

Evaluación histológica y mediante microscopía electrónica de retrodispersión (M.E.R) de la suplementación de colágeno en soporte de cemento y microesferas de hidroxapatita para mejorar su efecto osteoconductor

Erika Silva Cuzmar

Director: Jordi Franch Serracanta

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD ANIMALES

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMALES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

NOVIEMBRE 2013

Memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria
Erika Silva Cuzmar
Para optar al título de Doctor en Medicina y Sanidad Animales

Facultad de Veterinaria
Universidad Autónoma de Barcelona
Noviembre 2013

D. JORDI FRANCH SERRCANTA, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación titulado *“Evaluación histológica y mediante microscopía electrónica de retrodispersión (M.E.R) de la suplementación de colágeno en soporte de cemento y microesferas de hidroxapatita para mejorar su efecto osteoconductor”* realizado por la licenciada **Erika Silva Cuzmar** y dirigida por mí, reúne los requisitos científicos y formales necesarios para proceder a su defensa como tesis doctoral..

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Bellaterra a 18 de Noviembre de 2013

Fdo. Jordi Franch Serracanta

Agradecimientos

Agradezco al Doctor Jordi Franch, profesor titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su apoyo incondicional en todos los aspectos de este largo camino que fue hacer esta tesis doctoral, asimismo agradezco a cada uno de los miembros de nuestro equipo y de nuestro despacho por su apoyo, cariño y amistad.

Agradezco a la Doctora Cristina Manzanares, profesor titular del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona y a todo su equipo por su asesoramiento científico y su colaboración en el aprendizaje del proceso laboratorial de mi investigación.

Agradezco a la Doctora María Pau Ginebra, profesora titular del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universidad Politécnica de Catalunya, y a todo su equipo por su asesoramiento científico y especialmente por el suministro de los materiales de implantación usados en esta investigación.

Agradezco especialmente a Oscar Melo, profesor asociado del Departamento de Estadística de la Universidad Nacional de Colombia por su paciencia y desinteresada disponibilidad de tiempo para ayudarme a realizar el análisis estadístico de este trabajo.

Agradezco también a todos los profesores, funcionarios, alumnos y ex-alumnos de la Facultad de Veterinaria de la UAB que me ayudaron a llevar a cabo los distintos apartados de la tesis.

Finalmente agradezco a mi familia real, mi querido Clan Cuzmar, como a mi familia adoptiva en Barcelona, Ale, Vivi y Maty, a mi compañero Toni Catalán y a su familia y a todos los amigos que me acompañaron, por estar siempre presentes en todos los momentos en que necesité el cariño y el apoyo para salir adelante y lograr los objetivos de este largo camino.

Índice

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	5
2.1 Antecedentes generales	7
2.2 Estructura del hueso	8
2.3 Osteogénesis	13
2.4 Remodelación ósea	14
2.5 Consolidación ósea	16
2.6 Historia de los injertos óseos	19
2.7 Funciones de un injerto óseo	21
2.8 Tipos de injertos óseos	22
2.9 Biocerámicas	25
2.10 Cementos de Fosfato de Calcio	27
2.11 Microesferas de Hidroxiapatita	31
2.12 Colágeno	32
3. Planteamiento del problema, hipótesis de trabajo y objetivos	35
3.1 Planteamiento del problema	37
3.2 Hipótesis de trabajo	38
3.3 Objetivos	38
4. Materiales y métodos	39
4.1 Materiales	41
4.1.1 Autorización del procedimiento experimental	41
4.1.2 Animales	42
4.1.3 Materiales de implantación	43
4.1.3.1 Cemento de fosfato de calcio	43
4.1.3.2 Cemento de fosfato de calcio más colágeno	44

Índice

4.1.3.3 Microesferas de hidroxiapatita	44
4.1.3.4 Microesferas de hidroxiapatita más colágeno	44
4.2 Métodos	45
4.2.1 Método preoperatorio	45
4.2.2 Método operatorio	45
4.2.3 Método postoperatorio inmediato	49
4.2.4 Método de supervisión posopeartoria de los animales	49
4.2.5. Eutanasia	51
4.2.6 Método laboratorial	51
4.2.6.1 Preparación de las muestras para M.E.R.	51
4.2.7 Obtención de imágenes de las muestras mediante M.E.R.	54
4.2.7.1 Método de evaluación semicuantitativa de las imágenes	54
4.2.7.2 Método de evaluación histomorfométrica de las imágenes	56
4.2.8 Método laboratorial para el análisis histológico de la muestras	58
4.2.8.1 Método de evaluación cualitativa de las muestras de histología	59
4.3 Análisis estadístico	59
5. Resultados	61
5.1 Resultados clínicos y radiográficos	63
5.2 Resultados de la evaluación semicuantitativa de las imágenes	67
5.2.1 Resultados de la serie de muestras de 1 mes	68
5.2.1.1 Cemento de fosfato de calcio	68
5.2.1.2 Cemento de fosfato de calcio más colágeno	70
5.2.1.3 Microesferas de hidroxiapatita	73
5.2.1.4 Microesferas de hidroxiapatita más colágeno	75
5.2.1.5 Defecto vacío	77
5.2.2 Resultados de la serie de muestras de 3 meses	80
5.2.2.1 Cemento de fosfato de calcio	80

Índice

5.2.2.2	Cemento de fosfato de calcio más colágeno	83
5.2.2.3	Microesferas de hidroxiapatita	85
5.2.2.4	Microesferas de hidroxiapatita más colágeno	87
5.2.2.5	Defecto vacío	89
5.3	Resultados de la evaluación histomorfométrica de las imágenes	92
5.3.1	Resultados de la serie de muestras de 1 mes	92
5.3.1.1	Cemento de fosfato de calcio	92
5.3.1.2	Cemento de fosfato de calcio más colágeno	94
5.3.1.3	Microesferas de hidroxiapatita	96
5.3.1.4	Microesferas de hidroxiapatita más colágeno	98
5.3.1.5	Defecto vacío	100
5.3.1.6	Análisis comparativo	102
5.3.2	Resultados de la serie de muestras de 3 meses	106
5.3.2.1	Cemento de fosfato de calcio	106
5.3.2.2	Cemento de fosfato de calcio más colágeno	108
5.3.2.3	Microesferas de hidroxiapatita	110
5.3.2.4	Microesferas de hidroxiapatita más colágeno	112
5.3.2.5	Defecto vacío	114
5.3.2.6	Análisis comparativo	116
5.4	Resultados de la evaluación histológica de las imágenes	119
5.4.1	Cemento de fosfato de calcio	119
5.4.2	Cemento de fosfato de calcio más colágeno	121
5.4.3	Microesferas de hidroxiapatita	122
5.4.4	Microesferas de hidroxiapatita más colágeno	124
5.5	Resultados del análisis estadístico	125
6.	Discusión	127
6.1	Discusión de los resultados clínicos y radiográficos	129

Índice

6.2	Discusión de los resultados de la evaluación semicuantitativa de las imágenes	132
6.2.1	Discusión de resultados de la serie de muestras de 1 mes	133
6.2.2	Discusión de resultados de la serie de muestras de 3 meses	136
6.3	Discusión de resultados de la evaluación histomorfométrica de las imágenes	140
6.3.1	Discusión de resultados de la serie de muestras de 1 mes	140
6.3.2	Discusión de resultados de la serie de muestras de 3 meses	145
6.4	Resultados de la evaluación histológica de las imágenes	149
6.5	Discusión de los resultados del análisis estadístico	152
6.6	Discusión global de los resultados	153
7.	Conclusiones	155
8.	Bibliografía	159
9.	Resumen	169

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

La necesidad de contar con un injerto óseo ideal, que aporte las características biológicas y mecánicas requeridas para una correcta estimulación de la consolidación y sustitución de la masa ósea, ha sido objeto de estudio de una amplia gama de disciplinas médicas desde el siglo XVIII. El injerto de hueso esponjoso autólogo, es el único tipo de injerto que además de la osteoconducción, es decir, la formación de una red tridimensional que actúa como soporte físico de la neoformación ósea, entrega factores osteogénicos biológicos que aseguran por un lado la repoblación celular del defecto óseo, y por otro, la estimulación de la consolidación mediante factores de crecimiento y otros elementos bioactivos, lo que significa que impulsa la regeneración activa del hueso. Sin embargo, el injerto esponjoso autólogo fresco presenta también algunas importantes deficiencias, tales como, la baja capacidad mecánica inmediata para soportar cargas, limitada disponibilidad y la necesidad de otra intervención quirúrgica, con los consiguientes riesgos asociados. Esta problemática es la que ha determinado la investigación en el desarrollo de materiales sintéticos que puedan ser usados como injertos óseos. De esta manera, se ha desarrollado una gran gama de materiales con propiedades osteoconductoras que han sido utilizados como sustitutos óseos. Dentro de ellos, los fosfatos de calcio son uno de los más bastamente estudiados, debido a que su composición físico-química es similar a la del hueso, otorgándoles una excelente biocompatibilidad, bioactividad y biodegradabilidad.

Naturalmente, la disposición de los cristales de fosfato de calcio durante la osteogénesis está determinada entre otros factores por la estructura tridimensional formada por las moléculas de colágeno presentes en la matriz ósea que es calcificada. Es por ello que con el fin de crear una ruta biomimética a la osteogénesis, hemos propuesto, utilizar tanto fosfato de calcio como colágeno en la creación de nuevos materiales destinados al soporte de la regeneración ósea.

El método de fabricación de los fosfatos de calcio determina la solubilidad y distribución espacial del producto final lo que a su vez determina la utilización clínica a la cual puede ser sometido el material. Los cementos de fosfato de calcio, que corresponden a la mezcla de una fase polvo compuesta por distintos tipos de fosfatos de calcio más una fase líquida que generalmente es agua, tienen la capacidad de endurecerse a temperatura ambiente pasando por una fase de pasta moldeable que determina una excelente adaptabilidad del implante a su lecho. Sin embargo, su resistencia mecánica es limitada y no pueden ser usados en sitios de alta carga. Se ha demostrado que esta característica puede ser mejorada mediante la adición de fibras colágenas que aportan una mayor elasticidad a la mezcla aumentando la resistencia del cemento a las fuerzas a las cuales está sometido y por otro lado, podría darse una relación sinérgica entre las propiedades osteoconductoras de ambos

materiales. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue comprobar el efecto osteoconductor de la adición de colágeno a dos tipos distintos de soporte de hidroxiapatita.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Revisión Bibliográfica

2.1. Antecedentes generales

Si bien, antiguamente, la amputación era la forma de solucionar un gran número de patologías óseas que llevaban a la pérdida de masa ósea, especialmente en las extremidades, hoy en día, se prefiere preservar al máximo las estructuras anatómicas y buscar la restitución de su funcionalidad. Esta es la base sobre la que se sustenta la medicina regenerativa, especialidad multidisciplinaria cuyo principal objetivo es la creación y fabricación de sustitutos para material biológico.

El hueso es un tejido en continuo recambio, con una capacidad intrínseca de regeneración, que se observa a modo de renovación fisiológica, de crecimiento o de recambio activo como por ejemplo, en la reparación de sectores dañados o perdidos (Dimitriou y cols., 2011). En algunas circunstancias clínicas o patológicas, esta capacidad regenerativa propia puede ser insuficiente, no permitiendo la curación ósea espontánea y haciendo necesaria la utilización de algún material externo que aporte al hueso un soporte mecánico y biológico donde poder crecer (Lichte y cols., 2011). Algunos ejemplos donde el mecanismo de regeneración ósea puede ser insuficiente, son los casos de resecciones tumorales, pérdida de grandes superficies óseas por trauma, infección ósea, malas uniones, uniones retardadas, necrosis avasculares, osteoporosis, refuerzo de artrodesis y aumentos periprostésicos, entre otras situaciones clínicas comunes (Dimitriou y cols., 2011; Ragetly y Griffon, 2011). El uso de un injerto óseo sería entonces la forma de restituir la funcionalidad perdida mediante la estimulación o al menos la facilitación del crecimiento del hueso adyacente a un defecto, a medida que el material implantado es osteointegrado (Meseguer, 1996)

Actualmente, después de la sangre, el hueso es el tejido más abundantemente trasplantado. Algunos datos estadísticos han mostrado que se efectúan alrededor de 500.000 a 600.000 procedimientos de injertos óseos al año en Estados Unidos y sobre 2.2 millones en el mundo entero (Lewandrowski y cols., 2000). En Europa los procedimientos de injertos óseos aumentaron en un 50% en 3 años a partir del 2004, superando los 400.000 procedimientos al año (Blom, 2007). En Estados Unidos, aproximadamente, un 45% de los injertos óseos son de hueso autólogo, un 45% injertos alógenos y el 10% de los injertos óseos realizados corresponden a sustitutos óseos sintéticos. Estas cifras están aumentando de manera significativa en los últimos años (Blom, 2007; Vicario, 2003). En medicina veterinaria también se observa una

tendencia claramente creciente en su uso, tal y como ha sucedido en medicina humana. Los injertos óseos llevan utilizándose en veterinaria desde fines de la década de los 80 (Ragetly y Griffon, 2011)

2.2. Estructura del hueso

El hueso es un tejido conectivo especializado, que junto con el cartílago, tendones y ligamentos forma el sistema esquelético (Vicario, 2003). La principal función del hueso es la locomoción y sostén del organismo así como la protección de órganos internos. También podemos nombrar la función linfo-hematopoyética y la homeostasis y reserva mineral (Meseguer, 1996).

La función locomotora y protectora está dada por la formación de un esqueleto de material relativamente liviano con una gran resistencia a la deformación y absorción de fuerzas externas que permite el desplazamiento del organismo (Bayliss y cols., 2012)

La función hematopoyética se produce principalmente en los huesos largos que albergan en su interior la médula ósea, que corresponde a un tejido compuesto por una gran variedad de células de distintos linajes y niveles de diferenciación tales como células sanguíneas, linfáticas y especialmente células madres mesenquimales que pueden diferenciarse en tanto en células precursoras del linaje hematopoyético como óseo (Bayliss y cols., 2012)

La función de homeostasis mineral está dada por su constitución mineral que actúa como reservorio de calcio, fósforo y carbonatos, por lo tanto actúa como tampón ácido base y como regulador iónico (Bayliss y cols., 2012)

El tejido óseo es una estructura biomecánica formada por células especializadas rodeadas por una matriz mineralizada. Está constituido, fundamentalmente por un componente mineral (65%), por una matriz orgánica (33%) y por un componente celular (2%) (Meseguer, 1996; Miller, 2009)

La fracción inorgánica está compuesta por sales de calcio en la siguiente proporción; 85-90% fosfato de calcio, 8-10% carbonato de calcio 1,5% fosfato de magnesio y un 0.3% fluoruro de calcio. Estos minerales están dispuestos formando cristales de apatita, mayoritariamente hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que proporcionan al hueso la resistencia a la carga y a fuerzas compresivas.

La fracción orgánica de la matriz está compuesta por proteínas estructurales, mayoritariamente colágeno y otras proteínas denominadas generalmente como proteínas no colágenas. Hasta un 90% de las proteínas estructurales corresponden a colágeno tipo I, aunque también se ha detectado colágeno tipo III y V (Bayliss y cols., 2012; Lichte y cols., 2011).

El colágeno forma un micro esqueleto donde se depositan los cristales en forma ordenada. Este ordenamiento aporta cierta elasticidad al hueso permitiendo una mayor resistencia a las fuerzas de tracción que debe soportar el hueso (Bayliss y cols., 2012). Además, el colágeno es el andamiaje natural por donde migran los osteoblastos que formarán el hueso (Rocha y cols., 2002). El colágeno es sintetizado por los osteoblastos en forma de un precursor o tropocolágeno y es liberado al espacio extracelular donde es transformado en la molécula bioactiva que formará las fibras colágenas (Vicario, 2003). La molécula de colágeno está formada por 3 cadenas polipeptídicas, 2 cadenas α_1 idénticas entre sí y una α_2 , entrecruzadas de tal forma que su organización determina la superestructura del hueso (crosslink) (Figura 2.1). La molécula de colágeno forma y expone los sitios de unión para el resto de las proteínas del hueso que son las responsables del inicio y regulación de la calcificación y la comunicación entre la matriz y las células óseas (Meseguer, 1996).

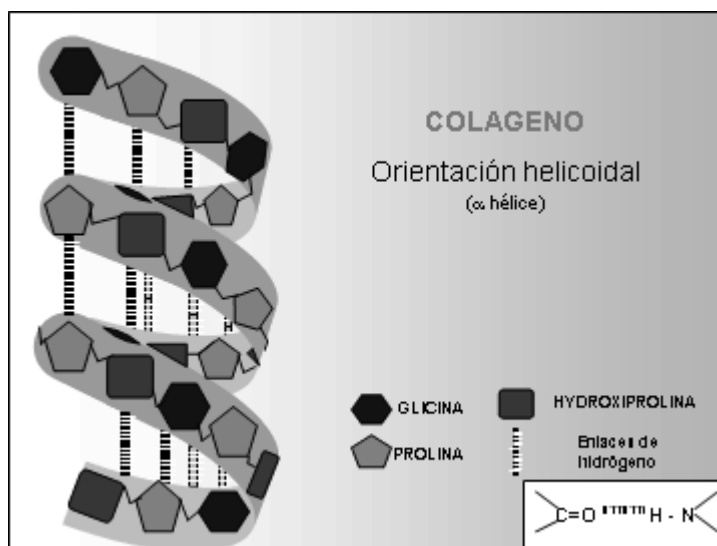


Figura 2.1: Molécula de colágeno

Entre las proteínas no-colágenas que controlan el proceso de mineralización ósea, la más importante es la osteocalcina que corresponde a un 1% de la matriz (Bradt y cols., 1999).

La osteocalcina es un péptido sintetizado exclusivamente por el osteoblasto, tiene afinidad por la hidroxiapatita y se ha visto que inhibe su síntesis *in vitro*, por lo tanto se cree que su función está relacionada con la elongación de los cristales y con el crecimiento óseo, sin alterar la reabsorción ósea (Ducy, 1996).

Otras proteínas no colágenas presentes en el tejido óseo y sus funciones se describen en la tabla 2.1

Tabla 2.1: Función de las proteínas no colágenas y factores de crecimiento (Fitzgerald y cols., 2004)

Proteína	Función
Osteocalcina	Estabilización de la hidroxiapatita Quimiotáctica para monocitos Regulación de la formación ósea
Osteonectina	Unión a calcio, apatita y proteínas de la matriz Modula la fijación celular
Glucoproteína α -2HS	Quimiotáctica para monocitos Mineralización por vesículas de la matriz
Proteína Gla de la matriz	Inhibe la mineralización de la matriz
Osteopontina	Fijación celular
Sialoproteína III ósea	Fijación celular
Fibronectina	Fijación celular Formación hidroxiapatita Mineralización
Factores de Crecimiento	Función
IGF- I, IGF - II	Diferenciación, proliferación y actividad de los osteoblastos
TGF – β	Inducción de hueso y cartílago en la osteogénesis y reparación de fracturas
BMPs	Inducción de formación hueso

Por otro lado, las células propias de hueso son los osteoblastos o células formadoras de hueso y los osteoclastos o células destructoras de hueso. Entre ambas células llevan a cabo los procesos de formación y reabsorción ósea que se mantienen activos durante toda la vida de un organismo.

Los osteoblastos pertenecen a la línea de células mesenquimales multipotenciales, su diferenciación se produce durante el desarrollo, pero también pueden diferenciarse bajo condiciones de estrés o daño óseo (Sumner-Smith, 1992). Son células cuboidales con citoplasma basofílico que se ubican en grupos alineados a lo largo de la superficie del hueso (Fitzgerald y cols., 2004; Sumner-Smith, 1992). Los osteoblastos tienen una alta tasa metabólica y son los responsables de la producción de las proteínas colágenas y no colágenas que darán lugar a la matriz ósea. También producen una serie de moléculas bioactivas y factores de crecimiento que

regulan en forma autocrina y paracrina al propio osteoblasto y otras células diana. Aproximadamente un 15% de los osteoblastos son rodeados por la matriz ósea al avanzar el crecimiento del hueso y se diferencian a osteocitos (Fitzgerald y cols., 2004).

Los osteocitos son las principales células del hueso maduro. Poseen una tasa metabólica mucho menor que los osteoblastos, pero aun así pueden producir algunas proteínas de la matriz. Su principal función es preservar la integridad de la matriz y liberar calcio desde el hueso cuando se incrementa su demanda (Sumner-Smith, 1992). Estas células poseen prolongaciones que forman una red de finos canalículos que recorren el hueso, por donde se comunican con otras células y reciben nutrientes (Hadjidakis y Androulakis, 2006).

Los osteoclastos son las células encargadas de la reabsorción ósea, derivan de las células hematopoyéticas del linaje fagocítico-mononuclear. Son células gigantes multinucleadas que se encuentran dentro de una laguna de resorción, o laguna de Howship, ubicada en la superficie ósea calcificada. Estas células tienen una alta tasa metabólica ya que sintetizan varias enzimas lisosómicas que reabsorben hueso por acidificación y proteólisis de la matriz ósea y encapsulan los cristales de hidroxiapatita. Su función está regulada localmente por citoquinas y sistémicamente por hormonas (Mills, 2007)

La estructura del hueso está organizada en varios niveles jerárquicos (Figura 2). A nivel anatómico o macroestructura podemos diferenciar el hueso cortical y el hueso trabecular o esponjoso. A nivel de microestructura (10-500 μm) podemos diferenciar osteonas o sistemas harvesianos y trabéculas. A nivel de submicroestructura (1-10 μm) podemos diferenciar lamelas. A nivel de nanoestructura (nanómetros – 1 μm) se encuentra la red de fibras de colágeno y otras proteínas infiltradas entre los cristales de hidroxiapatita y por último a nivel molecular o subnanoestructura se encuentran los elementos constituyentes puros como el tropocolágeno y nanocristales de hidroxiapatita (Figura 2.2) (Rho y cols., 1998)

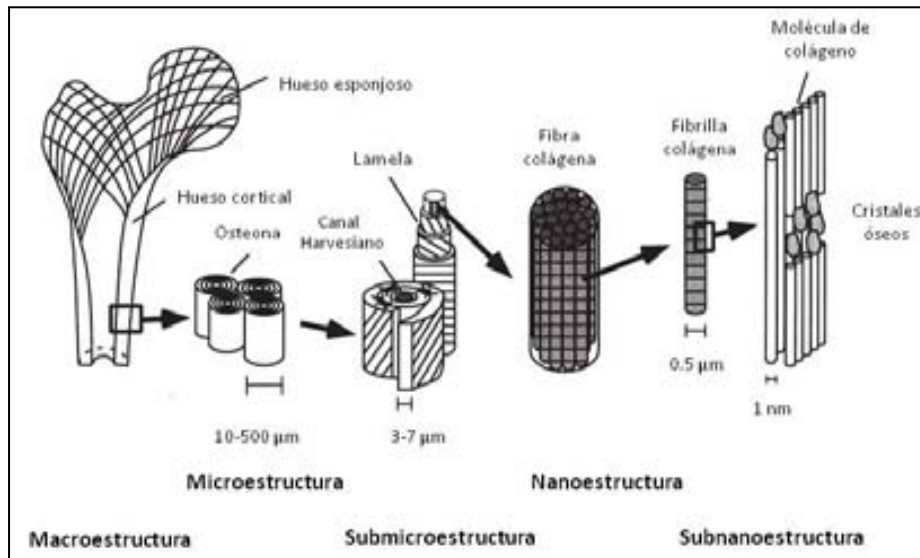


Figura 2.2: Organización jerárquica del hueso (Rho y cols., 1998)

El hueso cortical constituye el 80% del total del esqueleto y forma la parte externa de los huesos, posee una baja tasa de remodelación y una alta resistencia a la torsión y flexión, su función es principalmente mecánica y protectora, pero en déficits minerales prolongados, puede participar de la homeostasis metabólica (Hadjidakis y Androulakis, 2006). La estructura base del hueso cortical son las osteonas que corresponden a estructuras laminillares dispuestas concéntricamente a un conducto, denominado conducto de Havers, por donde reciben un flujo nutricional (Figura 2.3).

El hueso trabecular o esponjoso constituye el 20% restante y se encuentra dentro de las epífisis de los huesos largos, cuerpos vertebrales, pelvis y huesos planos. Este tipo de hueso está dispuesto en trabéculas organizadas de tal manera que forman cavidades en las que se ubica normalmente la médula ósea. Es un hueso menos denso, más flexible y participa activamente en la homeostasis metabólica dada su mayor tasa de recambio.

El hueso inmaduro recibe el nombre de hueso fibroreticular (woven bone) y el hueso maduro de hueso lamelar. La característica diferencial entre el hueso fibroreticular y el lamelar es la disposición de las fibras de colágeno I, las cuales en el hueso fibroreticular se disponen en forma de manojos dispuestos de manera irregular y en el hueso lamelar se encuentran dispuestas en laminillas y orientadas en dirección a las líneas de fuerza. El hueso fibroreticular corresponde a un hueso menos denso, con una mayor cantidad de osteoblastos y altas tasas de

recambio y calcificación. Normalmente, este tipo de hueso se encuentra presente en el feto y en huesos en reparación (Miller, 2009)

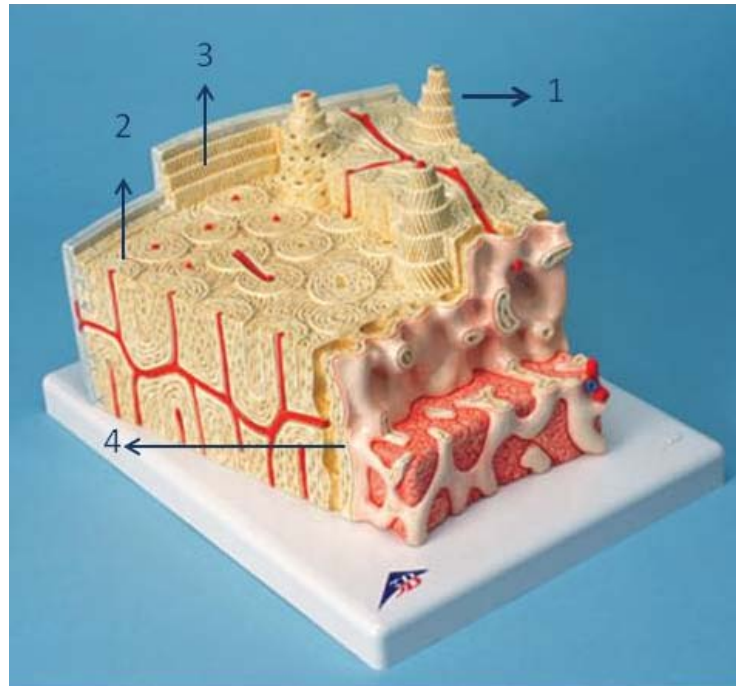


Figura 2.3: Estructura anatómica del hueso: 1. Sistemas de Havers. 2. Osteonas. 3. Hueso cortical 4. Hueso esponjoso. (Modelo tridimensional. Tecnoedu)

2.3. Osteogénesis

En el desarrollo embrionario, la formación de hueso se puede dar de 2 maneras: osificación intramembranosa y osificación endocondral.

La osificación intramembranosa genera los huesos planos y se basa en la diferenciación de osteoblastos directamente desde precursores celulares mesenquimales en ausencia de un modelo cartilaginoso precedente (Zachary y McGavin, 2012). Posteriormente estos osteoblastos secretan matriz osteoide irregular que es calcificada formando hueso fibroreticular que finalmente es remodelado a hueso lamelar (Little y cols., 2011)

La osificación endocondral es propia de los huesos largos y se produce en dos pasos sucesivos ya que originalmente se forma un modelo de cartílago que es reemplazado gradualmente por hueso (Mackie y cols., 2008). Primariamente se forman focos condrogénicos,

donde hay diferenciación de células mesenquimales a condroblastos, luego se produce hipertrofia celular que lleva a la formación de un modelo cartilaginoso similar con la forma y tamaño del hueso definitivo (Zachary y cols., 2012). Este paso es el responsable del crecimiento longitudinal de los huesos largos ocurrido en la metáfisis. Posteriormente la matriz cartilaginosa es calcificada, lo que permite su posterior degradación por los osteoclastos. Finalmente los condrocitos mueren y la matriz es invadida por vasos sanguíneos que permiten la migración de osteoclastos y osteoblastos a la zona. Los osteoclastos degradan la matriz y los osteoblastos generan focos de osificación, reemplazando gradualmente el molde cartilaginoso por hueso. Por último, los osteoblastos se transforman en osteocitos y se establecen en el tejido cumpliendo sus funciones específicas (Bronner y cols., 2010; Hoemann y cols., 2009; Little y cols., 2011; Mackie y cols., 2008)

2.4. Remodelación ósea

El hueso es un tejido activo que se encuentra en continua remodelación. En el proceso de remodelación ósea se produce el recambio de hueso antiguo o dañado por hueso neoformado mediante las acciones coordinadas de los osteoclastos y osteoblastos (Figura 2.4). En un individuo adulto en equilibrio homeostático estas dos acciones se encuentran balanceadas manteniendo la densidad ósea constante y permitiendo que el hueso neoformado se adapte mecánicamente a la fuerza y carga que debe soportar (Fitzgerald y cols., 2004). Alrededor de un 10% del total del esqueleto adulto se recambia anualmente, manteniendo el volumen original en un individuo sano (Bayliss y cols., 2012)

En el hueso cortical, la unidad básica que participa en este proceso es llamada Unidad Multicelular Básica (UMB, “cuting cones” en inglés). La UMB está formada por osteoblastos, osteoclastos y células endoteliales (Fitzgerald y cols., 2004; Hadjidakis y Androulakis, 2006). Esta unidad es responsable del ciclo básico de remodelación denominado Activación-Remodelación-Formación (ARF) (Fitzgerald y cols., 2004).

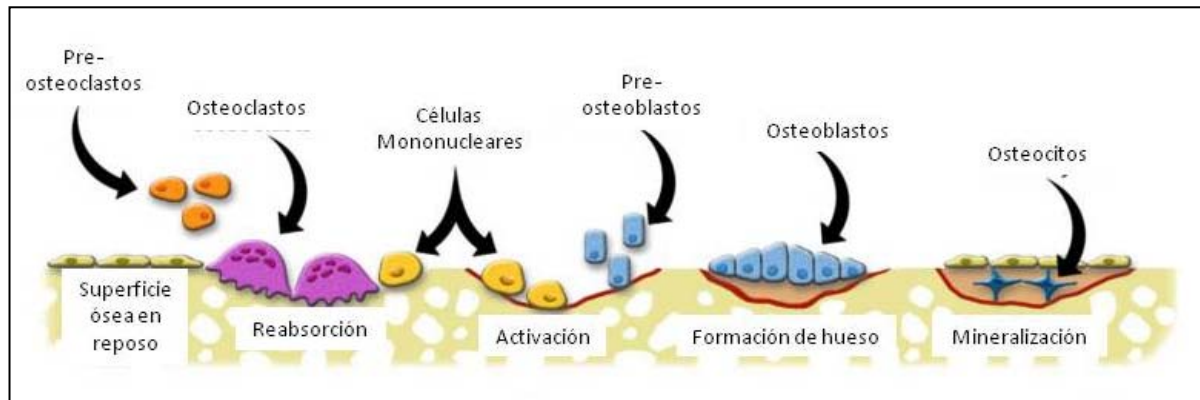


Figura 2.4: Remodelación ósea (Universidad de Michigan)

En primera instancia, en el ciclo ARF, se produce la activación, que consiste en la exposición de la superficie ósea mediante la separación de las células de revestimiento, este proceso trae como consecuencia el reclutamiento de células precursoras de osteoclastos. A continuación se produce la remodelación, donde hay un incremento en la actividad degradativa sobre la matriz extracelular por los osteoclastos. Los osteoclastos forman un cono de remodelación (cutting cone) que avanza en el sentido de carga del hueso, formando un canal de unos 2 mm de longitud y entre 150 y 200 μm de amplitud (Figura 2.5). La cavidad resultante es revestida por células endoteliales, que formarán el capilar central y posteriormente osteoblastos y osteocitos que formarán las llamadas lagunas celulares. Avanzando en esta etapa se produce apoptosis de los osteoclastos. En la última etapa del ciclo se genera una nueva matriz ósea mediante la acción de los osteocitos. El resultado final del ciclo ARF es la formación de una nueva osteona. El fundamento de este ciclo es que solo se genera hueso en lugares donde la reabsorción ya se ha producido (Bayliss y cols., 2012; Hadjidakis y Androulakis, 2006)

El hueso esponjoso tiene una mayor tasa de remodelación dada su mayor relación superficie-volumen. En este tipo de hueso, el mecanismo de remodelación está basado en la actividad degradativa osteoclástica seguida por la aposición de hueso por parte de los osteoblastos (Miller, 2009)

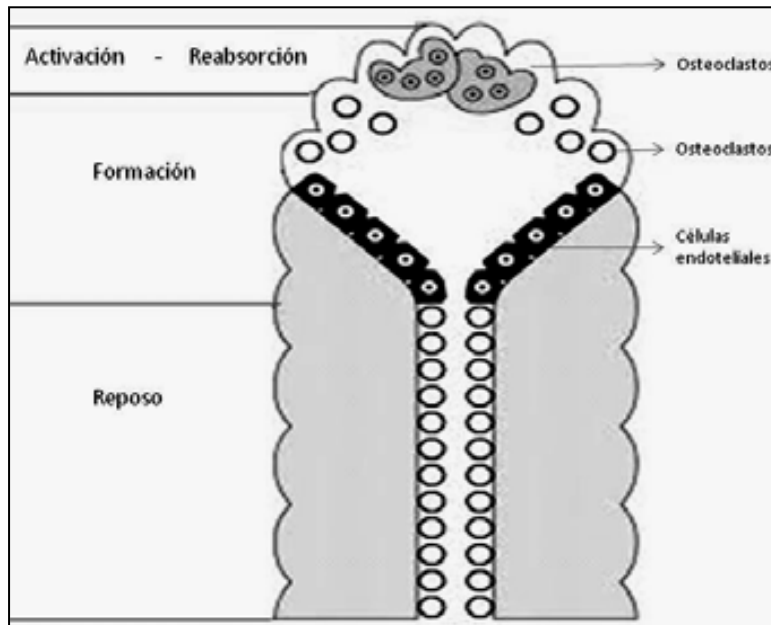


Figura 2.5: Cono de Remodelación (McPhee, 2006)

2.5. Consolidación ósea

Se considera que la consolidación ósea es una recapitulación del desarrollo óseo embrionario por lo tanto se entiende como un verdadero proceso de regeneración tisular (Harwood y cols., 2010; Marsell y Einhorn, 2011). La consolidación ósea difiere a la reparación de otros tejidos en que la curación se realiza mediante neoformación ósea a diferencia de la mayoría de los tejidos blandos donde se produce tejido fibrótico (Marsell y Einhorn, 2011; Van der Stok y cols., 2011).

Existen dos modalidades posibles para el proceso de consolidación ósea, dependiendo de las condiciones microambientales a las que esté sometido el defecto óseo. Estas dos modalidades corresponden a la reparación ósea directa o primaria y reparación ósea indirecta o secundaria.

La **osificación directa** es la menos común ya que requiere una reducción anatómica correcta y rígida con un espacio interfragmentario mínimo. En este tipo de reparación, el principal objetivo es el restablecimiento anatómico y biomecánico a través de la formación directa de tejido óseo lamelar.

La reparación primaria puede ocurrir a través de consolidación por contacto directo o consolidación con separación.

La **consolidación con contacto** ("contact healing") solo puede ocurrir si el espacio interfragmentario tiene un máximo de $10\ \mu\text{m}$ y la tensión interfragmentaria máxima es de un 2%.

En este caso los conos de remodelación se forman longitudinalmente en los bordes de los fragmentos de la fractura y atraviesan la línea de fractura produciendo simultáneamente la unión ósea y la restitución de los sistemas harvesianos en la dirección del eje central del hueso, por lo tanto no se produce la formación de un callo perióstico sino que directamente se forma hueso de tipo osteonal.

La **consolidación con separación** (“gap healing”) permite un espacio interfragmentario de 800 a 1000 μm . En este proceso se producen dos pasos consecutivos donde primariamente hay formación de tejido lamelar fibroreticular, luego lamelar orientado perpendicularmente a la línea de fractura que luego es remplazado por tejido osteonal que sigue la dirección del eje mayor del hueso. A pesar de que este proceso ocurre en dos pasos consecutivos, no es considerado osificación de tipo endocondral ya que en todo momento las células participantes son de tipo óseo (Marsell y Einhorn, 2011). De ello se desprende, que en defectos óseos que no presenten inestabilidad, la consolidación es más rápida ya que no se produce la fase cartilaginosa y la osificación es completamente de tipo intramembranosa (Harwood y cols., 2010; Marsell y Einhorn, 2011; Zachary y McGavin 2012)

Mayoritariamente, la reparación ósea se produce mediante **osificación indirecta** o secundaria, cuyo mecanismo consiste en osificación endocondral. Este tipo de osificación no requiere la reducción o contacto del 100% de la zona de fractura y permite un cierto grado de micro-movimiento de los fragmentos (Marsell y Einhorn, 2011). La osificación secundaria consiste primariamente en una reacción inflamatoria, seguida de la formación de un tejido cartilaginoso o condroide que posteriormente es remplazado por hueso fibroreticular y finalmente por hueso de tipo lamelar (Harwood y cols., 2010; Marsell y Einhorn, 2011).

La consolidación de un defecto óseo mediante osificación secundaria comprende 3 fases: inflamación, reparación y remodelación ósea (Fitzgerald y cols., 2004; Harwood y cols., 2010; Lee y cols., 2008). La reacción inflamatoria va acompañada de un aumento del aporte sanguíneo que permite la invasión vascular y celular en el tejido dañado fomentando la neoformación de tejido. En este proceso están involucradas células madres, fibroblastos, condrocitos y células óseas, que sufren una serie de procesos coordinados tales como activación, diferenciación, migración y proliferación dando como resultado un hueso regenerado en igual función y estado que el hueso original (Lee y cols., 2008).

Esta fase comienza con el sangrado de los tejidos circundantes al foco de fractura por la ruptura de vasos sanguíneos y microcapilares que genera primariamente hipoxia, posteriormente

activación de la cascada inflamatoria y coagulación, culminando con el reclutamiento y proliferación de células mesenquimales y osteoprogenitoras debido a la liberación de citoquinas con potencial osteogénico. Las células reclutadas generan un tejido de granulación que es invadido por una fina red de capilares, lo que asegura el aporte sanguíneo para las siguientes fases.

En la fase de reparación el mesénquima indiferenciado sufre condrogénesis formando un tejido cartilaginoso que va adquiriendo la forma del hueso original. Este tejido es llamado callo cartilaginoso. El progreso de la reparación ósea requiere que el callo cartilaginoso primario sea remodelado y reemplazado por un callo óseo más duro y más resistente que restituya la función biomecánica al hueso afectado. En el caso de que las condiciones de vascularización y estabilidad sean óptimas, se genera directamente un callo de tejido condroide que luego madura hasta ser sustituido por tejido fibroreticular y finalmente lamelar (Marsell y Einhorn, 2011). En este proceso ocurre simultáneamente osificación intramembranosa en los bordes y osificación endocondral en el centro del callo. En la zona central del callo óseo se genera neovascularización y migración de osteoclastos que degradan la matriz cartilaginosa calcificada dejando espacios que luego serán colonizados por osteoblastos, que son los que finalmente generarán la matriz ósea. En esta etapa el ordenamiento de las fibras colágenas es aleatorio, por lo tanto, se produce hueso de tipo fibroreticular.

En la fase de remodelación se inicia una segunda fase de reabsorción, donde el hueso adopta la configuración y morfología adecuada a la fuerza a que esté sometido. En esta etapa el hueso fibroreticular es reemplazado por hueso lamelar y osteonal. Por otra parte, se forma completamente la cavidad medular (Marsell y Einhorn, 2011; Miller, 2009)

Existen muchos factores que influyen las características del tejido neoformado, tanto factores biológicos como la vascularización y celularidad del defecto, como factores biomecánicos, especialmente el tamaño del defecto y la estabilidad o movimiento interfragmentario de la fractura (Gomez-Benito y cols., 2005; Harwood y cols., 2010). El aporte sanguíneo y la revascularización del tejido neoformado y del tejido circundante al sitio del defecto es esencial para una buena reparación ósea. La diferenciación de las células progenitoras depende de la concentración de oxígeno y las fuerzas de torsión presentes. Una fuerza elevada favorece la formación de tejido fibroso, una fuerza intermedia con bajo aporte de oxígeno favorece la aparición de cartílago, una fuerza baja con un alto aporte de oxígeno favorece la aparición de tejido fibroreticular. En el punto intermedio, es decir, con fuerza intermedia y alto

aporte de oxígeno, tendremos la formación de tejido condroide (Miller, 2009). En fracturas con una mayor separación interfragmentaria se genera una mayor cantidad de tejido. Este callo tendrá baja estabilidad o rigidez ya que es un tejido más elástico, adaptado al micro-movimiento de los fragmentos óseos. En una fractura con un pequeño espacio interfragmentario, el tejido neoformado será menos voluminoso pero de mayor calidad y rigidez (Gomez-Benito y cols., 2005).

El proceso de regeneración ósea ha sido evaluado mediante una amplia serie de técnicas de laboratorio, entre ellas la microscopía electrónica de retrodispersión o M.E.R (BS-SEM, Back-Scattered Scanning Electron Microscopy) que es considerada por algunos autores como la mejor técnica para evaluar las características morfológicas del tejido de remodelación ósea ya que posee la ventaja de permitir el discernimiento del grado y patrón de mineralización de los tejidos calcificados presentes en una muestra ósea (Franch y cols., 1998; Roschger y cols., 1998). Con este método, se pueden clasificar los tipos de tejido calcificado presentes en el proceso de consolidación ósea. Dichos tejidos de menor a mayor madurez dentro del proceso de remodelación son: el cartílago calcificado, que presenta una apariencia similar a una esponja y que posee zonas de calcificación sólo alrededor de las lagunas celulares; el tejido condroide que posee lagunas celulares de mayor tamaño y con forma poliédrica; el hueso fibroreticular que presenta un patrón de lagunas irregulares en tamaño y organización dentro de una matriz ósea bastante compacta; el hueso lamelar que corresponde ya a hueso plenamente maduro organizado en lamelas longitudinales que encierran pequeñas lagunas celulares fusiformes y finalmente hueso osteonal, que corresponde a la organización Haversiana del hueso lamelar formando osteonas (Franch y cols., 1998).

2.6. Historia de los injertos óseos

A pesar del hallazgo de cráneos datados del año 2000 A de C, perteneciente a la cultura Inca, donde se constató la reparación de un defecto óseo mediante un implante basado en conchas y placas de plata y oro (Figura 2.6) (Zubillaga y cols., 2007). Los primeros antecedentes que se tienen en la era moderna del uso de implantes óseos corresponden al siglo XVII cuando Job Van Meekeren, utilizó un trozo de cráneo canino para reparar un defecto craneal a un noble ruso. Posteriormente comprobó su éxito debido a que por requerimientos de la iglesia evangélica

de Moscú, se intentó su extracción, la cual no fue posible porque el injerto se hallaba totalmente osteointegrado (Zubillaga y cols., 2007)

Más adelante, en 1879, William Mac Ewen, realizó el primer aloinjerto óseo tratando a un paciente de 3 años de edad, afectado de un cuadro de osteomielitis humeral, mediante la resección del tejido infectado, y la reposición con un injerto óseo de tibia obtenido de otro niño. En 1885, Ollier, reportó alrededor de 60 casos de injertos heterólogos y gracias a sus estudios fueron acuñados los conceptos de autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto, posteriormente en 1893, Barth, describió la secuencia histológica de la integración ósea. (De la Garza y cols., 2004).



Figura 2.6: Cráneo con un implante metálico. Cultura Paracas, 2000 A de C
(www.trepan.com)

Desde principios del siglo XX comenzó la búsqueda de nuevos materiales que pudieran ser utilizados como sustitutos óseos.

En 1920 Albee y Morrison realizaron los primeros estudios en animales implantando fosfato tricálcico en defectos tibiales experimentales. Ellos concluyeron que la consolidación era evidentemente más rápida al utilizar tales materiales comparada con la consolidación natural (Weiss y cols., 2003). En ese mismo periodo fueron muchos los investigadores que utilizaron preparaciones en polvo de fosfatos cálcicos para estimular la curación ósea. Su uso se basaba en la idea de que la liberación local de calcio estimulaba la osteogénesis. La principal conclusión de estos estudios fue que los fosfatos de calcio eran bien tolerados y reemplazados eventualmente por hueso.

A pesar de ello, no se encontraron resultados concluyentes con respecto a que si los fosfatos cálcicos fomentaban realmente la consolidación ósea.

A partir de 1970, fueron introducidas las cerámicas sinterizadas como sustitutos óseos, evidenciándose la pobre reabsorción que presentaban algunos de estos compuestos (Lichte y cols., 2011). La preparación de cerámicas en bloques permitió mejorar la resistencia mecánica de los productos y expandió su uso a zonas de mayor carga.

Por otro lado se descubrió que las propiedades físicas, estabilidad, tasa de degradación y maleabilidad dependen de la composición y el método de preparación de los fosfatos de calcio (Lichte y cols., 2011; Meseguer, 1996).

En los años ochenta se desarrollaron los cementos óseos, que consistieron en la mezcla de fosfatos de calcio, denominada fase polvo y una fase líquida, que podían ser preparadas intraquirúrgicamente, los cuales trajeron otro enfoque al uso de sustitutos óseos, debido a su capacidad de fraguar *in situ* y por lo tanto permitieron su aplicación directamente en las zonas de hueso dañado, amoldándose íntimamente a la superficie y proporcionando un soporte mecánico, osteoconductor y bioabsorbible.

Desde ese punto, los esfuerzos científicos se han enfocado en mejorar las propiedades de estos sustitutos de injertos óseos (Bohner, 2010; Weiss y cols., 2003)

2.7. Funciones de un injerto óseo

Las funciones biológicas básicas que debe cumplir un injerto óseo son la osteoconducción, la osteoinducción y la osteogénesis (Cypher y Grossman, 1996). Estas características son las que aseguran un soporte biológico y micro-mecánico para la regeneración ósea.

La osteogénesis se define como la neoformación de hueso y ocurre gracias al aporte de osteoblastos o células precursoras provenientes del injerto (Cypher y Grossman, 1996). La osteoconducción es la capacidad del injerto de proporcionar una red o andamiaje donde pueda ocurrir crecimiento de vasos sanguíneos, migración y diferenciación celular. Los factores que influyen la osteoconducción son entre otros: porosidad, interconexión entre los poros y rugosidad de la superficie (Cypher y Grossman, 1996) .

La osteoinducción corresponde a la estimulación de la diferenciación celular y la proliferación de los osteoblastos a partir de células indiferenciadas, mediante sustancias llamadas genéricamente proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) presentes en el hueso. Existen como

mínimo 15 BMPs distintas, de las cuales las importantes son la BMP₂ y BMP₇. Estos elementos son liberados en caso de trauma y remodelación ósea (Albrektsson y Johansson, 2001).

Podemos sumar a estas tres características la osteointegración que se define como el contacto directo entre un implante y el hueso sin la formación de por medio de una membrana fibrosa. Esta característica depende íntimamente de las propiedades osteoconductoras y osteoinductoras del material, por ejemplo, se ha visto que un material no osteoconductor, no puede ser osteointegrado, aunque pueda rodearse íntimamente de hueso (bone ingrowth) (Albrektsson y Johansson, 2001).

La consolidación ósea y la incorporación de un injerto es una interacción molecular compleja entre el injerto y los tejidos del huésped. Esta interacción comprende eventos biológicos tales como proliferación, migración, diferenciación celular, respuesta inmune y revascularización (Adeyemo y cols., 2008)

2.8. Tipos de injertos

En primera instancia, podemos clasificar los injertos óseos en: naturales y sintéticos.

Los injertos naturales se clasifican según su origen en: autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos.

Hasta ahora el *gold standard* en los injertos óseos ha sido el injerto autólogo fresco de esponjosa debido a que reúne en sí las características biológicas necesarias para sostener la regeneración ósea, (osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis) (Aaboe y cols., 1995)(Tabla 2.2). Sin embargo presenta una importante desventaja debido a que es necesario que el donador y el receptor sean el mismo paciente. La primera consecuencia es una segunda cirugía y por lo tanto mayor tiempo quirúrgico, mayor dolor postoperatorio y mayor riesgo de infección. Se ha visto que el riesgo de complicaciones para estos procedimientos puede ir de un 8 a un 39% (Mai y cols., 2008; Van der Stok y cols., 2011). Además, que según sean las condiciones intraoperatorias, no existe garantía de la sobrevivencia del componente celular del injerto y por lo tanto de su posterior beneficio clínico.

En cirugía veterinaria, las zonas preferidas para realizar la obtención de tejido esponjoso para utilizar como injerto son la cresta iliaca y las epífisis proximales del humero y tibia.

Podemos deducir que en caso de pacientes de talla pequeña como aves, gatos o perros de raza pequeña, existe una importante limitación en la disponibilidad del hueso a obtener.

Por otro lado, el hueso esponjoso autólogo fresco, presenta un comportamiento de reabsorción impredecible y mecánicamente es deficitario ya que no soporta carga, lo que podría determinar el colapso del injerto. Se ha visto que un injerto de hueso esponjoso puede perder un 33% de su fuerza en la incorporación.

Por otro lado, la remodelación de un injerto esponjoso es muy variable, pudiendo estar dentro de un rango de 6 a 18 meses (Adeyemo y cols., 2008).

Los aloinjertos corresponden a injertos aportados por otro individuo de la misma especie que el receptor. Este tipo de injertos son frecuentemente utilizados en medicina humana lo que implica la existencia de bancos de huesos que soporten esta necesidad. Evitan la morbilidad de los autoinjertos pero pueden presentar riesgos de transmisión de enfermedades virales o reacciones inmunológicas (Tabla 2.2). Lamentablemente el procesamiento realizado para disminuir estos riesgos, que generalmente es la liofilización, también aminora su potencial osteogénico, osteoinductor y en menor medida su potencial osteoconductor y mecánico (Cypher y Grossman, 1996; Lichte y cols., 2011).

Los xenoinjertos provienen de individuos de otra especie por lo que el componente orgánico es completamente anulado en su procesamiento para evitar reacciones inmunológicas, manteniendo solamente su potencial osteoconductor (Tabla 2.2). Este tipo de injertos no presentan una ventaja por lo que han sido sustituidos casi completamente por injertos sintéticos (Cypher y Grossman, 1996; Wahl y Czernuszka, 2006)

Debido a los inconvenientes que puede tener el uso de materiales biológicos como sustitutos óseos, la ciencia ha cambiado el enfoque de este problema y se ha orientado a buscar materiales sintéticos que puedan brindar una mayor seguridad en su uso y que faciliten las capacidades regenerativas propias del organismo (Gleeson y cols., 2010)

Los injertos sintéticos son diseñados para presentar características similares al hueso y por lo tanto, según el tipo de material, pueden aportar tanto osteoconducción como osteoinducción y osteogénesis. Su principal objetivo es superar las desventajas de los injertos naturales (Tabla 2.2)(Fitzgerald y cols., 2004)

Hasta ahora no se ha logrado diseñar un producto sintético que aporte a la vez las mismas propiedades biológicas que un injerto fresco de esponjosa y que sea fácilmente utilizable a nivel clínico.

En definitiva, se espera que un injerto óseo ideal cumpla las siguientes funciones:

- Actuar como una red tridimensional que facilite la migración celular a nivel microscópico (osteoconducción), ofreciendo un soporte macroscópico similar al del hueso original y promover la diferenciación y actividad celulares (osteoinducción), así como aportar células formadoras de hueso (osteogénesis)
- Permitir la revascularización y neoformación ósea (porosidad).
- Ser un producto biocompatible, no tóxico y totalmente biodegradable. La tasa de reabsorción debe ser similar a la tasa de reparación ósea para facilitar la transferencia de carga del hueso neoformado.
- Ser un producto inmunológicamente inactivo y libre de riesgos de transmisión de enfermedades.
- Ser un producto de fácil manejo y almacenaje que soporte un proceso de esterilización adecuado a los fines clínicos que se le otorgan. Asimismo debe estar disponible en grandes cantidades para su producción.
- Tener la plasticidad necesaria para rellenar íntegramente la cavidad del defecto y adoptar la forma del hueso original (Aaboe y cols., 1995; Lichte y cols., 2011).

De esta forma surgen los biomateriales que se definen como una sustancia natural o sintética que ha sido diseñada para reemplazar o ser parte de un sistema vivo complejo causando una mínima alteración o perjuicio de este sistema.

El principal objetivo del uso de biomateriales es lograr una correcta interacción biológica entre el material implantado y los tejidos vivos (Dorozhkin, 2008; Vallet-Regí, 2010)

El mayor desafío en estos tiempos es diseñar materiales que puedan ayudar a los organismos vivos a mejorar sus propiedades regenerativas, no solo a recuperar la estructura de los tejidos dañados, sino también su función (Vallet-Regí, 2010). Lo que en el campo de la ortopedia y traumatología, se traduce en la búsqueda de materiales que sean intercambiados por hueso en un plazo de 6 a 12 meses (Kikuchi y cols., 2001).

Tabla 2.2: Tipos de injertos óseos

Tipo de Injerto	Origen	Propiedades	Desventajas
Autoinjerto	Hueso del propio paciente	Osteogénico Osteoinductivo Osteoconductor Mecánico (cortical)	Morbilidad zona donante Disponibilidad limitada
Alloinjerto	Hueso de otro individuo de la misma especie	Osteoconductor Mecánico	Transmisión de enfermedades Reacciones inmunológicas
Xenoinjerto	Hueso de otro individuo de diferente especie	Osteoconductor Mecánico	Transmisión de enfermedades Reacciones inmunológicas
Sintéticos	Material inerte	Osteoconductor Mecánico. Puede mejorarse mediante adición de elementos osteoinductivos	Ausencia de biointegración

2.9. Biocerámicas

Las biocerámicas son productos inorgánicos, no metálicos que se generan por un tratamiento térmico y posterior enfriamiento llamado sinterización. Este proceso da como resultado un material poroso y sólido de alta resistencia cuyas principales ventajas son su bioestabilidad, bioactividad y biodegradabilidad. Sus desventajas son su dureza y fragilidad (Dorozhkin, 2008; Vallet-Regí, 2010; Van der Stok y cols., 2011).

Existen muchas cerámicas que se utilizan en ortopedia y ortodoncia, principalmente las basadas en fosfato de calcio en distintas composiciones. Su uso se basa en su bioactividad, es decir, en la similitud con la fase mineral del hueso, lo que les otorga la capacidad de interactuar molecularmente con el hueso formando enlaces y sufrir reabsorción a medida que se va generando el hueso de reemplazo (Morales de Cano y cols., 2002) (Figura 2.7).

Un material bioactivo se define como un material que induce una actividad biológica específica. Esta interacción se debe a la reactividad de su superficie, que contribuye a la capacidad de formar uniones con el hueso y mejorar la formación de tejido óseo.

Por otra parte, las cerámicas son biocompatibles ya que son productos no tóxicos que no generan reacciones de cuerpo extraño. Esto genera un comportamiento característico entre los implantes y el hueso denominada osteointegración (Coelho y cols., 2009; Dorozhkin, 2010; Liu y cols., 2010).

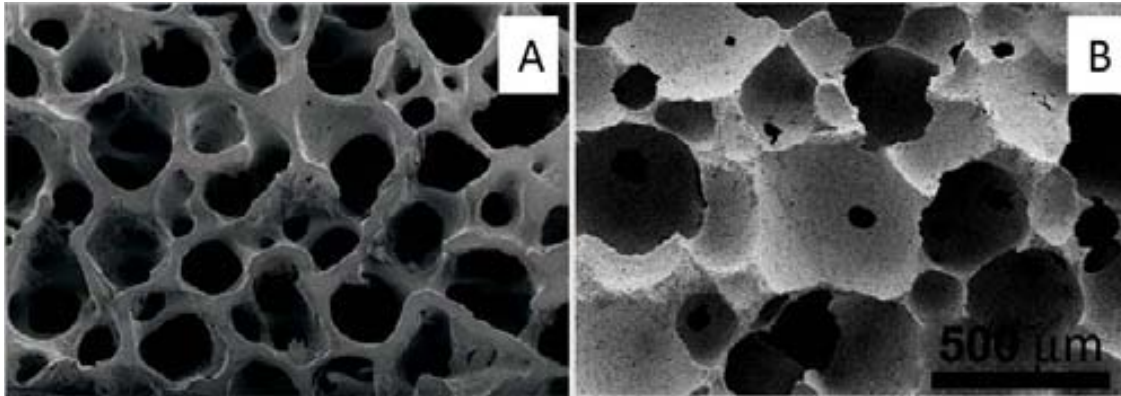


Figura 2.7: Comparación estructural entre hueso esponjoso (A) (Narvaez, 2004) y andamios de Hidroxiapatita (B) (Zeng y cols., 2012)

La utilización de cerámicas resulta idónea en zonas de bajo soporte de carga como por ejemplo relleno de defectos óseos, recubrimiento de implantes, sustitutos óseos o transportadores biológicos de fármacos, entre otros (Coelho y cols., 2009; Gautier y cols., 2001; Perez y cols., 2011).

Los factores más importantes que determinan la factibilidad del uso de una biocerámica como sustituto óseo son la solubilidad y la porosidad, aunque también son importantes la tasa de liberación Ca-P durante la consolidación ósea, maleabilidad del material para su adecuada inserción, plasticidad en el relleno de la cavidad y estabilidad inicial (Coelho y cols., 2009; Perez y cols., 2011). Si la solubilidad del fosfato de calcio es alta, la biocerámica se degradará a medida que crece el hueso neoformado, si la solubilidad es baja, podría incluso no reabsorberse. Aquellas biocerámicas que presenten una tasa de Ca/P iónico menor que 1 no se pueden utilizar en aplicaciones biomédicas debido a su solubilidad extremadamente alta y acidez (Dorozhkin, 2010).

Dentro de las biocerámicas, uno de los fosfatos de calcio que más se ha usado es el β -TCP ya sea como microesferas o bloques. Debido principalmente a que tiene una solubilidad media y se ha visto que es reabsorbido mediante actividad osteoclástica en un plazo inferior a 1 o 2 años.

En contraste, la hidroxiapatita sinterizada puede mantenerse en el organismo hasta por décadas, debido a su baja solubilidad (Bohner, 2001)

2.10. Cementos de Fosfato de Calcio

Los cementos de fosfato de calcio (CPCs) fueron desarrollados por Brown y Chow a mediados de los años 80. La mayor innovación y ventaja que trajeron fue la posibilidad de sufrir la reacción de fraguado por precipitación de los cristales a temperaturas fisiológicas (Figura 2.8), a diferencia de las biocerámicas utilizadas anteriormente que se deben procesar mediante sinterización a altas temperaturas (Ginebra y cols., 2010; Van der Stok y cols., 2011)

El cemento de fosfato de calcio corresponde a un producto bifásico, formado por una fase en polvo de cristales de fosfato de calcio que al mezclarlo con la fase líquida, compuesta en un alto porcentaje por agua, sufre una reacción de autofraguado a temperatura ambiente dando origen a un material que presenta excelentes características de bioabsorción y biomimetismo, es decir, que reproduce la composición, estructura, morfología y cristalinidad de los cristales óseos naturales (Dorozhkin, 2008; Ginebra y cols., 2010)

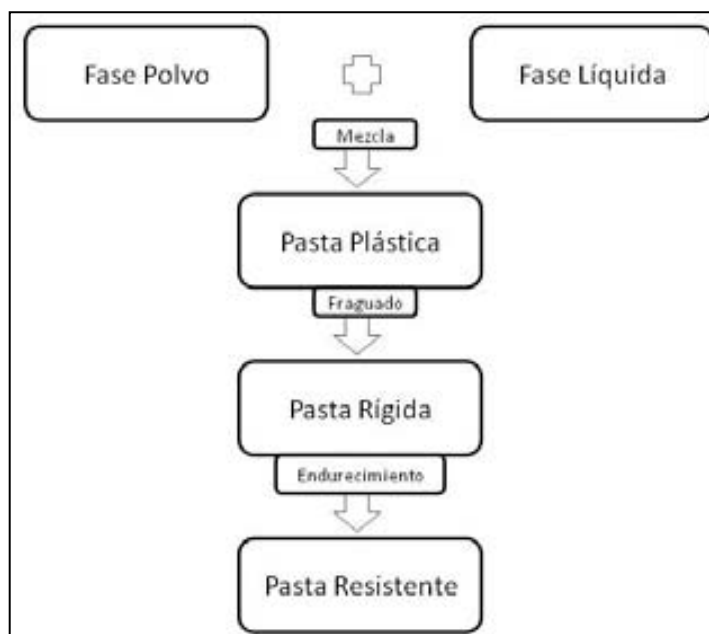


Figura 2.8: Proceso de preparación del cemento óseo

Durante la reacción de fraguado se producen una serie de reacciones químicas que comienzan con la disolución del fosfato de calcio original y su posterior precipitación en cristales de una menor solubilidad como por ejemplo hidroxiapatita deficiente en calcio o precipitada (p) o

brushita, dependiendo de las condiciones del medio ambiente y el sustrato primario. El ordenamiento que sufran los cristales en este proceso determinará la rigidez mecánica y resistencia del cemento, este proceso está fuertemente condicionado por la proporción entre las fases líquida/polvo y por la adición de otros componentes que alteran el proceso de fraguado (Ginebra y cols., 2010).

La hidroxiapatita (p) es el fosfato de calcio más estable en medio acuoso y por lo tanto en fluidos corporales, por ello, su síntesis en un medio que contenga los iones de calcio y fosfato es sencilla ya que sigue una tendencia natural (Kikuchi y cols., 2004). La hidroxiapatita sintetizada mediante sinterización es casi inabsorbible a diferencia de la hidroxiapatita presente en un cemento de fosfato de calcio que tiene una mayor solubilidad (Kikuchi y cols., 2004). Por el contrario el β -TCP es mucho más soluble por lo tanto su biodegradación es más rápida, debido a esto, el control de la bioabsorción de un cemento *in vivo* puede ser controlada mediante su composición (Dorozhkin, 2010). Esto implica que en las biocerámicas se prefiera algún fosfato de calcio más soluble como por ejemplo β -TCP en vez de hidroxiapatita sinterizada, pero en los cementos es diferente ya que en este caso, la hidroxiapatita (p), que se logra por precipitación es mucho más soluble. La mayoría de los cementos de fosfato de calcio tienen como producto final hidroxiapatita (p). Otra diferencia entre la hidroxiapatita sinterizada y la hidroxiapatita (p) es su área de superficie específica, la cual es 10 veces mayor en la hidroxiapatita (p), lo que explica su mayor bioactividad (Bohner, 2001) y hace que la hidroxiapatita (p) tenga un alto potencial como transportador de fármacos y otras moléculas activas debido a que tienen la posibilidad de unirse a grandes cantidades de proteínas endógenas como por ejemplo factores de crecimiento.

Las mayores ventajas de los cementos de fosfato de calcio son su rápida reacción de fraguado, mínima eliminación de calor durante el fraguado, fácil manipulación, excelente biocompatibilidad y sobre todo alta maleabilidad que le aporta capacidad de adaptación geométrica al defecto óseo (Dorozhkin, 2010). Su gran desventaja es que una vez endurecido, la estructura formada es frágil, tienen baja resistencia a los impactos y a la torsión por lo que debe ser usada en zonas de baja carga o en combinación con implantes metálicos que brinden estabilidad

Una vez mezcladas las dos fases del cemento, su aplicación puede ser mediante inyección o directamente moldeada por las manos del cirujano, esto determina que las características de la pasta sean distintas en cuanto a viscosidad, pero ambas deben poseer una buena cohesión y un

tiempo de la reacción de fraguado que permita al cirujano trabajar cómodamente (Bohner, 2000; Dorozhkin, 2010). Se ha visto que la disgregación del material durante la precipitación provoca reacciones inflamatorias (Bohner, 2010). La reacción de fraguado es solo ligeramente exotérmica por lo que no genera daño tisular (Bohner, 2001).

Los cementos de hidroxiapatita en general se presentan como pasta moldeable ya que tienen baja inyectabilidad debido a que en su formulación llevan una mínima cantidad de agua para evitar reacciones de autofraguado largas.

Se ha visto que para mejorar las propiedades reológicas de los cementos, es decir, la inyectabilidad y la cohesión, se pueden agregar polímeros viscosos como por ejemplo polisacáridos (Bohner, 2001).

La biodegradabilidad de los cementos depende de su composición, tamaño de partícula, porosidad y cristalinidad.

La solubilidad de los cementos de apatita es similar a la fase mineral del hueso, es decir, es relativamente insoluble a pH neutro y aumenta a medida que hay un decrecimiento del pH, facilitando de esta forma su disolución por los osteoclastos (Dorozhkin, 2010).

Los cementos de hidroxiapatita se bioabsorben tanto por medio del efecto fagocitario celular como por su disolución directa.

Por otro lado, dependiendo de su porosidad, podrían ser rápidamente colonizados por células lo que hace que el proceso de reparación tisular sea multifactorial y pueda resumirse de la siguiente forma: reacciones químicas de disolución-precipitación, acción de macrófagos, proliferación y diferenciación de células pluripotenciales, colonización por osteoblastos y finalmente mineralización de la nueva matriz ósea (Dorozhkin, 2010).

En general, la resistencia a la torsión de los cementos es menor que la del hueso, diente y de las biocerámicas sinterizadas, aunque su resistencia a la compresión es muy alta, generalmente unas 10 veces mayor que la del hueso (Weiss y cols., 2003).

La porosidad del cemento influye en sus propiedades mecánicas, observándose que la fuerza de compresión es inversamente proporcional a la porosidad. De esta manera, la resistencia a la compresión se puede manejar variando la porosidad del cemento mediante cambios en la razón de las fases líquida/polvo de la mezcla del cemento. Por ejemplo si el cemento se utilizará para rellenar pequeños defectos óseos, podemos utilizar un cemento de mayor porosidad y menor fuerza. Estas características facilitarán la neoformación ósea y la biodegradación del cemento aunque disminuirán su resistencia. Por el contrario, si el cemento se utilizará en una zona que requiere el soporte de grandes masas de tejido blando como por

ejemplo en una craneoplastia, necesitaremos un cemento poco poroso, de gran fuerza, aunque esto retrase su biodegradabilidad (Weiss y cols., 2003).

Generalmente la porosidad de los cementos de fosfato de calcio varía entre un 30 y un 60%, con poros interconectados muy pequeños, entre 1 y 12 μm , lo que no permite el desplazamiento celular en su interior y determina que la degradación del bloque de cemento sea desde el exterior hacia el interior por disolución, una mayor porosidad permitiría que la degradación también sea realizada por acción de las células fagocíticas (Bohner, 2001; Bohner, 2000; Dorozhkin, 2010). Debido a esta ausencia de macroporosidad los cementos por si solos no pueden ser usados como andamios, sino que deben ser tratados con algún componente que le otorgue macroporosidad para mejorar la osteoconductividad.

El rango de porosidad óptima para el crecimiento de hueso nuevo es entre 150 y 500 μm (Van der Stok y cols., 2011), con un mínimo de 50 μm para el crecimiento de vasos sanguíneos y de 150 μm para la formación de osteonas. Además del tamaño de los poros es importante la microestructura porosa, es decir, la interconexión entre los poros para permitir la migración celular y la difusión de nutrientes (Dorozhkin, 2010).

Las estrategias utilizadas para aumentar la porosidad de los cementos ha sido agregar a la mezcla líquidos hidrofóbicos como por ejemplo aceites, sólidos altamente solubles o burbujas de gas (Bohner, 2010)

La excelente bioabsorción presente en los cementos de fosfatos es la que ha llevado a investigar medios para mejorar sus deficiencias en resistencia mecánica. Se han intentado muchos métodos, como por ejemplo el suministro de distintos aditivos en su formulación, pero es difícil aumentar la fuerza sin provocar una disminución en otras propiedades ya que como discutimos anteriormente, estas propiedades están íntimamente relacionadas entre sí (Dorozhkin, 2010).

El principal uso clínico de los cementos de fosfato de calcio es el relleno de defectos óseos en sustitución de injertos o el recubrimiento de implantes metálicos para mejorar su capacidad de sujeción. Asimismo, dada la capacidad intrínseca de fraguar a temperatura corporal pueden ser usados eficazmente como transportadores de fármacos y otras moléculas bioactivas (Ginebra y cols., 2010).

2.11. Microesferas de Hidroxiapatita

Como vimos anteriormente, el uso de la hidroxiapatita en bloques densos, no permite su rápida biodegradabilidad ya que no permite la colonización interna del bloque por osteoclastos y otras células. Una forma de mejorar la biodisponibilidad y las propiedades osteoconductoras de la hidroxiapatita es la formación de composites en microesferas. En estos composites, se mezcla hidroxiapatita con alguna sustancia que le de cohesión y aporte otras propiedades deficitarias en el cemento puro, como por ejemplo gelatina, fibrina o colágeno y luego se forman microesferas durante la reacción de fraguado (Yin Hsu y cols., 1999). Aunque existen varios métodos de preparación de las microesferas, en general, se forman a partir de un CPC mediante la emulsión en un agente dispersante hidrofóbico, generalmente aceite vegetal, mientras ocurre la reacción de fraguado (Figura 2.9) (Teng y cols., 2007).

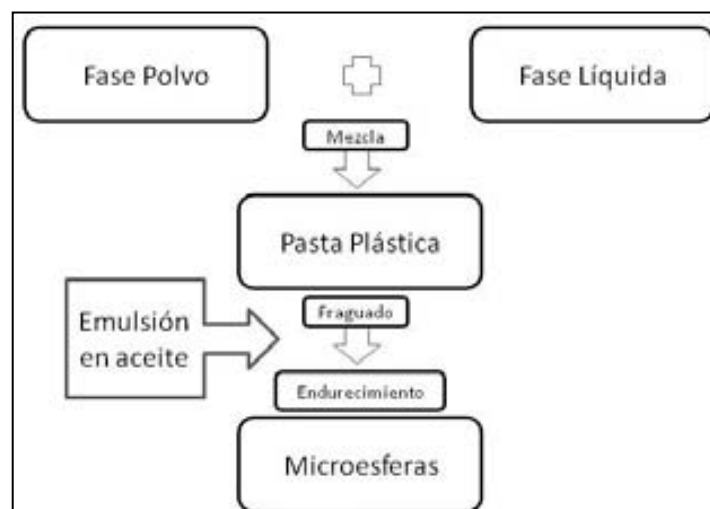


Figura 2.9: Formación de microesferas de hidroxiapatita

El soporte osteoconductor en microesferas proporciona una mayor versatilidad con respecto a otras presentaciones de la hidroxiapatita del tipo bloque compacto. La mayor ventaja de los microesferas es su capacidad de rellenar en forma más ajustada las cavidades y permitir por ello el tratamiento de defectos de mayor tamaño, debido a que evita la formación de espacios vacíos en la interfase implante-hueso, frecuentemente observada en implantes

realizados con bloques de hidroxiapatita (Gautier y cols., 2001). Por otra parte, las microesferas pueden ser aplicadas por inyección evitando grandes procedimientos quirúrgicos (Wu y cols., 2004)

Uno de los mayores usos que se le ha dado a las microesferas es el de transportador de moléculas bioactivas, fármacos e incluso como andamios para crecimiento celular debido a que presentan un área de superficie alta (Jiao y cols., 2012; Perez y cols., 2011; Teng y cols., 2007). Se ha demostrado que las microesferas de colágeno/hidroxiapatita son un excelente soporte para el crecimiento de osteoblastos *in vitro* (Wu y cols., 2004).

2.12. Colágeno

El colágeno ya sea como estructura tridimensional, andamio o como membrana ha sido utilizado en la regeneración de muchos tipos de tejidos, incluyendo el hueso. Algunas ventajas que presenta el colágeno y que justifican su uso en la elaboración de sustitutos óseos es su disponibilidad, alta biocompatibilidad, fomento de la hemostasia, adhesión y proliferación celular, bajo potencial inflamatorio, fácil manipulación y baja antigenicidad interespecífica (Gleeson y cols., 2010; Rocha y cols., 2002)

Sin embargo, como injerto óseo, presenta la desventaja de la falta de fuerza y rigidez para soportar carga antes o durante la consolidación (Gleeson y cols., 2010; Perez y cols., 2011). Dicha desventaja podría mejorarse agregando cristales de fosfato de calcio en su elaboración, lo que además aumentaría su potencial osteoconductor (Kane y Roeder, 2012; Perez y cols., 2011; Schneiders y cols., 2007).

Se ha comprobado que el refuerzo de estructuras colágenas con hidroxiapatita puede aumentar hasta en 10 veces su resistencia a la compresión y mejorar la bioactividad del material debido a que aumenta la rugosidad de la superficie facilitando la adhesión proteica y las uniones celulares. Además se ha observado un claro aumento en la mineralización de los injertos a las 4 semanas post implantación si se compara soportes exclusivos de colágeno con soportes de colágeno reforzados con hidroxiapatita (Gleeson y cols., 2010; Kane y Roeder 2012)

La porosidad y permeabilidad de un implante determina la neoformación de hueso en su interior. Se ha visto que una mayor porosidad facilita la neovascularización del implante y la proliferación celular, por lo tanto al haber un mayor transporte de nutrientes y oxígeno hay una mayor tasa de crecimiento óseo (Gleeson y cols., 2010). Los soportes exclusivos de colágeno presentan una alta porosidad y permeabilidad, sin embargo, se ha comprobado que la adición de

hidroxiapatita provoca una disminución insignificante en este parámetro conservándose sobre un 95% y por lo tanto no afecta su capacidad osteoconductora.

La utilización de colágeno en los soportes óseos de hidroxiapatita se basa en los principios de biomineralización que naturalmente ocurren en el hueso, el objetivo principal es buscar una similitud con el hueso tanto en su composición como en su estructura jerárquica. Puesto que se trata de los componentes básicos del hueso, surge como una elección obvia utilizarlos en la creación de un composite bioactivo que soporte y promueva el proceso de regeneración ósea. Por otro lado para lograr que las propiedades del material sean las mismas que las del hueso, no solo es necesario utilizar iguales componentes sino también que debe existir similitud en su estructura, es decir debe ser formulada mediante una ruta biomimética (Bradt y cols., 1999; Gleeson y cols., 2010; Kikuchi y cols., 2004; Liu y cols., 2010).

Por lo tanto se ha comprobado que la adición de colágeno a los cementos óseos y otros materiales basados en hidroxiapatita aumenta la velocidad de la regeneración ósea, dirige la agregación y migración de fibroblastos y presenta una tendencia al aumento de superficie de contacto entre el implante y el hueso en etapas tempranas de la remodelación, es decir, se forma una mayor cantidad de hueso (Bradt y cols., 1999; Gleeson y cols., 2010; Ishikawa y cols., 2001; Schneiders y cols., 2007; Wahl y Czernuszka, 2006).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
HIPÓTESIS DE TRABAJO
OBJETIVOS

Planteamiento del Problema, Hipótesis de Trabajo y Objetivos

3. 1. Planteamiento del problema

En estos momentos, la primera opción para tratar una pérdida masiva de tejido óseo es la utilización de un injerto de hueso esponjoso fresco autólogo debido a que este material entrega, en mayor o menor medida, los factores necesarios para el correcto funcionamiento del sistema regenerativo del hueso, es decir, el aporte de propiedades osteogénicas, osteoinductoras y osteoconductoras. Sin embargo, la serie de inconvenientes que presenta este tipo de procedimientos, relacionados principalmente con la morbilidad y la insuficiente cantidad en su recolección, ha obligado al diseño de nuevos materiales sintéticos que por sí solos o en conjunto, puedan sustituir eficazmente la función de un injerto óseo. El punto de partida para el buen funcionamiento del proceso de consolidación ósea es la existencia de una red de soporte tridimensional que posibilite mediante su capacidad osteoconductora la neoformación de hueso tal como la que proporciona el cemento óseo de hidroxiapatita. Sin embargo, este material, tiene algunas desventajas, como por ejemplo, la baja porosidad que limita su capacidad osteoconductora. Surge de esta forma la necesidad de disponer de un cemento óseo con una mayor capacidad osteoconductora y mecánica que permite mejorar las prestaciones de los productos disponibles actualmente.

En consecuencia, hemos propuesto en esta tesis la utilización y evaluación de un composite biomimético, basándonos en un producto de probada aptitud osteoconductora como es el cemento de hidroxiapatita como material control para realizar nuestra investigación. La modificación propuesta fue la adición de colágeno en su formulación, con el objetivo de aumentar su potencial osteoconductor, tomando como punto de partida la ruta natural de mineralización ósea y los resultados *in vitro* obtenidos por otros grupos de investigación que indican que el colágeno claramente mejora las propiedades mecánicas y de manejo de estos cementos.

Se utilizó fémur de conejo como modelo de estudio buscando una mejor estandarización de los resultados, debido a que es el modelo que más frecuentemente se ha utilizado para realizar estudios sobre materiales osteoconductores.

La elección de los tiempos de los bloques de estudio respondió a la estimación de los ciclos de remodelación ósea existentes en la especie de estudio.

3. 2. Hipótesis de trabajo

La adición de colágeno al cemento de hidroxiapatita mejoraría el efecto osteoconductor propio del cemento, por lo tanto, mediante la realización de *in vivo* de defectos óseos, su posterior relleno con los distintos tipos de cementos de hidroxiapatita y colágeno y finalmente la medición de la cantidad de tejido neoformado podríamos determinar su capacidad osteoconductor.

3. 3. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis fue demostrar la mayor capacidad osteoconductor resultante de la adición de colágeno a un cemento de hidroxiapatita en un modelo biológico, mediante la utilización de dos tipos distintos de soporte de hidroxiapatita, que fueron el cemento óseo de hidroxiapatita compacto y las microesferas de hidroxiapatita.

Para lograr este objetivo se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Creación, estandarización y aplicación de un método de evaluación semicuantitativo de la cantidad y calidad ultraestructural del tejido óseo neoformado en las superficies implantadas.
2. Creación y estandarización de un método de evaluación histomorfométrico de la cantidad y calidad ultraestructural del tejido óseo neoformado en las superficies implantadas.
3. Evaluación de la concordancia entre ambos métodos de evaluación para demostrar o no el mayor efecto de la adición de colágeno.

4.MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

A modo de resumen inicial: El estudio consistió en la realización de defectos óseos corticales en cóndilo femoral de conejo, rellenados con cemento y microesferas de hidroxiapatita de distinta formulación, eutanasia programada de los animales y posterior obtención de muestras y correspondiente análisis ultraestructural. Los detalles pormenorizados de los materiales y métodos utilizados en el presente estudio experimental se describen a continuación (Figura 4.1).

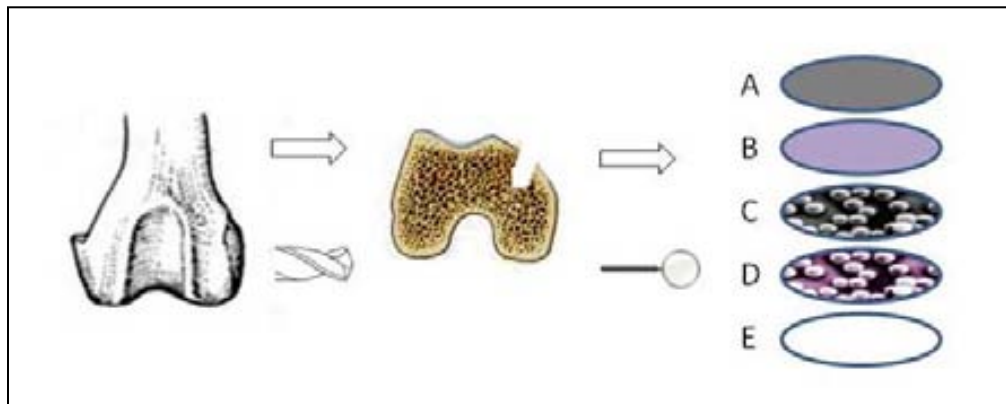


Figura 4.1: Esquema general procedimiento experimental

4.1. Materiales

4.1.1. Autorización del procedimiento experimental

Este procedimiento experimental fue autorizado por la Comisión de Ética y Experimentación Humana y Animal (CEEHA) de la Universidad Autónoma de Barcelona con expediente número 5599 de la Generalitat de Catalunya.

4.1.2. Animales

El estudio experimental se realizó en 32 conejos adultos hembras de raza Neozelandés Blanco, con un peso entre 4,8 y 5,5 kg y un rango de edad comprendido entre los 8 a los 12 meses. Todos los animales estaban correctamente vacunados y desparasitados, carentes de procesos patológicos y procedentes de un centro proveedor oficial de animales de experimentación.

Para el cálculo del tamaño significativo de muestra se utilizó la siguiente ecuación (Mead, 1988):

$$N-1=E+T+B$$

Donde N= número total de animales. T= número de tratamientos (5). B=número de bloques (2). E=grados de libertad del error (17) (Este valor debe encontrarse entre 10 y 20, en nuestro estudio decidimos aleatoriamente, usar 17)

$$N=1+E+T+B$$

$$N=1+17+5+2$$

$$N=28$$

Trabajamos con 5 grupos experimentales:

- A. Cemento de fosfato de calcio
- B. Cemento de fosfato de calcio más colágeno
- C. Microesferas de hidroxiapatita
- D. Microesferas de hidroxiapatita más colágeno
- E. Defecto vacío.

Se formaron 2 bloques de trabajo, dependiendo del tiempo postimplantación en el cual se realizaría la eutanasia de los conejos.

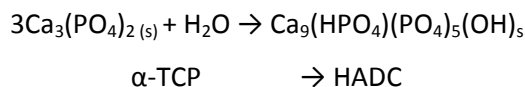
Según esta ecuación, el número óptimo necesario para cada grupo experimental fue de 5 animales, con un total de 25 animales. Como se utilizarán ambos fémures de cada animal, era preferible utilizar un número total par, por ello aumentamos a 6 el número de animales por grupo con un total de 30 animales en el estudio. Paralelamente se utilizaron 2 animales para realizar el análisis histológico convencional con descalcificación de las muestras a modo complementario al análisis principal mediante M.E.R.

4.1.3. Materiales de implantación

En el presente estudio experimental se utilizaron 4 tipos diferentes de materiales de implantación. El quinto grupo experimental correspondía al grupo control, en el que el defecto creado se dejó vacío.

4.1.3.1. Cemento de fosfato de calcio

Se utilizó como base cemento de α -fosfato tricálcico (α -TCP) que durante la reacción de fraguado es hidrolizado formando hidroxiapatita deficiente en calcio como producto final según la siguiente reacción:



La fase polvo estaba constituida por α -TCP con un área promedio de superficie específica de 1, 228 m²/gr y un tamaño de partícula medio de 2,41 μm . La porosidad del cemento fue del orden del 42% y la distribución del tamaño de poro de 0,006 a 1 μm .

La fase líquida estaba constituida por una solución de ácido acético 50 mM.

El tiempo de fraguado de este cemento mostró un valor promedio de 15 \pm 1 minutos.

4.1.3.2. Cemento de fosfato de calcio más colágeno

Se utilizó el mismo cemento que en el grupo anterior al cual se le adicionó en la fase líquida una solución de colágeno a una concentración de 10 mg/ml.

El colágeno se extrajo de pericardio bovino mediante un método de digestión enzimática, posteriormente fue sometido a un tratamiento químico para obtener colágeno fibrilizado.

La caracterización física del α -TCP presente en este cemento es similar a la del grupo control (tamaño de partículas, tamaño de poros y distribución de poro).

El tiempo de fraguado del cemento más colágeno presentó un valor de 12 ± 1 minutos.

4.1.3.3. Microesferas de hidroxiapatita

El cemento control antes descrito se utilizó como base para la preparación de los microesferas, por lo tanto, la porosidad del material fue del orden del 42% y la distribución del tamaño de poro de 0,006 a 1 μm . El proceso de preparación de las microesferas consistió en la formación de una emulsión de cemento en aceite vegetal, para ello, se agregó aceite una vez comenzada la reacción de fraguado manteniendo la mezcla en un agitador hasta su solidificación.

El tamaño promedio de los gránulos fue de 350 μm .

4.1.3.4. Microesferas de hidroxiapatita más colágeno

Se utilizó como base el cemento de fosfato de calcio descrito inicialmente, al que se le añadió colágeno tal como se mencionó anteriormente en la preparación de cemento de fosfato de calcio más colágeno. El procedimiento de preparación fue similar al de los microesferas controles.

La caracterización física de los microesferas fue similar a la del anterior grupo (350 μm) con la excepción de una mayor esfericidad presentada en este grupo.

4.2. Métodos

4.2.1. Método preoperatorio

Una vez adquiridos los animales, se mantuvieron en una sala exclusiva del centro proveedor hasta 2 días antes de realizar las intervenciones quirúrgicas, cuando fueron trasladados al centro quirúrgico.

Durante el periodo de adaptación, los animales se mantuvieron en el recinto quirúrgico en una sala de uso exclusivo para ellos. En este periodo se llevó a cabo una exploración física exhaustiva de cada animal para ratificar su adecuado estado de salud y posteriormente se realizó un estudio radiográfico con proyecciones mediolateral y anteroposterior de ambos fémures para descartar cualquier patología esquelética que pudiera interferir con el estudio y para tener como imagen de referencia en posteriores evaluaciones radiográficas. Los parámetros radiológicos utilizados para todos los estudios radiográficos fueron de 40Kv 10mAs y distancia focal de 80 cm.

4.2.2. Método operatorio

Para la manipulación segura de los animales, se inició el procedimiento operatorio con la sedación mediante aplicación intramuscular de ketamina y midazolam en la región de la cruz. La dosificación de fármacos utilizados en la preanestesia y anestesia de los animales se refleja en la tabla 4.1 y 4.2. Transcurrido un tiempo aproximado de cinco minutos postinyección se realizó la cateterización venosa en la vena marginal de la oreja utilizando un catéter endovenoso flexible de calibre 23G. La administración de fluidos se realizó mediante la aplicación de bolos de suero ringer lactato. La inducción anestésica se realizó mediante la inyección de propofol por vía endovenosa. El mantenimiento de la anestesia se realizó de manera inhalatoria utilizando isofuorano y oxígeno a través de mascarilla. Una vez anestesiados los animales, se completó la administración de fármacos con la aplicación de meloxicam y buprenorfina como analgésicos, metoclopramida como regulador del tránsito intestinal y penicilina procaína como antibiótico preventivo. La depilación de los miembros posteriores se realizó de manera amplia desde la articulación del tarso hasta la

cadera para evitar contaminación del campo quirúrgico. La desinfección de la piel se realizó con una solución acuosa de clorhexidina al 1%.

El abordaje quirúrgico del cóndilo se realizó mediante la incisión de la piel en la cara lateral de la epífisis distal del fémur, centrando la incisión en el aspecto lateral del cóndilo femoral y la región paratroclear lateral. Mediante disección roma se profundizó la incisión pasando a través del retináculo rotuliano lateral y exponiendo la cápsula articular que fue incidida para exponer la superficie ósea. Una vez expuesto el hueso y localizada la porción central del cóndilo femoral, se practicó un orificio unicortical con una broca de 2,7 mm que luego fue ampliándose progresivamente utilizando brocas de graduación creciente (3.5 y 5mm) hasta llegar a un diámetro de defecto de 5 mm.

La implantación, en el caso de los cementos se realizó activando la reacción de fraguado del cemento en el mismo quirófano bajo condiciones estériles y esperando a que la textura del cemento fuera la adecuada para mantener su cohesión y forma mientras se rellenaba el orificio, generalmente entre 5 y 8 minutos. En el caso de los gránulos de hidroxiapatita, se realizó la mezcla de los gránulos con sangre en un recipiente estéril, recolectando sangre de la propia zona quirúrgica hasta la formación de un coágulo que luego fue implantado en la zona a rellenar.

Tabla 4.1: Fármacos utilizados en la preanestesia

Fármaco	Acción	Dosis	Vía
Buprenorfina	Analgésico	0.03 mg/kg	i.m.
Meloxicam	AINE	0.18 mg/kg	s.c.
Midazolam	Tranquilizante	0.5 mg/kg	i.m.
Ketamina	Tranquilizante	0.1 mg/kg	e.v.
Metoclopramida	Regulador intestinal	0.5 mg/kg	s.c.
Penicilina Procaínica	Antibiótico	100.000 UI/kg	s.c.

Tabla 4.2: Fármacos utilizados en la anestesia

Fármaco	Acción	Dosis	Vía
Propofol	Anestésico (mantención)	2.5 mg/kg	e.v.
Isoflurano	Anestésico (mantención)	1-3 %	inhalatoria
Oxígeno		2 l/min	inhalatoria

La herida quirúrgica se suturó en dos planos utilizando material reabsorbible multifilamento en puntos continuos para el plano subcutáneo y material no reabsorbible monofilamento para la piel en modalidad de puntos simples discontinuos.

El control radiográfico postquirúrgico se realizó inmediatamente tras la cirugía todavía bajo anestesia general.

Para el protocolo de distribución del material de relleno, se formaron 2 grupos de 15 animales cada uno en función de los tiempos de supervivencia (1 y 3 meses). Se realizó la intervención bilateral de ambos fémures agrupando a los conejos en los diferentes subgrupos determinados según el material a implantar.

Paralelamente y siguiendo el mismo procedimiento antes mencionado, se realizó la implantación en dos conejos que fueron destinados a la evaluación histológica convencional de las muestras para constatar su inocuidad inmunológica. Para ello se realizó la eutanasia a los 12 días postquirúrgico.

La distribución de los implantes se detalla en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Distribución de animales en lo grupos experimentales

Nº conejo			Derecha	Izquierda
30 días	90 días	12 días		
1	16		A HAC	B HAC+col
2	17		A HAC	B HAC+col
3	18		A HAC	B HAC+col
4	19		A HAC	B HAC+col
5	20		A HAC	B HAC+col
6	21		A HAC	B HAC+col
7	22		C Me HAC	D Me HAC+col
8	23		C Me HAC	D Me HAC+col
9	24		C Me HAC	D Me HAC+col
10	25		C Me HAC	D Me HAC+col
11	26		C Me HAC	D Me HAC+col
12	27		C Me HAC	D Me HAC+col
13	28		E vacío	E vacío
14	29		E vacío	E vacío
15	30		E vacío	E vacío
		31	A HAC	B HAC+col
		32	C Me HAC	D Me HAC+col

A: Cemento de fosfato de calcio. HAC (control)

B: Cemento de fosfato de calcio mezclado con colágeno. HAC+col (10 mg/ml)

C: Microesferas de hidroxiapatita deficiente en calcio. Me HAC

D: Microesferas de hidroxiapatita deficiente en calcio y colágeno Me HAC+col

E: Defecto vacío

Conejos 1-15: 1 mes de duración del estudio

Conejos 16-30: 3 meses de duración del estudio

Conejos 31-32: 12 días de duración del estudio

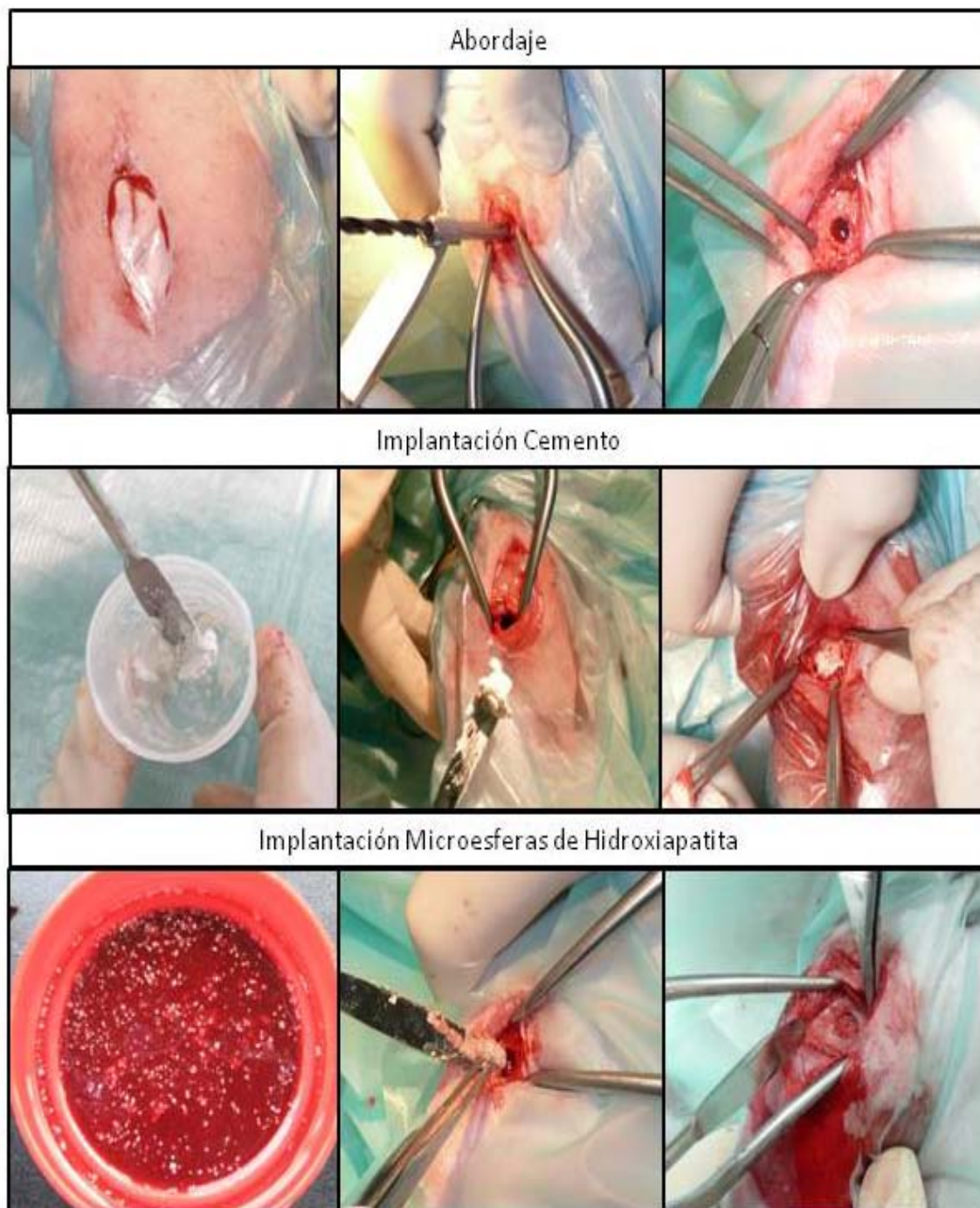


Figura 4.2: Secuencia de imágenes método quirúrgico

4.2.3. Método postoperatorio inmediato

Dada la condición digestiva de los conejos no se realizó ayuno previo a la cirugía y se incentivó a comer una papilla de pienso y agua inmediatamente después de la recuperación anestésica.

En el postoperatorio inmediato, los animales fueron tratados con antibioterapia y analgesia, tal como se detalla en la tabla 4.4, siendo mantenidos en las condiciones adecuadas para evitar complicaciones quirúrgicas en una sala de recuperación de uso exclusivo, preparada para tal fin. Todos estos manejos y administraciones fueron realizados por el investigador o personal autorizado.

Tabla 4.4: Fármacos utilizados en el periodo postquirúrgico

Fármaco	Acción	Dosis	Vía	Pauta diaria	Total días
Meloxicam	AINE	0.09 mg/kg	s.c.	BID	10
Buprenorfina	Analgésico	0.03 mg/kg	s.c.	BID	3
Metoclopramida	Regulador intestinal	0.5 mg/kg	s.c.	BID	3
Penicilina Procaína	Antibiótico	100.000 UI/kg	s.c.	BID	10

4.2.4 Método de supervisión posoperatoria de los animales

La evaluación postquirúrgica se realizó mediante las siguientes fichas de supervisión:

Tabla 4.5: Pauta de supervisión general de los animales

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Peso														
2	Condición corporal														
3	Consumo agua														
4	Consumo alimento														
5	Consumo cecotrofo														
6	Movilidad														
7	Cojera														

Tabla 4.6: Pauta de supervisión postquirúrgica de los animales

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
8	Inflamación														
9	Tumefacción														
10	Dolor														
11	Infección														
12	Fármaco 1														
13	Fármaco 2														
14	Fármaco 3														
15	Fármaco 4														
16	Estado herida														
7	Extracción de puntos														

La ficha de supervisión general se rellenó todos los días del estudio hasta la extracción de los puntos quirúrgicos con excepción del peso y condición corporal de lo animales se midió 1 vez por semana. La cirugía se realizó en el día 3 del estudio, debido a que se dejaron lo dos primeros días como periodo de adaptación a las nueva instalaciones y a los manejos médicos realizados durante este periodo.

La ficha de supervisión quirúrgica solo se rellenó entre los días 3 y 20 del estudio.

La administración de medicamentos se registró según el ritmo horario de cada fármaco.

La extracción de puntos se realizó 12 días postquirúrgico.

Terminado el periodo postquirúrgico y una vez retirados los puntos de la herida quirúrgica, los animales fueron supervisados 2 veces al día por su cuidador y controlados 2 veces por semana por el investigador, quien relleno la ficha de supervisión general en estas ocasiones.

A los siguientes parámetros: consumo de cecotrofos, movilidad, cojera, inflamación, tumefacción, dolor, infección y estado de la herida se les asignaron los valores de 0, 1 y 2. Siendo 0 ausencia, 1 presencia moderada y 2 presencia destacada.

Específicamente se midió el consumo de cecotrofos como el hallazgo de estos en la jaula, la tumefacción o edema como permanencia de la huella digital tras presión, dolor como signos de retirada o malestar a la presión, infección como la presencia de drenaje seropurulento y estado de la herida como dehiscencia de puntos quirúrgicos.

Una vez confirmada la recuperación postquirúrgica, los animales fueron devueltos a las instalaciones del centro de suministro de origen donde fueron ubicados en unas instalaciones independientes y con los criterios de estabulación establecidos para conejos.

Durante esta fase, se chequeó periódicamente el buen estado de salud de los animales y se descartó la aparición de cualquier patología sistémica o alteración local en la zona quirúrgica.

4.2.5. Eutanasia

La eutanasia programada fue realizada en tres tiempos distintos dependiendo del bloque al que perteneciera el grupo de animales.

Los animales destinados al grupo de análisis histológico fueron eutanasiados a los 12 días posteriores de la cirugía.

El resto de los grupos se trabajaron paralelamente en ambos bloques de tiempo, es decir, se utilizó un grupo de animales para cada tiempo experimental.

El primer bloque completó un tiempo de estudio de un mes y el segundo de tres meses.

La eutanasia se realizó mediante la aplicación endovenosa de una sobredosis de pentotal sódico utilizando para ello ketamina y midazolam como sedantes en dosis descritas en la tabla 4.1, para facilitar el manejo y cateterización de los animales según la normativa de American Veterinary Medical Association (AVMA).

Inmediatamente después de la eutanasia se realizaron radiografías de las extremidades posteriores en proyección medio-lateral y antero posterior.

Finalmente se realizó la disección y posterior radiografía de los fémures como piezas anatómicas individualizadas.

4.2.6. Método laboratorial

4.2.6.1 Preparación de las muestras para M.E.R.

Una vez debidamente identificados, los fémures individualizados fueron sumergidos en una solución de formaldehído tamponado al 10% por un tiempo mínimo de 1 semana. Con el tejido fijado se practicó una osteotomía supracondilar aislando los fragmentos condilares que

contenían los defectos óseos mediante el uso de una fresadora dremmel a una velocidad intermedia de 15.000 a 24.000 rpm.

Exceptuando las muestras que se destinaron al análisis por histología convencional, cuyo procesamiento será descrito más adelante, todas las muestras fueron procesadas para su inclusión en metilmetacrilato y posterior evaluación con microscopía electrónica de retrodispersión (M.E.R.) según el siguiente protocolo:

1. Baño 50% de GMA (2-hidroxi-etilmetacrilato) en agua destilada durante 24 horas en cubeta opaca.
2. Baño 70% de GMA en agua destilada durante 24 horas en cubeta opaca
3. Baño 90% de GMA en agua destilada durante 24 horas en cubeta opaca
4. Baño 100% de GMA durante 24 horas en cubeta opaca
5. Baño 100% de GMA durante 24 horas en cubeta opaca
6. Baño 50% de GMA con Technovit 7200 durante 24 horas en cubeta opaca
7. Baño 100% de Technovit 7200 durante 24 horas en cubeta opaca
8. Baño 100% de Technovit 7200 durante 14 días en cubeta opaca
9. Depósito de las piezas en el molde plástico de inclusión pegándolas al suelo del molde mediante Technovit 7230 VLS, evitando la presencia de burbujas en la superficie de contacto. Rellenar el molde con Technovit 7200
10. Polimerización del plástico introduciendo el molde con la pieza en el fotopolimerizador y exponiéndola a la luz blanca durante dos horas y a la luz ultravioleta durante seis horas. Transcurrido dicho tiempo, se separó la pieza del molde plástico y se obtuvo la muestra ósea ya incluida en el metacrilato

Una vez obtenidos los bloques de acrílico se procedió a su pulido manual hasta el afloramiento de la zona central de interés del defecto. Para ello se utilizó una máquina pulidora metalográfica “Bhueler Alfa” a una velocidad aproximada de 200 rpm, utilizando discos de papel abrasivo de carburo de silicio de grano creciente pasando por 600, 800, 1200 y 2400 G.

Con el primer disco se realizó un desbaste grosero de material hasta llegar al borde del defecto, luego se utilizaron los siguientes discos en forma consecutiva, doblando el tiempo de pulido y cambiando el ángulo de pulido en 90° cada vez, hasta obtener un pulido de tipo espejo sin evidencia de rayas en la superficie de la muestra.

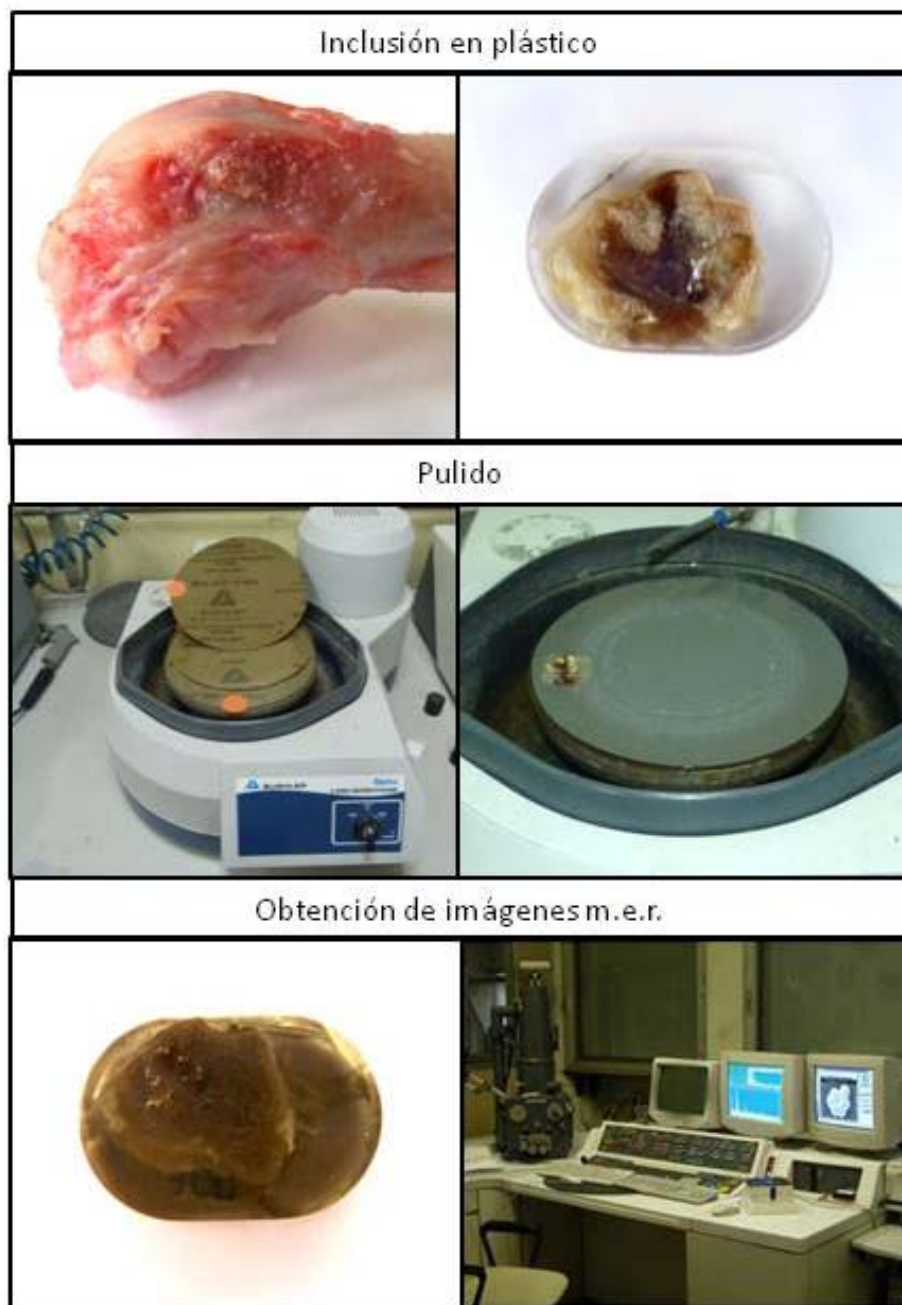


Figura 4.3: Secuencia de imágenes del método laboratorial

4.2.7. Obtención de imágenes de las muestras mediante M.E.R.

Las muestras adecuadamente pulidas, fueron recubiertas con carbono y para asegurar una correcta conductivización, necesaria para la óptima observación mediante M.E.R., se aplicaron una serie de trayectos con plata coloidal.

Las muestras fueron observadas y fotografiadas individualmente en un microscopio Steroscan S360 (Leica/Cambridge Instruments) de microscopía electrónica de barrido dotado de una sonda de detección de electrones retrodispersados.

Este método de observación se abrevia como BS-SEM (back-scattered scanning electron microscopy) en inglés o M.E.R. (microscopía electrónica de retrodispersión) en español.

Las imágenes de las muestras se capturaron estandarizadamente a 1 nA, 20Kv y distancia focal de 15 mm, en formato *.tif.

El protocolo de observación utilizado fue el siguiente: vista panorámica, 10X, 30X, 60X, 120X, 300X. Obteniendo imágenes del centro del defecto, márgenes del defecto, corticales del defecto y hueso normal.

4.2.7.1. Método de evaluación semicuantitativa de las imágenes de M.E.R.

La evaluación semicuantitativa de las imágenes se realizó por observación directa de las imágenes y se basó en la medición de los siguientes parámetros en cada muestra:

- **Progresión de la corticalización en el defecto:** Se evaluó la presencia lineal de hueso neoformado en la cortical en reconstrucción del defecto.

Se calculó como la cantidad de tejido neoformado linealmente con respecto a la anchura total del defecto. La escala de valoración fue de 0 a 5, siendo 0 la ausencia de corticalización y 5 el recubrimiento lineal completo del área de corticalización con independencia del grosor y de la dirección de los frentes de regeneración.

- **Grosor de la corticalización en el defecto:** Se evaluó el grosor medio de la corticalización, la escala de evaluación fue de 0 a 5, siendo 5 el mayor valor, asociado a un grosor igual a la cortical original
- **Madurez de la corticalización en el defecto:** Se evaluó el tipo de tejido neoformado.

Según la madurez del tejido se establecieron las siguientes categorías: Cartílago calcificado, tejido condroide, tejido óseo fibroreticular, tejido óseo lamelar, tejido óseo osteonal. Se asignaron ordinalmente los valores de 1 a 5 según la mayor madurez del tejido con el orden antes mencionado. El valor 0 se asignó a las muestras donde no se observó tejido neoformado

- **Infiltración central:** Se evaluó como la presencia de tejido neoformado en el interior del defecto. La escala de valoración fue de 0 a 5, siendo 0 la ausencia de tejido neoformado y 5 el relleno completo de los espacios libres de material de implantación en el área del defecto por tejido neoformado.
- **Recubrimiento intramedular:** Se evaluó como la extensión de la formación de trabeculado óseo que acompañó los márgenes del defecto. La escala de valoración fue de 0 a 5, siendo 0 la ausencia de recubrimiento y 5 el recubrimiento intramedular completo del área del defecto
- **Compactación del material:** Se evaluó la densidad del material de relleno dentro del defecto. La escala de valoración fue de 0 a 5, siendo 0 la permanencia de la densidad original del implante. En el caso de los cementos corresponde al relleno completo de la cavidad del defecto óseo y en el caso de los gránulos corresponde al menor espacio posible de separación entre los gránulos, es decir, que los gránulos se toquen entre sí y 5 a la pérdida completa de material en el área del defecto.
- **Hipertrofia del periostio adyacente al defecto:** Corresponde a la medición de la altura de la reacción perióstica en relación al grosor de la cortical original. La escala de valoración fue de 0 a 5, siendo 0 la ausencia de reacción perióstica y 5 el valor máximo encontrado con una altura que superó 5 veces el grosor de la cortical original
- **Formación de depresión cortical en el defecto:** Se evaluó como la desviación hacia el interior de la formación de la nueva cortical con respecto a la cortical original. La escala de valoración fue de 0 a 5, siendo 0 la ausencia de depresión y 5 la formación de depresión que superó el grosor de la cortical original

4.2.7.2. Método de evaluación histomorfométrica de las imágenes de las muestras de M.E.R.

El análisis de las imágenes se realizó mediante el módulo interactivo del software Leica LAS V4.0.

El análisis consistió principalmente en la cuantificación del área ocupada por los distintos tejidos o materiales en la imagen de la muestra. Para ello se trabajó con las imágenes panorámicas o las imágenes detalladas del defecto completo de cada muestra definiendo las siguientes áreas de trabajo:

- **Área de la corticalización del defecto:** Se definió un área de trabajo que incluyó el espacio ocupado por la cortical original con un pequeño margen subcortical
- **Área de tejido neoformado dentro de la corticalización**
- **Área de espacios vacíos dentro la corticalización:** Correspondió a los espacios sin relleno que se encontraban dentro del área de la corticalización, excluyendo los espacios que se ubicaron interna o externamente a la formación de nueva cortical. Estos espacios se ven de color negro en las imágenes de m.e.r
- **Área de material persistente dentro de la corticalización**
- **Área ocupada por la depresión cortical:** Correspondió al área ubicada sobre la formación de tejido neoformado y la línea de la cortical original, en los casos que existía corticalización. En las muestras donde no existió corticalización completa se realizó esta medición siguiendo la tendencia de formación de la nueva cortical
- **Longitud del de recubrimiento periférico en la medular**
- **Longitud total del defecto subcortical**
- **Área de espacios vacíos dentro del defecto subcortical**
- **Área de material persistente dentro del defecto subcortical**
- **Área de tejido neoformado dentro del defecto subcortical**
- **Área y longitud de la hipertrofia perióstica**
- **Área total del defecto:** Incluyó el área de corticalización y el área del defecto subcortical.
- **Área total de la muestra**
- **Área del defecto subcortical**

- **Longitud de la corticalización:** Se definió como la superficie lineal del tejido neoformado dentro del área de corticalización
- **Longitud del defecto**

Con estas mediciones se calcularon algunos índices que sirvieron para realizar la evaluación histomorfométrica:

- **% de relleno del área de la corticalización:** Correspondió al área ocupada por material y/o tejido dentro del área de corticalización con respecto al área total de corticalización
- **% de material remanente en el área de la corticalización:** Correspondió a la cantidad de material de implantación remanente en el área de corticalización
- **% de tejido neoformado en el área de corticalización:** Correspondió a la cantidad de tejido óseo con respecto al área total de corticalización
- **Índice de calidad de la corticalización:** Indicó la proporción de tejido óseo neoformado que efectivamente está formando un puente óseo entre los dos bordes del defecto. Se calculó con la siguiente fórmula :

$$IC = \frac{100 * \% \text{ tejido neoformado en la cortical}}{\% \text{ de relleno lineal cortical}}$$

- **% de relleno lineal cortical:** Se entendió como el porcentaje lineal de corticalización con respecto a la longitud total del defecto, expresa la proporción de tejido neoformado linealmente en el área de corticalización
- **% de recubrimiento periférico subcortical:** Se entendió como el porcentaje lineal de recubrimiento trabecular en el área subcortical con respecto a la longitud total del defecto subcortical

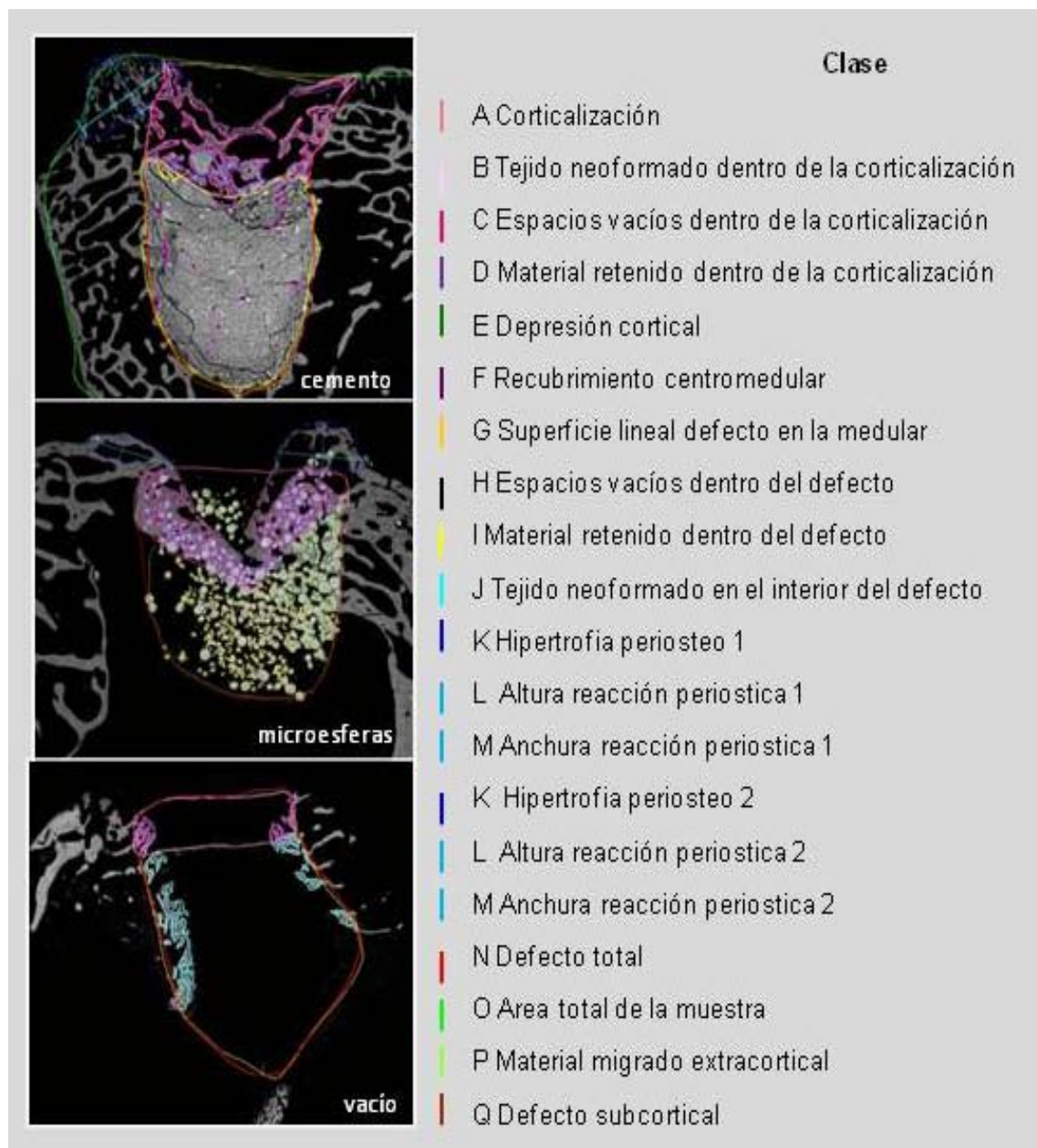


Figura 4.4: Análisis histomorfométrico de las imágenes

4.2.8. Método laboratorial para el análisis histológico de las muestras

Una vez disecados los fémures fueron sumergidos en una solución de formaldehído tamponado al 10% durante 1 semana para su fijación, posteriormente fueron sumergidos en una solución descalcificante basada en ácido nítrico al 5% por una semana. Una vez completada la

descalcificación de las muestras, se realizó la disección manual del área de estudio realizando un corte paralelo al eje del cóndilo femoral de 1 cm de espesor que contuviera completamente el defecto óseo en su interior. Posteriormente se realizó su inclusión en bloques de parafina, cortes con micrótopo y tinción con hematoxilina-eosina hasta identificar el centro del defecto. A este nivel se realizaron más cortes para tinción especial de tricrómico de Masson con el objetivo de identificar las fibras colágenas presentes en la muestra.

Este método solamente fue utilizado en un grupo reducido de muestras debido a que únicamente se pretendía llevar a cabo una valoración que ratificara la inocuidad del producto y demostrar la ausencia de reacción a cuerpo extraño.

4.2.8.1 Método de evaluación cualitativa de las muestras de histología

El análisis cualitativo de las muestras de histología se realizó mediante observación de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina. Se identificaron 5 áreas distintas de análisis y dentro de ellas se realizó recuento celular en 4 campos.

Las áreas evaluadas fueron el borde cortical externo del defecto, bordes corticales laterales del defecto y bordes intramedulares del defecto.

En esta tinción se evaluó la presencia y el tipo de células inflamatorias presentes en cada campo.

En las muestras teñidas con tinción de tricrómico de Masson se evaluaron las mismas zonas y cantidad de campos. El parámetro de evaluación fue la cantidad de fibras colágenas encontradas en cada campo.

4.3 Análisis estadístico

Frente al objetivo de obtener una comparación entre las dos metodologías de medición utilizadas en la valoración de muestras mediante M.E.R., fue desarrollado un análisis de regresión entre los resultados obtenidos para las distintas variables en el análisis semicuantitativo con respecto al análisis cuantitativo histomorfométrico. Este procedimiento fue realizado con el paquete de herramientas para análisis de Microsoft Office Excel 2007.

Con el objetivo de determinar la existencia de diferencias estadísticas entre las variables respuesta cuantitativas descritas en el apartado de análisis histomorfométrico de las muestras (Tejido cortical, tejido subcortical, depresión, recubrimiento, longitud de la corticalización) con los diferentes materiales implantados, se utilizó el método de análisis de componentes principales (ACP) y análisis multivariado de la varianza (MANOVA).

Como punto de partida se realizó una verificación de los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia de medias y varianzas mediante las pruebas de contraste de Barlett y Levene. Una vez comprobados tales supuestos, se aplicaron los análisis antes mencionados.

Adicionalmente, se complementó dicho análisis multivariado, con un análisis de varianza unidimensional mediante la aplicación de la prueba de comparación de Tukey. El objetivo de este análisis fue detectar el origen de las diferencias estadísticas entre los tratamientos, teniendo en cuenta que el MANOVA toma en conjunto todas las variables y efectúa una comparación multidimensional, sin determinar específicamente la ubicación de las diferencias o la fuente de la variación.

Para todos los análisis se definió la significación estadística a un valor de $p \leq 0.05$

El ACP fue realizado en el paquete estadístico Dtm-Vic 5.6, mientras que para realizar MANOVA, las pruebas de normalidad, homocedasticidad y de Tukey se utilizó el paquete estadístico Minitab 16.

5. RESULTADOS

Resultados

5.1. Resultados clínicos y radiográficos

La valoración clínica postquirúrgica mostró una temprana recuperación de la movilidad de los miembros posteriores de los animales, sin observarse ningún tipo de cojera o dificultad locomotora posterior al periodo de recuperación quirúrgica. No se observaron signos de dolor o molestia en ningún animal, realizando todos ellos sus actividades de locomoción y alimentación normalmente.

La cicatrización de las heridas quirúrgicas tuvo lugar sin incidencias. A las 2 semanas post cirugía se retiraron los puntos a todos los animales sin constatar la presencia de inflamación, infección o dehiscencia de los bordes de las heridas quirúrgicas.

Solamente se observó un leve descenso en el consumo de agua y comida durante los días en que los animales se ubicaron en el recinto postquirúrgico, el cual fue normalizado una vez que los animales fueron devueltos al recinto habitual de estabulación. Esta situación provocó una disminución pasajera, sin trascendencia, de la condición corporal y peso de los animales.

No se observaron cambios en los otros parámetros medidos en la ficha de supervisión durante el estudio, por lo que se determinó que, al final del estudio, los animales no presentaron signos de atrofia muscular en las extremidades intervenidas ni cambios importantes en el peso, condición corporal o su condición general. A pesar de ello, en algunos conejos se pudo observar cierto engrosamiento a nivel de la rodilla, que aunque responsable de un cierto grado de anquilosis articular, en ningún momento representó una limitación locomotora para el animal afectado. Tampoco se observaron signos de luxación de rótula ni crepitación articular.

La valoración radiográfica postoperatoria inmediata indicó, en casi todos los casos, que el defecto había sido practicado en el centro de la superficie paratroclear lateral del cóndilo femoral y por tanto, ubicados en un área de tejido corticoesponjoso que se buscaba en el estudio. Solamente en una muestra el defecto había sido practicado más caudalmente en el cóndilo, sin embargo, el tipo de tejido existente en esa zona también es de tipo corticoesponjoso.

Las imágenes radiográficas permitieron diferenciar claramente la radiodensidad de los defectos en función del material de relleno empleado, identificándose claramente los grupos con defecto vacío, con implante de cemento o con microesferas de hidroxiapatita. Sin

embargo, no fue posible discernir la presencia o no de colágeno en el implante a partir del aspecto radiográfico de este (Figura 5.1).



Figura 5.1: Diferentes radiodensidades de los materiales de implantación. A: Cemento control. B: Cemento más colágeno. C: Gránulos control. D: Gránulos más colágeno. E: Defecto vacío

La valoración radiográfica postoperatoria de 1 mes mostró que la radiopacidad de los materiales de relleno se mantuvo sin gran variación en todos los grupos con respecto a la inicial (Figura 5.2).

Se observó además que la consolidación ósea es difícil de evaluar con esta técnica ya que debido a la radiopacidad de los materiales de implantación, resultó difícil identificar claramente la presencia de neoformación ósea, osteointegración del implante y remodelación de los bordes corticales del defecto en un área de dimensiones tan limitada. Dicha dificultad de valoración se incrementó en las proyecciones craneocaudales dada la interferencia del hueso sesamoideo lateral del músculo gastrocnemio, estructura anatómica que muchas veces provocaba una imagen superpuesta en la zona de estudio (Figura 5.3).

A pesar de dichas dificultades, en ninguna de las muestras en las que el detalle del defecto se veía con más claridad permitiendo la evaluación de la consolidación, se observó consolidación completa (Figura 5.4).

En general, no se observó migración del material de relleno en los tejidos circundantes con la excepción de una muestra perteneciente al grupo de cemento con colágeno, en la que se observó la presencia de un punteado radiopaco en los tejidos circundantes a la articulación femorotibiorotuliana, atribuibles a la migración del cemento en el periodo postquirúrgico (Figura 5.5). Esta migración de material no provocó ningún signo de malestar o alteración locomotora en el animal afectado.



Figura 5.2: Evolución de la radiopacidad de un implante de cemento óseo. Este ejemplo corresponde a muestras del grupo A (cemento de fosfato de calcio). A: Postimplantación inmediata. B: 1 mes de evolución. C: Postimplantación inmediata. D: 3 meses de evolución



Figura 5.3: Interferencia de la evaluación de la consolidación ósea mediante radiografía



Figura 5.4: Evaluación de la consolidación ósea mediante radiografía en muestras con un injerto de fosfato de calcio más colágeno
A: Postimplantación inmediata. B: 1 mes postimplantación. C: 3 meses postimplantación



Figura 5.5: Migración periarticular de cemento de fosfato de calcio.

La valoración radiográfica postoperatoria de 3 meses mostró una leve disminución en la radiopacidad de los materiales de implantación (Figura 5.2), así como también se observó pérdida del grado de definición de los márgenes de los defectos y básicamente pérdida de la homogeneidad de la superficie de los implantes, observándose disminución del aspecto granular inicial, especialmente en los implantes de microesferas. En los casos donde fue posible evaluar la cortical se observó un alto grado de remodelación de la cortical del defecto confirmando la consolidación de prácticamente la mayoría de los defectos (Figura 5.4).

En algunas muestras no fue posible evaluar la remodelación cortical adecuadamente debido a la interferencia provocada por el solapamiento radiográfico del hueso sesamoideo lateral del músculo gastrocnemio en la zona paracondilar en la proyección antero-posterior, tal como se había comentado anteriormente.

5.2. Resultados de la evaluación semicuantitativa de las imágenes de M.E.R.

Para una valoración ultraestructural más precisa de las muestras objeto de estudio, previamente se procedió a valorar mediante microscopía electrónica de retrodispersión, muestras no tratadas a modo de patrón comparativo. En dichas muestras se observó que el hueso cortical presentaba un aspecto regular y liso con arquitectura de tipo osteonal y tejido de alta densidad organizado en patrón harvesiano (Figura 5.6-A, B, C). En algunas zonas de la cortical intacta se pudieron observar pequeños focos de remodelación, identificados como tejido fibroreticular rodeados de tejido maduro (Figura 5.6-B). El tejido subcortical se organizó formando un trabeculado compuesto de tejido óseo maduro de tipo lamelar (Figura 5.6-D).

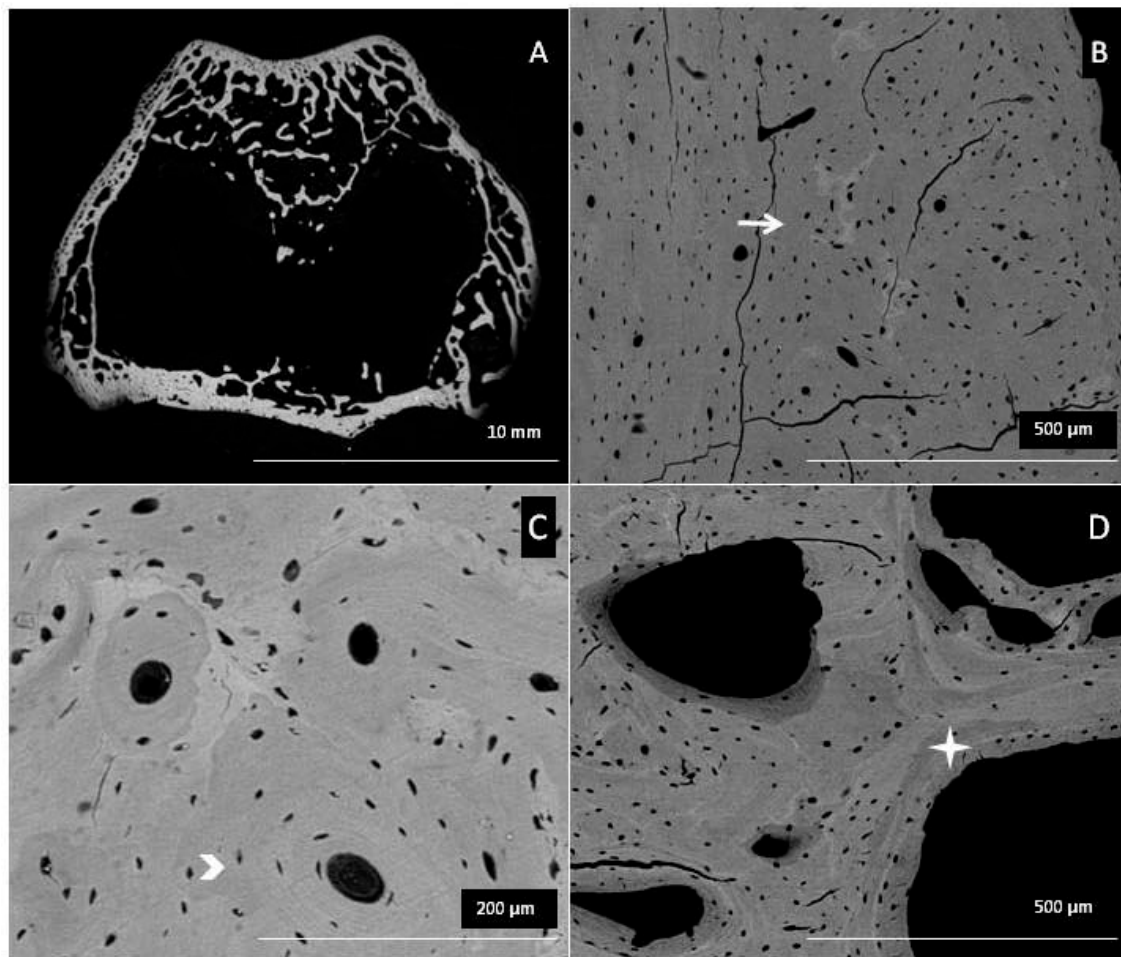


Figura 5.6: Imágenes de M.E.R. de la muestra patrón. A: imagen panorámica. B: Detalle de una cortical (→ : Zonas de remodelación activa). C: Detalle de una cortical (➤: Tejido óseo de tipo osteonal). D: Detalle de una trabécula central. (✦: Tejido óseo de tipo lamelar).

5.2.1. Resultados de la serie de muestras de 1 mes

5.2.1.1. Cemento de fosfato de calcio

Los defectos óseos y su material de relleno fueron claramente distinguibles ocupando menos de un 50% de la superficie paratroclear lateral del fémur.

A pesar de que en todas las muestras se observó corticalización, entendida como la neoformación de tejido óseo en la zona de la cortical del defecto, se mostraron distintos grados de avance de los frentes corticales, observándose en una muestra del grupo de forma incipiente.

No se observó corticalización lineal completa en ninguna muestra de este grupo (Figura 5.7-A). La puntuación media obtenida de esta característica fue de 2.08 ± 1.46 sobre 5.

El tipo de tejido óseo encontrado en esta área fue de tipo fibroreticular (Figura 5.7-B).

En la zona de la cortical original limítrofe con el defecto, se observó la presencia de pequeñas osteonas (Figura 5.7-C).

El grosor de la corticalización en este grupo presento un valor de 2.5 ± 0.84 .

Se observó que la regeneración tisular, en general, siguió la línea de la cortical original presentando solamente una leve depresión cortical, obteniendo un valor de 1.16 ± 0.98 para esta característica.

En el área peridefecto de algunas muestras se observó un ligero punteado blanco que al ser analizado por microanálisis, fue identificado como sales de calcio, probablemente fruto de la degradación del cemento (Figura 5.7-D).

En un 40% de las muestras de este grupo se observó la formación de una reacción perióstica en alguno de los bordes del defecto, de un grosor aproximado de 1.5 veces el grosor de la cortical original, solamente en un caso esta reacción fue bilateral. El valor obtenido para esta característica fue de 1.66 ± 1.12 . El tipo de tejido presente en esta estructura fue cartílago calcificado y tejido condroide, en algunas muestras fue posible observar la formación de un gradiente de calcificación del cartílago en el área de reacción perióstica (Figura 5.7-E).

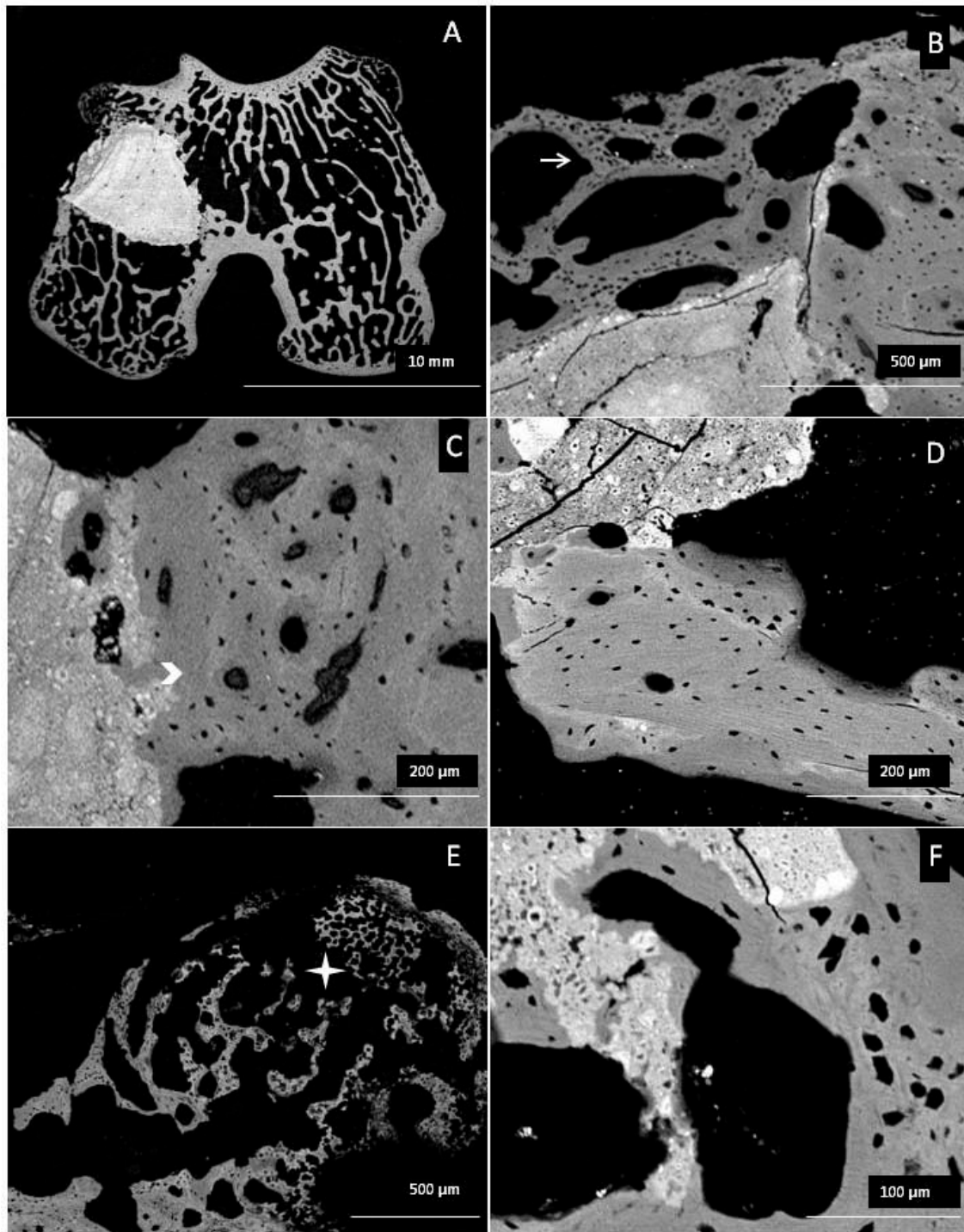


Figura 5.7: Imágenes de M.E.R. del grupo A.1 mes. A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. (→ : Tejido óseo fibroreticular). C: Interfase entre la cortical original y el implante. (➤: Osteonas). D: Sales de calcio disgregadas sobre la muestra. E: Reacción perióstica (✦: Tejido óseo de tipo lamelar). F: Formación de tejido óseo fibroreticular entre el cemento descompactado.

El material de relleno presentó una alta compactación en el 66% de los casos, rellenando íntima y completamente el defecto, sin embargo en el resto de muestras se observó una pérdida de compactibilidad en el núcleo del defecto. La puntuación media obtenida por dicha característica fue de 3.67 ± 1.75 .

Asimismo, fue constatada la presencia de trabeculado centromedular de tejido fibroreticular y lamelar que recubrió externamente la porción interna del defecto, sin embargo, en ningún caso se observó un recubrimiento trabecular completo del defecto. La puntuación media de este parámetro fue de 3.16 ± 1.47 . Dicho tejido trabecular neoformado presentaba un contacto íntimo con el cemento, sin existencia por tanto de una interfase de separación, demostrando así el carácter osteointegrable del cemento.

En los casos donde se observó descompactación del cemento, fue posible la identificación de tejido de tipo fibroreticular en el interior de las grietas formadas en el cemento (Figura 5.7-F), el valor obtenido para esta característica fue de 0.33 ± 0.82 .

5.2.1.2. Cemento de fosfato de calcio más colágeno

Los defectos óseos y su material de relleno fueron claramente distinguibles ocupando menos de un 50% de la longitud de la superficie paratroclear lateral del fémur.

En una de las muestras el defecto óseo se ubicó en la porción caudal del aspecto lateral del cóndilo femoral lateral, llegando a ser bicortical penetrando incluso en el surco intercondilar, sin embargo fue constatado que el proceso de reparación no presentaba diferencias con respecto a los defectos unicorticales de los otros huesos del estudio, por lo tanto fue incluido y analizado con los mismos criterios que las otras muestras del grupo.

El comportamiento de la corticalización fue ligeramente distinto al del grupo de cemento control, si bien se observó que la mayoría de las muestras presentaban corticalización en distintos grados, ninguna llegó al 100% de relleno lineal del defecto (Figura 5.8-A). La puntuación obtenida por esta característica fue mayor que en el grupo de cemento control con un valor de 2.92 ± 1.8 . Sin embargo, hubo una muestra que no presentó indicios de corticalización.

El tipo de tejido encontrado en estas muestras fue de tipo condroide, encontrándose incluso cartílago calcificado en una muestra (Figura 5.8-B, C, D). Este tipo de tejido no fue observado en el grupo anterior.

Igualmente se observó la reactividad de la cortical original contigua al defecto mediante la proliferación de osteonas.

En este grupo se captó gráficamente la formación de lagunas de Howship en la cortical original como prueba de la activa remodelación osteoclástica sobre esta zona cortical (Figura 5.8-E).

Asimismo, en este grupo también observamos que el grosor de la corticalización fue aproximadamente un 10% mayor que el valor obtenido en el grupo control, obteniendo una valoración de 3.2 ± 1.63 .

La formación de depresión cortical fue ligera, muy similar al grupo anterior con un valor de 1.16 ± 0.75 .

La reacción perióstica se constató en el 50% de las muestras con un elevado volumen, alcanzando hasta 3 veces el ancho de la cortical original en una muestra, solamente en un caso esta reacción fue bilateral. El valor obtenido para esta característica fue de 0.92 ± 1.56 . El tipo de tejido encontrado en esta estructura fue similar al del grupo anterior y correspondió a cartílago calcificado y tejido condroide, siendo posible observar la formación de un gradiente de calcificación del cartílago.

A grandes aumentos, se observaron pequeñas partículas libres identificadas mediante microanálisis, como islotes de sales de calcio, probablemente fruto de la degradación del cemento.

El material de relleno presentó una elevada compactibilidad. No se observó la pérdida de compactibilidad en el núcleo ni en los bordes del defecto en ninguna muestra. La puntuación media obtenida para esta característica fue de 4.5 ± 0.55 .

No se observó la neoformación de tejido en el interior del núcleo de cemento, por lo tanto la puntuación de esta característica fue 0.

La formación de trabeculado centromedular fue evidentemente menor que en el grupo de cemento control obteniendo un valor promedio de 1.67 ± 0.82 . El tipo de tejido que conformó esta estructura fue de tipo fibroreticular y lamelar (Figura 5.8-F). No fue posible detectar la formación de una interfase entre el cemento y el tejido neoformado en ningún área de la muestra.

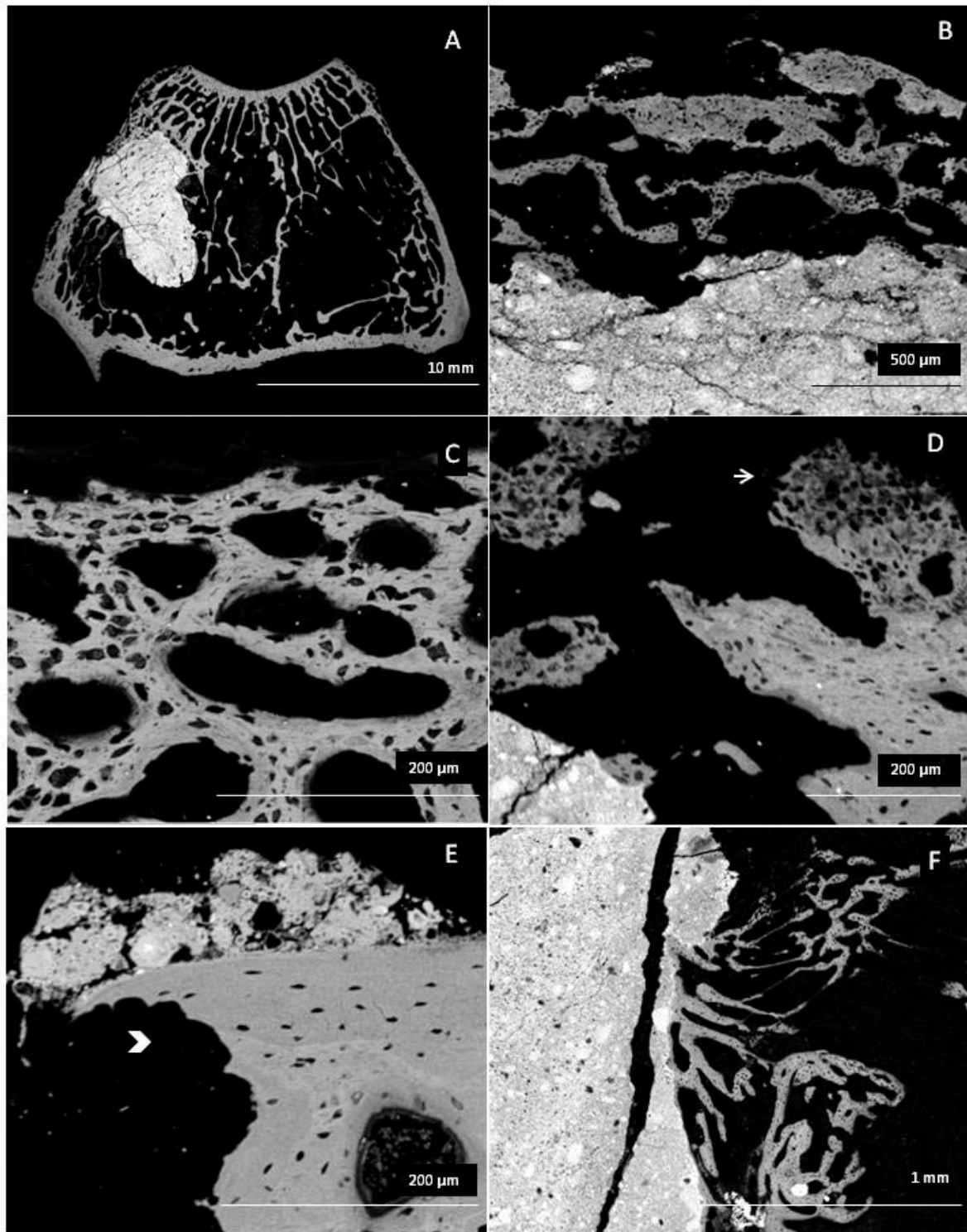


Figura 5.8: Imágenes de M.E.R. del grupo B.1 mes. A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. C: Cortical neoformada. Tejido condroide. D: Cortical neoformada. (→ Cartílago calcificado). E: Remodelación osteoclástica. (➤: Lagunas de Howship). F: Trabeculación central

5.2.1.3. Microesferas de hidroxiapatita

Los defectos óseos y su material de relleno fueron claramente distinguibles ocupando menos de un 50% de la longitud de la superficie paratroclear lateral del fémur.

En el 33% de las muestras se observó corticalización longitudinal completa, sin embargo se encontró una muestra con un comportamiento distinto, en la cual hubo un nivel muy bajo de corticalización, observándose zonas de la cortical original que no presentaban indicios de respuesta de neoformación ósea ni de remodelación. La corticalización presentó un valor de 3.5 ± 1.73 . (Figura 5.9-A).

Insertadas dentro del tejido neoformado se observaron microesferas de hidroxiapatita unidas íntimamente, es decir, no se observó una interfase de separación entre las microesferas y el tejido neoformado (Figura 5.9-B).

El tipo de tejido presente en esta estructura predominantemente fue hueso fibroreticular (Figura 5.9-C), aunque se encontraron pequeños núcleos de tejido condroide y lamelar.

El grosor de la corticalización en este grupo obtuvo una valoración de 4.25 ± 1.5 , siendo el mayor valor de esta característica en todo la serie de evaluación de 1 mes.

Algunas microesferas migraron desde el interior del defecto hacia el exterior sobrepasando en ciertas ocasiones el límite cortical.

En una muestra de este grupo se observó la presencia de una notoria depresión en la ubicación que siguió la cortical nueva con respecto a la cortical original. El valor promedio de esta característica en este grupo fue de 2.8 ± 2.05 .

La reacción perióstica en este grupo fue de tipo proliferativa, presentándose en un 80% de los casos de forma bilateral y de un grosor aproximado de 3 veces la cortical original (Figura 5.9-D). El valor obtenido para esta característica fue de 3.63 ± 1.99 . El tejido óseo encontrado en esta área fue un tejido inmaduro de tipo cartílago calcificado y condroide, observándose en algunas zonas la presencia de un gradiente de calcificación del cartílago.

A mayores aumentos fue posible observar la presencia de pequeñas partículas blancas distribuidas homogéneamente en toda la zona del defecto óseo. El resultado del análisis mediante microanálisis demostró que se trataba de partículas de sales de calcio.

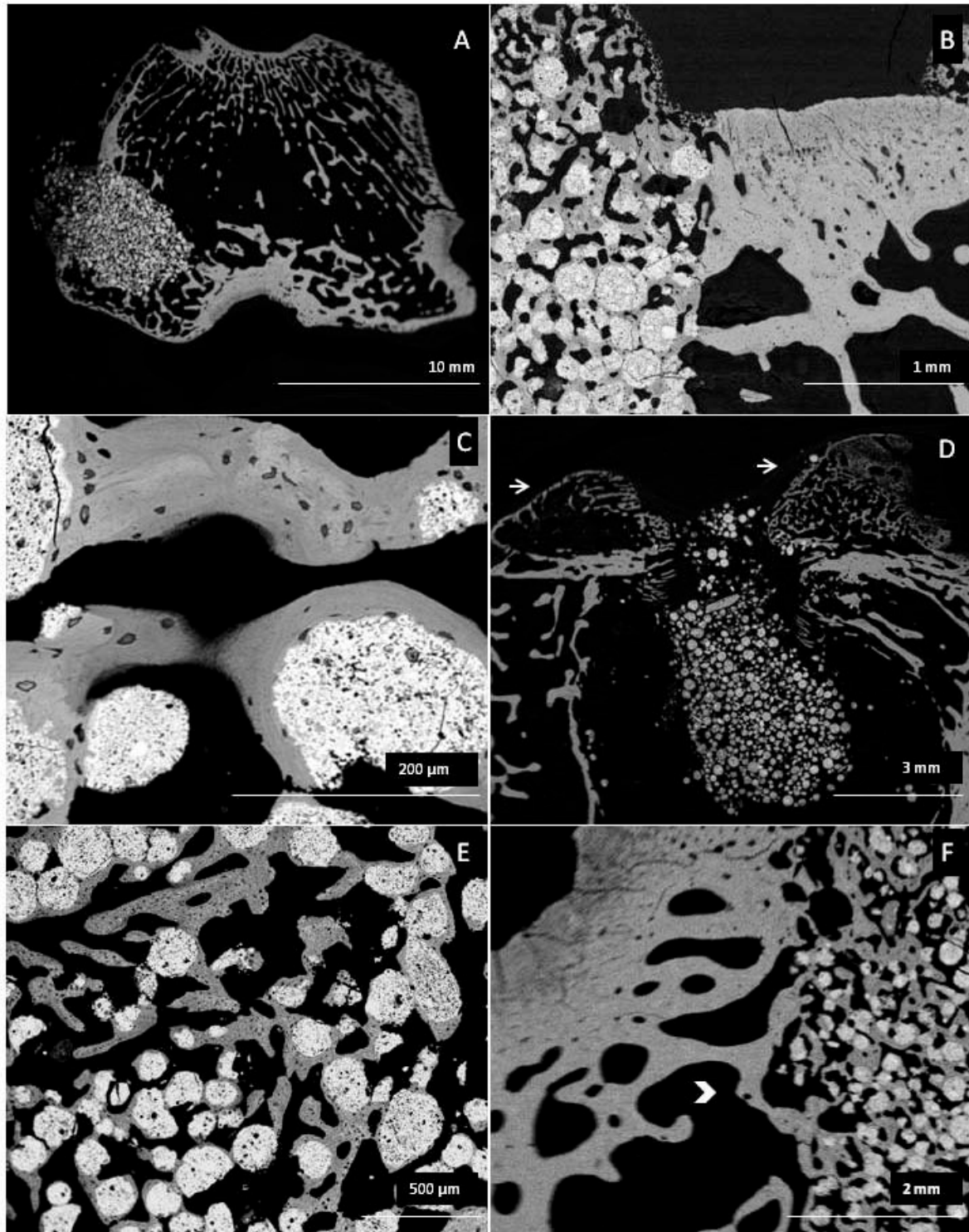


Figura 5.9: Imágenes de M.E.R. del grupo C.1 mes. A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. C: Microesferas de hidroxiapatita insertadas en la cortical neoformada. D: Defecto óseo. (➤ Reacción perióstica bilateral). E: Neoformación de tejido en el núcleo del implante. F: Detalle del borde del defecto óseo (➤ Trabeculación central).

En un 80% de las muestras, el relleno de microesferas se mantuvo relativamente compacto en el interior del defecto, mostrando una distribución homogénea de los espacios vacíos. La compactibilidad de las microesferas en el interior del defecto subcortical obtuvo un valor de 3.6 ± 0.89 .

Las microesferas en el interior del defecto presentaban diversidad con respecto a su tamaño y forma, sin embargo, se observó una notoria tendencia a la esfericidad.

En el 50% de las muestras fue posible observar la formación de tejido entre las microesferas en toda la amplitud del defecto. Este tejido se identificó como tejido condroide y fibroreticular (Figura 5.9-E). La evaluación de la neoformación de tejido en el interior del defecto presentó un valor de 3.2 ± 2.05 . Al igual que en las muestras de cemento, no se observó la formación de una interfase entre el material de implantación y el tejido neoformado.

En este grupo fue posible observar una franja de red trabecular que acompañó a los bordes del defecto en una gran extensión, valorando esta característica con un 3.6 ± 1.95 . El tipo de tejido presente en dicha red fue hueso fibroreticular (Figura 5.9-F). Este tejido presentó un alto grado de continuidad con respecto a su madurez y posición con el tejido neoformado en el interior del implante.

5.2.1.4. Microesferas de hidroxiapatita más colágeno

Los defectos óseos y su material de relleno fueron claramente distinguibles ocupando menos de un 50% del área paratroclear lateral del fémur.

En un bajo porcentaje de muestras (16.67%) se encontró corticalización completa (Figura 5.10-A). La corticalización tuvo un valor de 2.67 ± 1.6 . El tipo de tejido encontrado fue similar al del grupo de las microesferas control, encontrándose por igual tejido condroide y fibroreticular, a pesar de ello se encontraron algunas muestras con tejido lamelar e incluso tendencia a formación de osteonas (Figura 5.10-B, C).

El grosor de la corticalización en este grupo obtuvo un valor promedio de 3.6 ± 1.52 .

La presencia de microesferas insertadas en el tejido de la corticalización fue mucho menos abundante que en el grupo control o incluso nula. Se observaron microesferas en el espacio de corticalización sin recubrimiento de tejido calcificado neoformado.

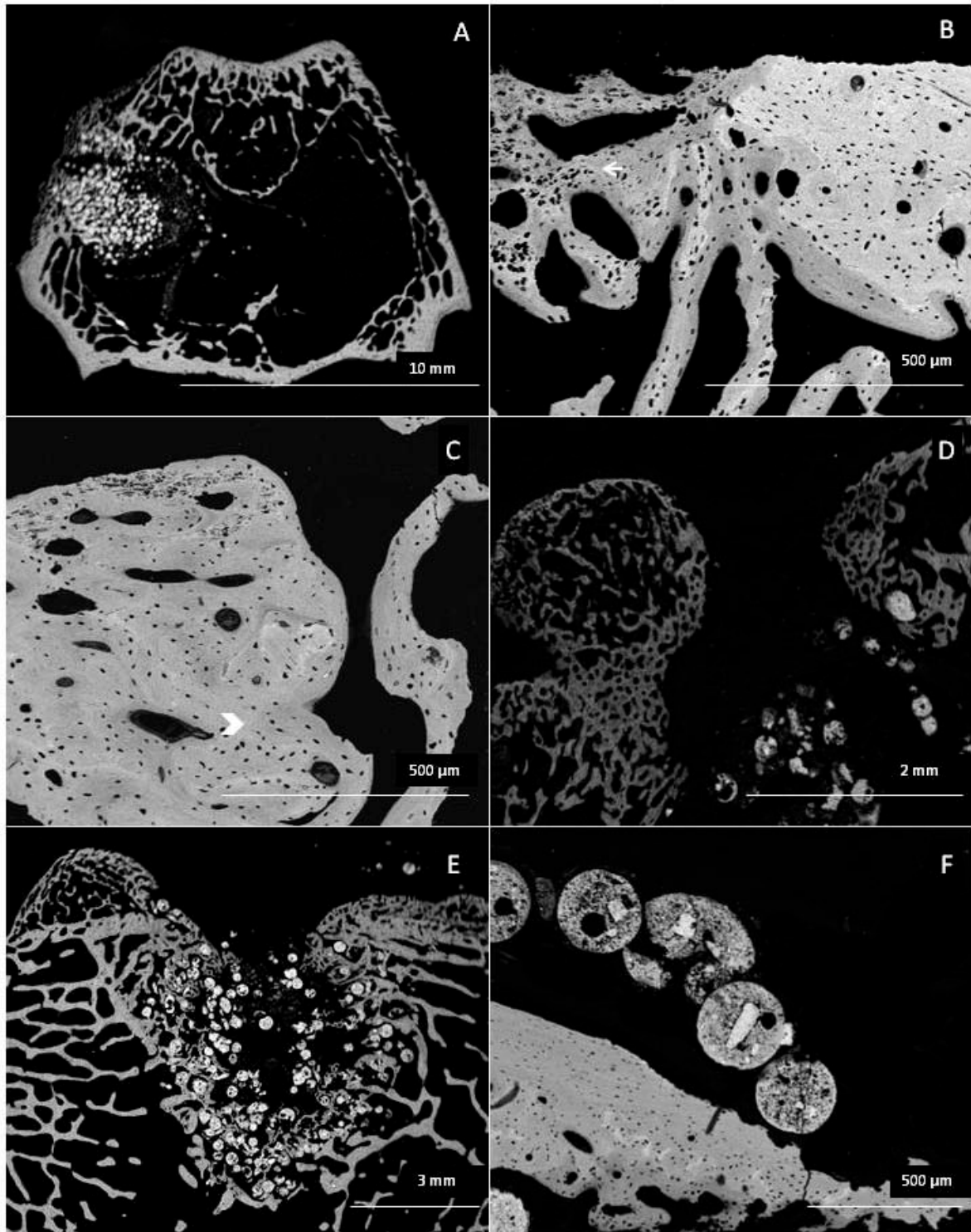


Figura 5.10: Imágenes de M.E.R. del grupo D.1 mes. A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. (➤ : Tejido condroide). C: Cortical neoformada. (➤ : Tejido lamelar). D: Reacción perióstica bilateral de gran extensión. E: Defecto óseo. Pérdida de compactación en el núcleo del implante. F: Microesferas de hidroxiapatita más colágeno. Nótese la homogeneidad en el tamaño y forma.

Al igual que el grupo de microesferas control, se observó la migración de microesferas externamente a la cortical.

A pesar de que tenemos un bajo porcentaje de corticalización lineal completa, se evaluó la presencia de depresión cortical como la tendencia de crecimiento de la nueva cortical y podemos puntuar esta característica con un valor de 2.17 ± 1.72 .

La formación de reacción perióstica en este grupo fue de tipo proliferativa y fue observada en forma bilateral en el 100% de las muestras (Figura 5.10-D). El valor obtenido para esta característica fue de 3 ± 1.35 . Fue el mayor valor observado para esta característica en este intervalo de tiempo. El tejido presente en esta estructura fue hueso fibroreticular y aunque se observó la presencia de tejido condroide, fue en menor medida que en el grupo anterior. Asimismo, la formación de un gradiente de calcificación del cartílago fue observada en menor cantidad de muestras.

La presencia de pequeños fragmentos de microesferas, observada como puntos blancos en toda la zona del defecto y alrededor de él, fue constatada en la mayoría de las muestras, tal como se observó en los otros grupos analizados del estudio.

Se observó una mayor descompactación del material de relleno con respecto al grupo de microesferas control, observándose una mayor diversidad en la distribución de espacios vacíos entre las microesferas y también de la distribución del tejido neoformado (Figura 5.10-E). La compactación del material dentro del defecto subcortical obtuvo el valor de 2.17 ± 0.98 .

Asimismo la neoformación de tejido infiltrativo en el interior del defecto subcortical presentó un valor menor que el del grupo control, siendo de 1.5 ± 1.22 . El tejido que constituía dicha neoformación era de tipo condroide y hueso fibroreticular.

Se observó que las microesferas presentes en el defecto presentaban una gran esfericidad y homogeneidad en su tamaño (Figura 5.10-F), a diferencia del grupo anterior donde se observó que estas dos características presentaban mayor diversidad.

La trabeculación central alcanzó un valor de 2.66 ± 1.21 para este grupo con presencia de tejido fibroreticular.

5.2.1.5. Defecto vacío

Los defectos óseos vacíos fueron claramente distinguibles ocupando menos de un 50% de la longitud de la superficie paratroclear lateral del fémur.

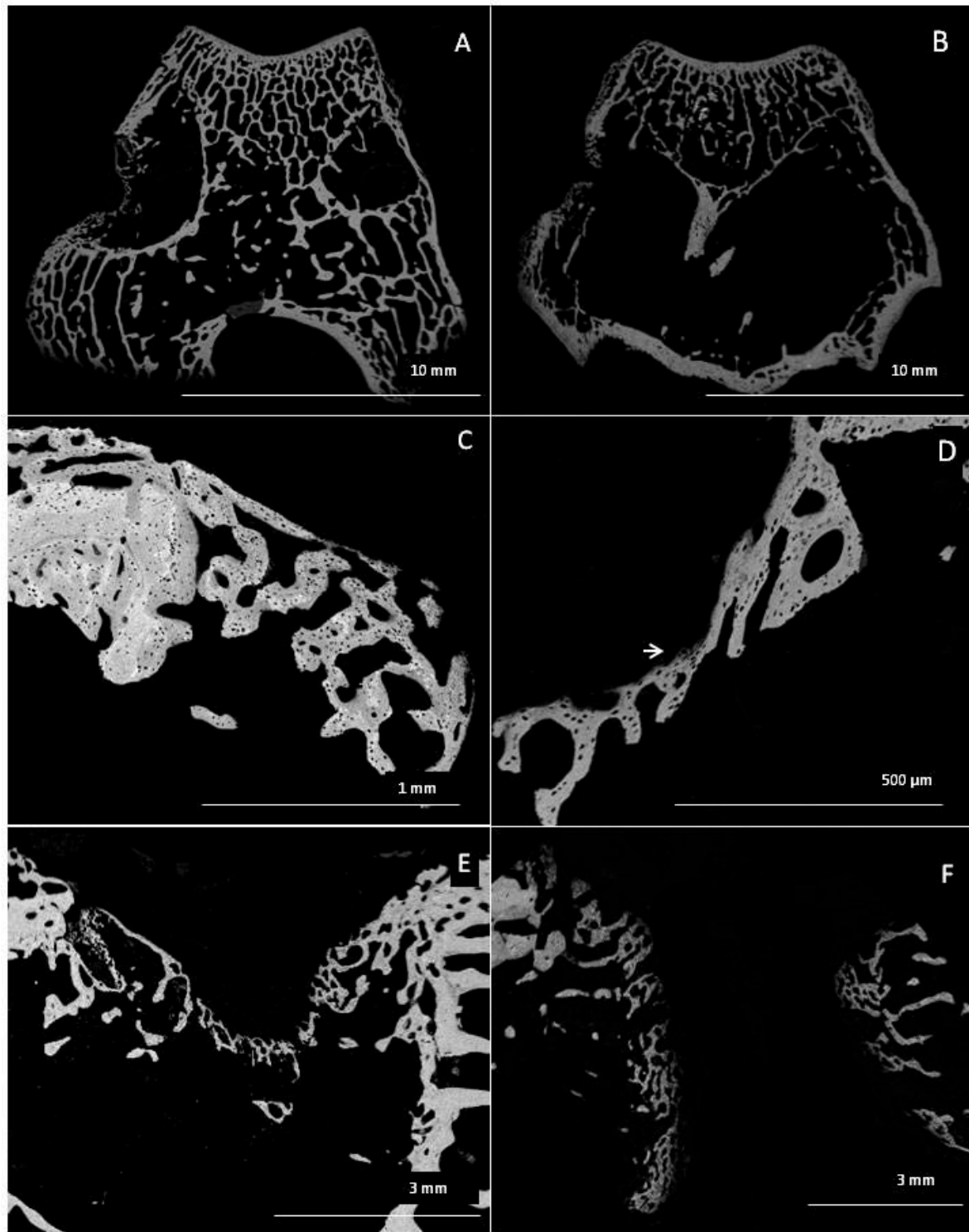


Figura 5.11: Imágenes de M.E.R. del grupo E.1 mes: A, B: Imágenes panorámicas. Nótese la ausencia de reacción perióstica y de recubrimiento intramedular. C, D: Cortical neoformada. → : Tejido óseo fibroreticular. E: Defecto óseo. Formación de depresión cortical notoria. F: Defecto óseo. Muestra con corticalización atípica.

Un 75% de las muestras presentaron corticalización cercana al 100%. A pesar de este alto valor, fue encontrada una muestra que se alejó de la media presentando apenas un 20% de corticalización lineal (Figura 5.11-A, B). La corticalización obtuvo un valor de 3.75 ± 1.89 . El tipo de tejido predominante en esta zona fue hueso fibroreticular, aunque también fue encontrado tejido condroide (Figura 5.11-C, D). El grosor de la corticalización obtuvo un valor de 2 ± 0.82 . Siendo el menor obtenido para esta característica en este intervalo de tiempo.

La forma que adoptó la nueva cortical en un 80% de los casos fue a un nivel más profundo que la cortical original, formando una depresión cortical en distintas intensidades, con un máximo de 2 veces el grosor de la cortical original (Figura 5.11-E). El valor obtenido para esta característica fue de 4.25 ± 0.96 siendo el mayor valor obtenido en toda la serie.

La formación de reacción perióstica fue observada en este grupo en forma ligera y la mayoría de las veces fue unilateral. El mayor volumen que se observó fue de 1 vez el grosor de la cortical original. El valor obtenido para esta característica fue de 0.5 ± 0.5 . El tejido presente en la reacción perióstica fue clasificado como hueso fibroreticular y tejido condroide en algunas zonas más externas; no se observó la presencia de un gradiente de calcificación del cartílago como en otros grupos de la serie de tiempo.

En este grupo se constató la mínima presencia de trabeculado en la zona subcortical del defecto a diferencia de todos los otros grupos de la serie que presentaron esta característica en distintas intensidades (Figura 5.11-A, B).

Se observó una muestra con corticalización atípica debido a que la corticalización lineal fue nula pero presentó formación de tejido fibroreticular acompañando los bordes del defecto hacia el interior de la muestra, a pesar de ello, esta muestra no fue excluida de los análisis realizados (Fig. 5.11-F)

Todos los resultados expuestos en este apartado se resumen en la tabla 5.1

Tabla 5.1: Resultados evaluación semicuantitativa grupo de 1 mes

1 mes		Cemento	Cemento colágeno	Microesferas	Microesferas colágeno	Vacío
Tipo de tejido		Fibroreticular	Condroide	Fibroreticular	Condroide Fibroreticular	Fibroreticular
Corticalización	Media	2.08	2.92	3.5	2.67	3.75
	Desv. est	1.46	1.8	1.76	1.6	1.89
Grosor de la corticalización	Media	2.5	3.2	4.25	3.6	2
	Desv. est	0.84	1.63	1.5	1.52	0.82
Depresión	Media	1.16	1.16	2.8	2.17	4.25
	Desv. est	0.98	0.75	2.05	1.72	0.96
Reacción perióstica	Media	1.66	0.92	3.63	3	0.5
	Desv. est	1.12	1.56	1.99	1.35	0.5
del relleno	Media	3.67	4.5	3.6	2.17	0
	Desv. est	1.75	0.55	0.89	0.98	0
Infiltración central	Media	0.33	0	3.2	1.5	0
	Desv. est	0.82	0	2.05	1.22	0
Trabeculación central	Media	3.16	1.67	3.6	2.66	0
	Desv. est	1.47	0.82	1.95	1.21	0

5.2.2. Resultados de la serie de muestras de 3 meses

5.2.2.1. Cemento de fosfato de calcio

Se observó corticalización completa en el 66, 67% de los casos obteniéndose una valoración media de 4.16 ± 1.29 para esta característica. El valor mínimo en este parámetro fue de un 2.5 en el 33, 34% de los casos (Figura 5.12-A). Esto marcó una diferencia con la serie anterior donde se observaron muestras que presentaban una corticalización incipiente. El tejido óseo predominante presente en estas estructuras fue de tipo fibroreticular, aunque se encontraron algunas muestras con presencia de tejido lamelar en pequeñas cantidades (Figura 5.12-B). Se observaron pequeños núcleos de cemento insertados en el tejido neoformado.

El grosor de la corticalización obtuvo un valor de 2.5 ± 1.22 . La cortical neoformada solo presentó una leve desviación interna con respecto a la posición de la cortical original, obteniendo un valor para la formación de la depresión cortical de $1,33 \pm 1.75$ (Figura 5.12-C).

A mayores aumentos y al igual que sucedía en las muestras de 1 mes, se observó la presencia de pequeños fragmentos de cemento libres en toda la extensión de la muestra (Figura 5.12-D).

Se observó formación de reacción perióstica en un 20% de las muestras, de baja intensidad, presentando un volumen máximo de 1.5 veces el grosor de la cortical original, el tejido presente en esta estructura fue de tipo fibroreticular aunque en las zonas más externas se encontraron pequeños islotes de tejido condroide. El valor obtenido para esta característica fue de 0.67 ± 0.89 .

El relleno de cemento perdió compactibilidad en la zona más externa del defecto en el 100% de las muestras, observándose neoformación de tejido óseo en estas zonas, a diferencia de las zonas centrales de los bloques de cemento donde no se observó formación de tejido (Figura 5.12-E). Este tejido óseo de infiltración fue de tipo fibroreticular e incluso se encontraron pequeñas islas de tejido óseo lamelar distribuidas uniformemente, la valoración de esta característica fue de 1 ± 0.89 .

En una muestra se observó la pérdida de gran cantidad de material de relleno, pero dada la forma que adoptaron los residuos presentes en el defecto, se concluyó que está pérdida se debió al proceso laboratorial y que se mantuvo *in situ* durante todo el periodo del estudio, por lo tanto, para analizar la puntuación obtenida por el grupo para la compactación del material no fue tomada en cuenta, el valor obtenido para esta característica fue de 3.4 ± 1.52 .

La formación de trabeculado centromedular que acompañó los bordes del defecto obtuvo un valor de 2.08 ± 1.74 , este tejido fue compuesto en su mayoría por tejido óseo fibroreticular y lamelar (Figura 5.12-F).

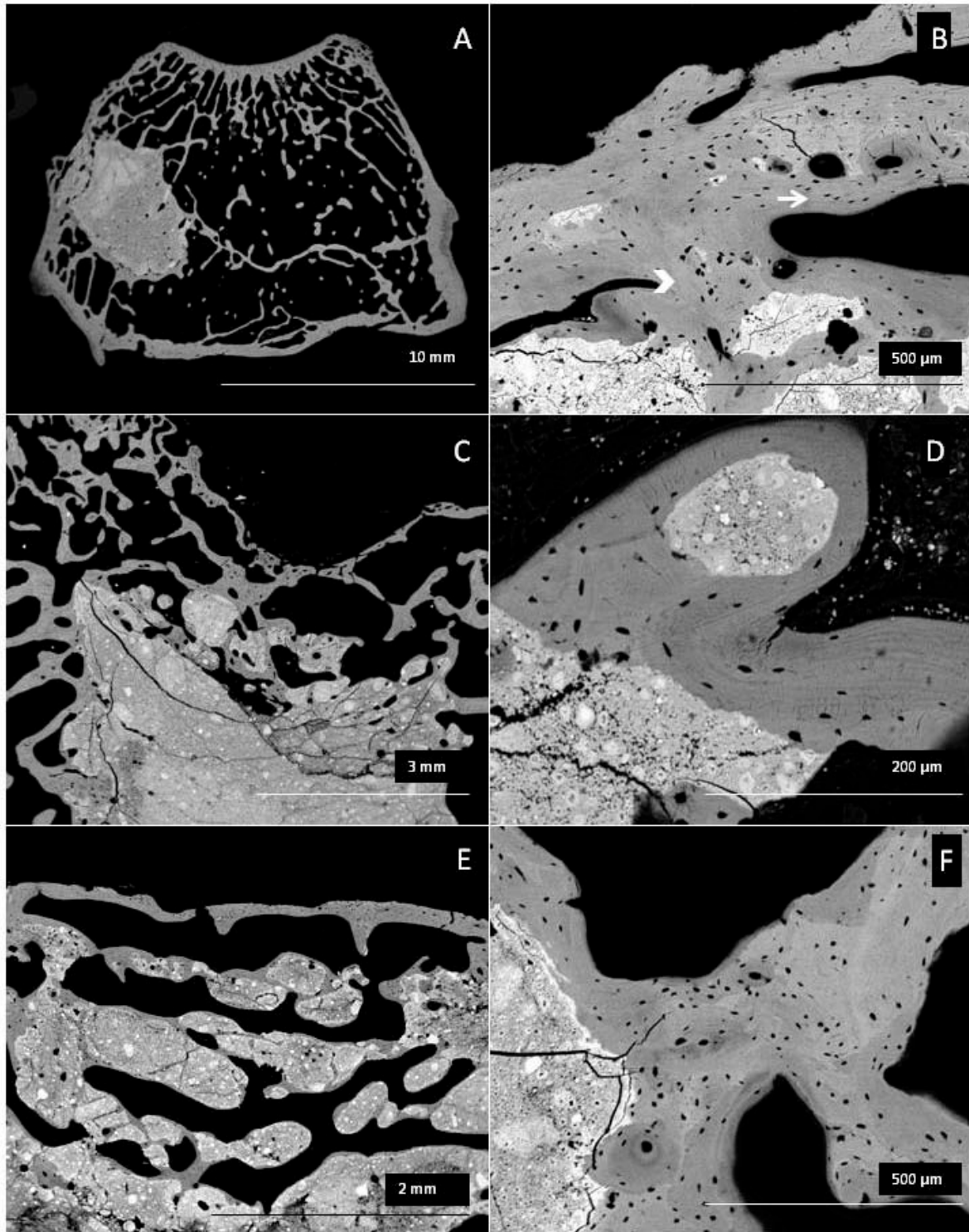


Figura 5.12: Imágenes de M.E.R. del grupo A.3 meses: A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. (→ : Tejido óseo lamelar) (➤: Tejido óseo fibroreticular). C: Formación de depresión cortical. D: Sales de calcio disgregadas sobre la muestra. E: Neoformación de tejido óseo entre el cemento descompactado. F: Trabeculación central. Tejido óseo lamelar y osteonal

5.2.2.2. Cemento de fosfato de calcio más colágeno

En el 66,67% de los casos se observó corticalización completa del defecto obteniéndose una valoración media de 3.75 ± 1.94 para esta característica (Figura 5.13-A). Esta valoración se vio afectada por la presencia de una muestra que presentó un grado de corticalización incipiente.

Sin embargo, la evaluación por la madurez del tejido fue mayor que en el grupo de cemento control debido a que a pesar de existir un predominio de tejido óseo fibroreticular, se observó con mayor frecuencia la presencia de hueso lamelar. Se observaron fragmentos de cemento insertados dentro del tejido neoformado de la cortical, pero en menor cantidad que en el grupo de cemento control (Figura 5.13-B). Esta característica no fue observada en los grupos de cementsos de la serie de 1 mes.

Asimismo, el grosor de la corticalización fue mayor que en el grupo anterior, obteniendo una puntuación de 2.75 ± 0.99 . Esta tendencia en los valores fue similar a los resultados de la serie de 1 mes.

La formación de depresión cortical fue ligeramente mayor que el grupo de cemento control, obteniendo un valor de 1.3 ± 1.75 (Figura 5.13-C).

La presencia de reacción perióstica no fue observada en ninguna muestra.

La pérdida de compactibilidad del cemento en la zona de la cortical externa fue observada solamente en un 16.67% de las muestras, a diferencia del grupo de cemento control de 3 meses donde fue observada en todas las muestras del grupo. La compactibilidad del material obtuvo un valor de 3.5 ± 0.55 para este grupo, este valor fue ligeramente mayor que el grupo de cemento control de esta misma serie. En las muestras donde se produjo separación de las partículas de cemento, también fue constatada la presencia de neoformación de hueso de tipo fibroreticular y tejido condroide entre el cemento disgregado (Figura 5.13-D). Sin embargo, al igual que en este mismo grupo de la serie de un mes, en ninguna de las muestras se observó crecimiento de hueso en el interior del núcleo de cemento.

Tal y como se observó en la serie de un mes, en muchas muestras de este grupo fue constatada la actividad osteoclástica mediante la formación de lagunas de Howship en las corticales en remodelación (Figura 5.13-E).

La formación de trabeculado centromedular fue ligeramente mayor que en el grupo de cemento control, obteniendo un valor de 1.91 ± 1.47 . Este tejido fue compuesto en su mayoría por hueso fibroreticular y lamelar (Figura 5.13-F).

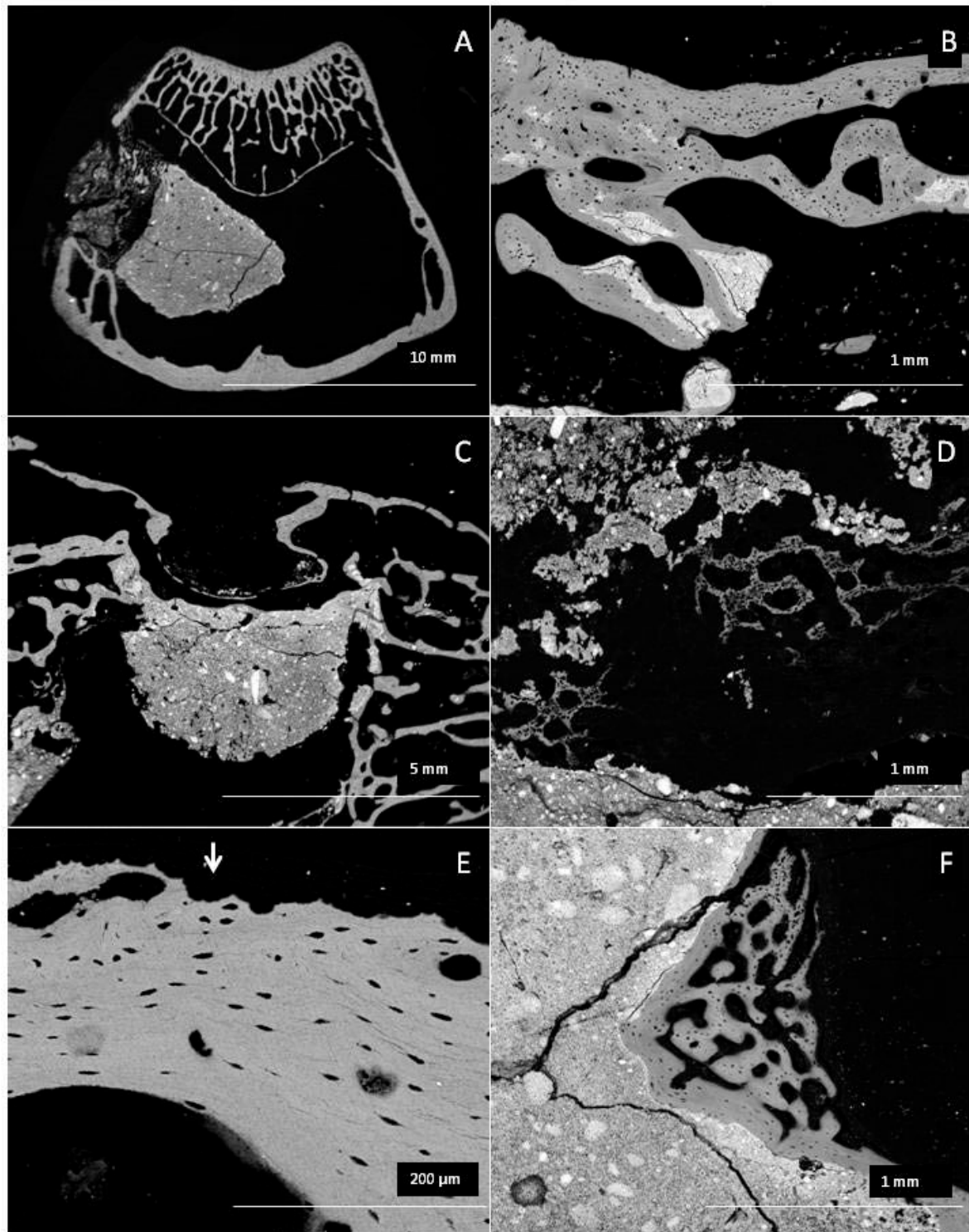


Figura 5.13: Imágenes de M.E.R. del grupo B.3 meses. A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. Nótese la presencia de fragmentos de cemento en el tejido. C: Formación de depresión cortical. D: Neoformación de tejido óseo entre el cemento descompactado. E: Remodelación osteoclástica. \downarrow : Lagunas de Howship . F: Trabeculación central. Tejido óseo fibroreticular y osteonal.

5.2.2.3. Microesferas de hidroxiapatita

Se observó corticalización completa en un 83.34 % de los casos (Figura 5.14-A), obteniendo una valoración media de 4.25 ± 1.84 para esta característica.

Tal como había sucedido en algunos de los grupos analizados, se observó una muestra dentro del grupo que presentó un comportamiento de corticalización distinto a la mayoría del grupo obteniendo una valoración mucho menor al promedio grupal, en este caso un valor de 2 contra un 5, presentado por el resto de las muestras.

En este grupo el tipo de tejido predominante en las corticales neoformadas fue hueso fibroreticular, aunque se encontraron zonas con hueso lamelar en algunas muestras (Figura 5.14-B, C).

En todas las muestras se observó la presencia de microesferas insertadas en la cortical neoformada y algunas microesferas migradas externamente a la cortical neoformada.

El grosor de la corticalización obtuvo una calificación de 3.5 ± 1.87 , fue el mayor valor obtenido en toda la serie de 3 meses, aunque es un 20% menor al valor obtenido por el mismo grupo de la serie de 1 mes.

La formación de depresión cortical fue irregular ya que se observó una gran depresión en un 33% de las muestras (Figura 5.14-D), pero en el resto fue bastante ligera, el valor medio obtenido para esta característica fue de 2 ± 1.67 .

La presencia de reacción perióstica fue observada en el 33.33% de los casos con un volumen máximo de 1.5 veces el grosor de la cortical original. La valoración de esta característica fue de 0.42 ± 0.67 . El tejido presente en esta estructura fue hueso fibroreticular, a diferencia de los grupos de un mes que presentaban tejidos más inmaduros e incluso con presencia de gradientes de calcificación de tejido cartilaginoso.

En un 50% de las muestras se observó homogeneidad en la compactación del relleno y en la formación de espacios vacíos en el interior del defecto subcortical, en el otro 50% se observaron zonas con pérdida de relleno en forma irregular dentro del defecto. La evaluación de la compactabilidad del relleno del defecto obtuvo un valor de 2.83 ± 0.82 .

En este grupo se observó crecimiento de tejido óseo en el interior del defecto tanto en los bordes como en el núcleo del defecto. Este tejido fue de tipo fibroreticular y lamelar (Figura 5.14-E). El valor obtenido para la infiltración de tejido neoformado en el interior del defecto subcortical fue de 2.67 ± 1.21 .

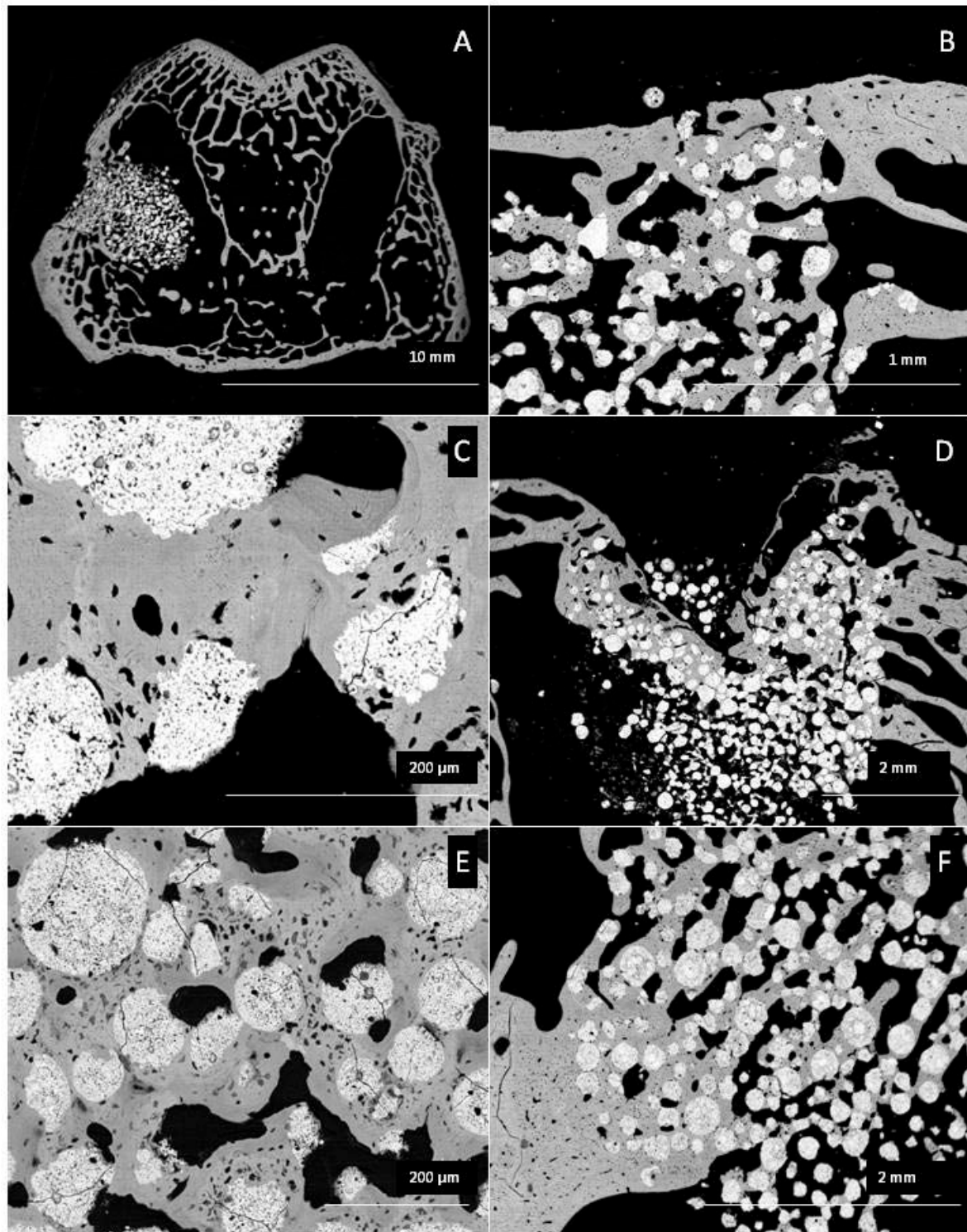


Figura 5.14: Imágenes de M.E.R. del grupo C.3 meses. A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. Nótese la presencia de microesferas en su espesor. C: Detalle de una cortical neoformada. Tejido óseo fibroreticular. D: Formación de depresión cortical. E: Neoformación de tejido óseo fibroreticular en el núcleo del implante. Nótese la heterogeneidad en el tamaño y forma de las microesferas de hidroxipatita. F: Trabeculación central. Nótese la continuidad entre este tejido y el de infiltración central del núcleo del implante.

Se observó que las microesferas presentaban una gran heterogeneidad con respecto al tamaño y esfericidad (Figura 5.14-E).

Asimismo se observó la formación de trabeculado en los bordes del defecto subcortical en forma incompleta y continuidad entre este tejido y el de infiltración central en el núcleo del implante tanto en su madurez como en su posición (Figura 5.14-F). El valor medio del recubrimiento centromedular fue de 2.08 ± 1.02 . Este valor fue un 20% menor al valor obtenido por el mismo grupo en la serie de 1 meses.

5.2.2.4. Microesferas de hidroxiapatita más colágeno

En el 50% de los casos se observó corticalización completa, sin embargo el promedio para esta característica fue de 4.4 ± 2.04 , siendo el mayor valor encontrado en esta serie de datos (Figura 5.15-A). El tipo de tejido que predominantemente conformó esta estructura fue hueso fibroreticular, aunque también fueron encontradas algunas zonas de hueso lamelar distribuidas en forma aleatoria.

Se observó la presencia de microesferas integradas en el tejido de la nueva cortical, pero fue en menor medida que en el grupo control (Figura 5.15-B, C).

La migración externa de microesferas se observó en el 50% de las muestras aunque de manera sutil.

El valor para el grosor de la corticalización en este grupo fue de 3 ± 1.52 , este valor fue un 10% menor que el valor del grupo de microesferas control.

Nuevamente observamos que la formación de depresión cortical sufrió un comportamiento irregular debido a que en un 33.33% la depresión fue de gran magnitud, sin embargo en un 50% de las muestras se observó remodelación anatómica sin depresión. El valor medio de esta característica fue de 1.83 ± 2.43 .

Se observó la presencia de reacción perióstica bilateral en el 16.67% de los casos con un volumen máximo de 2.5 veces el de la cortical original y una valoración de 0.33 ± 0.89 . El tejido presente en esta estructura fue hueso fibroreticular aunque se encontró un núcleo de tejido condroide en el centro de una de ellas.

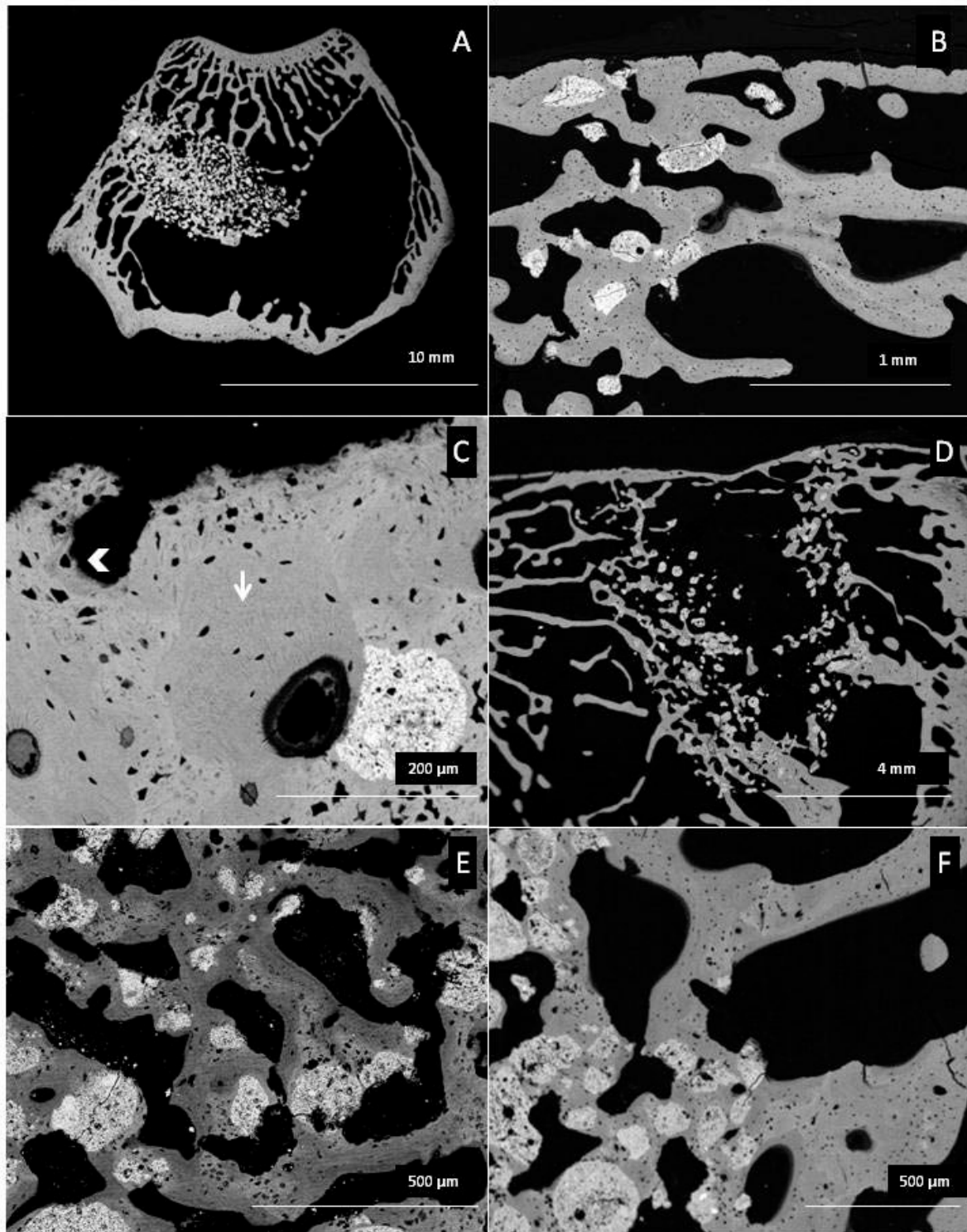


Figura 5.15: Imágenes de M.E.R. del grupo D.3 meses. A: Imagen panorámica. B: Cortical neoformada. Nótese la presencia de microesferas en su espesor. C: Detalle de una cortical neoformada. → : Tejido lamelar. ➤Tejido óseo fibroreticular. D: Pérdida de en el núcleo del implante. E: Neoformación de tejido óseo fibroreticular en el núcleo del implante. Nótese la heterogeneidad en el tamaño y forma de las microesferas de hidroxapatita. F: Trabeculación central. Nótese la continuidad entre este tejido y el tejido de infiltración central del núcleo del implante.

Tal como se observó en el grupo anterior, se encontró pérdida del relleno de microesferas, obteniendo un valor medio de 1.92 ± 1.36 para esta característica (Figura 5.15-D). En este grupo se observó una mayor pérdida de relleno que en el grupo anterior.

Se observó crecimiento de tejido óseo neoformado entre las microesferas en el interior del defecto obteniendo un valor 2.25 ± 1.94 . El tejido predominante encontrado en esta zona fue hueso fibroreticular, aunque también se encontraron islas de tejido óseo lamelar (Figura 5.15-E).

En este grupo se observó alta diversidad en el tamaño y forma de las microesferas, a diferencia de lo observado en el mismo grupo de la serie de 1 mes, donde fue evidente la esfericidad de las microesferas.

La formación de trabeculado centromedular fue menor que en el grupo anterior, obteniendo un valor de 1.92 ± 1.5 , el tipo de tejido óseo encontrado en esta estructura fue fibroreticular y lamelar, este tejido presentó continuidad con el tejido óseo neoformado en el interior del implante (Figura 5.15-E).

Dentro de este grupo se observó una muestra que salió completamente de las tendencias generales del grupo debido a que presentó una corticalización mínima, cercana al 10%, con una fuerte tendencia a la formación de depresión cortical y pérdida casi completa del relleno de las microesferas. Asimismo se observó la ausencia total de recubrimiento centromedular. Los valores obtenidos en esta muestra igualmente fueron considerados para calcular los valores medios para cada característica del grupo.

5.2.2.5. Defecto vacío

En un 50% de las muestras se observó corticalización completa con un valor medio para esta característica de 4.5 ± 0.71 (Figura 5.16-A, B). El tipo de tejido predominante en esta estructura fue hueso fibroreticular aunque se encontraron núcleos de tejido condroide y de hueso lamelar en algunas muestras (Figura 5.16-C, D). El tejido condroide fue escaso en los otros grupos de esta serie del estudio. En este grupo obtuvimos la mayor valoración del crecimiento lineal de la corticalización y por otro lado, el grosor, obtuvo el menor valor, puntuando con un 2.25 ± 1.5 (Figura 5.16-E). El valor medio de la formación de depresión fue de 2 ± 0.82 . Aunque este valor es del mismo orden que los últimos 3 grupos descritos, se observaron valores más homogéneos en su intensidad dentro del grupo.

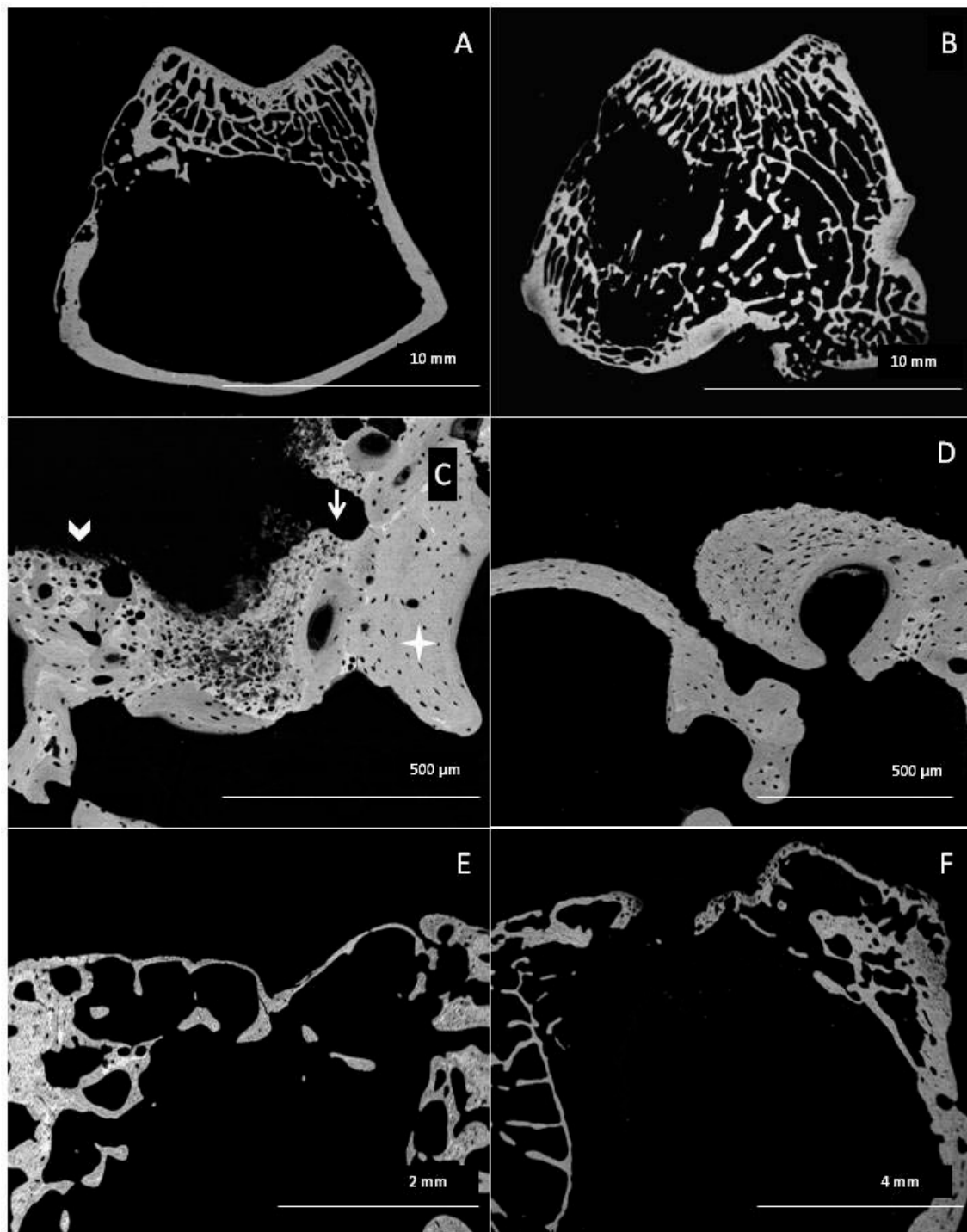


Figura 5.16: Imágenes de M.E.R. del grupo E.3 meses: A, B: Imágenes panorámicas. C, D: Cortical neoformada. (→ : Tejido óseo fibroreticular) (➤: Tejido condroide)(✦: Tejido lamelar) E: Defecto óseo. Nótese el mínimo grosor de la cortical neoformada. F: Defecto óseo. Nótese la ausencia de reacción perióstica y de recubrimiento intramedular

En este grupo no fue observada la presencia de reacción perióstica peri-defecto, de neoformación de tejido en el núcleo del defecto ni de trabeculado centromedular (Figura 5.16-F). Este resultado es similar al obtenido en el mismo grupo de la serie de 1 mes.

Todos los resultados expuestos en este apartado se resumen en la tabla 5.2. Para facilitar la comprensión de estos resultados, se repetirán también los datos de la evaluación semicuantitativa de 1 mes entregados en la tabla 5.1.

Tabla 5.2: Resultados evaluación semicuantitativa ambos bloques de tiempo

1 mes		Cemento	Cemento colágeno	Microesferas	Microesferas colágeno	Vacío
Tipo de tejido		Fibroreticular	Condroide	Fibroreticular	Condroide Fibroreticular	Fibroreticular
Corticalización	Media	2.08	2.92	3.5	2.67	3.75
	Desv. est	1.46	1.8	1.76	1.6	1.89
Grosor de la corticalización	Media	2.5	3.2	4.25	3.6	2
	Desv. est	0.84	1.63	1.5	1.52	0.82
Depresión	Media	1.16	1.16	2.8	2.17	4.25
	Desv. est	0.98	0.75	2.05	1.72	0.96
Reacción perióstica	Media	1.66	0.92	3.63	3	0.5
	Desv. est	1.12	1.56	1.99	1.35	0.5
del relleno	Media	3.67	4.5	3.6	2.17	0
	Desv. est	1.75	0.55	0.89	0.98	0
Infiltración central	Media	0.33	0	3.2	1.5	0
	Desv. est	0.82	0	2.05	1.22	0
Trabeculación central	Media	3.16	1.67	3.6	2.66	0
	Desv. est	1.47	0.82	1.95	1.21	0
3 meses		Cemento	Cemento colágeno	Microesferas	Microesferas colágeno	Vacío
Tipo de tejido		Fibroreticular	Fibroreticular Lamelar	Fibroreticular Lamelar	Fibroreticular	Fibroreticular
Corticalización	Media	4.16	3.75	4.25	4.4	4.5
	Desv. est	1.29	1.94	1.84	2.04	0.71
Grosor de la corticalización	Media	2.5	2.75	3.5	3	2.25
	Desv. est	1.22	0.99	1.87	1.52	1.5
Depresión	Media	1.16	1.3	2	1.82	2
	Desv. est	1.47	1.75	1.67	2.43	0.82
Reacción perióstica	Media	0.67	0	0.42	0.33	0
	Desv. est	0.89	0	0.67	0.89	0
Compactibilidad del relleno	Media	3.5	3.5	2.83	1.92	0
	Desv. est	1.52	0.55	0.82	1.36	0
Infiltración central	Media	1	0	2.67	2.25	0
	Desv. est	0.89	0	1.21	1.94	0
Trabeculación central	Media	2.08	1.91	2.08	1.92	0
	Desv. est	1.74	1.47	1.02	1.5	0

5.3. Resultados de la evaluación histomorfométrica de las imágenes

5.3.1. Resultados de la serie de muestras de 1 mes

5.3.1.1. Cemento de fosfato de calcio

En este grupo el porcentaje de relleno del área de la corticalización fue un 42.07%. Este valor incluye el material retenido en este espacio y el tejido neoformado, por lo tanto si lo descomponemos en retención de material y tejido neoformado, encontramos que un 22.27% correspondió a tejido neoformado y el 77.73% correspondió a material implantado en el área de corticalización.

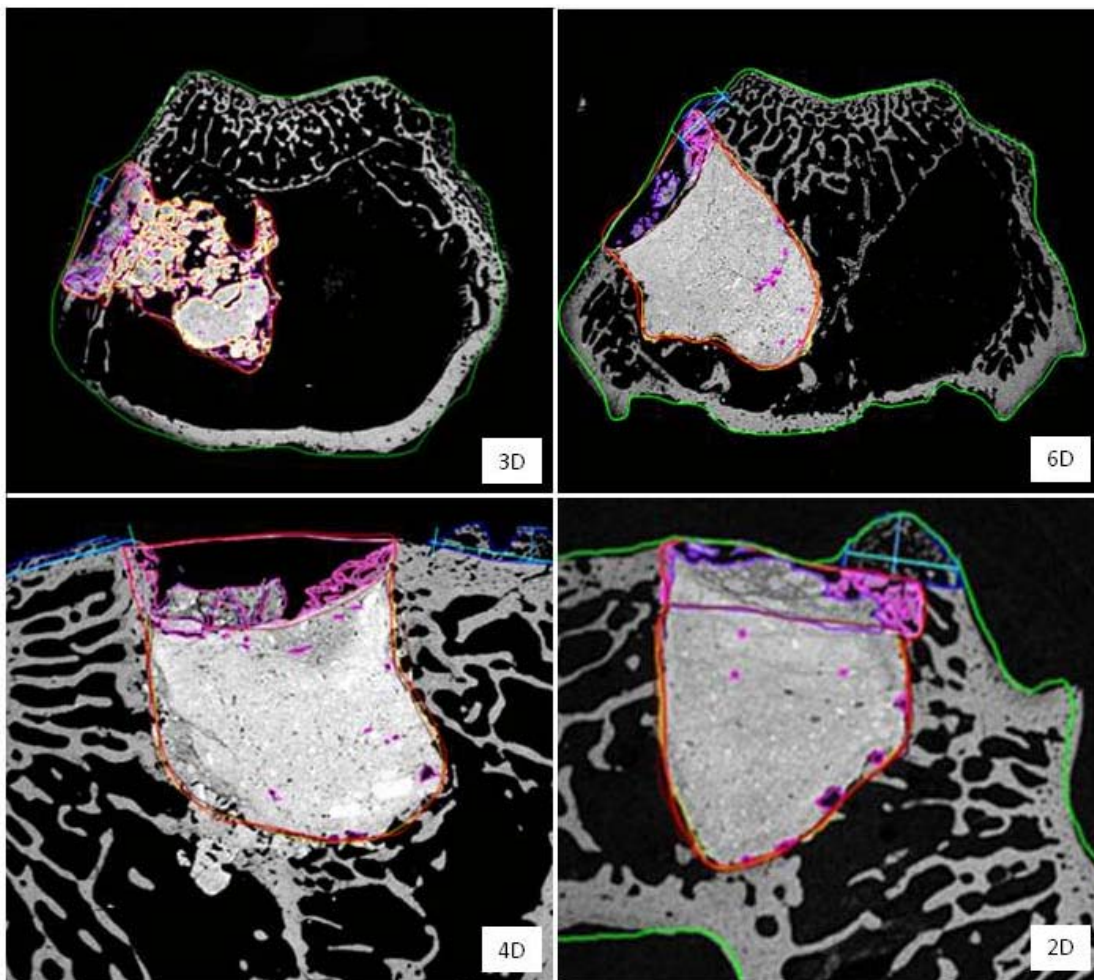


Figura 5.17: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo A. 1mes

Con respecto al crecimiento cortical lineal obtuvimos un valor de 34.37% y un índice de calidad de la corticalización de un 27.27%. El tejido neoformado en el interior del defecto fue completamente nulo. La retención de material subcortical fue de 80.95%.

Por otra parte, en este grupo se encontró una cantidad moderada de crecimiento trabecular en los bordes del defecto, con un 41.2% de recubrimiento centromedular.

En la tabla 5.3 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.3: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo A de 1 mes

Grupo A (Cemento) 1 mes			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	6,69	1,02	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	0,63	0,38	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	1,60	1,50	
Material del implante dentro de la corticalización	2,19	1,34	
Depresión cortical	1,12	1,30	
Recubrimiento centromedular	6,94	1,69	
Superficie lineal del defecto en la medular	16,84	6,02	
Espacios vacíos dentro del defecto	3,69	4,72	
Material dentro del defecto	20,31	12,42	
Material migrado extracortical	0,00	0,00	
Tejido neoformado en el interior del defecto	0,00	0,00	
Hipertrofia periostio 1	1,23	0,90	
Altura reacción perióstica 1	0,69	0,44	
Anchura reacción perióstica 1	2,31	0,75	
Hipertrofia periostio 2	0,71	1,07	
Altura reacción perióstica 2	0,28	0,39	
Anchura reacción perióstica 2	1,22	1,68	
Defecto total	32,11	12,09	
Área total de la muestra	195,80	16,76	
Defecto subcortical	25,09	10,40	
Longitud corticalización	1,83	1,32	
Anchura defecto	5,32	0,76	
% Relleno área de corticalización			42,07
% Tejido neoformado en la corticalización			9,37
% Material retenido en la corticalización			32,7
Índice de calidad de la corticalización			27,27
% Corticalización lineal			34,37
% Tejido neoformado en el interior del implante			0
% Material retenido subcortical			80,95
% Recubrimiento subcortical			39,42

5.3.1.2. Cemento de fosfato de Calcio más colágeno

El porcentaje de relleno del área de corticalización de fue de 37.5%. La descomposición de este valor indicó que un el porcentaje de material retenido fue de 58.56% y el tejido neoformado fue de 43.41%. El porcentaje de crecimiento lineal de la nueva cortical obtuvo un valor de 50.62%. El índice de calidad de la corticalización fue de 32.15%. En este grupo se observó una mínima cantidad de tejido neoformado de infiltración en el defecto con un valor de 0.33% del total del área del defecto subcortical. La retención de material en el área subcortical del defecto fue de 94.88%. En este grupo se encontró una baja cantidad de crecimiento trabecular centromedular en los bordes del defecto, obteniendo un porcentaje de recubrimiento centromedular de 26.4%.

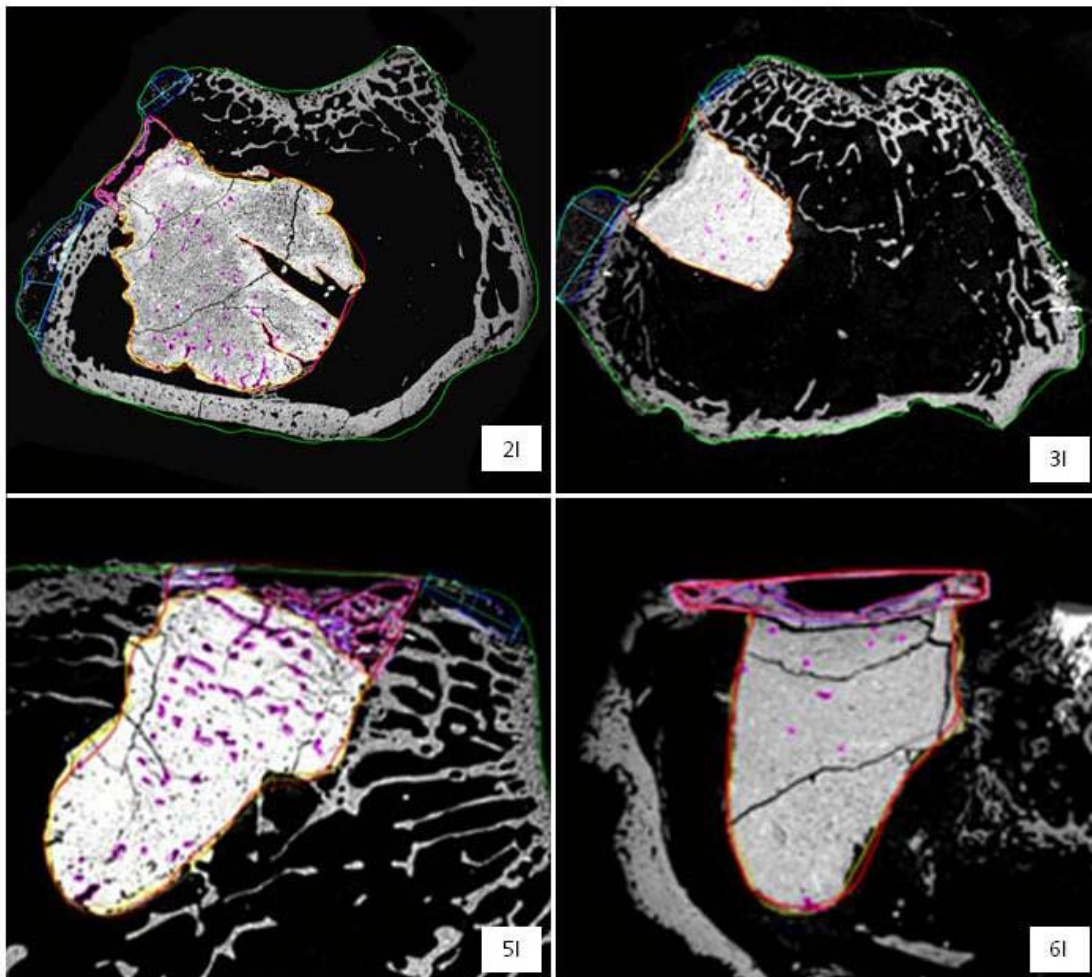


Figura 5.18. Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo B. 1mes

En la tabla 5.4 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.4: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo B de 1 mes

Grupo B (Cemento mas colágeno) 1 mes			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	4,43	1,36	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	0,75	0,51	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	1,70	1,10	
Material del implante dentro de la corticalización	0,70	0,61	
Depresión cortical	1,14	1,75	
Recubrimiento centromedular	4,94	4,00	
Superficie lineal del defecto en la medular	18,36	5,31	
Espacios vacíos dentro del defecto	1,33	1,70	
Material dentro del defecto	29,53	11,52	
Material migrado extracortical	0,00	0,00	
Tejido neoformado en el interior del defecto	0,00	0,00	
Hipertrofia periostio 1	1,84	1,76	
Altura reacción perióstica 1	0,64	0,52	
Anchura reacción perióstica 1	2,85	2,33	
Hipertrofia periostio 2	0,37	0,75	
Altura reacción perióstica 2	0,23	0,46	
Anchura reacción perióstica 2	0,51	1,02	
Defecto total	35,36	13,12	
Área total de la muestra	207,20	23,36	
Defecto subcortical	31,10	13,60	
Longitud corticalización	2,42	1,82	
Anchura defecto	4,77	1,00	
% Relleno área de corticalización			37,5
% Tejido neoformado en la corticalización			16,28
% Material retenido en la corticalización			21,22
Índice de calidad de la corticalización			32,15
% Corticalización lineal			50,62
% Tejido neoformado en el interior del implante			0,33
% Material retenido subcortical			94,88
% Recubrimiento subcortical			26,4

5.3.1.3. Microesferas de hidroxiapatita

El porcentaje de relleno del área de la corticalización fue de 26.06%, de los cuales, el 60.9% correspondió a tejido neoforado en la cortical y el 39.1 fue material retenido. Observamos que en este grupo hubo un 76,41% de crecimiento lineal de tejido en el área de la corticalización. El índice de calidad de la corticalización fue 20.77%.

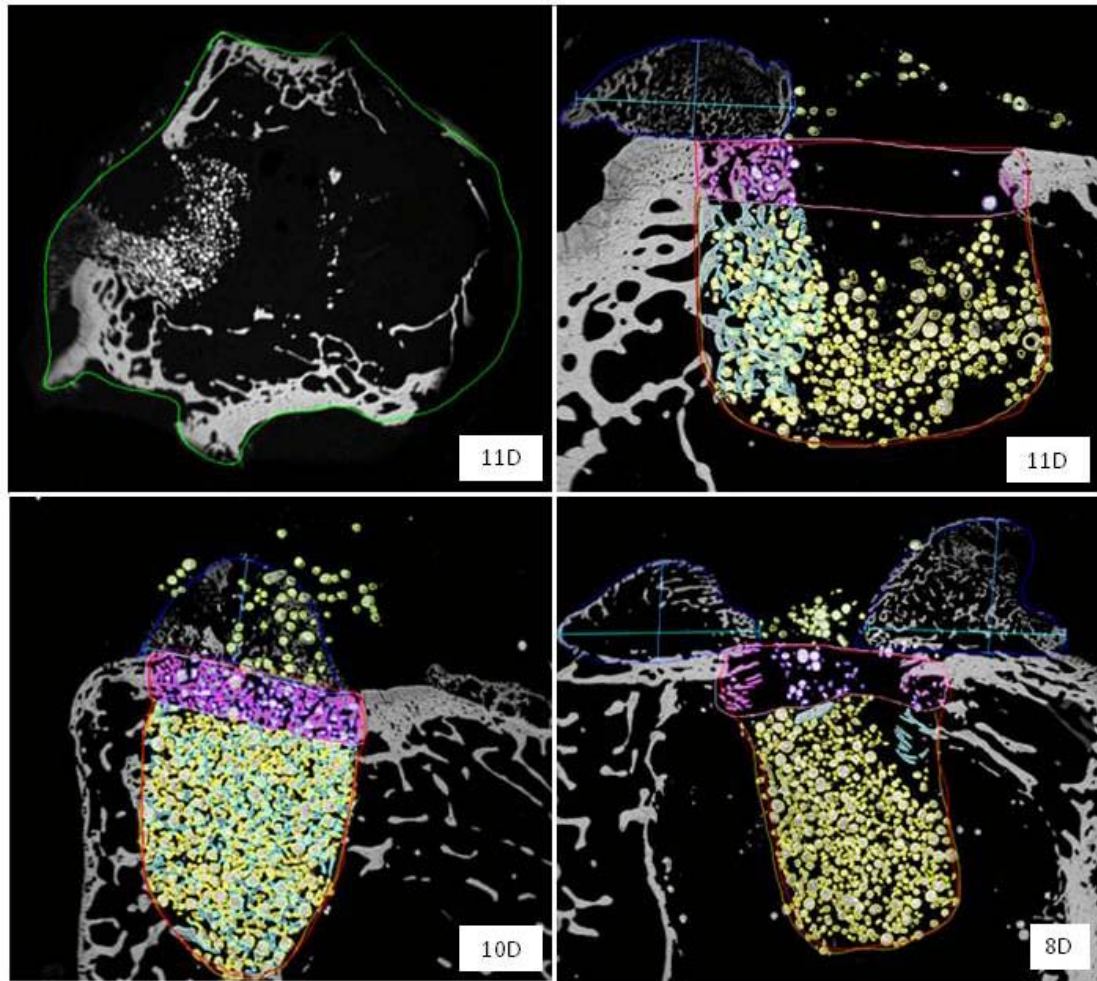


Figura 5.19: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo C. 1mes

El tejido neoformado en el área subcortical del defecto fue de un 7.23% y la retención de material fue de 28.58%. Se obtuvo un recubrimiento por trabeculación centromedular de un 48.64%

En la tabla 5.5 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.5: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo C de 1 mes

Grupo C (Microesferas de hidroxiapatita) 1 mes			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	6,75	2,75	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	1,07	0,35	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	3,99	2,42	
Material del implante dentro de la corticalización	0,69	0,47	
Depresión cortical	1,00	2,24	
Recubrimiento centromedular	6,25	5,43	
Superficie lineal del defecto en la medular	12,86	3,54	
Espacios vacíos dentro del defecto	13,41	5,56	
Material dentro del defecto	5,97	3,73	
Material migrado extracortical	0,40	0,45	
Tejido neoformado en el interior del defecto	1,51	0,98	
Hipertrofia periostio 1	6,13	3,03	
Altura reacción perióstica 1	1,82	0,68	
Anchura reacción perióstica 1	4,89	1,66	
Hipertrofia periostio 2	3,23	6,09	
Altura reacción perióstica 2	0,82	1,55	
Anchura reacción perióstica 2	2,04	2,80	
Defecto total	26,65	11,19	
Área total de la muestra	199,15	23,54	
Defecto subcortical	20,89	9,20	
Longitud corticalización	3,00	1,16	
Anchura defecto	3,93	1,12	
% Relleno área de corticalización			26,06
% Tejido neoformado en la corticalización			15,87
% Material retenido en la corticalización			10,19
Índice de calidad de la corticalización			20,77
% Corticalización lineal			76,41
% Tejido neoformado en el interior del implante			7,23
% Material retenido subcortical			28,58
% Recubrimiento subcortical			48,64

5.3.1.4. Microesferas de hidroxiapatita más colágeno

El porcentaje de relleno del área de la corticalización alcanzó un 28,97%, de los cuales, el 25,92% correspondió a material retenido y el 74,08% correspondió a tejido óseo. El crecimiento lineal fue de 66,75% en este grupo, con un índice de calidad de la corticalización de 32,16%. El tejido neoformado en la porción subcortical del defecto obtuvo un valor de 6,05%. La retención de material subcortical fue de 15,44%. El porcentaje de recubrimiento centromedular en este grupo fue el de 53,82%.

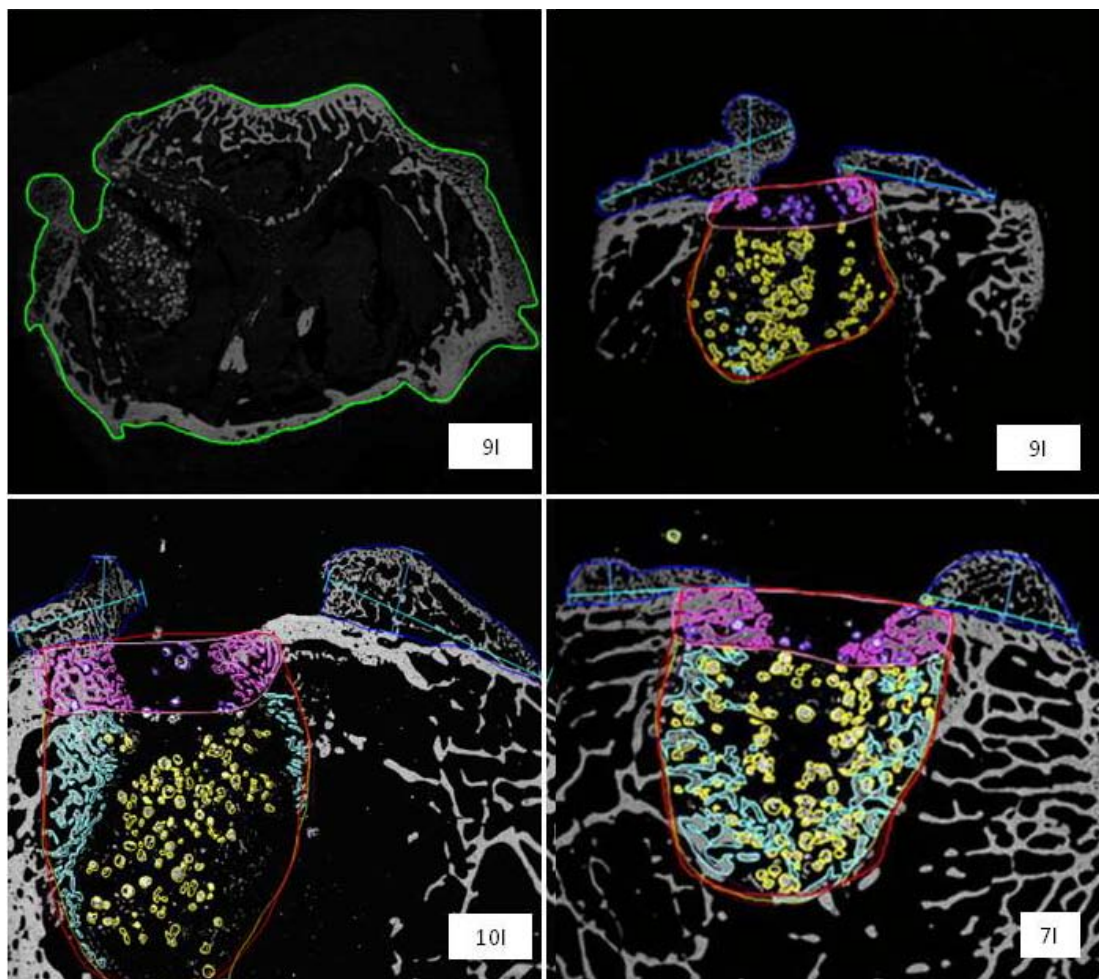


Figura 5.20: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo D. 1mes

En la tabla 5.6 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.6: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo D de 1 mes

Grupo D (Microesferas de hidroxiapatita más colágeno) 1 mes			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	5,93	2,18	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	1,27	0,85	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	4,22	1,54	
Material del implante dentro de la corticalización	0,45	0,46	
Depresión cortical	0,00	0,00	
Recubrimiento centromedular	5,95	5,32	
Superficie lineal del defecto en la medular	13,16	2,61	
Espacios vacíos dentro del defecto	16,55	5,16	
Material dentro del defecto	3,32	1,02	
Material migrado extracortical	0,15	0,24	
Tejido neoformado en el interior del defecto	1,30	1,74	
Hipertrofia periostio 1	3,12	1,55	
Altura reacción perióstica 1	1,08	0,43	
Anchura reacción perióstica 1	4,48	2,61	
Hipertrofia periostio 2	3,42	2,77	
Altura reacción perióstica 2	1,24	0,86	
Anchura reacción perióstica 2	3,40	2,07	
Defecto total	27,36	7,58	
Área total de la muestra	183,90	58,79	
Defecto subcortical	21,17	6,55	
Longitud corticalización	3,36	1,10	
Anchura defecto	5,03	0,78	
% Relleno área de corticalización			28,97
% Tejido neoformado en la corticalización			21,46
% Material retenido en la corticalización			7,51
Índice de calidad de la corticalización			32,16
% Corticalización lineal			66,75
% Tejido neoformado en el interior del implante			6,05
% Material retenido subcortical			15,44
% Recubrimiento subcortical			53,81

5.3.1.5. Defecto vacío

El porcentaje de relleno del área de la corticalización fue de 22.39%, íntegramente formado por tejido neoformado. Por otra parte, el crecimiento lineal de la corticalización alcanzó un valor de 85.87% del total y el índice de calidad de la corticalización fue de 26.13%. En este grupo el tejido neoformado en la zona subcortical del defecto fue de 1,32% y el valor del ecubrimiento trabecular centromedular fue de 26.99%.

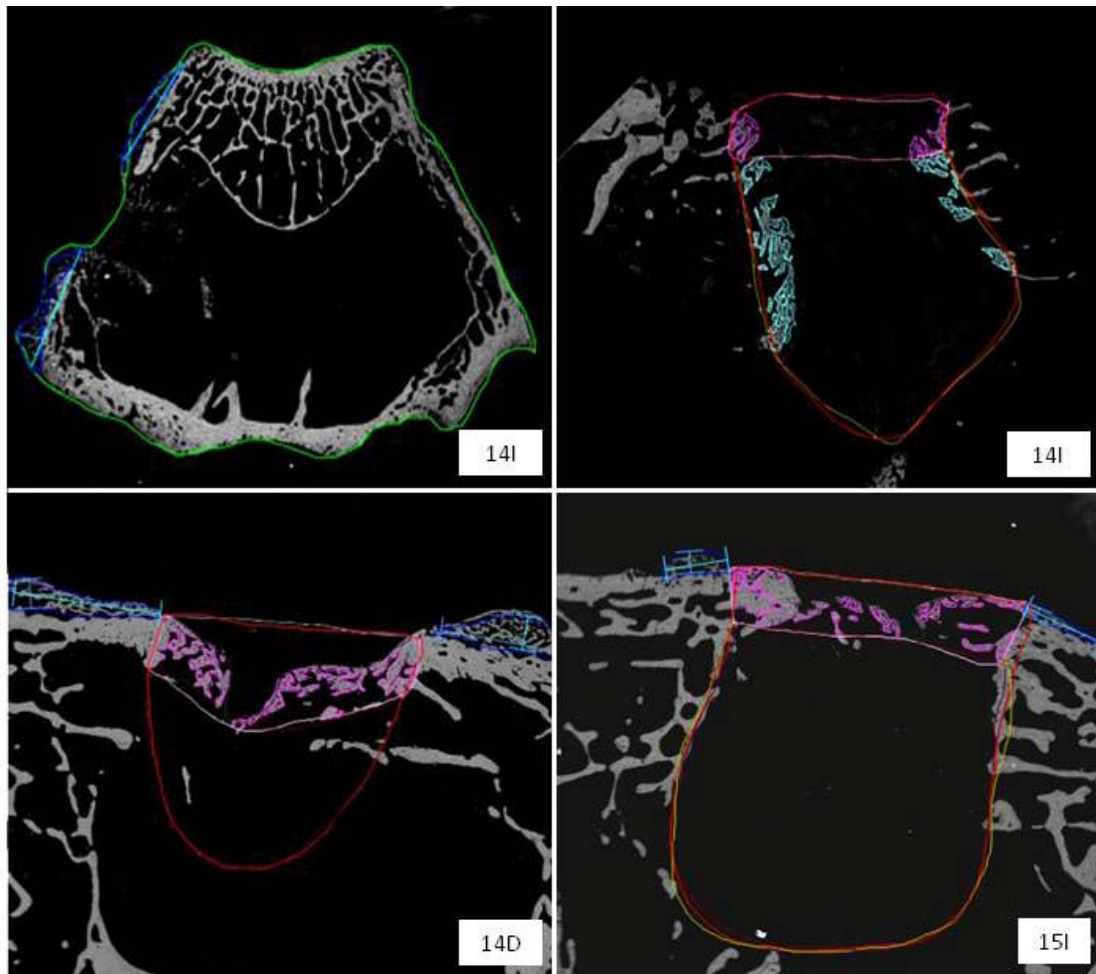


Figura 5.21. Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo E. 1mes

En la tabla 5.7 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.7: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo E de 1 mes

Grupo E (Defecto vacío) 1 mes			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	6,00	3,60	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	1,34	0,99	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	2,59	0,95	
Material del implante dentro de la corticalización			
Depresión cortical	2,07	1,80	
Recubrimiento centromedular	3,39	2,55	
Superficie lineal del defecto en la medular	12,19	2,32	
Espacios vacíos dentro del defecto	18,92	8,74	
Material dentro del defecto			
Material migrado extracortical			
Tejido neoformado en el interior del defecto	0,25	0,29	
Hipertrofia periostio 1	2,17	1,93	
Altura reacción perióstica 1	1,38	1,10	
Anchura reacción perióstica 1	2,99	2,54	
Hipertrofia periostio 2	0,48	0,58	
Altura reacción perióstica 2	0,22	0,26	
Anchura reacción perióstica 2	1,61	1,97	
Defecto total	25,53	11,22	
Área total de la muestra	174,85	64,45	
Defecto subcortical	19,17	8,58	
Longitud corticalización	3,89	2,04	
Anchura defecto	4,55	1,27	
% Relleno área de corticalización			22,39
% Tejido neoformado en la corticalización			22,39
% Material retenido en la corticalización			
Índice de calidad de la corticalización			26,13
% Corticalización lineal			85,87
% Tejido neoformado en el interior del implante			1,32
% Material retenido subcortical			
% Recubrimiento subcortical			21,41

5.3.1.6 Análisis comparativo

En este apartado se presentará un resumen gráfico de los resultados entregados anteriormente y de las relaciones existentes entre algunos parámetros.

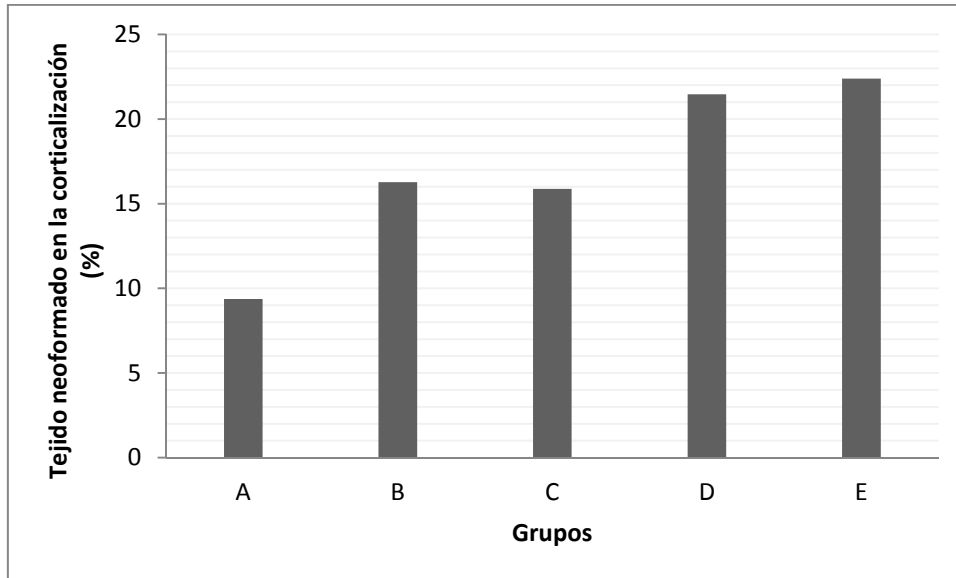


Gráfico 5.1: Tejido neoformado en el área de corticalización serie de 1 mes

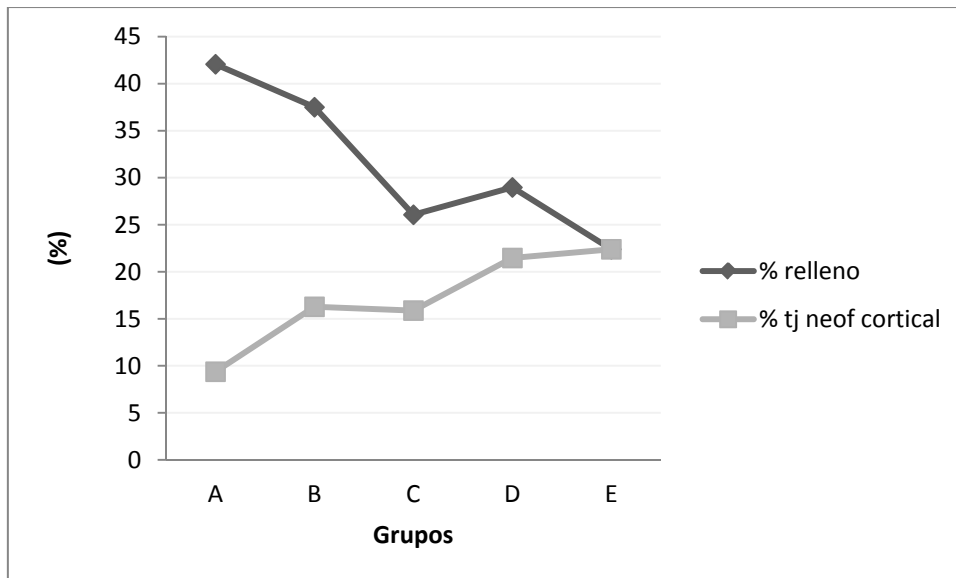


Gráfico 5.2: Relación entre el % de relleno cortical y la cantidad de tejido neoformado para la serie de 1 mes de evolución

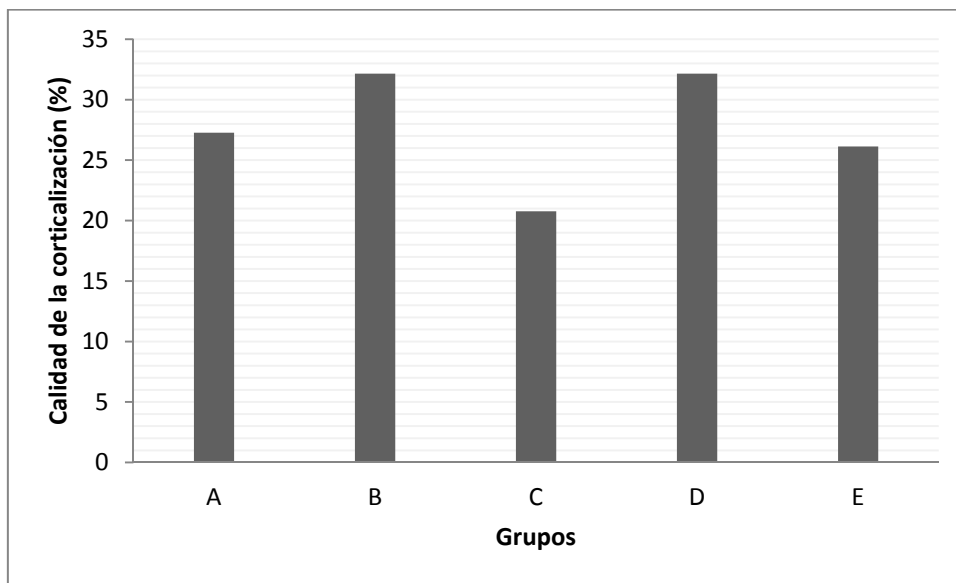


Gráfico 5.3: Índice de calidad de la corticalización serie de 1 mes

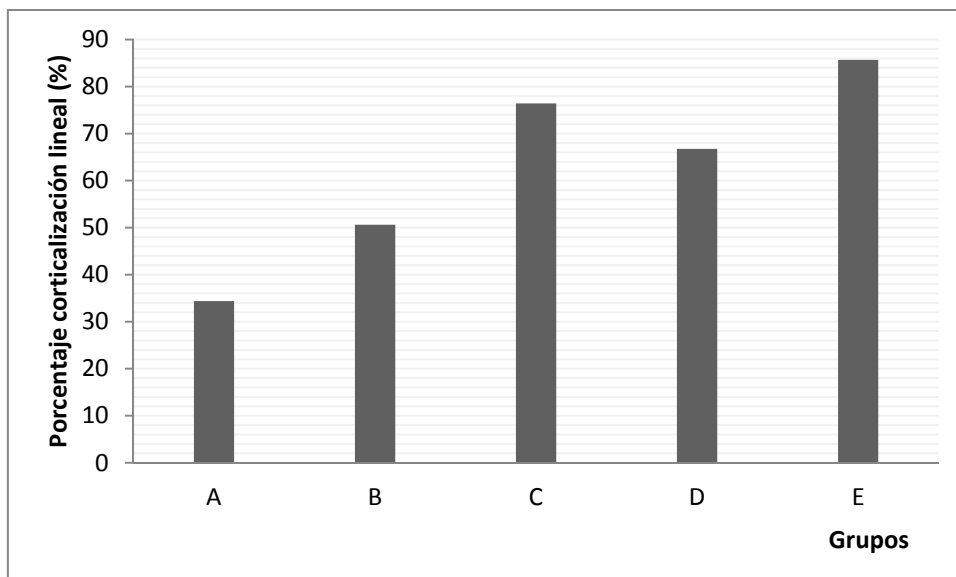


Gráfico 5.4: Corticalización lineal serie de 1 mes

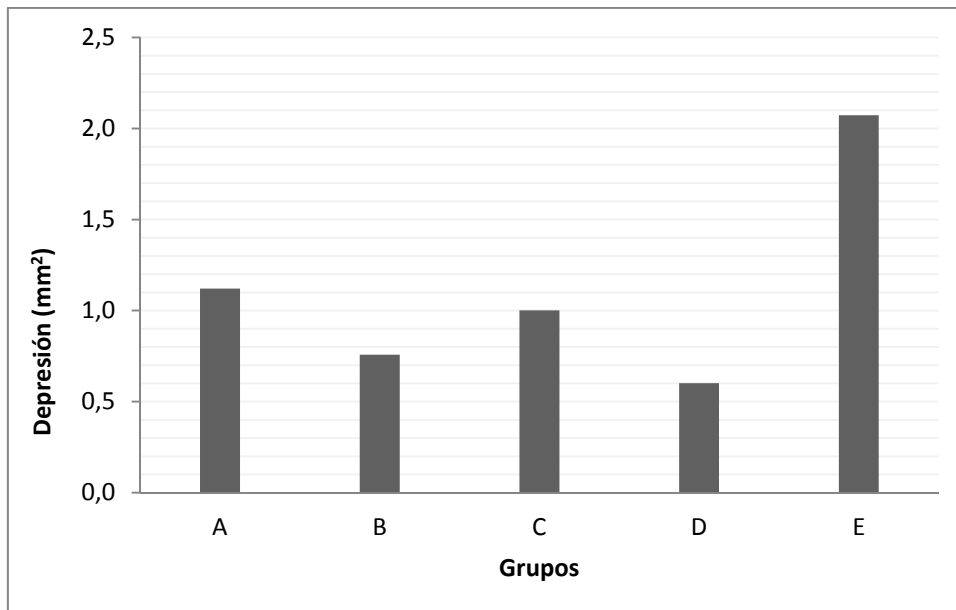


Gráfico 5.5: Formación de depresión cortical serie de 1 mes

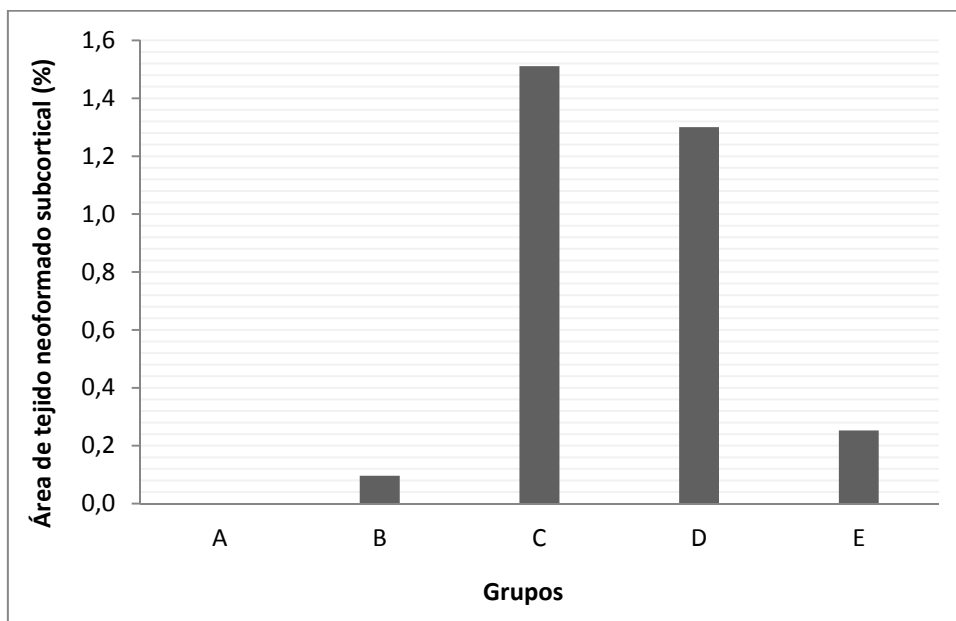


Gráfico 5.6: Neoformación de tejido óseo en el núcleo del defecto subcortical serie de 1 mes

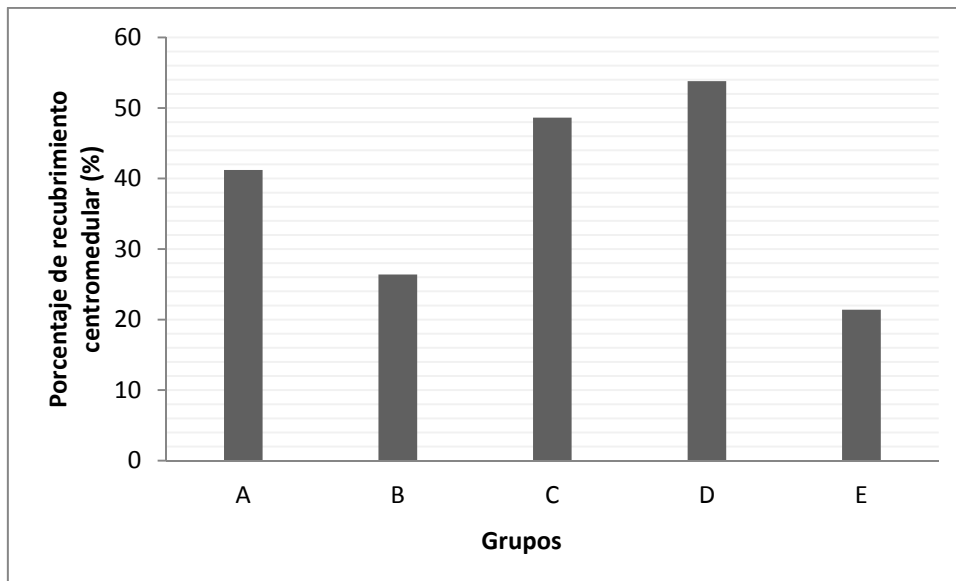


Gráfico 5.7: Neoformación de tejido trabecular alrededor de los bordes del defecto serie de 1 mes

5.3.2. Resultados de la serie de muestras de 3 meses

5.3.2.1. Cemento de fosfato de calcio

El porcentaje de relleno del área de la corticalización fue de 33.5%, de los cuales un 61.76% correspondió a tejido neoforado y el 38.23% correspondió a material retenido en el área de la corticalización. El crecimiento lineal de la corticalización alcanzó el valor de 75.57% con un índice de calidad de la corticalización de 27.38%. En el área subcortical se observó una mínima cantidad de tejido neoforado, alcanzando un valor de 2.9%. La permanencia del material en el área subcortical obtuvo un valor de 62.05%. En este grupo se observó un 34.16% de recubrimiento trabecular centromedular.

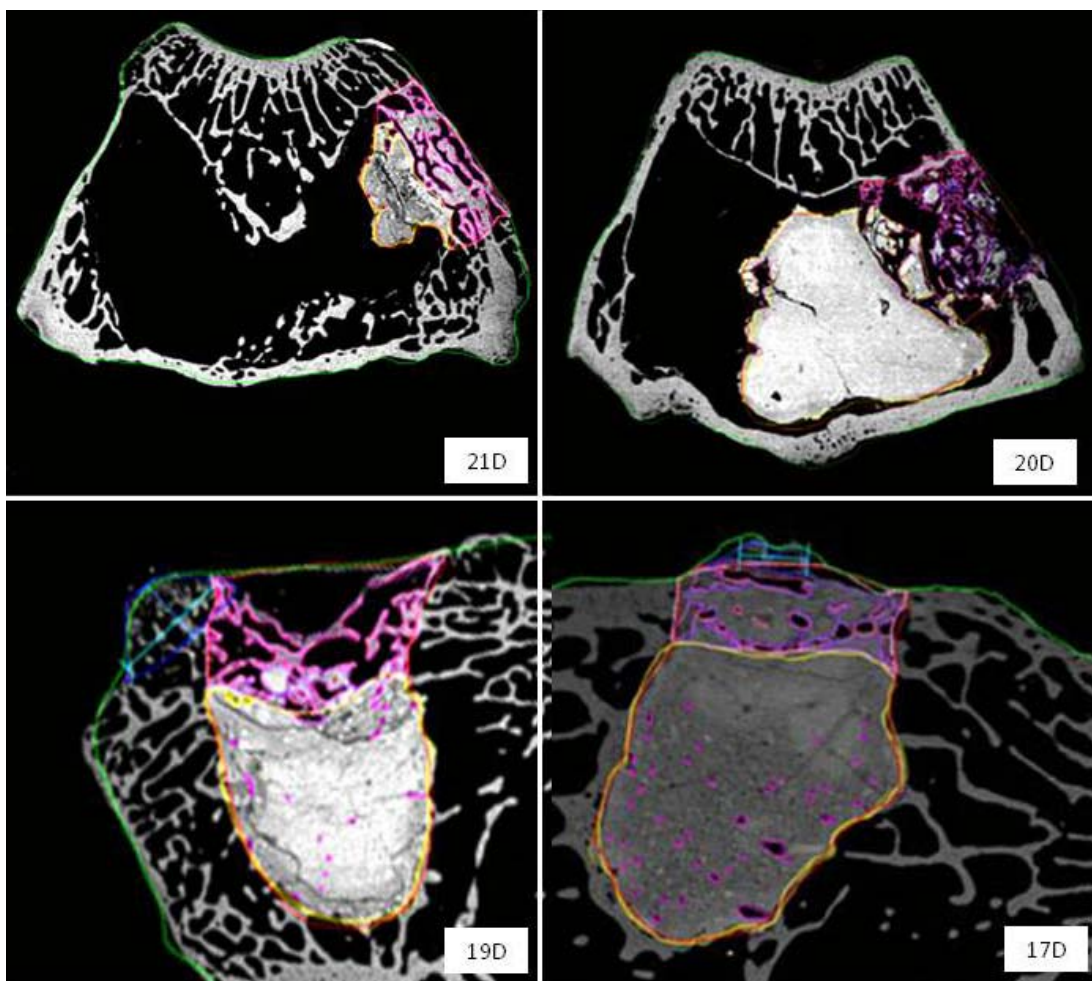


Figura 5.22: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo A. 3 meses

En la tabla 5.8 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.8: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo A de 3 meses

Grupo A (Cemento) 3 meses			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	6,25	1,43	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	1,29	1,03	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	3,57	1,72	
Material del implante dentro de la corticalización	0,80	1,20	
Depresión cortical	0,37	0,61	
Recubrimiento centromedular	5,67	4,10	
Superficie lineal del defecto en la medular	16,59	5,97	
Espacios vacíos dentro del defecto	10,77	11,77	
Material dentro del defecto	19,08	14,71	
Material migrado extracortical	0,00	0,00	
Tejido neoformado en el interior del defecto	0,90	1,29	
Hipertrofia periostio 1	2,03	2,24	
Altura reacción perióstica 1	0,73	0,82	
Anchura reacción perióstica 1	2,13	2,06	
Hipertrofia periostio 2	1,68	2,62	
Altura reacción perióstica 2	0,38	0,59	
Anchura reacción perióstica 2	1,84	2,91	
Defecto total	37,04	15,69	
Área total de la muestra	196,24	22,76	
Defecto subcortical	30,75	14,99	
Longitud corticalización	4,11	1,88	
Anchura defecto	5,43	1,08	
% Relleno área de corticalización			33,5
% Tejido neoformado en la corticalización			20,69
% Material retenido en la corticalización			12,82
Índice de calidad de la corticalización			27,38
% Corticalización lineal			75,57
% Tejido neoformado en el interior del implante			2,9
% Material retenido subcortical			62,05
% Recubrimiento subcortical			34,16

5.3.2.2. Cemento de Fosfato de calcio más colágeno

El porcentaje de relleno del área de la corticalización fue de 32.68%, de los cuales un 49.38% correspondió a tejido neoforado y un 50.61% correspondió a material retenido en el espacio cortical. El crecimiento lineal de la corticalización en este grupo fue de 64.17%, con un índice de calidad de la corticalización de 25.14%. En el área subcortical hubo un bajo porcentaje de neoforación de tejido alcanzando un 1.86%. Asimismo se observó un valor de 52.21% para la permanencia del material en el área subcortical. En este caso el recubrimiento trabecular obtuvo un valor de 26.41%.

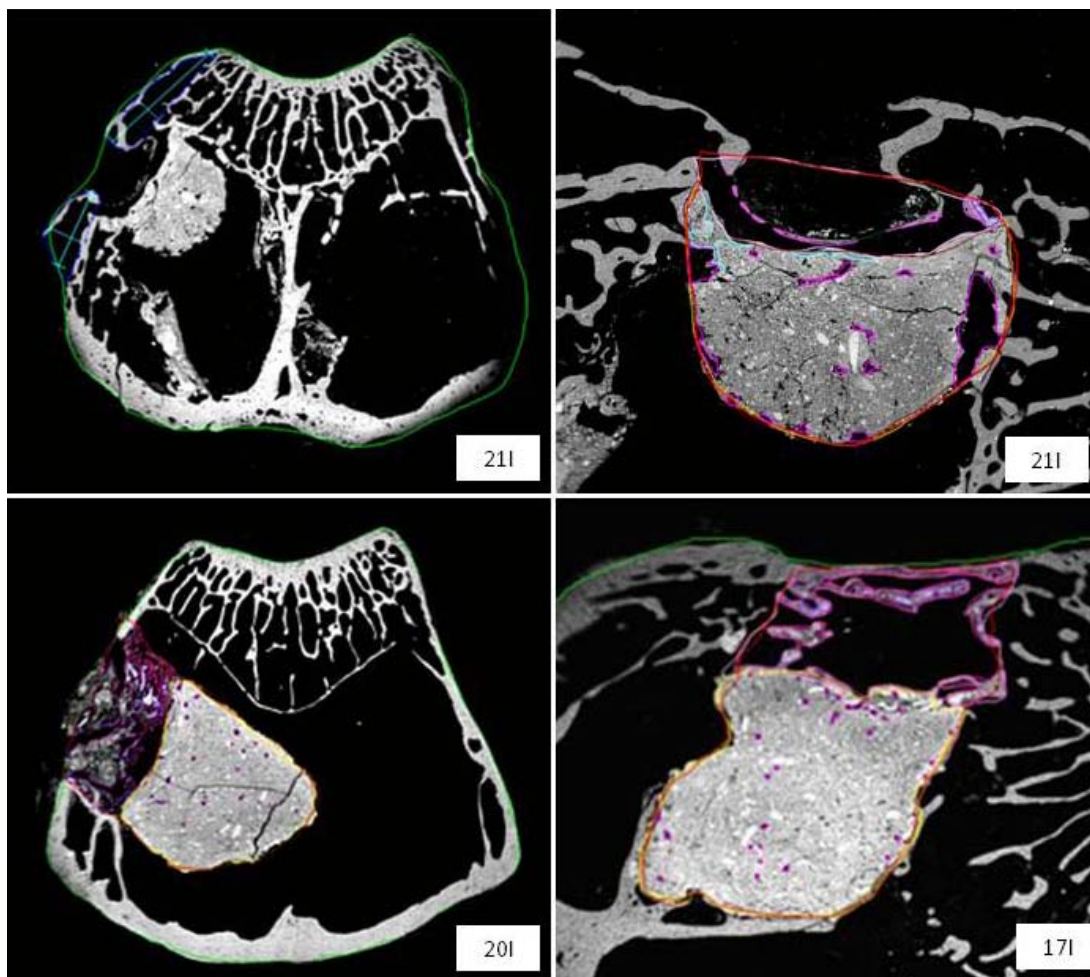


Figura 5.23: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo B. 3 meses

En la tabla 5.9 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.9: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo B de 3 meses

Grupo B (Cemento más colágeno) 3 meses			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	5,15	2,07	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	0,83	0,50	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	2,28	1,12	
Material del implante dentro de la corticalización	0,85	1,46	
Depresión cortical	0,79	1,23	
Recubrimiento centromedular	3,23	2,93	
Superficie lineal del defecto en la medular	12,22	4,92	
Espacios vacíos dentro del defecto	2,46	2,00	
Material dentro del defecto	9,19	8,15	
Material migrado extracortical	0,00	0,00	
Tejido neoformado en el interior del defecto	0,33	0,41	
Hipertrofia periostio 1	1,41	2,22	
Altura reacción perióstica 1	0,49	0,76	
Anchura reacción perióstica 1	1,40	2,30	
Hipertrofia periostio 2	0,98	1,79	
Altura reacción perióstica 2	0,24	0,42	
Anchura reacción perióstica 2	1,41	2,23	
Defecto total	22,44	13,99	
Área total de la muestra	205,38	16,67	
Defecto subcortical	17,61	12,87	
Longitud corticalización	3,30	1,76	
Anchura defecto	5,15	0,93	
% Relleno área de corticalización			32,68
% Tejido neoformado en la corticalización			16,14
% Material retenido en la corticalización			16,54
Índice de calidad de la corticalización			25,14
% Corticalización lineal			64,17
% Tejido neoformado en el interior del implante			1,86
% Material retenido subcortical			52,21
% Recubrimiento subcortical			26,41

5.3.2.3. Microesferas de hidroxiapatita

El porcentaje de relleno del área de la corticalización fue de 44.23%, de los cuales un 72.35% correspondió a tejido neoformado y un 27.65% correspondió a material retenido. Con respecto al crecimiento lineal de la corticalización encontramos en este grupo un 88.54%, con un índice de calidad del 36.48%. Observamos que en el área subcortical hubo un 12.95% de tejido neoformado. El valor del recubrimiento trabecular fue de 52.18%

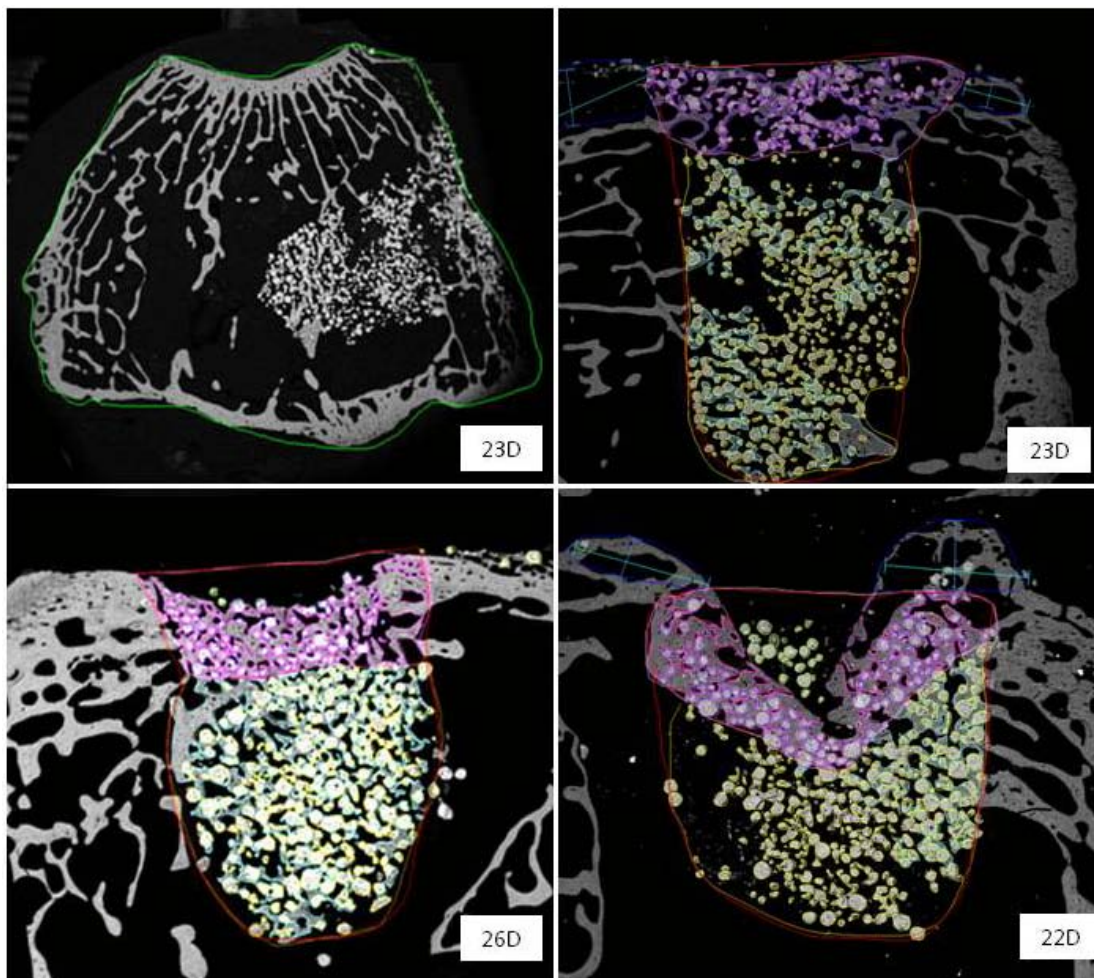


Figura 5.24: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo C. 3 meses

En la tabla 5.10 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.10: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo C de 3 meses

Grupo C (Microesferas de hidroxiapatita) 3 meses			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	7,10	1,54	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	2,29	0,62	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	2,54	1,96	
Material del implante dentro de la corticalización	0,85	0,54	
Depresión cortical	1,10	1,01	
Recubrimiento centromedular	6,40	2,59	
Superficie lineal del defecto en la medular	12,27	3,82	
Espacios vacíos dentro del defecto	9,56	5,80	
Material dentro del defecto	4,35	2,27	
Material migrado extracortical	0,10	0,13	
Tejido neoformado en el interior del defecto	2,62	1,64	
Hipertrofia periostio 1	2,08	2,73	
Altura reacción perióstica 1	0,56	0,62	
Anchura reacción perióstica 1	2,25	2,99	
Hipertrofia periostio 2	1,84	0,48	
Altura reacción perióstica 2	0,21	0,33	
Anchura reacción perióstica 2	0,57	0,90	
Defecto total	26,22	10,69	
Área total de la muestra	202,84	32,03	
Defecto subcortical	20,20	9,72	
Longitud corticalización	4,38	1,92	
Anchura defecto	4,95	1,04	
% Relleno área de corticalización			44,23
% Tejido neoformado en la corticalización			32
% Material retenido en la corticalización			11,92
Índice de calidad de la corticalización			36,48
% Corticalización lineal			88,54
% Tejido neoformado en el interior del implante			12,95
% Material retenido subcortical			22,99
% Recubrimiento subcortical			52,18

5.3.2.4. Microesferas de hidroxiapatita más colágeno

Se observó un porcentaje de relleno del área de corticalización de 32.44%, de los cuales un 83.29% correspondió a tejido neoformado y un 16.7% correspondió a material retenido. La cantidad de tejido neoformado en el área de corticalización fue del orden de 27.02%. El valor de la corticalización lineal fue de 76.33%, con un índice de calidad de 35.43%. En el área subcortical se observó un 10.97% de tejido neoformado y un 14.45% de material retenido. El recubrimiento trabecular obtuvo un valor de 53.22.

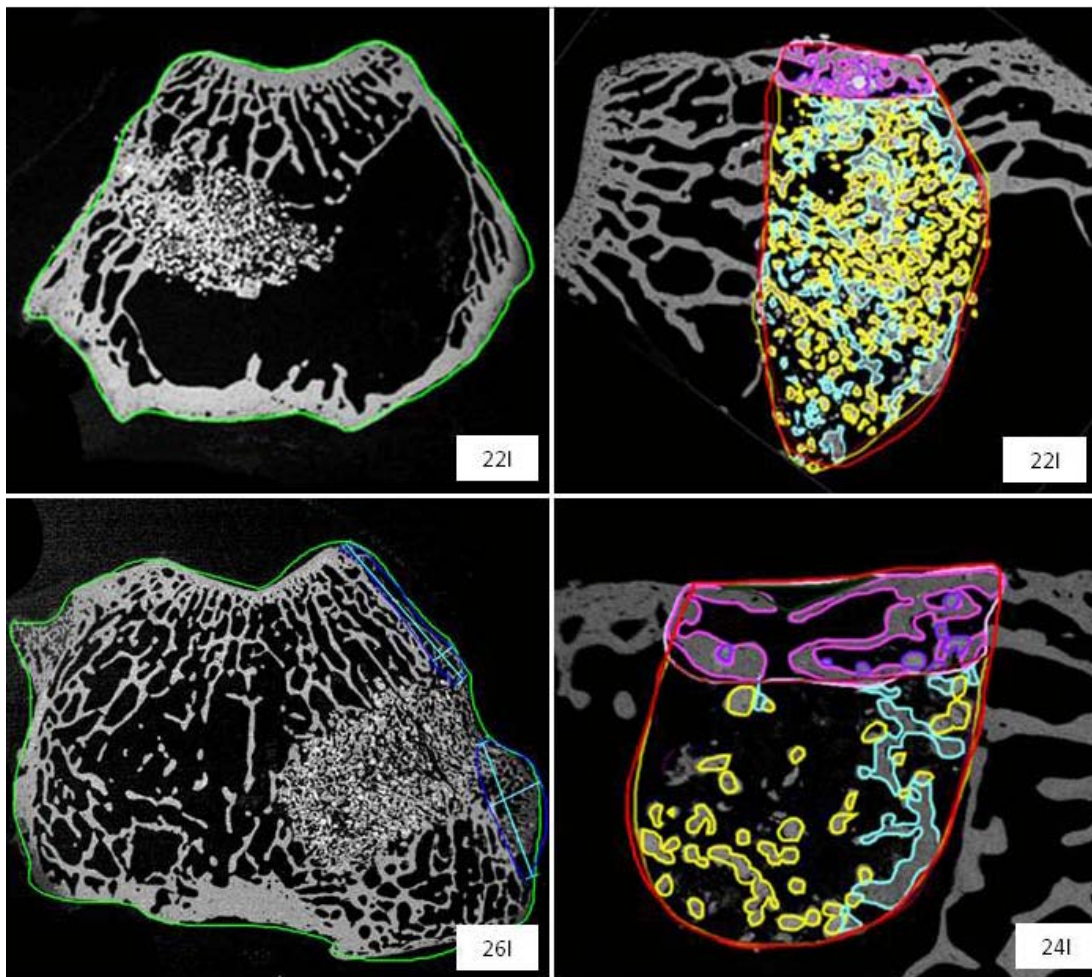


Figura 5.25: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo D. 3 meses

En la tabla 5.11 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.11: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo D de 3 meses

Grupo D (Microesferas de hidroxiapatita más colágeno) 3 meses			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	5,91	2,95	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	1,60	1,11	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	2,72	1,70	
Material del implante dentro de la corticalización	0,32	0,33	
Depresión cortical	1,27	2,61	
Recubrimiento centromedular	7,76	7,59	
Superficie lineal del defecto en la medular	14,58	3,66	
Espacios vacíos dentro del defecto	17,14	5,60	
Material dentro del defecto	3,32	3,19	
Material migrado extracortical	0,00	0,00	
Tejido neoformado en el interior del defecto	2,52	2,41	
Hipertrofia periostio 1	0,74	1,81	
Altura reacción perióstica 1	0,38	0,93	
Anchura reacción perióstica 1	0,95	2,32	
Hipertrofia periostio 2	1,60	3,92	
Altura reacción perióstica 2	0,38	0,93	
Anchura reacción perióstica 2	0,95	2,32	
Defecto total	29,13	10,10	
Área total de la muestra	0,00	0,00	
Defecto subcortical	22,98	8,73	
Longitud corticalización	3,45	1,73	
Anchura defecto	4,52	0,94	
% Relleno área de corticalización			32,44
% Tejido neoformado en la corticalización			27,02
% Material retenido en la corticalización			5,41
Índice de calidad de la corticalización			35,43
% Corticalización lineal			76,33
% Tejido neoformado en el interior del implante			10,97
% Material retenido subcortical			14,45
% Recubrimiento subcortical			53,22

5.3.2.5. Defecto vacío

El porcentaje de relleno del área cortical fue de 21.89, de los cuales el 100% correspondió a tejido neoformado. El valor de la corticalización lineal fue de 93.21, con un índice de calidad de la corticalización de 23.48%. En el área subcortical se observó ausencia completa de tejido neoformado y la trabeculación central obtuvo el valor de 18.84%.

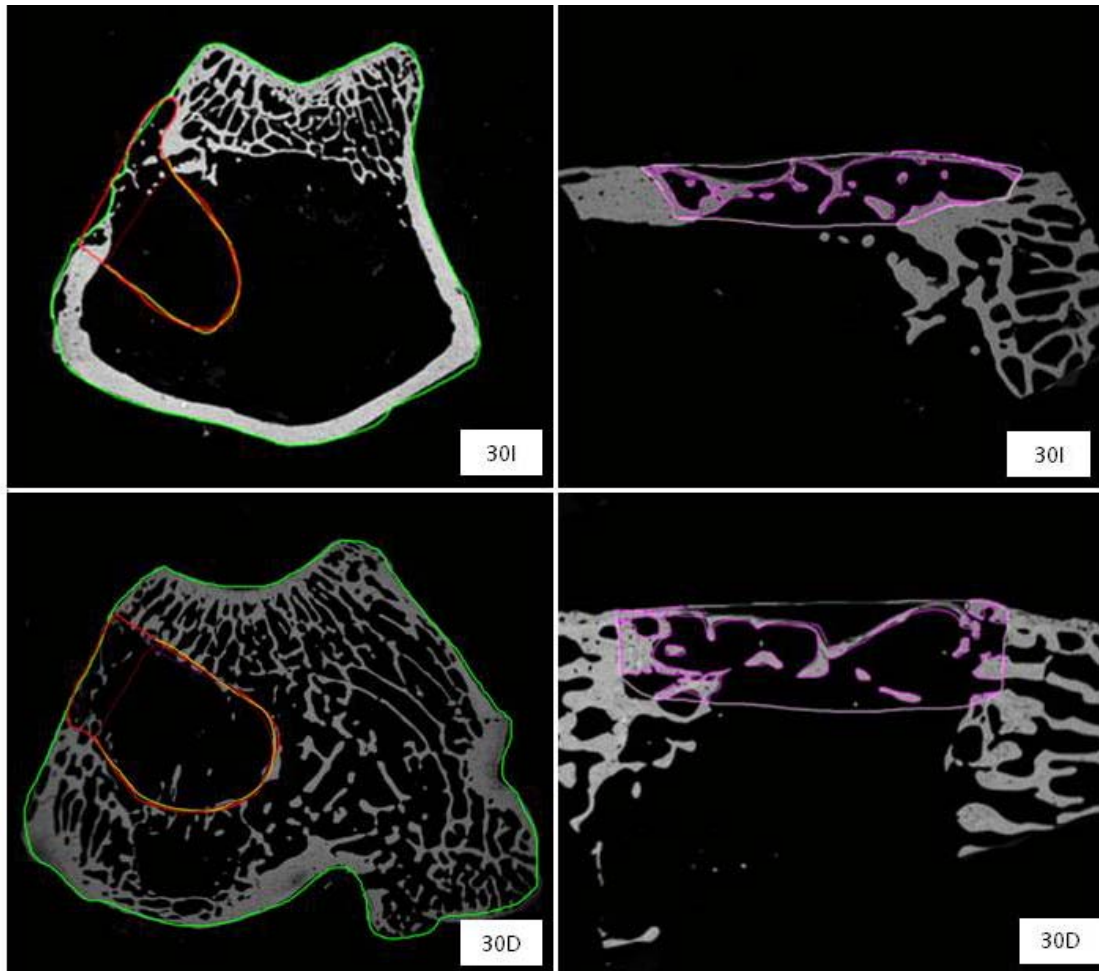


Figura 5.26: Imagen demostrativa de las mediciones histomorfométricas en el grupo E. 3 meses

En la tabla 5.12 se muestran las mediciones e índices calculados en este grupo.

Tabla 5.12: Resultados de la evaluación histomorfométrica del grupo E de 3 meses

Grupo E (Defecto vacío) 3 meses			
Clases	Media. Área (mm²)/longitud(mm)	Desv est	%
Corticalización	6,66	0,92	
Tejido neoformado dentro de la corticalización	1,46	0,22	
Espacios vacíos dentro de la corticalización	3,85	1,27	
Material del implante dentro de la corticalización			
Depresión cortical	1,35	0,60	
Recubrimiento centromedular	2,47	3,25	
Superficie lineal del defecto en la medular	13,10	0,69	
Espacios vacíos dentro del defecto	20,11	1,27	
Material dentro del defecto			
Material migrado extracortical			
Tejido neoformado en el interior del defecto	0,00	0,00	
Hipertrofia periostio 1	0,34	0,68	
Altura reacción perióstica 1	0,13	0,27	
Anchura reacción perióstica 1	0,83	1,67	
Hipertrofia periostio 2	0,00	0,00	
Altura reacción perióstica 2	0,00	0,00	
Anchura reacción perióstica 2	0,00	0,00	
Defecto total	26,77	0,84	
Área total de la muestra	187,00	28,42	
Defecto subcortical	20,11	10,43	
Longitud corticalización	4,83	0,83	
Anchura defecto	5,18	0,35	
% Relleno área de corticalización			21,89
% Tejido neoformado en la corticalización			21,89
% Material retenido en la corticalización			
Índice de calidad de la corticalización			23,48
% Corticalización lineal			93,24
% Tejido neoformado en el interior del implante			0
% Material retenido subcortical			
% Recubrimiento subcortical			18,84

5.3.2.6 Análisis comparativo

En este apartado se presentará un resumen gráfico de los resultados entregados anteriormente y de las relaciones existentes entre algunos parámetros.

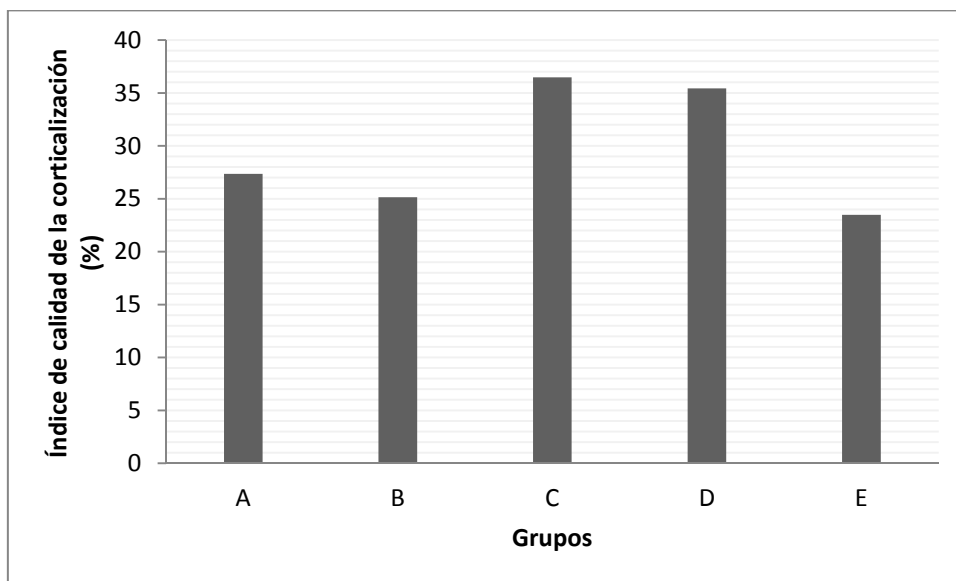


Gráfico 5.8: Índice de calidad de la corticalización en la serie de tres meses

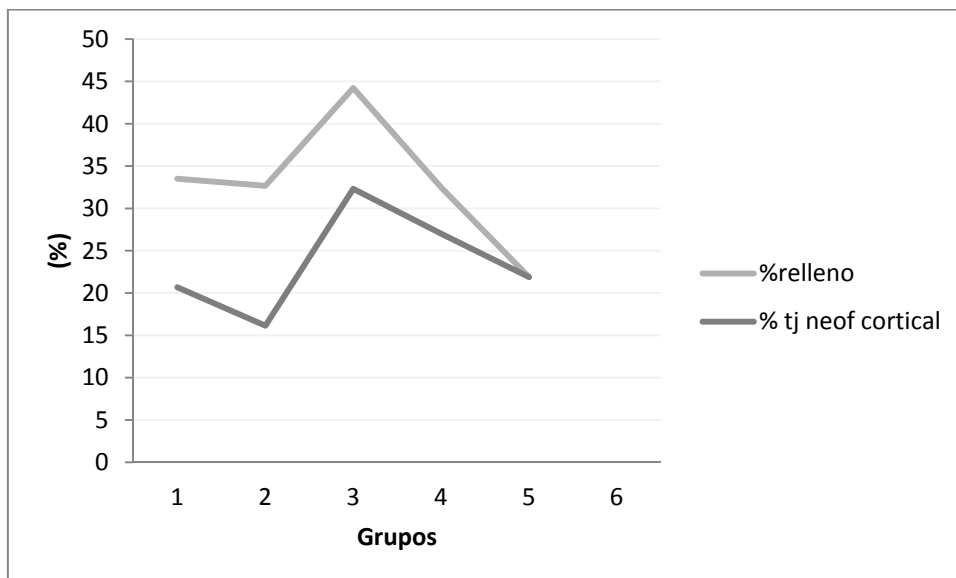


Gráfico 5.9: Relación entre el % de relleno cortical y la cantidad de tejido neoformado para la serie de 3 meses de evolución

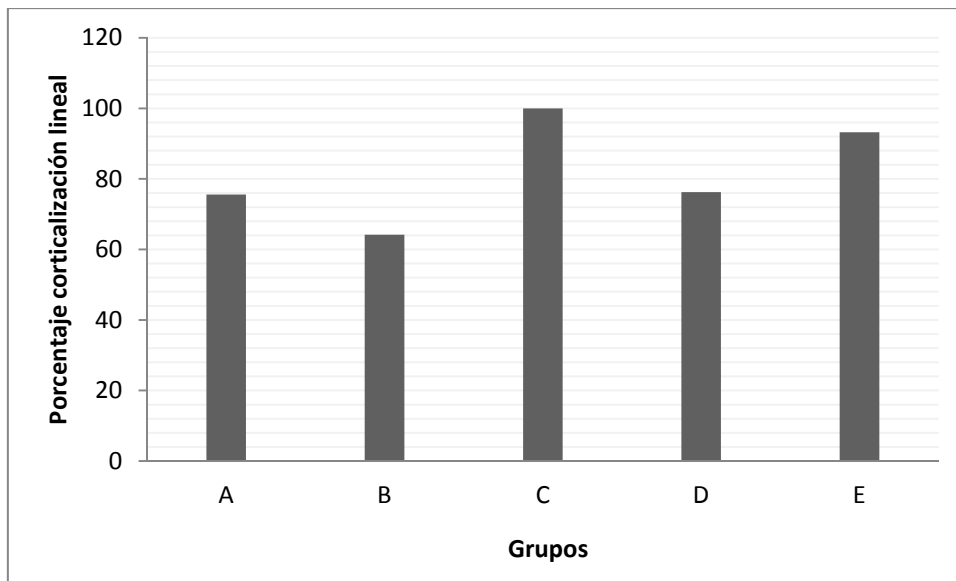


Gráfico 5.10: Corticalización lineal serie de 3 meses

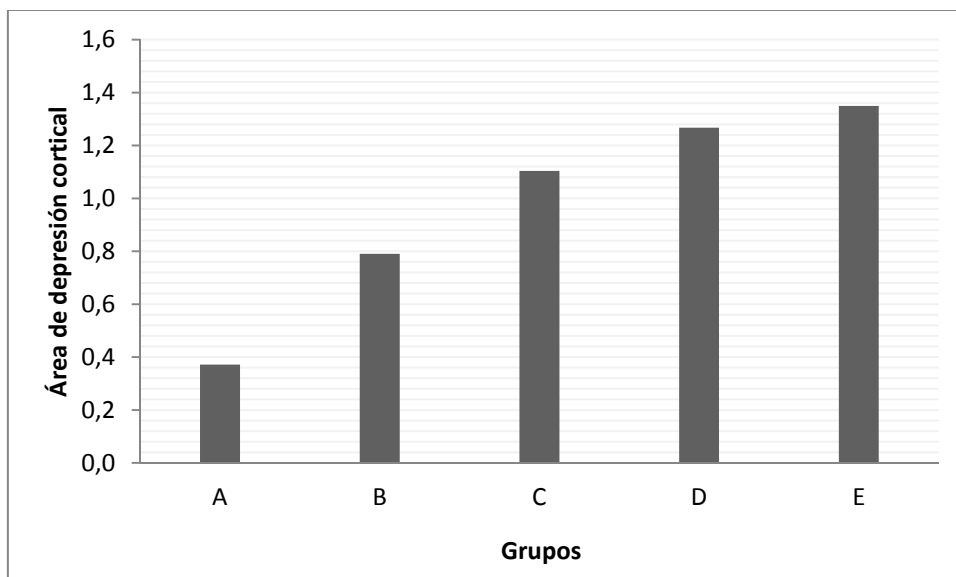


Gráfico 4.11: Formación de depresión cortical serie de 3 meses

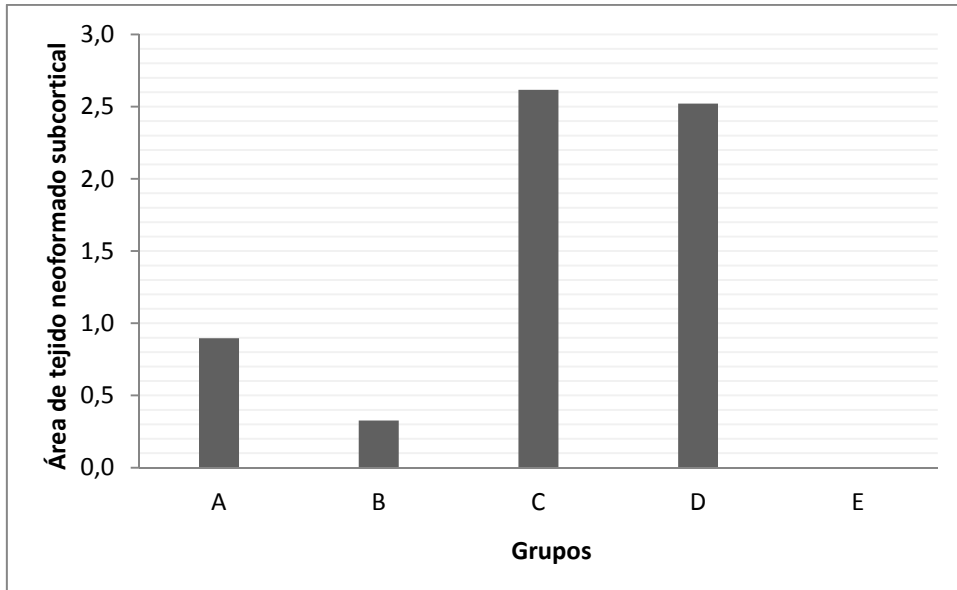


Gráfico 5.12: Neoformación de tejido óseo en el núcleo del defecto subcortical serie de 3 meses

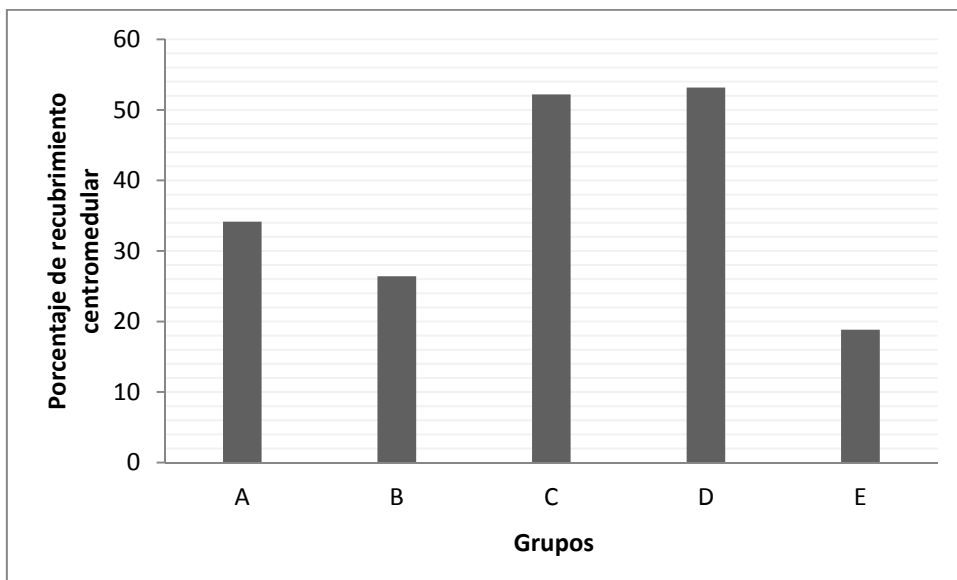


Gráfico 5.13: Neoformación de tejido trabecular alrededor de los bordes del defecto serie de 3 meses

5.4. Resultados de la evaluación histológica de las imágenes

Se determinó la presencia de tipos celulares y tipos de tejido presentes en las muestras con una evolución postquirúrgica de 12 días con la finalidad de constatar la falta de respuesta inflamatoria de los distintos productos a evaluar.

5.4.1. Cemento de fosfato de Calcio

Secciones transversales histológicas de la epífisis femoral distal mostraron claramente el defecto cuyo relleno estaba compuesto de fino material granulado inserto en una matriz homogénea. En la zona externa del defecto se observó la formación de una fina capa de tejido conectivo laxo siguiendo la silueta ósea, el cual se iba haciendo más denso hacia el interior del defecto (Figura 5.26-A). En la interfase entre el hueso y el cemento se observó disgregación de partículas del cemento y la formación de manojos de fibras colágenas dispuestas en un patrón irregular a su alrededor indicando formación de hueso fibroreticular en contacto con la superficie del biomaterial (Figura 5.26-B, E, F). Se observó además la neoformación de capilares, núcleos de osteoide y trabéculas interconectadas de tejido óseo inmaduro y la presencia de algún osteoclasto seguido de osteoblastos y células endoteliales dispuestos a manera de conos de remodelación, es decir formando capas concéntricas de las células nombradas (Figura 5.26-C, D). En estas trabéculas fue detectada remodelación ósea debido a la presencia de osteoclastos por un lado, y por otro, de osteocitos rodeados de osteoide. Finalmente, se detectó una cantidad muy baja de polimorfonucleares y otras células inflamatorias a lo largo de la muestra.

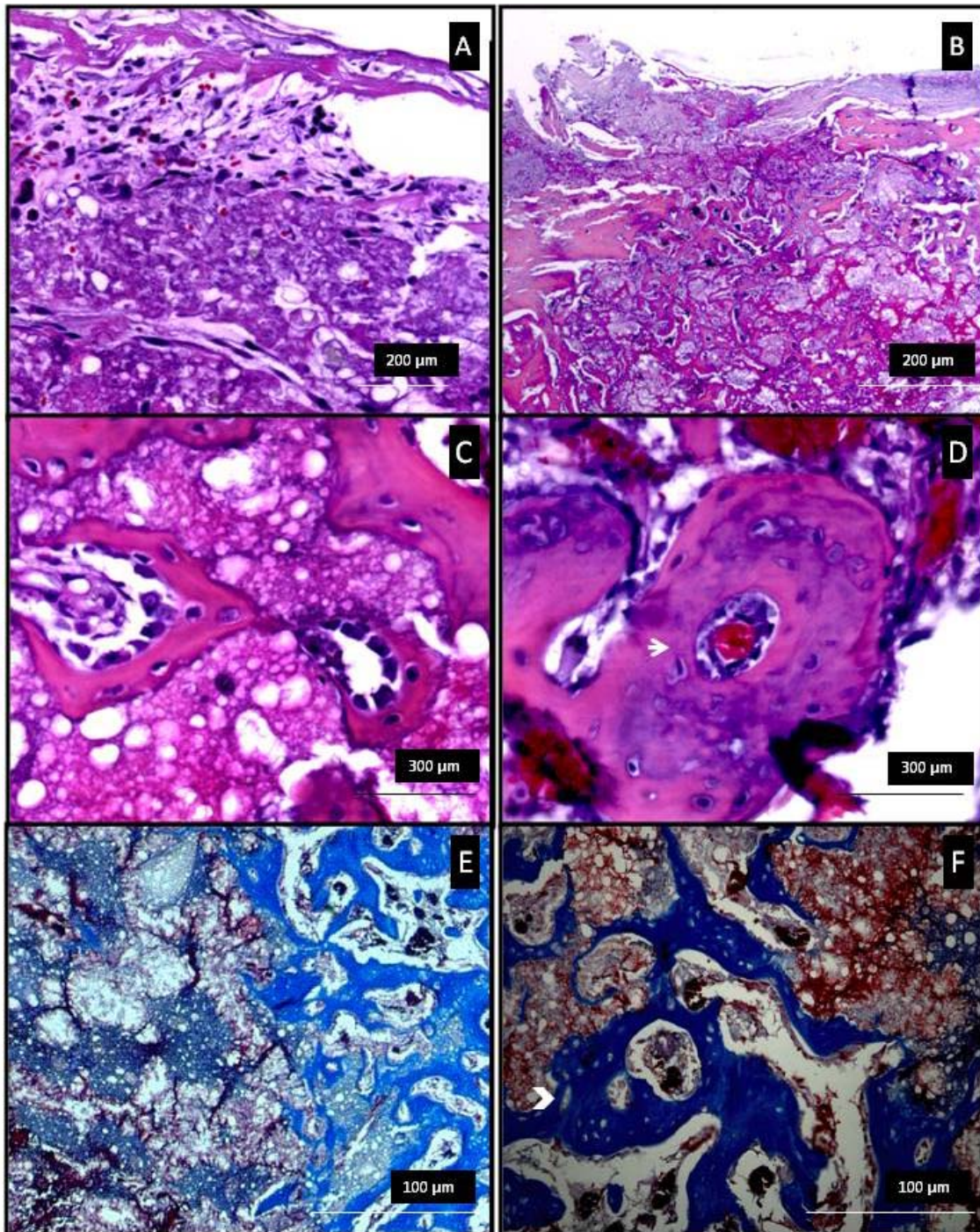


Figura 5.26: Imágenes de preparaciones histológicas grupo A: A: Hematoxilina-eosina: Tejido conectivo laxo en el borde externo del defecto. B: Hematoxilina-eosina: Interfase cemento/hueso. C: Hematoxilina-eosina: Formación de trabéculas de tejido óseo. D: Hematoxilina-eosina: (➤ : Cono de remodelación). E: Tricrómico de Masson: Interfase cemento/hueso . F: Tricrómico de Masson. (➤ Tejido óseo fibroreticular)

5.4.2. Cemento de fosfato de calcio más colágeno

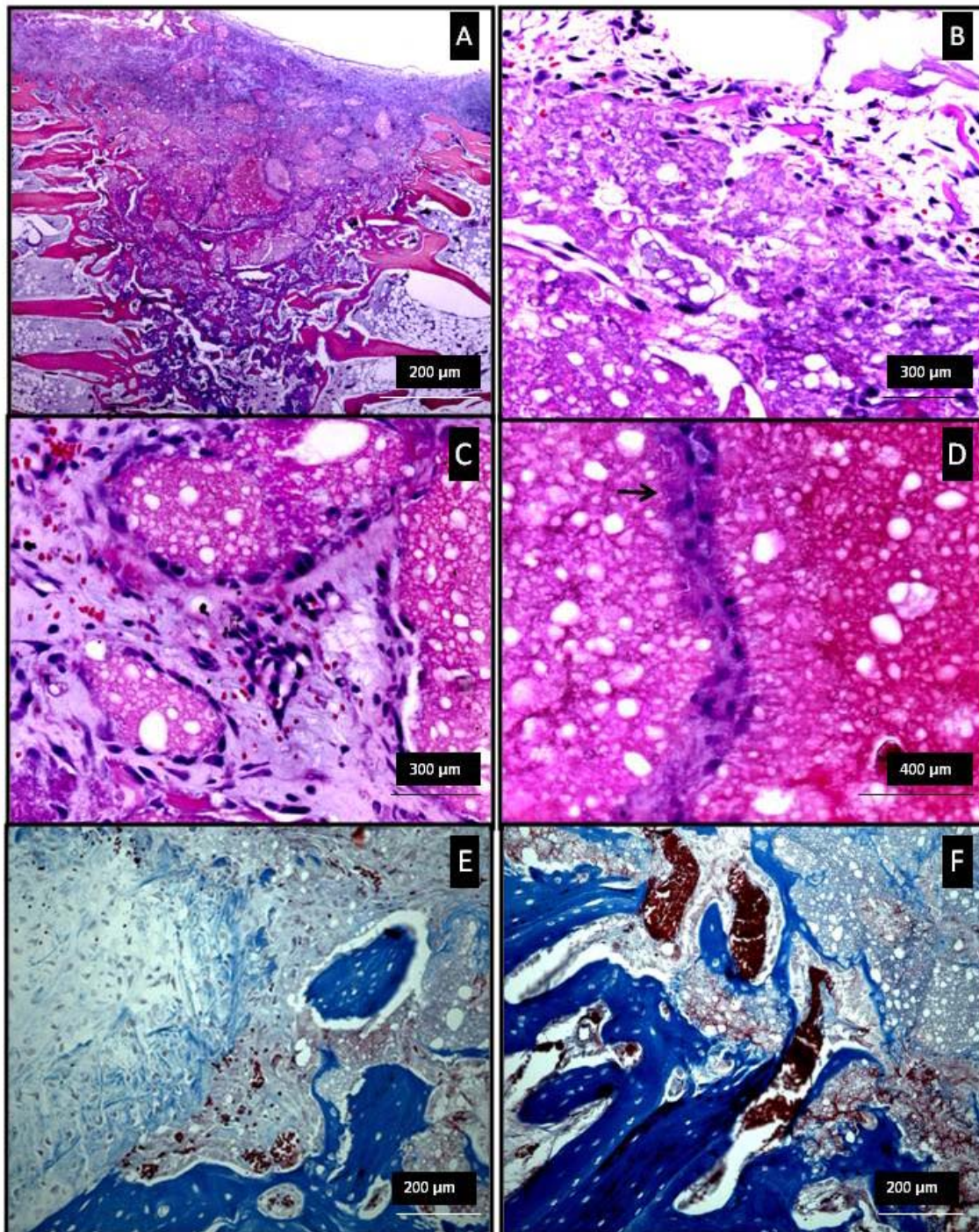


Figura 5.27: Imágenes de preparaciones histológicas grupo A: A: Hematoxilina-eosina: Implante de cemento más colágeno. B: Hematoxilina-eosina: Borde externo del implante. Nótese la presencia de una fina capa de tejido conectivo laxo. C: Hematoxilina-eosina: Formación de trabéculas de tejido óseo. D: Hematoxilina-eosina. (\rightarrow : Invasión celular en las grietas del cemento). E: Tricrómico de Masson: Interfase cemento/hueso. F: Tricrómico de Masson. Interfase cemento/hueso

El cemento presentó el aspecto de una masa homogénea con material finamente granulado en su interior (Figura 5.27-A). En el borde cortical externo del implante óseo se observó la presencia de una fina capa de tejido conectivo laxo que mostraba un gradiente de maduración hacia la profundidad del tejido (Figura 5.27-B, E). En los bordes del bloque de cemento se observó actividad osteogénica evidenciada por la formación de una capa de osteoblastos delimitando las trabéculas óseas y por la formación de vasos sanguíneos alrededor de estas trabéculas (Figura 5.27-C, F). Asimismo, se observó la invasión de células osteogénicas en las grietas que se formaron en el centro del bloque de cemento (Figura 5.27-D). En este grupo no se detectaron polimorfonucleares, linfocitos u otras células inflamatorias en los distintos campos observados.

5.4.3. Microesferas de hidroxapatita

La composición de las microesferas fue similar a la del cemento en bloque, con la diferencia de la composición granular individual de estas (Figura 5.28-A). La distribución de las microesferas fue homogénea en el interior del defecto. Se observó la presencia de una lámina de tejido conectivo semilaxo con un grosor mayor que la cortical original y con algunos microesferas insertas en ella en la zona externa del defecto (Figura 5.28-B, E). En los bordes del defecto se observó trabeculación osteogénica que no penetró profundamente en el núcleo del implante. Las microesferas se encontraron individualmente recubiertas por una fina capa de células osteogénicas (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos) y manojos de fibras colágenas en regular cantidad (Figura 5.28-C, D, F). Se observó la neoformación de capilares sanguíneos entre las microesferas. En este grupo, no se encontraron células inflamatorias.

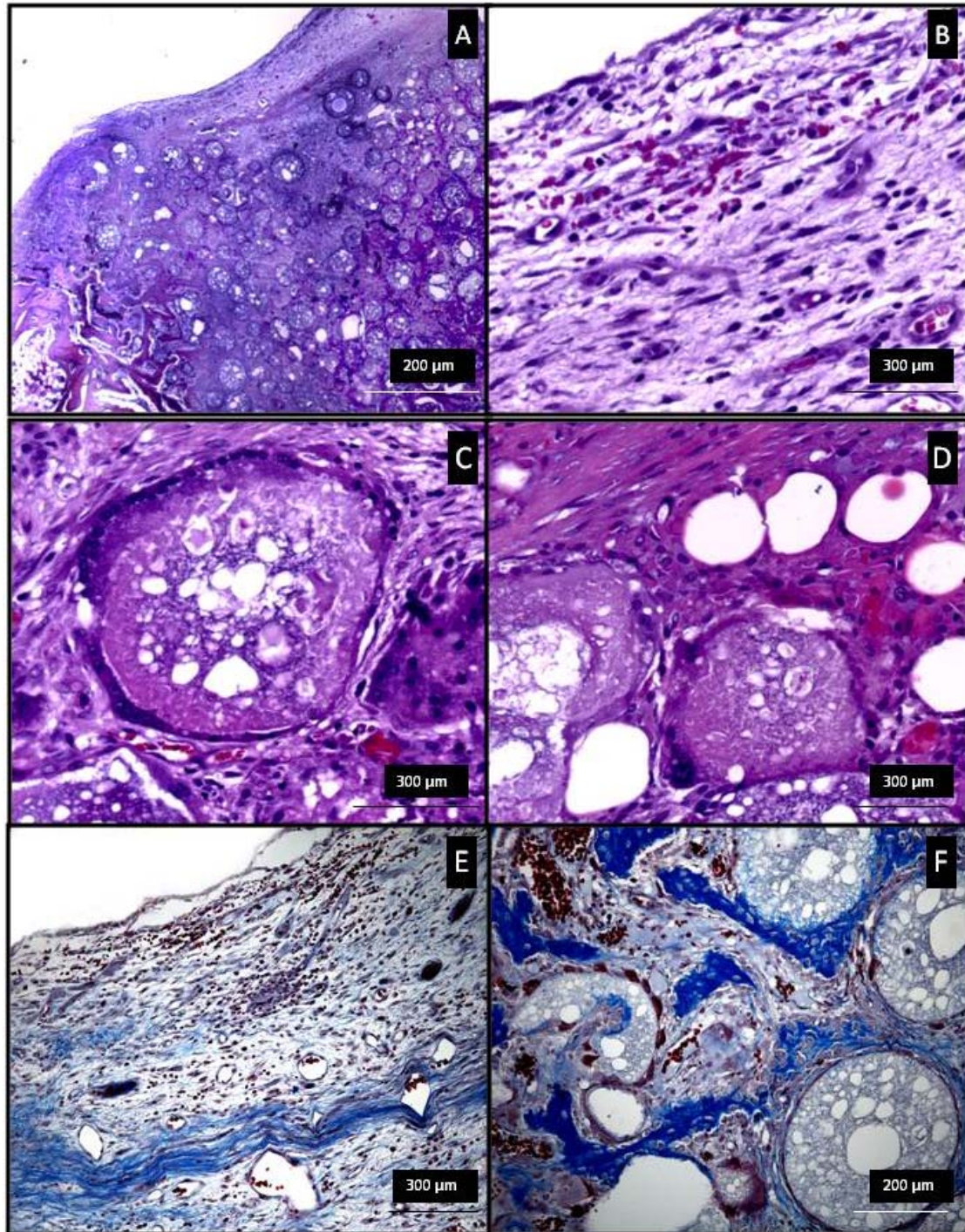


Figura 5.28: Imágenes de preparaciones histológicas grupo C: A: Hematoxilina-eosina: Implante de microesferas de hidroxiapatita. B: Hematoxilina-eosina: Borde externo del implante. Nótese la presencia de una gruesa capa de tejido conectivo laxo. C: Hematoxilina-eosina: Microesfera recubierta de células osteogénicas. D: Hematoxilina-eosina: Microesferas recubiertas de células osteogénicas. E: Tricrómico de Masson: Borde externo del defecto óseo. F: Tricrómico de Masson. Microesferas recubierta de células osteogénicas.

5.3.4. Microesferas de hidroxiapatita más colágeno

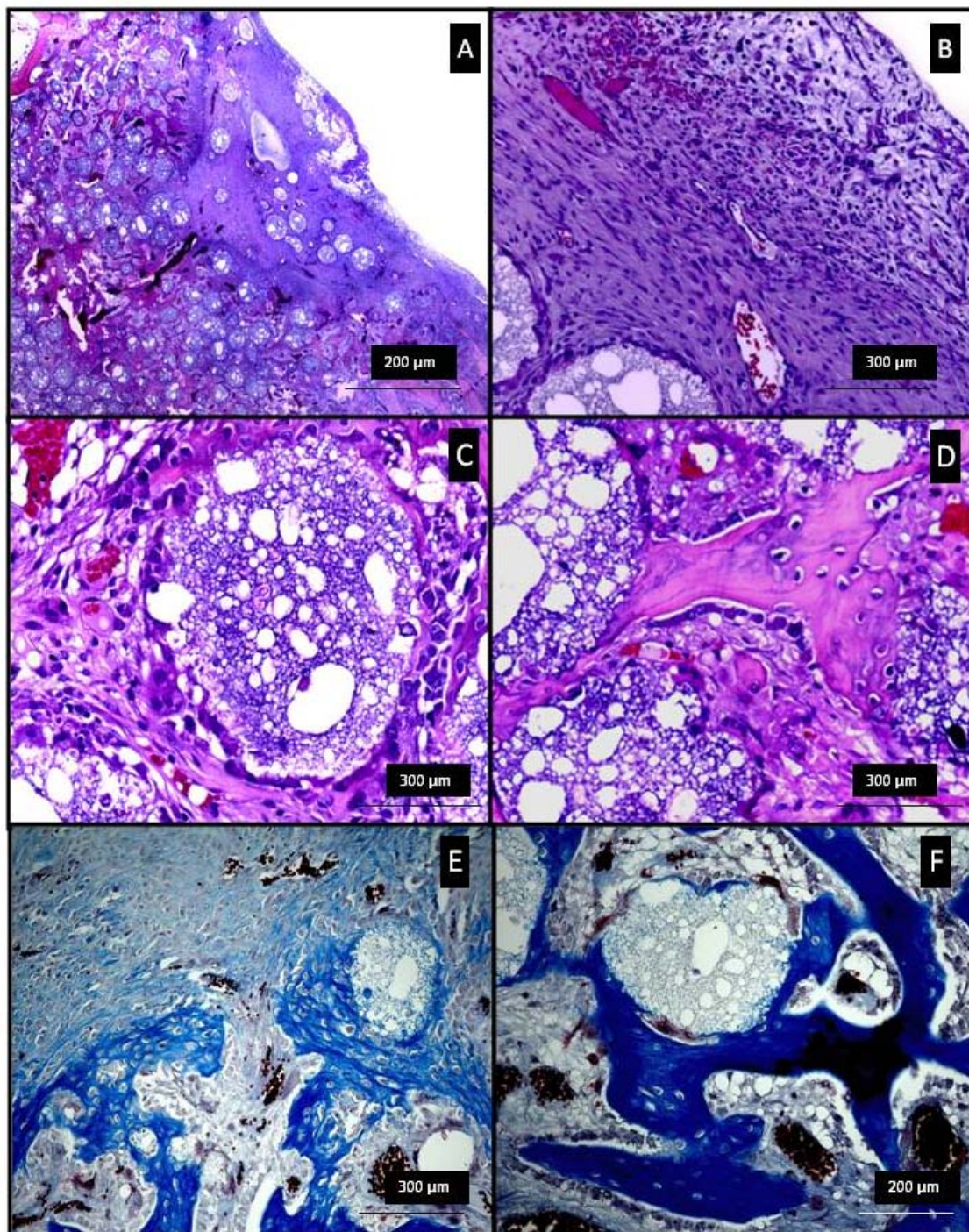


Figura 5.29: Imágenes de preparaciones histológicas grupo C: A: Hematoxilina-eosina: Implante de microesferas de hidroxiapatita más colágeno. B: Hematoxilina-eosina: Borde externo del implante. Nótese la presencia de una gruesa capa de tejido conectivo laxo. C: Hematoxilina-eosina: Microesferas recubiertas de células osteogénicas. D: Hematoxilina-eosina: Microesferas recubiertas de células osteogénicas. E: Tricrómico de Masson: Interfase entre el implante y el tejido conectivo. F: Tricrómico de Masson. Microesferas recubierta de células osteogénicas.

Las microesferas se observaron distribuidas en forma homogénea en el interior del defecto (Figura 5.29-A). En la zona de la cortical original se observó la formación de una capa de tejido conectivo semilaxo que fue haciéndose más densa a medida que se acercaba a la medular, con algunas microesferas insertas en su espesor (Figura 5.29-B, E). Se observó la formación de abundantes manojos de fibras colágenas que rodeaban las microesferas individualmente (Figura 5.29-E, F). Se evidenció osteogénesis en los bordes del defecto y en el interior del núcleo del implante mediante la formación de vasos sanguíneos y de trabéculas óseas revestidas de células osteogénicas. En estas trabéculas fue detectada remodelación ósea debido a la presencia de osteoclastos por un lado y osteoblastos que iban depositando osteoide por otro. (Figura 5.29-C,D) Se observó una cantidad muy limitada de polimorfonucleares y otras células inflamatorias.

5.5 Resultados del análisis estadístico

Los resultados del análisis de regresión se muestran en la tabla 5.13:

Tabla 5.13: Resultados del análisis de regresión entre las variables cualitativas y cuantitativas

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	R ² ajustada
Depresión	Depresión	0.12
Recubrimiento	Recubrimiento	0.52
Tejido subcortical	Infiltración central	0.57
Tejido cortical	Longitud de la corticalización	0.58

Estos resultados muestran la existencia de una alta correlación entre la mayoría de las variables respuesta adquiridas mediante las dos formas distintas de medición

En la tabla 5.14 se muestra la matriz de correlación entre las variables respuesta cuantitativas, realizada como punto de inicio del ACP.

El ACP resumió la variabilidad del estudio en tres vectores propios independientes entre sí que explican en su conjunto el 88.54% de la variabilidad total del estudio. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 5.15

Tabla 5.14: Matriz de correlación entre las variables respuesta cuantitativas

Correlación	Tejido Cortical	Depresión	Tejido Subcortical	Recubrimiento	Longitud Corticalización
Tejido Cortical	1	0.06	0.67	0.25	0.75
Depresión	0.06	1	-0.16	-0.05	0.04
Tejido Subcortical	0.67	-0.16	1	0.53	0.47
Recubrimiento	0.25	-0.05	0.53	1	0.26
Longitud Corticalización	0.75	0.04	0.47	0.26	1

Tabla 5.15: Valores de los vectores de variación obtenidos en el ACP


Componente	Valor propio	% variabilidad	% variabilidad acumulado
1	2.5	50.04	50.04
2	1.1	21.81	71.84
3	0.8	16.69	88.54


































En el análisis de varianza aplicado sobre los vectores propios definidos por el ACP, se detectaron diferencias significativas para las variables respuesta con respecto al tipo de implante aplicado, tal como lo muestra la tabla 5.16

Tabla 5.16: MANOVA para tratamiento

Criterio	Valor estadístico	P
De Wilks	0.63	0.009
Lawley Hotelling	0.57	0.006

Los resultados de la comparación univariada de Tukey aplicada sobre los vectores propios se resumen en la tabla 5.17

Tabla 5.17: Valores de significancia en la prueba de Tukey aplicada a los vectores de variación obtenidos en el ACP.  Indica valores no estadísticamente significativos

Valor P ajustado	Primer vector de variación					Segundo vector de variación				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
A										
B										
C	0,038					0,019	0,007			
D	0,049					0,033	0,009			
E								0,024		

6. DISCUSIÓN

Discusión

6.1. Discusión de resultados clínicos y radiográficos

A partir de los resultados clínicos obtenidos en nuestro estudio y teniendo en cuenta además, que los conejos son muy sensibles al estrés, pudimos determinar que la cirugía de implantación no significó un detrimento en la condición general de los animales participantes en el estudio. De hecho, se observó el mantenimiento de la condición corporal, peso y otros parámetros biológicos durante el periodo postoperatorio, tanto a corto como a medio plazo, lo que nos garantizó que la respuesta orgánica frente a la implantación fue desarrollada de manera normal.

Todos los grupos del estudio presentaron una evolución similar con respecto a la cicatrización de las heridas quirúrgicas.

No fue observada ninguna reacción tisular anómala, por lo tanto, no se esperó ningún retraso en la cicatrización de las heridas quirúrgicas o en la recuperación de la condición general de los animales. Incluso en un caso donde se detectó postmortem la migración de cemento a los tejidos blandos circundantes del lugar de implantación, no se observaron signos de inflamación o rechazo. Esta observación había sido descrita en muchos estudios de implantación de CPCs anteriores, como por ejemplo, en un trabajo de implantación similar al nuestro, realizado por Aberg y colaboradores en el cual, adicionalmente a la implantación y estudio histológico, se realizaron pruebas serológicas y proteinogramas para la detección de inflamación sistémica y se observó que casi un 90% de los animales fueron negativos en las pruebas para detectar inflamación a las 2 semanas postimplantación (Aberg y cols., 2012; Kane y Roeder, 2012).

En general, la excelente biocompatibilidad en tejido blando y hueso que presentan estos materiales ha sido demostrada a partir de diversos métodos de valoración como por ejemplo en un trabajo realizado por Fujikawa y colaboradores donde se implantaron bloques de CPC en mandíbulas de perros y se observó que un mes postimplantación, el bloque de cemento había sido recubierto por tejido óseo y que a los seis meses ya había sido parcialmente reemplazado por hueso. En el trabajo de revisión de Ambard y Mueninghoff, que consistió en una revisión sistemática sobre el uso, comportamiento y propiedades del cemento de hidroxiapatita entre 1980 y 2003, se llegó a similares conclusiones (Ambard y Mueninghoff, 2006; Fujikawa y cols., 1995).

También podemos citar el trabajo realizado por Hamerschmidt y colaboradores, donde se evaluó histológicamente la respuesta inflamatoria de la implantación de gránulos de hidroxiapatita en el hueso temporal, comparada con defectos controles vacíos y no se encontraron diferencias estadísticas entre la población de células inflamatorias, tales como, neutrófilos y monocitos presentes en la zona peridefecto a los 40 días posteriores a la implantación (Hamerschmidt y cols., 2011). Es decir que, la infiltración celular encontrada respondía simplemente al proceso normal de remodelación de los tejidos y no estaba inducida por los gránulos de hidroxiapatita

La herramienta clínica de elección para la evaluación de la consolidación ósea es la radiografía debido principalmente a no ser invasiva y ser un método de diagnóstico de alta difusión y bajo coste (Wong y otros, 2012). La radiografía nos permite evaluar aspectos importantes de la recuperación de un hueso dañado como por ejemplo la inflamación de tejidos blandos contiguos al hueso, alineación de los fragmentos óseos, formación de callo óseo o la detección de infecciones óseas. Sin embargo, se han encontrado evidencias de que no existe una alta correlación entre la consolidación radiográfica y la consolidación histológica, es decir, entre la imagen radiográfica y la resistencia real del hueso al soporte de carga y fuerzas externas a las que está sometido (Claes y Cunningham, 2009; Wong y cols., 2012).

La resistencia del hueso neoformado está relacionada con múltiples factores incluyendo la densidad mineral ósea y la remodelación ocurrida como respuesta a fuerzas de carga (Axelrad y Einhorn, 2011).

En consecuencia, la correcta evaluación de la consolidación ósea debería aportar información acerca de estas características, siendo así importante evaluar claramente la calidad del tejido óseo neoformado mediante la determinación de la densidad y tipo de tejido que lo constituye, información que no aporta adecuadamente la exploración radiográfica. Por ello que en este trabajo se utilizó la microscopia electrónica de retrodispersión como principal medio de evaluación del tipo y la calidad del tejido óseo calcificado neoformado.

Si realizamos una comparación entre los resultados radiográficos e histomorfométricos obtenidos en nuestro estudio, podemos notar que los cambios detectados en la evaluación radiográfica no fueron indicativos de la condición real del proceso de curación ósea, ello fue debido a la dificultad de la evaluación de la consolidación ósea del defecto mediante radiografía causada por la interferencia producida tanto por el hueso sesamoideo del músculo gastrocnemio como por la radiopacidad casi constante de los materiales implantados. Por

ejemplo, en el grupo de 1 mes se observaron varias muestras donde se determinó radiográficamente que la consolidación ósea alcanzó un nivel medio, sin embargo, en las mediciones de la corticalización lineal, se encontraron muestras con un amplio rango de valores, desde el 28,5 al 78% que radiográficamente fueron clasificados de forma similar.

Además, si observamos el tipo de tejido presente en estas estructuras encontramos tejido de tipo inmaduro desde cartílago calcificado a hueso fibroreticular que en la radiografía se visualizaron genéricamente como callo óseo.

Sin embargo, en el grupo de 3 meses, dado el mayor avance de la curación ósea, hubo una mayor similitud en los resultados de ambos análisis, es decir, en todas las muestras donde se determinó consolidación radiográfica completa, también se determinó un 100% de corticalización lineal con tejido de tipo lamelar en la evaluación histomorfométrica, por lo tanto, esta es otra razón que nos indica que la exactitud de la evaluación de la progresión de la consolidación ósea se ve mejor reflejada mediante métodos ultraestructurales como la microscopía electrónica de retrodispersión.

Por otro lado, con respecto a la evaluación radiográfica de la degradación de los injertos, el único signo detectado en radiografía fue la pérdida de nitidez de los defectos óseos, tanto en sus bordes como en su núcleo, sin embargo, no fue posible mediante esta técnica la clasificación de la evolución de este proceso. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en un estudio realizado en mandíbula de cerdo mediante la implantación de cemento de hidroxiapatita, cemento más colágeno y hueso autólogo, donde a los tres meses postimplantación, fue posible identificar mediante radiografía todos los tipos de defectos del estudio, es decir, que todos los tipos de implantes mantuvieron en gran medida su radiopacidad y características radiográficas propias, tal como en nuestro estudio. En este último estudio, también se observó que a los 6 meses postimplantación aún podían diferenciarse radiográficamente los defectos y fue posible encontrar una mezcla de cemento-colágeno y hueso en el sitio de implantación debido a la remodelación ósea (Mai y cols., 2008)

En consecuencia, podemos decir que la radiografía es una buena herramienta de evaluación de la consolidación ósea a nivel clínico pero que para estudios más detallados, es necesaria la complementación con alguna técnica de análisis ultraestructural como por ejemplo la microscopía electrónica de retrodispersión.

6.2. Discusión de la evaluación semicuantitativa de las imágenes de M.E.R.

La evaluación semicuantitativa es una forma rápida de discernir la progresión y la calidad de la remodelación en los defectos óseos, siendo su principal objetivo caracterizar la continuidad anatómica de la remodelación y el tipo de tejido presente en un momento determinado.

Existen varios procesos importantes que se dan en forma coordinada durante la cicatrización ósea, tales como, la osteointegración y reabsorción del implante, la reacción orgánica del hueso como respuesta al implante o la remodelación anatómica del defecto óseo.

En general, mediante las observaciones llevadas a cabo en este apartado, buscábamos obtener una caracterización de todos estos procesos, ya sea en forma global o independiente. Por el mismo motivo, el diseño del experimento en dos bloques de tiempo, nos ayudó a reflejar de mejor manera el proceso de curación ósea en el tiempo.

La definición de los parámetros a evaluar en este apartado fue difícil debido a que es imposible reflejar todos estos procesos en una medición única. Por ejemplo si consideramos la corticalización lineal del defecto: en algunas muestras del grupo de defecto vacío fue observada una corticalización máxima, es decir, un puente cortical completo entre los extremos del defecto, pero con un grosor mínimo y una importante depresión de la cortical nueva con respecto a la original. En la práctica, esta situación, se traduciría en un hueso neoformado frágil, con una predisposición alta al colapso mecánico. En contraste, observamos otros casos, donde no hubo corticalización lineal completa, pero los dos frentes corticales tuvieron un grosor similar a la cortical original y estaban compuestos por tejido de una elevada madurez, lo que indicaría que la remodelación fue más resistente y progresiva en el tiempo, tal y como lo vimos en los grupos de microesferas de hidroxiapatita con y sin colágeno

En consecuencia, el indicador de corticalización lineal, determinado de forma aislada, no nos entrega la información adecuada para poder discernir de qué manera está ocurriendo el proceso de remodelación ósea, sino que es necesario mirar en conjunto todos los parámetros restantes definidos. Es por ello que fueron definidos algunos parámetros primarios como indicadores de la remodelación anatómica del hueso, tales como corticalización lineal, grosor de la corticalización, depresión y madurez del tejido. Y por otra parte, se definieron parámetros secundarios como indicadores de la resistencia y perdurabilidad de la

remodelación del hueso tales como infiltración central, recubrimiento intramedular, compactación del material del implante y reacción perióstica.

En resumen, como nuestro ideal es la formación de un puente de hueso maduro que siga la misma forma y que tenga la misma resistencia a la tensión que la cortical original, determinamos que la mejor forma de evaluar semicuantitativamente este proceso era realizar una observación conjunta de los parámetros primarios y secundarios definidos anteriormente.

Como bien sabemos, uno de los principales factores biológicos que pueden afectar la velocidad del reemplazo de los implantes por hueso son la edad, el sexo y la condición metabólica del huésped, por ello, con la finalidad de limitar el alto potencial reparativo que poseen los animales en crecimiento y la diferencia intrínseca provocada por el sexo de los animales, se utilizaron en este estudio solamente hembras adultas.

6.2.1. Discusión de los resultados de la serie de muestras de 1 mes

La corticalización observada en el grupo de cemento de fosfato de calcio fue de nivel medio, tanto en su avance lineal como en su grosor y se produjo solamente una ligera depresión cortical.

La pérdida de compactibilidad en los bordes del bloque de cemento de fosfato de calcio permitió la invasión celular y la formación de pequeñas islas de tejido, esta característica no fue observada en el grupo de cemento con colágeno debido a que se observó una mayor permanencia de la compactibilidad del implante.

Asimismo, la inducción de trabeculación centromedular generada por la masa de cemento de fosfato de calcio fue mayor, alcanzando un valor de casi el doble que el grupo de cemento más colágeno, lo que le entregó al grupo cemento control una mayor solidez y resistencia del tejido en el proceso de consolidación ósea.

Si bien, la reacción perióstica presentada en el grupo de cemento control fue de tipo medio, su intensidad fue casi el doble que la del grupo de cemento con colágeno.

Tal y como se comentó oportunamente en el capítulo de revisión bibliográfica, la adición de micro fibras a un CPC, mejora sus características físicas y biológicas, lo que se traduce en la promoción de la proliferación y diferenciación celular, y por lo tanto, de la mineralización del tejido.

En un trabajo de investigación realizado por Bao y colaboradores, donde se adicionaron microfibras de ácido poliláctico y poliglicólico electrohiladas a un CPC, se comprobó que a medida que aumentaba la cantidad de fibras en la preparación, fue observada una mejora significativa en la proliferación de células madre humanas (hUCMSCs) y un aumento notorio en la expresión de sus genes osteogénicos, por lo tanto, se observó una mayor diferenciación celular (Bao y cols., 2011). Extrapolando esta información a nuestro estudio, resultó claro esperar que la adición de colágeno a nuestra preparación control de cemento de fosfato de calcio, produjera una mayor respuesta en la corticalización de los defectos creados.

En la práctica, constatamos que en el grupo de cemento de fosfato de calcio más colágeno la respuesta de corticalización fue mayor que en el grupo control, tanto en el avance lineal de la corticalización, como también en el grosor de la nueva cortical. Sin embargo, la madurez del tejido fue menor y la formación de tejido a nivel centromedular y en el núcleo del implante fue casi nula. Por lo tanto, a pesar que se observó que la corticalización completa se dio en un mayor número de muestras, la remodelación en el grupo de cemento más colágeno, generó un hueso más frágil que el original, debido a su baja madurez. Por otra parte, la baja cantidad de tejido neoformado en las zonas accesorias de corticalización, acentuó esta fragilidad, debido a que este tejido actúa prestando soporte físico frente a la acción de fuerzas externas que afecten al hueso neoformado.

Por otro lado, la formación de reacción perióstica observada fue menor en el grupo con colágeno que en el control.

Probablemente una posible explicación a dichas observaciones se relacionaría con la mayor compactibilidad que presentó el bloque de cemento más colágeno, la cual se mantuvo casi intacta desde el momento de la implantación hasta el final del experimento, a diferencia del grupo de cemento control, donde la disgregación de partículas desde los bordes del bloque incentivó la formación de tejido óseo.

El grupo de microesferas de hidroxiapatita presentó el mayor valor de corticalización lineal y grosor de todos los grupos del bloque de un mes, sin embargo, en forma contradictoria, también la intensidad de la formación de depresión fue la mayor, lo que nos

indicó que la remodelación ósea no se produjo en forma anatómica, es decir, las microesferas tienen una mayor capacidad osteoconductora dada por su mayor superficie de contacto, pero a pesar de ello, tienen una menor capacidad de soporte y relleno de los defectos óseos tratados, por lo tanto no pueden ser usadas en forma exclusiva en zonas de carga del hueso desde el inicio de la consolidación ósea, es decir, en forma prematura, al igual que el cemento, necesitaría de un soporte mecánico adicional, sin embargo su interacción con el tejido generaría un tejido funcional anatómico y maduro en un menor tiempo.

El grado de madurez del tejido neoformado en la cortical fue similar entre el grupo de cemento control y el grupo de microesferas control.

Por otro lado, la formación de tejido en las otras zonas medidas, es decir, reacción perióstica, infiltración central y trabeculación centromedular fue la más alta del grupo, llegando incluso a clasificarse como proliferativa. Esta diferencia, también fue atribuida a la mayor superficie de contacto que presentan las microesferas con respecto al cemento en masa y por lo tanto a la mayor capacidad osteoconductora de esta presentación física del cemento de hidroxiapatita.

Si comparamos el grupo de microesferas más colágeno con el grupo de microesferas control, observamos que todos los parámetros medidos fueron menores, desde el grado de corticalización hasta la madurez del tejido neoformado, es decir, tenemos un nivel de remodelación ósea alto pero con una menor rapidez y consistencia que en el grupo control.

A pesar de que en este punto encontramos una diferencia entre los grupos de cemento y los de microesferas, debido a que, tal como comentamos anteriormente, en el grupo de cemento más colágeno fue observada una mayor intensidad de la corticalización, tanto en avance como grosor de la cortical con respecto a su control, la respuesta global fue la misma entre grupos cementados y de microesferas, esto es, que la respuesta de remodelación ósea en los grupos adicionados de colágeno tuvo una menor solidez que en los grupos controles.

En el grupo de defecto vacío obtuvimos resultados un tanto contradictorios, debido a que por un lado el nivel de corticalización fue el mayor del bloque, sin embargo los otros parámetros, que indican el nivel de calidad y resistencia de la remodelación, fueron extremadamente bajos, lo que se tradujo en una remodelación ósea no anatómica, frágil y poco funcional.

6.2.2. Discusión de los resultados de la serie de muestras de 3 meses

En el grupo de cemento de fosfato de calcio, se observó un nivel de corticalización alto con un grosor medio y con el menor nivel de formación de depresión de todo el bloque.

Asimismo observamos la formación de una red trabecular centromedular fuerte, lo cual nos indicó que la remodelación fue resistente y anatómica.

Si bien aún no encontramos tejido óseo maduro, se observó una progresión lógica dada por el mayor tiempo transcurrido en este bloque que en el de un mes, por lo tanto, podemos decir que la remodelación presente en este grupo, mostró las características adecuadas como para soportar exitosamente las cargas a las cuales estará sometido el hueso.

A diferencia de los grupos de un mes, en este bloque se observaron importantes signos de degradación del cemento. Concluimos que la degradación fue realizada mediante solubilización, reabsorción osteoclástica y fagocitosis debido a que fue una degradación perimetral, es decir, fue avanzando paulatinamente desde los bordes del implante, por lo tanto, el núcleo de los implantes permaneció intacto en este bloque de tiempo. Esta observación concuerda con datos obtenidos de estudios similares, donde se constató que la absorción de los bloques de cemento controles o modificados fue realizada en forma perimetral, manteniéndose zonas de cemento intacto en el núcleo de los implantes a los 4 meses postimplantación (Totdmann y cols., 2013).

En general, el cemento debería tardar entre 3 y 36 meses en ser completamente reabsorbido y reemplazado por hueso (Kruger y Groll 2012), dependiendo de las condiciones propias de cada implante.

Por ejemplo, en un estudio donde se buscaba comprender el mecanismo de reabsorción de los CPCs, se observó la aparición de los primeros signos histológicos de reabsorción 1 mes postimplantación, mediante la observación de células gigantes multinucleadas en la interfase hueso-implante, así como también se observaron pequeñas porciones de cemento liberadas desde el bloque hacia el tejido circundante. Con estas observaciones se concluyó que la reabsorción del cemento se llevó a cabo mediante la combinación tanto de solubilidad fisiológica del cemento como de la actividad celular macrofágica, tal como lo hemos definido para nuestro estudio (Mai y cols.,2008).

Por otra parte, podemos decir que no se encontraron diferencias en la tasa de reabsorción de los bloques de cemento control y cemento con colágeno, lo que concuerda con los resultados obtenidos en un estudio de similares características realizado en mandíbula de

cerdos enanos, donde se concluyó que la adición de colágeno al cemento de hidroxiapatita, no aceleró la tasa de bioabsorción del cemento, siendo cercana al 90%, a los 4 meses postimplantación en ambos grupos (Todtmann y cols., 2013).

A pesar de que nuestros resultados histológicos serán discutidos más adelante, mediante M.E.R. pudimos constatar que al mes postimplantación existió liberación de partículas de cemento y también disgregación periférica de los implantes por lo que creemos que la respuesta celular es concordante con estos datos bibliográficos.

En otro estudio donde se comparó la biodegradación de dos tipos de cemento de fosfato de calcio que diferían en su macroporosidad, se observó que el cemento poroso presentó una mayor biodegradabilidad y que la penetración ósea comenzó a partir de 1 semana postimplantación, a diferencia del caso del cemento sin macroporosidad donde solamente se observó la formación de hueso en la periferia a partir de la cuarta semana postimplantación (Mino-Farina y cols., 2009). Podemos extrapolar este resultado comparando nuestros resultados entre el cemento en masa y las microesferas de hidroxiapatita, es decir, sólo diferenciaríamos nuestros implantes de acuerdo a la porosidad interconectada de sus componentes, donde claramente se observó una mayor degradación de las microesferas con respecto del cemento en masa. Sin embargo, el signo más claro, de que la degradación del cemento se produjo mediante disolución, percibido en nuestro estudio fue la presencia de pequeñas partículas cemento de fosfato de calcio libres en las cercanías de los implantes. Estas partículas se observaron en los dos bloques de tiempo analizados y sólo a grandes aumentos debido a que tuvieron una superficie aproximada de $3 \mu\text{m}^2$. Si bien estas partículas fueron encontradas en distintas cantidades en todos los grupos que llevaban las preparaciones de hidroxiapatita, no fue nuestro objetivo el realizar un análisis comparativo entre los grupos de esta característica y discernir qué preparación presentaba una mayor solubilidad.

Al igual que en la serie de un mes, en el grupo de cemento de fosfato de calcio más colágeno, pudimos constatar que el avance lineal, grosor y madurez de la corticalización fue mayor que en los grupos de cemento control, todo ello, sin tener en cuenta las mediciones secundarias, que son las indicativas de la resistencia de las nuevas estructuras óseas creadas y que fueron menores en este grupo, tal como en el grupo de 1 mes.

En un estudio similar, se determinó que la adición de colágeno a preparaciones de hidroxiapatita y β fosfato tricálcico aumentaba la formación de hueso en defectos en radio de perros comparada con hidroxiapatita sola o combinada con médula ósea (Rodrigues y cols., 2003). Atribuimos esta característica, el efecto osteoconductor del colágeno, que actuó en

forma sinérgica al efecto osteoconductor propio de la hidroxiapatita y fue el responsable de esta mayor respuesta orgánica de la cortical del hueso frente a la implantación del cemento.

En el caso del grupo de microesferas de hidroxiapatita, tal como en el primer bloque de tiempo, se observó el mayor valor de grosor y madurez de la corticalización. Además, en este grupo se observó que la remodelación ósea fue más resistente debido a la elevada formación de estructuras óseas a nivel centromedular.

El grupo de microesferas de hidroxiapatita más colágeno, siguió el mismo patrón que el del bloque de un mes, es decir, se logró un elevado grado de remodelación, tanto en la cortical como en las estructuras de soporte, sin embargo no fue del todo anatómica debido a la formación de una intensa depresión cortical.

La reacción perióstica de este bloque fue notablemente menor que la del primero, sin embargo, atribuimos esta diferencia a la remodelación ósea ocurrida entre los dos tiempos de medición y no a una diferencia real en el efecto de las microesferas debido a que se observó esta tendencia en todos los grupos del estudio

En general observamos que las microesferas generaron una mayor respuesta en la remodelación del hueso al utilizarlas como implante óseo, lo que se deduce de la mayor proliferación de tejido en todos los niveles anatómicos donde se implantaron las microesferas, es decir, a nivel cortical, reacción perióstica y centromedular, tal como había sido demostrado en investigaciones anteriores. En este sentido, citaremos un trabajo donde se investigó la capacidad *in vitro* de las microesferas de hidroxiapatita de soportar el crecimiento de osteoblasto y se demostró que además de permitir la adhesión de osteoblastos en su superficie, también mantuvieron la capacidad de los osteoblastos de mineralizar la matriz que los rodeaba (Wu y cols., 2004)

Sin embargo, las microesferas no brindaron el soporte físico suficiente como para que la remodelación siguiera la forma de la cortical original, por lo tanto, no entregaron la resistencia mecánica necesaria para su uso en zonas de carga.

Está demostrado *in vitro*, que la adición de colágeno a un CPC incrementa la adhesión de los osteoblastos a las matrices de hidroxiapatita (Moreau y cols., 2009; Rodrigues y cols., 2003). Por otra parte, en un estudio donde se combinaron gránulos de β -TCP con colágeno, también está demostrado que la respuesta de remodelación del hueso es mayor que al utilizar la cerámica en forma exclusiva (Komaki y cols., 2006). A partir de estas observaciones esperábamos que la respuesta proliferativa fuera mayor en los grupos que contenían colágeno

con respecto a sus controles, por el hecho de que al asegurar una mayor adhesión, proliferación y diferenciación de estas células, la formación de tejido óseo sería mayor.

Sin embargo, nuestros resultados no lo demostraron y solo observamos una diferencia dada por la diferente presentación física del soporte de hidroxiapatita, siendo mayor en las microesferas que en el cemento en masa.

Por lo tanto, tal como se ha determinado en algunos estudios como por ejemplo, en el trabajo de Wu y colaboradores, las microesferas de hidroxiapatita más colágeno pueden ser usados tanto como materiales de implantación ósea como también como elementos transportadores de osteoblastos, es decir que puede ser incorporado un factor osteogénico en su preparación (Wu y cols., 2004).

Concluimos por tanto, que las microesferas de hidroxiapatita son un material prometedor en el campo de los implantes óseos, sin embargo deben ser usadas en forma combinada con otro tipo de dispositivos que aseguren la estabilidad y el soporte de carga de las estructuras óseas originales.

Por otra parte, en el grupo del defecto vacío, nuevamente existió una concordancia en la evolución de los dos bloques de tiempo, es decir, observamos un elevado avance lineal de los frentes corticales, sin embargo, el tejido formado careció de resistencia al tener un grosor mínimo y un grado de madurez bajo.

Asimismo, la remodelación ocurrida en este bloque no presentó grandes diferencias con la observada en el bloque de tiempo menor, lo que nos indicó, que a diferencia con los otros grupos, donde el tiempo aportó un factor de evolución positiva de la consolidación ósea, aquí tenemos un riesgo sostenido en el tiempo de falla mecánica o incluso biológica que puede determinar finalmente un fracaso en la consolidación ósea.

6.3. Discusión de los resultados de la evaluación histomorfométrica de las imágenes de M.E.R.

Con el objetivo de realizar mediciones histomorfométricas objetivas y extrapolables a otros estudios enmarcados en el mismo ámbito de investigación, fue definido un protocolo de mediciones tal y como fue expuesto en el apartado de Materiales y Métodos. Este protocolo fue creado abarcando todas las zonas de la muestra que podrían estar sujetas a cambios debidos a la implantación de los materiales de estudio. Desafortunadamente no encontramos en literatura ningún protocolo similar como referencia.

6.3.1. Discusión de los resultados de la serie de muestras de 1 mes

En el grupo de cemento de hidroxapatita se observó el mayor porcentaje de relleno del espacio cortical del bloque. Sin embargo, tanto la cantidad de tejido neoformado como el avance lineal de los frentes corticales fueron los menores del bloque de tiempo, lo que indicó que hubo una alta retención de material en el espacio cortical y una mayor cohesión del bloque de cemento. Estas observaciones sugirieron que la ocupación completa del espacio cortical con cemento inhibió la formación periférica de tejido, así como ocurrió en el núcleo de la masa de cemento, donde no se observó neoformación de tejido, tal como lo demuestra el grafico 4.2.

Tal y como hemos comentado anteriormente, existe evidencia bibliográfica de que un composite CPC-colágeno tiene la ventaja de poseer una mayor resistencia a la fractura y una mayor capacidad de generar uniones celulares con los osteoblastos que un cemento sin colágeno. Por ejemplo, en el estudio realizado por Moreau y colaboradores, donde se diseñó un cemento de fosfato de calcio que incluía en su preparación colágeno bovino en polvo, se comprobó mediante estudios mecánicos y estudios *in vitro* en cultivos celulares, dos aspectos claves (Moreau y cols., 2009). Por un lado, el hecho de agregar el colágeno en la preparación primaria del cemento, permitió mantener las capacidades del cemento de rellenar íntimamente las cavidades tratadas, al producirse la reacción de fraguado *in situ*, tal y como fue realizado en nuestro estudio, a diferencia de otros trabajos donde en primer lugar se formaba un implante de cemento y en segundo lugar era recubierto por colágeno. Y por otro lado que la adición de colágeno produjo un aumento de 10 veces en la resistencia a la fractura

del composite y un aumento de dos veces en la formación de uniones con los osteoblastos, requisito imprescindible para el desarrollo, mantenimiento y remodelación del tejido óseo (Moreau y cols., 2009).

A pesar que estos resultados fueron obtenidos en pruebas *in vitro*, esperábamos que, en nuestro estudio, donde fue usado un cemento similar con la única diferencia que el colágeno fue agregado en solución y no en polvo, la adición de colágeno generaría una mayor bioactividad del cemento y por lo tanto una mayor formación de tejido óseo en los defectos.

Finalmente, lo que observamos en el grupo de cemento de hidroxiapatita más colágeno fue que la cantidad de tejido neoformado en el área de corticalización fue notoriamente mayor que el grupo control, sin embargo la formación de depresión fue mayor y la formación de trabeculación centromedular fue menor, lo que indicó que, a pesar de haberse formado una mayor cantidad de tejido, la consolidación no presentó las características adecuadas para ser anatómica y resistente y probablemente requeriría un mayor tiempo para lograr resultados óptimos.

Por lo tanto, nuestros resultados no están del todo en acuerdo con las evidencias bibliográficas tomadas como base para nuestra hipótesis. Debido principalmente a que, si bien es cierto, que la cantidad de tejido fue mayor, por lo que inferimos que realmente hubo una mayor adhesión celular, el resultado global del grupo adicionado de colágeno no tuvo ventajas reales frente al grupo control sin colágeno.

Estos resultados podrían haberse dado por la interacción real que existió entre los materiales de implantación y los tejidos vivos, condiciones que no se tuvieron del todo en cuenta del todo en los estudios previamente nombrados en cultivos celulares. Así se demostró en un estudio realizado por Hempel y colaboradores, donde se realizaron pruebas similares *in vitro* en cultivos celulares intentando imitar el medio ambiente en el cual se producía la implantación. En estas condiciones se observó que la proliferación y diferenciación de las células era inhibida al usar como sustrato los composites en comparación con el sustrato de cultivo control. Especialmente en el grupo de cemento más colágeno, donde se observó que al contacto con el medio, la liberación de fosfato fue mayor y por lo tanto hubo un mayor decrecimiento en el pH. Estos cambios en los niveles de pH, y concentraciones iónicas de calcio y fosfatos fueron derivados de la interacción celular entre el material y su propia biodegradación (Hempel y cols., 2004). Aunque es cierto que *in vivo*, existen procesos circulatorios que previenen estos cambios y mantienen una homeostasis local, los microcambios en el medio, podrían ser la causa de que en el grupo de cemento con colágeno

no se obtuvieron los resultados esperados, es decir, una regeneración y remodelación óseas más rápidas y de mejor calidad.

En ambos grupos cementados, la cantidad de tejido neoformado en el interior del defecto fue mínima. No obstante, en el grupo de cemento control se observó una mayor cantidad de espacios vacíos en el núcleo del implante, por lo tanto, esperaríamos que con el tiempo de evolución, se observaría una mayor cantidad de tejido neoformado en dicha zona.

Como ya hemos comentado anteriormente, está demostrado que la porosidad es un requisito fundamental para que un material de implantación ósea pueda permitir la migración celular y vascularización de un implante (Bernhardt y cols., 2013). Por ello esperabamos que una mayor pérdida de compactibilidad del cemento, como en el caso del cemento control, estimularía un mayor crecimiento óseo, debido, principalmente, a que solo se observó este crecimiento en las áreas donde se formaron grietas y por lo tanto fue permitida la penetración celular.

Se ha demostrado que la adición de fibras biodegradables a un CPC mejora sus propiedades mecánicas y biológicas. Por ejemplo, en un estudio realizado con adición de fibras de ácido poliláctico-co-glicólico, se determinó un aumento significativo de la resistencia a la flexión en las pruebas *in vitro* y posteriormente un aumento significativo de la capacidad osteoconductora y de la tasa de degradación en las pruebas *in vivo* (Dagang y cols., 2007). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los parámetros histomorfométricos, que deberían reflejar esta mayor bioactividad, medidos en nuestros grupos controles con respecto a los grupos con adición de colágeno, tanto en grupos cementados como en grupos con implante granular. Por lo tanto, planteamos que el colágeno no actuó como promotor de la bioactividad del cemento de hidroxiapatita, al menos en el presente estudio.

En el caso del grupo de microesferas de hidroxiapatita, la principal diferencia que presentó este grupo con respecto a los cementados fue el mayor crecimiento de tejido óseo en las zonas accesorias de remodelación, es decir, en la zona centromedular y periostio.

Asimismo observamos que la cantidad de tejido neoformado en el área de corticalización en este grupo fue una de las mayores de la serie, sin embargo, el índice de calidad de la corticalización fue el menor del grupo, es decir, el tejido neoformado se distribuyó siguiendo la anchura de la cortical original más que en forma longitudinal, por lo tanto pudimos observar 2 frentes de corticalización de un grosor adecuado, pero que no

llegaron a unirse en el centro, a pesar de ello, debido a la alta calidad y cantidad de tejido, podemos extrapolar lógicamente que a mayor tiempo podríamos lograr una regeneración y remodelación total del hueso.

Si bien estos resultados parecen ser contradictorios, ya que finalmente, el avance de los frentes corticales fue menor que en otros grupos, en realidad, estamos frente a una remodelación de la cortical de mayor contundencia y calidad, lo que a la larga ofrecerá una mayor resistencia mecánica al hueso.

Tal y como había sido demostrado en otros estudios con microesferas de hidroxiapatita, la elevada área de superficie que ofrecen estas estructuras es la responsable de su alta bioactividad (Xiao y cols., 2013). Por lo tanto, esta diferencia fue atribuida a la mayor superficie de contacto que ofrecieron las microesferas de hidroxiapatita en comparación con el cemento óseo. Esta mayor superficie de contacto de las microesferas, no solamente se debe a la superficie de cada gránulo en particular sino también al efecto de macro porosidad interconectada que generan las microesferas entre sí. En otros términos, al aporte de una red tridimensional más amplia para soportar la formación de hueso.

En el grupo de microesferas con colágeno obtuvimos el mayor índice de calidad de la serie, seguido por el grupo de cemento más colágeno. Observamos que la remodelación temprana ocurrida en estas muestras fue más anatómica y funcional que la ocurrida en otros grupos.

Tal como se ha reflejado en la literatura, sugerimos que esta observación se debió a que el colágeno contribuyó al depósito temprano de minerales, crecimiento vascular y aporte de sitios de unión para los factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas, por lo tanto, proporcionó un medio ambiente favorable para la regeneración ósea en las primeras etapas de la consolidación (Giannoudis y cols., 2005). A pesar de ello, no obtuvimos diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos entre los grupos adicionados de colágeno y sus respectivos controles.

En el grupo de defecto vacío, observamos un gran avance de los frentes corticales, sin embargo, las características distintivas del grupo fueron la formación de una importante depresión del margen cortical y la prácticamente nula formación de tejido óseo en las áreas centromedular y perióstica, lo que determinó que la remodelación lograda no presentara las características anatómicas y mecánicas necesarias para una óptima funcionalidad. Estas características se traducen en un alto riesgo de colapso o fallo en la consolidación ósea.

El porcentaje de relleno de la corticalización fue mayor en los grupos implantados con cemento con respecto a los otros grupos del estudio. El análisis detallado indicó que este valor fue mayor en el grupo de cemento control con respecto al cemento con colágeno, a diferencia del grupo con implante granular donde el mayor valor fue obtenido por el grupo adicionado con colágeno, por lo tanto no fue posible definir una tendencia dada por la adición de colágeno al material con respecto a esta característica. La descomposición de este valor en porcentaje de material retenido y porcentaje de tejido neoformado indicó una mayor retención de material en los grupos cementados sobre los grupos con implantación de microesferas, al contrario de lo que ocurrió con el tejido neoformado que fue menor en los grupos cementados con respecto a los grupos con microesferas y estos a su vez fueron menores que el grupo con defecto vacío (Gráfico 4.1). Esta característica solo fue vista en este bloque de tiempo, a diferencia del bloque de tres meses, donde se encontró una diferencia significativa en la cantidad de tejido neoformado en los grupos con microesferas.

El análisis conjunto de estas dos características indicó que el material de implantación denso produjo un efecto de frenado de la neoformación ósea, tal y como ocurrió en los núcleos de los implantes de cemento, obteniendo un menor porcentaje de tejido óseo en los grupos cementados con respecto a los grupos con implantes de microesferas o defecto vacío (Gráfico 4.2).

Esta observación está relacionada con la porosidad interconectada que ofrecen las microesferas, lo que permite la migración celular y el aporte nutritivo necesarios para la neoformación de tejido óseo. Esta observación fue demostrada por Bernhardt y colaboradores en un estudio donde se evaluó *in vitro* la interacción de osteoblastos y osteoclastos con gránulos de hidroxiapatita de distinta porosidad. La conclusión obtenida fue que ha mayor porosidad, había una mayor interacción celular. En otros términos, el implante de microesferas actúa como un implante de cemento macroporoso (Bernhardt y cols., 2013).

Con respecto a la corticalización lineal, el mayor valor fue observado en el grupo del defecto vacío, no obstante, también encontramos en este grupo los mayores valores para la formación de depresión cortical y los menores valores del bloque para la formación de tejido neoformado en el área centromedular (Gráficos 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7).

En los grupos implantados, fue observada una mayor corticalización lineal en los grupos con microesferas con respecto a los grupos implantados con cemento. El comportamiento de esta característica dentro de los subgrupos no marcó una tendencia ya que en el caso de los grupos cementados se obtuvo un mayor valor en el grupo control y en el grupo de relleno granular fue al contrario.

En el área subcortical se observó que la cantidad de tejido neoformado en el interior del defecto fue notoriamente mayor en los grupos con relleno de microesferas con respecto a los grupos con relleno de cemento. En los grupos cementados y en los grupos con defecto vacío, este valor fue cercano a cero (Gráfico 4.6).

Asimismo, se observó un mayor valor para el recubrimiento trabecular en los bordes del defecto en los grupos implantados con respecto al grupo de defecto vacío, siendo este recubrimiento mayor en los grupos implantados con microesferas que en los grupos implantados con cemento (Gráfico 4.7).

Como ya hemos comentado anteriormente, atribuimos estas diferencias a la mayor superficie de contacto presente en los implantes granulares, y por lo tanto a la mayor bioactividad periférica que ofrecen este tipo de implantes, tal como ha sido demostrado en variados estudios similares que se han citado a lo largo de este trabajo.

6.3.2. Discusión de los resultados de la serie de muestras de 3 meses

Al igual que en el bloque de tiempo anterior, observamos que la mayor permanencia de material en el área de corticalización se encontró en los grupos cementados, no obstante, en este bloque de tiempo, las diferencias entre la cantidad de tejido formado en los distintos grupos cementados no fueron importantes.

Por otra parte, también observamos un aumento en la cantidad de tejido formado a nivel centromedular (trabeculación central e infiltración) en todos los grupos, especialmente en los grupos cementados. Atribuimos este cambio a la mayor disgregación y reabsorción que sufrió la masa de cemento en forma periférica, dado el mayor tiempo de esta serie, lo que permitió una mayor exposición de superficie de la hidroxiapatita y por lo tanto una mayor adhesión y colonización celular.

En general, el grupo de cemento de fosfato de calcio más colágeno presentó resultados similares a su control, es decir, observamos niveles moderados de corticalización lineal e índices de calidad de la corticalización, así como niveles bajos de depresión, por lo que la remodelación se clasificó como anatómica y resistente a pesar de no haberse completado aún del todo. A pesar de ello, comparando los resultados de ambos bloques de tiempo, se podría esperar que a mayor tiempo, la evolución de la corticalización siguiera una progresión positiva, por lo menos en los grupos implantados con cemento y microesferas.

En este bloque se pudo observar que ambos grupos de microesferas presentaron un índice de calidad de la corticalización mayor que los del bloque de un mes, lo que indicó, que si bien no se había logrado aún la remodelación completa en todas las muestras del grupo, la remodelación generada con este tipo de implantes fue la más cercana a la óptima obtenida en el estudio.

En el grupo de microesferas de hidroxiapatita más colágeno, se observaron resultados similares a los de su grupo control, es decir, se observó un alto índice de calidad, debido a que la cantidad de tejido neoformado fue alta y se organizó de manera adecuada rellenando el espacio de corticalización de forma relativamente homogénea. A pesar de este alentador resultado, el nivel de formación de depresión logrado en este grupo fue muy alto, probablemente debido a una elevada migración de las microesferas.

Por otro lado, la cantidad de tejido neoformado en las zonas accesorias fue de las más altas del bloque.

Con estas últimas observaciones podemos decir que los implantes de microesferas de hidroxiapatita, sin hacer distinción entre presencia o no de colágeno en su formulación, arrojaron los mejores resultados del estudio en cuanto a la calidad funcional de la corticalización y que probablemente, generarían una remodelación completa en un menor tiempo y por lo tanto con menores riesgos de falla biológica o mecánica de la consolidación ósea

Con respecto al grupo de defecto vacío, podemos decir que la evolución de este grupo de muestras fue similar a la del bloque de tiempo anterior, es decir, observamos un alto grado de avance de los frentes corticales, pero con una remodelación no anatómica y poco funcional, de hecho, se observó el mayor nivel en la formación de depresión y el menor índice de calidad de la corticalización.

En otras palabras, tal como esperábamos al plantearnos el estudio, por el hecho de ser un defecto óseo de tamaño subcrítico, obtuvimos cierta corticalización lineal, incluso de un 100% en algunas muestras, pero, sin embargo, el proceso de consolidación no fue completado del todo en este punto, sino que obligatoriamente necesitaría un largo proceso de remodelación posterior que le brindara la resistencia y fuerza necesarias para lograr un hueso funcional. Sin embargo, la progresión lógica de la consolidación en estas muestras no siempre mostraba una tendencia al engrosamiento de la cortical, por el contrario, el alto grado de madurez del tejido que contrastaba con su grosor mínimo, indicaría que no se produciría una mayor cantidad de tejido, lo que implicaría que el riesgo de fallo biológico o mecánico se prolongaría en el tiempo.

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Todtmann y colaboradores, en un estudio donde se evaluó la modificación de la formulación de un cemento CPC, mediante la adición de colágeno y otras sustancias tales como osteocalcina y citrato de sodio y se comprobó que en los defectos vacíos hubo una tasa de remodelación ósea de un 65%, la cual fue significativamente mayor que la presentada por el grupo de cemento control, por lo que se concluyó que, a pesar de que histológicamente los tejidos neoformados en los grupos con cemento control o cemento modificado fueron de mayor madurez y calidad, los valores histomorfométricos fueron similares, es decir, no hubieron grandes diferencias en la remodelación fisiológica de los defectos vacíos en comparación con los que se rellenaron con los productos osteoconductores (Todtmann y cols., 2013).

Dado, que el tejido óseo tiene una alta capacidad de regeneración y consolidación, en dicho estudio, tal como en el nuestro, los defectos vacíos se utilizaron como una medida estándar de la consolidación ósea espontánea y sirvieron como referencia de comparación para los productos evaluados

El porcentaje de relleno de la corticalización en la serie de 3 meses presentó un comportamiento distinto al del grupo de 1 mes en los diferentes grupos implantados, principalmente debido a que los valores obtenidos fueron más homogéneos, destacando los grupos implantados con microesferas con el mayor valor y el grupo vacío con el menor.

Con respecto a la retención del material, también se comportó de manera distinta al grupo de 1 mes, debido a que se obtuvieron valores similares en ambos grupos cementados y en cuanto a los grupos rellenados con microesferas, se observó una ligera disminución en el grupo de microesferas con colágeno. A pesar de estas diferencias, el análisis conjunto de ambas características mostró igual tendencia que el grupo de 1 mes, es decir, que a medida que disminuía el material de implantación presente en el espacio de la corticalización, hubo una mayor cantidad de tejido neoformado.

La formación de depresión en este bloque tuvo su mayor valor en el grupo vacío, al igual que en la serie de un mes.

Los otros parámetros medidos también tuvieron comportamientos similares a los de la serie de un mes.

La hidroxiapatita y el colágeno poseen dos propiedades importantes para actuar como injerto óseo, que son la osteointegración y la osteoconducción, sin embargo, carecen de las capacidades de osteoinducción y osteogénesis requeridas en un injerto ideal (Vozzi y cols., 2013).

No obstante, estos materiales, por si solos, no pueden ser directamente usados como materiales de sustitución ósea, debido a que por un lado las masas compactas de hidroxiapatita no proveen de una estructura porosa con características biodegradables para facilitar la colonización de células formadoras de tejido óseo y por otro, las estructuras colágenas en sí mismas, no proveen de las propiedades mecánicas requeridas para el éxito de un implante óseo (Vozzi y cols., 2013). Es por ello que en este estudio se planteó la creación de dos formulaciones compuestas de hidroxiapatita y colágeno en distintas presentaciones físicas (masas de cemento y microesferas) para evaluar su bioactividad.

En algunos grupos del estudio, pudimos ver, que los materiales probados aportaron un importante estímulo para la formación de hueso e hicieron que el proceso de remodelación y consolidación ósea ocurriera de forma más rápida y consistente. Sin embargo, a pesar que durante el proceso de consolidación se fueron observando algunas diferencias que hacían creer que el colágeno generaría un mayor efecto estimulante de la remodelación ósea, finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos con y sin colágeno, en ambas categorías del estudio. Sino más bien, la diferencia fue dada por la presentación física de los sustratos utilizados, es decir, las únicas diferencias estadísticamente significativas encontradas en nuestros resultados, fueron vistas entre los grupos rellenos con microesferas en comparación con los grupos cementados y los grupos de defecto vacío en conjunto.

Por lo tanto, podemos decir que, el efecto estimulante de la consolidación ósea definido para los materiales utilizados se atribuyó a la presentación física de la hidroxiapatita y no a la presencia de colágeno en el compuesto, debido principalmente a la porosidad interconectada de las microesferas que entregaría una red física osteoconductora amplia para soportar el crecimiento óseo (Bernhardt y cols., 2013) y también por la mayor superficie de contacto que ofrecen las microesferas con los elementos biológicos, lo que aumenta su capacidad de actuar como sitios de adhesión celular y su bioactividad general (Wu y cols., 2004).

Corroborando nuestros resultados, también podemos citar un estudio realizado por Mooney y colaboradores, donde se realizó una comparación entre la implantación de hueso esponjoso y dos tipos de gránulos de hidroxiapatita con distinta porosidad, para producir fusión vertebral en un modelo en cabras y se observó que todos los implantes tenían la misma efectividad, es decir, que los gránulos de hidroxiapatita estimularon de la misma manera que el implante de hueso esponjoso la neoformación de tejido óseo y que por lo tanto, a los tres meses postimplantación, los implantes habían sido incorporados periféricamente al hueso y

que ambos defectos habían sido rellenados de hueso, con la única diferencia, de que los implantes de gránulos de hidroxiapatita densa habían formado menos hueso en su núcleo que los de hidroxiapatita porosa o los de hueso autólogo. De esta forma, podemos concluir que, el número de interconexiones entre las microesferas de hidroxiapatita ofrece un gran potencial para la vascularización y la neoformación de hueso multiplicando la capacidad osteoconductor propia del material base (Mooney y cols., 1998).

Por otra parte, a pesar que nuestro estudio tenía como objetivo evaluar estos compuestos en forma biológica y no mecánica, podemos aportar como antecedente que las diferencias en la presentación física de la hidroxiapatita también puede aportar diferencias en la resistencia mecánica del compuesto, tal y como fue demostrado en un estudio donde se chequeó el efecto de utilizar hidroxiapatita en distintas formas físicas para formar un compuesto de utilización en medicina dental y se concluyó que la adición de hidroxiapatita en microesferas al compuesto produjo un aumento significativo de la resistencia a la flexión comparada con otras presentaciones del mismo material. Ello se debió a la organización esférica del material, que permitió que las fuerzas aplicadas sobre la microesfera fueran disipadas antes de su fractura (Lezaja y cols., 2013).

6.4. Discusión de resultados de la evaluación histológica de las imágenes

El principal objetivo de este apartado fue evaluar la biocompatibilidad de los materiales probados, por lo tanto, se definió un tiempo de 12 días como el tiempo adecuado para detectar alguna reacción inflamatoria generada por la implantación, tal como se había realizado en otros estudios donde el tiempo mínimo ha sido definido entre 1 y 2 semanas postimplantación (Mino-Farina y cols., 2009)

En el grupo de cemento de hidroxiapatita, todas las características observadas, indicaron el comienzo del proceso normal de consolidación ósea, esto es, la presencia de células óseas especializadas, como osteoblastos y osteoclastos, que indicaron remodelación ósea y la formación de una fina capa de tejido conectivo laxo sobre la cara externa del implante de cemento.

Por otro lado, la cantidad de células inflamatorias detectadas en las muestras fue mínima, por lo tanto podemos inferir que este material no produjo una reacción inflamatoria en el tejido posterior a la implantación.

Al igual que el grupo de cemento control, en el grupo de cemento de fosfato de calcio más colágeno, no encontramos evidencias histológicas de la presencia de inflamación alrededor del implante, sino más bien que una respuesta de remodelación del hueso, especialmente notoria en la invasión de células osteogénicas en las grietas formadas en el bloque de cemento.

Tal como se ha publicado en artículos de investigación similares al nuestro, comprobamos que la hidroxiapatita es un material biocompatible, que no causa reacciones inflamatorias, alérgicas o tóxicas, agudas o crónicas. Para ello podemos citar el trabajo de Mai y colaboradores, donde se evaluó histológicamente la reabsorción de un implante de cemento de hidroxiapatita en mandíbula, a corto y medio plazo, observándose que bajo condiciones *in vivo*, el cemento de hidroxiapatita es reabsorbible y mostró buena biocompatibilidad. En este estudio, también se concluyó que la bioabsorción del cemento fue realizada mediante la combinación de actividad celular de macrófagos y solubilidad fisiológica. Esta actividad fue constatada en la primera evaluación histológica realizada 1 mes postimplantación, donde se observaron numerosas células gigantes multinucleadas en la interfase hueso implante, luego a los 3 meses de evolución se observó la presencia de osteoblastos de revestimiento y la formación de una capa de osteoide alrededor del implante. Finalmente, a los 12 meses de evolución no se detectaron restos del cemento, sino que este había sido reemplazado en su totalidad por hueso esponjoso (Mai y cols., 2008). Por otra parte, existen también evidencias bibliográficas donde se ha comprobado la excelente biocompatibilidad del colágeno, como por ejemplo en el trabajo realizado por Rocha donde fueron implantados andamios de colágeno con distintas características físicas en tibias de ratas y se comprobó que en ninguno de los grupos, ni en los tiempos estudiados, existió una reacción inflamatoria de alto nivel, sino que solo fueron encontradas las células inflamatorias presentes normalmente en cualquier proceso de creación de defectos óseos, por lo que los defectos vacíos fueron similares en este aspecto a los defectos implantados con andamios de colágeno (Rocha y cols., 2002).

Tal como pudimos concluir en las evaluaciones anteriormente realizadas, la forma física de este tipo de hidroxiapatita generó una mayor bioactividad.

En los grupos anteriores observamos agregación celular en los bordes y en las grietas del implante, sin embargo, en el grupo de microesferas de hidroxiapatita, pudimos observar que cada microesfera presentó la tendencia a ser rodeada completamente por células

osteogénicas, lo que multiplicó exponencialmente la cantidad de células que tuvieron contacto con el compuesto en comparación con el cemento en masa.

Al igual que los grupos anteriores, no fueron encontrados signos de inflamación tisular en los grupos con implante granular.

Estas mismas características fueron observadas en el grupo de microesferas de hidroxiapatita más colágeno, sin embargo, se observó la formación de una mayor cantidad de manojos de colágeno dentro y alrededor del implante. A pesar de no haber realizado un análisis cuantitativo de esta característica, podemos sugerir que el colágeno presente en el compuesto fue el responsable de la inducción de este proceso.

En resumen, en este apartado, hemos observado que la implantación de hidroxiapatita ya sea como masa o como microesfera generó una respuesta favorable de parte del hueso, estimulando la remodelación ósea y que en ningún caso provocó una respuesta inflamatoria temprana que pudiera afectar finalmente la consolidación del defecto.

Nuestros resultados concuerdan con los reflejados en la literatura, donde se ha documentado la excelente biocompatibilidad del cemento de fosfato de calcio. Por ejemplo, en un estudio realizado con implantación de cemento de hidroxiapatita y α -TCP, donde no se detectó reacción inflamatoria o formación de tejido fibroso en ninguno de los tiempos de su experimento (1,4 y 12 semanas) (Mino-Farina y cols., 2009).

A pesar de ello, existen algunas evidencias bibliográficas opuestas que han demostrado que eventualmente la hidroxiapatita puede provocar reacciones tisulares tardías adversas como por ejemplo en un estudio donde se realizó un análisis histológico, 4 meses postimplantación de andamios de hidroxiapatita y gelatina y se encontraron signos de reacción a cuerpo extraño tales como la presencia de células gigantes multinucleadas que contenían partículas del compuesto en su citoplasma (Gil-Albarova y cols., 2012). Lamentablemente, nosotros no realizamos una evaluación histológica a este tiempo que pueda ser comparable con estos resultados, pero extrapolando nuestros resultados histomorfométricos, creemos que, en nuestro caso, no se produjo reacción inflamatoria ni a corto ni a largo plazo en los sitios de implantación, por lo que también podemos suponer que las reacciones inflamatorias detectadas en dicho estudio pueden haberse dado por la gelatina más que por la hidroxiapatita.

Por otra parte la remodelación detectada en nuestro estudio siguió el patrón descrito en la literatura. Por ejemplo, en un estudio donde se implantó un CPC para estimular el crecimiento de hueso en la unión hueso-tendinosa en una cirugía de reparación de ligamento

cruzado, se observó que 1 semana postimplantación aún no se detectaban signos de remodelación, sino solamente la formación de finas capas de tejido conectivo alrededor del implante, sin embargo a las tres semanas postimplantación fue posible observar la formación de islas de tejido óseo creciendo en la estructura porosa de hidroxapatita (Tien y cols., 2004).

En nuestro estudio, realizamos el análisis a un tiempo intermedio de estas dos observaciones (12 días) y pudimos detectar por un lado signos de remodelación ósea y por otro la formación de una capa de tejido conectivo en la superficie externa del implante en todos los grupos del estudio, lo que indicó que ninguno de los productos utilizados provocó un retardo en la remodelación y consolidación ósea.

6.5. Discusión de los resultados del análisis estadístico

Según los resultados obtenidos, podemos inferir que la evaluación semicuantitativa de las imágenes, para la cual no se necesita ninguna herramienta informática especial, sino que solamente es necesario un investigador capacitado que realice el análisis observacional, nos entregó resultados válidos, fiables y comparables con los resultados del análisis cuantitativo (histomorfométrico), el cual necesita un programa computacional específico y una mayor disponibilidad de tiempo, aunque elimina el factor de variación individual.

Sin embargo, en el caso de la medición de depresión habría que realizar alguna modificación en la técnica de medición semicuantitativa para llegar a una correlación mayor y por lo tanto obtener resultados comparables entre las dos metodologías.

La matriz de correlación de las variables respuesta indicó que, al haber correlaciones altas, fue factible utilizar un análisis estadístico multivariado que resumiera la información y evitara la obtención de resultados aislados que no pudieran ser aplicados a la totalidad de las variables en estudio, de esta forma comprobamos que el tipo de análisis realizado se ajustó a los objetivos del estudio.

El análisis de varianza realizado sobre los vectores propios obtenidos por el ACP indicó que existían diferencias significativas dentro de los tratamientos aplicados, sin embargo, no definió la fuente de variación, con este objetivo, fue realizada la prueba de Tukey que precisó la ubicación de las diferencias entre los tratamientos, definiendo dos grupos distintos dentro del estudio, por un lado están los tratamientos A, B y E (cementos y control) que son

estadísticamente similares entre sí y por otro lado los tratamientos C y D (microesferas de hidroxiapatita) que son igualmente similares entre sí.

Este resultado nos indicó que los mejores resultados globales se obtuvieron con el producto aplicado en forma de microesferas, sin embargo no se detectaron diferencias en la adición de colágeno sobre alguna de las preparaciones.

6.6. Discusión global de los resultados

De acuerdo a los objetivos propuestos en nuestro estudio y a los resultados obtenidos, podemos decir que fuimos capaces de verificar la excelente biocompatibilidad de los materiales utilizados en nuestro estudio tanto a nivel clínico, reflejada en la excelente recuperación postquirúrgica de los animales, como también en la evaluación histológica realizada, reflejada en la ausencia de una reacción inflamatoria exacerbada como respuesta a la implantación. Estos resultados son concordantes con muchos estudios presentes en literatura que fueron citados en este capítulo, como por ejemplo el trabajo de implantación de cemento óseo realizado por Aberg cuyo objetivo fue evaluar la biocompatibilidad y reabsorción de los materiales mediante histología, inmunohistoquímica y análisis de la inflamación sistémica, llegando a la conclusión de que el cemento permitió una rápida neoformación ósea sin provocar ninguna reacción inmunológica considerable (Aberg y cols., 2012). También citaremos el trabajo de Rocha, donde se realizó implantación de andamios de colágeno de distintas características físico-químicas y se llegó a similares conclusiones con respecto a dicho material, es decir que el colágeno provocó una baja respuesta inflamatoria, por lo tanto, no existió ningún retraso en el proceso de curación debido a inflamación aguda o crónica (Rocha y cols., 2002). Por otra parte, el diseño experimental, con un grupo control y 2 bloques de tiempo nos permitió obtener resultados progresivos en el tiempo que pudieran ser extrapolables al proceso completo de consolidación y remodelación ósea.

Existe evidencia bibliográfica en trabajos *in vitro* que apoya la hipótesis de que la adición de colágeno a un cemento de hidroxiapatita mejorará sus propiedades osteoconductoras, como por ejemplo los resultados obtenidos por Perez, quien trabajó con cultivos celulares sobre andamios de hidroxiapatita y concluyó que la respuesta celular era incrementada en los grupos donde los andamios contenían colágeno en comparación con los que solo contenía hidroxiapatita (Perez y cols., 2011). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el proceso de consolidación ósea, con respecto a la cantidad y calidad del tejido neoformado, tanto en el bloque de 1 mes como en el de 3 meses, no reflejaron diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos con y sin colágeno. Esto podría deberse a la elevada complejidad del proceso de consolidación ósea *in vivo*, el cual incluye un sin número de interacciones celulares y microambientales que actúan en forma coordinada y que no pueden ser reproducidas en los trabajos *in vitro*. Esta conclusión está de acuerdo con los resultados obtenidos por Hempel en un estudio donde se trabajó con cultivos celulares intentado detectar los efectos de los cambios microambientales en la actividad celular y se comprobó que pequeñas variaciones de pH o de las concentraciones de calcio y fosfato, derivadas de la interacción del implante con el tejido vivo, producen un estrés considerable sobre los osteoblastos que puede traer como consecuencia la inhibición de la diferenciación celular (Hempel y cols., 2004). A pesar de ello, podemos decir que así como en la naturaleza el efecto osteoconductor del colágeno tiene su mayor efecto en las fases primarias del proceso de mineralización ósea, probablemente, en nuestro compuesto actúe de la misma manera, es decir, aportando solidez a las primeras etapas, sin embargo, al ser dicho proceso de consolidación largo y complejo, esta mejora no se ve reflejada en el proceso global.

Por otra parte, mientras la adición de colágeno no reflejó diferencias en la capacidad osteoregenerativa del defecto, nuestro estudio si mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la capacidad de regeneración ósea de la presentación en forma de microesferas en comparación con la de cemento en masa. Esto fue observado tanto en las muestras de 1 como de 3 meses. A partir de estas observaciones, pudimos deducir que el efecto osteoconductor propio del cemento se vio acentuado por la formación de una red tridimensional de mayor envergadura dada por la suma de la mayor superficie de contacto aportada por las microesferas con la red tridimensional formada entre las microesferas en sí. Esta observación concuerda con los resultados de algunos estudios presentes en literatura, como por ejemplo en el estudio realizado por Mooney, donde se realizó la implantación de gránulos de hidroxiapatita de distinta porosidad y se concluyó que el mayor efecto de mejora del potencial osteoconductor de los gránulos fue dado por el número de interacciones entre los gránulos que aportó un gran potencial de invasión vascular que permitiría la neoformación ósea (Mooney y cols., 1998).

Por último podemos decir que el protocolo de análisis histomorfométrico diseñado para este estudio dio los resultados esperados, permitiendo comparar objetivamente el proceso de consolidación entre los distintos grupos de muestras y obtener resultados fiables y repetibles, por lo tanto, es extrapolable a otros estudios con objetivos similares.

7. CONCLUSIONES

Conclusiones

El análisis detenido de nuestros resultados y su comparación con la información existente en literatura nos llevaron a definir las siguientes conclusiones:

Primera: El aporte de colágeno a la formulación del cemento óseo de hidroxiapatita no produjo diferencias estadísticamente significativas en la respuesta ósea regenerativa *in vivo* en tejido corticoesponjoso de fémur de conejo.

Segunda: El tipo de soporte físico utilizado para implantar la hidroxiapatita determina diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta regenerativa *in vivo* siendo la presentación en forma de microesferas la que presenta una mejor respuesta en comparación con la del cemento en masa.

Tercera: El mayor efecto promotor de la regeneración ósea observado en las microesferas de hidroxiapatita se basa en la elevada superficie de contacto que tiene este material con el tejido vivo y por el efecto de poros interconectados que genera su distribución tridimensional.

Cuarta: La regeneración de la cortical ósea superficial debe ir acompañada, en las primeras etapas de la consolidación, por neoformación de tejido óseo en las estructuras más profundas del hueso para aportar una mayor consistencia a las estructuras neoformadas mientras se produce la remodelación general del hueso.

Quinta: El protocolo de medición histomorfométrica de la evolución de la consolidación ósea de defectos óseos diseñado en este estudio demostró ser un método eficaz, objetivo y extrapolable a otros estudios con objetivos similares.

Sexta: Los métodos de evaluación semicuantitativa e histomorfométrica son altamente comparables, sin embargo, en algunos parámetros, como por ejemplo la medición de la depresión cortical es necesario realizar una mejora en el protocolo de medición para lograr una mayor concordancia entre ambos métodos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. 1995. Healing of experimentally created defects: A review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 33(5):312-8.
2. Aberg J, Henriksson HB, Engqvist H, Palmquist A, Brantsing C, Lindahl A, Thomsen P, Brisby H. 2012. Biocompatibility and resorption of a radiopaque premixed calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A* 100(5):1269-78.
3. Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, Kuebler AC. 2008. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: A microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37(7):651-9.
4. Albrektsson TA and Johansson CJ. 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* 10(2):S96-S101.
5. Ambard AJ and Mueninghoff L. 2006. Calcium phosphate cement: Review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont* 15(5):321-8.
6. Axelrad TW and Einhorn TA. 2011. Use of clinical assessment tools in the evaluation of fracture healing. *Injury* 42(3):301-5.
7. Bao C, Chen W, Weir MD, Thein-Han W, Xu HH. 2011. Effects of electrospun submicron fibers in calcium phosphate cement scaffold on mechanical properties and osteogenic differentiation of umbilical cord stem cells. *Acta Biomater* 7(11):4037-44.
8. Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P. 2012. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)* 30(2):47-53.
9. Bernhardt A, Dittrich R, Lode A, Despang F, Gelinsky M. 2013. Nanocrystalline spherical hydroxyapatite granules for bone repair: In vitro evaluation with osteoblast-like cells and osteoclasts. *J Mater Sci Mater Med* 24(7):1755-66.
10. Blom A. 2007. (V) which scaffold for which application? *Current Orthopaedics* 21(4):280-7.
11. Bohner M, Bohner. 2001. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal* 10(2):S114-21.
12. Bohner M. 2010. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *Eur Cell Mater* 20:1-12.
13. Bohner M. 2000. Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31, Supplement 4:D37-47.
14. Bradt J, Mertig M, Teresiak A, Pompe W. 1999. Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation. *Chem Mater* 11(10):2694-701.

15. Bronner F, Farach-Carson M, Roach H. 2010. Bone and development. topics in bone biology. London: Springer.
16. Claes LE and Cunningham JL. 2009. Monitoring the mechanical properties of healing bone. *Clin Orthop Relat Res* 467(8):1964-71.
17. Coelho PG, Coimbra ME, Ribeiro C, Fancio E, Higa O, Suzuki M, Marincola M. 2009. Physico/chemical characterization and preliminary human histology assessment of a β -TCP particulate material for bone augmentation. *Materials Science and Engineering: C* 29(7):2085-91.
18. Cypher TJ and Grossman JP. 1996a. Biological principles of bone graft healing. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 35(5):413-7.
19. Cypher TJ and Grossman JP. 1996b. Biological principles of bone graft healing. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 35(5):413-7.
20. Dagang G, Haoliang S, Kewei X, Yong H. 2007. Long-term variations in mechanical properties and in vivo degradability of CPC/PLGA composite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 82B(2):533-44.
21. De la Garza C, Mendoza O, Galván R, Briseño R, Alvarez E. 2004. Banco de hueso y tejidos: Alta tecnología disponible para los ortopedistas mexicanos. *Acta Ortop Mexicana* 18(6):261-5.
22. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. 2011. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med* 9:66.
23. Dorozhkin S. 2010. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 31(7):1465-85.
24. Dorozhkin S. 2008. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal of Materials Science* 43(9):3028-57.
25. Ducy P. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-452 .
26. Fitzgerald RH, Fitzgerald R, Kaufer H, Malkani AL. 2004. *Ortopedia*. Panamericana.
27. Franch J, García F, Manzanares C. 1998. Backscattered electron imaging of the calcified tissues present in bone healing. *VCOT* 11:115-1.
28. Fujikawa K, Sugawara A, Murai S, Nishiyama M, Takagi S, Chow LC. 1995. Histopathological reaction of calcium phosphate cement in periodontal bone defect. *Dent Mater J* 14(1):45-57.
29. Gautier H, Daculsi G, Merle C. 2001. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: In vitro characterization and microbiological activity. *Biomaterials* 22(18):2481-7.
30. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. 2005. Bone substitutes: An update. *Injury* 36 Suppl 3:S20-7.

31. Gil-Albarova J, Vila M, Badiola-Vargas J, Sanchez-Salcedo S, Herrera A, Vallet-Regi M. 2012. In vivo osteointegration of three-dimensional crosslinked gelatin-coated hydroxyapatite foams. *Acta Biomater* 8(10):3777-83.
32. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. 2010. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* 6(8):2863-73.
33. Gleeson JP, Plunkett NA, O'Brien FJ. 2010. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 20:218-30.
34. Gomez-Benito MJ, Garcia-Aznar JM, Kuiper JH, Doblare M. 2005. Influence of fracture gap size on the pattern of long bone healing: A computational study. *J Theor Biol* 235(1):105-19.
35. Hadjidakis D and Androulakis II. 2006. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092(1):385-96.
36. Hamerschmidt R, Santos RF, Araujo JC, Stahlke Jr HJ, Agulham MA, Moreira AT, Mocellin M. 2011. Hydroxyapatite granules used in the obliteration of mastoid cavities in rats. *Braz J Otorhinolaryngol* 77(3):315-21.
37. Harwood PJ, Newman JB, Michael ALR. 2010. (ii) an update on fracture healing and non-union. *Orthopaedics and Trauma* 24(1):9-23.
38. Hempel UF, Reinstorf AF, Poppe MF, Fischer UF, Gelinsky MF, Pompe W FAU - Wenzel, K.W., Wenzel KW. 2004. Proliferation and differentiation of osteoblasts on biocement D modified with collagen type I and citric acid. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 71(B):130-143.
39. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. 2009. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)* 57(4):318-23.
40. Ishikawa H, Koshino T, Takeuchi R, Saito T. 2001. Effects of collagen gel mixed with hydroxyapatite powder on interface between newly formed bone and grafted achilles tendon in rabbit femoral bone tunnel. *Biomaterials* 22(12):1689-94.
41. Jiao Y, Lu Y, Xiao G, Xu W, Zhu R. 2012. Preparation and characterization of hollow hydroxyapatite microspheres by the centrifugal spray drying method. *Powder Technol* 217(0):581-4.
42. Kane RJ and Roeder RK. 2012. Effects of hydroxyapatite reinforcement on the architecture and mechanical properties of freeze-dried collagen scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 7:41-9.
43. Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. 2001. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* 22(13):1705-11.

44. Kikuchi M, Ikoma T, Itoh S, Matsumoto HN, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J. 2004. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Composites Sci Technol* 64(6):819-25.
45. Komaki H, Tanaka T, Chazono M, Kikuchi T. 2006. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of beta-tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2. *Biomaterials* 27(29):5118-26.
46. Kruger R and Groll J. 2012. Fiber reinforced calcium phosphate cements -- on the way to degradable load bearing bone substitutes? *Biomaterials* 33(25):5887-900.
47. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. 2008. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone* 42(5):932-41.
48. Lewandrowski K, D. Gresser J, Wise DL, Trantolo DJ. 2000. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: A histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials* 21(8):757-64.
49. Lezaja M, Veljovic DN, Jokic BM, Cvijovic-Alagic I, Zrilic MM, Miletic V. 2013. Effect of hydroxyapatite spheres, whiskers, and nanoparticles on mechanical properties of a model BisGMA/TEGDMA composite initially and after storage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101:1469-1476
50. Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. 2011. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury* 42(6):569-73.
51. Little N, Rogers B, Flannery M. 2011. Bone formation, remodelling and healing. *Surgery (Oxford)* 29(4):141-5.
52. Liu X, Wang XM, Chen Z, Cui FZ, Liu HY, Mao K, Wang Y. 2010. Injectable bone cement based on mineralized collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 94(1):72-9.
53. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. 2008. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40(1):46-62.
54. Mai R, Reinstorf A, Pilling E, Hlawitschka M, Jung R, Gelinsky M, Schneider M, Loukota R, Pompe W, Eckelt U, et al. 2008. Histologic study of incorporation and resorption of a bone cement-collagen composite: An in vivo study in the minipig. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105(3):e9-14.
55. Marsell R and Einhorn TA. 2011. The biology of fracture healing. *Injury* 42(6):551-5.
56. McPhee S and Hammer G. 2006. *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*, 6e. Mc Graw Hill
57. Mead R. 1988. *The design of experiments : Statistical principles for practical applications*. Cambridge [England]; New York: Cambridge University Press.

-
58. Meseguer L. 1996. Estudio de la respuesta ósea del compuesto [beta]-fosfato tricálcico-colágeno en la reconstrucción de defectos óseos. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones.
 59. Miller MD. 2009. Ortopedia y traumatología. revisión sistemática + expert consult. Quinta ed. Elsevier.
 60. Mills SE. 2007. Histology for pathologists. Lippincott Williams & Wilkins.
 61. Mino-Farina N, Munoz-Guzon F, Lopez-Pena M, Ginebra MP, Del Valle-Fresno S, Ayala D, Gonzalez-Cantalapiedra A. 2009. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. *Vet J* 179(2):264-72.
 62. Mooney V, Massie JB, Lind BI, Rah JH, Negri S, Holmes RE. 1998. Comparison of hydroxyapatite granules to autogenous bone graft in fusion cages in a goat model. *Surg Neurol* 49(6):628,33; discussion 633-4.
 63. Morales de Cano JM, García Ruzafa A, Planell Estany JA, Ginebra Molins MP, Driessens FCM, Hernández Hermoso JA. Estudio de un cemento bioactivo de hidroxapatita como material de sustitución ósea. *Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales*.10(1):19-24 .
 64. Moreau JL, Weir MD, Xu HH. 2009. Self-setting collagen-calcium phosphate bone cement: Mechanical and cellular properties. *J Biomed Mater Res A* 91(2):605-13.
 65. Narváez M. Propuesta para el análisis de las propiedades mecánicas del hueso esponjoso vertebral. 2001. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
 66. Perez RA, Ginebra MP, Spector M. 2011. Cell response to collagen-calcium phosphate cement scaffolds investigated for nonviral gene delivery. *J Mater Sci Mater Med* 22(4):887-97.
 67. Ragetly GR and Griffon DJ. 2011. The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. *Vet Comp Orthop Traumatol* 24(1):1-8.
 68. Rho J, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 20(2):92-102.
 69. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. 2002. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 23(2):449-56.
 70. Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA, Duarte ME, Farina M. 2003. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bonetissue engineering. *Biomaterials* 24(27):4987-97.
 71. Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K. 1998. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* 23(4):319-26.

72. Schneiders W, Reinstorf A, Pompe W, Grass R, Biewener A, Holch M, Zwipp H, Rammelt S. 2007. Effect of modification of hydroxyapatite/collagen composites with sodium citrate, phosphoserine, phosphoserine/RGD-peptide and calcium carbonate on bone remodelling. *Bone* 40(4):1048-59.
73. Sumner-Smith G. 1992. *Bone in clinical orthopaedics*. 2002nd ed. Germany: W.B. Saunders Co.
74. Teng S, Chen L, Guo Y, Shi J. 2007. Formation of nano-hydroxyapatite in gelatin droplets and the resulting porous composite microspheres. *J Inorg Biochem* 101(4):686-91.
75. Tien YC, Chih TT, Lin JH, Ju CP, Lin SD. 2004. Augmentation of tendon-bone healing by the use of calcium-phosphate cement. *J Bone Joint Surg Br* 86(7):1072-6.
76. Todtmann N, Lode A, Mann R, Mai R, Lauer G, Wieczorek K, Eckelt U. 2013. Influence of different modifications of a calcium phosphate cement on resorption and new bone formation: An in vivo study in the minipig. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101(8): 1410-1418.
77. Vallet-Regí M. 2010. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chimie* 13(1-2):174-85.
78. Van der Stok J, Van Lieshout EMM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. 2011. Bone substitutes in the netherlands – A systematic literature review. *Acta Biomaterialia* 7(2):739-50.
79. Vicario C. 2003. *El efecto osteoinductor de la matriz de los aloinjertos. estudio experimental en cultivos de osteoblastos humanos*. Madrid, España.: Universidad Complutense de Madrid.
80. Vozzi G, Corallo C, Carta S, Fortina M, Gattazzo F, Galletti M, Giordano N. 2013. Collagen-gelatin-genipin-hydroxyapatite composite scaffolds colonized by human primary osteoblasts are suitable for bone tissue engineering applications: In vitro evidences. *J Biomed Mater Res A*. Online Publication
81. Wahl DA and Czernuszka JT. 2006. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater* 11:43-56.
82. Weiss DD, Sachs MA, Woodard CR. 2003. Calcium phosphate bone cements: A comprehensive review. *J Long Term Eff Med Implants* 13(1):41-7.
83. Wong LCY, Chiu WK, Russ M, Liew S. 2012. Review of techniques for monitoring the healing fracture of bones for implementation in an internally fixated pelvis. *Med Eng Phys* 34(2):140-52.
84. Wu T, Huang H, Lan C, Lin C, Hsu F, Wang Y. 2004. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. *Biomaterials* 25(4):651-8.

-
85. Xiao W, Fu H, Rahaman MN, Liu Y, Bal BS. 2013. Hollow hydroxyapatite microspheres: A novel bioactive and osteoconductive carrier for controlled release of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. *Acta Biomater* 9(9):8374-83.
 86. Yin Hsu F, Chueh S, Jiin Wang Y. 1999. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. *Biomaterials* 20(20):1931-6.
 87. Zachary J and McGavin D. 2012. *Patologic basis of veterinary disease*, 5th edition. 5th ed. Mosby: Elsevier.
 88. Zeng X, Hu H, Xie L, Lan F, Jiang W, Wu Y, Gu Z. 2012. Magnetic responsive hydroxyapatite composite scaffolds construction for bone defect reparation. *International Journal of Nanomedicine* 7: 3365-7
 89. Zubillaga I, Sánchez G, Montalvo JJ. 2007. Reconstrucción craneal con biomateriales: Revisión histórica y estado actual. *Revista Española De Cirugía Oral Y Maxilofacial* 29(2):79-89.

9. RESUMEN

ABSTRACT

Resumen

La regeneración de hueso derivada de la pérdida de masa ósea se ha convertido en uno de los grandes desafíos de la medicina actual, siendo el autoinjerto de hueso esponjoso fresco el tratamiento modelo, debido principalmente a sus excelentes propiedades biológicas, que aseguran un aporte de células con potencial osteogénico, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular que fomentarían la neoformación ósea. Sin embargo las desventajas de este tipo de injertos han determinado que la búsqueda de un material sintético que aporte o complemente estas propiedades y que, por lo tanto, sustente la regeneración ósea, sea actualmente una importante línea de investigación en la medicina regenerativa. Dentro de estos materiales, destaca el cemento de hidroxiapatita debido a su excelente biocompatibilidad, dada por una composición física y química similar a la fase mineral del hueso, lo que determina que al ser utilizada como injerto óseo genere una vía biomimética de neoformación ósea. Teniendo en cuenta, que en la naturaleza, la formación de los primeros indicios de mineralización ósea son construidos sobre un nanoesqueleto de colágeno, es que hemos definido como objetivo de nuestro estudio demostrar la mayor capacidad osteoconductora resultante de la adición de colágeno a un cemento de hidroxiapatita en un modelo biológico, mediante la utilización de dos tipos distintos de soporte de hidroxiapatita, que fueron el cemento óseo de hidroxiapatita propiamente tal y las microesferas de hidroxiapatita. Para ello se intervinieron 30 conejos neozelandeses blancos adultos, a los cuales se les practicó un defecto de 5 mm a nivel lateral de ambos cóndilos femorales, los que fueron, los cuales fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos de acuerdo al tipo de relleno utilizado: cemento de hidroxiapatita, cemento de hidroxiapatita más colágeno, microesferas de hidroxiapatita, microesferas de hidroxiapatita más colágeno y por último se dejó un grupo control con el defecto vacío. La evolución de los implantes fue evaluada de manera clínica, radiográfica y mediante M.E.R., con un sistema semicuantitativo y por histomorfometría, en dos bloques de tiempo de 1 y 3 meses respectivamente. Paralelamente, se realizó una evaluación histológica con una evolución de 12 días de los grupos anteriormente definidos. Nuestros resultados demostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en la respuesta ósea entre la adición o no de colágeno al cemento de hidroxiapatita, sin embargo encontramos diferencias significativas con respecto a la presentación física de los materiales, obteniendo una mayor neoformación ósea en los grupos en que el cemento fue entregado en forma de microesferas con respecto al cemento entregado como masa.

Abstract

Bone regeneration derived from bone loss has become one of the greatest challenges of modern medicine. Fresh autogenous cancellous bone grafts is the standard treatment due to its excellent biological properties that ensure a supply of cells with osteogenic potential, growth factors and extracellular matrix components that promote bone neoformation. However, the disadvantages of these grafts have currently made the search for a synthetic material that provides or supplements these properties and, therefore, supports the bone regeneration an important branch of research in regenerative medicine. Hydroxyapatite cement as a bone graft substitute outshines all other materials. Its high biocompatibility given by its physical and chemical composition, which resembles the mineral phase of the bone, generates a biomimetic path of new bone formation. Given that in nature, the formation of the first signs of bone mineralization are built on a collagen nanoskeleton, the objective of this study was to demonstrate the greater osteoconductive capacity resulting from the addition of collagen to hydroxyapatite cement in a biological model. This was achieved by the use two different types of hydroxyapatite: hydroxyapatite compact paste and hydroxyapatite microspheres. On 30 adult white New Zealand rabbits a 5mm defect was made on the lateral aspect of both femoral condyles. These defects were randomly divided into five groups according to the type of bone substitute material used: hydroxyapatite cement, hydroxyapatite cement with collagen, hydroxyapatite microspheres, hydroxyapatite microspheres with collagen and lastly no substitute filling as a control group. The evolution of the implants was assessed through clinical evaluation, X-rays, as well as Backscattered Scanning Electron Microscopy (BS-SEM) with a semi-quantitative system and histomorphometry in two time blocks: one and three months after surgery. In parallel, a histological evaluation was carried out, in all the previously mentioned groups, on day 12 of the investigation. The results revealed that there were no statistically significant differences between the bone response when using hydroxyapatite cement/microspheres with or without the addition of collagen. However; significant differences appeared regarding the physical presentation of the material used. Greater bone formation was present in the groups where the hydroxyapatite was applied as microspheres than in those with the paste form. Despite the results obtained, we consider necessary more experimental studies *in vivo* in order to confirm or reject the achievement of potential osteoconduction enhancement with the use of collagen in bone cements.

