

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN

5.1. ANTECEDENTES

El hueso es el único tejido del organismo que al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original. De esta manera, cuando el hueso presenta soluciones de continuidad, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, en las pérdidas mayores de masa tisular se hace necesario recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación ⁶⁸.

El mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, ya sea proveniente del propio paciente, como en el caso del autoinjerto óseo, o bien obtenido de un donante, como cuando se emplea un aloinjerto óseo ^{2,37,74-76}.

La posibilidad de sustituir un tejido u órgano dañado o insuficiente siempre ha sido objeto de gran preocupación, de ahí que el primer caso de injerto conocido pertenece a la tradición cristiana. Esta atribuye a los Santos Cosme y Damián, el milagro de reemplazar la pierna tumoral de un sacristán por la de un moro fallecido, hecho que habría acontecido en el siglo III y que fue una fuente de inspiración para varios pintores del renacimiento.

Más cerca de nuestro tiempo, pero siempre en el plano de lo anecdótico, en el año 1668, Van Meekeren describe el relato de un misionero, del que podría ser el primer procedimiento de sustitución ósea. Este corresponde al implante de un xenoinjerto óseo obtenido de la calota de un perro para reparar el defecto traumático craneal de un soldado ruso ³⁹⁷.

Sin embargo, deben transcurrir muchos años antes que comiencen los verdaderos avances en el tratamiento de las soluciones de continuidad óseas.

En 1820, Von Walter emplea por primera vez en clínica un autoinjerto óseo, al reponer los fragmentos de hueso removidos en una trepanación quirúrgica craneana para resolver el defecto óseo creado, obteniendo su reparación ³⁹⁸.

En 1867, Ollier publica el “Tratado experimental y clínico de la regeneración del hueso” en que demuestra que los autoinjertos óseos son viables. El primer resultado parcialmente satisfactorio lo obtiene con un conejo de ocho meses en que trasplanta el radio derecho al lado izquierdo y viceversa, obteniendo la consolidación en el lado derecho y la infección y reabsorción del injerto en el lado izquierdo ³⁹⁹.

En 1878, McEwen utiliza el primer aloinjerto óseo en clínica implantando cuñas óseas de tibias procedentes de pacientes con raquitismo, para tratar un gran defecto diafisario humeral secundario a una resección ósea por infección en un niño. Debido a que los resultados que obtiene son satisfactorios, postula las siguientes conclusiones:

- Los injertos óseos entre humanos viven y crecen.
- Todos los elementos óseos deben ser incluidos en el injerto.
- La división del hueso en fragmentos pequeños mejora la incorporación del injerto.
- El injerto debe ser implantado en condiciones de asepsia.

Todas estas condiciones, con excepción de la primera, son coincidentes con el conocimiento actual relativo a la incorporación de los injertos óseos ⁴⁰⁰.

En 1893, Barth en Alemania y Curtis en USA, trabajando independientemente, publican sus trabajos sobre injertos óseos. Barth es el primero en observar el proceso de necrosis de los injertos óseos en sus estudios histológicos, determinando el concepto de “schleichenden ersatz”. Este corresponde a la necrosis del injerto, la reabsorción del hueso necrótico y la subsecuente neoformación ósea. De esta forma, considera que los injertos no tienen propiedades osteogénicas. Por su lado, Curtis presenta sus experiencias con injertos óseos en cuatro pacientes. En tres casos utiliza hueso descalcificado para tratar defectos cavitarios y en el cuarto caso resuelve una pseudoartrosis de tibia con autoinjerto de peroné. Postula que los injertos óseos proporcionan una estructura de soporte temporal que permite la neoformación ósea, definiendo, de esta manera, el concepto de osteoconducción ^{401,402}.

En 1907, Huntington publica un método que permite solucionar defectos segmentarios tibiales transfiriendo localmente un segmento de peroné con su vascularidad conservada, de esta manera soslaya las dificultades inherentes al empleo de los injertos óseos. Sin

embargo, esta opción sólo tiene utilidad para resolver lesiones específicas, y la posibilidad de ampliar sus indicaciones se presenta recién seis décadas después con el desarrollo de la microcirugía ⁴⁰³.

En 1908, Buchmann presenta las primeras autoartroplastías biológicas en dos casos de anquilosis de codo. Para ello reseca la articulación cúbito humeral y la reemplaza por la primera articulación metatarsofalángica logrando una recuperación parcial de la movilidad del codo comprometido ⁴⁰⁴.

En 1914, Phemister describe en un trabajo sobre injertos óseos realizados en perros, el proceso de “creeping substitution” del hueso necrótico, confirmando el fenómeno que antes Barth había denominado “schleichenden ersatz”, y que nosotros podríamos llamar “sustitución por arrastre”. Considera que una parte de las células del injerto óseo siguen vivas, lo que le otorga propiedades osteogénicas. Además, postula que la incorporación de los injertos es favorecida con la fragmentación de las piezas, pues así sobrevive un mayor número de células, dado que el aumento de superficie favorece su nutrición ⁴⁰⁵.

En 1915, Albee publica un libro sobre cirugía de los injertos óseos, recogiendo los conocimientos de la época y confirmando la utilidad de los autoinjertos. En 1925, Lexer presenta la primera serie clínica de aloinjertos con un seguimiento de 20 años, encontrando resultados satisfactorios en el 50.0 % de los 23 casos en que realiza un trasplante osteoarticular. Para ello utiliza como injerto hueso fresco procedente de pacientes amputados o de cadáveres ^{406,407}.

El 1942, Inclán reporta su experiencia con la implantación de huesos preservados, siendo reconocido como el fundador del primer banco de huesos. Presenta una serie de 52 casos, de los cuales en 43 pacientes utiliza autoinjertos conservados, en 8 casos aloinjertos y en 1 paciente emplea huesos de un feto de nueve meses, obteniendo resultados comparables con los del autoinjerto fresco. Para la conservación almacena el tejido óseo en bolsas estériles con sangre citratada o solución de Ringer a una temperatura de 2 a 5 °C, durante un periodo que oscila entre 1 y 63 días ⁴⁰⁸.

En 1946, Wilson funda el banco de huesos del Hospital for Special Surgery de Nueva York. Las piezas proceden de intervenciones quirúrgicas donde es necesario reseca hueso, las que son almacenadas a - 27 °C en bolsas estériles. Es el primero que plantea la necesidad

de organizar un banco de huesos con una metodología adecuada, selección rigurosa de los donantes y controles microbiológicos seriados ⁴⁰⁹.

En 1953, Sanchiz Olmos publica la experiencia del primer banco de huesos creado en España, el que había sido fundado dos años antes en el Hospital Provincial de Madrid. Paralelamente, ese mismo año, Narváez reporta los resultados preliminares del primer banco de huesos de Chile ^{410,411}.

En 1955, Bonfiglio define la inmunogenicidad de los aloinjertos realizando estudios en conejos, determinando que un segundo aloinjerto en el mismo animal genera una respuesta inflamatoria mayor ⁴¹².

En 1963, Burweil demuestra que el hueso almacenado durante una semana a - 20 °C tiene menor inmunogenicidad. De esta forma, la congelación se transforma en el método más utilizado para la conservación de los injertos óseos ⁴¹³.

En 1965 y 1970, Ottolenghi y Volkov publican, respectivamente, sus experiencias en el reemplazo óseo y articular con alotransplantes óseos masivos ^{414,415}.

Las conocidas limitaciones de los injertos como sustitutivos óseos, permiten que la microcirugía vascular y la osteogénesis por distracción puedan entregar otro interesante aporte para la solución de defectos óseos específicos.

En 1975, Taylor efectúa el primer injerto de peroné libre vascularizado con anastomosis microvascular, para reconstruir un defecto traumático tibial contralateral. En 1977, Serafín realiza la transferencia de una costilla vascularizada para la resolución de un defecto mandibular. El injerto óseo vascularizado permite la reparación de amplios defectos secundarios a lesiones tumorales o traumáticas, pero tiene como desventaja la necesidad de sacrificar un hueso sano del esqueleto ^{11,12}.

En 1989, Ilizarov publica su experiencia con el transporte óseo, técnica que venía desarrollando desde el año 1940 para resolver grandes defectos diafisarios por medio de la osteogénesis por distracción. Este procedimiento aprovecha la capacidad que tiene el hueso de generar nuevo tejido óseo al ser corticotomizado y sometido a distracción continua, lo que representa una ventaja respecto al autoinjerto óseo vascularizado ^{9,10}.

Pese a todos los avances descritos, la sustitución del hueso continúa siendo un problema pendiente hasta nuestros días. Por lo anterior, en la década de los setenta comienzan a desarrollarse en diferentes laboratorios de ingeniería de los materiales, numerosas líneas de investigación que ensayan la formulación y caracterización de variados biomateriales que pueden tener utilidad para promover la regeneración del tejido óseo.

Como hemos señalado, los biomateriales corresponden a todos aquellos materiales, elementos, sustancias o compuestos, elaborados con componentes naturales o artificiales, que pueden implantarse en un organismo vivo para reemplazar o reparar un tejido natural lesionado o irreversiblemente dañado, entre otros el tejido óseo.

Existe una gran diversidad de materiales en investigación o ensayados y disponibles a la fecha, sin embargo, los que han resultado más promisorios como potenciales sustitutivos óseos continúan siendo los biomateriales cerámicos.

El primer material cerámico que se emplea como sustitutivo óseo en clínica corresponde al sulfato de calcio hemihidratado, conocido comúnmente como yeso de París. En 1892, Dreesman de la Clínica Trendelenburg de Bonn usa este material mezclado con una solución de fenol al 5.0 % para rellenar cavidades de huesos largos en 8 pacientes. Seis defectos eran de origen tuberculoso, 1 secundario a una osteomielitis y 1 correspondiente a un encondroma. Las cavidades rellenaron con hueso neoformado en 5 de los casos ¹²⁰.

En 1920, Albee realiza la primera aplicación clínica satisfactoria de las cerámicas de fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en humanos, que fueron descritos como reactivos químicos de triple fosfato cálcico ¹⁵⁵.

En 1951, Ray y Ward publican, treinta años después que Albee, un informe preliminar del empleo clínico de cerámicas de fosfatos de calcio como sustitutivos óseos, trabajo que es seguido bastante más tarde por el reporte realizado en 1971, por Bhaskar y cols., de la aplicación de fosfato tricálcico como implante en clínica dental con resultado exitoso ^{156,157}.

En 1959, Peltier publica su experiencia con la utilización clínica del yeso de París en el tratamiento de diferentes defectos óseos. En 1980, Coetzee emplea este material cerámico como sustitutivo óseo en clínica para el tratamiento de defectos craneanos, reportando buenos resultados ^{121,122}.

En 1971, Hench y cols. descubren que ciertas composiciones de vidrios de base silicio tienen la capacidad de ligarse con el tejido óseo y promover la neoformación ósea. Denominan a estos materiales como vidrios bioactivos y desde esa fecha se han realizado numerosos estudios con vistas a su utilización clínica como sustitutivos óseos ¹¹¹.

En 1974, Roy y Linnehan describen la obtención de hidroxiapatita desde el esqueleto carbonatado de algunos géneros de coral por medio de un proceso de intercambio hidrotermal. Esto ha permitido el posterior uso clínico de este biomaterial cerámico, que cuenta con numerosas publicaciones de su empleo como sustitutivo óseo, tanto exclusivo o como aumentador de injertos óseos ¹⁰⁷.

En 1981, Burnie y Gilchrist presentan sus estudios relativos a una serie de vidrios con contenidos variables de pentóxido de fósforo (P_2O_5) y distintas proporciones de CaO y Na_2O . De esta manera, obtienen materiales con un amplio rango de propiedades bioactivas y diferentes velocidades de disolución, que abren la posibilidad de desarrollar vidrios basados en fosfatos de calcio para futuras aplicaciones biomédicas ^{112,351}.

En 1982, LeGeros postula el concepto de los cementos basados en fosfatos de calcio, el que fue concretado por Brown y Chow en 1983, al publicar el primer estudio sobre un cemento óseo que fragua a temperatura fisiológica, que luego patentaron en 1986 ²¹³⁻²¹⁵.

En 1993, Driessens y cols. del Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, desarrollan un nuevo cemento óseo apatítico basado en la hidrólisis del fosfato α tricálcico y postulan el concepto de osteotransducción que caracteriza a estos materiales. En 1994, Ginebra del mismo Departamento, continúa con el desarrollo y optimización del cemento de fosfato α tricálcico, denominado cemento H, proponiéndolo para su aplicación en cirugía ósea, ortopédica y dental y para mejorar la osteointegración de las endoprótesis articulares ^{196,201}.

En 1998, Clement y cols. elaboran y caracterizan un vidrio del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O en el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, estudiando su biocompatibilidad y velocidad de disolución. Posteriormente, Navarro y cols., del mismo Departamento, determinan *in vitro* las propiedades físico-químicas y biológicas de diferentes vidrios de base fosfato, dos de los cuales, corresponden a los vidrios G0 y G5 ^{19,354,379}.

5.2. BIOMATERIALES CERÁMICOS

Entre los numerosos biomateriales cerámicos que se encuentran en fase de investigación o disponibles para su empleo clínico preliminar, nos ha resultado de particular interés por sus potenciales aplicaciones en cirugía ortopédica y traumatología el estudio de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio^{214,351}.

Los cementos basados en fosfatos de calcio y los vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O han sido desarrollados, estudiados y evaluados experimentalmente por varios grupos de investigadores, entre los que destaca el grupo del Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica y el Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica de la Universitat Politècnica de Catalunya dirigido por los Profesores Josep Anton Planell Estany y María Pau Ginebra Molins^{18-24,196,354}.

En el Institut Clínic de l'Aparell Locomotor del Hospital Clínic de Barcelona y el Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques de la Universitat de Barcelona, se ha consolidado una línea de investigación en sustitutos óseos dirigida por el Profesor Santiago Suso Vergara, que ha posibilitado el estudio experimental *in vivo* de variados implantes que tienen proyecciones clínicas. Como continuadores de esta línea, hemos desarrollado este trabajo de tesis que nos ha permitido profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos²⁵⁻²⁸.

Un biomaterial óptimo para la sustitución ósea debería ser osteoconductor, osteoinductor, osteogénico, estructuralmente resistente y reabsorbible. Ninguno de los materiales disponibles actualmente para su empleo en la clínica humana reúne todas estas características. Para aproximarse a estos propósitos las líneas de investigación que se desarrollan en el presente están profundizando en el estudio de la combinación y asociación de distintos biomateriales, ya sea entre sí, con proteínas recombinantes osteoinductivas, o bien con elementos celulares osteoformadores, que lleven a la obtención de materiales compuestos capaces de desempeñarse como un hueso híbrido, es decir, como un sustitutivo óseo vivo¹³⁵⁻¹⁵⁴.

Los principales criterios de calidad que debe poseer un biomaterial para optar a la condición de sustitutivo óseo son una correcta biocompatibilidad con el tejido óseo receptor, una acción biológica promotora de una rápida neoformación ósea y propiedades biomecánicas

óptimas. La primera característica la detentan todos los biomateriales ensayados para la sustitución ósea, la segunda la poseen muchos y la tercera es la que representa mayores dificultades, especialmente cuando se requiere la implantación de los sustitutivos óseos en localizaciones sometidas a sollicitaciones mecánicas importantes ^{3,17,48,49,71,104,150,154,}

De esta manera, los defectos óseos mayores como los secundarios a traumatismos graves, resección de tumores o pérdida ósea asociada a endoprótesis, representan todavía un desafío pendiente para los campos de la investigación experimental y clínica, dado que por ahora el implante de bloques voluminosos de biomateriales tiene grandes dificultades para obtener la regeneración ósea y generalmente fracasa ⁶⁸.

El hecho que los sustitutivos óseos habituales en clínica humana, es decir, autoinjertos y aloinjertos, no siempre constituyen un tratamiento ideal, debido a sus reconocidas limitaciones, junto con la posibilidad de disponer de variados biomateriales que detentan positivas características biológicas y fisico-químicas, y promisorias perspectivas futuras en el ámbito de la cirugía del aparato locomotor, nos ha impulsado a realizar este estudio experimental, dado que no hemos encontrado en la literatura científica trabajos de investigación que comparen con el autoinjerto óseo esponjoso fresco, la aptitud de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos para resolver defectos cavitarios ^{6-8,79-82}.

En este trabajo de tesis nos planteamos como objetivo principal estudiar la regeneración del tejido óseo en defectos cavitarios experimentales con dos formulaciones de cementos óseos y dos de vidrios bioactivos basados en fosfatos de calcio, comparándolos con el autoinjerto óseo esponjoso fresco. Estos biomateriales tienen como principales ventajas teóricas la posesión de reconocidas propiedades osteoconductoras, comprobada biocompatibilidad, capacidad de biodegradación, disponibilidad cuantitativamente ilimitada, aptitud para la vehiculización de fármacos y condiciones apropiadas para ser empleados como moldes para la ingeniería de tejidos ^{15,17,42,111,112,193,214,351}.

Como una manera de ordenar nuestra discusión analizaremos sucesivamente, el modelo experimental, la metodología de trabajo, las características de los grupos de estudio, la información bibliográfica principal relativa a los cementos óseos y vidrios bioactivos basados en fosfatos de calcio y, por último, realizaremos un análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

5.3. MODELO EXPERIMENTAL

El empleo del conejo como animal de experimentación es ampliamente aceptado, debido a que involucra costes razonables, requiere una infraestructura que generalmente se encuentra disponible en los laboratorios de cirugía experimental y su intervención y manipulación resulta sencilla. Sin embargo, la utilización de este animal en estudios de regeneración ósea permanece controvertida debido a que ostenta una gran capacidad osteoformadora ^{49,69}.

En el presente estudio hemos utilizado 60 conejos machos adultos albinos de la raza Nueva Zelanda para conseguir que tuviesen sus cartílagos de crecimiento cerrados y evitar la participación de los tejidos aledaños en la neoformación ósea, obteniendo de esta manera resultados finales más fidedignos. Por otro lado, la intervención quirúrgica de animales maduros ha permitido practicar los defectos cavitarios femorales en huesos de mayor tamaño, disminuyendo los riesgos de complicaciones ^{25-28,69}.

El modelo experimental empleado en este trabajo de tesis corresponde a la prueba de esponjosa en conejos descrita por Katthagen el año 1986, que corrobora las observaciones previas de Nizard, demostrando que un defecto cavitario de 6 mm. de diámetro realizado en la metafisis femoral distal del animal de experimentación no se repara espontáneamente, por lo que la regeneración ósea que se puede observar debe ser necesariamente atribuida al sustitutivo óseo implantado ⁶⁹.

La creación del defecto cavitario metafisario distal modifica las condiciones biomecánicas del cóndilo femoral medial del conejo, pues destruye más del 50.0 % del tejido óseo de este segmento aumentando el riesgo de fractura. En su serie Katthagen describe esta complicación en el 1.2 % de los casos. En nuestro trabajo de tesis hemos tenido 1 fractura condílea lo que representa un 1.7 %. Para evitar esta complicación se debe efectuar un correcto centrado del orificio, lo que se puede facilitar marcando el sitio correspondiente con un punzón, luego de lo cual se realiza un orificio preliminar con una broca de 3 mm., para, seguidamente, practicar el defecto cavitario propiamente tal con la broca de 6 mm. ⁶⁹.

A diferencia de Katthagen, que en su estudio define como grupo control a la serie de animales de experimentación que no recibe ningún tipo de implante, nosotros hemos considerado en nuestro trabajo de tesis un grupo control positivo, correspondiente a la serie

de conejos que fueron implantados con autoinjerto óseo esponjoso fresco, pues la numerosa experiencia experimental y clínica acumulada confirma que este sustitutivo óseo es el que muestra la mayor capacidad de regeneración ósea. De esta manera, los biomateriales utilizados en este estudio serán mejores cuanto más se asemejen al comportamiento biológico del autoinjerto esponjoso ⁶⁹.

Como periodos de estabulación de los animales antes de la eutanasia hemos definido 4 y 12 semanas, teniendo presente los numerosos estudios que demuestran que durante las primeras 4 semanas se produce la neoformación ósea cuantitativamente más importante y que entre las 4 y las 8 semanas se desarrollan fundamentalmente fenómenos de remodelación ósea por lo que la cuantía global de formación ósea entre estos dos periodos no es significativamente distinta, hecho que hemos corroborado en nuestro estudio. Por otro lado, se ha establecido para el conejo albino de la raza Nueva Zelanda como animal de experimentación, que periodos menores de 4 semanas sólo permiten valorar la biocompatibilidad de los materiales y tiempos de estabulación mayores de 12 semanas no aportan información relevantemente distinta ^{27,69,134,135,192,290,291,295,300,305,312-314,318,319}.

Considerando lo expuesto, en este trabajo de tesis hemos optado por contar con cinco grupos de animales de experimentación constituidos por 12 conejos cada uno, los que a su vez se dividen en un subgrupo que permanece estabulado por 4 semanas y un subgrupo que se mantiene durante 12 semanas antes de la eutanasia. Lo anterior, permite valorar la evolución de los biomateriales en el tiempo y conseguir resultados más fidedignos y estadísticamente significativos ²⁵⁻²⁸.

La extrapolación de los resultados obtenidos en animales de experimentación a la especie humana siempre resulta discutible, especialmente cuando está comprobado que el proceso de regeneración ósea es más rápido en el conejo. Sin embargo, consideramos que los resultados logrados tienen validez y permiten conseguir conclusiones fiables por cuanto el modelo experimental empleado ha demostrado su utilidad en trabajos previos y porque los resultados relativos obtenidos con los cuatro implantes se correlacionan en similares condiciones, con el autoinjerto óseo esponjoso fresco, cuyo comportamiento biológico es ampliamente conocido. De esta forma, las diferencias determinadas entre los distintos grupos estarán relacionadas con las diferentes propiedades biológicas de los implantes utilizados en el estudio, ya que las demás variables del experimento son constantes y controladas para todos ^{25-28,69}.

5.4. METODOLOGÍA DE TRABAJO

Los animales empleados en este trabajo de tesis, fueron admitidos para cirugía experimental luego de comprobar que se encontraban en buenas condiciones generales. De esta manera, se realizaron dos intervenciones quirúrgicas diarias, de lunes a sábado, durante un periodo total de cinco semanas.

Para realizar la intervención quirúrgica los animales fueron anestesiados con una mezcla de Hidrocloruro de Ketamina (Ketostop ®) en dosis de 35 mg/kg, Clorhidrato de Xilazina al 2.0 % (Xilazina ®) en dosis de 18 mg/kg y Acepromazina Maleato al 1.0 % (Pacifor ®) en dosis de 1 mg/kg, siguiendo el esquema propuesto por Boden y cols. en 1995. Con estos tres fármacos se obtiene una excelente anestesia general y relajación del conejo, cuyo efecto tiene una duración que oscila entre 45 y 60 minutos, permitiendo efectuar la intervención femoral sin contratiempos ³⁹².

La primera semana se intervino al grupo control, la segunda al grupo implantado con cemento H, la tercera al grupo que recibió cemento R, la cuarta al grupo implantado con vidrio G0 y la última semana al grupo que recibió vidrio G5. Esto nos permitió contar con un cronograma organizado para los periodos de estabulación de los diferentes grupos.

La fecha de eutanasia quedó determinada al momento de la intervención quirúrgica, dependiendo del subgrupo al que fue aleatoriamente asignado el animal correspondiente. La eutanasia de los animales se realizó con una sobredosis de Tiopental Sódico al 2.0 % (Pentotal ®), con el ejemplar previamente sedado con Clorhidrato de Xilazina al 2.0 % (Xilazina ®), que provoca el *exitus* por un paro cardiorrespiratorio. Los primeros animales eutanasiados correspondieron a los ejemplares de los subgrupos estabulados durante 4 semanas y los últimos a los asignados a los subgrupos de 12 semanas.

Luego de la eutanasia se efectuó un abordaje longitudinal del muslo derecho del ejemplar, extrayendo completamente el fémur implantado por desarticulación a nivel de la cadera y la rodilla, para realizar inmediatamente el estudio radiológico frontal y lateral de las muestras óseas. Enseguida, el fémur fue cortado con sierra para obtener el segmento óseo portador del implante correspondiente. Posteriormente, las muestras fueron procesadas para su estudio con técnica para hueso no descalcificado por medio de los pasos sucesivos de fijación, deshidratación, deslipidación, infiltración, inclusión y tinción.

5.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Los 60 conejos seleccionados para este trabajo fueron divididos en 5 grupos de 12 individuos cada uno, de acuerdo con la siguiente distribución:

- Grupo CO: conformado por los animales implantados con autoinjerto esponjoso óseo fresco (control).
- Grupo CH: constituido por los conejos que recibieron como implante cemento H.
- Grupo CR: conformado por los animales implantados con cemento R.
- Grupo G0: constituido por los conejos que recibieron como implante vidrio G0.
- Grupo G5: conformado por los animales implantados con vidrio G5.

Los 5 grupos definidos de acuerdo con el implante utilizado como sustitutivo óseo, fueron divididos en 2 subgrupos de 6 animales, cada uno. De esta manera, el primer subgrupo permaneció en estabulación por 4 semanas y el segundo durante 12 semanas hasta la eutanasia.

Cada animal se mantuvo controlado en su correspondiente jaula individual, la que indicaba la denominación del ejemplar, el implante empleado, la fecha de la intervención y la fecha de la futura eutanasia. Lo anterior, fue de particular importancia debido a la imposibilidad de diferenciar un conejo de otro por la uniformidad de sus características fenotípicas.

A pesar de la aplicación de una metodología rigurosa fue necesario excluir del estudio tres animales (5.0 %), dado que presentaron las siguientes complicaciones:

- El individuo CH-04-06 falleció a los 7 días del postoperatorio por causas que no pudimos determinar en la autopsia. La herida operatoria se encontraba cicatrizada y al reseca el fémur encontramos un defecto cavitario correctamente situado con el implante *in situ*.
- El ejemplar CR-04-02 evolucionó con una artritis séptica de la rodilla derecha que se hizo evidente a los 18 días del posoperatorio. El cultivo fue positivo para un estafilococo dorado sensible a la cloxacilina.
- El individuo CO-04-05 presentó una fractura condílea que fue determinada al momento de la eutanasia con signos de consolidación avanzada.

5.6. CERÁMICAS DE FOSFATOS DE CALCIO

El empleo de biomateriales cerámicos como sustitutivos óseos en la cirugía del aparato locomotor ha tenido un importante progreso y desarrollo en las dos últimas décadas, dado que la versatilidad de estos materiales ha permitido modificar, variar y diversificar su composición química obteniendo propiedades biológicas cada vez mejores ^{15,17,158,182,183}.

Destaca particularmente la capacidad común de todos estos biomateriales para establecer enlaces directos con el hueso, otorgando un andamiaje seguro para la promoción de la neoformación ósea. Sin embargo, las propiedades mecánicas que detentan las cerámicas fosfo-cálcicas continúan siendo deficientes debido a su fragilidad intrínseca, hecho que constituye una limitante para la potencial ampliación y multiplicación de sus aplicaciones clínicas y terapéuticas ^{27,231,279,281,287,293,298,300,311,316}.

Las cerámicas de fosfatos cálcicos son materiales osteoconductores que poseen interesantes proyecciones como sustitutivos óseos, especialmente para la elaboración de materiales compuestos que actúen como sustratos portadores de factores bioquímicos con capacidad osteoinductiva y/o células osteoformadoras. Por ello numerosos grupos de investigadores profundizan permanentemente en el estudio de estos biomateriales, entre ellos el grupo del Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica y el Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica de la Universitat Politècnica de Catalunya ^{18,19}.

Estás últimas dos décadas la investigación se ha centrado en las cerámicas formuladas como cementos óseos debido a su biocompatibilidad, versatilidad y capacidad para cumplir con la función de sustitutivos óseos. Los cementos basados en fosfatos de calcio han mostrado buenos resultados experimentales, por lo que ya se han reportado positivas experiencias clínicas preliminares ^{15,193}.

Los vidrios de base silicio son antecesores de los cementos basados en fosfatos de calcio y cuentan con numerosa investigación experimental que confirma su bioactividad. En cambio, los vidrios de base fosfato, más cercanos a la fase mineral del hueso, han sido motivo de interés más recientemente, ya que su elevada solubilidad y dificultades de elaboración han sido una limitante para su desarrollo y potenciales aplicaciones biomédicas. En esto radica la importancia de este trabajo, debido a que hemos estudiado las propiedades biológicas de dos formulaciones de vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O ^{111,112,351}.

5.7. CEMENTOS ÓSEOS BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO

La formulación como cementos de las cerámicas de fosfatos de calcio ha permitido obtener biomateriales que conjugan las excelentes propiedades biológicas de las cerámicas, con condiciones biomecánicas más acordes con los requerimientos de soporte estructural de las soluciones de continuidad óseas que necesitan ser sustituidas^{20-23,196,201,214}.

Los cementos de fosfatos de calcio presentan como característica destacada su capacidad de reabsorción, que puede ser activa o pasiva, dependiendo de la participación o no de la actividad celular. La reabsorción activa de los biomateriales es mediada por la acción celular, como ocurre con los cementos que dan como producto final hidroxiapatita deficiente en calcio que es degradada por los osteoclastos. La reabsorción pasiva se produce cuando el material es inestable en los fluidos orgánicos, como ocurre con el sulfato de calcio, de hecho, los cementos que dan como producto final fosfato dicálcico dihidratado experimentan este tipo de reabsorción. Los cementos de hidroxiapatita precipitada son osteointegrados en el tejido óseo pero no son reabsorbidos, por lo que su comportamiento biológico es similar al de las cerámicas de hidroxiapatita formulada en gránulos^{160,172}.

El primer cemento basado en fosfatos de calcio fue desarrollado por Brown y Chow en 1983 y se encuentra constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico dihidratado o hidrógeno fosfato de calcio. Es el biomaterial perteneciente a este grupo que cuenta con mayor número de estudios experimentales relativos a su comportamiento biológico^{214,215}.

Los cementos de fosfatos de calcio presentan como ventajas respecto a los injertos óseos y otros biomateriales formulados para la sustitución ósea las siguientes características²⁰⁻²³:

- Disponibilidad ilimitada del biomaterial para sus aplicaciones biomédicas validadas.
- Condición de materiales biodegradables que evita los potenciales efectos adversos o de toxicidad en el largo plazo.
- Características de biomateriales sintéticos por lo que carecen del riesgo de transmisión de enfermedades al receptor y ausencia de morbilidad quirúrgica en su obtención.
- Propiedades positivas para constituir materiales compuestos con otros biomateriales no cerámicos, como los polímeros.
- Moldeabilidad intraoperatoria que permite proporcionar al biomaterial la forma adecuada para rellenar el defecto óseo a sustituir.

- Buena fijación y aposición al defecto óseo que evita los problemas de migración del material que se observa con las formulaciones como polvos, gránulos o bloques.
- Reacción exotérmica limitada durante el fraguado, con escaso aumento de temperatura, que evita la lesión del tejido receptor.
- Versatilidad de procesamiento del cemento que permite obtener materiales con una fluidez inicial variable que hace posible la inyección percutánea al interior de un foco de fractura o de una cavidad ósea.
- Aportación de estabilidad inicial al defecto óseo otorgada por unas propiedades mecánicas más cercanas a las del hueso, que los diferencian positivamente de los materiales de osteosíntesis o de los cementos acrílicos empleados para la fijación de prótesis.
- Capacidad para ser empleados como vehículos para la liberación de sustancias, tales como antibióticos, fármacos, factores de crecimiento óseo, etc.
- Factible utilidad para la cementación de endoprótesis de sustitución articular, facilitando los recambios ulteriores por su condición biodegradable.

Considerando lo anterior, podemos comentar que en los animales del grupo control fue necesario intervenir quirúrgicamente la extremidad contralateral para la obtención del autoinjerto óseo esponjoso fresco, con el riesgo de morbilidad añadida por el abordaje de ambas extremidades inferiores. De hecho, un animal de este grupo fue excluido por presentar una fractura en su fémur implantado que, aparte de ser causada por el incorrecto centrado del defecto cavitario experimental, también recibió la influencia directa de la carga en dos extremidades debilitadas por la intervención quirúrgica.

Los cementos basados en fosfatos de calcio son biomateriales cerámicos osteoconductivos, reabsorbibles, degradables, biocompatibles y osteointegrables, cuyas propiedades físico-químicas y biológicas han sido ampliamente estudiadas en numerosos ensayos experimentales y que han demostrado ser capaces de comportarse como sustitutivos óseos ventajosos. Lo anterior, ha permitido que desde 1996 se hayan empleado en clínica, aunque en forma limitada, especialmente para favorecer la consolidación de fracturas metafisarias de huesos largos, siempre asociados a las técnicas de osteosíntesis convencionales debido a sus deficientes propiedades mecánicas^{20-23,193,196,201,214}.

A las propiedades físico-químicas y biológicas de los cementos de fosfatos de calcio nos referiremos enseguida, destacando las referencias más importantes, resumiendo sus correspondientes aportes y señalando la experiencia recogida en este trabajo.

5.7.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El estado actual del conocimiento de las propiedades físico-químicas de los cementos basados en fosfatos de calcio, se debe al aporte de numerosos investigadores que han estudiado detalladamente las características de estos biomateriales cerámicos. La publicación por parte de Brown y Chow, en 1983, del trabajo en que dan a conocer la formulación del primer cemento de fosfato cálcico, corresponde al punto de partida de diversas líneas de investigación que han entregado valiosas aportaciones para el desarrollo de estos materiales ²¹⁴.

En 1989, Mirtchi y cols. estudian el efecto en la formulación de un cemento de fosfato β tricálcico y fosfato monocálcico monohidratado de tres aditivos, correspondientes a sulfato cálcico dihidratado, sulfato cálcico hemihidratado y pirofosfato de calcio. Describen que la incorporación de sulfato cálcico dihidratado y pirofosfato de calcio permite obtener las mejores propiedades mecánicas, sin embargo, la adición de estos compuestos prolonga excesivamente el tiempo de fraguado del cemento ²⁴³.

En 1990, Dandurand y cols. analizan la incorporación de un cemento apatítico de fosfato octocálcico a un cemento acrílico de hidroximetilmetacrilato, determinando que ambos componentes son capaces de unirse, por lo que proponen emplear este material compuesto para la cementación de las endoprótesis ²³⁰.

En 1991, Chow y cols. describen la formulación de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhídrido o bien fosfato dicálcico dihidratado, observando la transformación del material en hidroxiapatita. Destacan que debido a su porosidad el cemento de fosfato cálcico tiene propiedades mecánicas limitadas, pero valoran positivamente su condición biocompatible, reabsorbible, biodegradable, moldeable y osteoconductiva ²¹⁷.

En 1993, Bermúdez y cols. realizan un estudio comparativo del comportamiento mecánico de varias formulaciones de cementos de fosfatos de calcio, evaluando los cambios de resistencia de acuerdo con su composición, su relación líquido / polvo y la presencia o ausencia de aditivos en su fase sólida en polvo. De esta manera, determinan las combinaciones de reactivos que permiten preparar el cemento con agua y a temperatura ambiental, obteniendo valores de resistencia a la compresión de hasta 60 MPa y a la

tracción diametral de hasta 5 MPa. Consideran que estos valores resultan insuficientes para sus potenciales aplicaciones quirúrgicas en áreas óseas sometidas a sollicitaciones mecánicas importantes ²⁴⁴.

En 1993, Miyazaki y cols. describen el efecto sobre el tiempo de fraguado y resistencia mecánica en una formulación de cemento óseo de fosfato de calcio de aditivos como fosfato sódico, flúor, zirconio y ácido tartárico. También evalúan las propiedades químicas y mecánicas de este material con diferentes polímeros como polivinilo alcohol y ácido poliacrílico ^{225,226}.

En 1993, Driessens y cols. publican los resultados preliminares del desarrollo y caracterización de un nuevo cemento óseo apatítico de fosfato de calcio, en que el componente principal de la fase sólida en polvo corresponde a fosfato α tricálcico. Este cemento utiliza como fase líquida hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4) y en su optimización posterior se dará en denominar cemento H ¹⁹⁶.

En 1993, Otsuka y cols. estudian la influencia que ejerce el tamaño de las partículas de fosfato cálcico metaestable en un cemento basado en fosfato de calcio, valorando la tasa de transformación de éste biomaterial en hidroxiapatita y determinando su resistencia mecánica final ²⁴⁵.

En 1993, Driessens y cols. analizan 100 formulaciones posibles de cementos de ortofosfato de calcio, estudiando el efecto de diferentes aditivos que participan como aceleradores o retardantes de las reacciones de fraguado, valorando las que podrían ser adecuadas para su utilización en aplicaciones quirúrgicas ²⁰⁵.

En 1994, Bermúdez y cols. describen el proceso de elaboración de un cemento de ortofosfato cálcico a partir de fosfato α tricálcico, fosfato monocálcico monohidratado y óxido cálcico. Este estudio pretende optimizar las formulaciones químicas de los cementos de fosfatos de calcio ²⁰⁸.

En 1994, Ishikawa y cols. estudian el proceso de transformación de un cemento de fosfato de calcio en hidroxiapatita no estequiométrica en diferentes soluciones, encontrando que el tiempo de hidrólisis de los constituyentes del material y el tamaño de los cristales de apatita que se forman son dependientes del pH de la solución ²⁹⁷.

En 1994, Bermúdez y cols. describen el desarrollo de un cemento de fosfato α tricálcico y fosfato dicálcico en que utilizan una relación líquido / polvo de 0,30 ml/g., encontrando que la relación molar Ca/P óptima es de 1.36 ± 0.03 . Señalan que la adición de un 2.0 % de hidroxiapatita precipitada disminuye el tiempo de fraguado del cemento de 27.5 a 10 minutos, obteniendo una resistencia a la compresión de 30 ± 5 MPa ²¹⁰.

En 1994, Bermúdez y cols. analizan diferentes compuestos como el fosfato α tricálcico, el fosfato monocálcico monohidratado y el óxido cálcico, que permiten la formulación y elaboración de cementos de fosfatos de calcio. Analizan el tiempo de solidificación y la resistencia mecánica de diversos cementos, considerando que es necesario realizar estudios experimentales para evaluar las posibilidades mecánicas que pueden tener estos materiales en la fijación de endoprótesis ²¹².

En 1994, Dickens-Venz y cols. estudian las propiedades físico-químicas de la combinación de un cemento de fosfato cálcico con resinas carboxiladas polimerizables *in vitro*, valorando las reacciones de fraguado y la resistencia mecánica del biomaterial. Señalan que este material compuesto produce aproximadamente un 40.0 % de hidroxiapatita y tiene una resistencia mecánica de 14 a 15 MPa, por lo que podría ser utilizado en la sustitución de cavidades óseas ²⁵⁹.

En 1994, Bermúdez y cols. describen el desarrollo a nivel físico-químico de un cemento de fosfato octocálcico. Estudian las proporciones óptimas de los componentes, la relación líquido / polvo de la mezcla y los aditivos con el objetivo de conseguir un cemento con un tiempo de fraguado corto y una resistencia mecánica elevada. Con una relación Ca/P de 1.36, un 2.0 % de hidroxiapatita precipitada y una relación líquido / polvo de 0,30 ml/g., obtienen una resistencia a la compresión de 30 MPa y un tiempo de solidificación inicial y final de 10 y 40 minutos, respectivamente ²⁰⁶.

En 1994, Ginebra y cols. desarrollan un cemento apatítico de fosfato de calcio que contiene un nucleador en su fase en polvo y un acelerador en el líquido. Este biomaterial posee un tiempo inicial de fraguado de 7.5 minutos y un tiempo final de endurecimiento de 12.5 minutos. A la temperatura corporal el tiempo inicial de fraguado es de 6 minutos, después de lo cual podría cerrarse la herida operatoria al ser empleado como sustitutivo óseo. El producto de la mezcla del polvo y el líquido del cemento no se encoge ni se expande durante el fraguado, ni tampoco genera una reacción exotérmica durante su solidificación. El

tiempo de moldeado de la pasta del cemento de fosfato de calcio, en que ésta puede ser deformada sin dañar su microestructura, es de 4 minutos. Después del fraguado inicial el producto de la reacción no se desintegra en contacto con los fluidos acuosos y presenta una resistencia mecánica a la compresión de 40 MPa. Refieren que este cemento óseo fosfocálcico carece de efectos citotóxicos, señalando que está concebido para su aplicación en cirugía ósea, ortopédica y dental y para acelerar la osteointegración de endoprótesis metálicas²⁰¹.

En 1994, Driessens y cols. analizan 450 posibles combinaciones químicas para la formulación de cementos de fosfatos de calcio, encontrando que sólo 15 de éstas permiten obtener materiales con un tiempo final de fraguado menor a 60 minutos y una resistencia a la compresión superior a 2 MPa. De estos, sólo 6 mantienen un pH neutro durante la reacción de fraguado²⁰⁷.

En 1995, Fernández y cols. comparan las reacciones físico-químicas durante la solidificación de los cementos de fosfatos de calcio y el cemento de polimetilmetacrilato. Señalan que frente a la elevada alza térmica que produce la polimerización del cemento acrílico de polimetilmetacrilato, los cementos fosfocálcicos presentan como ventajas la generación de una reacción isotérmica o exotérmica mínima, el aporte de una mayor estabilidad dimensional durante el fraguado y la ausencia de formación de tejido fibroso en la unión del material con el tejido óseo en el largo plazo¹⁹⁷.

En 1995, Ishikawa y cols. estudian la resistencia mecánica y la porosidad crítica del cemento de fosfato de calcio. Debido a que estos parámetros tienen una relación inversa entre sí, concluyen que el valor óptimo de la porosidad es de un 63.0 % y el de la resistencia a la tensión es de 102 MPa. Refieren que para un material con porosidad cero, la resistencia a la tracción diametral es de 103 MPa, en cambio, el valor obtenido por el cemento poroso es de alrededor de 10 MPa. Sin embargo, se debe tener presente que la porosidad mayor favorece el comportamiento biológico de estos materiales²³².

En 1995, Ginebra y cols. analizan el efecto de diversos aditivos y la temperatura sobre las propiedades de un cemento de fosfato de calcio, cuya formulación incluye una fase en polvo constituida por un 83.0 % de fosfato α tricálcico, un 15.0 % de fosfato β tricálcico y un 2.0 % de hidroxiapatita precipitada y una fase líquida que corresponde a una solución de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4) al 2.0 %. Encuentran que la adición de carbonato,

pirofosfato o sales de magnesio retarda o incluso inhibe la reacción de fraguado del cemento fosfocálcico, en cambio, la adición de pirofosfato de calcio, fosfato de calcio β terciario o hidroxiapatita sinterizada en la fase en polvo no afecta sus propiedades. Además, señalan que el aumento desde la temperatura ambiente a la corporal reduce el tiempo de fraguado del cemento, la resistencia a la compresión es superior y la microestructura del material es más homogénea ²⁶³.

En 1995 Ishikawa y cols. preparan un cemento de fosfato cálcico de fraguado rápido, incorporando alginato de sodio en la fase líquida. Señalan que la utilización de este aditivo mejora las propiedades mecánicas de este material compuesto y aconsejan su uso en las aplicaciones quirúrgicas dentales y maxilofaciales en que el cemento está expuesto al contacto con la sangre ²⁷².

En 1996, Fernández y cols. analizan la reacción de fraguado de un cemento fosfocálcico constituido por fosfato de calcio α terciario, fosfato dicálcico e hidroxiapatita precipitada, como fase en polvo, y agua bidestilada, como fase líquida, señalando que el fosfato α tricálcico reacciona formando hidroxiapatita deficiente en calcio y que este proceso demora cerca de 32 horas durante las cuales se incrementa la resistencia a la compresión del biomaterial ²³⁷.

En 1996, Driessens y cols. preparan dos tipos de cementos de fosfatos de calcio que corresponden al cemento R constituido por fosfato monocálcico monohidratado y fosfato cálcico sódico potásico y el cemento S formado por fosfato monocálcico monohidratado y fosfato cálcico potásico. Ambos emplean agua destilada como fase líquida, resultando de mayor interés el cemento R que genera como producto final hidroxiapatita precipitada y muestra una gran solubilidad. La utilidad del cemento R como sustitutivo óseo es evaluada en este trabajo de tesis ²⁴⁸.

En 1997, Ginebra y cols. estudian la reacción de fraguado y solidificación de un cemento fosfocálcico que se encuentra constituido por un 81.0 % de fosfato α tricálcico, un 17.0 % de fosfato β tricálcico, un 2.0 % de hidroxiapatita precipitada y una fase líquida de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4) al 2.5 % (cemento H). Los resultados muestran que el fraguado del cemento es consecuencia de la hidrólisis del fosfato α tricálcico que da como producto hidroxiapatita deficiente en calcio, de tal manera que a las 24 horas la conversión es cercana al 80.0 %. Lo anterior, se acompaña de un incremento de la resistencia a la

compresión y la microestructura del cemento fraguado consiste en grupos de grandes placas con orientación radial o paralela en una matriz de pequeños cristales. La utilidad del cemento H como sustitutivo óseo es estudiada en este trabajo experimental ²²⁰.

En 1997, Khairoun y cols. analizan formulaciones derivadas del cemento de fosfato α tricálcico (cemento H) a los que adicionan carbonato cálcico (CaO_3) en su fase en polvo, valorando el tiempo inicial y final de fraguado, el tiempo de cohesión y la resistencia a la compresión. Consideran que la incorporación de carbonato de calcio permite utilizar estos cementos en situaciones clínicas en que es inevitable el contacto rápido del biomaterial con la sangre ²⁵¹.

En 1997, Ginebra y cols. estudian el efecto de dos tamaños diferentes de partículas de la fase en polvo del cemento de fosfato α tricálcico en los parámetros de fraguado y comportamiento mecánico, encontrando que con las más pequeñas se reduce el tiempo de fraguado desde 45 a 8 minutos. También decrecen paralelamente los tiempos de cohesión y endurecimiento, y los rangos de resistencia a la compresión se incrementan por un factor de cinco en las primeras 24 horas, aunque a las 360 horas las propiedades mecánicas de ambos cementos son similares ²⁶⁴.

En 1998, Fernández y cols. investigan, con un sistema de difracción de rayos X, la reacción de fraguado de los cementos de fosfato α tricálcico variando la proporción Ca/P. Determinan que después de 24 horas del fraguado no se detecta fosfato α tricálcico en ninguno de los ejemplos, señalando que este método de estudio también puede ser utilizado para valorar el comportamiento cinético de otros sistemas de cementos ²⁵².

En 1998, Khairoun y cols. estudian la inyectabilidad de cuatro cementos óseos constituidos por fosfato α tricálcico, fosfato dicálcico e hidroxiapatita precipitada y/o carbonato cálcico, denominados cementos H, F, B y D. Refieren que la inyectabilidad varía con la composición de la fase en polvo del cemento, la relación líquido / polvo, el tiempo transcurrido desde la mezcla de los componentes, la concentración del acelerador, es decir, del hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4) y la fecha de preparación del polvo. Señalan que el cemento D que se encuentra constituido por un 58.0 % de fosfato α tricálcico, un 2.5 % de fosfato dicálcico, un 8.5 % de hidroxiapatita precipitada y un 8.5 % de carbonato cálcico, es el más inyectable tanto para una relación líquido / polvo de 0.35 como para una de 0.40. El que se presenta como menos inyectable es el cemento H ²⁵⁶.

En 1998, Ginebra y cols. describen el efecto de la adición de una solución de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4) como fase líquida en la reacción de fraguado de un cemento de fosfato α tricálcico, comparándolo con el empleo de agua destilada. Para ello mezclan la fase en polvo con una solución al 2.5 % de Na_2HPO_4 , con una relación líquido / polvo de 0.32 ml/g., encontrando que esta fase líquida tiene un efecto acelerador del endurecimiento del cemento, permitiendo que su resistencia mecánica tome lugar desde que se realiza la combinación de los componentes. En cambio, al emplear agua destilada como fase líquida, aún luego de transcurridas 8 horas de realizada la mezcla, no es posible determinar el fraguado del cemento ²⁶⁵.

En 1998, Fernández y cols. describen las propiedades mecánicas y la microestructura del cemento de fosfato α tricálcico al que añaden carbonato cálcico como aditivo, obteniendo como producto de la reacción una estructura apatítica deficiente en calcio más parecida a las apatitas de la fracción mineral del hueso. De esta manera, la adición de un 10.0 % en peso de carbonato cálcico retarda el desarrollo de la resistencia a la compresión, pero ésta mejora hasta en un 40.0 % ²⁷⁹.

En 1998, Khairoun y cols. realizan un estudio comparativo de dos cementos fosfocálcicos correspondientes al cemento H que contiene un 98.0 % de fosfato α tricálcico y un 2.0 % de hidroxiapatita precipitada y el cemento F compuesto por un 64.0 % de fosfato α tricálcico, un 27.0 % de fosfato dicálcico y un 9.0 % de hidroxiapatita precipitada. Para ambos cementos varían la relación líquido / polvo entre 0.30 y 0.40 y la concentración del líquido acelerador (Na_2HPO_4) entre un 0 y un 4.0 %, determinando que no encuentran combinaciones del cemento H que satisfagan todos los requerimientos clínicos. En cambio, para el cemento F describen algunas combinaciones que permitirían su aplicación en cirugía ortopédica, reconstructiva y maxilofacial en que el contacto temprano con la sangre es inevitable ²⁸⁵.

En 1999, Fernández y cols. describen la producción y caracterización de nuevos cementos de fosfatos de calcio en el sistema $\text{CaHPO}_4 - \alpha - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, estudiando el pH, moldeabilidad, tiempo de cohesión y tiempo inicial y final de fraguado. Señalan que incrementando la relación líquido / polvo de 0.30 a 0.35 se obtienen más mezclas de cemento con una relación Ca/P mayor que pueden ser moldeables, además aumenta el periodo de tiempo de fraguado en que el material es manipulable. Al disminuir el tamaño de las partículas del polvo del cemento de fosfato de calcio se incrementa el tiempo de cohesión para la relación líquido / polvo de 0.30. Sin embargo, para la relación líquido / polvo de 0.35 la disminución

del particulado de la fase sólida mejora la moldeabilidad de la pasta del material a valores críticos. La adición de carbonato cálcico modifica la estructura del producto de la reacción del cemento, haciéndolo más parecido a la fase apatítica mineral del hueso, además reduce la viscosidad de la pasta por lo cual se incrementa el tiempo inicial y final del fraguado y mejora la inyectabilidad ²²¹.

En 1999, Ishikawa y cols. analizan nueve formulaciones de cementos de fosfatos de calcio empleando proporciones de fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhídrido, que oscilan entre 0.25 y 2.0. Comprueban que la mayor resistencia mecánica del cemento se obtiene al utilizar una proporción equimolar de los componentes de la mezcla y que las propiedades mecánicas decrecen cuando la relación entre el fosfato tetracálcico y el fosfato dicálcico anhídrido se desvía de 1.0 ²⁰².

En 1999, Dos Santos y cols. describen la influencia de los aditivos poliméricos sobre las propiedades mecánicas del cemento de fosfato α tricálcico, empleando alginato sódico, poliacrilato sódico y un hidrogel de poliacrilamida. Señalan que el alginato y el poliacrilato sódico tienen un efecto deletéreo para el tiempo de fraguado y la resistencia mecánica. En cambio, al añadir el hidrogel de poliacrilamida este polimeriza generándose una doble reacción de fraguado, con lo que se consigue una resistencia a la compresión mayor que la obtenida para el cemento no modificado ²³⁸.

En 1999, Khairoun y cols. analizan la incorporación de un vidrio de fosfato del sistema $61.5P_2O_5-30.8CaO-7.7Na_2O$ en un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato α tricálcico, fosfato dicálcico e hidroxiapatita precipitada, evaluando su efecto en el fraguado y las propiedades mecánicas del biomaterial. Refieren que la adición del vidrio de fosfato de liberación controlada retarda ligeramente el fraguado, forma cristales de brushita que no refuerzan el cemento y, por lo tanto, reduce considerablemente la resistencia a la compresión del material ²³⁹.

En 1999, Leroux y cols. describen el efecto de aditivos como ácido láctico, glicerol, chitosan y glicerofosfato sódico en la inyectabilidad de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato α tricálcico, fosfato tetracálcico y glicerofosfato de sodio. Concluyen que el cemento sin aditivos, con glicerol, ácido láctico o glicerofosfato sódico dan como producto final hidroxiapatita, en cambio el cemento con chitosan madura a fosfato octocálcico. Los tiempos de fraguado obtenidos con estos aditivos son compatibles con una intervención

quirúrgica. La inyectabilidad mejora con la adición de ácido láctico, glicerol y glicerofosfato de sodio. El chitosan mejora ligeramente la inyectabilidad y la resistencia del cemento ²⁶⁷.

En 1999, Khairoun y cols. estudian cuatro formulaciones de cementos basados en fosfato α tricálcico, dos de las cuales incorporan carbonato cálcico en su composición, a las que añaden en la fase líquida sustancias promotoras de la cohesión, tales como, hidroxietil almidón, sulfato dextran sodio, α ciclodextrina, β ciclodextrina, γ ciclodextrina, sal de sodio ácido algínico, almidón soluble de Zulkowski, polivinilpirrolidona, sal de potasio ácido hialurónico y sal de sodio condroitin sulfato. Demuestran que la mayoría de estos aditivos disueltos en el cemento líquido reducen el tiempo de cohesión, por lo que pueden ser útiles para evitar la disgregación de los materiales cuando entran en contacto con la sangre o con los ambientes fisiológicos ²⁷⁵.

En 2000, Dos Santos y cols. describen el refuerzo del cemento de fosfato α tricálcico con fibras de poliamida para mejorar sus propiedades mecánicas, encontrando que esta incorporación polimérica genera un escaso incremento de la resistencia a la compresión, hecho que puede estar relacionado con la distribución no homogénea de las fibras en la matriz del cemento ²⁴¹.

En 2000, Driessens y cols. analizan el efecto de la temperatura y la inmersión en el fraguado de tres cementos de fosfato α tricálcico, que corresponden a los cementos H, F y D que contienen un 98.0, 64.0 y 58.0 % de fosfato α tricálcico, respectivamente. Señalan que el aumento de la concentración del líquido acelerador (Na_2HPO_4), y de la temperatura, incrementan la velocidad de fraguado de los diferentes cementos, mientras que la inmersión retarda el fraguado ²⁷⁸.

En 2000, De Maeyer y cols. estudian *in vitro* la reacción de conversión de cementos de fosfatos de calcio que contienen fosfato octocálcico como uno de sus reactivos, luego de obtener este componente por dos métodos diferentes. El octofosfato cálcico puede ser preparado bajo condiciones homogéneas de precipitación por hidrólisis controlada del fosfato dicálcico dihidratado y por un segundo método de precipitación heterogénea en que una solución de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es lentamente añadida a otra de fosfato tamponado diluido. Refieren que la hidrólisis del fosfato octocálcico, en hidroxiapatita, es termodinámicamente favorable, por lo que el uso de estos cementos puede ser beneficioso para algunas aplicaciones biomédicas ²⁴⁰.

En 2001, Ginebra y cols. analizan el efecto como aditivo de un sistema acrílico polimérico derivado del ácido aminosalicílico sobre las propiedades mecánicas y reológicas del cemento de fosfato α tricálcico. Determinan que la incorporación del fármaco polimérico incrementa la inyectabilidad del cemento, de tal manera que la resistencia a la compresión mejora en un 25.0 % y que la resistencia a la flexión aumenta en un 70.0 % ²⁶⁸.

En 2001, Ratier y cols. estudian las características del fraguado y el comportamiento mecánico de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato tetracálcico, fosfato α tricálcico y glicerofosfato de sodio, el que comparan con dos formulaciones que pueden actuar como sistemas de liberación sostenida de fármacos y que contienen hidrocloreto de tetraciclina y tetraciclina trihidratada, respectivamente. Señalan que la cantidad de hidrocloreto de tetraciclina que es posible incorporar al cemento, sin afectar sus características, es de un 1.0 % y la de tetraciclina trihidratada puede llegar hasta un 7.0 %, permitiendo la formación de una hidroxiapatita con buenas propiedades mecánicas ²⁶⁹.

En 2001, Sarda y cols. describen las propiedades reológicas del cemento de fosfato α tricálcico durante el fraguado inicial, luego de estudiar la influencia de diversos factores en la inyectabilidad de este biomaterial. Refieren que el incremento de la relación líquido / polvo de 0.30 a 0.32 aumenta los tiempos inicial y final de fraguado, el estrés cizallante no modifica el fraguado del cemento, el aumento de la temperatura disminuye los tiempos de fraguado y la adición de ácido cítrico mejora la fluidez. Comentan la importancia que adquiere la inyectabilidad de los cementos de fosfatos de calcio para su aplicación por técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas ²⁷⁶.

En 2002, Del Real y cols. presentan un procedimiento para crear macroporos en un cemento de fosfato α tricálcico por medio de la adición de NaHCO_3 , que genera la formación de burbujas de CO_2 que son las responsables de incrementar la porosidad del material en más de un 50.0 %. Sin embargo, este proceso disminuye la resistencia a la compresión del biomaterial obtenido ²³³.

En 2002, Driessens y cols. preparan diferentes composiciones de cementos fosfocálcicos nanoapatíticos, con relaciones Ca/P que oscilan entre 0.8 y 1.5, los que son obtenidos combinando fosfato monocálcico monohidratado, fosfato α tricálcico, fosfato cálcico potásico, fosfato cálcico sódico potásico e hidroxiapatita precipitada. Señalan que para la obtención de nanoapatitas, es decir, cristales de apatita de tamaño nanométrico, se requiere

la incorporación de iones potasio y que bajo inmersión ellas se transforman en hidroxiapatita deficiente en calcio ²⁷⁰.

En 2002, Nilsson y cols. caracterizan un nuevo cemento óseo de fosfato-sulfato cálcico, cuya fase en polvo está constituida por fosfato α tricálcico y sulfato cálcico hemihidratado, y su fase líquida corresponde a hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4). Señalan que este material origina como producto de su reacción dos fases, una de tipo apatítico que corresponde a hidroxiapatita deficiente en calcio y otra reabsorbible conformada por sulfato cálcico dihidratado. Concluyen que la obtención de un cemento óseo bifásico como el descrito, que presenta una reabsorción lenta, lo transforman en un buen candidato para la liberación de fármacos como antibióticos, antioxidantes y analgésicos ²³⁵.

En 2002, Yang y cols. describen la influencia de la adición de semillas de apatita en la síntesis de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato monocálcico monohidratado e hidróxido de calcio. Refieren que cuando se incrementa la concentración de hidroxiapatita cristalina empleada como semilla, entre valores de 3.0 y 7.0 % en peso, se obtiene un tiempo de fraguado de 5 a 7 minutos y una resistencia a la compresión de 17 MPa. Al aumentar la adición de semilla de apatita hasta un 20.0 %, el tiempo de fraguado se prolonga hasta 30 minutos y la resistencia mecánica decrece a 12 MPa. Señalan que la incorporación de la semilla mejora la cristalinidad final de la fase apatítica ²⁴⁶.

En 2002, Sarda y cols. analizan el efecto del ácido cítrico en la inyectabilidad del cemento de fosfato α tricálcico, comparándolo con la formulación del biomaterial sin aditivos. Describen que el ácido cítrico se comporta como fluidificante durante las primeras etapas de la mezcla de los componentes del cemento, que las reacciones de disolución-precipitación del material se presentan retardadas y que la resistencia a la compresión se incrementa. Lo anterior, se traduce en una mejoría de la inyectabilidad y consiguiente moldeabilidad del material ²⁷¹.

En 2003, Nilsson y cols. estudian los factores que influyen en la resistencia compresiva de un cemento inyectable de hidroxiapatita - sulfato de calcio, evaluando la relación líquido / polvo, la morfología de las partículas de hidroxiapatita, el contenido de hidroxiapatita y la cantidad de sulfato de calcio dihidratado requerido como acelerador de la reacción de fraguado. Señalan que una baja relación líquido / polvo y la reducción de la cantidad de hidroxiapatita generan un cemento más resistente, que las formulaciones que contienen

hidroxiapatita sinterizada muestran mayor resistencia compresiva y que la cantidad del acelerador no tiene ninguna influencia ²⁵⁷.

En 2003, Sarda y cols. describen la obtención de macroporosidad en un cemento de fosfato α tricálcico, por medio de la incorporación de moléculas surfactantes aniónicas como el dodecil sulfato, que actúa como agente de entrada de aire. De esta manera, varían la relación líquido / polvo y la concentración de dodecil sulfato, para conseguir mejorar la reabsorbibilidad del cemento sin deteriorar de modo importante su resistencia mecánica. Señalan que con la adición de 17.3 mM de dodecil sulfato se obtiene una macroporosidad homogénea, que para una relación líquido / polvo de 0.32 ml/g., permite conseguir una resistencia a la compresión de 25 MPa ²³⁶.

En 2003, Gbureck y cols. estudian la formulación de un cemento de fosfato de calcio preparado a partir de fosfato dicálcico anhídrido y carbonato cálcico, logrando la síntesis de un fosfato tricálcico amorfo por medio del molido por alta energía de fosfato β tricálcico cristalino en etanol. Refieren que la solubilidad de estos materiales se incrementa con el tiempo de molienda por lo que se pueden emplear como cementos formadores de hidroxiapatita. Con este procedimiento de elaboración es posible obtener cementos de fosfato β tricálcico mecánicamente activados, que pueden presentar una resistencia compresiva y diametral tensil de hasta 50 y 7 MPa, respectivamente ²⁰³.

En 2004 Almirall y cols. describen un nuevo procedimiento para conseguir implantes macroporosos a bajas temperaturas a partir de cemento de fosfato α tricálcico, empleando una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como reactivo. De esta forma, obtienen como producto de la reacción de hidrólisis una hidroxiapatita deficiente en calcio que presenta una importante macroporosidad, interconectada con una alta microporosidad intrínseca. La fase apatítica lograda con este método es más parecida a la fracción mineral que la conseguida con la hidroxiapatita sinterizada, ostentando una porosidad de alrededor de un 66.0 % ²³⁴.

En 2004, Bohner presenta un nuevo cemento hidráulico constituido por fosfato α tricálcico y sulfato de calcio dihidratado como fase en polvo e hidrógeno fosfato disódico dihidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) como fase líquida, describiendo los cambios de sus propiedades físico-químicas en función de la cantidad de sulfato cálcico empleado, la concentración de fosfato en la solución de la mezcla y el volumen de ésta. Señala que al aumentar la concentración

de fosfato en la fase líquida y añadir pequeñas cantidades de polvo de sulfato de calcio dihidratado al fosfato α tricálcico, se reduce de manera importante el tiempo de fraguado del cemento, sin que se modifiquen sus propiedades mecánicas²⁰⁴.

En 2004, Bigi y cols. describen el efecto de la incorporación de gelatina en las propiedades del cemento de fosfato α tricálcico, preparando dos formulaciones diferentes que comparan con el cemento puro. Refieren que la adición de gelatina tipo A de piel de cerdo (Italgelatine S.p.A.) acelera la reacción de fraguado, incrementa la velocidad de conversión en hidroxapatita deficiente en calcio y mejora significativamente las propiedades mecánicas del cemento, hecho que se relaciona con la reducción de la porosidad total y la adquisición de una microestructura más compacta²⁴⁷.

En 2004, Takechi y cols. estudian el efecto del vapor, calor seco, óxido de etileno e irradiación gamma como métodos de esterilización, en el fraguado y las propiedades mecánicas de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhídrido. Describen que la esterilización del polvo del cemento con vapor se efectúa en autoclave a 120 °C por una hora y no es posible medir el tiempo de fraguado del material. La esterilización con calor seco se realiza a 200 °C durante 2 horas, la esterilización con gas de óxido de etileno se efectúa a 60 °C durante 3 horas y la esterilización con radiación gamma se realiza con ⁶⁰Co con dosis de 20 kGy. Estos tres métodos prolongan el tiempo de fraguado y disminuyen la resistencia mecánica, siendo menor el compromiso con la radiación gamma, por lo que proponen este sistema para esterilizar los cementos de fosfatos de calcio²⁵⁰.

En 2004, Ginebra y cols. investigan la posibilidad de controlar las características micro y nanoestructurales finales de un cemento de fosfato α tricálcico, modificando el tamaño de las partículas del polvo de partida. Para ello preparan un polvo fino y otro granular que al mezclarse con la fase líquida constituyen los cementos F y C, respectivamente. Señalan que con ambos cementos se obtiene una pasta homogénea, aunque más espesa para el polvo fino, que los tiempos de cohesión, inicial y final de fraguado son menores, la resistencia a la compresión ligeramente mayor y el tamaño de las partículas del producto de la reacción mucho más pequeñas para el cemento F. Concluyen que es posible desarrollar cementos que presentan una superficie específica mayor en los rangos nanométricos, lo que puede permitir la modulación de respuestas biológicas como la absorción de proteínas y la adhesión celular¹⁸.

De la literatura referenciada se desprende que los cementos óseos basados en fosfatos de calcio deben tener la capacidad de fraguar en contacto con los fluidos orgánicos sin experimentar fenómenos de descohesión, poseer tiempos de fraguado y endurecimiento razonables, carecer de manifestaciones de contracción de volumen, presentar una reacción isotérmica o exotérmica limitada, carecer de toxicidad local o general, detentar propiedades bioactivas y proporcionar una resistencia mecánica apropiada ^{18,22,42,196,213,222,223}.

Las propiedades mecánicas de los cementos de fosfatos de calcio, especialmente su resistencia a la compresión, dependen de la composición química de la fase en polvo y la fase líquida, del tamaño de las partículas de los componentes del polvo, de la cantidad y morfología del material agregado como semilla, de la relación líquido / polvo de la mezcla, de la porosidad final del cemento fraguado y de la estabilidad química del material durante su almacenamiento y esterilización ^{181,218,232,250,279}.

La principal desventaja de los cementos fosfocálcicos es su deficiente resistencia mecánica, que en el mejor de los casos es igual a la del hueso esponjoso o equivalente a un 20.0 % de la del hueso cortical. Por lo anterior, estos materiales no son aptos para su implantación en áreas óseas sometidas a sollicitaciones mecánicas importantes y sus indicaciones actuales se mantienen limitadas al relleno de defectos óseos cavitarios y como refuerzos de dispositivos de osteosíntesis ^{244,257,268,279}.

El cemento de fosfato α tricálcico (cemento H) que hemos empleado en este trabajo de tesis tiene unos valores de resistencia a la compresión de 20 MPa a las 8 horas de su implantación, 33 MPa a las 24 horas y 40 MPa a las 40 horas, que corresponde a su resistencia mecánica máxima. En cambio, el cemento de fosfato monocálcico (cemento R) presenta valores máximos de resistencia a la compresión que promedian los 12 MPa a las 64 horas, bastante más bajos que los exhibidos por la mayoría de los cementos óseos basados en fosfatos de calcio ^{201,248,249}.

La porosidad de los biomateriales cerámicos es un factor de gran importancia en su comportamiento como andamios osteoconductivos, debido a que existe una relación exponencial entre la resistencia mecánica y el volumen de los poros. Sin embargo, se debe considerar que la fijación biológica entre los cementos de fosfatos de calcio y el tejido óseo requiere disponer de poros con un diámetro mínimo de 100 a 150 μm . para asegurar una correcta invasión ósea neoformada. Por lo anterior, ha sido necesario el desarrollo de

numerosos procedimientos para la obtención de una macroporosidad compatible con una rápida sustitución ósea de estos materiales ^{181,218,232-234,236,279}.

Los tiempos de fraguado y solidificación de los cementos de fosfatos de calcio dependen de la composición química del polvo y el líquido, la proporción entre la fase sólida y la fase líquida de los componentes iniciales, la granulometría de la fase sólida en polvo, el pH del medio receptor, la temperatura del ambiente y la incorporación de aditivos. El tiempo de fraguado disminuye al añadir al polvo inicial una proporción de hidroxiapatita precipitada como semilla y al emplear una solución acuosa de hidrógeno fosfato disódico como fase líquida. El fraguado de los cementos fosfocálcicos suele generar una reacción isotérmica, sin embargo, algunas formulaciones pueden producir efectos exotérmicos restringidos, con alzas de temperatura de alrededor de unos 10 °C, hecho que previene la lesión potencial de los tejidos vecinos ^{220,221,223,252,262}.

La caracterización física del cemento de fosfato α tricálcico (cemento H) muestra que posee un tiempo de cohesión menor de 5 minutos, un tiempo inicial de fraguado que varía entre 7 y 9 minutos y un tiempo final de fraguado que oscila entre 15 y 22 minutos. El cemento de fosfato monocálcico (cemento R) detenta un tiempo de cohesión de 2 minutos, un tiempo inicial de fraguado que varía entre 8 y 14 minutos y un tiempo final de fraguado que oscila entre 18 y 26 minutos ^{201,249}.

La mayor ventaja que exhiben los cementos de fosfatos de calcio es la posibilidad de moldearlos intraoperatoriamente, ya que después de realizar la mezcla de los componentes se obtiene una pasta homogénea en forma precoz. Esto permite implantar la cantidad requerida del material en el lugar a tratar dándole la forma adecuada sin alterar su microestructura. Para los cementos inyectables es conveniente que la pasta sea más fluida y que el tiempo de fraguado sea más prolongado. Luego de la implantación del cemento es ideal que fragüe rápidamente para proceder al cierre de la herida operatoria ²⁶⁴.

Respecto a la fluidez presentada por los cementos luego de la mezcla de sus componentes sólido y líquido, en nuestro trabajo encontramos que el cemento H permite su aplicación inyectable para el relleno de los defectos óseos. En cambio, los constituyentes del cemento R generan una pasta más espesa que requiere ser implantada con espátula. Por lo demás, ambos cementos proporcionan una buena fijación y aposición al defecto óseo que se confirma por la ausencia de migración periférica en los dos periodos de estudio.

5.7.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

El conocimiento presente de las propiedades biológicas de los cementos basados en fosfatos de calcio, ha sido posible gracias a los estudios de varios grupos de investigadores. En 1984, Gruninger y cols. realizan los primeros ensayos *in vitro* e *in vivo* del cemento de fosfato de calcio desarrollado por Brown y Chow. Los estudios *in vitro* consideran la evaluación de la hemólisis de glóbulos rojos humanos, el análisis de la toxicidad oral en ratas, la eficiencia de la proliferación de fibroblastos de ratas y pruebas de mutagenicidad, determinando la ausencia de efectos tóxicos o mutagénicos atribuibles al biomaterial. Los ensayos *in vivo* analizan la implantación subcutánea en cerdos de Guinea y la ósea tibial en ratas, del cemento de fosfato de calcio comprimido y preformado. A nivel óseo el cemento permanece en el sitio de implantación y no se observa reabsorción después de 7 semanas. Los implantes son bien tolerados por los animales y no se verifican reacciones de toxicidad o mutagenicidad ²²⁷.

En 1987, Chohayeb y cols. emplean un cemento de fosfato de calcio mezclado con glicerina y ácido fosfórico para aplicaciones dentales en perros, observando la capacidad del biomaterial de adaptarse homogéneamente a la superficie de la dentina y la aparición de una leve reacción inflamatoria ²²⁸.

En 1990, Sugawara y cols. investigan la biocompatibilidad de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico dihidratado mediante la implantación subcutánea en ratas. Describen una buena biocompatibilidad del material, pues sólo aparece una mínima reacción inflamatoria alrededor del biomaterial similar a la producida por el implante de hidroxiapatita que sirve como control ²²⁹.

En 1990, Otsuka y cols. proponen la incorporación de drogas en los microporosidad cristalina de los cementos de fosfatos de calcio, para obtener su liberación local lenta desde el área de implantación. Estudian como fármacos modelos los antibióticos cefalexina y norfloxacin, que se liberan *in vitro* desde un cemento de hidroxiapatita basado en fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico dihidratado ³²¹.

En 1991, Hong y cols. analizan en primates la reacción que experimenta el tejido dentario periapical frente a la implantación de un cemento de fosfato de calcio, observando la neoformación de tejido óseo alrededor de este biomaterial ³⁰⁸.

En 1991, Costantino y cols. describen las propiedades químicas de un cemento de fosfato de calcio y la respuesta histológica frente a la implantación subcutánea, intramuscular y ósea en gatos, observando que no se produce ningún efecto tóxico, aunque en los tejidos blandos se determina la presencia de una leve reacción a cuerpo extraño. Al implantar el biomaterial a nivel óseo determinan su sustitución por hueso neoformado en proporción a su macroporosidad, es decir, la combinación de los procesos de osteoconducción y biodegradación ²⁸⁰.

En 1992, Driessens y cols. estudian las reacciones químicas que generan las cerámicas de fosfatos de calcio implantadas *in vivo* en cerdos, encontrando que se produce la reabsorción parcial de los implantes y el recubrimiento por hueso neoformado. El análisis de la unión entre el hueso y el implante demuestra que se forma tejido óseo directamente en la superficie de los materiales implantados, concluyendo que estos se comportan como osteoconductores ¹⁸⁷.

En 1993, Yoshimine y cols. evalúan con microscopía óptica y electrónica los efectos de la implantación de un cemento de fosfato tetracálcico a los 3, 10 y 30 días, observando la aparición de una leve reacción inflamatoria a los 30 días y la presencia de hueso neoformado alrededor del material. El estudio ultraestructural muestra que la neoformación ósea se produce directamente sin interfaz entre el implante y el hueso, concluyendo que se trata de un material osteoconductor y biocompatible ²³¹.

En 1993, Shindo y cols. utilizan un cemento de hidroxiapatita para reconstrucciones faciales en seis perros, realizando implantes en la región supraorbitaria, en un lado directamente y en el otro con una membrana colágena interpuesta. En el lado del implante libre observan la osteointegración del cemento y la progresiva sustitución por hueso neoformado, en cambio, en los implantes recubiertos por colágeno encuentran la aparición de una interfaz fibrosa ²⁸¹.

En 1993, Munting y cols. implantan un cemento basado en fosfato β tricálcico y fosfato monocálcico monohidratado en defectos cavitarios metafisarios de huesos largos en perros, encontrando que el biomaterial se adapta correctamente a la geometría de las cavidades luego de su fraguado, dando como productos finales fosfato dicálcico dihidratado y fosfato β tricálcico. Después de 7 meses de evolución el fosfato dicálcico dihidratado se ha reabsorbido completamente y sólo es posible encontrar partículas mayores de fosfato β tricálcico rodeadas por hueso neoformado ²⁸².

En 1994, Ishikawa y cols. estudian *in vitro* el comportamiento de un cemento de fosfato de calcio en una solución acuosa semejante al plasma sanguíneo, observando la formación de cristales de hidroxiapatita sin que el biomaterial experimente fenómenos de disolución. Señalan que estos materiales fraguados implantados *in vivo* serían estables en los fluidos biológicos²⁹⁷.

En 1995, Constantz y cols. describen la reparación de una lesión esquelética con un cemento de fosfato de calcio que contiene fosfato monocálcico monohidratado, fosfato α tricálcico y carbonato cálcico, el que bajo condiciones fisiológicas endurece en minutos dando como producto de su reacción dahlita. Señalan que en los estudios *in vivo* en animales este material alcanza una estructura similar a la fracción mineral del hueso y proponen su implantación inyectable percutánea en humanos para mejorar el resultado de las osteosíntesis de las fracturas²⁸³.

En 1995, Driessens y cols. estudian *in vivo* en ratas la implantación subcutánea de cilindros preformados de tres tipos de cementos de fosfatos de calcio y uno de fosfato de magnesio. Señalan que la resistencia a la compresión de los tres cementos fosfocálcicos permanece invariable luego de transcurridas 8 semanas desde el implante, en cambio, las propiedades mecánicas del cemento de fosfato de magnesio decrecen durante el periodo del estudio. Describen los cambios químicos que se producen después de la implantación de los cementos de fosfatos de calcio y de fosfato de magnesio y sus propiedades de osteotransducción²⁸⁴.

En 1995, Fujikawa y cols. analizan las reacciones histopatológicas que se generan frente a la implantación de un cemento de fosfato de calcio en defectos periodontales en perros, comparando la capacidad de osteoconducción de éste material con la de una cerámica de hidroxiapatita. Señalan que tres meses después de la implantación el cemento es parcialmente sustituido por hueso neoformado, en cambio la hidroxiapatita presenta resultados inferiores³¹⁰.

En 1995, Jansen y cols. realizan la implantación de un cemento de fosfato de calcio (cemento H) constituido por un 85.0 % de fosfato α tricálcico y un 15.0 % de β tricálcico en cuatro cabras adultas, a cada una de las cuales practican 5 defectos cavitarios en la tibia derecha y 4 en la izquierda, con un total de 36. En cada animal rellenan 8 defectos con cemento y dejan uno sin implantar como grupo control. En la evaluación realizada a los 3

meses describen la presencia de abundante osteoide y la reabsorción parcial del cemento. A los 6 meses encuentran que se ha producido una remodelación haversiana del hueso neoformado, con la presencia de osteonas maduras, aunque persisten restos del implante. Destacan el hecho que el cemento no genera reacción inflamatoria ²⁸⁷.

En 1995, Miyamoto y cols. efectúan un estudio comparativo *in vivo* de un cemento de fosfato de calcio convencional y uno de fraguado rápido, implantándolos entre los músculos femorales de ratas. Señalan que la nueva formulación de cemento de fosfato de calcio presenta tiempos de fraguado entre 5 y 7 minutos, observando que mejora la resistencia mecánica en las primeras fases después de la implantación ²⁷³.

En 1996, Yoshimine y cols. analizan la interacción *in vitro* entre un cemento basado en fosfato tetracálcico y células osteogénicas provenientes de ratas neonatas, observando la formación en la periferia del material de estructuras nodulares tridimensionales que contienen tejido mineralizado semejante al hueso formado *in vivo* y que se encuentran cubiertas por células osteoblásticas activas. La microscopía electrónica muestra el material inmediatamente adyacente a los procesos citoplasmáticos de las células y la mineralización de la matriz colágena extracelular tiene lugar directamente en la superficie del biomaterial. Estos resultados *in vitro* sugieren que el cemento de fosfato de calcio participa directamente en el proceso de neoformación ósea ²⁹⁸.

En 1996, Mermelstein y cols. estudian el recubrimiento de tornillos de esponjosa con un cemento de fosfato de calcio con el objetivo de mejorar su fijación, implantándolos en fragmentos de fémur distal de perros y determinando la fuerza necesaria para arrancarlos. Observan que los dispositivos revestidos con el biomaterial requieren de un esfuerzo significativamente mayor para su extracción, por lo que concluyen que el cemento de fosfato de calcio puede estar indicado para mejorar la fijación de tornillos de esponjosa en regiones con deficiente calidad ósea ³²⁶.

En 1996, Hamanishi y cols. describen la implantación de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico dihidratado en tibias de conejos, señalando que este biomaterial es degradado, reabsorbido y reemplazado por hueso trabecular rápidamente. Refieren que el carácter bioactivo y biodegradable de este cemento se debe a su similitud de grado de cristalinidad respecto al hueso receptor, por lo que es esperable que se amplíen sus aplicaciones clínicas ²⁹⁰.

En 1996, Ohura y cols. estudian la implantación de 2 formulaciones de cementos de fosfatos de calcio constituidos por fosfato β tricálcico, fosfato monocálcico monohidratado y sulfato cálcico hemihidratado en defectos cavitarios femorales distales de conejos, utilizando cavidades óseas no implantadas como controles. Describen que a las 4 semanas los implantes se encuentran rodeados por hueso neoformado, a las 8 semanas los cementos, con excepción de los gránulos de fosfato β tricálcico, se han reabsorbido casi completamente y han sido sustituido por tejido óseo y a las 16 semanas las cavidades implantadas con ambos cementos han sido sustituidas por un patrón óseo trabecular. Las cavidades no implantadas que actúan como control carecen de regeneración ósea ²⁹¹.

En 1996, Hamanishi y cols. describen el empleo del cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico dihidratado, como vehículo para la vancomicina que es un antibiótico específico contra el estafilococo dorado meticilino resistente. Señalan que este biomaterial contacta directamente con el hueso del huésped y que se produce una liberación lenta y sostenida del antibiótico, por lo que lo proponen como tratamiento para las osteomielitis generadas por el mencionado germen ³²².

En 1996, Stankewich y cols. estudian en un modelo de fractura del cuello femoral practicado en huesos de cadáver, la inyección de un cemento de fosfato de calcio para favorecer la fijación convencional con tornillos canulados de 7 mm. Determinan que la aumentación con cemento de fosfato de calcio incrementa la resistencia de la fijación de estas fracturas, por lo que la proponen como beneficiosa para mejorar la estabilidad de la osteosíntesis ³²⁵.

En 1996, Kopylov y cols. publican los primeros resultados clínicos obtenidos con un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato monocálcico monohidratado, fosfato α tricálcico y carbonato cálcico, al emplear este material en el tratamiento de fracturas inestables de la epífisis distal del radio de 6 pacientes, a los cuales aplican como única inmovilización una férula dorsal durante dos semanas. Reportan buenos resultados en 5 casos con un seguimiento de un año ³³⁰.

En 1997, Miyamoto y cols. efectúan la implantación en tibias de ratas de un cemento de fosfato de calcio de fraguado rápido constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhídrido, comparándolo con un cemento de fosfato de calcio convencional. Señalan que ambos biomateriales presentan una excelente osteoconductividad y biocompatibilidad, aunque detectan una leve reacción inflamatoria inicial en los tejidos blandos aledaños. A las

2 semanas verifican neoformación ósea en la superficie de ambos cementos y a las 8 semanas los implantes se encuentran casi completamente rodeados por hueso maduro. Concluyen que el cemento de fraguado rápido es superior, debido a esta característica, pues aporta una resistencia mecánica más alta en etapas tempranas de la implantación ²⁹⁹.

En 1997, Kurashina y cols. describen la implantación de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato α tricálcico, fosfato dicálcico dibásico y fosfato tetracálcico monóxido en los tejidos subcutáneo y óseo mandibular de conejos, evaluando el comportamiento del fraguado y la respuesta tisular. El estudio histológico de los tejidos blandos revela la formación de una cápsula fibrosa alrededor del cemento implantado, el que no muestra signos de degradación, y a nivel óseo determinan la presencia de una unión directa entre el implante y el hueso y una neoformación ósea activa. Describen la pérdida del cemento desde la implantación mandibular en un 25.0 % de los especímenes por el sangramiento profuso originado por la lesión de las arterias alveolares ³⁰⁰.

En 1998, Constantz y cols. realizan la implantación de cuatro formulaciones de cementos de fosfatos de calcio constituidos por la combinación de fosfato monocálcico monohidratado, fosfato tricálcico y óxido de calcio en la metáfisis distal y diáfisis femoral de conejos, efectuando un análisis histológico, químico y cristalográfico a las 2, 4 y 8 semanas. Describen que en la implantación metafisaria, a las 2 semanas, el cemento de brushita resultante de la reacción se transforma parcialmente en apatita carbonatada y que el implante es rodeado por hueso laminar y tejido fibrovascular. A las 8 semanas se determina predominantemente fenómenos de remodelación del hueso neoformado mediados por los osteoclastos. Destacan que el ritmo de remodelación ósea depende de la composición del cemento y del lugar de implantación ²⁹².

En 1998, Driessens y cols. reiteran el concepto de osteotransducción que fue introducido en 1993 para describir el comportamiento *in vivo* de los cementos de fosfatos de calcio. Al ser implantados en el hueso estos materiales muestran una rápida osteointegración, debido a que son lentamente reabsorbidos y, simultánea y gradualmente, reemplazados por hueso neoformado. Destacan la ausencia de brecha en la unión entre el cemento y el hueso y señalan que probablemente el material no pierde su estabilidad mecánica durante la transformación ⁴².

En 1998, Frankenburg y cols. realizan la implantación en las metáfisis femoral distal y tibial

proximal de perros, de un cemento de fosfato de calcio que genera dahlita como producto de su reacción, comparándolo con el autoinjerto óseo desde las 24 horas hasta las 78 semanas de evolución. El estudio histológico muestra que el material es osteoconductor y que a las 2 semanas se encuentra cubierto por tejido óseo, luego de lo cual es penetrado por pequeños vasos que son rodeados por láminas circunferenciales de hueso que evolucionan a sistemas haversianos, siendo progresivamente sustituido por hueso neoformado que se remodela completamente. El estudio biomecánico revela que a las 8 semanas las tibias implantadas con cemento han restablecido cerca del 100 % de su resistencia torsional respecto del hueso control contralateral ²⁹³.

En 1998, Oreffo y cols. estudian *in vitro* la diferenciación y crecimiento de células medulares de hueso humano frente a 4 composiciones de cementos de fosfatos de calcio, 3 de los cuales están basados en fosfato α tricálcico y 1 en fosfato monocálcico monohidratado y que se denominan cemento D, cemento F, cemento H y cemento R. Los dos últimos se estudian *in vivo* en este trabajo de tesis. Los resultados de este ensayo revelan que en presencia de estos cementos la proliferación celular se reduce, pero la diferenciación de las células osteoprogenitoras presenta un importante incremento. Señalan que este sistema de cultivos *in vitro* puede ser propuesto para la evaluación y desarrollo de nuevos biomateriales que pueden tener utilidad como implantes ortopédicos ²⁹⁴.

En 1998, Frayssinet y cols. analizan los efectos de la implantación de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato β tricálcico y pirofosfato sódico, inyectado con jeringa en defectos óseos del cóndilo femoral lateral de conejos, comparándolo con cavidades control sin implantar. Realizan un análisis histológico a las 2, 6 y 18 semanas, encontrando que el material es degradado en forma progresiva y sustituido por hueso neoformado que presenta una tasa superior a la observada en el grupo control ²⁹⁵.

En 1998, Ikenaga y cols. estudian las características biomecánicas de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato β tricálcico, fosfato monocálcico monohidratado y sulfato cálcico hemihidratado que implantan en la epífisis lateral del fémur distal de conejos. El cemento se implanta en cilindros de 4,7 mm. de diámetro y 10 mm. de largo que son colocados en los defectos femorales y lo comparan con implantes similares de una cerámica bifásica de fosfato de calcio como control. La eutanasia de los animales se efectúa a las 2, 4, 12 y 16 semanas y se realiza un estudio histomorfométrico y biomecánico. Describen que a las 2 semanas el cemento ha sido reemplazado por hueso en la periferia y que a las 12

semanas el material ha sido casi completamente reabsorbido y sustituido por hueso trabecular. La cerámica bifásica presenta a las 2 semanas neoformación ósea en los poros del material y a las 12 semanas existe hueso maduro en contacto con las diferentes superficies del implante. El estudio biomecánico revela que a las 12 semanas la resistencia a la compresión del cemento es superior a la de la cerámica y el hueso normal y que a las 16 semanas los valores no muestran diferencias significativas. El módulo elástico de la cerámica es superior al del cemento y el hueso sano en todos los períodos estudiados. Los valores comparativos entre el cemento y el hueso normal no presentan diferencias. La resistencia a la fractura del cemento es más alta que la de la cerámica a las 12 y 16 semanas y aunque el valor para el cemento es mayor que el del hueso normal a las 12 semanas, a las 16 semanas este parámetro se equipara. Los autores postulan que el cemento de fosfato de calcio puede mejorar la fijación inicial de las fracturas ³¹⁴.

En 1998, Yamamoto y cols. valoran la resistencia mecánica *in vitro* e *in vivo* de dos formulaciones de cementos de fosfatos de calcio constituidos por fosfato α tricálcico y fosfato dicálcico dihidratado. El cemento A contiene un 95.0 % de fosfato α tricálcico y el cemento B un 90.0 %. Para estudiar la resistencia a la compresión *in vitro* inyectan los cementos en estado pastoso en un molde tubular de 7 mm. de diámetro y 14 mm. de longitud y luego los sumergen en fluido pseudoextracelular entre 3 y 28 días. Para el ensayo *in vivo* implantan los cilindros en los tejidos blandos dorsales de conejos y los evalúan en idénticos periodos. La resistencia a la compresión *in vitro* es similar para ambos cementos en los distintos periodos y en el estudio *in vivo* el cemento A presenta un valor mayor a las 2 semanas. Para valorar la resistencia al arrancamiento *in vitro* insertan tornillos esponjosos en los moldes con los cementos y para la evaluación *in vivo* realizan defectos cavitarios en el cóndilo femoral lateral de conejos que implantan con los cementos y luego insertan los tornillos. *In vitro*, el cemento A es ligeramente más resistente a las 2 semanas e *in vivo* no encuentran diferencias significativas. Concluyen que los cementos de fosfato α tricálcico pueden emplearse para mejorar la fijación de implantes y prótesis ³¹³.

En 1998, Kurashina y cols. implantan un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato α tricálcico, fosfato dicálcico dibásico y fosfato tetracálcico monóxido en defectos óseos craneales y bajo el periostio craneal (experimentos de aumentación) en conejos. En la evaluación realizada a las 12 semanas encuentran que la regeneración ósea ha sido exitosa en 8 de los 12 animales. En 4 animales describen la pérdida parcial del implante debido al sangramiento generado durante la intervención. En los experimentos de

aumentación encuentran que el implante mantiene su forma hemisférica y que contacta estrechamente con el hueso receptor. Por lo anterior, concluyen que los cementos de fosfato de calcio son materiales promisorios para las craneoplastías y la aumentación esquelética debido a su buena osteoconductividad ³¹².

En 1998, Yuan y cols. implantan nueve biomateriales cerámicos correspondientes a cerámicas y cementos de fosfatos de calcio en la musculatura dorsal de perros, evaluando la presencia de neoformación ósea. Describen el desarrollo de formación ósea en los implantes que presentan microporosidad, que en este estudio correspondieron a fosfato β tricálcico, dos hidroxiapatitas microporosas, dos cementos de fosfato cálcico y una cerámica bifásica. Concluyen que los biomateriales de fosfatos de calcio con características químicas y estructurales específicas pueden ostentar propiedades osteoinductivas ¹⁷¹.

En 1999, Sasaki y cols. utilizan un material compuesto por cemento de fosfato cálcico, gentamicina y ácido poliláctico para el tratamiento de osteomielitis experimentales en conejos. Para ello provocan en la tibia proximal del animal de experimentación una osteomielitis por estafilococo dorado y dos semanas después implantan el material portador del antibiótico. Determinan que la gentamicina se libera sostenidamente durante 2 meses, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que el cemento es sustituido por hueso neoformado ³²⁴.

En 1999, Lu y cols. comparan la implantación de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato β tricálcico y fosfato monocálcico monohidratado con la de un cemento de α glicidilbifenol metacrilato, en los cóndilos laterales femorales y tibiales de conejos. El estudio histológico determina la presencia de un enlace directo entre el cemento de fosfato de calcio y el hueso y la sustitución progresiva por tejido óseo, sin reacción inflamatoria detectable. El estudio biomecánico del cemento fosfocálcico revela una disminución de la resistencia a la compresión hasta las 4 semanas, seguida de una recuperación progresiva hasta las 12 semanas, para detentar a las 16 semanas niveles comparativamente más bajos que el hueso esponjoso. El cemento acrílico mantiene durante todos los periodos del estudio unas propiedades mecánicas superiores a las del cemento fosfocálcico y el hueso esponjoso ³¹⁶.

En 1999, Flautre y cols. realizan la implantación en forma de bloques y pasta líquida de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato β tricálcico, fosfato monocálcico monohidratado y pirofosfato sódico dihidrogenado en defectos óseos femorales distales en ovejas, los que comparan con un control negativo sin implantar. Evalúan los resultados

histomorfométricos a las 12, 24 y 52 semanas, señalando que ambas presentaciones implantadas promueven una neoformación ósea progresiva que se desarrolla principalmente en el primer periodo del estudio, sin diferencias significativas entre ellas ³¹⁵.

En 1999, Miyamoto y cols. realizan la implantación subcutánea en ratas de tres tipos de cementos de fosfatos de calcio, constituidos por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhídrido, que corresponden a un cemento convencional, un cemento de fraguado rápido y un cemento no disgregable, respectivamente. En la evaluación histológica realizada a la semana de implantación describen que el cemento convencional se encuentra completamente desintegrado y rodeado por vesículas que contienen células inflamatorias, mientras que los otros dos mantienen su forma y están rodeados por una fina capa de tejido granuloso. Por lo anterior, recomiendan la utilización de los cementos de fraguado rápido, porque inducen una reacción inflamatoria mínima ³⁰¹.

En 2000, Pioletti y cols. estudian el efecto de las partículas de brushita, fosfato β tricálcico y cemento de brushita sobre la función de los osteoblastos, preparando partículas de 1 a 10 μm . y otras mayores de 10 μm . de diámetro. Observan que las partículas de menos de 10 μm . pueden producir una disminución en la viabilidad, la proliferación y la producción de matriz extracelular de los osteoblastos. El efecto es dosis dependiente y el número máximo de partículas que puede soportar un osteoblasto es de 50, por lo que consideran que en el futuro el desarrollo de los cementos de fosfatos de calcio debe minimizar la generación de partículas menores de 10 μm . ³⁰³.

En 2000, Blom y cols. analizan *in vitro* en cultivos celulares de osteoblastos y precursores osteoblásticos, la incorporación de factor de crecimiento $\beta 1$ (rhTGF- $\beta 1$) durante el fraguado de un cemento de fosfato de calcio, constituido por fosfato α tricálcico, fosfato tetracálcico monóxido y fosfato dicálcico dibásico. Señalan que la presencia del factor de crecimiento estimula la diferenciación de los preosteoblastos, por lo que proponen continuar estos estudios *in vivo* ²⁵³.

En 2000, Frayssinet y cols. realizan la implantación de cilindros de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato β tricálcico y fosfato dicálcico dihidratado, en el cóndilo femoral lateral de 12 ovejas, valorándolos histológicamente a los 20, 60 y 120 días. Señalan que a los 20 días se observa una discreta formación de hueso trabecular entrelazado con el implante, a los 60 días se produce la división del cemento a partir de los poros y la aparición

de hueso neoformado entre los fragmentos y a los 120 días todo el material ha sido sustituido por hueso, por lo que concluyen que la presentación en forma de cemento óseo mejora la resistencia mecánica de los fosfatos de calcio y no altera el proceso de osteointegración ¹³³.

En 2000, Yuan y cols. estudian la implantación de un cemento de fosfato de calcio que da como producto final hidroxiapatita deficiente en calcio, a nivel óseo y muscular en perros, evaluando los animales a las 4 semanas y 2 y 6 meses. Describen la ausencia de fenómenos inflamatorios o necrosis en las áreas musculares y óseas implantadas. A nivel óseo describen la sustitución del material por hueso neoformado y a nivel muscular encuentran formación de tejido óseo en los poros del material implantado, por lo que concluyen que el cemento, además de ser biocompatible, reabsorbible y osteoconductor, también posee propiedades osteoinductivas ²⁹⁶.

En 2000, Sánchez-Sotelo y cols. presentan un estudio clínico controlado de 110 pacientes mayores de 50 años con fracturas de epífisis distal de radio, comparando el tratamiento con inmovilización con yeso durante 6 semanas y la inyección de un cemento de fosfato cálcico más inmovilización con yeso durante dos semanas. Encuentran que la función de la mano y la muñeca, y el resultado radiológico son mejores en el grupo tratado con cemento fosfocálcico. La tasa de consolidación con desplazamiento es del 18.2 %, por lo que concluyen que el tratamiento con cemento óseo es incapaz de evitar esta complicación ³³².

En 2000, Knabe y cols. evalúan *in vitro* en cultivos de células óseas medulares de ratas dos cementos óseos de fosfato α tricálcico, dos cerámicas de fosfato tricálcico y una cerámica de potasio fosfato de calcio de reabsorción rápida. Señalan que las cerámicas de fosfato tricálcico facilitan en mayor grado el crecimiento osteoblástico y la elaboración de matriz extracelular, seguidas por los dos cementos óseos. La cerámica de potasio fosfato de calcio inhibe el crecimiento celular, lo que parece estar relacionado con la alta liberación de iones potasio y fosfato ³⁰⁴.

En 2001, Torner realiza un estudio experimental en conejos implantando cemento de fosfato α tricálcico, autoinjerto óseo esponjoso fresco y aloinjerto óseo congelado en defectos cavitarios femorales distales. Interviene 48 animales divididos en 4 grupos de 12 individuos, tres de los cuales reciben los implantes y un cuarto grupo queda con el defecto sin rellenar (control). A las 4 semanas describe la presencia de neoformación ósea en los tres grupos

implantados, sin diferencias significativas. A las 12 semanas verifica una mayor formación ósea en los grupos implantados con autoinjerto óseo y cemento de fosfato α tricálcico ²⁷.

En 2002, Ooms y cols. implantan en defectos creados en el tejido esponjoso del cóndilo medial del fémur distal de cabras un cemento de fosfato de calcio que contiene un 61.0 % de fosfato α tricálcico, un 26.0 % de hidrógeno fosfato de calcio, un 10.0 % de carbonato cálcico y un 3.0 % de hidroxiapatita precipitada, empleando como control defectos implantados con cemento de polimetilmetacrilato. El cemento es fácilmente moldeable y fragua en forma rápida, manteniendo una buena cohesión en contacto con los fluidos corporales. La evaluación histológica se realiza a los 3 días y 2, 8, 16 y 24 semanas, mostrando a las 2 semanas una abundante aposición ósea en la superficie del cemento, sin reacciones inflamatorias, ni encapsulación fibrosa. En los periodos posteriores las áreas reabsorbidas del cemento son sustituidas por hueso nuevo que mantiene continuidad con el lecho óseo receptor, demostrando las propiedades osteotransductivas del material ²⁸⁸.

En 2002, Khairoun y cols. describen la caracterización *in vitro* y las propiedades *in vivo* de un cemento óseo de apatita carbonatada constituido por un 58.0 % de fosfato α tricálcico, un 25.0 % de fosfato dicálcico anhídrido, un 8.5 % de hidroxiapatita precipitada y un 8.5 % de carbonato cálcico. Para la valoración *in vitro* preparan cilindros de cemento fraguado que son inmersos en solución de Ringer a 37 °C y para el estudio *in vivo* practican defectos de 6 mm. de diámetro en el fémur distal de conejos que implantan con el biomaterial y evalúan histológicamente a las 3 semanas. El estudio *in vitro* revela que el cemento presenta una resistencia a la compresión de 42 MPa después de 24 horas de su endurecimiento y el análisis *in vivo* muestra la presencia de hueso neoformado en contacto con toda la superficie del implante, el que exhibe una escasa degradación ³⁰⁵.

En 2003, Ooms y cols. inyectan en defectos del hueso cortical de la tibia de cabras un cemento de fosfato α tricálcico, empleando como control cavidades implantadas con cemento de polimetilmetacrilato. El estudio con microscopía electrónica de transmisión determina la presencia de una fina capa, de 50 a 60 nm. de espesor, en la unión entre el cemento fosfocálcico y el tejido óseo. El polimetilmetacrilato aparece completamente rodeado por una cápsula de tejido fibroso. La evaluación histológica descarta la presencia de una respuesta inflamatoria o reacción a cuerpo extraño y muestra que se genera una neoformación ósea progresiva y la reabsorción paralela del biomaterial implantado. A las 24 semanas persiste material sin degradar, pero la continua reabsorción osteoclástica sugiere

que todo el material será eventualmente sustituido. Concluyen que el cemento de fosfato α tricálcico es un material biocompatible, osteoconductor y osteotransductor, por lo que es un buen candidato para ser empleado como sustitutivo óseo ²⁸⁹.

En 2003, Ehara y cols. describen los efectos de los cementos de fosfato α tricálcico y fosfato tetracálcico en la proliferación osteoblástica, diferenciación y mineralización en un sistema de cultivo de células MC3T3-E1 de ratones neonatos. Señalan que ambos cementos no tienen influencia en la velocidad de proliferación de los osteoblastos, pero incrementan la formación de matriz extracelular y promueven un cambio hacia un estado celular más diferenciado y la mineralización de la matriz. Concluyen que estas propiedades de los cementos pueden generar un ambiente que estimula la osteogénesis cuando estos materiales son empleados como sustitutos óseos ³⁰⁷.

En 2003, Ooms y cols. estudian *in vivo* la respuesta de los tejidos blandos paravertebrales de cabras implantando tres formulaciones de cementos de fosfatos de calcio, dos de los cuales corresponden a cementos de fosfato α tricálcico y el tercero a un cemento de fosfato monocálcico. Los materiales son aplicados mientras se mantienen plásticos y moldeables. La valoración histológica revela que los cementos se transforman en una apatita carbonatada microcristalina y que se encuentran rodeados por una cápsula fibrosa. Algunos especímenes muestran una leve reacción inflamatoria y casi no se observa reabsorción de los materiales luego de 8 semanas de la implantación. En algunas muestras de 4 y 8 semanas detectan pequeñas áreas de calcificación en la cápsula. Concluyen, que estos cementos son biocompatibles y pueden utilizarse en la proximidad de los tejidos blandos ³⁰⁶.

En 2003, Hoshikawa y cols. realizan un análisis cuantitativo de los procesos de reabsorción y osteoconducción de un cemento de fosfato de calcio constituido por fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico anhídrido, determinando su valor como sustitutivo óseo y su efecto mecánico en la fijación de tornillos esponjosos mediante la implantación en el fémur distal de conejos. En el estudio histológico comparan el cemento con hidroxiapatita como control, encontrando que, a las 24 semanas, 2/3 del cemento óseo ha sido reabsorbido y sustituido por hueso neoformado, mientras que la hidroxiapatita casi no experimenta degradación. La resistencia al arrancamiento de los tornillos reforzados con cemento es significativamente mayor que la de los dispositivos no tratados. Concluyen que este cemento fosfocálcico presenta una buena biodegradabilidad y osteoconductividad, y aparece como satisfactorio para mejorar la fijación de tornillos en huesos de pobre calidad ³¹⁸.

En 2003, Ooms y cols. evalúan *in vivo* un cemento de fosfato α tricálcico para la fijación de implantes de titanio en el hueso esponjoso del cóndilo femoral medial de cabras, empleando dispositivos lisos para cementar e implantes recubiertos por plasma pulverizado del cemento. Comparan mediante pruebas de torque la fijación de los implantes lisos con cemento de fosfato α tricálcico o polimetilmetacrilato y la fijación de los implantes recubiertos por inserción preajustada exclusiva o con cemento fosfocálcico. Señalan que los implantes lisos fallan en la unión implante-cemento, los dispositivos recubiertos preajustados fracasan en la unión hueso-implante y los implantes recubiertos cementados fallan en la capa cementante. Concluyen, que la cementación con fosfato α tricálcico puede facilitar la carga temprana de los implantes de titanio preajustados ³¹⁹.

En 2004, Apelt y cols. estudian el comportamiento *in vivo* de tres cementos de fosfatos de calcio que corresponden a un cemento de fosfato monocálcico monohidratado, un cemento de fosfato β tricálcico y un cemento de brushita, implantándolos en las epífisis distal y la metáfisis proximal de ambos húmeros y fémures de seis ovejas y utilizando como control un defecto vacío. La evaluación histológica muestra que los tres cementos son sustituidos por hueso neoformado. La mayor formación ósea se verifica con el cemento de fosfato β tricálcico y la menor reabsorción con el cemento de fosfato monocálcico monohidratado ³²⁰.

En 2004, Ruhé y cols. efectúan un estudio experimental comparativo *in vivo* en defectos craneales en conejos en los que implantan un cemento de fosfato de calcio cargado con rhBMP-2, cemento sin factor osteoinductivo y matriz colágena absorbible con rhBMP-2, estudiando la regeneración ósea a las 2 y 10 semanas. Señalan que se genera una mayor neoformación ósea con el cemento con rhBMP-2 a las 10 semanas y que ya es posible determinar su presencia a las 2 semanas de implantación. Concluyen que el cemento de fosfato de calcio es un buen candidato como molde para la ingeniería de tejidos ¹³⁵.

En 2004, Ooms y cols. estudian *in vitro* un cemento inyectable de fosfato α tricálcico para la fijación de una prótesis preajustada de cadera en fémures de perros, comparando la estabilidad inicial obtenida con la del implante sin fijación. La valoración comparativa se realiza evaluando la rotación en varo y valgo, la traslación medial y lateral y la traslación en subsidencia. El estudio biomecánico revela que el empleo del cemento de fosfato α tricálcico incrementa la estabilidad inicial de la prótesis femoral estudiada, con diferencias estadísticamente significativas. Concluyen que estos promisorios resultados deben ser confirmados en experimentos *in vivo* antes de postular una futura aplicación clínica ⁴¹⁶.

De las referencias revisadas se concluye que la propiedad biológica más destacada de los cementos de fosfatos de calcio es su capacidad para establecer un enlace directo entre el biomaterial y el hueso, hecho que posibilita el proceso de regeneración ósea al emplearlos como sustitutivos. Lo anterior, es determinado por la composición química de estos materiales que presenta una importante similitud con la fracción mineral del hueso²⁸⁰⁻²⁹⁶.

En nuestro trabajo hemos corroborado esta propiedad, por cuanto en todos los animales implantados con los cementos H y R se ha verificado la presencia de una continuidad histológica entre el biomaterial y el tejido óseo receptor, sin interfaz fibrosa.

El mecanismo de osteointegración de los cementos basados en fosfatos de calcio denominado osteotransducción, es una particularidad de este grupo de cerámicas. En este caso el material implantado participa directamente en el proceso de sustitución ósea, siendo degradado activamente por los osteoclastos, mientras paralelamente se desarrolla la neoformación ósea. La porosidad del cemento fraguado es la responsable de su fijación bioactiva, de tal manera que el material más que ser degradado experimenta una verdadera transformación al interior del tejido óseo. Esto simplifica la problemática de adaptar la velocidad de degradación del material al desarrollo de la neoformación ósea, dado que no se trata de dos mecanismos diferentes sino de un sólo proceso^{27,42,284,287-289}.

En nuestro estudio hemos determinado la presencia de una neoformación ósea progresiva y centrípeta, con la degradación simultánea de los cementos H y R, de tal manera que a las 12 semanas sólo es posible encontrar restos fragmentados de estos biomateriales rodeados por tejido óseo en remodelación.

La remodelación que experimenta el hueso neoformado luego de la implantación del cemento de fosfato de calcio, está correlacionada con los ciclos de reabsorción y aposición ósea que caracterizan al hueso normal. Esto implica la existencia de una interfaz dinámica, denominada de coalescencia, donde se relacionan directamente los cristales de síntesis del material implantado con los cristales apatínicos biológicos que se van depositando en la matriz ósea^{167,172,287-289}.

En nuestro estudio los fenómenos de remodelación ósea se constatan en las muestras de 12 semanas de evolución para ambos cementos, dado que en los cortes histológicos de 4 semanas se observa fundamentalmente la formación de un tejido óseo inmaduro.

La biocompatibilidad de los cementos fosfocálcicos es un factor de mucha importancia para disponer su empleo como sustitutivos óseos efectivos. Los estudios de toxicidad local o general, de mutagenicidad y carcinogénesis han resultado negativos y los productos de degradación de estos materiales aportan calcio y fósforo para la neoformación ósea desarrollada por los osteoblastos. Sin embargo, en algunos estudios se ha detectado la presencia de algunas reacciones inflamatorias leves alrededor de los implantes que parecen tener relación con la formulación y composición particular de ciertos cementos ^{227-229,231,287,296}.

En nuestro trabajo no hemos detectado manifestaciones inflamatorias, ni toxicidad frente a los cementos estudiados, a pesar de la exclusión de dos animales implantados con estos materiales por complicaciones asociadas. El conejo CH-04-06 falleció a los 7 días por causas que no pudimos determinar en la autopsia, aunque no existen elementos atribuibles a problemas de toxicidad del material. El animal CR-04-02 presentó una artritis séptica por estafilococo dorado de aparición tardía que muy probablemente se puede haber generado por infección posoperatoria, más que por contaminación intraoperatoria.

Un aspecto que aparece como controversial es la potencial capacidad osteoinductiva de las cerámicas de fosfatos de calcio, hecho que ha venido siendo descrito desde 1994 y que recientemente se ha hecho extensiva a algunas formulaciones de cementos fosfocálcicos. La posible osteoinductividad de los biomateriales cerámicos ha sido postulada al encontrar neoformación ósea al implantarlos en tejidos blandos, especialmente a nivel muscular en animales de experimentación. Los autores que defienden esta postura consideran que determinadas geometrías y composiciones específicas de las cerámicas de fosfatos de calcio, son capaces de reclutar factores osteoinductivos endógenos en los tejidos blandos implantados que se encargan de promover la neoformación ósea. No obstante, los mecanismos íntimos de este tipo de osteogénesis no han sido dilucidados ¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

El presente trabajo de tesis nos ha permitido comprobar las propiedades biológicas de los cementos de fosfatos de calcio, confirmando su condición de materiales osteoconductivos, osteotransductivos, reabsorbibles, degradables, biocompatibles y osteointegrables. La determinación cuantitativa para los dos cementos óseos estudiados, de la promoción de una tasa global de neoformación ósea equivalente a la generada por el autoinjerto óseo, corrobora muchos de los resultados de los estudios antes descritos. Lo anterior, hace posible reafirmar que los cementos de fosfatos de calcio son útiles como sustitutivos óseos, por lo que esperable la ampliación y masificación de su empleo clínico ^{27,287-289}.

5.8. VIDRIOS BIOACTIVOS DE BASE FOSFATO

La formulación como vidrios de las cerámicas de fosfatos de calcio ha conseguido disponer de un nuevo grupo de biomateriales con destacables características bioactivas, a las que se suman unas propiedades mecánicas más cercanas a las del hueso, que permanecen inalteradas durante su disolución y bioabsorción ^{111,112}.

La unión de los vidrios bioactivos al hueso se establece por medio de una capa de hidroxicarbonatoapatita formada en la superficie de éstos cuando entran en contacto con los fluidos biológicos. Esta capa se genera como consecuencia de la alta reactividad de estos materiales en el medio acuoso, propiciando un rápido intercambio iónico. Este proceso produce una variación de la concentración iónica del fluido, la formación de una capa de gel en la superficie del vidrio y la cristalización de la apatita hidroxicarbonatada ^{338,339}.

Los vidrios bioactivos son materiales cerámicos con propiedades osteoconductoras que desde el punto de vista microestructural corresponden a sólidos amorfos, es decir con un elevado desorden estructural. De esta forma, un vidrio se puede definir como un material isotrópico, orgánico o inorgánico, que no presenta ningún tipo de periodicidad atómica tridimensional ^{24,113,350}.

Los primeros vidrios bioactivos fueron desarrollados por Hench y cols. en 1971, al determinar que ciertas composiciones vítreas tenían la capacidad de enlazar químicamente con el tejido óseo. De esta manera, elaboraron un vidrio de base silicio con la formulación 45S5, es decir, constituido por un 45.0 % molar de SiO₂, un 24.5 % de Na₂O, un 24.5 % de CaO y un 6.0 % de P₂O₅ y cuyo mecanismo de enlace con el tejido óseo implica la formación de una capa de hidroxiapatita activa originada por intercambios iónicos y reacciones de disolución y precipitación ^{111,337,338}.

Los vidrios bioactivos de base silicio preceden en el tiempo a los cementos de fosfatos de calcio, presentando un importante desarrollo que es respaldado por numerosos estudios experimentales. Sin embargo, a pesar que estos materiales promueven una rápida neoformación ósea, contienen SiO₂ como constituyente el que se absorbe escasamente, despertando dudas respecto a sus efectos *in vivo* en el largo plazo ³⁷⁰.

En cambio, los vidrios de base fosfato son químicamente más cercanos a la fase mineral del

hueso, por lo que más recientemente han sido motivo de gran interés para determinar sus potenciales aplicaciones biomédicas, especialmente en los ámbitos de la sustitución ósea. Estos vidrios corresponden a cadenas fosfatadas capaces de enlazar con variados compuestos e intercambiar iones o grupos moleculares con el medio fisiológico donde son implantados, por lo que pueden llegar a osteointegrarse por medio de una unión química ¹¹².

En las últimas dos décadas se han realizado numerosos estudios experimentales destinados al desarrollo de materiales bioabsorbibles, entre los que destacan los biomateriales poliméricos y los vidrios bioactivos. Los segundos representan una interesante alternativa para el soporte temporal del tejido óseo, pues poseen propiedades mecánicas cercanas a éste y, una vez implantados, pueden desintegrarse y osteointegrarse gradualmente. Luego de su bioabsorción los riesgos de complicaciones en el largo plazo son prácticamente inexistentes ^{112,349,352,353}.

Los vidrios bioactivos de base fosfato comparten varias de las ventajas que ostentan los cementos de fosfatos de calcio, dado que, al igual que éstos, son materiales biodegradables, pueden ser empleados para conformar materiales compuestos, tienen capacidad para ser utilizados como vehículos liberadores de fármacos, pueden ser usados para recubrir implantes metálicos o prótesis y son potenciales candidatos como soportes en la ingeniería de tejidos y como sustitutivos óseos. Sin embargo, carecen de la característica más destacada de los cementos fosfocálcicos que es la capacidad de conformar cuerpos sólidos que se fijan al tejido óseo receptor luego de mezclar sus componentes ^{389,390}.

Los vidrios de base fosfato son biomateriales cerámicos osteoconductivos, bioabsorbibles, degradables, biocompatibles y osteointegrables, cuyas propiedades biológicas y físico-químicas han sido estudiadas recientemente, determinando que pueden ser propuestos como potenciales sustitutivos óseos. Todavía no se ha aprobado el empleo clínico de ningún vidrio bioactivo, incluso para los vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O se encuentra pendiente su valoración *in vivo* en animales de experimentación, hecho que otorga el mayor interés a este trabajo de tesis ^{19,24,354,368,369,372,376,379,380}.

En las páginas siguientes nos referiremos a las propiedades físico-químicas y biológicas de los vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , describiendo las referencias de mayor interés, analizando sus correspondientes aportaciones y comentando la experiencia obtenida en este estudio.

5.8.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El desarrollo de los vidrios de base fosfato con composiciones apropiadas para su empleo en potenciales aplicaciones biomédicas comienza recién el año 1981 merced a los estudios de Burnie y Gilchrist, quienes aportaron un importante impulso para alcanzar el estado actual del conocimiento de las características y propiedades de este promisorio grupo de biomateriales cerámicos ³⁵¹.

En 1984, Bunker y cols. estudian los mecanismos y propiedades de disolución de dos vidrios de base fosfato de los sistemas $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ y $\text{Li}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$, observando que los rangos de disolución pueden ser controlados variando la composición del material, incluso en más de 4 niveles de magnitud. Señalan que estos vidrios están constituidos por componentes presentes en el organismo humano, por lo que es esperable una buena compatibilidad y una baja toxicidad ³⁷¹.

En 1989, Yunfei y cols. realizan un estudio estructural de los vidrios de fosfato del sistema $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$ y del sistema $\text{Na}_2\text{O-Fe}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$, determinando que el hierro se encuentra incorporado en la estructura vítrea por intermedio de iones férricos y ferrosos. Este y otros estudios posteriores han servido como base para la caracterización y desarrollo de composiciones vítreas que actualmente incorporan óxidos metálicos, como una manera de controlar la solubilidad de estos materiales ³⁷³.

En 1991, Chen y Monroe preparan varios materiales formulados como cementos a partir de vidrios de base fosfato. Para ello elaboran y estudian las propiedades físico-químicas de 10 vidrios de fosfato del sistema $\text{CaO-SrO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ que reducen a polvo mezclándolos con soluciones de hidróxido de calcio o ácido fosfórico. Considerando que es posible regular la solubilidad de estos materiales los proponen como potenciales sustitutos óseos o vehículos liberadores de fármacos ³⁶¹.

En 1994, Lin y cols. elaboran vidrios de fosfato que incorporan óxido de hierro en diferentes proporciones, que oscilan entre un 5.0 y un 22.0 % en peso, encontrando que la adición de este óxido metálico disminuye la solubilidad y aumenta la resistencia tensil de los materiales formulados. Además, determinan que estos vidrios de base fosfato son biocompatibles pues las pruebas realizadas en tejidos no muestran fenómenos inflamatorios a las 9 semanas de evolución ³⁷⁴.

En 1997, Yu y cols. estudian la estructura y propiedades de 7 composiciones de vidrios de fosfato a los que adicionan Fe_2O_3 en proporciones de 14 a 43 mol %, encontrando que la durabilidad química aumenta con contenidos mayores de 25.0 % molar y que sobre 30.0 % tienen una excepcional durabilidad química en agua destilada o solución salina disminuyendo su velocidad de disolución³⁷⁵.

En 1998, Delahaye y cols. valoran la cinética y mecanismo de solubilidad de 6 composiciones de vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O a pH 3, encontrando que su disolución es congruente, con una primera fase lineal que es seguida por una etapa en que la solubilidad decrece producto de un incremento de la fuerza iónica y el desarrollo de una capa hidratada³⁶⁵.

En 1998, Clément y cols. estudian 5 composiciones de vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , valorando la influencia de su conformación química en sus propiedades mecánicas por medio de la determinación del módulo de Young, la dureza de Vickers y la tenacidad a la fractura y su solubilidad a través de la pérdida de masa por unidad de tiempo. Determinan que el módulo de Young se incrementa con el mayor contenido de CaO, encontrando valores entre 68.61 y 116.54 GPa, esta misma relación se observa entre la tenacidad a la fractura y el contenido de P_2O_5 con valores que oscilan entre 0.65 y 0.96 MPa $\text{m}^{1/2}$. La solubilidad aumenta acorde con el incremento del contenido de Na_2O ³⁵⁴.

En 1999, Clément y cols. describen los cambios estructurales de dos vidrios de metafosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O durante su disolución en fluido corporal simulado (SBF), determinando la ausencia de modificaciones durante la primera semana. Sin embargo, después de 4 semanas de evolución el análisis de la superficie del vidrio muestra una delgada capa hidratada compuesta por grupos de ortofosfato de calcio³⁶⁹.

En 1999, Kasuga y cols. elaboran dos vitrocerámicas bioactivas preparadas por sinterización y cristalización de dos diferentes vidrios inversos de fosfato de calcio. Sólo la vitrocerámica derivada del vidrio $60\text{CaO}-30\text{P}_2\text{O}_5-7\text{Na}_2\text{O}-3\text{TiO}_2$ presenta un comportamiento bioactivo en fluido corporal simulado y una resistencia a la compresión de 100-120 MPa, por lo que consideran que la durabilidad química de los vidrios es mejorada por la adición de TiO_2 ³⁶⁶.

En 1999, Clément y cols. evalúan la tenacidad a la fractura de un vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , con un contenido de P_2O_5 de 44.5 % molar, de CaO de 44.5 % y

de Na₂O de 11.0 %, por medio de la indentación de Vickers, obteniendo valores que fluctúan entre 0.65 ± 0.08 MPa m^{1/2} que son totalmente compatibles con el enlace del material al hueso³⁸⁰.

En 2000, Franks y cols. estudian la solubilidad *in vitro* de 7 composiciones de vidrios de fosfato del sistema P₂O₅-CaO-Na₂O que evalúan en agua destilada y solución salina tamponada (HBSS). Determinan que el contenido de CaO de los vidrios tiene una relación inversa exponencial con la solubilidad y, además, refieren que la bioactividad de estos materiales es demostrada por la formación de brushita precipitada que es un precursor de la formación de apatita³⁵².

En 2000, Clement y cols. describen la durabilidad química y las propiedades mecánicas de los vidrios de fosfato del sistema P₂O₅-CaO-Na₂O cuando se les incorpora Fe₂O₃, TiO₂ y ZnO. Señalan que la adición de Fe₂O₃ y TiO₂ disminuye considerablemente la solubilidad de estos biomateriales, en cambio, cuando se les incorpora ZnO ésta se incrementa. El TiO₂ se presenta como más efectivo para disminuir la solubilidad de los vidrios y el Fe₂O₃ muestra una resistencia mecánica mayor. Concluyen que estos nuevos sistemas de vidrios de metafosfato con baja solubilidad y mejores propiedades mecánicas los hacen compatibles con las aplicaciones biomédicas que requieren estabilidad en el largo plazo³⁷⁶.

En 2001, Franks y cols. estudian 10 composiciones de vidrios de fosfato del sistema P₂O₅-CaO-Na₂O con un contenido fijo de 45.0 % molar de P₂O₅, en las que varían la relación CaO/Na₂O. Encuentran que con altos contenidos de Na₂O se forma principalmente una fase de NaPO₃, con una relación CaO/Na₂O intermedia precipitan fases como NaPO₃ y Na₄Ca(PO₃)₆ y con un alto contenido de CaO se forma únicamente Na₄Ca(PO₃)₆³⁷⁷.

En 2001, Georgiou y cols. describen las propiedades mecánicas de un material compuesto en cuya elaboración emplean hidroxiapatita, la que es reforzada con un 2.5 y 5.0 % en peso de un vidrio de fosfato del sistema 45P₂O₅-32CaO-23Na₂O. Señalan que la adición del vidrio de fosfato densifica y reduce la porosidad de la hidroxiapatita, con el consiguiente incremento de la resistencia mecánica de este material compuesto³⁶².

En 2001, Kasuga y cols. estudian diferentes composiciones de vidrios inversos de fosfato de calcio que contienen iones P₂O₇²⁻ y PO₄³⁻ a los que incorporan pequeñas proporciones de TiO₂, evaluándolos en fluido corporal simulado (SBF). Después de 20 días de inmersión se

deposita una capa de partículas de apatita de $6\text{CaO}\cdot 3\text{P}_2\text{O}_5\cdot \text{TiO}_2$, que posee una mayor durabilidad química que la de los vidrios de metafosfato y en que los iones fosfato no se disuelven excesivamente, por lo que la formación de apatita no es suprimida ³⁶⁷.

En 2002, Navarro y cols. analizan tres formulaciones de vidrios de fosfato del sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-TiO}_2$ que comparan con un vidrio libre de TiO_2 , encontrando que la incorporación de TiO_2 disminuye significativamente la solubilidad del material vítreo, de tal manera que a los 80 días el vidrio sin TiO_2 tiene una pérdida de peso de un 11.0 %, mientras que el que contiene 8 mol % de TiO_2 sólo reduce un 1.0 %. La dureza de Vickers del vidrio sin TiO_2 es de 377.30 y el módulo de Young es de 59.86 MPa, mientras que para el vidrio con 8 mol % de TiO_2 la dureza de Vickers es de 433.20 y el módulo de Young es de 79.95 MPa. Concluyen que el refuerzo con TiO_2 mejora la estabilidad y propiedades mecánicas de los vidrios de fosfato transformándolos en buenos candidatos para aplicaciones biomédicas ³⁷⁹.

En 2002, Franks y cols. estudian la solubilidad y proliferación celular osteoblástica para 6 composiciones de vidrios del sistema $\text{MgO-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, en que emplean contenidos crecientes de MgO para reemplazar el CaO, mientras que los contenidos de Na_2O y P_2O_5 se mantienen constantes para todos, en proporciones de 23.0 % y 45.0 % molar, respectivamente. Señalan que al sustituir el CaO por MgO, la curva de solubilidad de los vidrios pierde su naturaleza exponencial, hecho que permite deducir la significativa contribución del primero en el control del proceso de solubilidad. En cambio, la proliferación de los osteoblastos del cultivo de prueba no es afectada en ninguna de las composiciones vítreas estudiadas e incluso parece incrementarse frente a los vidrios que contienen Mg ³⁷⁸.

En 2004, Ahmed y cols. elaboran y caracterizan 9 composiciones de vidrios de fosfato del sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ con contenidos de P_2O_5 de 45.0, 50.0 y 55.0 % molar y de CaO de 30.0, 35.0 y 40.0 % molar, encontrando que con el aumento del contenido de CaO para todos los vidrios estudiados se produce un incremento de las temperaturas de transición vítrea y de cristalización, una disminución de la solubilidad y una reducción gradual del pH acompañado de la liberación de iones Na^+ y Ca^{+2} . Los mismos autores elaboran fibras de vidrio con las 9 composiciones antes señaladas, encontrando que no es factible su obtención a partir de los vidrios de fosfato que contienen un 45.0 % molar de P_2O_5 . Para las fibras de vidrio desarrolladas verifican el mismo comportamiento de las temperaturas de transición vítrea y de cristalización y de la solubilidad, con el incremento del contenido de CaO de las formulaciones ^{389,390}.

De la literatura referenciada se desprende que los vidrios de base fosfato son materiales cerámicos que poseen una composición química y propiedades mecánicas compatibles con la condición de andamios para la regeneración ósea, debido a que al ser utilizados en el relleno de cavidades óseas es esperable que enlacen con el hueso receptor y que sean sustituidos progresivamente por tejido óseo neoformado ^{112,351}.

Los vidrios de base fosfato presentan algunas semejanzas estructurales con los polímeros orgánicos lineales, sin embargo, detentan ventajas significativas respecto de éstos, debido a que son materiales completamente amorfos si han sido correctamente procesados, su degradación es predecible y variando la composición del vidrio se puede modificar fácilmente su velocidad de bioabsorción ^{352,377}.

La condición de materiales bioabsorbibles y biodegradables de los vidrios de fosfato les confieren cualidades que superan su baja estabilidad química, especialmente a la hora de disponer de biomateriales solubles para la sustitución ósea. En los vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , la relación CaO/ Na_2O controla la solubilidad, permitiendo elaborar materiales con tiempos de disolución que pueden variar desde pocos días hasta varios meses, dependiendo de la aplicación biomédica que se les quiera dar ^{352,354,369,371,372,389}.

A pesar de lo anterior, para las formulaciones vítreas que se proponen para la sustitución ósea la solubilidad puede continuar siendo alta, pese a la intervención de la relación CaO/ Na_2O . De ahí que varios estudios han propuesto la incorporación de óxidos metálicos en la composición de los vidrios ternarios de fosfato, entre los cuales destacan el TiO_2 y el Fe_2O_3 . De esta manera, se puede obtener vidrios cuaternarios de fosfato que presentan una menor solubilidad y una mayor resistencia mecánica ³⁷³⁻³⁷⁹.

Las propiedades mecánicas de los vidrios de base fosfato, tanto su resistencia a la flexión como su módulo de elasticidad, en general, no varían con el tiempo que demoran en disolverse. Esto se debe a que la disolución del vidrio se desarrolla con la formación de una capa de reacción hidratada en la superficie del material desde la cual el proceso se va extendiendo uniformemente. Por lo tanto, el interior del material vítreo no es afectado por la disolución, lo que explica porqué las propiedades se mantienen en el tiempo. Por otra parte, cabe destacar que los valores del módulo de elasticidad de los vidrios de fosfato se encuentran en alrededor de 50 GPa, relativamente cercanos a los valores reportados para el hueso ^{354,380}.

Estas características han permitido que los vidrios de fosfato se empleen como materiales de refuerzo para elaborar biomateriales compuestos, habiéndose utilizado en distintas proporciones para incrementar la resistencia mecánica de diferentes polímeros bioabsorbibles y cerámicas fosfocálcicas, como la hidroxiapatita sintética. Los vidrios de fosfato también se han mostrado útiles para la formulación de variadas vitrocerámicas bioactivas^{24,362}.

En nuestro trabajo de tesis hemos empleado un vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O con una composición molar de 44.5 % de P_2O_5 , un 44.5 % de CaO y un 11.0 % de Na_2O y un vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 que presenta una composición molar de 44.5 % de P_2O_5 , un 44.5 % de CaO, un 6.0 % de Na_2O y un 5.0 % de TiO_2 . El primero posee una dureza de Vickers de 357.30 ± 8.24 kg/mm² y un módulo de Young de 59.86 ± 8.24 MPa, mientras que el segundo presenta una dureza de Vickers de 431.10 ± 7.80 kg/mm² y un módulo de Young de 71.10 ± 1.70 MPa^{368,379}.

Los estudios *in vitro* han demostrado que el vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O es 6 veces más soluble que el vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 y estos mayores niveles de solubilidad se mostraron como los responsables de la generación de una leve citotoxicidad^{19,391}.

Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio *in vivo* han permitido determinar que la bioabsorción de ambos materiales es equivalente, sin diferencias estadísticamente significativas, tanto a las 4 como a las 12 semanas. Además, ambos vidrios de fosfatos se han mostrado biocompatibles. Estos resultados revelan la dificultad para extrapolar los hallazgos determinados *in vitro*, al comportamiento que los materiales demuestran *in vivo*. Estas aparentes discrepancias en los resultados pueden explicarse porque *in vivo* los cambios químicos son tamponados por el ambiente fisiológico y la circulación continua de los fluidos corporales, que atenúan las condiciones locales^{19,391}.

Por último, los vidrios de base fosfato carecen de la característica de conformar cuerpos sólidos que poseen los cementos de fosfatos de calcio, sin embargo, su presentación en micropartículas hace que al ser mezclados con la sangre del receptor adquieran una ligera solidez otorgada por la coagulación, que impide su migración desde el sitio de implantación. De hecho, en ninguno de los 24 animales que recibieron vidrios de fosfato encontramos restos de los materiales en localización ectópica.

5.8.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Los primeros estudios relacionados con las propiedades biológicas de los vidrios de fosfato también fueron publicados por Burnie y cols. en 1981, valorando su biocompatibilidad *in vitro* donde se muestran carentes de toxicidad e *in vivo* donde generan reacciones adversas limitadas por lo que proponen continuar con estos ensayos. Debido a que la atención sobre los vidrios de base fosfato como potenciales sustitutivos óseos es relativamente reciente, la mayoría de los trabajos han estado dedicados a la evaluación de sus propiedades físico-químicas, por lo que no existen muchas referencias relacionadas con el estudio de sus propiedades biológicas ³⁵¹.

En 1990, Kokubo y cols. desarrollan el fluido corporal simulado (SBF) cuya composición química es similar a la del plasma sanguíneo, para reproducir *in vitro* las reacciones superficiales que ocurren *in vivo* entre los vidrios y los tejidos de implantación y de esta manera poder determinar su potencial bioactividad ³⁸².

En 1998, Uo y cols. preparan 25 composiciones diferentes de vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , evaluando propiedades como la temperatura de transición vítrea y la velocidad de disolución en agua destilada y fluido corporal simulado y la toxicidad en cultivos celulares. Concluyen que la solubilidad disminuye al incrementar el contenido de CaO y al disminuir el contenido de P_2O_5 , y que la citotoxicidad sigue esta misma relación. Además, los vidrios libres de CaO tienen una velocidad de disolución muy elevada ³⁸⁷.

En 1998, Cartmell y cols. estudian la hemocompatibilidad de 8 composiciones de vidrios del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O en que varían el contenido de CaO y Na_2O para controlar su liberación, encontrando que ninguna de ellas promueve la adhesión plaquetaria y que tres formulaciones presentan una mínima capacidad de activar el complemento, por lo que consideran que estos materiales pueden tener utilidad como vehículos liberadores de fármacos ³⁸⁵.

En 1998, Cartmell y cols. evalúan la respuesta de los tejidos blandos frente a la liberación controlada de tres vidrios del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O incluidos en glicerol, dos con tamaños de gránulo de 200 a 300 μm y uno menor de 53 μm , inyectándolos intramuscularmente en la región dorsolumbar de ratas. El estudio histológico revela que las partículas vítreas de mayor tamaño provocan una reacción inflamatoria en los tejidos

aledaños durante su lenta degradación hasta los 6 meses, por lo que podrían ser potencialmente efectivas para su empleo en la incontinencia urinaria por estrés infantil. La rápida degradación de las partículas menores genera necrosis tisular por lo que desaconsejan su uso ³⁸⁴.

En 2000, Salih y cols. elaboran 4 composiciones de vidrios de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O que evalúan *in vitro* en dos cultivos de diferentes líneas celulares de osteoblastos humanos, utilizando concentraciones crecientes de extractos vítreos. Describen que los vidrios más solubles inhiben el crecimiento de ambas líneas celulares, en cambio los menos solubles y con mayor contenido de Ca²⁺ estimulan la proliferación celular ³⁵³.

En 2001, Salih y cols. valoran *in vitro* el crecimiento celular de osteoblastos cultivados frente a un material compuesto por hidroxiapatita y 2,5 y 5 % en peso de vidrio de fosfato del sistema $45P_2O_5$ -32CaO-23Na₂O, cuyas propiedades mecánicas habían estudiado previamente. Señalan que la proliferación celular es menor con la hidroxiapatita pura y los dos materiales compuestos respecto del cultivo control, efecto que se mantiene en el tiempo, por lo que consideran que ésta no tiene relación con la composición de los materiales ³⁶³.

En 2002, Gil-Albarova y cols. realizan la implantación subcutánea de láminas de vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O y un material compuesto por el vidrio anterior y un copolímero de PLA en 18 conejos, para valorar su tolerancia tisular y los efectos sobre sus propiedades mecánicas. Los animales se subdividen en 3 grupos para cada material, siendo eutanasiados a las 2, 8 y 16 semanas. Describen que ambos materiales carecen de toxicidad local o general y que conservan sus propiedades mecánicas durante el tiempo de disolución. Este trabajo determina la biocompatibilidad *in vivo* del vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O (vidrio G0) que empleamos en este trabajo de tesis ³⁸¹.

En 2002, Kesisoglou y cols. estudian *in vitro* los efectos de 4 composiciones de vidrios del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O en los linfocitos T. Los materiales poseen un contenido fijo de P_2O_5 de 45.0 % y de Na₂O de 15.0 % molar y 3 vidrios incorporan óxidos metálicos como CoO, ZnO y Fe₂O₃ en proporción de 5 % molar. Determinan que todas las composiciones vítreas provocan la activación de los linfocitos T, que incrementan la síntesis de DNA comparados con el cultivo control, siendo el Zn y el Fe los más activos. Sin embargo, los niveles de activación son muy bajos respecto a los que originan los mitógenos policlonales ³⁸⁸.

En 2003, Gil-Albarova y cols. efectúan la implantación en el fémur distal de 10 conejos del biomaterial compuesto estudiado el año 2002, comparándolo con un defecto óseo no tratado como control negativo. Encuentran neoformación ósea y osteointegración parcial del material, con la presencia de fragmentos residuales del implante. Consideran que este material compuesto es biocompatible y tiene utilidad como osteosustitutivo, pero proponen un periodo de estabulación más prolongado para determinar el tiempo que demora su bioabsorción. Este trabajo es el único que ha valorado *in vivo*, aunque en forma de material compuesto, la condición de sustitutivo óseo del vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O que implantamos en nuestro estudio, por lo tanto no son experiencias comparables ^{134,381}.

En 2003, Navarro y cols. estudian *in vitro* la solubilidad y biocompatibilidad de un vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , denominado vidrio G0, y un vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 , llamado vidrio G5, evaluando en discos de los materiales y sus extractos la pérdida de peso en fluido corporal simulado y la toxicidad, adhesión y proliferación celular utilizando un modelo de cultivo de fibroblastos de piel humana. Este ensayo tiene gran importancia, pues corresponde al estudio *in vitro* que precede a nuestro trabajo *in vivo*, en que evaluamos las propiedades biológicas como sustitutos óseos del vidrio G0 y el vidrio G5, comparándolos con el cemento de fosfato α tricálcico (cemento H), el cemento de fosfato monocálcico (cemento R) y el autoinjerto óseo esponjoso fresco ¹⁹.

En 2004, Bitar y cols. evalúan *in vitro* 10 composiciones de vidrios del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , los que son sembrados en cultivos de osteoblastos orales humanos, fibroblastos orales y fibroblastos de tendones flexores de la mano. Establecen que ambos tipos celulares mantienen sus respectivos fenotipos en contacto con los discos vítreos estudiados y que los vidrios que contienen menos de 46.0 % molar de CaO no generan reacciones adversas, por lo que consideran que estas últimas composiciones vítreas son ideales como andamiajes para la ingeniería de tejidos ³⁸⁶.

En 2004, Navarro y cols. describen la elaboración de vitrocerámicas macroporosas de fosfato de calcio en el sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 preparadas a partir de partículas de vidrio por adición de una solución de H_2O_2 y su consiguiente sinterización. De esta manera, obtienen materiales con una fase predominantemente vítrea, con una porosidad que oscila entre un 40.0 y un 55.0 % y con un rango de poros entre 20 y 500 μm . La valoración de la biocompatibilidad se efectúa *in vitro* en cultivos celulares, tanto para el material como para sus extractos, determinando que carecen de efectos tóxicos ⁴¹⁷.

De las referencias comentadas se concluye que los vidrios de base fosfato son materiales bioactivos, biocompatibles, bioabsorbibles y biodegradables, cuyas características biológicas cercanas a la fracción mineral del hueso, les permiten promover la proliferación de las células osteoformadoras en los análisis *in vitro*, haciendo posible su proposición como potenciales sustitutivos óseos alternativos ^{134,381}.

En general, los estudios experimentales han mostrado que la mayoría de las formulaciones de vidrios de base fosfato carecen de toxicidad local o general y de respuesta inflamatoria aguda o crónica. Sin embargo, cuando se analizan vidrios muy solubles se ha observado en ocasiones la presencia de reacciones inflamatorias, llegándose incluso a producir necrosis tisular. También se ha determinado que la incorporación de óxidos metálicos puede generar la activación limitada de la respuesta inmune. De ahí la importancia de los ensayos de citotoxicidad que tienen como objetivo valorar el daño potencial de las sustancias liberadas por estos implantes en los cultivos celulares ^{19,353,385}.

Los materiales bioactivos requieren de un período de implantación variable y del ajuste del implante antes que el tejido óseo pueda proliferar y se establezcan enlaces. De esta manera, si los materiales experimentan reacciones superficiales rápidas los implantes serán reabsorbibles, mientras que si éstas se desarrollan en forma más lenta, su comportamiento será bioinerte. De ahí la importancia de definir correctamente las composiciones de los vidrios de fosfato para que se puedan desenvolver como materiales bioactivos y, por consiguiente, puedan ser propuestos como factibles sustitutivos óseos ²⁴.

El estudio *in vitro* del vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O (vidrio G0) y del vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 (vidrio G5) al microscopio electrónico de barrido ambiental, muestra que ambas formulaciones desarrollan un proceso de degradación superficial, sin embargo, su principal diferencia radica en la velocidad con que aparecen los cambios morfológicos. De esta forma, después de 4 semanas de disolución el vidrio G0 presenta la formación de una capa superficial ligeramente desprendida y agrietada, mientras que el vidrio G5 apenas exhibe signos de degradación ^{368,391}.

La toxicidad es evaluada en cultivos de fibroblastos con discos de los vidrios y extractos de los mismos, determinándose una leve respuesta positiva para ambas formulaciones al contacto con el material íntegro, que es algo mayor para el vidrio G0. En cambio, los extractos vítreos no desencadenan ninguna respuesta de toxicidad. La presencia de TiO_2

tampoco genera efectos adversos. Por otra parte, la implantación *in vivo* en el tejido celular subcutáneo dorsal de conejos Nueva Zelanda descarta la leve toxicidad generada *in vitro* por el vidrio G5 ^{19,381}.

Los resultados obtenidos para la adhesión y proliferación de los fibroblastos resultan contradictorios en relación con las pruebas de toxicidad, debido a que ambas respuestas son mayores con el vidrio G0 que con el vidrio G5. De esta manera, el vidrio G5 que es más soluble fomenta una mayor adhesión y proliferación fibroblástica e induce la secreción extracelular de proteínas ¹⁹.

En nuestro trabajo de tesis hemos estudiado las propiedades biológicas de los vidrios G0 y G5 *in vivo* en animales de experimentación implantando estos dos materiales en defectos cavitarios de la metáfisis femoral distal de 24 conejos, comparándolos con dos cementos de fosfatos de calcio y el autoinjerto óseo esponjoso. Este trabajo experimental nos ha permitido demostrar que ambos vidrios de fosfato se comportan como sustitutivos óseos.

El estudio comparativo de medias del área trabecular total, longitud total de osteoide, área de osteoide y superficie porcentual de hueso neoformado a las 4 semanas, ha mostrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos. De esta forma, los dos vidrios han generado una menor neoformación ósea que el grupo control implantado con autoinjerto óseo y los dos cementos de fosfatos de calcio. Sin embargo, a las 12 semanas la neoformación ósea promovida por los dos vidrios y los dos cementos es equivalente a la del autoinjerto óseo, sin diferencias estadísticamente significativas.

Por otra parte, ambos vidrios de fosfato mostraron una buena biocompatibilidad y capacidad osteoconductiva, fomentando una neoformación cuantitativamente similar al compararlos entre sí. Por lo tanto, ambos materiales vítreos representan una interesante alternativa para la sustitución ósea.

Recientemente, Navarro y cols. del Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, han desarrollado y caracterizado vitrocerámicas porosas de fosfato de calcio, las que en los ensayos *in vitro* también aparecen como promisorios materiales bioactivos y, sin lugar a dudas, resultará de gran relevancia el futuro estudio comparativo *in vivo* con los vidrios particulados que hemos empleado en este trabajo experimental ⁴¹⁷.

5.9. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El objetivo general que nos propusimos para desarrollar esta Tesis Doctoral fue estudiar la regeneración del tejido óseo en defectos cavitarios experimentales con cuatro biomateriales cerámicos basados en fosfatos de calcio, dos cementos óseos y dos vidrios bioactivos, comparándolos con el autoinjerto óseo esponjoso fresco^{196,248,354,379}.

Para concretar este objetivo, realizamos un estudio experimental prospectivo, comparativo y controlado, interviniendo quirúrgicamente 60 conejos machos adultos de la raza Nueva Zelanda, a los que se practicó defectos cavitarios de 6 mm. de diámetro en la metáfisis distal del fémur derecho. Seis animales fueron empleados por cada material, grupo control y periodo de implantación. Los resultados se obtuvieron por medio de estudios radiológico, histológico e histomorfométrico a las 4 y 12 semanas⁶⁹.

Los resultados obtenidos para este modelo experimental, han demostrado que el cemento de fosfato α tricácico (cemento H), el cemento de fosfato monocálcico (cemento R), el vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O (vidrio G0) y el vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 (vidrio G5) se comportan como materiales osteoconductivos, biocompatibles y reabsorbibles, siendo progresivamente sustituidos por tejido óseo neoformado^{27,287,288}.

Lo anterior, nos ha permitido confirmar uno de los objetivos específicos que nos planteamos, que era comprobar la utilidad de los cementos óseos basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos.

Además, hemos podido corroborar uno de los objetivos específicos más importantes de este trabajo de tesis, que era demostrar el comportamiento de los vidrios de base fosfato como sustitutivos óseos. Como hemos señalado a lo largo de nuestra discusión, hasta la fecha no se han publicado trabajos que valoren *in vivo* la capacidad de los vidrios de fosfato como osteosustitutivos, aunque los estudios realizados previamente *in vitro* han respaldado esta aseveración^{19,353,386}.

Consideramos que los resultados de este trabajo pueden promover la realización de otros estudios *in vivo*, que permitan cotejar y discutir nuestras conclusiones, para que los vidrios de fosfato puedan llegar a tener un lugar en el armamentario clínico disponible para la sustitución ósea.

5.9.1. RESULTADOS RADIOLÓGICOS

La evaluación radiológica de la regeneración ósea generada por los cementos óseos, vidrios bioactivos y autoinjertos óseos, tiene como inconveniente principal la subjetividad del observador y la limitada información final que es posible obtener. Además, en este modelo experimental la cortical lateral del fémur se mantiene indemne, lo que dificulta la interpretación radiológica por superposición de imágenes en las proyecciones laterales.

Las escalas radiológicas que existen para efectuar la valoración de los injertos óseos, en general están descritas para evaluar la incorporación ósea del área central del tejido óseo implantado. No existen baremos radiológicos específicos para el estudio experimental de los defectos óseos cavitarios rellenos con injertos óseos o biomateriales³⁹³⁻³⁹⁵.

En este trabajo empleamos la escala de Lane y Sandhu que cuantifica la formación de hueso y la remodelación del mismo en los defectos sustituidos con injertos óseos. Esta escala no tiene considerada la posibilidad de reabsorción del injerto y asigna una puntuación de 0 a 4 en función de la neoformación ósea porcentual³⁹⁵.

Los trabajos precedentes que utilizaron este modelo experimental han demostrado que el estudio radiológico es limitado, y, aunque existe correlación entre la neoformación ósea radiológica y el área trabecular total, hecho que confirmamos en este estudio, se desaconseja formular conclusiones en base a él. Estos antecedentes y nuestra propia experiencia nos han llevado a desistir de realizar mayores análisis estadísticos de los resultados radiológicos²⁵⁻²⁸.

De todas maneras, concordamos en que debido a su simplicidad se debe efectuar el estudio radiológico de las muestras óseas, pues tiene utilidad para descartar complicaciones intercurrentes como las fracturas asociadas, para apreciar la reabsorción del implante, para identificar la eventual migración de los biomateriales o para detectar la presencia de calcificaciones extraóseas.

La visión global de nuestros resultados radiológicos permite señalar que se produce regeneración ósea con todos los implantes estudiados y que las puntuaciones son mayores en los grupos estabulados durante 12 semanas. Sin embargo, se trata de una valoración general que no permite formular mayores conclusiones.

5.9.2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Una vez concluido el análisis radiológico las muestras óseas son cortadas longitudinalmente para realizar la evaluación macroscópica del área de implantación y enseguida son procesadas para su estudio con técnica para hueso no descalcificado. La infiltración e inclusión del segmento óseo portador del defecto experimental se realiza en una resina plástica hidrosoluble basada en glicolmetacrilato, lo que permite valorar un hueso que preserva sus relaciones histológicas. De esta manera, es posible determinar las características de la neoformación ósea y la relación existente entre los diferentes componentes del tejido óseo y los sustitutivos implantados.

De cada muestra ósea se obtiene tres cortes histológicos de 5 µm de espesor los que son teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina, que permite observar el ribete de osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro, con la tinción de tricrómico de Goldner que muestra el osteoide de color rojo y el hueso mineralizado de color verde y con la técnica de Von Kossa que permite ver el ribete de osteoide de color rojo y el hueso mineralizado de color negro^{64,396}.

5.9.2.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

En la valoración macroscópica encontramos que los defectos cavitarios experimentales de todos los animales intervenidos, presentan tejido óseo distinguible en el área de implantación. En ninguna de las muestras óseas observamos tejido de carácter conjuntivo fibroso, reemplazando a los biomateriales cerámicos o al injerto óseo empleado.

Parte de los biomateriales implantados pueden ser reconocidos en la porción central de los defectos a las 4 semanas, los que se encuentran en íntimo contacto con el tejido óseo neoformado. En este mismo periodo de evaluación no es posible distinguir en el examen macroscópico la presencia del injerto óseo esponjoso implantado.

A las 12 semanas el área metafisaria femoral distal rellena con los cuatro biomateriales, carece de solución de continuidad y la zona de los defectos presenta un tejido neoformado de aspecto macroscópico uniforme. Lo mismo puede observarse en los casos implantados con injerto óseo autólogo. En este periodo de estudio siempre es posible distinguir restos de los biomateriales implantados en los casos que recibieron cementos de fosfatos de calcio²⁷.

5.9.2.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

El estudio histológico del grupo control a las 4 semanas nos ha permitido determinar la dificultad que existe para diferenciar la estructura del autoinjerto óseo aportado, respecto del hueso neoformado, debido al estrecho contacto que establece el hueso injertado con los numerosos ribetes de osteoide que avanzan en forma centripeta. A las 12 semanas el defecto cavitario se encuentra ocupado por hueso trabecular en avanzado estado de remodelación, con su estructura casi completamente calcificada y uniformemente distribuido.

La regeneración ósea dinámica que provoca la implantación de autoinjerto óseo esponjoso fresco en los variados defectos del hueso, constituye el patrón de oro con el que se debe comparar la neoformación ósea promovida por los biomateriales formulados y caracterizados para su empleo como sustitutivos óseos^{25,69}.

En los grupos implantados con cementos H y R a las 4 semanas se observa claramente la presencia de los biomateriales en el centro del defecto, con numerosos capilares sanguíneos invadiendo los implantes. En la periferia se determinan ribetes de osteoide en continuidad con el tejido óseo metafisario que se interdigita en la estructura de los cementos. A las 12 semanas se observa una mayor presencia de tejido óseo neoformado, en remodelación trabecular, que penetra y rodea los numerosos fragmentos en que se han dividido los biomateriales. En los espacios creados dentro de los implantes se distinguen puentes corticales que van sustituyendo los implantes en la medida que estos se van degradando. En todas las muestras estudiadas persisten restos de los cementos óseos sin reabsorber^{27,287,288,305}.

Es importante destacar que el osteoide que se forma en el molde osteoconductor que representa la estructura de los cementos óseos, tiene mayor grosor que el observado en el grupo control, lo que podría significar la existencia de alguna dificultad para que se desarrolle la calcificación de este tejido de neoformación. La condición de materiales osteoconductor que ostentan los cementos de fosfatos de calcio, implica que se debe producir una estrecha coordinación entre las velocidades de reabsorción y de neoformación ósea, situación que contrasta ligeramente con los hallazgos determinados en los estudios *in vivo* en que se ha observado que los procesos de degradación y biorreabsorción de éstos materiales son ligeramente prolongados, aunque muestran alguna variabilidad que es dependiente de la formulación específica de los distintos cementos óseos²⁷.

En los grupos implantados con vidrios G0 y G5 de 4 semanas de evolución se visualiza el núcleo central de los defectos ocupado por el implante vítreo, rodeado por abundante osteoide. Al igual como ocurre con los cementos óseos, los vidrios de fosfato se encuentran extensamente invadidos por pequeños capilares sanguíneos provenientes del hueso periférico. A las 12 semanas se observa un importante incremento de la neoformación ósea, caracterizada por la presencia de un tejido óseo inmaduro de configuración haversiana que penetra, rodea y circunda numerosas áreas de los materiales vítreos. En todas las muestras analizadas es posible determinar la permanencia de restos de vidrios de fosfato sin reabsorber.

La formulación particulada de los vidrios de base fosfato genera la formación, en el ambiente fisiológico de implantación, de un conglomerado vítreo homogéneo que ofrece unas características estructurales muy particulares. La fijación bioactiva de los materiales vítreos al tejido óseo se establece gracias a la transformación de su superficie, lo que permite la constitución de una capa apatítica similar a la fracción mineral del hueso, la que va extendiéndose uniformemente hacia el interior del biomaterial. Lo anterior, puede explicar el patrón evolutivo que presentan los dos vidrios de base fosfato, caracterizado por la conformación de un tejido óseo de tipo haversiano, que sustituye en forma regular y progresiva a los biomateriales implantados. Posiblemente, la constitución de un tejido óseo de estas características sea más ventajosa para enfrentar los fenómenos de disolución y bioabsorción que experimentan los vidrios de fosfato en el sitio de implantación. Alternativamente, podría considerarse que se genera alguna dificultad para el desarrollo de un tejido óseo de tipo trabecular. Considerando la localización del defecto óseo experimental, es esperable la posterior remodelación trabecular del tejido óseo neoformado que ha sustituido a los materiales vítreos. Seguramente, los futuros estudios *in vivo* que valoren la formación ósea promovida por estos materiales, a más largo plazo, nos responderán esta inquietud.

En resumen, en todos los cortes histológicos estudiados de los cuatro biomateriales se encuentra tejido óseo neoformado inmaduro, que progresa en forma centrípeta desde la periferia de los defectos cavitarios. Es interesante constatar la precocidad de la invasión capilar, dado que las 4 semanas el área central de todos los biomateriales está vascularizada. El tejido óseo neoformado que sustituye al injerto autólogo es el que presenta la estructura más madura en los dos periodos estudiados, de tal manera que a las 12 semanas su remodelación trabecular se encuentra prácticamente concluida ^{25,27,69,287,288,305}.

5.9.3. RESULTADOS HISTOMORFOMÉTRICOS

El estudio histomorfométrico de las muestras permite conocer con detalle la regeneración ósea de los diferentes grupos y compararla con la obtenida con el autoinjerto óseo esponjoso fresco (grupo control). En los cuatro grupos implantados con los biomateriales cerámicos hemos podido constatar una progresiva neoformación ósea centrípeta, que es cuantitativamente superior en los subgrupos estabulados por 12 semanas.

En el periodo de estudio correspondiente a las 4 semanas se observa abundante osteoide en los dos tercios periféricos del defecto, que es indicativo que la mayor parte de la regeneración ósea se produce en esta primera fase, por lo que posteriormente el proceso continúa, pero a un ritmo evolutivo inferior. A las 12 semanas se verifican principalmente fenómenos de remodelación del hueso inmaduro que sustituye el defecto cavitario experimental ^{25,27,69,287,288,305}.

En este trabajo de tesis hemos realizado 6 mediciones y calculado 3 parámetros histomorfométricos, para todos los cuales las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk, tanto para los grupos de estudio de 4 como para los de 12 semanas, han sido estadísticamente significativas, cumpliéndose el supuesto de normalidad en todos los grupos.

5.9.3.1. ÁREA DE IMPLANTE

Corresponde a la superficie del defecto cavitario que ha sido realizado en la metáfisis distal del fémur derecho del animal de experimentación. El orificio labrado quirúrgicamente tiene un diámetro de 6 mm., por lo que el área teórica del defecto óseo debería medir 28.274 mm². Sin embargo, las áreas de implante determinadas para cada una de las 57 muestras óseas útiles empleadas para el estudio histomorfométrico no corresponden exactamente al valor esperado, hecho que tiene relación directa con la perpendicularidad del corte histológico realizado.

El área de implante es una de las mediciones de mayor importancia del estudio, debido a que entrega el valor de referencia para calcular todos los parámetros histomorfométricos. Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias para el área de implante entre los distintos grupos no encontramos diferencias estadísticamente

significativas. Por lo tanto, las diferencias encontradas entre las mediciones y parámetros histomorfométricos que se analizan a continuación tienen validez estadística ⁶⁹.

5.9.3.2. ÁREA TRABECULAR TOTAL

Esta medición se debe interpretar de una manera relativa, relacionándola con el área del implante creado. Vale consignar que esta medida también es influida por la dirección del corte histológico, ya que si éste presenta una ligera oblicuidad las trabéculas óseas pueden aparecer con un área mayor.

Cuando se realiza la implantación de biomateriales el área trabecular total cuantificada corresponde íntegramente a tejido óseo neoformado. En cambio, en el caso de los injertos óseos esta medición no permite diferenciar claramente entre el hueso neoformado y el tejido óseo implantado en el defecto. Por ello, para el grupo control se hace necesario interpretar el valor del área trabecular total analizando los parámetros de formación de osteoide.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias del área trabecular total a las 4 semanas, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

El establecimiento de contrastes mediante el método de Tukey HSD ha mostrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Vidrio G0 y los grupos Control, Cemento H y Cemento R ($P < 0.05$) y entre el grupo Vidrio G5 y el grupo Control ($P < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control y los grupos Cemento H y Cemento R.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias del área trabecular total a las 12 semanas, determinamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

Los resultados obtenidos para el área trabecular total de los dos cementos basados en fosfatos de calcio son comparables con los descritos para los mismos periodos de valoración por Torner en 2001, por lo que podemos afirmar que los cementos H y R generan una neoformación ósea equivalente a la del grupo control, tanto a las 4 como a las 12 semanas del estudio ²⁷.

En cambio, los vidrios de base fosfato muestran un área trabecular total significativamente menor a las 4 semanas. A las 12 semanas estos parámetros se equiparan a los obtenidos en los grupos control, cemento H y cemento R, sin diferencias significativas. Lo anterior, puede interpretarse como que la neoformación ósea promovida por los vidrios bioactivos se desarrolla y establece de manera más lenta durante las primeras 4 semanas, de tal forma que recién a las 12 semanas se obtiene una tasa global de neoformación ósea equivalente a la del grupo control. Esto parece estar representado por la determinación en el estudio histológico, de un tejido óseo neoformado más inmaduro y menos remodelado en los defectos óseos implantados con los dos vidrios de base fosfato.

En conclusión, la neoformación ósea generada por los cementos óseos y vidrios bioactivos basados en fosfatos de calcio transcurridas 12 semanas desde su implantación, es equivalente a la producida por el autoinjerto óseo esponjoso fresco en el animal de experimentación ^{25,27,287,288,305}.

5.9.3.3. PROFUNDIDAD DE CRECIMIENTO

Esta medición permite objetivar el crecimiento medio del hueso neoformado que progresa en forma centrípeta desde los bordes de los defectos óseos experimentales. Corresponde al valor promedio de 12 medidas realizadas, a la manera de una esfera de reloj, en puntos equidistantes del defecto implantado ^{28,128}.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias de la profundidad de crecimiento, tanto a las 4 como a las 12 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

La determinación del crecimiento centrípeta del hueso neoformado en todas las muestras, viene a confirmar las propiedades osteoconductoras que detentan los cuatro biomateriales implantados. Lo anterior, es corroborado por la presencia en los cortes histológicos de numerosos vasos capilares que surcan el centro de todos los implantes a las 4 semanas.

Los cementos óseos y vidrios bioactivos de fosfatos de calcio generan una profundidad de crecimiento similar a la promovida por el autoinjerto óseo esponjoso fresco, tanto a las 4 como a las 12 semanas, hecho que respalda su proposición como sustitutivos óseos ventajosos.

5.9.3.4. LONGITUD TOTAL DE OSTEOIDE

Esta medición pondera el hueso inmaduro neoformado que se encuentra en vías de transformarse en tejido óseo calcificado y es indicativa de la cantidad de reborde trabecular en que se produce formación ósea. Su determinación es de especial utilidad para valorar la regeneración ósea efectiva cuando se estudia la incorporación de los injertos óseos, dado que es difícil distinguir el hueso neoformado del tejido óseo implantado.

Al multiplicar la longitud total de osteoide por la amplitud media de osteoide se puede obtener un cálculo aproximado de la superficie de osteoide que se está formando, cuyo parámetro se denomina área de osteoide.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias de la longitud total de osteoide a las 4 semanas, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

El establecimiento de contrastes mediante el método de Tukey HSD ha mostrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Vidrio G0 y los grupos Control, Cemento H y Cemento R ($P < 0.05$) y entre el grupo Vidrio G5 y el grupo Control ($P < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control y los grupos Cemento H y Cemento R.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias de la longitud total de osteoide a las 12 semanas, encontramos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

Los vidrios de base fosfato muestran una longitud total de osteoide significativamente menor a las 4 semanas de evolución. En cambio, a las 12 semanas estos parámetros se equiparan a los obtenidos en los grupos control, cemento H y cemento R, sin diferencias significativas. Lo descrito, se encuentra en directa relación con los resultados obtenidos para el área trabecular total de los vidrios bioactivos de base fosfato en el primer periodo de estudio, confirmando que la neoformación ósea promovida por estos biomateriales es más lenta durante las primeras 4 semanas^{25,27}.

5.9.3.5. AMPLITUD MEDIA DE OSTEOIDE

La amplitud media de osteoide tiene la misma connotación que la longitud total de osteoide y corresponde al grosor promediado de los diferentes ribetes de osteoide presentes en el defecto óseo experimental. Esta medición debe interpretarse como un indicador indirecto de la actividad osteoblástica.

La amplitud media de osteoide puede indicar escasa formación o importante calcificación del osteoide. Estos dos supuestos son válidos siempre que no exista un defecto de calcificación, hecho que no debiera presentarse en nuestros animales de estudio.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias de la profundidad de crecimiento, tanto a las 4 como a las 12 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

Los ribetes de osteoide encontrados en los cortes histológicos de los cinco grupos de estudio tienen una amplitud media bastante regular, aunque difieren en su forma especialmente en los defectos implantados con biomateriales en que todo el hueso que observamos corresponde a tejido óseo neoformado ^{25,27}.

5.9.3.6. ÁREA DE BIOMATERIAL NO REABSORBIDO

Esta medición histomorfométrica es de gran importancia, ya que es un indicador de la velocidad de reabsorción de los biomateriales cerámicos. Corresponde al área que ocupan los restos de los cementos óseos y vidrios bioactivos implantados que permanecen sin ser degradados ^{28,128}.

Debido a que las propiedades de degradación y reabsorción son características propias de los biomateriales cerámicos, hemos comparado esta medición entre estos cuatro grupos de estudio.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias del área de biomaterial no reabsorbido a las 4 semanas, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos.

El establecimiento de contrastes mediante el método de Tukey HSD ha mostrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Cemento R y los grupos

Vidrio G0 y Vidrio G5 ($P < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Cemento H y el grupo Cemento R.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias del área de biomaterial no reabsorbido a las 12 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos estudiados.

Las diferencias encontradas en el área de biomaterial no reabsorbido revelan que a las cuatro semanas permanece sin degradar una mayor cantidad de material para los vidrios G0 y G5, respecto del cemento R.

El cemento R (cemento de fosfato monocálcico) ha sido especialmente formulado como un biomaterial cerámico de reabsorción rápida, sin embargo, su degradación *in vivo* no presenta diferencias estadísticamente significativas con el cemento H (cemento de fosfato α tricálcico), tanto a las 4 como a las 12 semanas del estudio.

En los ensayos *in vitro* el vidrio G0 (vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O) se muestra mucho más soluble que el vidrio G5 (vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2), no obstante, en el estudio *in vivo* no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tanto a las 4 como a las 12 semanas ^{19,354,376,379,391}.

El desarrollo de biomateriales para la sustitución ósea, busca que éstos actúen como soporte temporal del hueso, de tal manera que una vez implantados se deberían reabsorber de manera rápida y gradual para que las tensiones puedan ser transferidas de manera progresiva al tejido óseo neoformado. Lo anterior, requiere que exista una adecuada correlación entre las velocidades de reabsorción del material y la osteoformación.

La principal desventaja de las cerámicas de fosfatos de calcio convencionales, como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico, es su lenta velocidad de reabsorción. Considerando el área de biomaterial no reabsorbido, podemos señalar que los cuatro implantes cerámicos empleados en este estudio presentan una velocidad de reabsorción intermedia.

5.9.3.7. SUPERFICIE PORCENTUAL DE HUESO NEOFORMADO

Este parámetro se obtiene dividiendo el área trabecular total (A.T.T.) con el área de implante

(A.I.) y es uno de los que tiene mayor importancia, pues nos permite determinar el valor porcentual de la neoformación ósea. Con diferentes nombres es uno de los baremos más utilizados en los estudios experimentales *in vivo* que cuantifican la osteoformación generada por los sustitutivos óseos.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias de la superficie porcentual de hueso neoformado a las 4 semanas, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

El establecimiento de contrastes mediante el método de Tukey HSD ha mostrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Vidrio G0 y los grupos Control, Cemento H y Cemento R ($P < 0.05$) y entre el grupo Vidrio G5 y los grupos Control, Cemento H y Cemento R ($P < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control y los grupos Cemento H y Cemento R.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias de la superficie porcentual de hueso neoformado a las 12 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

En nuestro estudio, el grupo control es el que presenta una mayor tasa de regeneración ósea, seguido muy de cerca por los cementos H y R. Sin embargo, a las 12 semanas no se determinan diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos. En el grupo control las diferencias intragrupo observadas entre las 4 y 12 semanas no son estadísticamente significativas, lo que confirma el hecho que durante las primeras 4 semanas se desarrolla la neoformación ósea más activa.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis para la superficie porcentual de hueso neoformado en el grupo control, son de 30.17 ± 4.40 % a las 4 semanas y 36.15 ± 16.45 % a las 12 semanas, los que son comparables con los descritos por Katthagen en 1986 que señala un valor de 34.15 ± 6.10 % a las 4 semanas^{25,27,69,287,288,305}.

5.9.3.8. ÁREA DE OSTEOIDE

Este parámetro se obtiene multiplicando la longitud total de osteoide (L.T.O.) por la amplitud media de osteoide (A.M.O.), lo que permite determinar un valor aproximado del área de

osteoide que se ha formado durante los correspondientes periodos de estudio en el defecto cavitario.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias del área de osteoide a las 4 semanas, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

El establecimiento de contrastes mediante el método de Tukey HSD ha mostrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Vidrio G0 y los grupos Control, Cemento H y Cemento R ($P < 0.05$) y entre el grupo Vidrio G5 y los grupos Control, Cemento H y Cemento R ($P < 0.05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control y los grupos Cemento H y Cemento R.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias del área de osteoide a las 12 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

El desarrollo de los ribetes de osteoide se relaciona directamente con el área trabecular total encontrada para los distintos grupos de estudio, de ahí que al efectuar la comparación del área de osteoide a las cuatro semanas en los cinco grupos, se repitan las diferencias estadísticamente significativas que fueron determinadas al comparar el área trabecular total en ese mismo periodo ^{25,27}.

5.9.3.9. RELACIÓN ÁREA DE OSTEOIDE / ÁREA TRABECULAR TOTAL

Este parámetro relaciona el área de osteoide (Aos) y el área trabecular total (ATT), entregándonos un valor porcentual de la neoformación ósea generada.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) de comparación de medias de la relación área de osteoide / área trabecular total, tanto a las 4 como a las 12 semanas, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos.

Este parámetro nos confirma que el valor obtenido para el área de osteoide tiene una relación directa con el área trabecular total, por lo que en este caso tampoco se determinan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos periodos de análisis ^{25,27}.

5.9.4. CORRELACIÓN HISTOLÓGICA / HISTOMORFOMÉTRICA

Luego de discutir los resultados histomorfométricos de este estudio experimental, resulta claro que los cuatro biomateriales promueven una neoformación ósea, cuantitativamente, equivalente a la generada por el autoinjerto óseo esponjoso fresco, a las 12 semanas de evolución. Sin embargo, las características del tejido óseo regenerado en los defectos cavitarios experimentales son diferentes para los dos periodos estudiados y para los distintos implantes empleados.

El autoinjerto óseo esponjoso fresco promueve una neoformación ósea rápida, con el desarrollo de un tejido óseo de características muy similares al hueso receptor del injerto, de tal manera que a las 12 semanas la estructura del hueso regenerado se encuentra casi completamente remodelada. En cambio, el tejido de neoformación que sustituye a los biomateriales cerámicos presenta características variadas, dependiendo del material estudiado ^{25,27,69}.

Los cementos de fosfatos de calcio generan una neoformación ósea algo más lenta, con la constitución de un osteoide más grueso, cuya remodelación transcurre más tardíamente, de tal forma que a las 12 semanas se mantiene la presencia de un tejido óseo más inmaduro que el observado en el grupo control. Además, en este periodo de estudio persisten restos de los biomateriales que no han sido degradados, lo que revela una ligera discordancia entre las dos fases del proceso osteotransductivo ^{27,287,288,305}.

Los vidrios de base fosfato también participan de una neoformación ósea más retardada, que incluso es significativamente menor a las 4 semanas en comparación con los cementos y el autoinjerto óseo. La particularidad de la sustitución de estos biomateriales por un hueso de tipo haversiano, implica que la remodelación ósea completa se verificará temporalmente más diferida, respecto de los demás implantes ¹³⁴.

En resumen, la obtención de una remodelación ósea más rápida, similar a la promovida por el autoinjerto óseo esponjoso, es la finalidad perseguida en la osteosustitución con biomateriales. Esta pasa por conseguir una buena coordinación entre las dos fases del proceso osteotransductivo, en el caso de los cementos basados en fosfatos de calcio, y por la formulación de materiales vítreos con propiedades de bioabsorción concordantes con la evolutividad de las apatitas biológicas para el caso de los vidrios bioactivos.

5.9.5. CONSIDERACIONES FINALES

Cuando nos propusimos desarrollar este estudio experimental nos planteamos como hipótesis de trabajo demostrar que “La reparación de los defectos cavitarios del tejido óseo con cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio es comparable, cualitativa y cuantitativamente, con la que se obtiene con el autoinjerto óseo”.

Esta hipótesis fue respaldada por el objetivo general que nos formulamos, que era “Estudiar *in vivo* la regeneración del tejido óseo en defectos cavitarios experimentales con cuatro biomateriales cerámicos basados en fosfatos de calcio, dos cementos óseos y dos vidrios bioactivos, comparándolos con el autoinjerto óseo esponjoso fresco”.

Para conseguir este objetivo general y demostrar nuestra hipótesis de trabajo nos dispusimos a desarrollar este estudio experimental, prospectivo, comparativo y controlado, con la finalidad de respondernos los siete objetivos específicos que a continuación comentamos en sus consideraciones finales.

Los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio implantados en defectos cavitarios en el animal de experimentación se comportan como materiales bioactivos, biocompatibles y biodegradables, características que han podido ser evaluadas *in vivo* en este trabajo de tesis confirmando su actividad biológica.

Los cementos de fosfatos de calcio son biomateriales cerámicos formulados para constituir cuerpos sólidos luego de la mezcla de sus componentes básicos, hecho que permite rellenar los defectos óseos susceptibles de ser tratados con estos materiales, promoviendo una progresiva regeneración ósea que finalmente restituye la estructura tisular original. Desde su formulación en 1983 estos biomateriales han sido profusamente estudiados *in vivo* y desde 1996 se han reportado un número creciente de experiencias clínicas que los han empleado para favorecer la consolidación especialmente en fracturas de localización metafisaria. En nuestro trabajo experimental los estudios radiológico, histológico e histomorfométrico nos han permitido comprobar la utilidad de los cementos óseos basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos ^{214,330-336}.

Los vidrios de base fosfato poseen una composición química semejante a la fracción mineral del hueso, motivo que ha centrado más recientemente la atención en estos sólidos amorfos,

dado que sus propiedades bioactivas, solubilidad y bioabsorción, han permitido la formulación de materiales particulados que en los estudios *in vitro* han demostrado ser capaces de promover el desarrollo y proliferación de las células osteoformadoras. La ausencia de publicaciones que hayan empleado vidrios bioactivos de fosfato en el relleno de soluciones de continuidad óseas hace que este trabajo de tesis tenga un particular interés. Nuestros resultados experimentales han demostrado que los vidrios de base fosfato se comportan como sustitutivos óseos en el animal de experimentación.

Los cuatro biomateriales cerámicos empleados en este trabajo de tesis, correspondientes a cemento de fosfato α tricálcico (cemento H), cemento de fosfato monocálcico (cemento R), vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O (vidrio G0) y vidrio de fosfato del sistema P_2O_5 -CaO-Na₂O-TiO₂ (vidrio G5) fueron desarrollados y caracterizados en el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya. Los estudios imagenológicos realizados para obtener nuestros resultados nos han permitido constatar que los cuatro materiales analizados promueven una neoformación ósea progresiva y centrípeta, hecho que nos indica que cuando son implantados en los defectos óseos poseen capacidad de osteoconducción, aportando una estructura capaz de guiar la formación y aposición ósea^{196,201,248,354,379}.

El estudio comparativo de los cuatro biomateriales con el mejor sustitutivo óseo conocido, es decir, el autoinjerto óseo esponjoso fresco, nos ha confirmado las propiedades osteoconductoras de los materiales analizados y nos ha corroborado las propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas del injerto óseo autólogo^{25,69}.

El estudio histomorfométrico de la neoformación ósea promovida por los cuatro biomateriales cerámicos y el autoinjerto óseo esponjoso fresco, nos ha permitido determinar cuantitativamente que la osteoformación desarrollada en los defectos cavitarios experimentales es equivalente para los cinco grupos analizados a las 12 semanas de su implantación^{64,396}.

La evaluación de la tasa de reabsorción *in vivo* de los biomateriales aptos para la sustitución ósea, es una de las mediciones más importantes para continuar con el desarrollo y formulación de nuevos materiales para aplicaciones biomédicas. La investigación en el campo de los biomateriales busca elaborar implantes capaces de cumplir la función de andamios transitorios, de tal forma que luego de ser implantados se reabsorban progresivamente para

que las tensiones sean transferidas de manera gradual al tejido óseo neoformado. Lo anterior, necesita de un correcto equilibrio entre las velocidades de reabsorción del implante y de la neoformación ósea. En nuestro estudio los cuatro biomateriales empleados han presentado una tasa de reabsorción comparativamente equivalente a las 12 semanas de evolución^{28,128}.

Luego de revisar, contrastar y discutir cada uno de los objetivos específicos derivados del objetivo general que nos formulamos para desarrollar el presente estudio experimental, podemos comentar que a las cerámicas de fosfatos de calcio convencionales, que actualmente se emplean en la clínica, se les podrían sumar los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos sintéticos alternativos, ya sea para tratar defectos cavitarios que conservan su soporte estructural o que se encuentran estabilizados con dispositivos de osteosíntesis, para elaborar sistemas vehiculizadores de fármacos, para participar como fases biodegradables en el refuerzo y recubrimiento de prótesis y materiales de osteosíntesis y como armazones para la ingeniería de tejidos¹⁵⁻¹⁷.

Respecto de la aplicación clínica de estos biomateriales, las cerámicas de fosfatos de calcio formuladas como cementos óseos parecen cumplir los requisitos para su próximo empleo médico rutinario, debido a que sus variadas propiedades y su versatilidad se ajustan a muchos de los requerimientos específicos de la cirugía del aparato locomotor en lo relativo a la sustitución ósea. Los vidrios de base fosfato necesitarán de muchos más estudios experimentales para validar el potencial rol que podrían desempeñar como sustitutivos óseos, teniendo en consideración la ventaja que representa su similitud química con el hueso, hecho que permite esperar su eventual incorporación futura al arsenal biomédico disponible para la osteosustitución^{193,194}.

Parece poco probable obtener una mejoría sustantiva de las propiedades mecánicas de los biomateriales cerámicos, de ahí que los esfuerzos se están orientando al desarrollo y caracterización de materiales compuestos que incluyan factores osteoinductivos y/o células osteoformadoras, con el afán de obtener un sustitutivo óseo más parecido al hueso vivo, de tal manera que la regeneración ósea se establezca lo más rápidamente posible, para restituir las condiciones biomecánicas originales del segmento óseo comprometido¹⁵⁰.

Finalmente, a la luz de los resultados obtenidos en este estudio experimental consideramos que nuestra hipótesis de trabajo ha quedado demostrada.