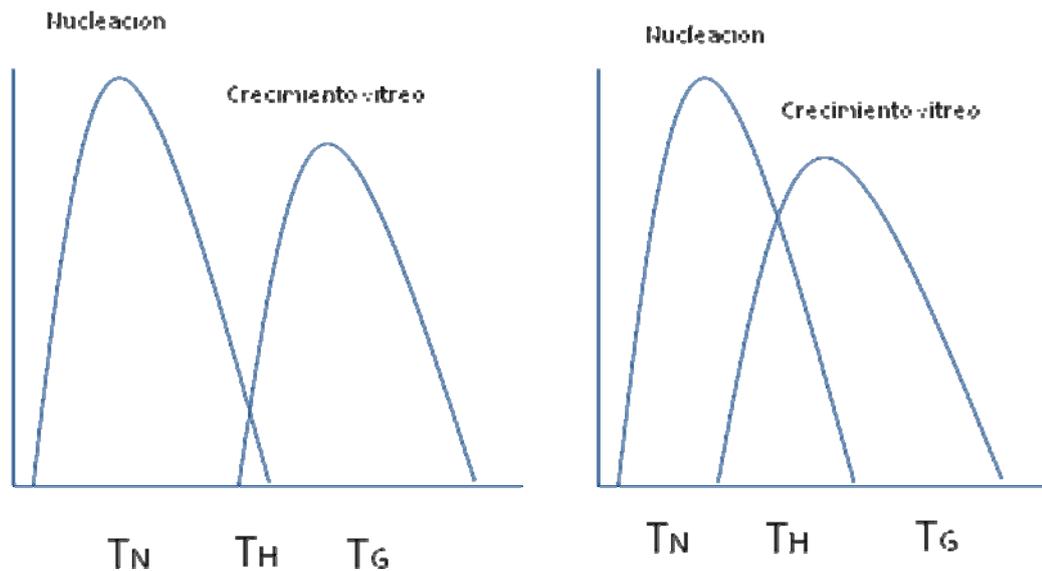


Fig. 1: Procesos de cristalización distintos. En el caso de la izquierda se precisan dos tratamientos térmicos y en el de la derecha solo uno ya que la T_H es amplia (modificada de **Rawlings**, 1992).

Una vitrocerámica no es completamente cristalina, típicamente al menos el 50% y como mucho el 98% del volumen esta cristalizado. En la mayoría de las vitrocerámicas encontramos más de una fase cristalina, esto depende de la composición y del tratamiento térmico. La fase más comúnmente encontrada en la vitrocerámicas bioactivas acompañando a la apatita es la wallastonita ($\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$).

La temperatura de cristalización para la apatita y la wallastonita varía según la composición de su vidrio de origen; por ejemplo el Al_2O_3 (alumina) reduce la temperatura de cristalización de la wallastonita y por tanto aumenta la diferencia de temperaturas de cristalización de apatita y wallastonita.

Kokubo y cols sintetizaron su vitrocerámica A-W a través de la vía no convencional. El vidrio de origen se aplastaba para conseguir partículas de menos de 44µm, el polvo se compactaba en frío y el bloque compacto se calentaba a 5°C/min hasta 1050°C donde se mantenía durante 2 horas. El proceso de densificación ocurre entre 750 - 900°C. La formación de apatita, principalmente desde la superficie de las partículas vítreas, se estabiliza a los 830°C y es seguida (850-900°C) de la precipitación de pequeños cristales de apatita (0.1×0.5 µm). Finalmente precipita la wallastonita en el vidrio residual entre los cristales de apatita.

Las propiedades mecánicas del cualquier implante que se use como sustituto óseo deberían ser lo más parecidas a al mismo. Como comentamos previamente con el proceso convencional de obtención de vitrocerámicas se consiguen propiedades mecánicas más pobres que por el de sinterización (Tabla 7).

	Módulo de Young (GPa)	Fuerza Tensil (MPa)	Fuerza de compresión (MPa)	Resistencia a la fractura (MPa m ^½)
Cortical	15-25	46-156	117-216	2,2-5,7
Esponjosa	0,02-1,7	-	0,15-5,0	-
Apoceram®	-	169	-	1,6
Apoceram® (sinterizada)	-	177	-	2,1
Bioglass®	35	42	-	-

Tabla 7: Comparativa de propiedades mecánicas. Los valores con “-“ significan que no han sido estudiados (modificada de **Rawlings**, 1992) .

Las vitrocerámicas estimulan la formación ósea en su superficie al aumentar la concentración de Ca^{2+} extracelular, lo que favorece la formación de una capa de hidroxicarbonatoapatita y la diferenciación de la línea celular osteogénica (**Matsuoka**, 1999). Esta diferenciación se evidencia por el aumento de expresión de los genes de fosfatasa alcalina, osteocalcina y TGF- β 1, que se demuestra mediante análisis de extracción e hibridación de ARN.

Matsuoka (1999) compara la formación ósea de una vitrocerámica de apatita-wallastonita con respecto a una hidroxiapatita, encontrando una diferencia significativa a favor de la vitrocerámica y en los dos casos encuentra un pico de formación ósea máximo a los 11 días. Otros estudios también comparan la HA a vitrocerámicas de apatita-wallastonita encontrando mejor potencial osteoconductor en la vitrocerámica (**Ono**, 1990).

Existe una fuerte correlación entre solubilidad (sobre todo liberación de Na^+ y biocompatibilidad. El aumento de la concentración de CaO o P_2O_5 en vidrios estequiométricos mejora la biocompatibilidad del mismo (**Bandyopadhyay-Ghosh**, 2007). Así con una vitrocerámica de fluorcanasite modificada se llegan a conseguir mejor biocompatibilidad in vitro que el Bioglass® (está aún pendiente de demostrar que ocurra también in vivo).

Como se destacaba previamente en la clasificación de las cerámicas por su generación, las vitrocerámicas que van a ser usadas como matriz en ingeniería ósea deben tener una estructura tridimensional altamente porosa con un 50-60 % del volumen de macroporos (100-500 μm) para la entrada de vasos sanguíneos y

también un alto porcentaje de microporos (< 10 μm) con paredes rugosas importantes para la osteogénesis ya que favorecen la adhesión proteica y la unión y proliferación celular.

Otra de las características necesarias de una matriz vitrocerámica en la regeneración ósea es que exista un balance adecuado entre la porosidad y las características mecánicas que deben ser similares al hueso esponjoso (2-12 MPa). Este equilibrio es difícil, ya que distintos materiales tienen una buena porosidad (> 50% del volumen total) pero malas características mecánicas (< 1 MPa).

Se ha estudiado en una vitrocerámica con un vidrio de origen (CEL2) del sistema $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$ la viabilidad como matriz para ingeniería tisular. Se observó que la porosidad era la adecuada (100-300 μm) muy interconectada con microporosidad rugosa y que era bioactiva y biocompatible. Dependiendo del sistema de producción se conseguían matrices con una porosidad del 50% y resistencia de 4 MPa o bien matrices con menor porosidad (un poco menor del 50%) y una resistencia de 5 MPa (**Vitale-Brovarone**, 2009).

Tras demostrar la utilidad de la matriz CEL2, se le añadió osteoblastos humanos (MG-63) en dos grupos uno control y otro con BMP2 observándose en los dos grupos, pero en mayor medida en el segundo, crecimiento celular y formación de depósitos de calcio (**Vitale-Brovarone**, 2007). Este mismo tema ha sido también estudiado por otros grupos con diferentes vidrios, así **Ziegler** (2008) documenta la actividad de la fosfatasa alcalina en tres matrices de HA, FTC y vitrocerámica a la que le añade un cultivo celular SAOS-2 y rh-BMP2 y rh-bFGF y encuentra que el aumento de actividad de fosfatasa alcalina ocurre en las primeras horas y desaparece pasadas 24 horas por lo que concluye que su bioactividad es tiempo dependiente.

Además de que una vitrocerámica sea bioactiva, al igual que los biovidrios, y que además tenga unas características mecánicas similares al hueso que debe reemplazar, en muchas ocasiones se necesita que se reabsorban cuando cumplen su función para que así, a la larga, solo quede hueso natural. Para ello desde que se descubrió los biovidrios y más tarde las vitrocerámicas, muchos grupos de trabajo investigan distintas formulaciones que cumplan todos los requisitos exigidos.

Una de estas vitrocerámicas bioreabsorbibles es le GC-ICEL que ha demostrado bioactividad con formación de capa de hidroxiapatita, reabsorción continua y sobre todo diferenciación a osteoblastos de células humanas de médula ósea (MSC) lo que la convierte en estimuladora de la Osteogénesis (**Leonardi**, 2009).

Los biovidrios han sido utilizados como liberadores de diversas drogas, como así lo demuestra nuestro grupo de estudio con el biovidrio 58S como vector biodegradable de liberación controlada de gentamicina (**Ros**, 2006). De igual manera se han descrito vitrocerámicas para la liberación de diversas drogas. La vitrocerámica Fa-GC ha demostrado que puede ser impregnada con ibuprofeno sin perder su bioactividad ni sus características mecánicas (**Vitale-Brovarone**, 2008).

Al igual que se inicialmente se investigaron implantes porosos de HA y β -FTC simulando la estructura bimodal del hueso humano (hueso esponjoso y hueso cortical) (**Hsu**, 2008), se ha estudiado vitrocerámicas con gradiente de porosidad usando para ello un vidrio de origen CEL2 al que se le pueden añadir o esponjas de poliuretano o partículas de polietileno, obteniendo vitrocerámicas con estructura y

propiedades mecánicas similares al hueso natural manteniendo excelentes propiedades bioactivas (**Vitale-Brovarone**, 2009).

Un concepto importante es el citotoxicidad producida por la vitrocerámica. La citotoxicidad se debe a las reacciones químicas (como la liberación de iones álcali) que suceden al entrar en contacto la vitrocerámica con medio extracelular, y deben ser tomadas en cuenta en la investigación de cualquier vitrocerámica para uso como sustituto óseo. **Kotura** (1986) describió, en estudios in vitro, citotoxicidad al sumergir distintas cerámicas en un medio con cultivo celular V79; observo que la menos citotóxica era la alúmina ya que es la que menos reacciona con el medio extracelular.

Desde que **Charnley** en los años 50 y 60 introdujo el uso del polimetilmetacrilato (PMMA) como cemento óseo para la fijación protésica ha sido ampliamente utilizado. Pero desde entonces ha demostrado una serie de desventajas aún no resueltas como son la falta de unión al hueso, la posible formación de un tejido fibroso que produce el aflojamiento aséptico de la prótesis y el desgaste. Para solucionar este problema se han desarrollado cementos bioactivos mezclando a vidrios y vitrocerámicas resina de dimetacrilato (Bis-GMA). Estos cementos se unen al hueso a través de una capa de hidroxicarbonatoapatita. De estos cementos bioactivos los conseguidos mediante el uso de una vitrocerámica son los que mejores propiedades mecánicas tienen (**Okada**, 2001, **Shinzato**, 2001).

III. OBJETIVOS

En este trabajo nos hemos propuesto comprobar en un modelo animal en conejos la biocompatibilidad de un biomaterial, más concretamente una vitrocerámica con una composición de 54% de pseudowallastonita, 38% de wollastonita, 4% cristobalita y 4% de fosfato tricálcico.

El material lo implantamos en los cóndilos femorales de conejos y a las muestras obtenidas tras su sacrificio les realizamos estudio radiológico simple y estudio anatomopatológico, con lo que nos proponemos:

- Comprobar la compatibilidad biológica del implante con el huésped.
- Estudiar la interfase implante-huésped con el paso del tiempo.
- Analizar las características de la degradación-sustitución del implante.
- Valorar las propiedades del material como sustituto óseo.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL

1) VITROCERAMICA

El material utilizado en este trabajo corresponde a una vitrocerámica con una composición final de fases cristalinas del 54% de pseudowallastonita (CaSiO_3), 38% de wollastonita [$\text{CaSiO}_3 - \text{Ca}_3(\text{Si}_3\text{O}_9)$], 4% cristobalita [ó dióxido de silicio (SiO_2)] y 4% de fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$].

Este material se sintetizó en la Cátedra de Química de la Universidad Complutense de Madrid (Dra. M. Vallet-Regí) y para conseguirlo se siguieron los siguientes pasos:

a) Materiales Precursores

La síntesis de HA (hidroxiapatita) se consigue a través de un método de precipitación basado en la reacción de una papilla acuosa de Ca(OH)_2 (Riedel-DeHäen®) con una solución de H_3PO_4 (Merk®). El polvo obtenido se colocó en un molinillo vibrador y posteriormente se calcinó a 1200° durante 1 hora obteniendo polvo de HA llamado HA-1200. El polvo calcinado fue secado durante 20 horas.

El gel (55S) con una composición nominal de 55% SiO_2 , 41% CaO y 4% P_2O_5 fue preparado por el método sol gel. La síntesis fue realizada mediante hidrólisis y condensación de cuentas estequiométricas de tetraetil ortosilicato [$\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] y trietil fosfato (TEP). El gel seco fue molido y tamizado y la fracción de partículas cuyo rango de tamaño oscilaba entre 32 y 68 μm fueron seleccionadas y calcinadas a 1100° durante 3 horas (55S-1100).

b) Preparación de la suspensión

La suspensión fue preparada usando una solución acuosa que contenía 15% de peso de monómeros de metacrilamida (Aldrich®) y N,N' metilenebisacrilamida (Aldrich®) en una relación de 6/1 como vehículo de suspensión. Como dispersante se usó el Darvan 811 (R.T. Vanderbilt Company, Inc.®) en una concentración de 4,8 mg/m^2 .

Las suspensiones (50% de volumen sólido) fueron preparadas mediante la mezcla del vehículo de suspensión, el dispersante y el polvo de HA-1200 en molinillo durante 30 minutos. Después el material 55S-1100 fue añadido y

dispersado durante 10 minutos. La suspensión preparada contenía un 5% de peso de 55S-1100 (M955). Finalmente fueron añadidas cantidades adecuadas de una solución del 10% de peso de persulfato amónico (Aldrich®) y otra solución del 99% de peso de N,N,N',N' tetrametil diamina (Aldrich®) como iniciador y catalizador respectivamente, que fueron mezcladas durante 3 minutos.

c) Preparación del Andamiaje

Las piezas porosas se obtuvieron por incrustación de negativos poliméricos obtenidos por estereolitografía con la suspensión previamente preparada. La fabricación de los negativos se realizó mediante estereolitografía (SL) usando un equipo comercial SLA-3500 disponible en 3D-System (California, USA). El equipo funciona con un lápiz láser de luz ultravioleta que se desplaza en el plano XY y un elevador vertical que se desplaza en el eje Z (Fig. 2). Los movimientos X, Y, Z son controlados por un ordenador personal que contiene la información de la pieza a construir, previo ajuste con un programa de diseño asistido computerizado (DAC). Los negativos son contruidos, capa por capa, mediante polimerización de Achura™ SI 10®, una resina de foto curable, que fue colocada en un baño termostático (Fig. 3). El polímero negativo obtenido presenta vigas generadas por los poros, que mostraron una forma elipsoidal con ejes de 470 y 370 μm y la distancia entre ellos (también llamados canales) fue de 2 mm.

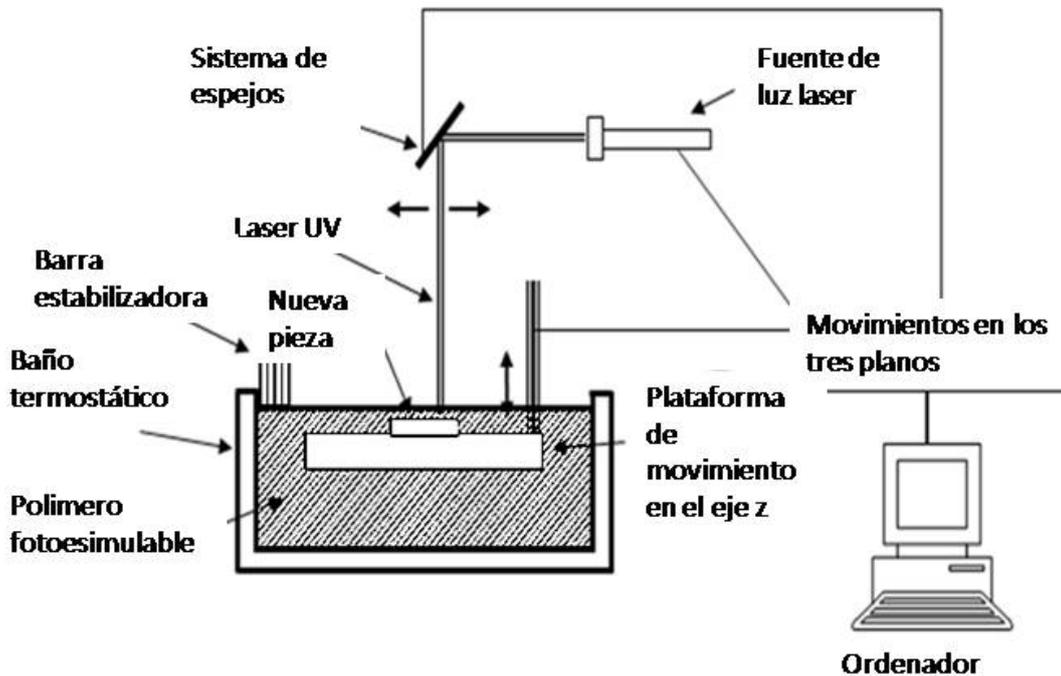


Fig. 2. Representación esquemática del proceso de estereolitografía usado para la preparación de los negativos.

Los negativos fueron empapados en la suspensión contenida en molde de polietileno. Después, los moldes se colocaron en una cámara y se les aplicó vacío para eliminar las burbujas de aire atrapadas en la suspensión, posteriormente se aplicó durante 15 minutos un flujo de N_2 . Tras esto la cámara cerrada se calentó por encima de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2,5 horas para inducir la gelación del sistema. Las piezas fueron retiradas y se sometieron a un proceso de secado-congelación durante 24 horas. Para producir la consumición del negativo, las piezas secadas se calentaron a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un ritmo de calentamiento de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante 3 horas, y finalmente a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $1300\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas para sinterizar el material. Este polímero totalmente eliminado es el que produce los canales tridimensionales interconectados.

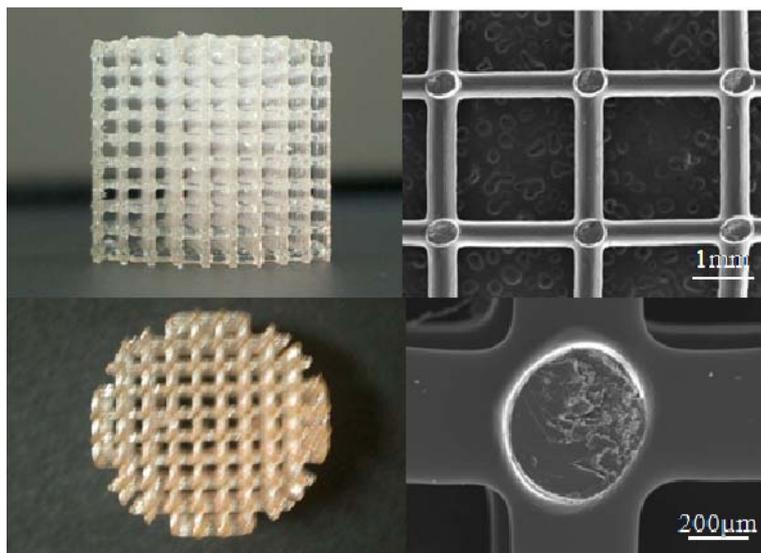


Fig. 3. Negativos poliméricos obtenidos por estereolitografía a distinta magnificación.

d) Caracterización de las piezas

La fase de composición de las piezas obtenidas fue determinada por XRD (difracción de rayos X) en un difractómetro Philips X'Pert MPD (radiación $\text{Cu K}\alpha$) en el rango de 5-120°C con tamaño de paso de 0,02°C y tiempo por paso de 10 segundos.

El método Rietveld se usó en la fase de cuantificación usando el software X'Pert Plus (Philips). El escaneo de microscopía electrónica se realizó en un sistema JEO 6400 Micoscope-Oxford Pentefet super ATW; previamente las muestras fueron chapadas en oro. La porosidad fue determinada por un porosímetro de intrusión de Hg (Micromeritics ASAP2010).

El análisis de fase cristalina de la piezas obtenidas mediante la aplicación del método de Rietveld de XRD muestra la siguiente composición: Hidroxiapatita (70%, JCPDS No. 9_0432), β -TCP (11%, JCPDS No. 70-2065), α -TCP (9%, JCPDS No. 70-0364) y silicocarnotina (10%, JCPDS No.73-1181).

e) Bioactividad in vitro en fluido corporal simulado.

La bioactividad in Vitro fue evaluada por inmersión de las muestra en fluido corporal simulado (FCS) y los cambios en la composición de la solución y pH se midieron varias veces sumergiendo un sistema Ilyte $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Ca}^{2+}$ ®. El estrato recién formado fue caracterizado por SEM (scanning electron microscope), XRD (X-ray diffraction) y FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) en un Niclote Nexos® (Fig. 4). EL FTIR uso discos preparados con 1 mg de material raspado de la superficie de las muestras y 250 mg de KBr.

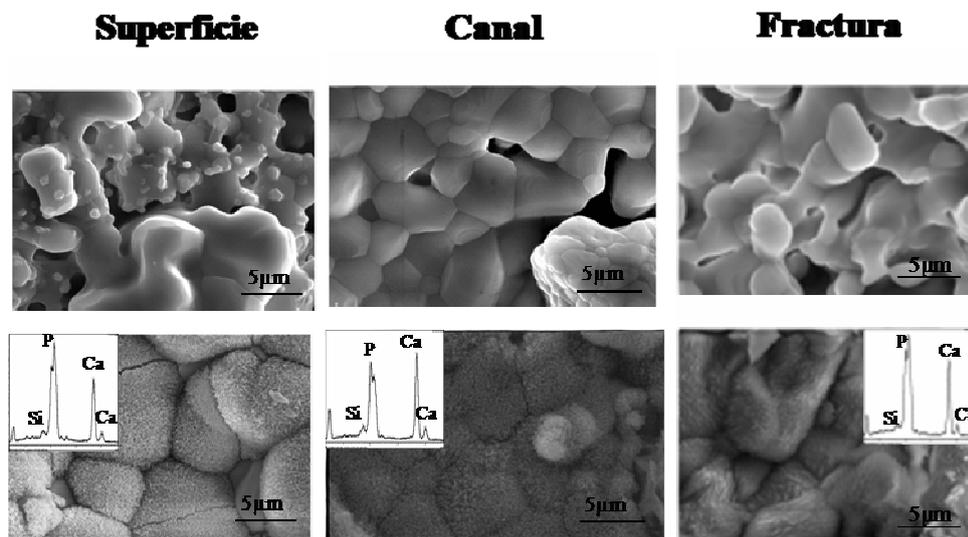


Fig. 4. Micrografías de superficie, canales y fractura de las piezas porosas antes y después de 7 días en FCS. Obsérvese la formación de una capa de apatita incluso en el interior del andamiaje (superficie de canales y fracturas).

La porosidad final del material esta formada macroporos de 1-2 μm y canales interconectados entre 360 y 400 μm , habiendo en total 24 puntos de interconexión (Fig. 5). Los cilindros de material definitivo utilizados tienen un tamaño definitivo de 10 mm.

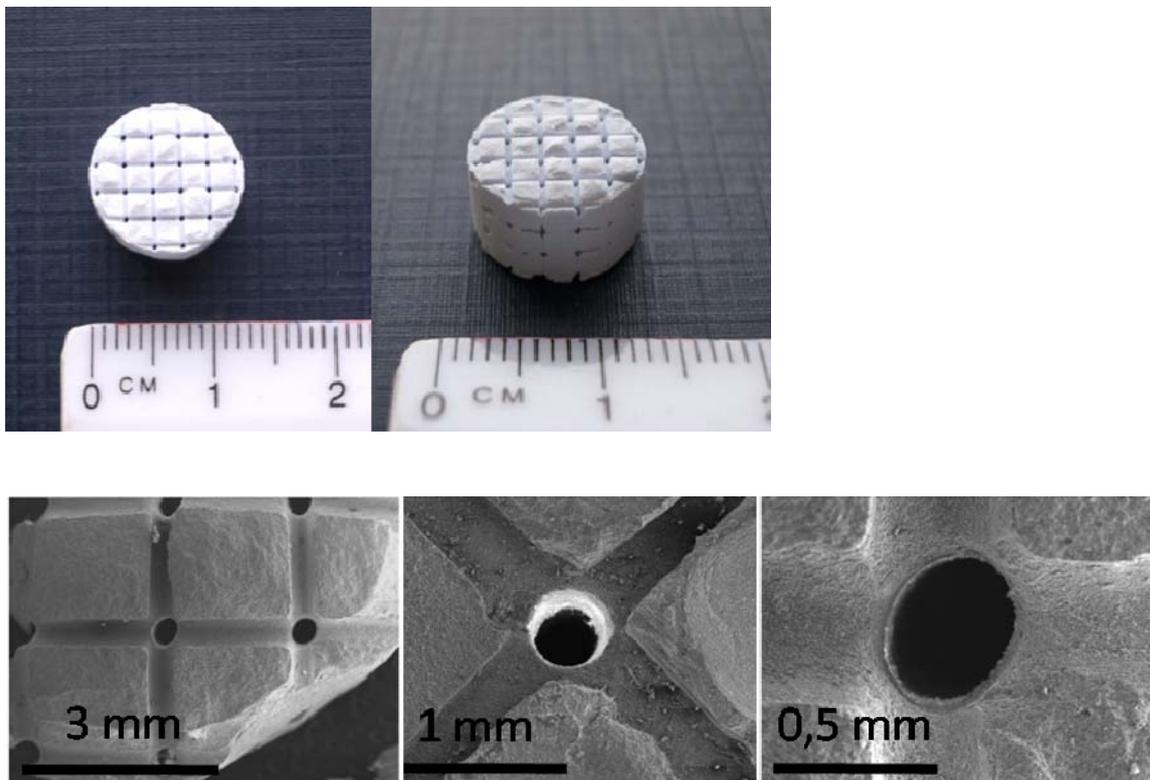


Fig. 5. Fotografías y micrografías por SEM, a diferente magnificación, mostrando la red de canales interconectados.

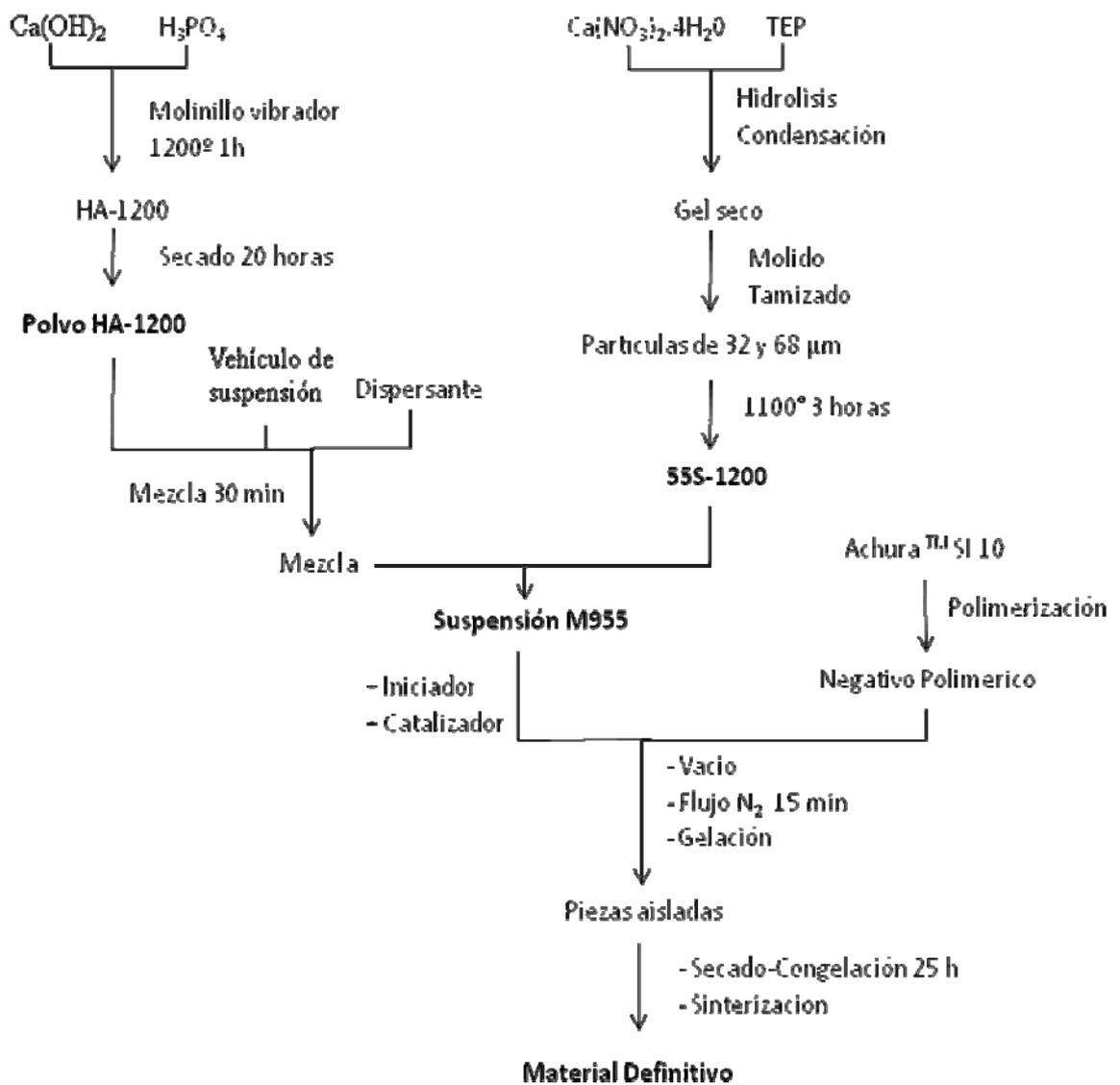


Fig. 6. Esquema resumen del proceso de síntesis del implante.

2) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Hemos utilizado 11 conejos albinos Nueva Zelanda con un peso comprendido entre 3.500 y 4.000 g. y 17-18 semanas (edades próximas al cierre fisario cuando alcanzan el volumen óseo adecuado para nuestro estudio) y de ambos sexos ya que no se han descrito diferencias entre sexos respecto al metabolismo óseo (**Harkness y Wagner, 1980**).

Los criterios en los que nos basamos para elegir este animal para la experimentación fueron los siguientes:

1. Tamaño del esqueleto adecuado a las necesidades del experimento.
2. Gran resistencia a los procesos infecciosos (aunque se siguiera un estricto protocolo antibiótico).
3. Elevado metabolismo óseo que permite la obtención de muestras para su estudio en cortos periodos de tiempo.
4. Bajo coste, docilidad, fácil provisión y mantenimiento.
5. También porque ha sido el animal utilizado usualmente en otros estudios lo que permite contrastar los resultados.

En este estudio experimental hemos seguido las condiciones éticas y legales establecidas en el R.D. 223/1988 de 14 de Marzo y la Orden de 13 de Octubre de 1989 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y se ha realizado en el animalario de la Universidad de Murcia (Nº REGAES 300305440012).

II) MÉTODOS

1) PLANIFICACIÓN

Para realizar el estudio se establecieron 5 grupos de animales. El proceso consistió en ir interviniendo los animales de forma consecutiva y según la disponibilidad del quirófano y jaulas del animalario. Una vez intervenidos se realizó una planificación de fechas de sacrificio y recogida de muestras para así poder realizar los 5 grupos según el periodo de implantación del material (Tabla 8).

<i>Grupo I</i>	<i>Grupo II</i>	<i>Grupo III</i>	<i>Grupo IV</i>	<i>Grupo V</i>
2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	12 meses
n=3	n=2	n=2	n=2	n=2
				

Tabla 8: Planificación del experimento

Hemos usado las dos fémures de las patas traseras de los conejos por lo tanto el número de muestras es el doble del de animales, habiendo por tanto 6 muestras en el grupo I y 4 muestras en los grupos II, III, IV y V.

2) CUIDADOS PREOPERATORIOS

La identificación de los animales se realizó mediante microchip insertado en tejido celular subcutáneo en zona dorsal cervical. De forma complementaria se identificaron mediante un clip plástico en la oreja derecha con un número de 4 dígitos impreso. Posteriormente todos estos datos junto a los postquirúrgicos se introdujeron en una tabla de datos (Tabla 9).

Conejo	Microchip/ Identificador	Fecha intervención	Fecha sacrificio	Periodo	Identif. AP
1	00-0670-7551/2270	18/11/2005	21/7/2006	8 meses	4178 A,B
2	00-0670-70C0/2387	21/11/2005	21/7/2006	8 meses	4185 A,B,C
3	00-0670-54B1/2476	29/11/2005	22/11/2006	12 meses	4183 A,B,C
4	00-0670-5FA1/2405	21/12/2005	28/6/2006	6 meses	4173 A,B
5	00-0670-5FA1/2543	27/01/2005	25/7/2006	6 meses	4174/82 A,B
6	00-0670-5FA1/2400	17/3/2006	25/7/2006	4 meses	4187'5 A,B
7	00-0670-5FA1/2396	17/3/2006	25/7/2006	4 meses	4181 A,B,C,D
8	00-0670-5FA1/2399	31/3/2006	20/4/2007	12 meses	4186 A,B,C
9	00-0670-5FA1/2453	4/4/2006	20/6/2006	2 meses	4176 A,B,C,D
10	00-0670-5FA1/2397	5/4/2006	20/6/2006	2 meses	4175 A,B,C,D
11	00-0670-5FA1/2157	4/4/2006	20/6/2006	2 meses	4169 A,B,C,D

Tabla 9: Base de datos de los animales de experimentación.

Dos o tres semanas antes de la intervención, los animales fueron depositados en el Servicio de Animales de Laboratorio del SAI (servicios de apoyo a la investigación) de la Universidad de Murcia (Nº REGAES 300305440012), de forma individual en jaulas de 45 x 65 x 45 cm. con el fin de permitirles adaptarse al medio.

Se les mantuvo a temperatura de 20-21°C, humedad relativa del aire 45-65%, renovación de aire de 15 veces/hora, velocidad máxima del aire 0,5 m/s, fotoperiodo Luz/Oscuridad 12/12, ruido máximo de 55 dB e iluminación de 350 lux/m².

Se les alimentó con una dieta completa de mantenimiento (Pienso 112 U.A.P, PANLAB) y durante el periodo de adaptación, los animales bebieron y comieron “ad libitum”.

Las intervenciones fueron realizadas en un quirófano de cirugía experimental convencional de 20 m² separado convenientemente de las áreas de rasurado, almacén de material quirúrgico, área de despertar y vigilancia postoperatoria, según las recomendaciones de **Alexander** (1974) y la normativa de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación (86/609/CEE).

3) MÉTODO ANESTÉSICO

Basándonos en estudios previos similares (**Meseguer**, 1993; **Úbeda**, 1994; **Galian**, 1995; **Lax** 2004; **Ros** 2006) nuestro método anestésico se basó en los siguientes principios farmacológicos, con los que conseguimos mínima toxicidad hepática y renal, fácil eliminación, alto margen de seguridad y mínimos efectos secundarios.

Los datos de cada animal e incidencias se registraron en una hoja de protocolo individualizada (Tabla 10) en la que se anotaban, además, los detalles del experimento.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Laboratorio de Cirugía Ortopédica experimental

Línea de investigación: _____ Animal: _____

Peso: _____ gr. Sexo: M / H Edad: _____ meses.

Nº Jaula: _____ Nº Identificación: _____

Fecha intervención: ____/____/____

Anestesia:

• Premedicación:

- Atropina: Dosis _____ ml. Vía admón: _____
- Clorpromacina: Dosis _____ ml. Vía admón: _____
- Profilaxis Antibiótica: Dosis _____ ml. Vía admón: _____

• Inducción:

- Ketamina: Dosis _____ ml. Vía admón: _____

• Mantenimiento:

- Ketamina: Dosis _____ ml. Vía admón: _____

Vía de abordaje: _____

Tiempo de intervención: _____ min.

Tto postqx (si precisa): _____

Incidencias Qx o Post Qx: _____

Fecha de sacrificio: ____/____/____

Muestras:

- Rx: SI / NO
- AP: SI / NO
- MEB: SI / NO

Nombre de investigador: _____

Murcia a __ de _____ de 200__

Tabla 10: Protocolo individualizado para cada conejo del estudio

Premedicación: Administrada 10-15 minutos antes de la inducción (Fig. 7).

- *Sulfato de Atropina* (0.3 mg/kg, vía im.). Es utilizada para reducir la secreción excesiva de las vías respiratorias altas, la motilidad intestinal, así como la bradicardia producida por ciertos agentes anestésicos. Es preciso tener en cuenta que un 30% de estos roedores son portadores de una seroatropinasa que reduce los efectos de la atropina.

- *Hidrocloruro de clorpromacina* (10 mg/kg, vía i.m.). Su uso permite reducir las dosis de agentes anestésicos, sobre todo de los barbitúricos. Proporciona una buena relajación muscular y reduce la ansiedad del animal al carecer de efecto analgésico y anestésico, consiguiendo un efecto sedante entre los 10-15 minutos después de su administración.

- *Amoxicilina* (Clamoxyl LA® laboratorios Pfizer) (0.1ml/kg, vía im.). La profilaxis antibiótica es administrada en monodosis y 30 minutos antes de la intervención.

Una vez premedicado el animal se procedió al rasurado de ambas patas traseras en una zona comprendida entre la mitad del muslo y el 1/3 medio de la pata, seguidamente se limpió la zona con clorhexidina con objeto de garantizar la máxima asepsia del campo quirúrgico (Fig. 8).



Fig. 7. Inducción anestésica mediante inyección intramuscular.

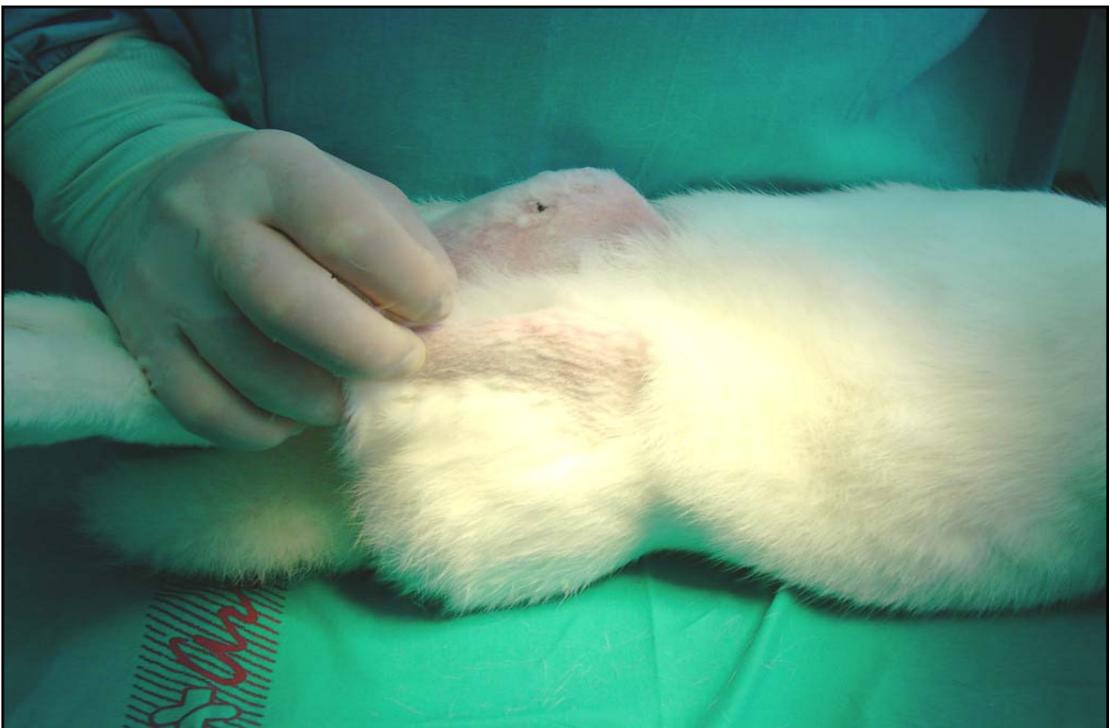


Fig.8. Rasurado de ambas patas traseras.

Inducción anestésica:

- *Clorhidrato de Ketamina* (Merial®)(50 mg/kg, vía i.m.). Es un hipnótico de acción rápida así como un potente analgésico de escasa acción como relajante muscular, que se potencia con la clorpromacina. Como ventajas destaca la no depresión respiratoria, ausencia de efectos acumulativos y un buen margen de dosificación, consiguiendo una acción anestésica suficiente para la cirugía a los 15-20 minutos.

Mantenimiento:

- *Clorhidrato de Ketamina* (20 mg/kg, vía i.m.). La pauta es a demanda ante el menor signo de agitación del animal.

Reversión o despertar:

Los animales fueron depositados en sus jaulas para evitar manipulaciones intempestivas y reacciones incontroladas por parte del animal en las primeras horas/días tras la intervención. Esta fase se realiza de forma suave y espontánea, no requiriéndose medicación alguna.

Esta pauta anestésica resultó ser cómoda de aplicar, consiguió un tiempo anestésico suficiente, excelente relajación muscular y analgesia, careció prácticamente de complicaciones, de efectos tóxicos mínimos y produjo en el animal un despertar suave y progresivo.

4) MÉTODO QUIRÚRGICO

Intervención Quirúrgica

La asepsia del campo quirúrgico se consiguió aplicando un antiséptico iodado, Povidona Yodada al 10% (Betadine®). A continuación aislamos dicha zona mediante un paño fenestrado estéril dejando expuesta únicamente el área de la rodilla sobre la que aplicamos un campo estéril del tipo Steri-Drape® de 10 x 10 cm (Fig. 9). Se eligió la cara lateral del área metafiso-epifisaria del fémur distal para introducir el implante por los siguientes motivos:

- Fácil acceso quirúrgico: se accede entre planos musculares por detrás del tensor de la fascia lata y del vasto externo llegando al plano óseo con mucha facilidad y de forma poco traumática para los tejidos blandos.
- Tamaño ideal óseo (diámetro del fémur a este nivel distal) acorde con el tamaño de los implantes.

Para realizar el defecto óseo abordamos el fémur mediante una incisión cutánea de unos 10 mm tomando como referencia anatómica el relieve óseo del epicóndilo externo. Por éste abordaje el plano subcutáneo es mínimo y nos encontramos directamente con plano muscular que se incide de forma longitudinal (Fig. 10). Después de realizar una desperiostización cuidadosa y mantener el campo con unos separadores tipo Hoffman, procedimos con un punzón de 2 mm a marcar

la zona donde se alojaría el implante, volviendo a confirmar la idoneidad del punto de entrada que debía estar inmediatamente proximal al epicóndilo externo y bien centrado en el plano antero-posterior. Seguidamente utilizamos brocas sucesivas de 3.2 y 4.5 mm montadas en un mango en T, con la que perforamos el hueso en todo su espesor (Fig. 11).

Una vez conseguido el lecho apropiado procedimos al lavado abundante del mismo con Ringer Lactato con el que procuramos arrastrar todas las partículas óseas producidas durante la perforación del hueso. El defecto óseo así creado fue rellenado completamente con el implante, de aspecto cilíndrico 6 x 4.5 mm. (Fig. 12).

A continuación procedimos al cierre cuidadoso de la herida comenzando por el plano muscular profundo con puntos sueltos de Vicryl[®] 4/0, para contribuir en la estabilidad del implante en el lecho receptor evitando su extrusión, así como la formación de hematoma importante. El plano cutáneo se afrontó por medio de una sutura continua con Seda 3/0 (Fig. 13). Finalmente, tras el lavado de la herida quirúrgica con Betadine[®], se aplicó un apósito plástico en spray del tipo Novecután[®].



Fig. 9.- Detalle de la zona quirúrgica con paño fenestrado estéril tipo Steri-Drape® de 10 x 10 cm.

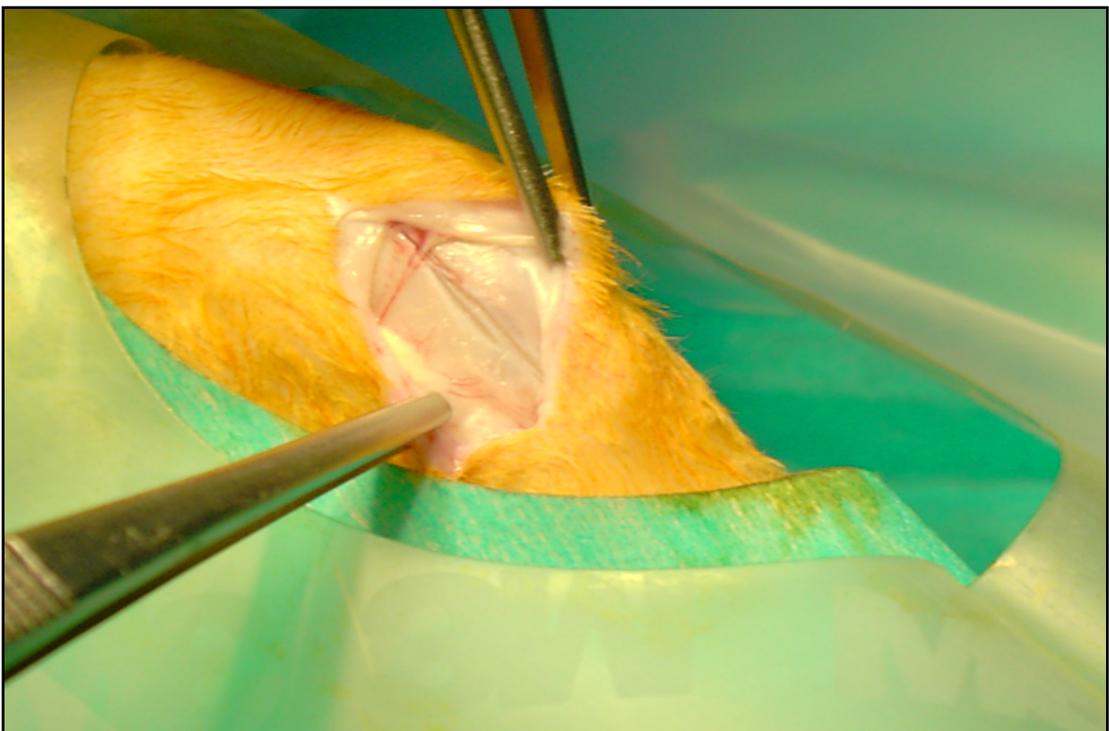


Fig. 10.- Incisión cutánea de unos 10 mm tomando como referencia anatómica el relieve óseo del epicóndilo femoral externo.

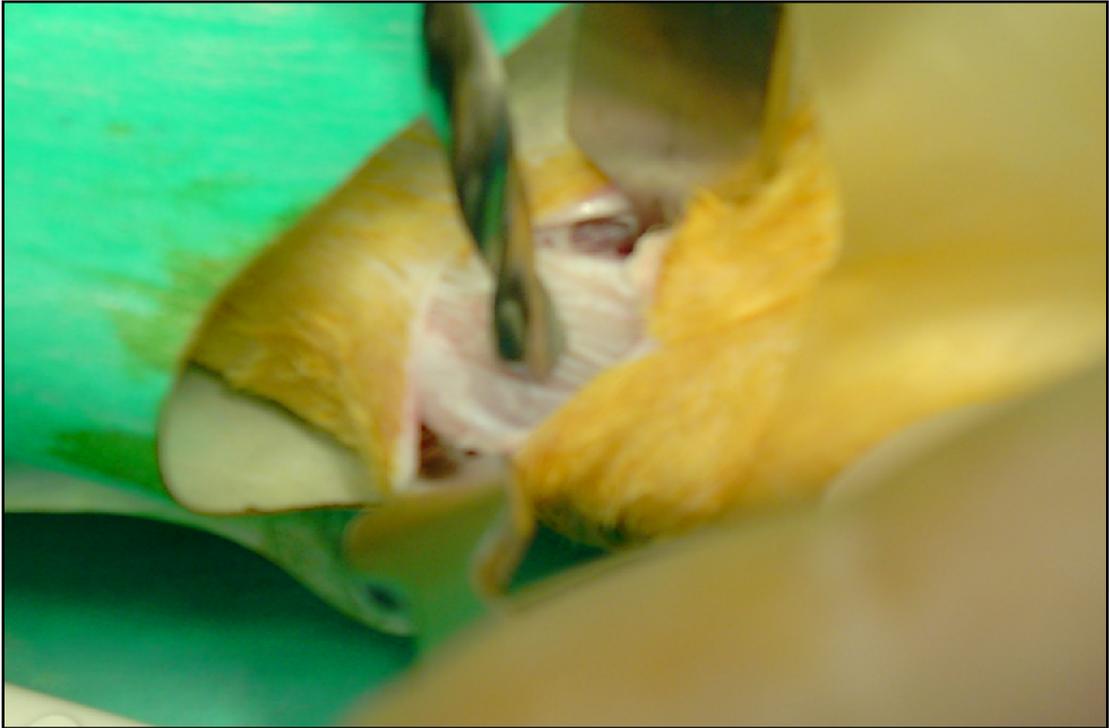


Fig. 11.- Detalle del brocado de la cortical epifisaria distal de fémur.

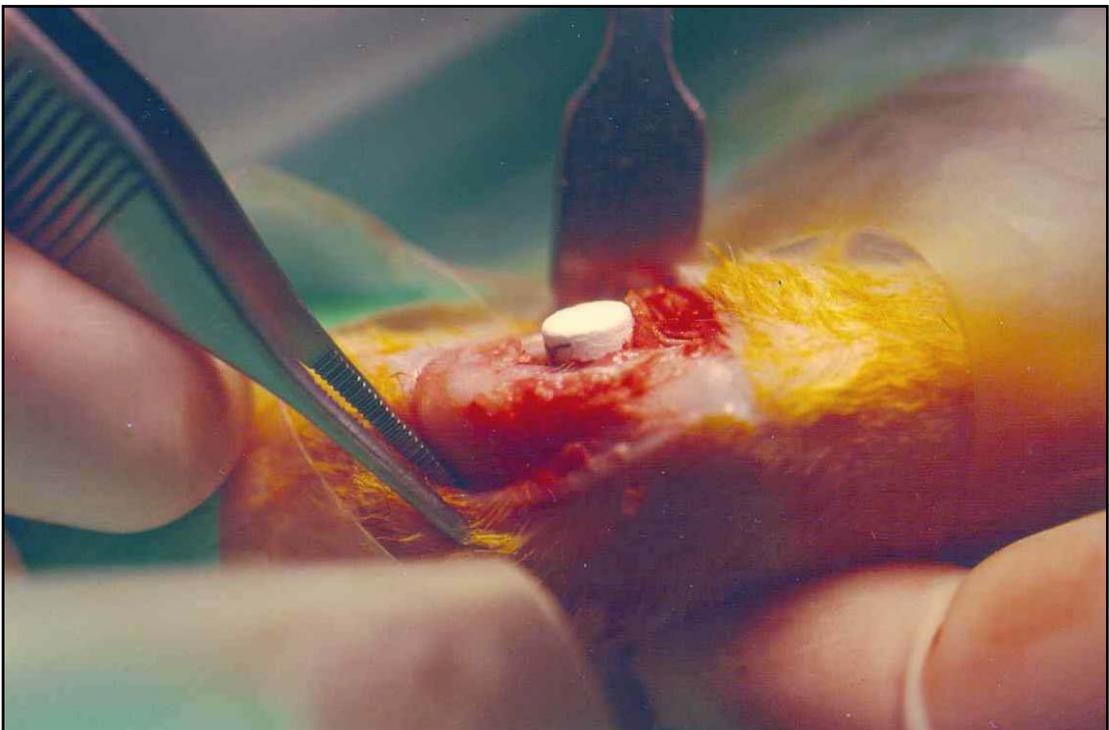


Fig. 12.- Implante de vitrocerámica en el orificio creado en fémur.



Fig. 13.- Cierre de la herida quirúrgica mediante sutura discontinua con seda 3/0.

Una vez cumplido el tiempo del periodo de estudio en cada conejo, según la planificación previa establecida, se procedió al sacrificio de los animales.

Para ello, previa sedación del animal, se les realizaba una punción intracardiaca. Para confirmar la localización de la aguja se aspiraba y se extraía sangre. Con la certeza de encontrarnos en cavidad cardiaca se procedía realizar un taponamiento cardiaco tras la inyección de 40 cc de aire.

A continuación se realizaba un abordaje quirúrgico en línea media anterior ampliado sobre todo proximalmente. En este caso la disección era directa hasta plano óseo. Seguidamente se desperiostizaba todo el fémur salvo su extremo proximal y se desarticulaba la rodilla. Con una mini sierra de disco se realizaba

osteotomía transversal a nivel del 1/3 medio-proximal de fémur. Para finalmente extraer el segmento distal del fémur desprovisto de partes blandas (Fig. 14).



Fig. 14. Imagen de pieza de estudio antes de introducirlas en formol.

5) MÉTODO RADIOLÓGICO.

Las imágenes radiológicas se han obtenido con técnica mamográfica. Para ello se ha utilizado 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, para proceder posteriormente a la obtención de imágenes magnificadas 1: 1.7 con 20 kV, 16 mA, foco fino y exposimetría automática sin rejilla antidifusora. En todos los casos se realizaron un mínimo de dos proyecciones ortogonales por pieza anatómica (A-P y Lateral de tibia).

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 ha permitido su estudio en formato BMP, TIFF y JPG.

6) MÉTODO ANATOMO-PATOLÓGICO

A.-Obtención de las muestras.

Para el estudio morfológico utilizamos los fémures que fueron fijados en formaldehído neutro tamponado al 10%, a los que habíamos realizado previamente el estudio radiológico. Para ello:

- Identificamos la zona implantada donde, según comprobamos con el estudio radiológico, permanecía el material implantado. A continuación,

- Realizamos dos osteotomías transversales: una a nivel adyacente al límite proximal del implante y la otra a 5 mm de distancia de la anterior.

De esta forma obteníamos una muestra de hueso en toda la sección transversal de 5 mm de espesor proximal al implante.

- Posteriormente realizamos otra osteotomía transversal adyacente a la zona implantada distal a la misma. Con lo que obteníamos otra muestra de hueso en toda la sección transversal correspondiente a la zona del implante.

- Por último, realizamos una osteotomía transversal a 5 mm distal a la anterior, obteniendo así una tercera muestra de hueso de un espesor de 5mm en toda la sección transversal del hueso distal al implante. Esta pieza, debido a su localización tan distal, correspondía a una sección transversal que incluía parte de

los cóndilos femorales, con contenido de tejido cartilaginoso correspondiente al cartílago intraarticular de la rodilla.

Las osteotomías se realizaron con mini-sierra circular.

B.-Procesamiento para Microscopía óptica.

Las muestras obtenidas se fijaron en formol neutro tamponado al 10% hasta su proceso de descalcificación que se llevó a cabo por medio de dos métodos:

1. **Método del TBD (Termo Shandon S.A., Pittsburg, USA).** Se mantuvieron las muestras durante 2 horas con el descalcificador TBD-I (Ácido hidroclicórico 14% y polyvinylpyrrolidone) y posteriormente utilizamos el TBD-II (Ácido fórmico 26% + Citrato sódico 8.5% + polyvinylpyrrolidone) durante 17 días, realizando un cambio de líquido cada 24 horas (**Azorit y cols., 2002**).
2. **Método del Formol Nítrico.** Introduciendo las piezas en una solución compuesta por 100 cc de Formaldehído 35-40%, 900 cc de agua destilada y 52,6 cc de ácido nítrico 60%, durante dos días; se lavaron con agua durante 1/2 hora para seguidamente volverlas a sumergir esta vez en carbonato de litio durante 4 horas, finalmente se lavaron con agua durante 24 horas y se mantuvieron en formol al 10% al menos 24 horas previas a su inclusión en parafina (**Meseguer, 1993; Úbeda, 1994 y Galian, 1995**).

A continuación las muestras fueron lavadas con agua destilada y seguidamente fueron deshidratadas mediante alcoholes a concentraciones crecientes continuando con los pasos habituales de este proceso hasta su inclusión en parafina. De los bloques se realizaron secciones de 5 μm mediante un microtomo de rotación Minot Leitz®.

Las secciones histológicas fueron teñidas mediante la técnica de rutina de Hematoxilina-eosina (H-E) y con el Tricrómico de Masson.

C. Procesamiento para Microscopía Electrónica de Barrido.

A otras muestras se les realizó secciones transversales de 1-2 mm de espesor a nivel de la zona de implantación al mismo tiempo que eran irrigadas con líquido fijador (Glutaraldehído al 3%). Los fragmentos obtenidos se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4 y a una temperatura de 4°C, durante cinco horas. Posteriormente fueron lavados en tampón cacodilato 0,1 M más sacarosa al 8%, durante 12 h a 4°C. La fijación se completó en una solución de Tetraóxido de Osmio al 1% en tampón Cacodilato 0,1 M durante 2 h a 4°C y nuevo lavado durante 12 h. La deshidratación se llevó a cabo mediante el paso por soluciones de acetona en concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 90% y absoluto) durante 10 minutos en cada una de ellas. El secado se realizó mediante CPDO2 Balzers Unión con acetona 100% y CO₂ líquido. Posteriormente se realizó el recubrimiento con oro con un metalizador BIO-RAD POLARON DMSION® (200

Amstrong) y la observación de las muestras se realizó en Microscopio Electrónico de Barrido Jeol JSM-6.100[®], con una aceleración de 15 a 20 Kv. Las imágenes se obtuvieron sobre película Kodak Plus-X Pan 5-PXP 120[®] ó digitalizadas mediante un programa (LINK ISIS[®]).

V. RESULTADOS

Los resultados más relevantes observados en nuestro estudio los vamos a presentar agrupados en cada uno de los cinco periodos considerados. A su vez, en cada periodo describiremos las características radiológicas y a continuación las anatomopatológicas. En los periodos de 2, 4 y 12 meses también describiremos las características de microscopía electrónica.

A) GRUPO I (2 meses)

A.1) Estudio Radiológico.

En el estudio radiológico las características del material implantado correspondían a la imagen de densidad radiológica elevada de forma cilíndrica o redondeada en su proyección lateral y con forma cuadrada de 6 X 4.5 mm en la proyección anteroposterior, que se diferencia con facilidad de las estructuras óseas en las que se implantó.

El interior del implante muestra líneas regulares radiotransparentes, tanto verticales como horizontales, formando una malla de líneas radiotransparentes características que se corresponden con la propia estructura interna del implante.

En este primer periodo de 2 meses el defecto óseo cortical practicado para la colocación del implante está completamente reparado. El implante se encuentra totalmente adaptado a la cavidad donde se aloja mostrando características radiológicas que se individualizan perfectamente del tejido óseo adyacente.

La imagen ósea del fémur no se encuentra alterada y presenta características radiológicas normales.

El implante muestra su estructura interna de bandas radiotransparentes cruzadas en donde sólo puede destacarse que los bordes regulares y lisos presentan, en ocasiones, bordes más irregulares y difusos en las zonas de contacto con el tejido óseo adyacente.



Fig. 15. Proyección anteroposterior de una muestra del período de 2 meses.



Fig. 16. Proyección lateral de una muestra del período de 2 meses.

A.2) Estudio Anatomopatológico.

Las secciones histológicas en este periodo de 2 meses se caracterizaban por abarcar todo el volumen del cilindro implantado en el seno de médula ósea hematopoyética la cual muestra características normales.

Desde la periferia hacia el interior encontrábamos en uno de los bordes de la muestra, áreas de partes blandas correspondientes al tejido muscular estriado y también tejido óseo cortical ambos de características normales.

El material implantado preservaba su arquitectura original. Caracterizado por acúmulos dispuestos en placas homogéneas de material granular compacto. En su interior destacaban islotes correspondientes a poros macroscópicos. No obstante existían canales que comunicaban la periferia y atravesando todo el espesor del bloque del material en diversas direcciones, así como, de forma periódica, dilataciones o islotes. Tanto el interior de los citados islotes como el de los canales se observaba que estaban tapizados por una capa delgada pero continua de osteoide, que envolvía a focos de médula ósea hematopoyética que mostraba características normales.

En las muestras teñidas con la técnica del Tricrómico de Masson destacaba la capa de osteoide tapizando los islotes y canales, como una delgada línea azul.

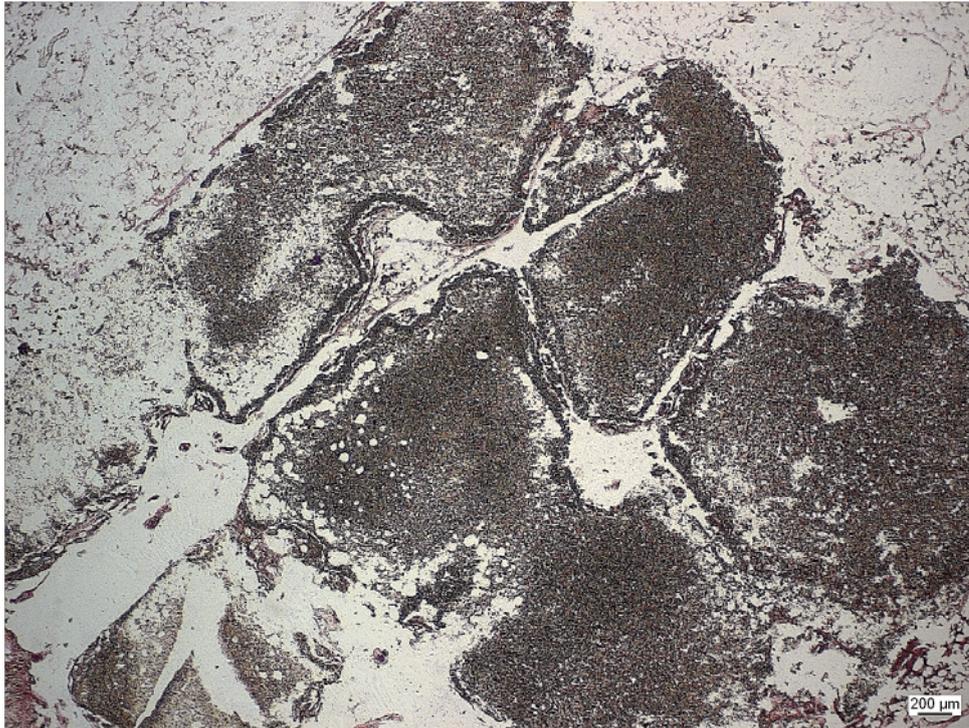


Fig. 17. Imagen panorámica del implante en el seno de la médula ósea hematopoyética, H-E. 125x.

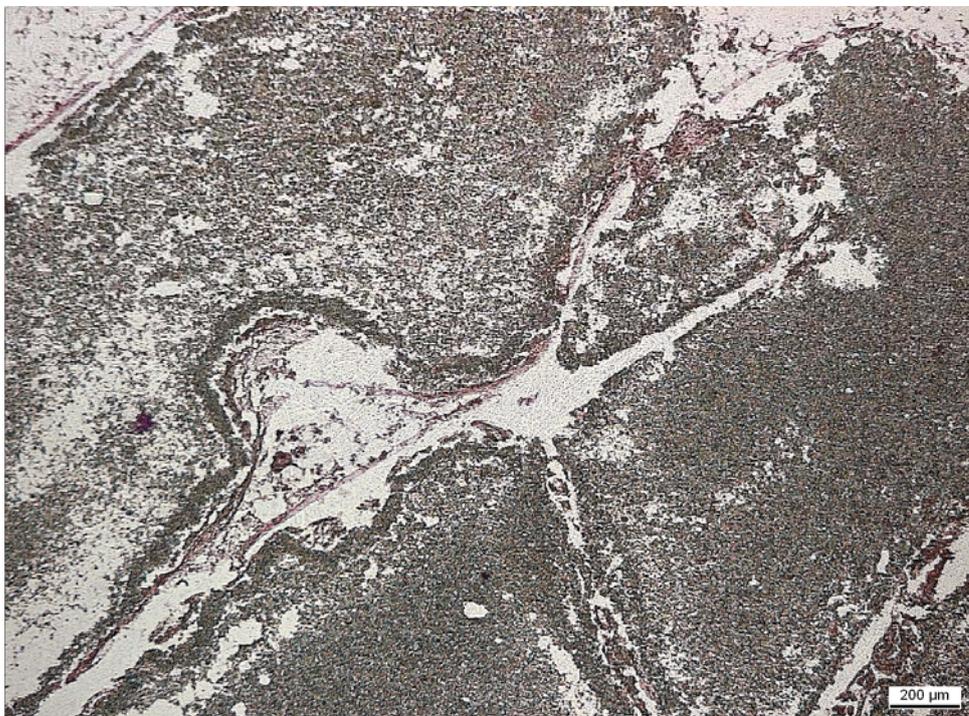


Fig. 18. Detalle de los espacios en el interior del implante con una dilatación central, H-E. 321.5x

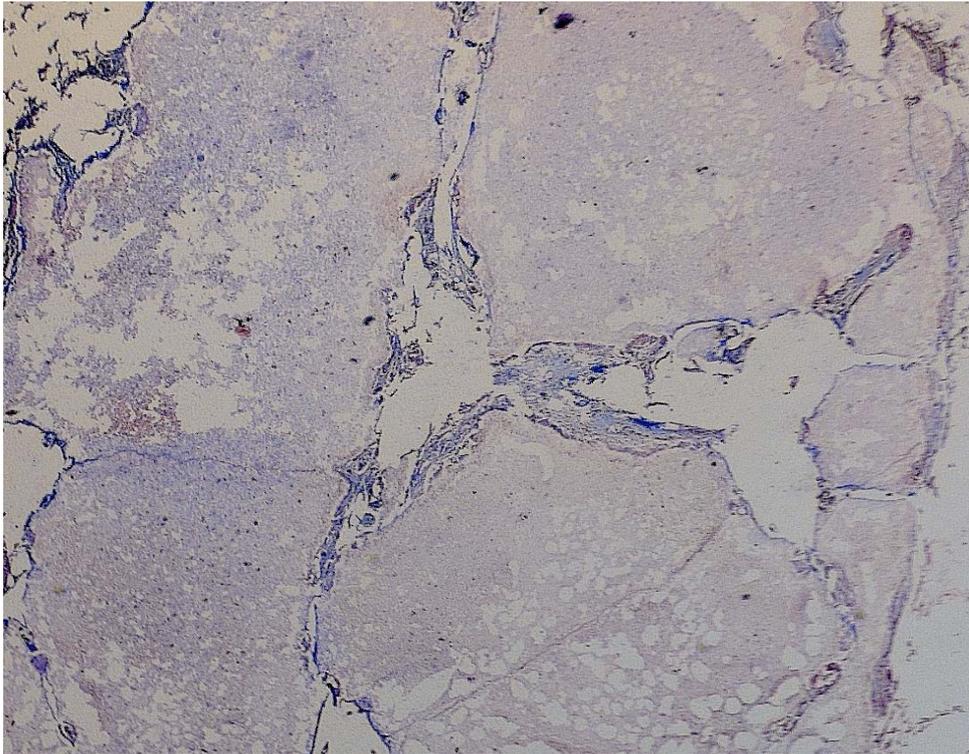


Fig. 19. Detalle de la porción central del implante, Tricrómico de Masson. 312'5x.

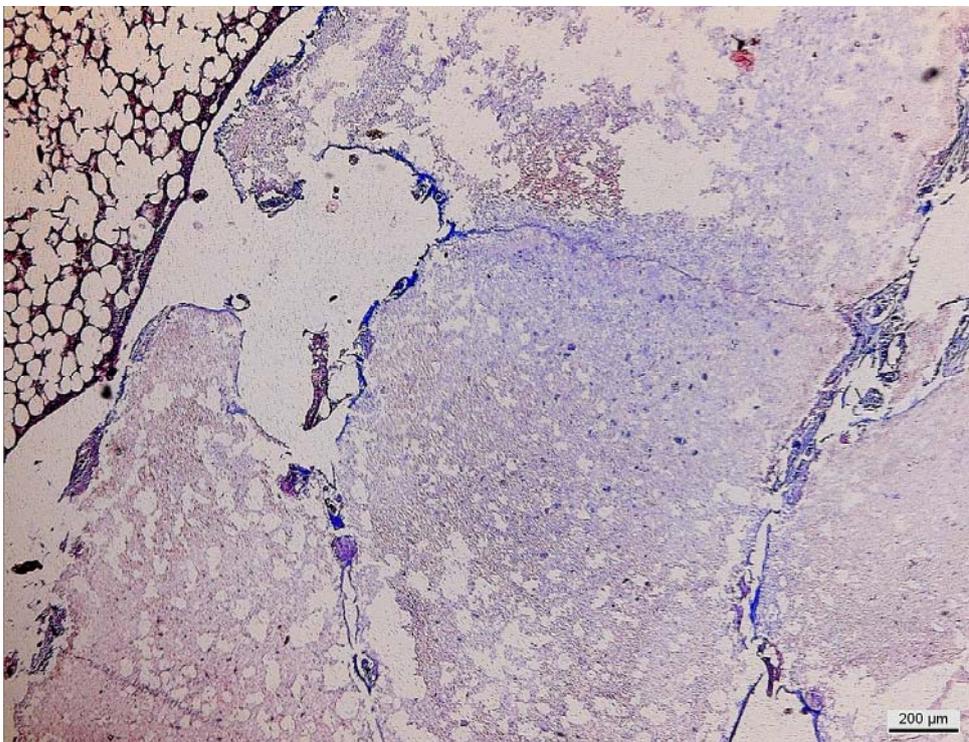


Fig. 20. Detalle de un espacio o dilatación en contacto con médula ósea hematopoyética y tapizado por osteoide (delgada línea azul), Tricrómico de Masson. 312'5x.

A.3) Estudio Microscopía Electrónica. de Barrido.

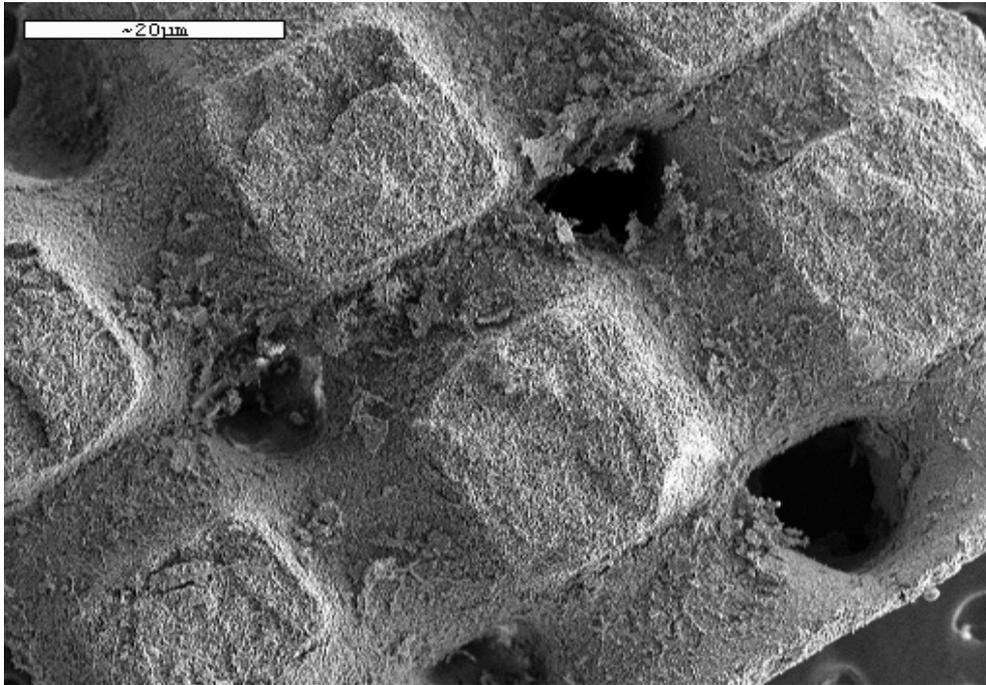


Fig. 21. Imagen con MEB de la vitrocerámica en la que se observa el aspecto granular de la superficie del material y en el que destaca la estructura porosa uniformemente organizada.

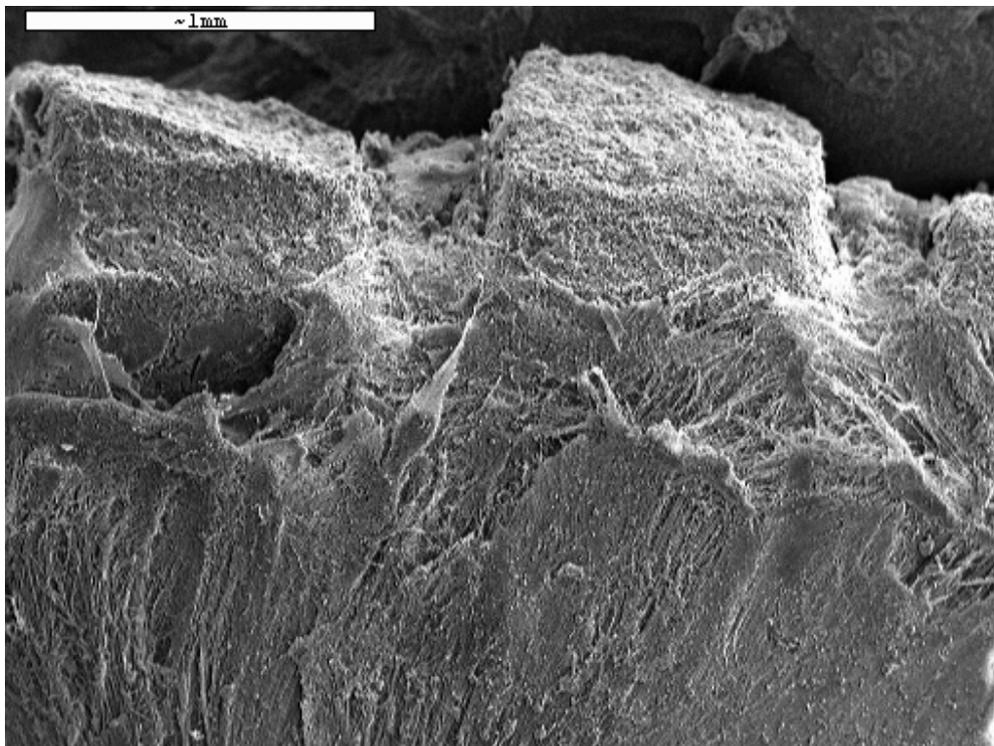


Fig. 22. Ídem: A los dos meses de su implantación: fina capa de tejido de aspecto fibrilar que recubre toda la superficie del material implantado.

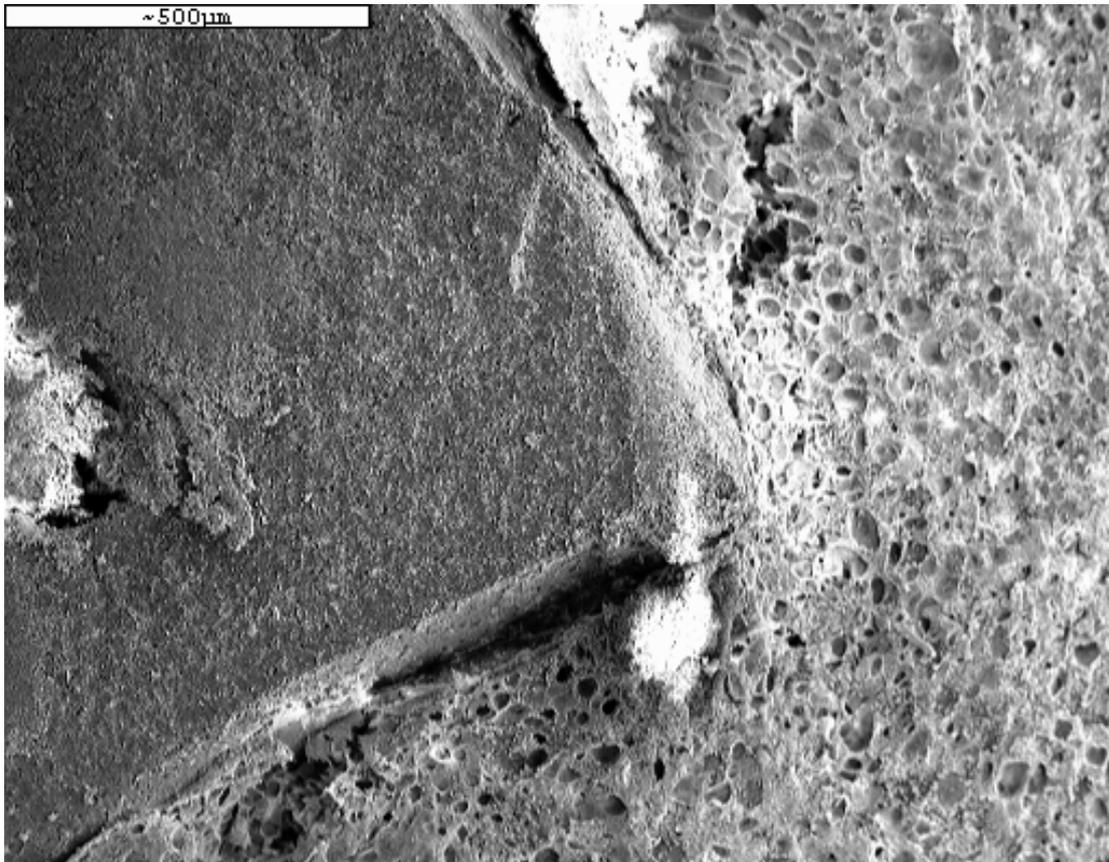


Fig. 23. En las zonas periféricas el material se encuentra rodeado de médula ósea hematopoyética en estrecho contacto.

B) GRUPO II (4 meses)

B.1) Estudio Radiológico.

La imagen radiológica de las zonas afectadas por la introducción del implante presentan una cortical completamente reparada, con una estructura ósea radiológica semejante a la del hueso cortical normal adyacente.

Los implantes presentan características similares al periodo anterior, manteniendo tanto la densidad radiológica como las bandas radiotransparentes que delimitan su propia estructura interna sin diferencias con el estadio anterior.



Fig. 24. Proyección anteroposterior de una muestra del período de 4 meses.



Fig. 25. Proyección lateral de una muestra del período de 4 meses.

B.2) Estudio Anatomopatológico.

La arquitectura general del material implantado se mantiene conservada.

Respecto a las secciones histológicas del periodo previo destacaban dos fenómenos. El primero correspondía al aumento de la porosidad en el material implantado, debido a la reabsorción del mismo. El segundo es que el depósito de osteoide que era mayor y más uniforme.

En algunas áreas observamos sustitución periférica de los islotes del material implantado por hueso neoformado. Asimismo se observaba la médula ósea de características normales envolviendo al implante y en el interior de los islotes y canales.

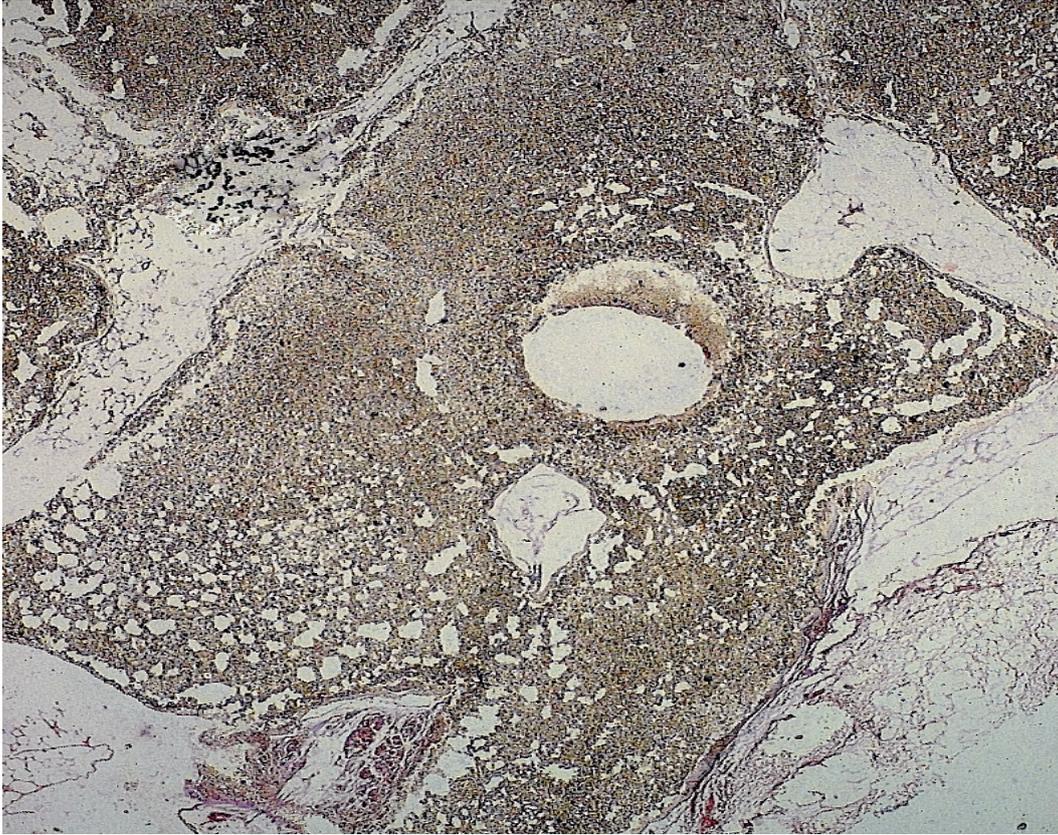


Fig. 26. Imagen panorámica del implante. Destaca un islote central tapizado por gran cantidad de osteoide, H-E.200x.

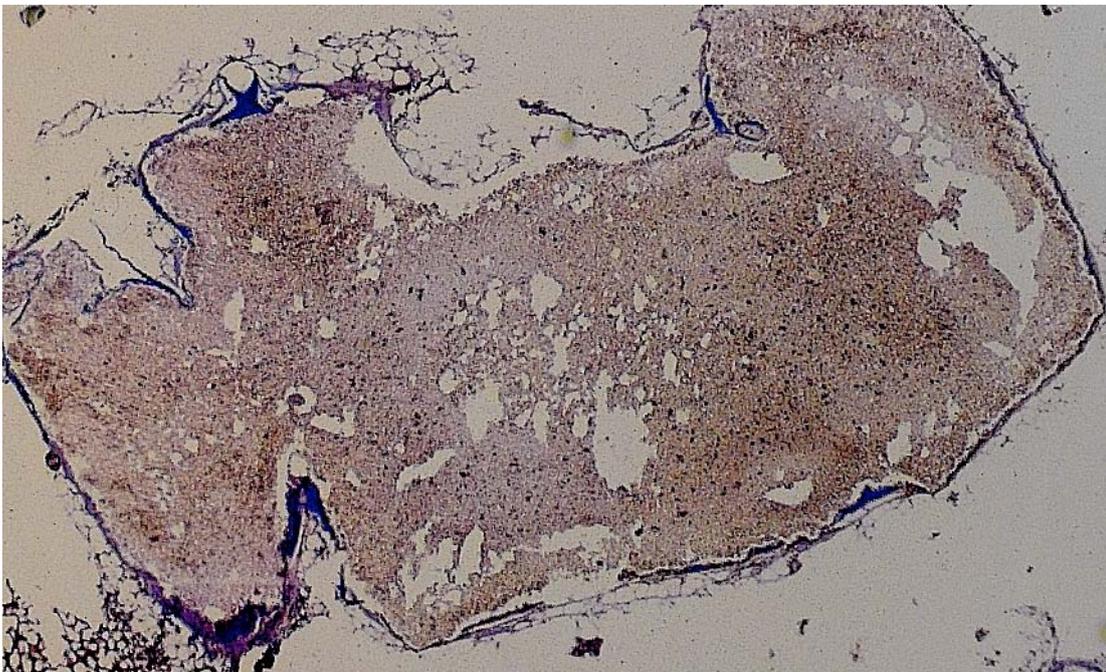


Fig. 27. Imagen panorámica del implante rodeada de una delgada y uniforme capa de osteoide, Tricrómico de Masson.200x.

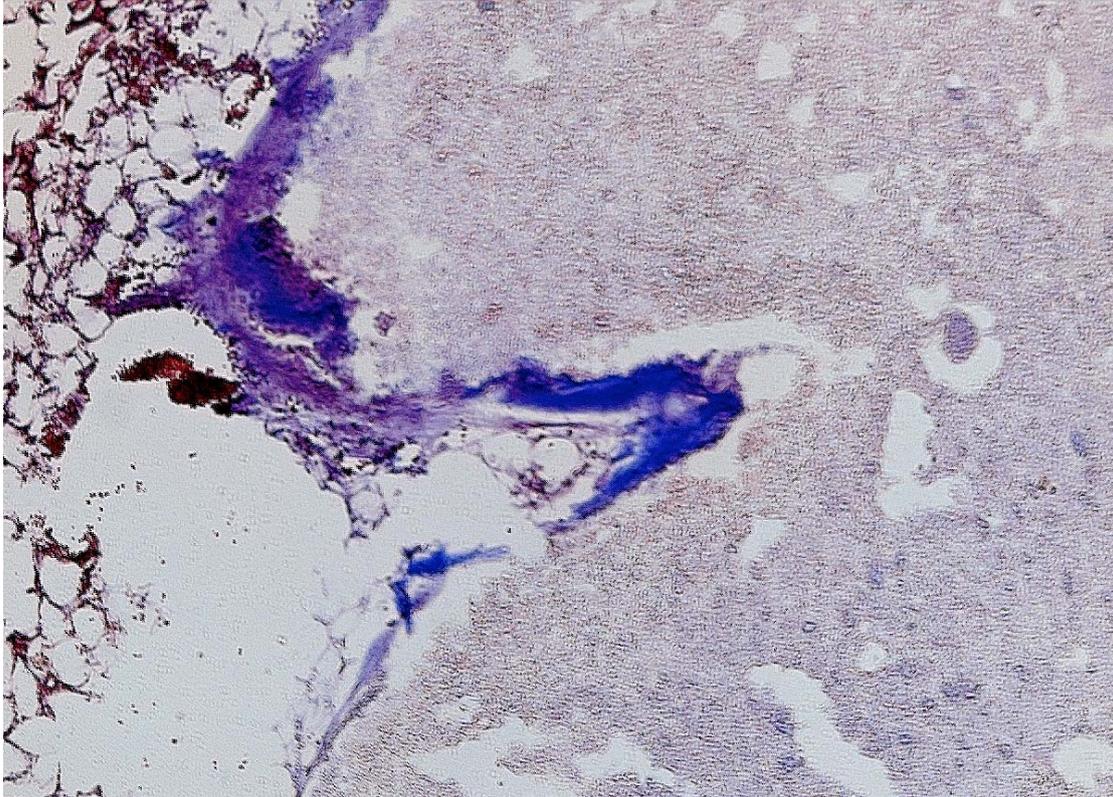


Fig. 28. Detalle de un área de la capa de osteoide revistiendo parcialmente al implante y a la izquierda médula ósea de características normales, Tricrómico de Masson.312'5x.

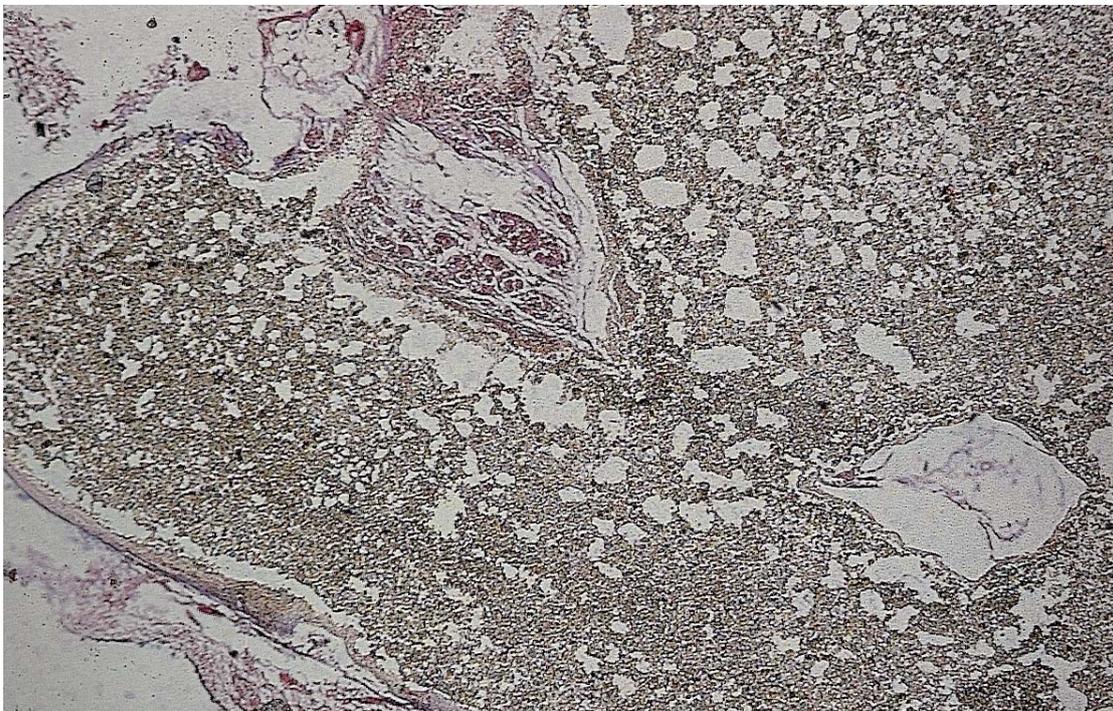


Fig. 29. Detalle del implante en el que se observan múltiples áreas de reabsorción y hueso neoformado en la zona central superior, HE.312'5x.

B.3) Estudio Microscopía Electrónica. de Barrido.

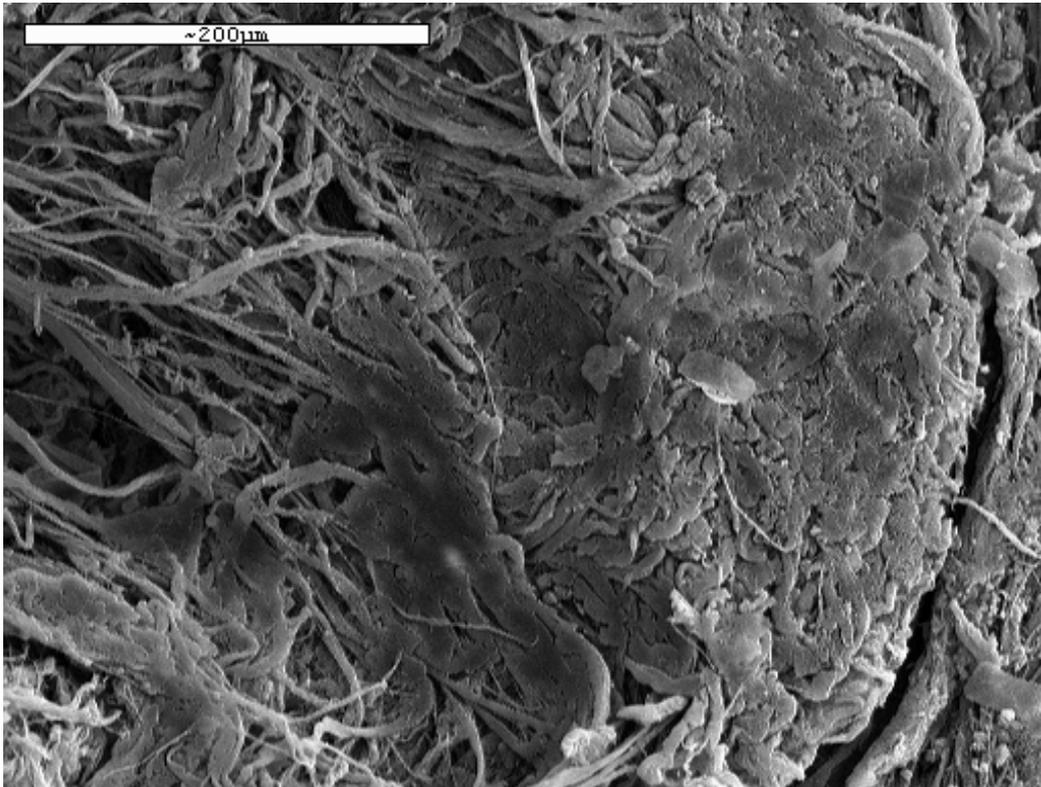


Fig. 30. Implante colonizado por material de apariencia reticular que se introduce en su interior a través de los poros. Las retículas corresponden a fibras de aspecto colágeno o matriz ósea no mineralizada, que llegan a condensarse en determinadas áreas.

C) GRUPO III (6 meses)

C.1) Estudio Radiológico.

En este estadio el implante mantiene su forma cuadrangular o estérica según la proyección radiológica analizada.

Mantiene su elevada densidad radiológica en cuyo interior puede observarse las bandas radiotransparentes en forma de malla de su estructura interna.

En ocasiones se observan pequeñas imágenes lineales de densidad calcio que parecen líneas trabeculares óseas que se dirigen hacia el interior del implante y, en ocasiones. Contribuyen al incremento de las irregularidades de la superficie del implante, en las zonas de contacto con el hueso adyacente.

El hueso alrededor del implante presenta características radiológicas normales.



Fig. 31. Proyección anteroposterior de una muestra del período de 6 meses. El implante se observa fragmentado, lo que probablemente ocurrió en el momento de la introducción del implante.



Fig. 32. Proyección lateral de una muestra del período de 6 meses.

C.2) Estudio Anatomopatológico.

Durante este periodo se seguían observando los fenómenos descritos en el periodo anterior aunque de forma más destacada. El aumento de la porosidad debido a la degradación del material es mayor, apareciendo numerosos focos de distintos tamaños.

Por otra parte el tamaño de los islotes y canales antes descrito era mayor, por lo que llegaban a separar en fragmentos más o menos grandes el material implantado. Como consecuencia de este aumento de tamaño de canales y poros el volumen de médula ósea hematopoyética era mayor.

Un fenómeno similar ocurre con el osteoide, que continuaba tapizando el material por el interior y la periferia, aunque en mayor cantidad.

También observábamos aunque en mayor medida la sustitución de material implantado por hueso.

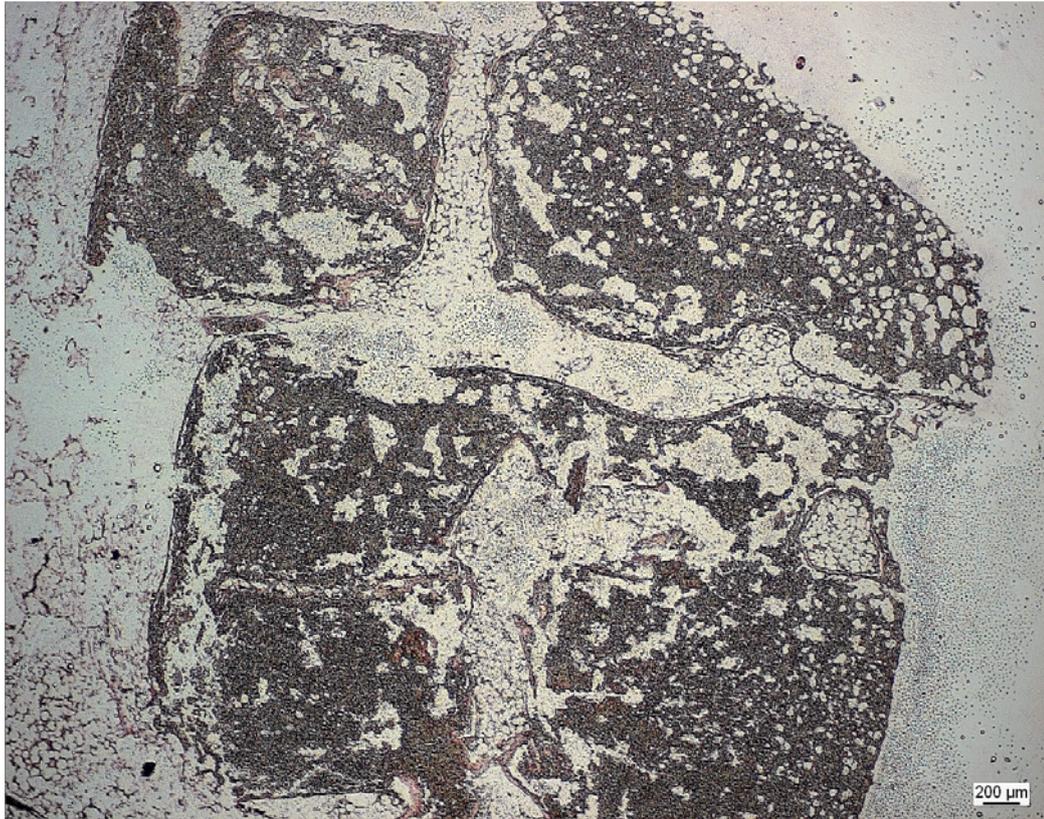


Fig. 33. Imagen panorámica del implante. Destaca el aumento de la porosidad, H-E. 125x.

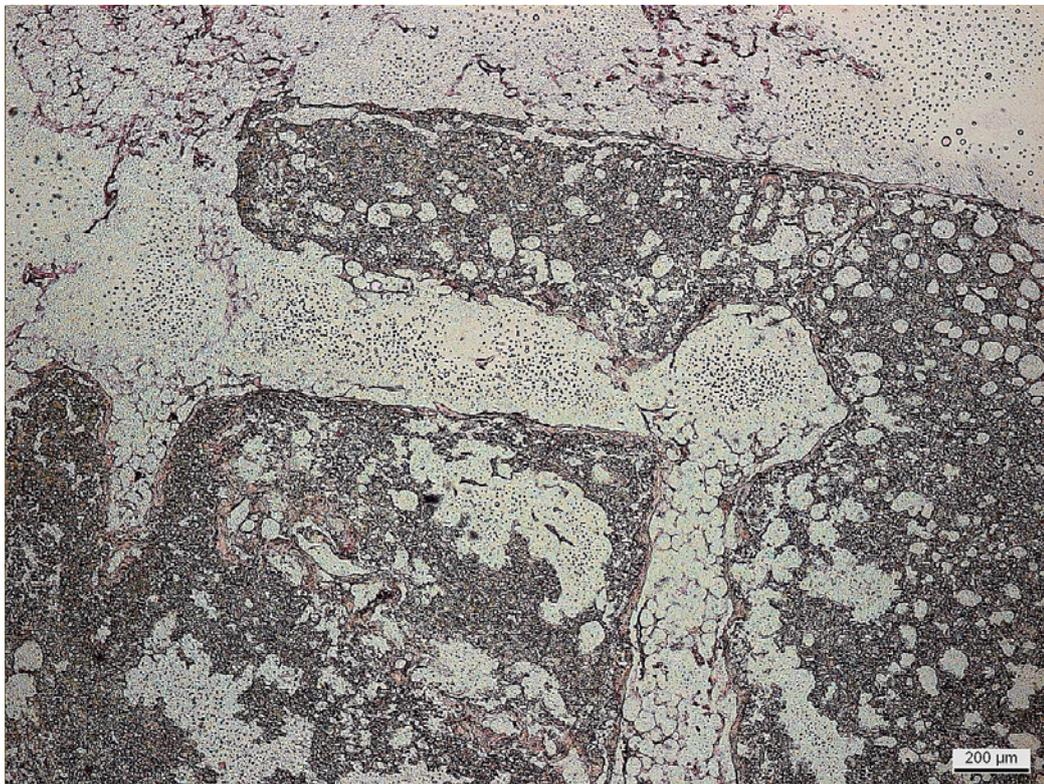


Fig. 34. Detalle de dos islotes unidos por canales de gran tamaño tapizados por osteoide, H-E.200x.

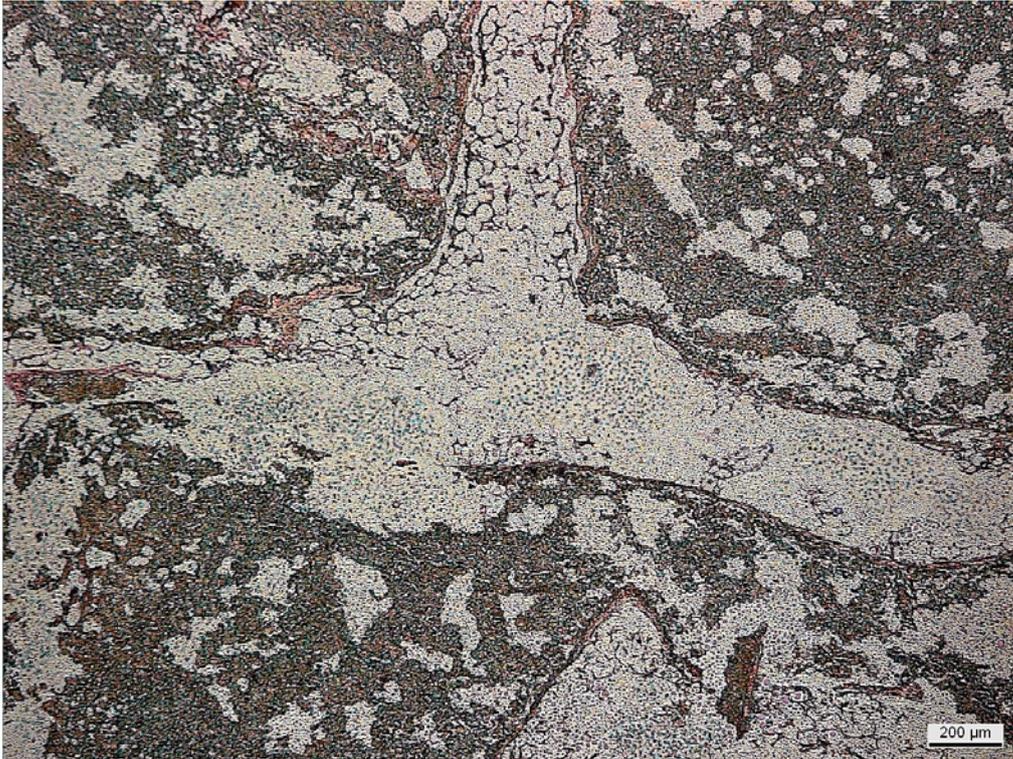


Fig. 35. Detalle de la confluencia de dos canales en un islote que ha perdido su forma circular característica debido a la reabsorción, que también se evidencia en el interior del material, H-E. 312'5x.

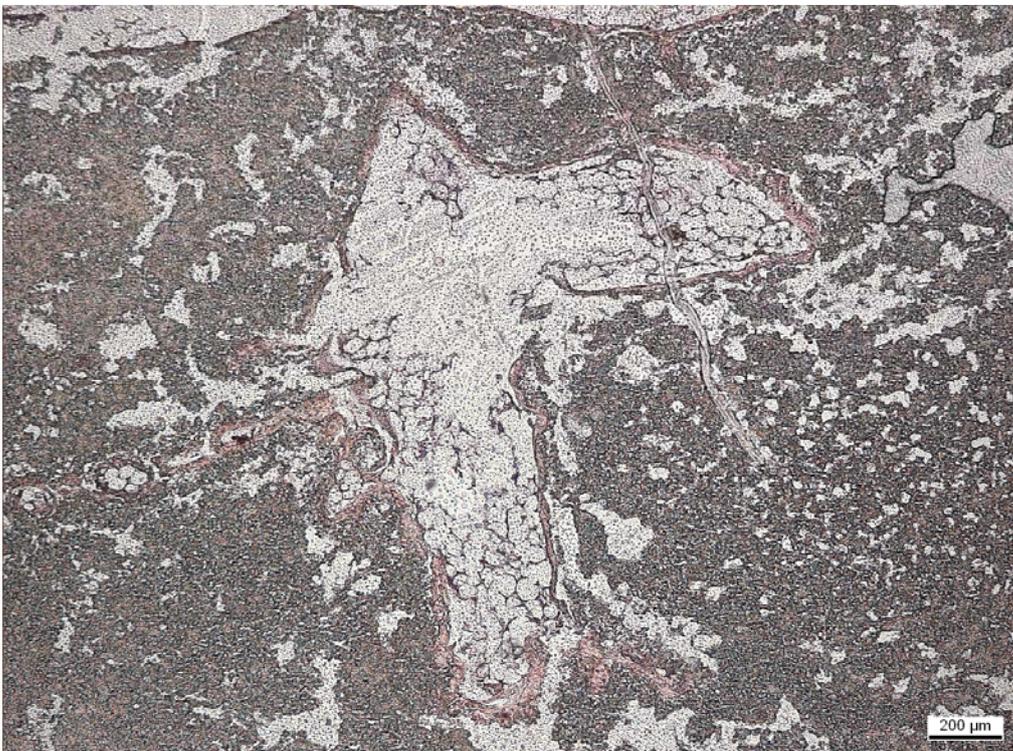


Fig. 36. Detalle de un islote o dilatación. Su interior está tapizado de osteoide y hueso neoformado, que también aparece áreas reabsorbidas del interior del material, H-E. 312'5x.

D) GRUPO IV (8 meses)**D.1) Estudio Radiológico.**

En este estadio , los implantes ya presentan una larga disminución de su tamaño y de su densidad radiológica y muestran mayor alteración de su superficie en contacto con el hueso. El implante es perfectamente individualizable todavía, aunque presentan un incremento en la rugosidad de su zona externa en contacto con el hueso adyacente.

Son menos evidentes las bandas internas radiotransparentes que aparecen en estos momentos , con un aumento de su densidad radiológica y una pérdida del entramado característico y regular que presentaban hasta ahora.

No se observan alteraciones óseas atribuibles a la presencia de los implantes.

Al compara la ubicación de los implantes en el interior del fémur con los periodos iniciales, los implantes se encuentran más alejados de la superficie articular de los cóndilos femorales, lo que parece indicar que el crecimiento óseo ha evolucionado normalmente si verse afectado significativamente por la presencia del implante.



Fig. 37. Proyección anteroposterior de una muestra del período de 8 meses. El implante muestra disminución de tamaño y densidad radiológica.



Fig. 38. Proyección lateral de una muestra del período de 8 meses.

D.2) Estudio Anatomopatológico.

La característica más destacada de este cuarto periodo correspondía a la gran extensión de los canales e islotes son tan extensos que fragmentan el material de modo irregular.

Así mismo las zonas de reabsorción del material también eran de mayor extensión.

También la extensión de la médula ósea hematopoyética era mayor tanto en los islotes y canales como en los nuevos espacios entre los fragmentos del material implantado.

De igual modo los depósitos de hueso neoformado era de mayor volumen que en los periodos previos.

Existía aumento de la porosidad del material implantado. También encontramos un depósito de osteoide de disposición laminar y uniforme tapizando islotes y canales que a su vez están ocupados de médula ósea.

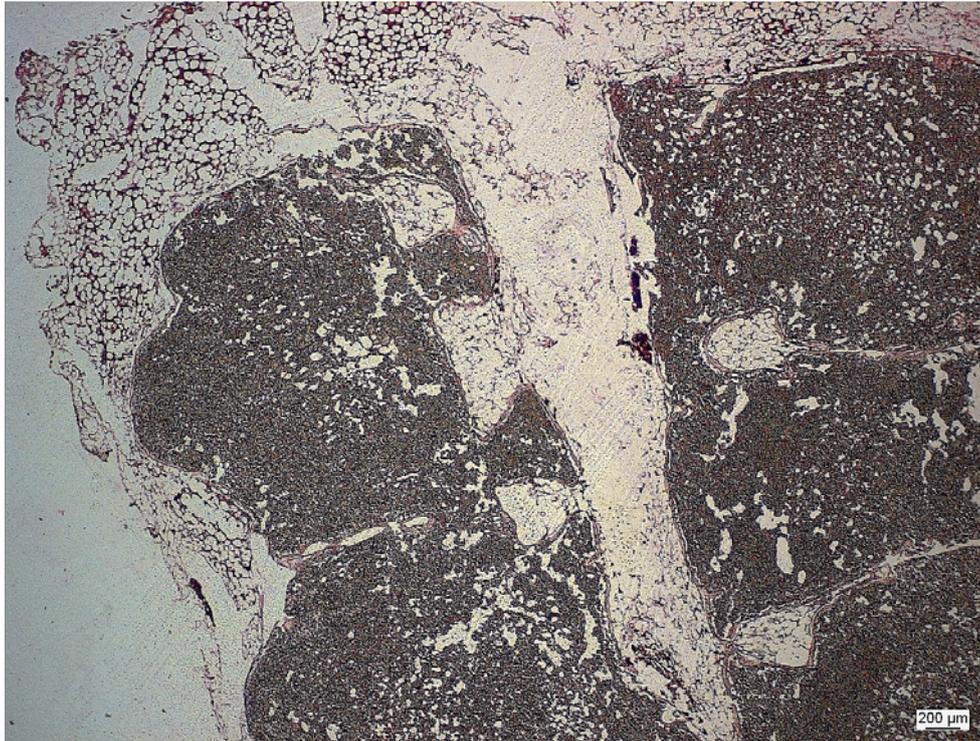


Fig. 39. Imagen panorámica del implante en el periodo de 8 meses. Destaca el aumento de tamaño de los canales que llegan a fragmentar el implante, H-E. 200x.

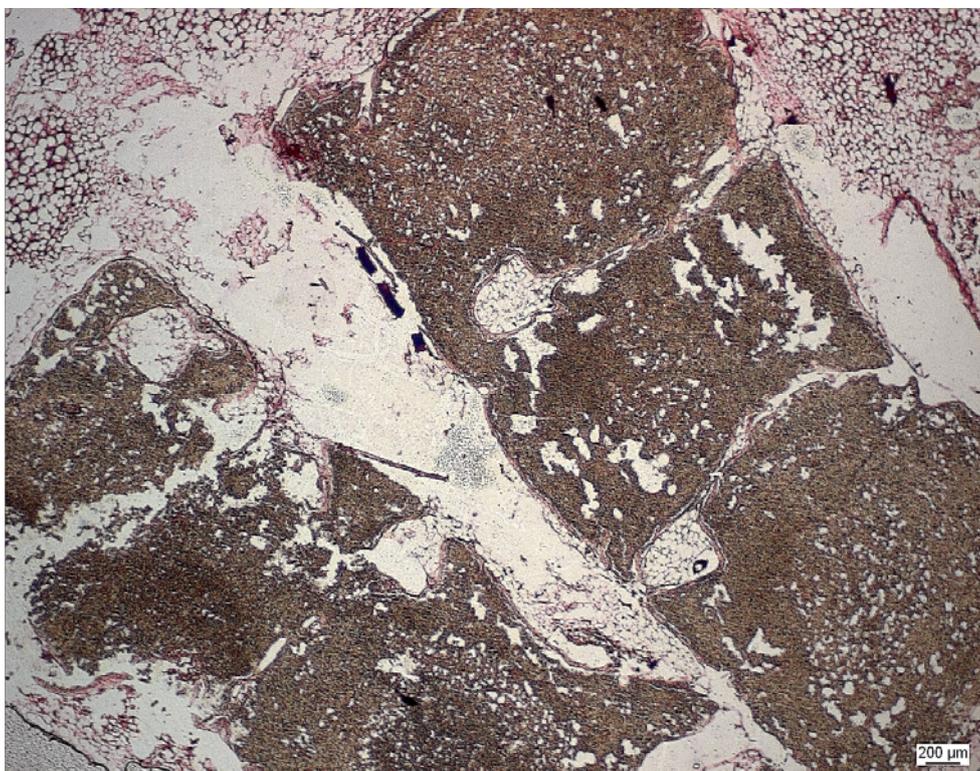


Fig. 40. Imagen panorámica del implante. Destaca el aumento de reabsorción del implante, H-E. 312'5x.

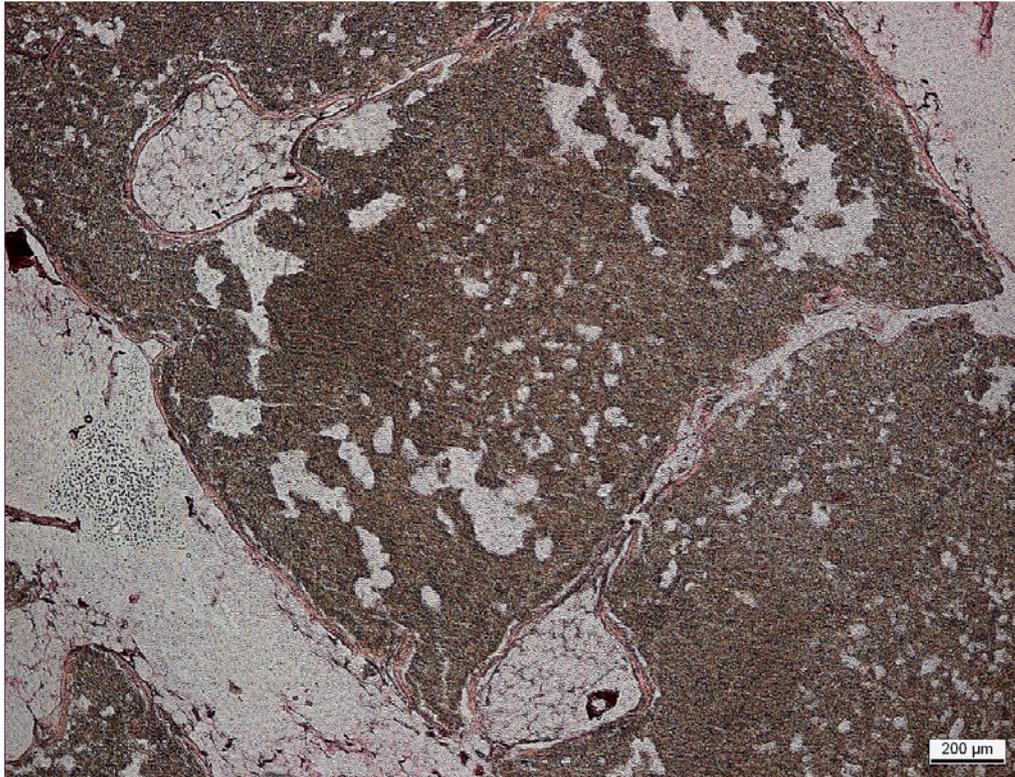


Fig. 41. Detalle de islotes tapizados de hueso y médula ósea de características normales en su interior, H-E. 312'5x.

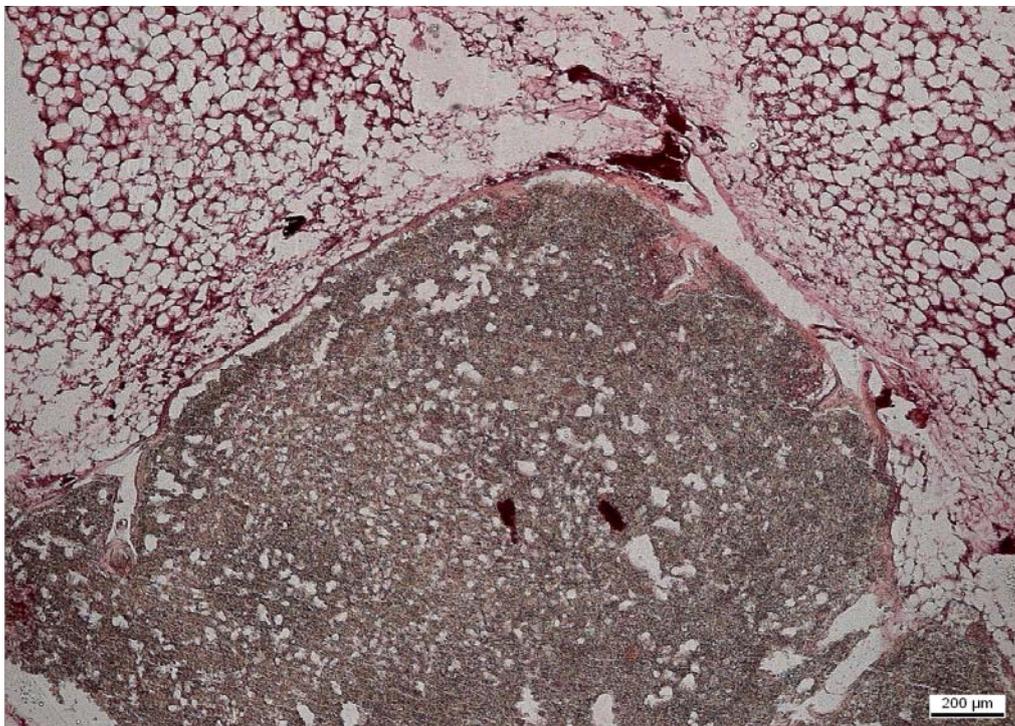


Fig. 42. Detalle de la interfase médula ósea - hueso - implante, H-E. 312'5x.

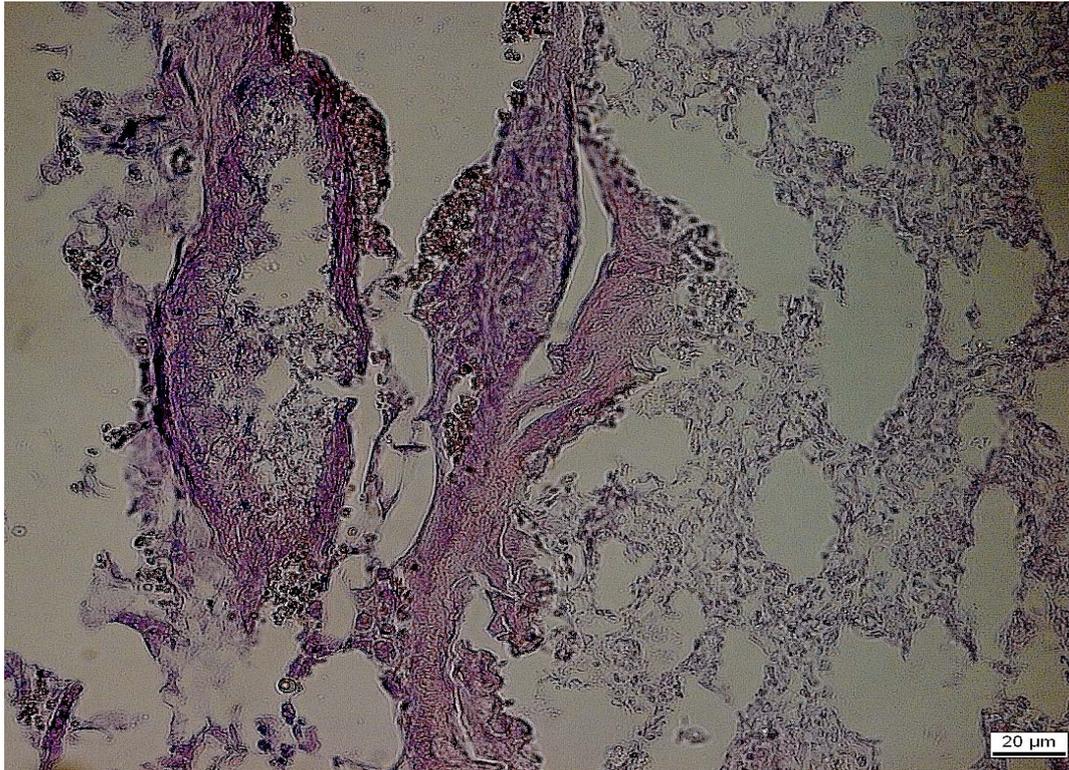


Fig. 43. Detalle a mayor aumento del hueso neoformado, Tricrómico de Masson. 500x.

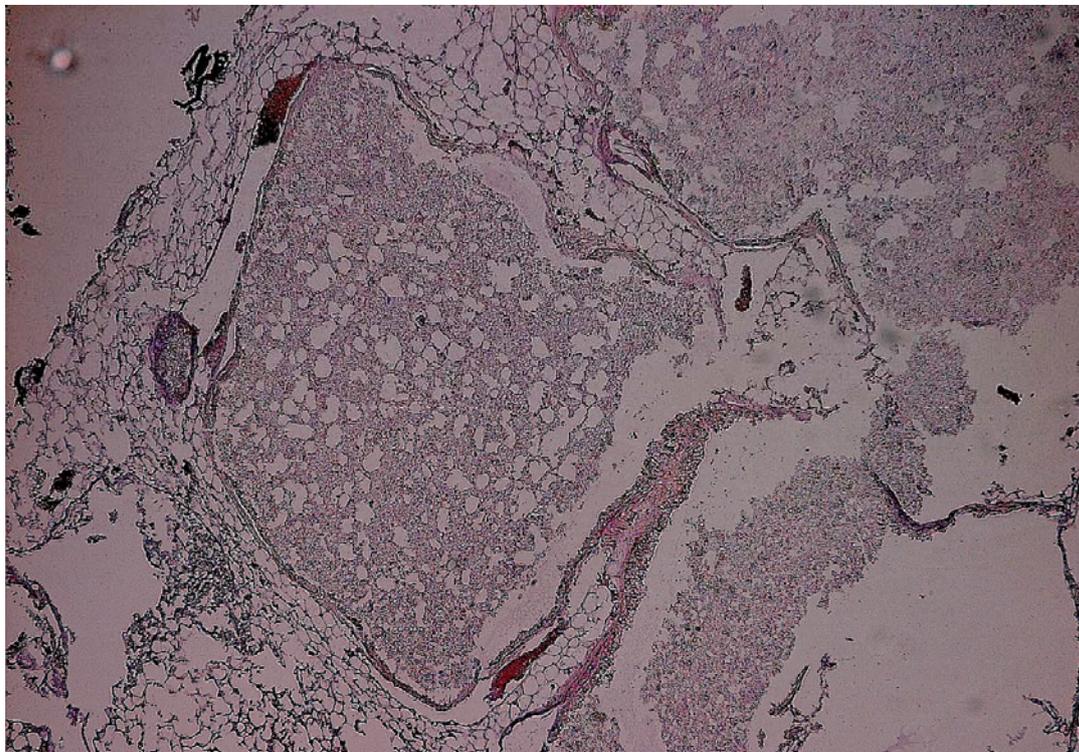


Fig. 44. Detalle de un fragmento de implante aislado por la reabsorción periférica, Tricrómico de Masson. 312'5x.

E) GRUPO V (12 meses)

E.1) Estudio Radiológico.

Este es el último periodo estudiado.

El implante se observa en este estadio de menor tamaño y densidad radiológica.

También ha perdido el entramado de bandas radiotrasparentes en su estructura interna y presenta una superficie irregular que se observa atravesada con frecuencia por líneas trabeculares óseas que parecen continuarse hacia su interior o prolongarse desde su superficie hacia el tejido óseo circundante.

En ocasiones su forma cuadrada o esférica se ve modificada, quizás por la fragmentación del implante que parece de tamaño significativamente menor.



Fig. 45. Proyección anteroposterior de una muestra del período de 12 meses. Destacan líneas trabeculares óseas penetrando en el implante.



Fig. 46. Proyección lateral de una muestra del período de 12 meses. El implante muestra pérdida de su estructura inicial.

E.2) Estudio Anatomopatológico.

Las características más destacadas de este periodo corresponden al hecho de que algunos de los fragmentos del material implantado habían sufrido una reabsorción casi total caracterizándose por una desestructuración del material en fragmentos muy irregulares.

Las diversas áreas de material están separadas por gran cantidad de médula ósea hematopoyética de características normales. El área del material mostraba un aspecto finamente granulada y con menor densidad que en los periodos previos.

Se seguían observando canales e islotes atravesando el cilindro implantado, pero en este periodo su volumen era mucho mayor. El interior de ambas estructuras estaba tapizado por una gruesa capa continua de material osteoide y en muchas áreas se observa la sustitución del mismo por hueso..

En algunas áreas se observaba en el interior del osteoide trabéculas óseas neoformadas con abundantes osteocitos con osteoblastos.

La médula ósea alrededor del implante y en el interior de canales e islotes presentaba características normales.

En este periodo tampoco se observaba tejido fibroso en la interfase hueso-material.

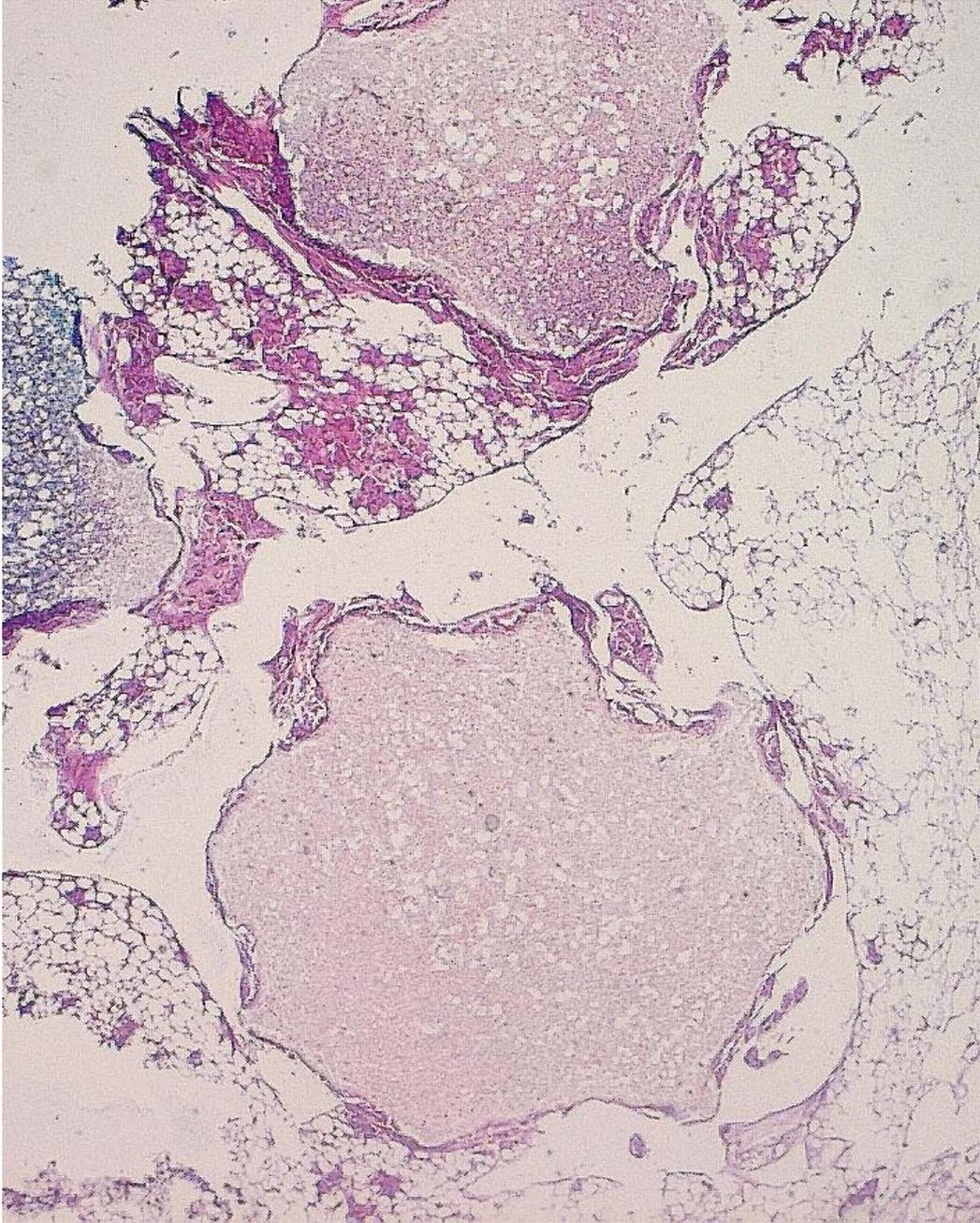


Fig. 47. Imagen panorámica en la que se observa fragmentos irregulares de implante, Tricrómico de Masson. 312'5x.

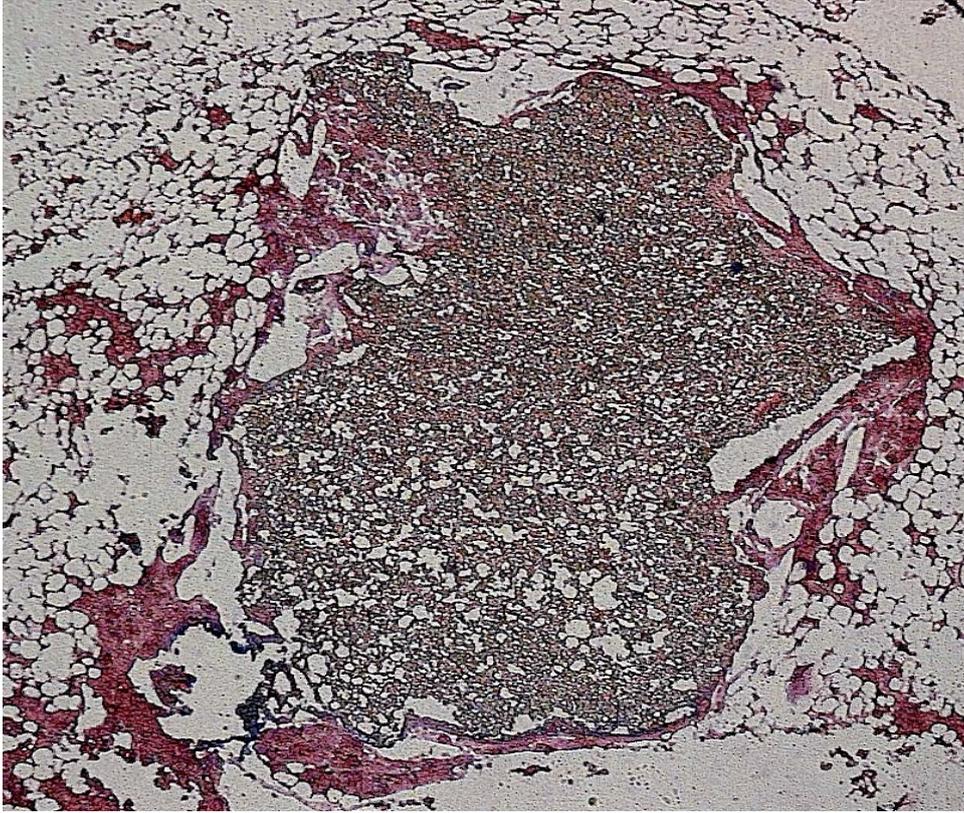


Fig. 48. Imagen panorámica de un fragmento irregular de implante rodeado de hueso y medula ósea hematopoyética, H-E. 312'5x.

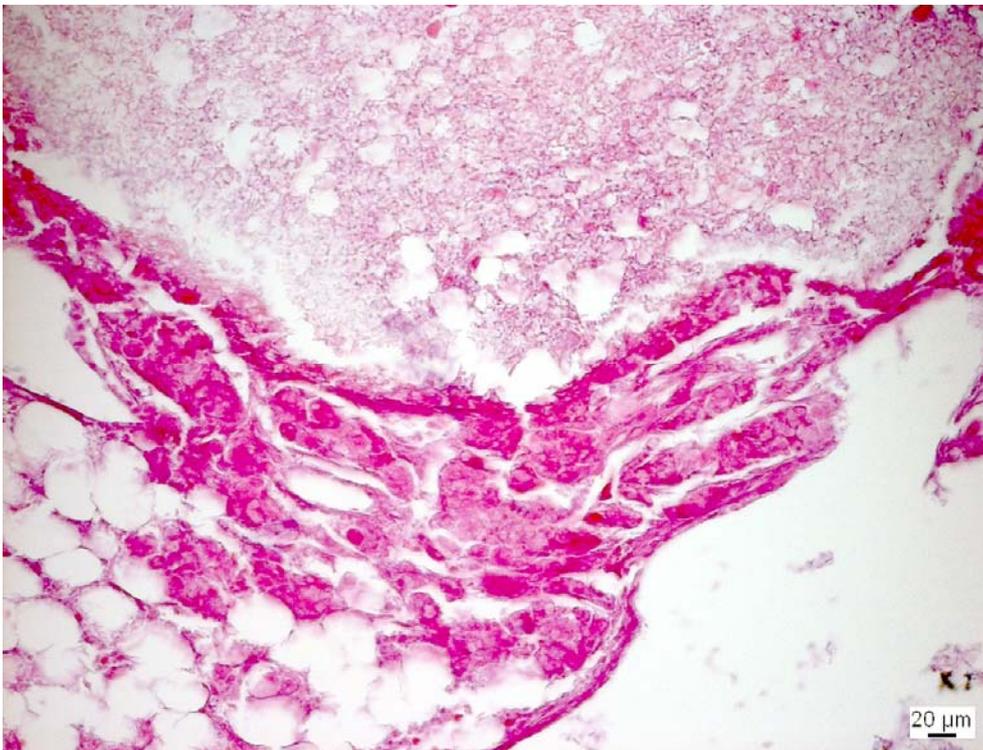


Fig. 49. Detalle de la interfase implante(superior), hueso (medio) y matriz ósea (inferior), H-E. 500x.

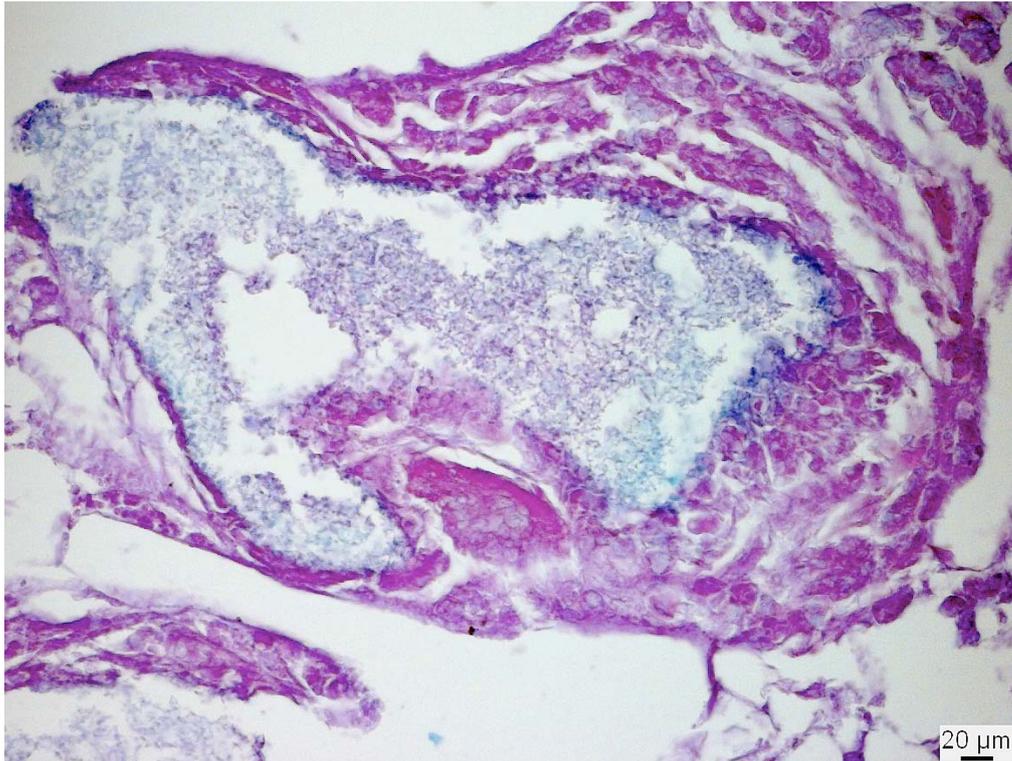


Fig. 50. Detalle de un pequeño fragmento de implante rodeado por gran cantidad de hueso, Tricrómico de Masson. 500x.

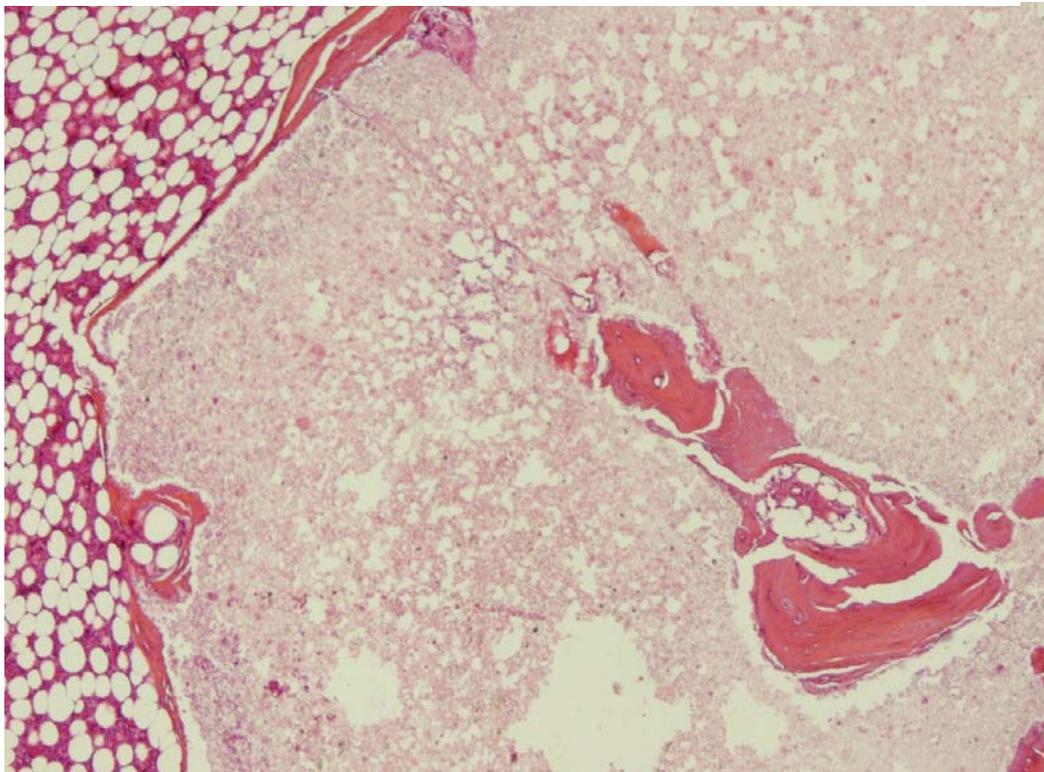


Fig. 51. Detalle del implante con hueso neoformado en su interior y rodeándolo, H-E. 400x.

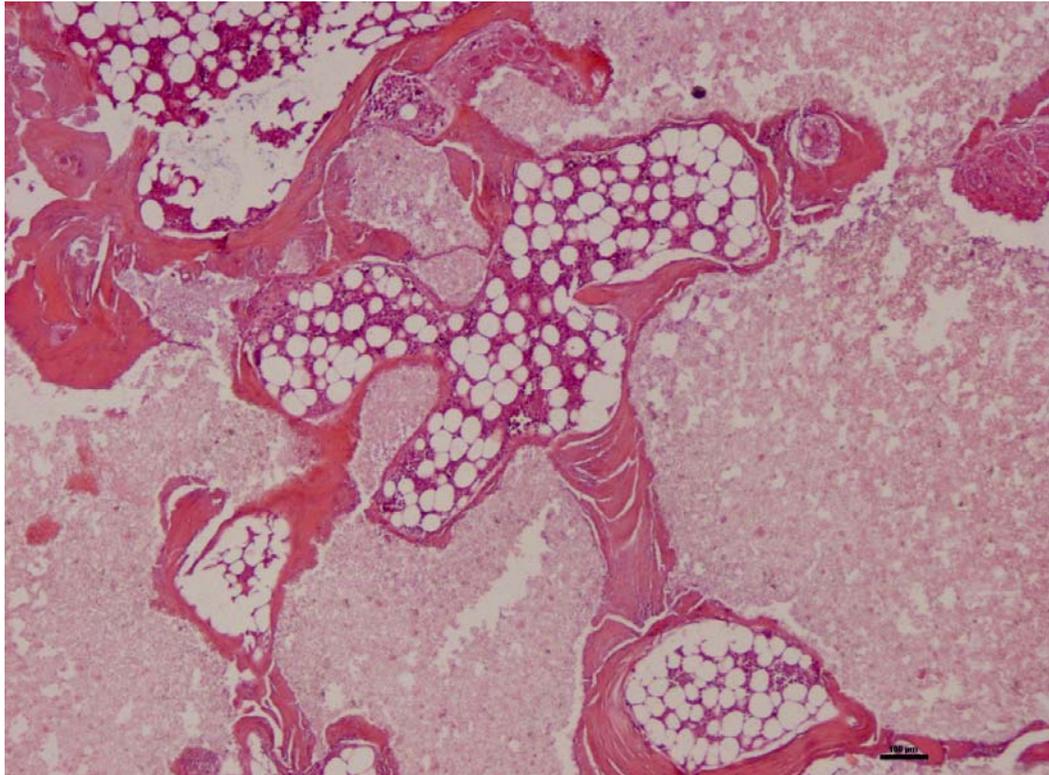


Fig. 52. Detalle de áreas de reabsorción ósea rellenas de hueso neoformado y médula ósea, H-E. 312'5x.

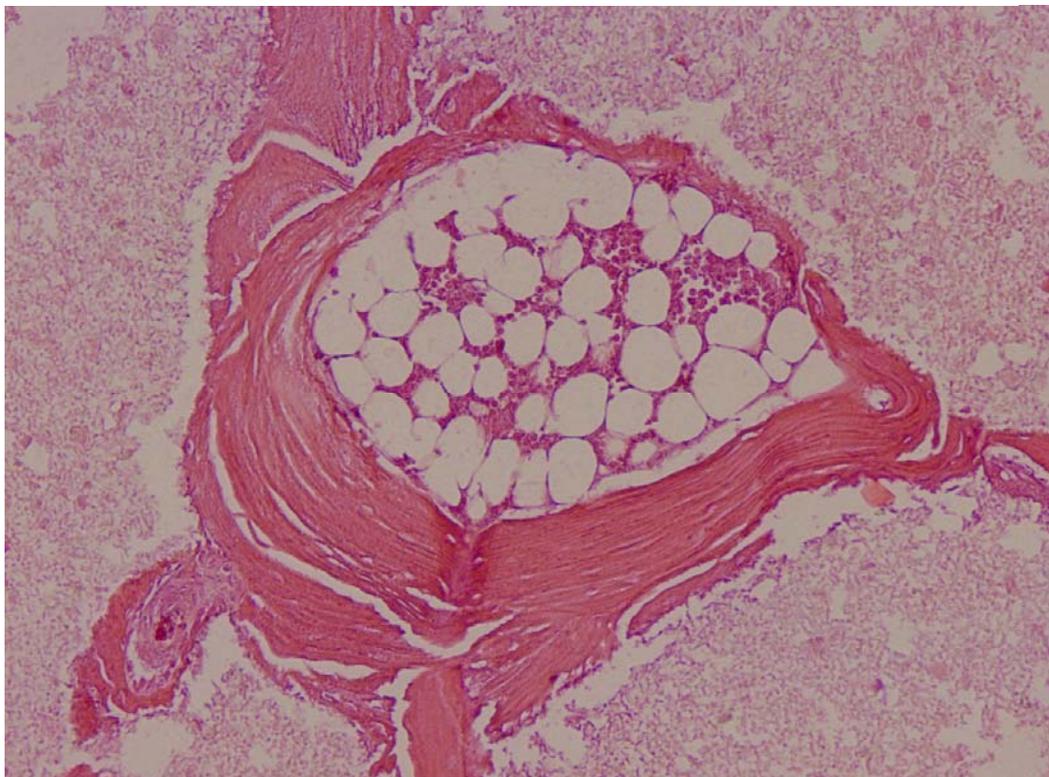


Fig. 53. Detalle a mayor aumento de un islote totalmente relleno de hueso neoformado con médula ósea en su interior, H-E. 500x.

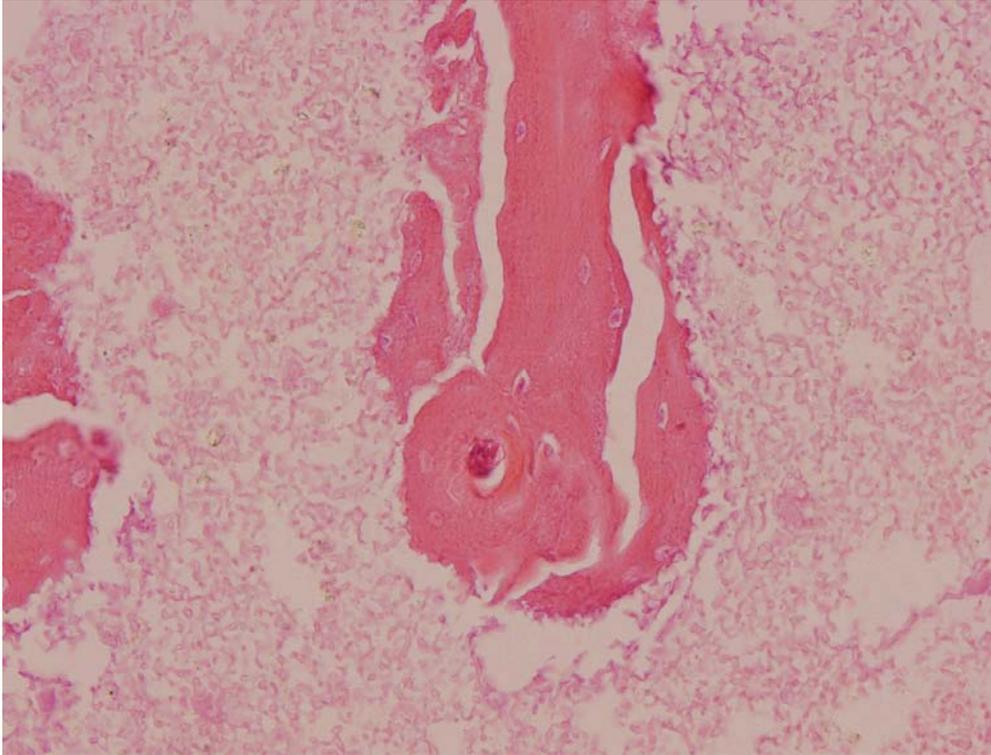


Fig. 54. Detalle del hueso neoformado con un osteocele en su interior, H-E. 500x.

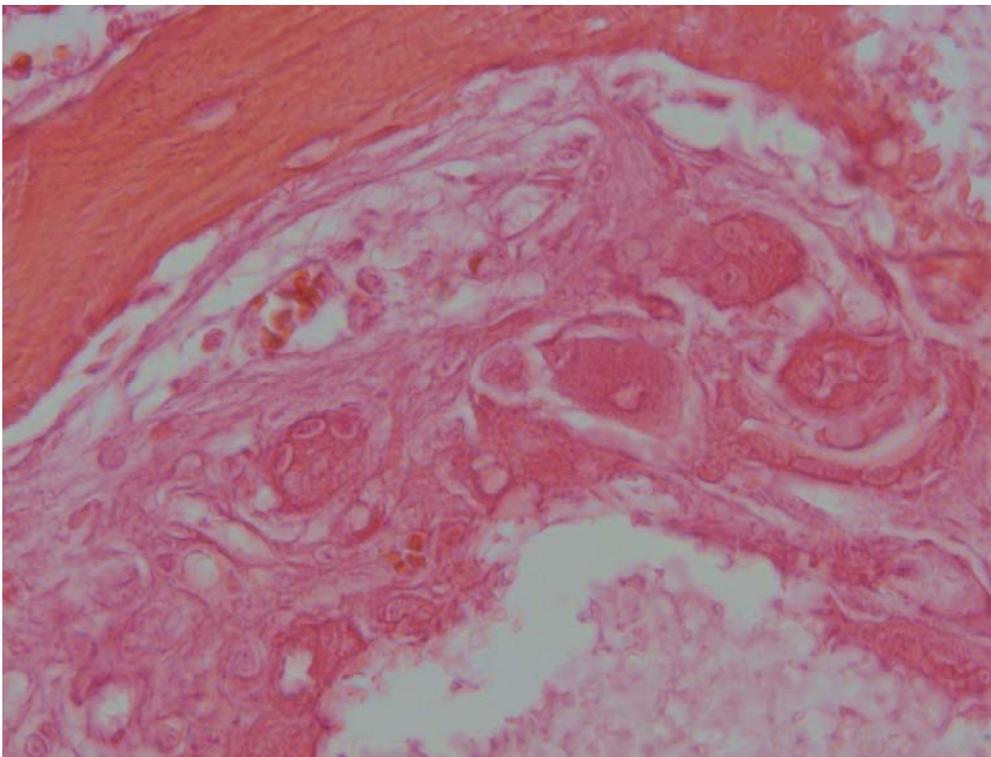


Fig. 55. Detalle a gran aumento de un foco de osificación endondral, H-E. 500x.

E.3) Estudio Microscopía Electrónica. de Barrido.

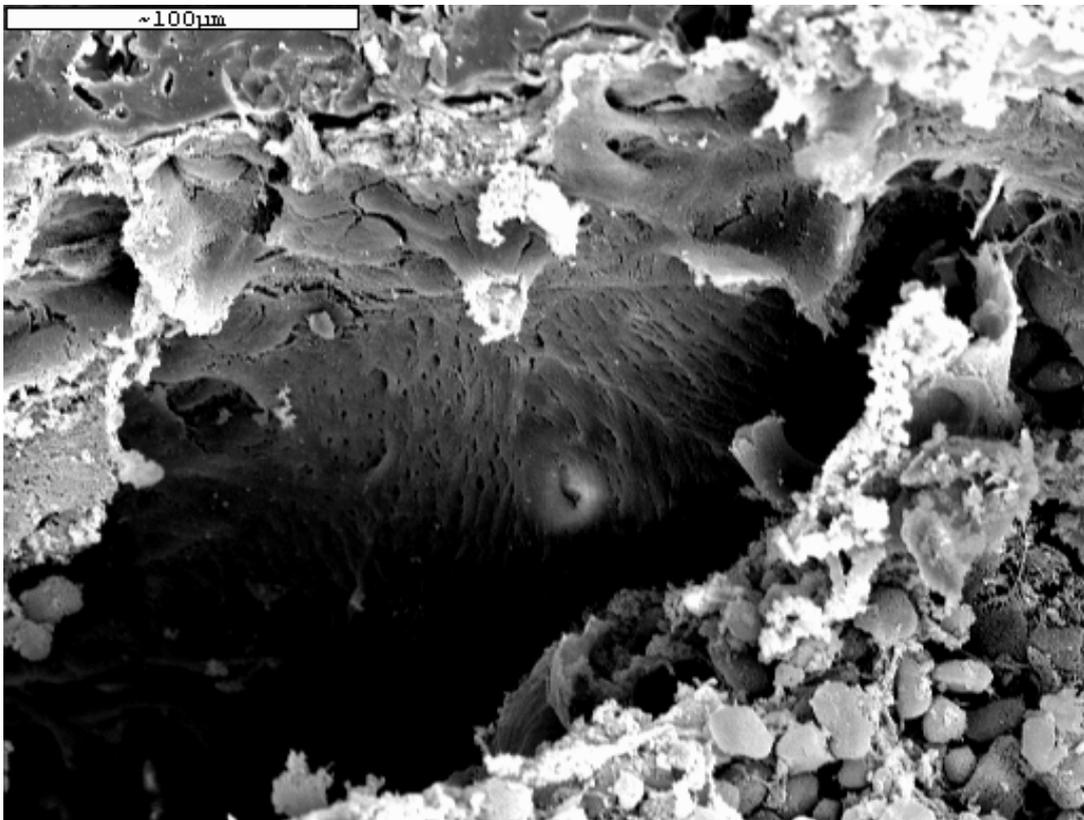


Fig. 56. Destaca la presencia de tejido osteoide mineralizado ocupando el interior de los poros del material

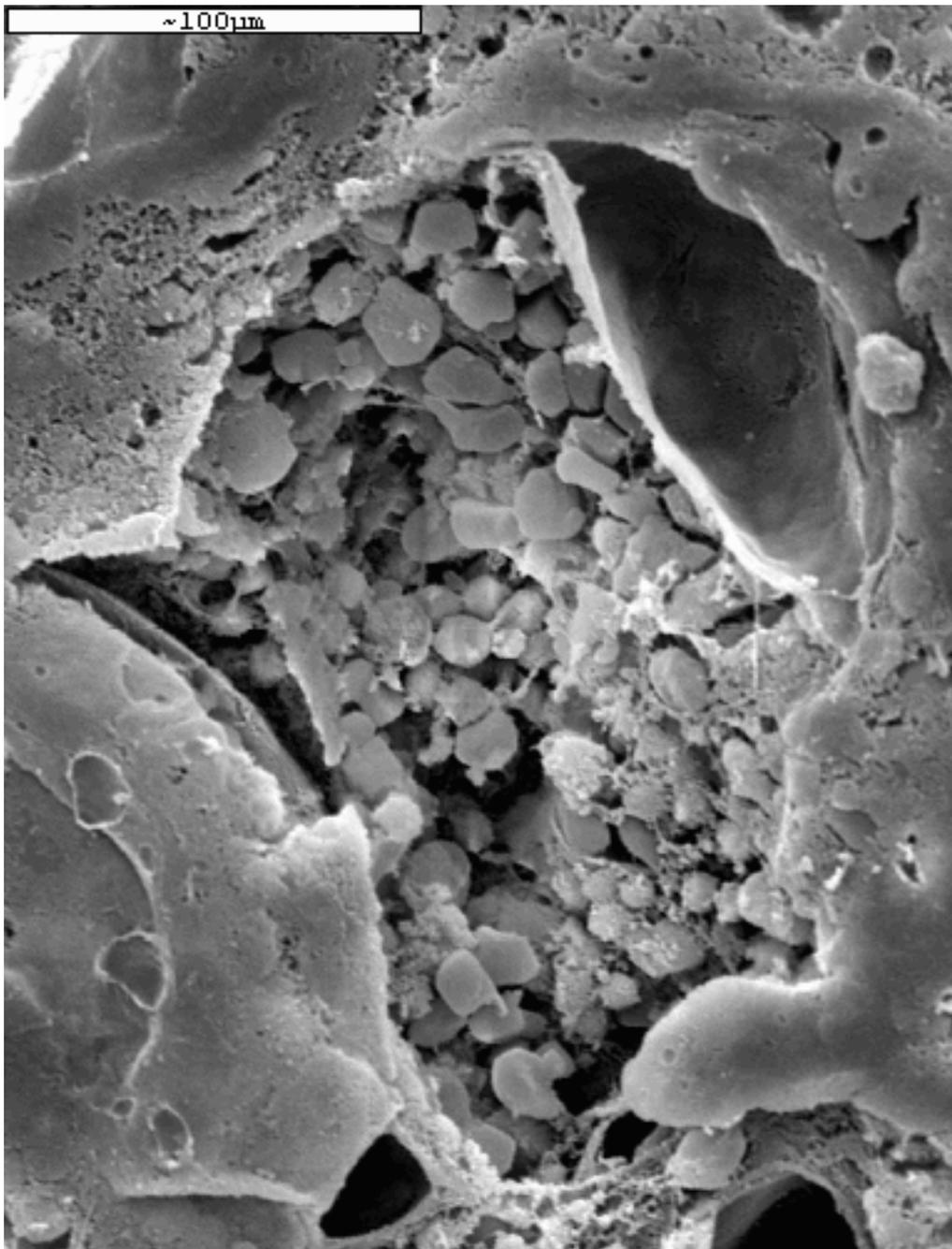


Fig. 57. Destaca la presencia de elementos celulares procedentes de la medula ósea hematopoyética.

VI. DISCUSIÓN

La sustitución ósea ha sido motivo de numerosos estudios por distintas especialidades quirúrgicas, fundamentalmente Traumatología, Odontología y Neurocirugía, con el fin de resolver el problema que representa la existencia de defectos óseos secundarios a diferentes patologías médicas o quirúrgicas, como hemos expuesto brevemente en la revisión bibliográfica recogida en el capítulo de los antecedentes. Además, dicha problemática suele complicarse enormemente cuando el déficit local de hueso se asocia a una infección.

La búsqueda del sustituto óseo ideal sigue siendo la meta a conseguir. Este debería tener las siguientes características,

1. Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial
2. No ser tóxico, ni carcinógeno.

3. Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) e inerte (si así se precisara).
4. Tener una resistencia mecánica adecuada al hueso a sustituir.
5. Tener un tiempo de fatiga similar al hueso que sustituye.
6. Tener densidad y peso similar al hueso que sustituye.
7. Tener un diseño de ingeniería perfecto; esto es, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados.
8. Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.

Los materiales que cumplieran estos ocho requisitos se podrían considerar biomateriales idóneos. Pero aún así no serían sustitutos óseos ideales ya que el hueso autólogo además de tener todas estas características además es osteoinductivo (capacidad descrita por **Urist** en 1965), osteoconductor (capacidad descrita por **Jarcho** en 1981) y osteogénico (capacidad descrita por **Blokhuis** y **Dailiana** en 2000 y 2002 respectivamente).

Estas características especiales del hueso autólogo son las que hacen que el estudio del sustituto óseo ideal sea más costoso. Actualmente, aún no se ha descrito el biomaterial que tenga todas las características del hueso esponjoso autólogo y por tanto el Sustituto Óseo Ideal.

Ante la imposibilidad de obtener un biomaterial con todas las capacidades del hueso autólogo; se plantea hacer combinaciones de *matrices osteoconductoras* que proporcionen un andamiaje adecuado para el crecimiento óseo en su interior, *células osteogénicas* con capacidad de diferenciarse y formar hueso y *agentes osteoinductivos* que favorezcan el proceso de regeneración ósea (**Schneider**, 2003).

La mayoría de los biomateriales utilizados como sustitutos óseos actúan únicamente como agentes osteoconductoros sin presentar propiedades osteoinductivas salvo que se les añada médula ósea autóloga, aloinjerto desmineralizado o factores de crecimiento recombinantes (**Bucholz**, 2003).

Este hecho ha dado origen al desarrollo de numerosos sustitutos óseos así como al diseño de distintas líneas de investigación de diversa naturaleza. Cada uno de estos sustitutos óseos presenta características que lo individualizan, diferenciándolo de los demás, al tiempo que les confiere ventajas e inconvenientes a la hora de su utilización en la clínica humana. Sin embargo, ninguno de ellos ha conseguido igualar o ser tan perfecto como el hueso sano.

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo diversos estudios sobre distintos biomateriales con el fin de intentar conocer las características de su aplicación en la clínica diaria. Inicialmente estudió diversos materiales poliméricos como el ácido poliláctico y poliglicólico (**García Novalvos**, 1990 y **Santonja**, 1990). Posteriormente realizó estudios sobre cerámicas de fosfato cálcico, principalmente hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (β -FTC) y compuestos β -FTC-colágeno (**Úbeda**, 1994, **Galian**, 1995, **Muñoz**, 1999 y **Lax**, 2004) comprobándose su eficacia tanto como matrices osteoconductoras como sobre el crecimiento de células de

estirpe osteoblástica. Todos estos materiales se suelen comercializar en forma de implantes porosos, implantes densos (no porosos) y partículas granulares porosas.

Las cerámicas pueden ser de naturaleza química muy variada; Las biocerámicas cristalinas más características son los fosfatos de calcio en general y en particular la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico- β (**Vallet-Regí**, 2004), las cerámicas amorfas representadas por los vidrios bioactivos (**Vallet-Regí**, 2003), las vitrocerámicas bioactivas (**Cabañas**, 2003 y **Vallet-Regí**, 2005), los cementos de sales de calcio (**Frayssinet**, 1998 y **Kim**, 2001), diferentes combinaciones bifásicas como la hidroxiapatita-biovidrio (**Rámila**, 2002) entre otras, las cerámicas híbridas bioactivas (**Vallet-Regí**, 2004) y los materiales mesoporosos ordenados de óxido de silicio (**Vallet-Regí**, 2001).

Estas cerámicas se utilizan para relleno de defectos óseos en diversas presentaciones, bien como granulado o en forma de piezas porosas o densas. También se usan en inyectables para poder utilizarlas con mayor facilidad y por vía percutánea (**Constantz**, 1995). Así como para recubrimiento de prótesis metálicas (**Hijón**, 2004) con el fin de conseguir una mejor fijación de las mismas al hueso.

Como se comentaba previamente el motivo fundamental de la investigación en el campo de las vitrocerámicas es la mejora en la capacidad mecánica con respecto a los biovidrios. Se han realizado múltiples estudios en los que se comparan el tipo de unión al hueso de distintos materiales cerámicos. Y lo que es una evidencia es que la unión de la vitrocerámica al hueso se realiza a través de la formación de una capa rica en Ca y P, hecho ampliamente tratado en el apartado de vitrocerámicas de los antecedentes de este trabajo.

La unión vitrocerámica hueso es lo suficientemente sólida para permitir aplicar cargas desde el primer momento. La vitrocerámica está sometida a una desintegración focal principalmente en áreas de interfase. La solubilidad de las vitrocerámicas se puede disminuir drásticamente disminuyendo el contenido de Na_2O y aumentando el de Al_2O_3 , Ta_2O_5 , TiO_2 y Sb_2O_3 . Pero estas vitrocerámicas con solubilidad disminuida producen una alteración de la formación ósea sobre el implante al inhibir la diferenciación celular de células condroides en osteoblastos y el proceso de mineralización del osteoide, demostrado por **Gross** en 1980 en un estudio en el que comparaba vitrocerámicas de distinta solubilidad en fémures de ratas.

El material que hemos utilizado en nuestro estudio es una vitrocerámica diseñada por **Vallet-Regi y cols** con una composición de 54% de pseudowallastonita, 38% de wollastonita, 4% cristobalita y 4% de fosfato tricálcico.

La elección de este material como sustituto óseo se basa en que los estudios recogidos en la bibliografía confirman ampliamente que las vitrocerámicas son materiales bioactivos pero con mejores propiedades mecánicas que los biovidrios.

Gil-Albarova y cols estudiaron en 2005 el comportamiento de un biovidrio sol-gel y de una vitrocerámica (obtenida a través de un tratamiento térmico del vidrio) en la curación de defectos óseos críticos en diáfisis de fémur de conejo, usando un grupo control en el que el defecto lo dejaban vacío. Al igual que en nuestro estudio, tras el sacrificio a los 6 meses, se observó cobertura ósea cuando se

uso vidrio y vitrocerámica (en el control no había reparación del defecto). En este estudio al buscar solo la comparación entre los distintos materiales, solo se usa un periodo de estudio; en nuestro estudio como buscamos estudiar el comportamiento a lo largo del tiempo de nuestra vitrocerámica se analizaron 5 períodos.

En el estudio histológico describen dos datos que concuerdan con nuestros resultados que son la íntima unión implante-hueso y que a los 6 meses postimplantación hay una mínima degradación de la vitrocerámica. En cambio en el vidrio se describe una gran fragmentación del implante. En nuestros resultados también destaca el hecho de producirse una mínima fragmentación debida a la reabsorción del implante. Como comentamos en los resultados había algún caso de fragmentación del implante acaecida a la hora de introducir el implante ya que buscábamos que la perforación ósea metafisaria no fuese excesivamente grande para que el implante quedase fijado a presión, y en algún caso ocurrió la fragmentación en dos del implante.

También realizan estudio mecánico de las muestras, donde se vuelve a confirmar las mejores cualidades mecánicas de la vitrocerámica frente al biovidrio que presenta unos resultados similares al caso control. En nuestro trabajo no realizamos estudios mecánicos a las muestras obtenidas, aunque conocemos por los estudios de **Gil-Albarova** (2005) las mejores cualidades mecánicas de la vitrocerámica sobre el vidrio, que muestra en el estudio mecánico unos resultados similares al grupo en el que el defecto se quedaba vacío.

La elección por tanto entre un biovidrio y una vitrocerámica en la práctica clínica se debería basar en la tasa de reabsorción que preferimos en cada uso y las sollicitaciones mecánicas a las que va a estar sometido. Si queremos usarlo en un defecto óseo que va a estar sometido a sollicitaciones mecánicas desde el primer momento lo más interesante sería usar una vitrocerámica. Si por el contrario, el defecto óseo no va a estar sometido a cargas (relleno de un área quística con integridad cortical periférica) un vidrio sería mejor opción.

Con respecto a las mejores propiedades mecánicas de los vitrocerámicas es interesante uno de los primeros estudios que realiza **Kitsugi y Kokubo** en 1989. En él estudian y comparan la formación de hueso y la resistencia tensil de una vitrocerámica de apatita-wallastonita y una cerámica de alúmina en defectos óseos tibiales de conejos.

Demuestran que la carga necesaria para producir el fallo mecánico de la vitrocerámica es tiempo dependiente de forma significativa ($p < 0.01$). También describe que la unión al hueso por parte de la cerámica de alúmina es nula (ya que se trata de una cerámica bioinerte).

La unión vitrocerámica-hueso la describe como fuerte y sin interposición de partes blandas. Esta afirmación está ampliamente demostrada en nuestro estudio. En ninguno de los cinco periodos, de nuestro estudio se observó tejido fibroso en la interfase implante-hueso.

Otros estudios de diversas cerámicas in vivo la realizó **Ono** en 1990. En el compara dos vitrocerámicas de apatita-wallastonita en gránulos mezcladas con fibrina con otra mezcla de hidroxiapatita y fibrina en defectos óseos creados en metáfisis distal de fémur de conejos.

Demuestra una superioridad a la mezcla vitrocerámica A-W - fibrina en proporción 1:4 . con formación de hueso más precoz y de características morfológicas y mecánicas similares al hueso normal.

Esta característica del hueso neoformado igual al normal también está descrita en los resultados de este trabajo, donde observamos hueso neoformado y médula ósea de características normales.

Previo a estos estudios, **Nakamura** en 1985 también demuestra la superioridad de la unión de una vitrocerámica con cristales de oxiapatita, fluorapatita y wallastonita frente la hidroxiapatita, el 45S5 Bioglass y la alúmina al implantarlos en metáfisis tibiales proximales de conejos.

Esta vitrocerámica de apatita-wallastonita presentaba una elevada resistencia a la flexión y a la compresión, 157 y 1060 MP respectivamente. La vitrocerámica demostró mejores propiedades mecánicas respecto, a la carga necesaria para producir la ruptura, que la HA, el 45S5 Bioglass y lo alumina (que fue la que peores resultados obtuvo). Basándonos en los trabajos de **Bunte** en 1977, también demostró mejores propiedades mecánicas que el Cervital®.

Unos años después **Kitsugui** comparó esta misma vitrocerámica con otra dos cerámicas la AW-6 y la AW-AL en tibias de conejo, valorando la carga de tracción a la que se producía la rotura implante-hueso tras 10 semanas de la implantación, siendo la diferencia a favor de la vitrocerámica AW estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

. El estudio de microscopio electrónico demostró que la capa rica en Ca-P era mayor que en las otras dos otras cerámicas. Observación que volvía a demostrar la importancia de la capa Ca-P en la unión vitrocerámica- hueso. Cuanto mayor es esa capa, mejores propiedades mecánicas de la unión del hueso neoformado y el implante.

La capacidad de formación de la capa Ca-P por una vitrocerámica está determinada por la superficie y propiedades estructurales de la misma (**Andrade**, 2006) y su temperatura de sinterización (**Clupper**, 2001). También se ha demostrado in vivo (implantado el material en músculo de conejo) que la cristalización de las vitrocerámicas retarda la formación de redes de sílice y la precipitación de la apatita en cerámicas porosas y no en las densas (**Xin**, 2008) .

En la búsqueda de mejorar las propiedades de las vitrocerámicas se han realizado distintas modificaciones de formulaciones que previamente habían demostrado buenos resultados. Una de ellas es la modificación de la vitrocerámica presentada por **Kokubo** en 1985 $MgO-CaO-SiO_2-P_2O_5-CaF_2$ a la que se le añadió 0.2% de Y_2O_3 (itrio). Esta nueva modificación se estudio en fémures de rata demostrando una buena biocompatibilidad sin reacción inflamatoria en el hueso

huésped. Propiedades mecánicas mejores que la vitrocerámica de origen; mejora la fuerza a la compresión un 119%. El problema que no termina de explicar y concluye que se precisa de más estudios es la disminución de la bioactividad ya que no se forma hueso.(**Al-Haidary**, 2008). Esta vitrocerámica modificada, no cumple por tanto los requisitos que se piden a un sustituto óseo aunque sus propiedades mecánicas sean superiores a la de su vitrocerámica de origen.

Desde que **Charnley** en los años 50 y 60 introdujo el uso del polimetilmetacrilato (PMMA) como cemento óseo para la fijación protésica ha sido ampliamente utilizado. Pero desde entonces ha demostrado una serie de desventajas aún no resueltas como son la falta de unión al hueso, la posible formación de un tejido fibroso que produce el aflojamiento aséptico de la prótesis y el desgaste. Para solucionar este problema se han desarrollado cementos bioactivos mezclando vidrios y vitrocerámicas con resina de dimetacrilato (Bis-GMA). Estos cementos se unen al hueso a través de una capa de hidroxicarbonatoapatita. De estos cementos bioactivos los conseguidos mediante el uso de una vitrocerámica son los que mejores propiedades mecánicas tienen. Se han implantado uno de estos cementos bioactivos (polvos de vitrocerámica apatita- wallastonita MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ mezclados con una resina de dimetacrilato Bis-GMA) en defectos tibiales metafisarios de tibia, observándose a las 10 semanas contacto directo con el hueso y reabsorción parcial en la superficie del material. A las 25 semanas se observaba absorción completa del material que se reemplazaba por hueso neoformado (**Okada**, 2001).

Otros autores han seguido investigando sobre las propiedades mecánicas y bioactivas de distintas formulaciones de vitrocerámicas. Una de ellas es la vitrocerámica de canasite, estudiada por **Rocha Barros** en 2002. En este estudio, a diferencia del nuestro, se usa la diáfisis femoral en vez de la metafisis distal y tan solo usa 3 períodos de estudios que son a las 4, 13 y 22 semanas. También se analizan los resultados por microscopía óptica y electrónica. El material de control usado fue la hidroxiapatita. La vitrocerámica de canasite había demostrado una buenas propiedades mecánicas (**Johnson**, 2000).

Los resultados fueron concluyentes. La HA se mostraba como un material bioactivo alrededor del cual se formaba hueso (afirmación ampliamente demostrada). Pero en los estudios de la vitrocerámica se observaba aéreas inflamatorias y tejido de granulación en la superficie del material parecía degradada. En el apartado de resultados de este trabajo, se destaca en todos los periodos el hecho de la ausencia total de reacción inflamatoria alrededor o en interior del implante.

Se concluye por tanto que la vitrocerámica de canasite a pesar de presentar buenas propiedades mecánicas no es un material osteoconductor y por tanto no se considera útil como implante in vivo. Al contrario ocurre con nuestra vitrocerámica que si que presenta características osteoconductoras y por tanto podría ser valorada como un implante de sustitución ósea in vivo.

Debido a la mala osteoconductividad de la cerámica de canasite, el mismo grupo de estudio (**Rocha Barros**, 2007) hace modificaciones en la solubilidad de una vitrocerámica de fluorcanasite asumiendo que la falta de conductividad podía deberse a una solubilidad anómala.. El modelo de estudio es el mismo que años anteriores. En este estudio se comparan tres vitrocerámicas de distintas solubilidades y el grupo control es el Bioglass 45S5.

El resultado vuelve a ser el mismo , concluyendo que la solubilidad del implante no modifica la respuesta ósea en el modelo de fémur de conejo.

Con estudios como los comentados previamente se puede concluir que las vitrocerámicas son biomateriales bioactivos, ya que liberan iones calcio y se unen al hueso a través de una delgada capa de hidroxiapatita carbonatada cuando está en contacto con fluido humano simulado o in vivo.

Muchos de los estudios de biocompatibilidad de una vitrocerámica in vivo se hace sobre conejos. Se han descrito otras formas de valoración previa a los estudios in vivo de biocompatibilidad y mineralización de biomateriales bioreabsorbibles que contengan Ca. **Vargas** en 2009 describe un sistema de cultivo basado en embriones de pollo (usando la membrana corioamniótica del pollo) para el análisis del efecto de la liberación de Ca desde un biomaterial en la osificación alrededor del implante.

Además de la capacidad ya conocida de la bioactividad y la osteoconducción una vitrocerámica puede tener una capacidad ostepromotora. Hay que diferenciar en este punto el término Osteoinducción que es la capacidad por la cual unas

proteínas específicas mandan señales para la diferenciación de células madre en células óseas en lugar de en células de otro tipo. Estas proteínas son las llamadas proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y estas son capaces de producir hueso ectópico.

Cuando hablamos de que un biomaterial favorece la diferenciación celular nunca podremos hablar de Osteoinducción sino de Osteopromoción, que es la capacidad de algunos biomateriales o proteínas (PDGF, PRP, etc.) de mejorar o estimular la reparación ósea. Las diferenciamos de las BMP en que no son capaces de producir hueso ectópico.

Matsuoka en 1999 realiza un estudio muy completo sobre la estimulación de la formación ósea por una vitrocerámica A-W. en el estudio se vuelve a demostrar la liberación de iones Ca y la unión al hueso a través de una fina capa de hidroxiapatita carbonatada. También describe que con la disolución de la vitrocerámica se aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina de células osteoblásticas (ROS17/2.8) de 1.5 a 3 veces con respecto al control.

El estudio tiene una parte in vivo en el cual implante la vitrocerámica en metáfisis distal de conejos y demuestra la neoformación de hueso lineal con células cuboidales tipo osteoblasto. Esta misma observación también está descrita en nuestro estudio y aparece en casi todas las vitrocerámicas estudiadas.

El estudio concluye que el favorecimiento de la diferenciación de células osteogénicas se debe a la formación de la capa de hidroxiapatita carbonatada y el aumento de concentración de iones Ca y Si. La elevada concentración de Ca aumenta la actividad de células osteoblásticas en una proporción dosis dependiente y

también aumenta la expresión de fosfatasa alcalina y osteocalcina. Esta parte del estudio no se encuentra dentro del objetivo de nuestro trabajo pero es compatible con nuestros resultados.

En la literatura, el estudio más semejante al nuestro es el de **Gil-Albarova** del grupo de la profesora **María Vallet-Regi** en 2004. En el se estudia la respuesta in vivo de un vidrio y una vitrocerámica en defectos óseos limitados.

Se evalúa en conejos Nueva Zelanda el comportamiento de biovidrio sol-gel y una vitrocerámica que previamente habían demostrado bioactividad en fluido humano simulado de **Kokubo**. Nuestra vitrocerámica también fue validada como material bioactivo en ese mismo fluido humano simulado donde se observaba la cobertura completa de una capa de hidroxiapatita carbonatada en el séptimo día de inmersión en el fluido. De hecho este es un paso fundamental antes de comenzar con estudios in vivo mucho más costosos. Si en el estudio in vitro no se observa bioactividad no tiene sentido seguir investigando con esa vitrocerámica; es mejor buscar otra formulación que si que sea bioactiva y si se consigue continuar con los estudios.

El vidrio estaba sintetizado a través del método sol-gel y era del sistema $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$. La vitrocerámica era del sistema $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO}$ e inicialmente no era bioactiva. La mezcla con HCl (ácido clorhídrico) 1 Molar durante 1 minuto hacía que se disolviera la fase cristalina produciendo una superficie rugosa fundamentalmente de hidroxiapatita. El vidrio estaba completamente cubierto de una capa de

hidroxiapatita carbonatada a los 3 días de inmersión en fluido humano simulado y la vitrocerámica al séptimo día como la nuestra.

Al igual que en nuestro estudio todos los animales sobrevivieron a la cirugía y el postoperatorio inmediato. En ninguno de los estudios se observó fracturas postimplantación ni tampoco reacciones inflamatorias o adversas al implante.

Gil Alvaroba no encuentra desviaciones angulares en conejos esqueléticamente inmaduros a pesar de lesionar las fisis. En nuestro estudio no implantamos en ningún conejo inmaduro, pero esta afirmación se puede deber a la gran plasticidad de los conejos inmaduros.

En el estudio morfométrico evidencian mayor proporción de hueso en los animales con implante que en los controles (sin nada en el defecto óseo). Tampoco demostró diferencias entre los dos implantes. Aunque la bioactividad in vitro es claramente mayor en el biovidrio, in vivo la cantidad de hueso neoformado no muestra diferencias.

En resumen, con los resultados morfológicos y radiológicos obtenidos en nuestro estudio podemos concluir que la vitrocerámica estudiada es una cerámica bioactiva con capacidad de crear hueso a su alrededor.

Nuestros resultados no lo evidencian porque no tenemos grupo control, pero con los trabajos de **Gil Alvaroba** se confirma que la producción de hueso es mayor en estas vitrocerámicas que en el grupo control.

La biocompatibilidad queda demostrada en los resultados expuestos ya que en ninguno de los periodos aparece reacción inflamatoria o granulomatosa alrededor del implante. La interfase hueso-implante no presenta ninguna fase intermedia; se trata de una unión directa.

La degradación del material es lenta, observándose en el último periodo de 12 meses, persistencia de la mayor parte del material. Este hecho concuerda con el hecho de tratarse de una cerámica con propiedades mecánicas altas. Esta elevada resistencia mecánica es paralela a la menor reabsorción del material.

Por tanto la efectividad de esta vitrocerámica como sustituto óseo queda demostrada.

VII. CONCLUSIONES

1. La existencia de un crecimiento óseo asociado a una casi nula respuesta inflamatoria en todos los periodos del estudio demuestran que este material se puede considerar **biocompatible**.

2. En todos los periodos estudiados observamos aposición de osteoide y crecimiento óseo tanto en la periferia como en el interior del material, sin presentar tejido fibroso en la interfase implante-huésped, lo que demuestra la capacidad **osteointegración**.

3. El biomaterial sufre un proceso de reabsorción parcial y progresiva durante todos los periodos el experimento, que es llevado a cabo por **mecanismos celulares fagocíticos** sin que se originen **productos intermedios**.

4. Por todas las propiedades previamente descritas el material puede ser considerado como una alternativa dentro de los sustitutos de injerto óseo.

VIII. ABREVIATURAS

A-W: Apatita – Wallastonita.

BMP: Bone Morphogenetic Protein o Proteína Morfogenética ósea.

Ca: Calcio.

DAC: Diseño Asistido Computerizado..

FCS: Fluido Corporal Simulado.

FDA: Food and Drug Administration o Administración de Alimentos y Medicamentos.

FGF: Fibroblastic Growth Factor o Factor de Crecimiento Fibroblástico.

FTC: Fosfato tricálcico.

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy o Espectroscopio Infrarrojo de Fourier transformado.

HA: Hidroxiapatita.

H-E: hematoxilina-eosina.

Hg: Mercurio.

HCl: Ácido Clorhídrico.

IGF: Insulin Growth Factor o Factor de Crecimiento Insulínico.

Mg: Magnesio.

MOD: Matriz Ósea Desmineralizada.

P: Fósforo.

PDGF: Platelet Derivate Growth Factor o Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

PMMC: Polimetilmetacrilato.

PRP: Plasma Rico en Plaquetas.

SEB: Sociedad Española de Biomateriales.

SEM: Scanning Electron Microscope o Escaner de Microscopia Electronica.

Si: Silicio.

SL: Esereolitografía.

TEP: Trietil fosfato.

TGF- β : Tumoral Growth Factor - β o Factor de Crecimiento Tumoral - β .

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor o Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

XRD: X Ray Difraccion o Difracción de Rayos X.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Haidary J, Al-Haidari M, Qrunfuleh S.** Effect of yttria addition on mechanical, physical and biological properties of bioactive MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glass ceramic. *Biomed Mater.* 2008 Mar;3(1):15005.
- Andersson Ö. H., Liu G., Karlsson K. H., Niemi L., Miettinen J., and Juhanoja J.:** "In Vivo Behavior of Glasses in the SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅-Al₂O₃-B₂O₃ System," *J. Materials Sci., Materials in Medicine.* 1990; 1, 4 219-227.
- Andersson, O.** PhD thesis. Abo Akademi University, Finland, 1990.
- Andrade A L, Valerio P, Goes A M, Fatima Leite M D and Domingues R Z**
Influence of morphology on *in vitro* compatibility of bioactive glasses. 2006 *J. Non-Cryst. Solids* 352 3508–11.
- Andrew H, Crenshaw, Jr.** Técnicas y vías de abordaje quirúrgicas. En: Ferry canales S, editor. *Campbell Cirugía Ortopédica. Tomo I.* Madrid: Harcourt Brace SA, 1998; p. 43-47.
- Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA.** Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop.* 1996; (329): 300-309.
- Bagambisa FB, Joos U, Schilli W:** Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res*,1993;8:1047-11055
- Bandyopadhyay-Ghosh S, Reaney IM, Brook IM, Hurrell-Gillingham K, Johnson A, Hatton PV.** In vitro biocompatibility of fluorcanasite glass-ceramics for bone tissue repair. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Jan;80(1):175-83
- Barralet, J., Knowles, J. C., Best, S. M. and Bonfield,W.,** Thermal decomposition of synthesised carbonate hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.,* 2002, **13**, 529–533.

- 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(15): 1181-5.
- Bertrand B, Doyen A, Eloy P.** Triosite implants and fibrin glue in the treatment of atrophic rhinitis: technique and results. *Laryngoscope* 1996;106:652-7.
- Bessa PC, Casal M, Reis RLJ** Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *Tissue Eng Regen Med.* 2008 Mar-Apr;2(2-3):81-96.
- Blokhuis TJ, Wippermann BW, den Boer FC, et al.** Resorbable calcium phosphate particles as a carrier material for bone marrow in an ovine segmental defect. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51: 369-375.
- Blom EJ, Verheij JG, de Bleeck-Hogervorst JM, Di Silvio L, Klein CP.** Cortical bone ingrowth in growth hormone-loaded grooved implants with calcium phosphate coatings in goat femurs. *Biomaterials.* 1998 Jan-Feb;19(1-3):263-70.
- Bonfield, W., Grynpas, M. D.&Young, R. J.,** *J. Biomechanics*, 11 (1978) 473.
- Bouler J-M, Trecant M, Delecrin J, Royer J, Passuti N, Daculsi G.** Macroporous biphasic phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J Biomed Mater Res* 1996;32:603-9.
- Boyan B. D., McMillan J., Lohmann C. H., Ranly D. M., Schwartz Z.,** "Bone Graft Substitutes: Basic Information for Successful Clinical Use with Special Focus on Synthetic Graft Substitutes"; pp. 231-259 in *Bone Graft Substitutes*. Edited by Cato T. Laurencin. Published/Created: W. Conshohocken, PA : ASTM International, U. S. A., 2003.

- Boyce T, Edwards J, Scarborough N.** Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 571-581.
- Bucholz R. W.,** "Clinical Issues in the Development of Bone Graft Substitutes in Orthopedic Trauma Care"; pp. 289-297 in *Bone Graft Substitutes*. Edited by Cato T. Laurencin. Published/Created: W. Conshohocken, PA : ASTM International, U. S. A., 2003.
- Bunte N., V. Strunz, U.M. Gross, H. Bromer, and K. Deutscher,** "Vergleichende Untersuchungen über die Haftung Verschiedenen Implantatmaterialien im Knochen," *Dtsch. Zahnärztl. Z.*, 32,825-828 (1977).
- Burwell RG:** The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop* 1985;200:125-141.
- Byrd H, Hobar P, Shewmake K.** Augmentation of the craniofacial skeleton with porous hydroxyapatite granules. *Plast Recon Surg* 1993;91:15-22.
- Cabañas M.V. and Vallet-Regí M.:** Calcium phosphate coatings deposited by aerosol chemical vapour deposition. *J. Mater. Chem.* 2003. 13, 1104-1107.
- Canalis E. McCarthy TL, Centrella M,** Cyclic AMP induces insulin-like growth factor I synthesis in osteoblast-enriched cultures. *J Biol Chem.* 1990 Sep 15;265(26):15353-6.
- Cassidy C, Jupiter JB, Cohen M, et al:** Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radius fractures: A randomized study. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:2127-2137.
- Chapman M. W., Bucholz R. and Cornell C.** Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material: a randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79: 495-502.

- Chappard D., Fressonnet C., Genty C., Baslé M.F., Rebel A.** Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials*. 1993. 14. 7. 507-512.
- Charnley J.** Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br*. 1960 Feb;42-B:28-30
- Clark A. E., Kim C. Y., West J. K., Wilson J., and Hench L. L.,** "Reactions of Fluoride and Nonfluoride Containing Bioactive Glasses"; p. 73 in *Handbook of Bioactive Ceramics*, Vol I. Edited by T. Yamamuro, J. Wilson and L. L. Hench. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- Clark A. E., Pantano C. G. and Hench L. L.,** "Auger Spectroscopic Analysis of Bioglass Corrosion Films," *J. Amer. Ceram. Soc.*, 59 [1-2] 37-39 (1976).
- Clupper D C, Mecholsky J J Jr, Latorre G P and Greenspan D** Sintering temperature effects on the *in vitro* bioactive response of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in Tris buffer. 2001 *J. Biomed. Mater. Res*. 57 532-40 .
- Cockin J.** Autologous bone grafting: complications at the donor site. *J Bone Joint Surg Br*. 1971; 53:153-153.
- Coetzee AS.** Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate. *Arch Otolaryngol*. 1980 Jul;106(7):405-9.
- Constantz B.R., Ison I.C., Fulmer M.T., and cols:** Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*. 1995. 267,1796-1799.
- Cordero J.** Biomateriales. En: Fernandez Portal L. *Actualizaciones en cirugía ortopédica y traumatología*. Barcelona: Masson, 2000; p3-14.
- Cornell CN, Lane JM, Chapman M, et al:** Multicenter trial of Collagraft as bone graft substitute. *J Orthop Trauma* 1991;5:1-8.

- Cornell CN.** Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 591-598.
- Croes EA, Jansen GH, Lemstra AW, Frijns CJ, van Gool WA, van Duijn CM.** The first two patients with dura mater associated Creutzfeldt-Jakob disease in the Netherlands. *J Neurol.* 2001 Oct;248(10):877-80.
- Daculsi G., Passuti N.** Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1990. 11. 86-88.
- Dailiana Zoe H, MD, George Shiamishis, MD, Dimitra Niokou, MD, Elli Ioachim, MD, and Konstantinos N. Malizos, MD.** Heterotopic neo-osteogenesis from vascularized periostium and bone grafts. *The J Trauma.* 2002; 53: 934-938.
- Damien C. J., Parsons J. R., Benedict J. J., and Weisman D. S.,** "Investigation of a Hydroxiapatite and Calcium Sulfate Composite Supplemented with an Osteoinductive Factor", *J Biomed Mat Res*, Vol. 24, 1990, pp. 639-654.
- de Groot K:** Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption, and strength of calcium phosphate ceramics. *Ann NY Acad Sci* 523:227-233, 1988.
- Doherty M, Schlag G, Schwarz M, Mollan R, Nolan P, Wilson D.** Bio and compatability of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials* 1994;15(8):601-7.
- Douglas R. W., and El-Shamy T. M.,** Reactions of Glasses with Aqueous Solutions," *J. Amer. Ceram. Soc.*, 50 [1] 1-8 (1967).
- Dressmann H.** Uber knocken plombierung. *Beitr Klin Chir* 1892; 9: 804-807.
- Driessens FC.** Physiology of hard tissues in comparison with the solubility of synthetic calcium phosphates. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;523:131-6. Review.

Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. Clin Orthop Relat Res. 2000 Feb;(371):38-45. Review.

El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM: Porous bioactive glass and hydroxyapatite ceramic affect bone cell function in vitro along different time lines. J Biomed Mater Res, 1997;36:167-180

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 Mar;57(2):237-52.

Frankenburg EP, Goldstein SA, Bauer TW, Harris SA, Poser RD. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. J Bone Joint Surg Am. 1998 Aug;80(8):1112-24.

Frayssinet P., Gineste L., Conte P. and cols: Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. Biomaterials. 1998. 19, 11-12, 971-977.

Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ. Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. Orthop Clin North Am. 1999; 30: 583-588.

Galgut PN, Waite IM, Tinkler SM. Histological investigation of the tissue response to hydroxyapatite used as an implant material in periodontal treatment. Clin Mater. 1990;6(2):105-21.

- Galian Cánovas A.** Respuesta biológica del hueso al compuesto Hidroxiapatita-Colágeno. Estudio morfológico y ultraestructural "Tesis Doctoral", Murcia, Universidad de Murcia, 1995.
- Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D:** Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated dhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res*,1998;40:48-56.
- García Novalvos A.** Ultraestructura de la respuesta ósea frente al implante del poliéster PLA 85 GA 15 y estudio cromatográfico de su degradación "Tesis Doctoral", Murcia, Universidad de Murcia, 1990.
- Gazdag A, Lane J, Glaser D, Forters R.** Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995;3:1-8.
- Gil-Albarova J, Salinas AJ, Bueno-Lozano AL, Román J, Aldini-Nicolo N, García-Barea A, Giavaresi G, Fini M, Giardino R, Vallet-Regí M.** The in vivo behaviour of a sol-gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials*. 2005 Jul;26(21):4374-82.
- Gil-Albarova J, Garrido-Lahiguera R, Salinas AJ, Román J, Bueno-Lozano AL, Gil-Albarova R, Vallet-Regí M.** The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(19):4639-45.
- Gómez Barrera E, Rodríguez Macías MJ.** Recubrimiento de hidroxiapatita. En: Vallet M, Munuera L, editor. *Biomateriales: aquí y ahora*. Madrid: Dykinson SL, 2000; p97-106.

Gouin F., Passuti N., Verrielle V., Delécrin J. and Bainvel J.V. Histological features of large bone allografts. *J Bone Joint Surg.*, 1996, 78B, 38-41.

Gross U. and Strunz V., "The Interface of Various Glasses and Glass-Ceramics with a Bony Implantation Bed," *J. Biomed. Mater. Res.*, 19 251 (1985).

Gross U., Kinne R., Schmitz H. J, Strunz V., "The Response of Bone to Surface Active Glass/Glass-Ceramics," *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 4 2 (1988).

Gross UM, Strunz V. The anchoring of glass ceramics of different solubility in the femur of the rat. *J Biomed Mater Res.* 1980 Sep;14(5):607-18.

Hak J. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg* 2007;15:525-536.

Hench L. L. and Wilson J. W., "Surface-Active Biomaterials," *Science*, 226 630 (1984).

Hench L. L., Clark A. E., "Adhesion to Bone"; Chapt. 6 in *Biocompatibility of Orthopedic Implants*, Vol 2. Edited by D. F. Williams. CRC Press, Boca Raton, FL, 1982.

Hench L. L., Clark D. E., "Physical Chemistry of Glass Surfaces," *J. Non-Cryst. Solids*, 28 83 (1978).

Hench L. L., Paschall H. A., "Direct Chemical Bonding Between Bio-Active Glass-Ceramic Materials and Bone." *J Biomed. Mater. Res. Symp.*, 4 25-42 (1973).

Hench L. L., Splinter R. J., Allen W. C, and. Greenlee T. K, Jr., "Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials" *J. Biomed. Mater. Res.*, **2** [1] 117-141 (1972).

Hench L. The story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med* (2006) 17:967–978.

Hench L.L.: *Curr Opin. Sol-gel materials for bioceramic applications. Solid State Mater Sci.* 1997: 60, 4.

Hijón N.; Cabañas M.V.; Izquierdo-Barba I, and cols: Bioactive carbonate-hydroxyapatite coatings deposited onto Ti6Al4V substrate. *Chem. Mater.* 2004. 16, 1451-1455.

Hsu, Y.H., Turner, I.G. and Miles, A.W. Fabrication of Porous Bioceramics with Porosity Gradients Similar to the Bimodal Structure of Cortical and Cancellous Bone, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, (2008) 18: 2251–2256.

Hu RW, Bohlman HH. Fracture at the iliac bone graft harvest site after fusion of the spine. *Clin Orthop.* 1994; 309: 208-213.

Hulbert S. F., Bokros J. C., Hench L. L., Wilson J., and Heimke G., "Ceramics in Clinical Applications, Past, Present and Future"; pp. 189-213 in *High Tech Ceramics*. Edited by P. Vincenzini. Elsevier Science Pub. B.V., Amsterdam, 1987.

Hyakuna K, Yamamuro T, Kotoura Y, Kakutani Y, Kitsugi T, Takagi H, Oka M, Kokubo T. The influence of calcium phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. *J Biomed Mater Res.* 1989 Sep;23(9):1049-66.

Ito G, Matsuda T, Inoue N y Kamegai T: A histological comparison of the tissue interface of bioglass and silica glass. *J Biomed Mater Res*, 1987;21:485-497.

James F. Trotter, MD. Transmission of hepatitis C by implantation of a processed bone graft. *The Journal of Bone and Joint Surgery. JBJS. org.* Vol 85-A. Number 11. November 2003: 2215-2217.

Jantzen C. M., Polodinec M. J., and Wicks G. G., p. 491 in *Advances in Ceramics*, Vol 8. Edited by G. G. Wicks and W. A. Ross WA. Amer. Ceramic Soc., Columbus, OH, 1984.

Jarcho M, Bolen CH, Thomas MB, Bobick J, Kay J. Hydroxyapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *J Mater Sci* 1976; 11: 2027-2035.

Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981;157:259-78.

Johnson A, Shareef MY, van Noort, Walsh JM. The effect of furnace type and sintering conditions on the biaxial flexural strength of a canasite glass-ceramic. *Dent Mater* 2000;14:280-4.

Kay JF. Bioactive surface coatings for hard tissue biomaterials. In: *CRC handbook of bioactive ceramics*, vol. 2, 1990. p. 111-22.

Kim C. Y., Clark A. E. and Hench L. L., "Early Stages of Calcium-Phosphate Layer Formation in Bioglasses," *J. Non-Cryst. Solids*, 113 195-202 (1989).

Kim H.M. : Bioactive ceramics: Challenges and perspectives. *J. Ceram. Soc. Jpn.* 2001. 109 (4), S49-S57.

Kitsugi T, Yamamuro T, Kokubo T. Bonding behavior of a glass-ceramic containing apatite and wollastonite in segmental replacement of the rabbit tibia under load-bearing conditions. *J Bone Joint Surg Am.* 1989 Feb;71(2):264-72.

Kitsugi, T., Yamamuro. T., Nakamura, T., Hayashi. S., Kakutani. Y. Hyakuna. K., Ito, S., Kokubo. T., Takagi, M. and Shibuya, T.. Bone bonding behavior of three kinds of apatite-containing glass-ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 1986, 20, 1295-1307

Kocialkowski A, Wallace WA, Prince HG. Clinical experience with a new artificial bone graft: preliminary results of a prospective study. *Injury.* 1990 May;21(3):142-4.

Kokubo T, Ito S, Shigematsu M and Sakka S Mechanical properties of a new type of apatite-containing glass-ceramic for prosthetic application *J. Mater. Sci. Eng.* 1985 20 2001-4

Kokubo, T. Bioactive glass ceramic: properties and applications. *Biomaterials* 1991, Vol 12 March: 155-162.

Kokubo, T. *J.Nono-Cryst. Sol.*, 120 (1990) 138

Kokubo, T., Shigematsu, M., Nagashima, Y., Tashiro, M., Nakamura, T., Yamamuro, T., and Higashi, S., Apatite and wollastonite containing glass-ceramics for prosthetic application, *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, 60, 260, 1982.

Kokubo. T., Hayashr, T., Sakka. S., Kitsugr, T. and Yamamuro. T. Bonding between bioactive glasses, glass ceramics or ceramics In simulated body fluid, *Yogyo-Kyokai-Sh/ 1987, 95. 785-791*

Kotoura Y., T. Yamamuro, J . Shikata, Y. Kakutani, T. Kitsugi, K. Hyakuna, and H. Tanaka, "Cytotoxicity of ceramic materials," *Ortop. Res. Sci.*, 13, 633-635 (1986).

Lax 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.

Le Geros R. F., Bone G. and Le Geros R., "Type of H₂O in Human Enamel and in Precipitated Apatites," *Calcif. Tissue Res.*, 26 111 (1978).

Le Geros, R. Z., Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite. *Nature*, 1965, **205**, 403-404.

Leonardi E, Ciapetti G, Baldini N, Novajra G, Verné E, Baino F, Vitale-Brovarone C. Response of human bone marrow stromal cells to a resorbable P(2)O(5)-SiO(2)-CaO-MgO-Na(2)O-K(2)O phosphate glass ceramic for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2009 Jul 17.

Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater.* 1991 Winter;2(4):231-9.

- Matsuoka H, Akiyama H, Okada Y, Ito H, Shigeno C, Konishi J, Kokubo T, Nakamura T.** In vitro analysis of the stimulation of bone formation by highly bioactive apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic: released calcium ions promote osteogenic differentiation in osteoblastic ROS17/2.8 cells. *J Biomed Mater Res.* 1999 Nov;47(2):176-88.
- Moore WR, Graves SE, Bain GI.** Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001 Jun;71(6):354-61.
- Muñoz J.** Aislamiento y cultivo de células de estirpe osteoblástica: cinética de crecimiento sobre cerámica de hidroxapatita. "Tesis Doctoral", Murcia, Universidad de Murcia, 1999.
- 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): 250-260.
- Nakamura T, Yamamuro T, Higashi S, Kokubo T, Ito S.** A new glass-ceramic for bone replacement: evaluation of its bonding to bone tissue. *J Biomed Mater Res.* 1985 Jul-Aug;19(6):685-98.
- Nakamura T, Yamamuro T, Higashi S, Kokubo T, Ito S.** A new glass-ceramic for bone replacement: evaluation of its bonding to bone tissue. *J Biomed Mater Res.* 1985 Jul-Aug;19(6):685-98.
- Neo M, Kotani S, Fujita Y, Nakamura T, Yamamuro T, Bando Y, Ohtsuki C, Kokubo T:** Differences in ceramic-bone interface between surface-active ceramics and resorbable ceramics: a study by scanning and transmission electron microscopy. *J Biomed Mater Res,* 1992;26:255-267.

Ogino M., Ohuchi F. and Hench L. L., "Compositional Dependence of the Formation of Calcium Phosphate Films on Bioglass," *J. Biomed. Mater. Res.*, 14 55-64 (1980).

Ohura, K., Nakamura. T., Yamamuro. T., Kokubo, T., Ebisawa, Y., Kotoura, Y. and Oka, M., Bone bonding ability of P₂O₅-free CaO.SiO glasses, *J. Biomed. Mater. Res.*

Okada Y, Kobayashi M, Neo M, Kokubo T, Nakamura T. Ultrastructure of the interface between bioactive composite and bone: comparison of apatite and wollastonite containing glass-ceramic filler with hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate fillers. *J Biomed Mater Res.* 2001 Oct;57(1):101-7.

Ono K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. Mechanical properties of bone after implantation of apatite-wollastonite containing glass ceramic-fibrin mixture. *J Biomed Mater Res.* 1990 Jan;24(1):47-63.

Ono K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. Mechanical properties of bone after implantation of apatite-wollastonite containing glass ceramic-fibrin mixture. *J Biomed Mater Res.* 1990 Jan;24(1):47-63.

Ono K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. Quantitative study on osteoconduction of apatite-wollastonite containing glass ceramic granules, hydroxyapatite granules, and alumina granules. *Biomaterials.* 1990 May;11(4):265-71.

Oonishi H, Kushitani S, Iwaki H, Sakai K, Ono H. Long-term clinical results of using HAP in revision of total hip replacement involving massive bone defects in the acetabulum. *Bioceramics* 1992; 8: 157-162.

Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T: Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop*, 1997; 334: 316-325.

Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br.* 1999 ; 81 : 333-335.

Pelker RR, Friedlaender GE. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin North Am.* 1987; 18: 235-239.

Pinholt EM, Solheim E, Bang G, Sudmann E. Bone induction by composites of bioresorbable carriers and demineralized bone in rats: a comparative study of fibrin-collagen paste, fibrin sealant, and polyorthoester with gentamicin. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Dec; 50(12): 1300-4.

Price N, Bendall SP, Frondoza C, Jinnah RH, Hungerford DS: Human osteoblast-like cells (MG63) proliferate on a bioactive glass surface. *J Biomed Mater Res*, 1997; 37: 394-400.

Rámila A.; Padilla S., Muñoz B. and cols.: A new hydroxyapatite/glass biphasic materials: in vitro bioactivity. *Chem. Mater.* 2002. 14, 2439-2443.

Ransford AO, Morley T, Edgar MA, et al. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. A prospective, randomised study of 341 patients. Published erratum appears in *J Bone Joint Surg Br.* 1998; 80: 562. *J Bone Joint Surg Br.* 1998; 80: 13-18.

Ravaglioli A, Krajewski A. *Bioceramics, materials, properties, applications.* London: Chapman & Hall; 1992.

- Rawlings RD.** Bioactive glasses and glass-ceramics. *Clin Mater.* 1993;14(2):155-79.
- Rehman I, Hench LL, Bonfield W, Smith R.** Analysis of surface layers on bioactive glasses. *Biomaterials.* 1994 Aug; 15(10): 865-70.
- Rocha Barros VM, Salata LA, Sverzut CE, Xavier SP, van Noort R, Johnson A, Hatton PV.** In vivo bone tissue response to a canasite glass-ceramic. *Biomaterials.* 2002 Jul;23(14):2895-900.
- Rocha Barros VM, Liporaci JL Jr, Rosa AL, Junqueira MC, de Oliveira PT, Johnson A, van Noort R.** Bone response to three different chemical compositions of fluorcanasite glass-ceramic. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Nov;83(2):480-3.
- Ros MJ.:** Cerámica de biovidrio 58S como vector biodegradable de liberación controlada de gentamicina. Estudio experimental “in vivo” en conejos. Tesis doctoral, Departamento de cirugía, pediatría, ginecología y obstetricia. Murcia, 2006
- 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.
- Salama R, Weissman SL:** The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow: A preliminary report. *J Bone Joint Surg Br* 1978;60:111-115.
- Sandhu HS, Grewal HS, Parvateneni H.** Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 685-698.

- Santonja Medina F.** Comparación de la respuesta ósea ante el implante de los poliésteres PLA 85, GA 15, PLA 96: Estudio histológico, radiológico y cromatográfico. "Tesis Doctoral", Murcia, Universidad de Murcia, 1990.
- Sassard WR, Eidman DK, Gray PM Jr, et al.** Augmenting local bone with Grafton demineralised bone matrix for posterolateral lumbar spine fusion: avoiding second site autologous bone harvest. *Orthopedics*. 2000; 23: 1059-1065.
- Schachar NS, Henry WB Jr, Wadsworth P, et al:** Fate of massive osteochondral allografts in a feline model, in Friedlaender GE, Mankin HJ, Sell KW (eds): *Osteochondral Allografts: Biology, Banking, and Clinical Applications*. Boston: Little Brown, 1981, pp 81-101.
- Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R.** Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabilitation* 1991; 18: 439-452.
- Schneider A, Taboas J. M., McCauley L. K., Krebsbach P. H.** Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res* 2003; 21: 859-64.
- Shinzato S, Nakamura T, Tamura J, Kokubo T, Kitamura Y.** Bioactive bone cement: effects of phosphoric ester monomer on mechanical properties and osteoconductivity. *J Biomed Mater Res*. 2001 Sep 15;56(4):571-7.
- Sim FH, Frassica FJ:** Use of allografts following resection of tumors of the musculoskeletal system. *Instr Course Lect* 1993;42:405-413.
- 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.

Strand Z. Role of the glass phase in bioactive glass-ceramics. *Biomaterials*. 1992;13(5):317-21.

Tseng SS, Lee MA, Reddi AH. Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 Suppl 1:92-8.

Tsugura E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kubokin Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997;121:317-24.

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.

Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W. The use of ceramics for bone replacement. *J Bone Jt Surg* 1984;66-B:269-75.

Urist, M. R. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150: 893, 1965.

Vallet-Regí M. and González-Calbet J.: Calcium phosphates in the substitution of bone tissue. *Review Progress in Solid State Chemistry*. 2004.32, 1-31.

Vallet-Regí M. Cerámicas. En: Vallet M, Munuera L, editor. *Biomateriales: aquí y ahora*. Madrid: Dykinson SL, 2000; p78-79.

Vallet-Regí M., Ragel C.V., Salinas A.J.: Glasses with medical applications. *Microreview*. 2003; *Eur. J. Inor. Chem.* 6, 1029-1042.

Vallet-Regí M.: Ceramics for medical applications. *Perspective Article. J. Chem. Soc. Dalton Trans*. 2001; 02, 97-108.

Vallet-Regí M.; Salinas A.J.; Ramírez-Castellanos J. and cols.: Nanostructure of bioactive sol-gel glasses and organic-inorganic hybrids. *Chem. Mater.* 2005. 17, 1874-1879.

Vallet-Regí, M. "Introduction to the world of biomaterials". *Anales de Química. International Edition. Suplemento 1 vol.1997.* 93.1, S6-S14.

Vargas GE, Mesones RV, Bretcanu O, López JM, Boccaccini AR, Gorustovich A. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos. *Acta Biomater.* 2009 Jan;5(1):374-80.

Vehmeier S, Wolkenfelt J, Deijkers R, Petit P, Brand R. and Bloem R. Bacterial contamination in post-mortem bone donors. *Acta Orthop Scand* 2002; 73 (6): 678-683.

Vitale-Brovarone C, Baino F, Miola M, Mortera R, Onida B, Verné E. Glass-ceramic scaffolds containing silica mesophases for bone grafting and drug delivery. *J Mater Sci Mater Med.* 2009 Mar;20(3):809-20.

Vitale-Brovarone C, Baino F, Verné E. Feasibility and Tailoring of Bioactive Glass-ceramic Scaffolds with Gradient of Porosity for Bone Grafting. *J Biomater Appl.* 2009 May 18.

Vitale-Brovarone C, Verné E, Robiglio L, Appendino P, Bassi F, Martinasso G, Muzio G, Canuto R. Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. *Acta Biomater.* 2007 Mar;3(2):199-208.

Vitale-Brovarone, C., Baino, F. and Verne', E.. High Strength Bioactive Glass-ceramic Scaffolds for Bone Regeneration, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, (2009) 20: 643–653.

Vrouwenvelder WC, Groot CG, de Groot K: Better histology and biochemistry for osteoblasts cultured on titanium,-doped bioactive glass: bioglass 45S5 compared with iron-, titanium-,fluorine- and boron-containing bioactive glasses. *Biomaterials*, 1994;15:97-106.

Wang, Y., Zhang, S., Zeng, X., Ma, L. L., Weng, W., Yan, W. and Qian, M., Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings. *Acta Biomater.*, 2007, 3, 191–197.

Wildemann B, Kadow-Romacker A, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *J Biomed Mater Res A*. 2007 May;81(2):437-42.

Wilson J., and Nolletti D., "Bonding of Soft Tissues to Bioglass®," in *Handbook of Bioactive Ceramics*. Edited by T. Yamamuro, L. L. Hench, and J. Wilson. CRC Press, Boca Raton, FL (1990).

Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(2):115-21.

Wintermantel E, Suk-Woo H. *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. Implantate für Medizin und Umwelt. Gebundene Ausgabe.* Berlin: Springer; 1998.

Xin R, Zhang Q, Chen J, Leng Y. Effects of porosity and crystallinity of glass ceramics on the in vivo bioactive response. *Biomed Mater.* 2008 Dec;3(4):41001.

Yamamuro T: Bone-bonding behavior and clinical use of A-W glass-ceramic. En: Bone grafts, derivatives bone substitutes. Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG, ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1994;245-259.

Zerwekh J. E., Kourosch S. and Scheinberg R. Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *J Orthop Res.* 1992; 10: 562-572.

Ziegler J, Anger D, Krummenauer F, Breitig D, Fickert S, Guenther KP. Biological activity of recombinant human growth factors released from biocompatible bone implants. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Jul;86(1):89-97.

