

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA**



TESIS DOCTORAL

**REGENERACIÓN ÓSEA VERTICAL
A BASE DE CEMENTOS DE BRUSHITA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

M^a Elena Lucerón Díaz-Ropero

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Jesús Torres García-Denche

Juan Carlos Prados Frutos

Francisco Antonio García Gómez

Faleh Tamimi Mariño

Madrid, 2012

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

A mis padres, por darme la oportunidad que ellos nunca tuvieron.

A mis hermanos, por creer en cada locura que emprendo.

Y a mi marido, por todo el tiempo robado para este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las personas sin las cuales no habría sido capaz de llevar a cabo esta Tesis doctoral:

Al profesor Jesús Torres García Denche por la dirección de esta Tesis, por su guía en este camino y contribuir a mi empeño, y por su inagotable y paciente espera en la elaboración de este proyecto después de largas épocas de sequía en el mismo.

Al profesor Juan Carlos Prados Frutos por la dirección de esta Tesis, por su inestimable ayuda en la finalización de la misma con su inagotable capacidad de trabajo y su ejemplo de profesionalidad.

Al profesor Francisco Antonio García Gómez, por su confianza y apoyo, y por el estímulo necesario para llevar a cabo esta difícil tarea.

Al profesor Faleh Tamimi Mariño, que me introdujo en este proyecto, brindándome los recursos necesarios y que me apoyó y motivó para emprender esta Tesis, y por haberme proporcionado valiosa información para realizar mi trabajo.

Al departamento de Estomatología, por el soporte institucional brindado para la realización de este trabajo.

1. ÍNDICE

ÍNDICE

1 RESUMEN

2 HIPÓTESIS

3 OBJETIVOS

4 INTRODUCCIÓN

4.1- Hueso y tejido óseo

4.2- Estado actual de las investigaciones en cementos cálcicos

4.3- Materiales para regeneración ósea

4.4- Descripción de los cementos cálcicos

4.5- Descripción del material ideal para regeneración ósea

4.6- Descripción del cemento de brushita

4.7- Regeneración con granulado de cemento de brushita

5 JUSTIFICACIÓN

6 MATERIAL Y MÉTODO

6.1- Materiales de experimentación

6.1.1- Preparación de la fase sólida del cemento

6.1.1.1- Síntesis del fosfato tricálcico-beta

6.1.1.2- Síntesis del polvo de cemento usado

6.1.2- Preparación de la fase líquida del cemento

6.1.2.1- Soluciones de ácidos “carboxi”

6.1.2.2- Síntesis de geles y soluciones de sílice y C4S

6.1.3- Tratamiento de los cementos con fluidos supercríticos

6.1.4- Preparación de los cementos de brushita

6.2- Animales de experimentación

6.3- Instrumental

6.4- Método

6.4.1- Cirugía de colocación de injertos

6.4.2- Estudios in vitro e in vivo

6.4.3- Análisis mediante difracción de rayos X

6.4.4- Microscopía electrónica de barrido

6.5- Análisis estadístico

7 RESULTADOS

8 DISCUSIÓN

9 CONCLUSIONES

10 BIBLIOGRAFÍA

11 ANEXO

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

1. RESUMEN

1- RESUMEN

El tratamiento con implantes osteointegrados constituye una de las alternativas más idóneas para la sustitución de dientes perdidos^{39, 50}, desplazando cada vez más a la prótesis convencionales en todas sus posibilidades y sobre todo en su modalidad removible, cumpliendo en muchos casos las expectativas funcionales y estéticas de los pacientes. A pesar de la evolución de las técnicas quirúrgicas, la aparición de nuevas superficies de implantes y los avances en el campo de los biomateriales, hemos comprobado en la mayoría de las estadísticas actuales, un índice de fracasos entre un 5 y un 10% a los cinco años^{2,74}.

Una parte muy importante de la actuación terapéutica en los campos de la Traumatología, Ortopedia, Cirugía Oral e Implantología, se asienta sobre los principios biológicos de la regeneración ósea, en que están implicados células, matriz extracelular y señales osteoinductivas⁴.

Los procedimientos para aumentar hueso en sentido vertical son cada vez más necesarios el campo de la Implantología. La insuficiente disponibilidad ósea para la estabilización de los implantes, así como de cualquier tipo de prótesis convencional, es uno de los problemas más frecuentes en la práctica implantológica, prostética e implantoprostética.

El aumento del sustrato óseo mediante técnicas regenerativas, constituye una de las líneas de investigación más importantes en la actualidad, por lo que los procedimientos de regeneración ósea han aumentado de forma considerable para mantener o reconstruir las dimensiones óseas verticales y horizontales que permitan insertar los implantes dentales en una posición correcta⁵⁰.

Para este propósito se han desarrollado varias técnicas de regeneración ósea que incluyen el uso de injertos óseos de tipo autógeno (el hueso se injerta a partir de un hueso extraído del propio cuerpo del paciente), en secciones, partículas o bloques, los injertos tipo heterólogo,

aloinjertos o xenoinjertos (el nuevo hueso proviene de animales, cadáveres o donantes), injertos sintéticos (fundamentalmente compuestos de calcio y fosfato, materiales similares a los componentes de los huesos), como sustitutos óseos, biomateriales, membranas y factores de crecimiento, que suelen emplearse de forma aislada o combinada para incrementar la cantidad de hueso remanente de forma previa o simultáneamente a la colocación de los implantes osteointegrados^{22,75}.

Los injertos de tipo heterólogo pueden reducir el tiempo quirúrgico y la morbilidad que provocan los injertos autólogos, pero implican una serie de desventajas como el rechazo por parte de los pacientes, así como reacciones de tipo inmunológico⁴⁴. Los xenoinjertos han demostrado ser materiales seguros⁵¹, pero su variación en cuanto a su porosidad y propiedades físico-químicas constituyen una limitación importante en el campo de la ingeniería tisular.

De ahí que, tras numerosos problemas con los materiales óseos procedentes de hueso autólogo, aloinjertos (humanos) y xenoinjertos (animales), se busque un sustitutivo óseo 100% sintético⁵⁷.

La regeneración tisular es la respuesta que consigue la *restitutio ad integrum* del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original. En este sentido el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión⁶. La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular.

Desde los estudios de Trueta²⁴ se sabe de la importancia de los vasos sanguíneos en la osteogénesis.

Tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina, las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales, estas señales moleculares promueven la diferenciación

hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial. Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas.

En este proceso va a ser fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización.

La capacidad de conseguir la regeneración ósea es limitada, y es ahora, con un mayor conocimiento acerca de los factores de crecimiento, cuando empiezan a aparecer estudios esperanzadores en el campo de la regeneración ósea, basados en promover la diferenciación, la migración y la proliferación de las células involucradas en la misma³. Sin embargo, a pesar de los experimentos en los que se ha obtenido excelentes resultados en modelos animales, los procedimientos de aumento de hueso tienen una tasa de éxito relativamente baja, debido a las infecciones, la exposición del injerto en la cavidad oral o a la inestabilidad de los materiales^{76,77}, siendo el resultado una insuficiente ganancia de tejido¹.

Para evitar estos problemas, se han desarrollado técnicas quirúrgicas cada vez más avanzadas y diferentes protocolos profilácticos. Los antibióticos y la correcta esterilización local de la zona quirúrgica y el material se hacen esenciales para prevenir infecciones, sin embargo, estos procedimientos ven muy limitada su acción cuando los sustitutos de hueso se exponen a los agentes externos. Para limitar la exposición de un implante, los avances quirúrgicos van encaminados a conservar tejidos de protección blandos para dar una buena cobertura a los materiales de relleno¹.

La estabilidad de un injerto es esencial para conseguir regeneración ósea predecible. La estabilidad se consigue en ocasiones ayudándonos de membranas de colágeno, mallas de titanio, y otros tipos de aditamentos^{76,78}. Pero el uso de tales coadyuvantes añade complejidad, tiempo y coste al procedimiento quirúrgico, lo que puede causar un incremento de la posibilidad de exposición del implante¹. Su uso hace que estos procedimientos sean altamente sensibles a la técnica quirúrgica, observándose por este motivo un elevado número de complicaciones y fracasos^{2,4,7-8}, por lo tanto, hay una apremiante necesidad para desarrollar materiales alternativos y técnicas para ofrecer una intervención más sencilla y más rentable¹ sin perder eficacia.

El material ideal para los procedimientos de aumento de hueso no sólo debería ser osteoconductor, biocompatible y mecánicamente adecuado sin la necesidad de soporte adicional, sino que debería poder aplicarse usando procedimientos mínimamente invasivos y mantenerse estable con respecto a las superficies de hueso original sin exponerse a la cavidad oral, el riesgo de infección debe ser reducido y ser capaz de mantener una buena estabilidad mecánica¹. Así, el riesgo de exposición de un implante y su estabilidad mecánica, se vería claramente disminuido.

Los cementos de fosfato cálcico se han probado como materiales biocompatibles y osteoconductivos que podían inyectarse usando procedimientos mínimamente invasivos^{1,57}.

El fosfato beta tricálcico, es absorbido por las células, a la vez que se autoregenera en el hueso⁵⁸, compuesto de 100% de material sintético de composición pura y similar a la estructura mineral de los huesos, biocompatible y osteogénico, debido a que es un material sintético, se pueden evitar todos los problemas relacionados con la transmisión de patógenos y garantizar una total seguridad biológica⁵⁹, formando cristales de carbonato tras la implantación de cerámicas de fosfato de calcio⁶⁰.

En 1968, Kent y colaboradores⁷⁹⁻⁸⁰, desarrollaron una técnica de tunelización subperióstica en la que se hace una pequeña incisión sobre el reborde alveolar en la que el periostio era separado y se introducían bajo él partículas de hidroxiapatita que se inyectaban a través de una pequeña aguja con un diámetro interno de 0.5 cm⁸¹.

Esta técnica fue desarrollada inicialmente para incrementar el volumen del reborde alveolar y para estabilizar la mucosa remanente en desdentados totales⁸². A pesar del éxito en la aplicación de protodoncia removible, los estudios a finales de los ochenta, demostraron, que la inestabilidad de las partículas inyectadas de hidroxiapatita, causaba la formación de encapsulaciones fibrosas de las mismas. La técnica fue útil para la estabilización de prótesis removibles pero la cápsula fibrosa no permitía la formación de hueso⁸³⁻⁸⁴. Como los implantes dentales comenzaron a usarse también para retención de prótesis inicialmente removibles, se fue

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

perdiendo interés en la técnica de tunelización subperióstica debido a la pobre capacidad regenerativa del hueso y la técnica dejó de utilizarse¹.

AUTOR	CIRUGÍA		INJERTO			OBSERVACIONES HISTOLÓGICAS REGENERACIÓN	FINALIDAD DEL PROCEDIMIENTO
	Sitio	Manejo tisular	Material	Lugar	Estabilización		
Kennet et al.	MX MD	Elevador perióstico	Partículas H-A densas	Inyección	NR	NR	Estabilización Prótesis
Kennet et al.	MX MD	Elevador perióstico	Partículas H-A densas + Hueso autógeno	Inyección	NR	NR	Estabilización Prótesis
Kennet et al.	MX MD	Elevador perióstico	Gránulos HA + Hueso autógeno	Inyección	NR	NR	Estabilización Prótesis
Vanassche et al.	MX MD	Elevador perióstico	Hueso autógeno + HA	Inyección	NR	NR	Estabilización Prótesis
Melisch et al.	MD MX	Elevador perióstico	Colágeno + HA	Inyección	NR	NR	Estabilización Prótesis
Marshall	MD	Elevador Perióstico	PFC + HA	Injerto particulado	NR	Tejido fibroso	Estabilización Prótesis e implantoprótesis
William et al.	MX MD	Elevador Perióstico	HA	Inyección	Prótesis	NR	Estabilización Prótesis
Block and Degen	MX MD	Elevador Perióstico	DFDB	Inyección	NR	NR	Estabilización implantoprótesis
Block	MD	Elevador Perióstico	DFDB	Inyección	NR	NR	Estabilización implantoprótesis
Hasson	MX MD	Elevador Perióstico	HA Bovina	Inyección	Membrana colágeno	NR	Estabilización implantoprótesis
Smiler et al.	MX MD	Elevador Perióstico	Hueso autógeno + HA	Inyección colágeno	NR	45% Hueso neoformado	Estabilización implantoprótesis
Kfir et al.	MX	Elevadores	PRF	Empaquetamiento	Membrana	NR	Estabilización

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

	MD	Periósticos secuenciales			PLGA		implantoprótesis
Mazzocco	MD	Elevadores Periósticos	Hueso autógeno	Injerto en bloque	Tornillos titanio	NR	Estabilización implantoprótesis

Tabla1. Resumen estudios de aumento vertical hueso^{80-82,85,87,138,149,169-172}

El aumento de hueso por esta técnica no permite una vista directa del defecto subyacente; sin embargo, esta técnica permite que la invasión en los tejidos sea mínima. El procedimiento requiere paciencia y delicadeza quirúrgica para diseccionar y elevar el colgajo subperióstico para permitir la formación de un “bolsillo”. Aunque el material regenerativo se inserta fácilmente en el mismo, el aumento sin fijación fue muy controvertido⁸⁵⁻⁸⁶ por la posible desestabilización del injerto. Con la introducción de las nuevas membranas y de los materiales nuevos para aumento de hueso, varios artículos publicaron mejoras en la técnica descrita por Kent^{87,88}. La fijación de una membrana sobre la tunelización ha mostrado éxitos con el tiempo; sin embargo, la técnica es compleja y requiere un alto grado de destreza quirúrgica y un alto tiempo operatorio. Una revisión de la literatura revela que el estudio de las técnicas y materiales para conseguir aumento de hueso en sentido vertical con cirugías mínimamente invasivas han aumentado muy poco en las últimas tres décadas¹.

Para incrementar el hueso de la cresta alveolar para la colocación de implantes se examinó en un primer momento la respuesta de la superficie de hueso cortical a los cementos de brushita. Mirtchi y colaboradores desarrollaron estos cementos en 1989⁸⁹⁻⁹⁰. Inicialmente, este material se usaba bajo la forma de gránulos β -TCP presentados como bloques de cemento o como pastas inyectables⁹¹⁻⁹². Los cementos de brushita inyectados con menos del 30% de β -TCP raramente se usaban para los procedimientos de regeneración ósea. Pero estos cementos están emergiendo como biomateriales prometedores para tratamientos óseos gracias a su biocompatibilidad, reabsorción in vivo y aceptables propiedades mecánicas.

Estos cementos basados en brushita tienen la ventaja añadida de ser biodegradables *in vivo*¹. La mayoría de los estudios posteriores que se desarrollaron *in vivo* evaluaron composiciones

similares del cemento con altas concentraciones de β -TCP presentados como gránulos o polvo⁹³⁻⁹⁴. Las propiedades mecánicas y la facilidad de manejo de los cementos iniciales de brushita era muy pobre, pero fueron mejorados para reducir el exceso de β -TCP y usando, además, aditivos para aumentar el tiempo de manejo y reducir la porosidad⁹⁵, propiedades a mejorar con los primeros cementos. A la vez, se van intentando para hacerlos menos viscosos y así poder inyectarlos en procedimientos mínimamente invasivo, y varios estudios *in vivo* han investigado dicha posibilidad⁹⁶⁻⁹⁷. Además, la capacidad de regenerativa de los cementos de brushita ha sido tradicionalmente evaluada para defectos óseos^{90,94}.

Los cementos de brushita son un sistema de ácido base, y así pueden exponer a los tejidos a condiciones de pH muy bajas. Para evitar esto, se han usado bloques y macrogránulos⁹⁶⁻⁹⁷ o grandes excesos de β -TCP para minimizar la cantidad de ácido usado, tanto que la mayoría de estudios *in vivo* se centran en composiciones muy específicas de cementos de brushita que son fundamentalmente macrogránulos de β -TCP⁹⁸⁻⁹⁹. De hecho, esto es lo que se conoce del comportamiento *in vivo* de los cementos de brushita cuya matriz consiste predominantemente en fosfato dicálcico dihidratado, con muy pocos o nada de macrogránulos β -TCP reactivos.

Los cementos de brushita se preparan mezclando una fase líquida con otra sólida para formar una pasta manejable que fragua produciendo un material duro. El objetivo de nuestro trabajo es mejorar y desarrollar nuevos cementos de brushita cambiando la composición de la fase líquida, mientras que la fase sólida se mantiene siempre como una mezcla de fosfato tricálcico (α -TCP), monofosfato cálcico y piro fosfato cálcico. Finalmente, hemos realizado un estudio en un modelo experimental animal, para evaluar la capacidad que tienen los materiales sintetizados para regenerar hueso.

La esterilización de los cementos de brushita es necesaria para su aplicación clínica, pero solamente la técnica de irradiación gamma es capaz de esterilizarlos sin dañar sus propiedades. No obstante, esta técnica es costosa y necesita medidas de seguridad especiales para controlar las radiaciones nocivas. En este trabajo se ha evaluado una nueva técnica para esterilizar los cementos de brushita basada en los fluidos supercríticos para esterilizar los cementos óseo de

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

brushita y de metacrilato y será la que seguimos en el proceso de esterilización de dichos cementos para su uso en los animales de experimentación.

En este trabajo, se ha sintetizado y caracterizado un nuevo cemento que se compone de una mezcla de fosfato monocálcico y α -TCP que fragua con ácido glicólico. Una vez fraguado, el cemento tenía una fuerza de tensión diametral de $2,9 \pm 0,7$ MPa, su composición era de brushita y β -TCP, y la media de tamaño de los cristales de brushita era de $ca 2,6 \pm 1,4$ μ m. Con el cemento ya fraguado se fabricaron gránulos con un tamaño entre 200 y 1000 μ m que fueron aplicados en defectos óseos en la calota de un grupo de conejos para evaluar *in vivo* la capacidad de regeneración ósea de este material²⁵.

En el presente estudio *in vivo*, se evalúa una novedosa técnica utilizando biomateriales fluidos para obtener un aumento vertical de hueso en conejos inyectando una pasta de cemento de brushita en un túnel subperióstico en contacto directo con la cortical ósea. Se prepararon dos cementos de brushita con diferentes concentraciones de fosfato dicálcico y se implantaron *in vivo* para investigar el efecto del cemento en el éxito o fracaso del aumento de hueso. Estudiando los mecanismos del desarrollo de los iones hidrógeno de ambos cementos, intentaremos explicar las diferencias biológicas observadas⁷³. Cuatro semanas después de su implantación el material produjo un notable aumento de volumen óseo, aparte de mejorar la densidad mineral ósea y además se pudieron observar signos de reabsorción en el granulado. Los resultados demuestran que este nuevo biomaterial puede ser considerado para el uso clínico en regeneración ósea como una alternativa a otros materiales no reabsorbibles.

2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1- Hipótesis de trabajo

2.2- Objetivos

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las técnicas de regeneración ósea constituyen un procedimiento quirúrgico válido para aumentar la cantidad y la calidad de hueso en áreas con insuficiente volumen óseo, previniendo, entre otras posibilidades la desestabilización de los implantes osteointegrados. Los biomateriales para la estimulación de la regeneración ósea, deberían combinar propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras. Además, deberían ser reabsorbidos gradualmente y reemplazados por hueso nuevo.

La brushita se alza como material que cumple estas características, en la sustitución por hueso neoformado.

Se parte de la hipótesis: A mayor cantidad de TCP contenida en los gránulos de brushita, mayor capacidad osteogénica, osteoinductiva y osteoconductoras del material, así como mayor capacidad de degradación progresiva y sustitución por nuevo hueso; por tanto, hay mayor aumento vertical de hueso neoformado en los animales tratados con cemento de brushita con mayor concentración de TCP.

3. OBJETIVOS

Para verificar esta hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar la liberación de protones de diferentes fórmulas de cementos de brushita.
- 2) Aplicar y evaluar dos fórmulas de cementos de brushita en un procedimiento de aumento de hueso mínimamente invasivo.
- 3) Evaluar el efecto *in vivo* del nuevo biomaterial con técnicas de densitometría de rayos X, microscopía óptica e histomorfometría.

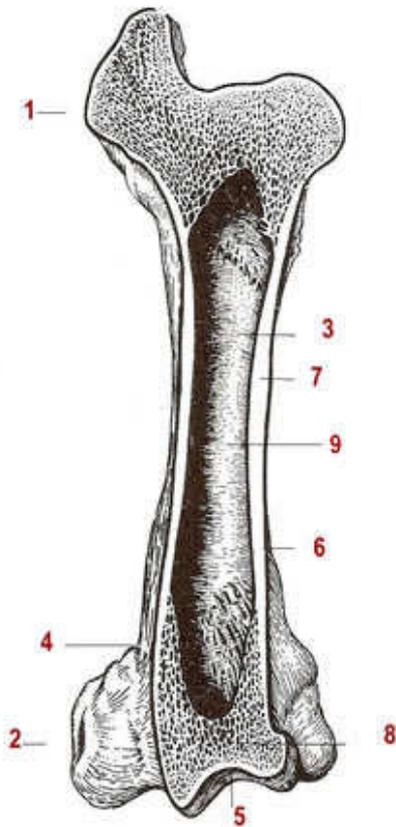
4. INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

- 4.1- Hueso y tejido óseo**
- 4.2- Estado actual de las investigaciones en cementos cálcicos**
- 4.3- Materiales para la regeneración ósea**
- 4.4- Descripción de los cementos cálcicos**
- 4.5- Descripción del material ideal para la regeneración ósea**
- 4.6- Descripción del cemento de brushita**
- 4.7- Regeneración con cemento de brushita con aditivos**
- 4.8- Regeneración con granulado de cemento de brushita**

4. INTRODUCCIÓN

4.1. EL HUESO



- 1- Epífisis proximal
- 2- Epífisis distal
- 3- Cavidad medular
- 5- Superficie articular
- 6- Endostio
- 7- Hueso trabecular o esponjoso
- 8- Canal medular

El tejido óseo es uno de los más resistentes y rígidos del cuerpo humano. Es el constituyente principal del esqueleto, junto con el tejido cartilaginoso⁵², sirve de soporte a las partes blandas y protege órganos vitales, como los contenidos en el cráneo, tórax y columna vertebral. Aloja y protege la médula ósea, generadora de células sanguíneas. Proporciona y apoya a los músculos

esqueléticos, transformando sus contracciones en movimientos útiles, constituyendo un sistema de palancas que amplía las fuerzas generadas en la contracción muscular, sin olvidar su importante función metabólica como reserva de calcio y fósforo^{2,39}.

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conjuntivo formado por células y material intercelular calcificado (matriz ósea).

Las funciones básicas de los huesos y del esqueleto son:

- **Soporte:** los huesos proveen un cuadro rígido de soporte para los músculos y tejidos blandos.
- **Protección:** los huesos protegen cavidades corporales de posibles traumatismos. Por ejemplo, el cráneo protege el cerebro frente a los golpes, y la caja torácica, formada por costillas y esternón protege los pulmones y el corazón.
- **Movimiento:** gracias a los músculos que se insertan en los huesos a través de los tendones y su contracción sincronizada, se produce el movimiento, transforma las contracciones de los músculos en movimientos útiles que amplían las fuerzas generadas en la contracción muscular.³⁹
- **Homeostasis mineral:** el tejido óseo almacena una serie de iones y de minerales, especialmente calcio y fósforo, además de otros iones, necesarios para la contracción muscular y otras funciones, cuando son necesarios, el hueso libera de forma controlada dichos minerales a la sangre que los distribuye a otras partes del organismo para mantener constantes las concentraciones en los líquidos orgánicos (líquido intersticial, sangre y linfa)⁵³.
- **Producción de células sanguíneas:** dentro de cavidades situadas en ciertos huesos, el tejido conectivo denominado **médula ósea roja** produce los hematíes, mediante el proceso denominado **hematopoyesis**.

- **Almacén de grasas de reserva: la médula amarilla** consiste principalmente en **adipocitos** con unos pocos hematíes dispersos. Es una importante reserva de energía química.

El tejido óseo presenta propiedades físicas como alta resistencia a la tracción y compresión, cierta elasticidad, flexibilidad y bajo peso, asegurando máxima resistencia con la mayor economía y peso mínimo.

Otra de las características del tejido óseo es su anisotropía y la presencia de agua, en torno al 3% en sujetos adultos sanos, que disminuye de forma progresiva con la edad, , lo cual se traduce en que el hueso en edades avanzadas es más rígido, por lo tanto, más frágil y quebradizo¹⁶⁶, posee una gran respuesta a estímulos mecánicos, metabólicos, nutritivos y endocrinos, es un tejido dinámico en renovación constante durante toda la vida del individuo⁵⁴.

4.1.1 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una variedad de tejido conjuntivo que se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión.

El tejido óseo posee zonas de variable densidad que se diferencian macro y microscópicamente en áreas de hueso compacto y áreas de hueso esponjoso, sin límites netos que las separen. El hueso compacto representa el 80% del volumen total del hueso y constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos, así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo.

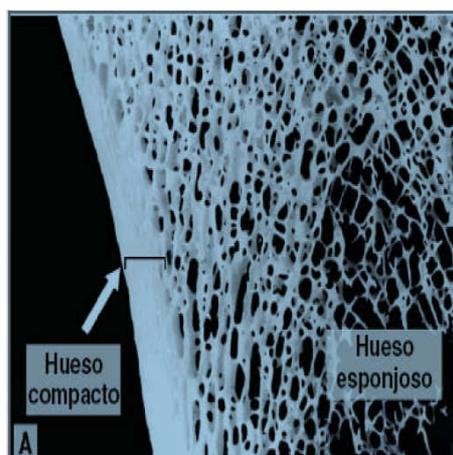


Fig. 1. Figura extraída de “Histología Básica” de Junqueira⁵⁵

En el hueso compacto, la matriz ósea forma láminas concéntricas alrededor de canales longitudinales llamados conductos de Havers. Los canales de Volkmann comunican los canales de Havers entre sí y con la superficie interna y externa del hueso. A través de ambos canales se extienden los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios del hueso. Los osteocitos se disponen en pequeños espacios en las láminas denominadas “lagunas”, y poseen prolongaciones para intercambiar nutrientes con el líquido intersticial y cada laguna dispone de una serie de canalículos que se conectan entre sí y a los conductos de Havers, por donde se extienden las

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

prolongaciones de los osteocitos (“calcóforos”). El sistema de Havers, u osteona, la forman un conducto de Havers, las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos. Las restantes láminas entre osteonas se llaman “láminas intersticiales”^{36,53}.

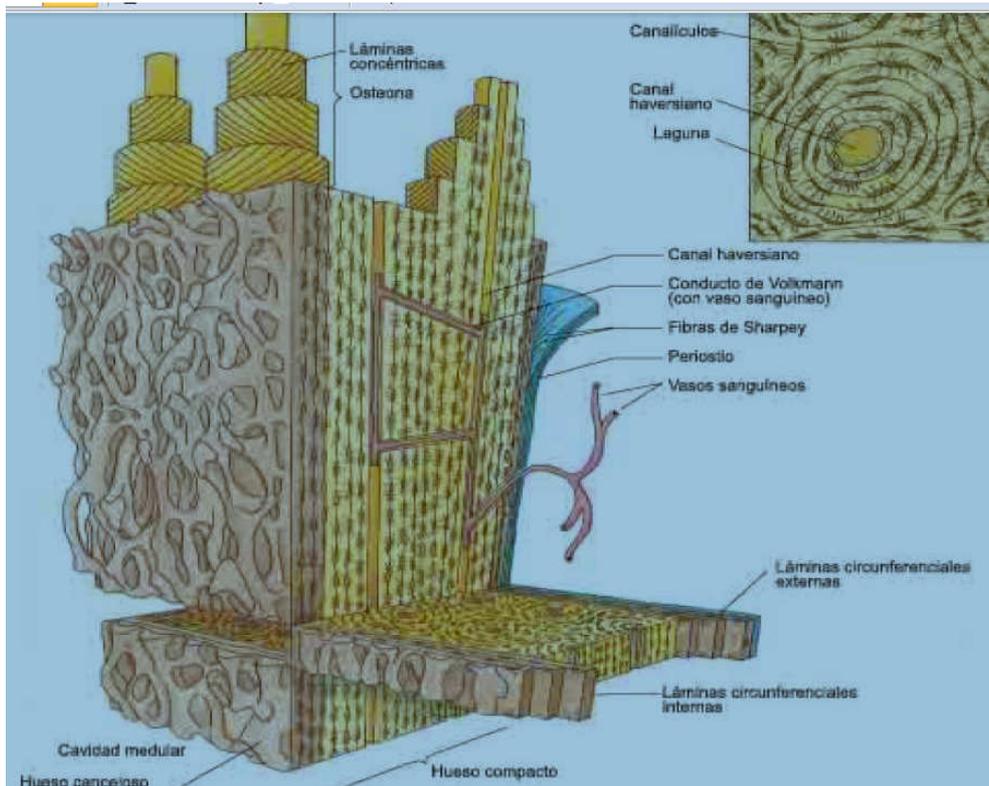


Fig.2. Figura extraída de Atlas y textos de Histología de Gartner⁵⁶

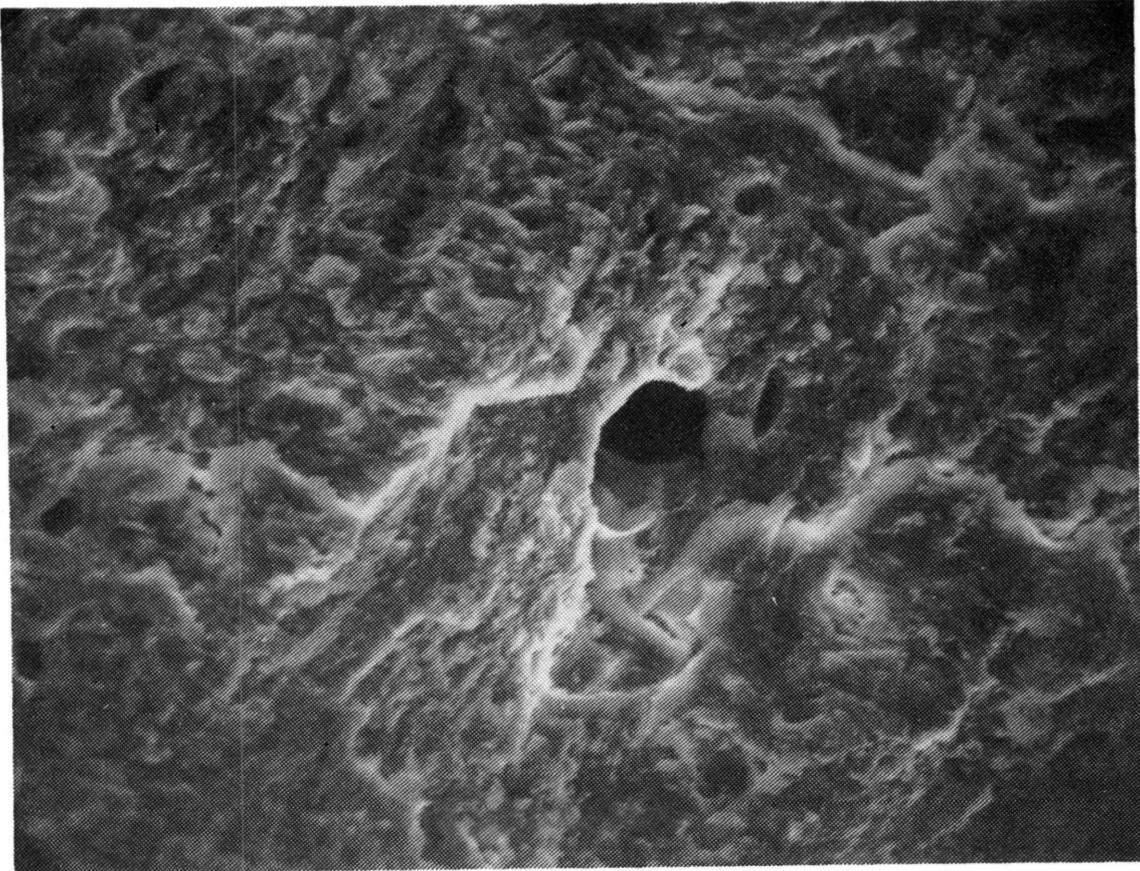


Fig. 3. Microscopía electrónica de barrido en corte transversal de sección de hueso.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Está formado por la matriz ósea, que es un material intercelular calcificado (Fig.4) y por células.

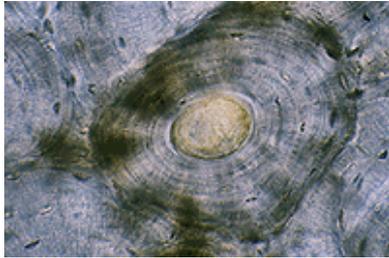


Figura 4

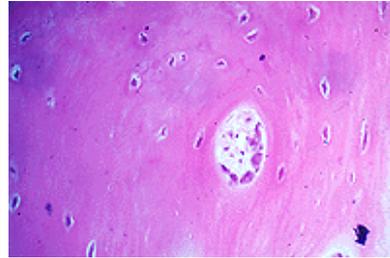


Figura 5

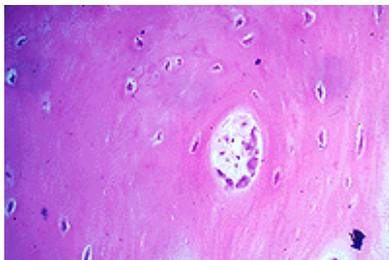


Figura 6

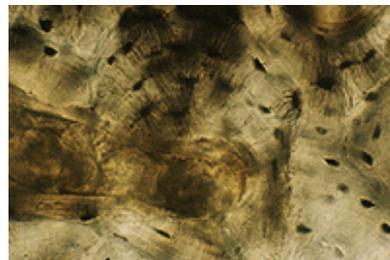


Figura 7

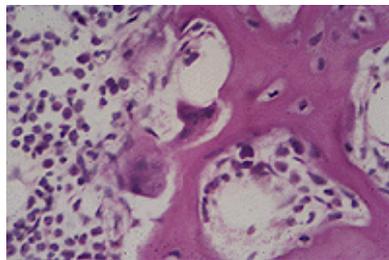


Figura 8

LA MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA

El hueso es un tejido heterogéneo, altamente anisótropo de tal manera que la matriz intercelular muestra una estructura y unas propiedades diferentes en los diferentes tipos de hueso.

a. Constituyentes orgánicos (matriz orgánica u osteoide)

Corresponde al 50% del peso seco del hueso (Fig.9), más del 90% de ella corresponde a fibrillas de colágeno I, organizadas en laminillas de unos 5 μm de grosor (Fig. 10).

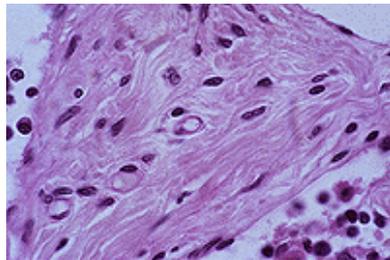


Figura 9

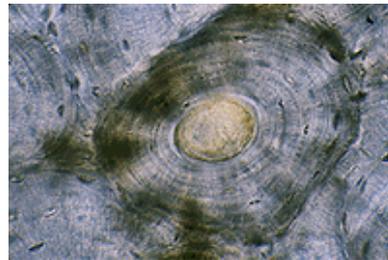


Figura 10

El principal componente de la matriz ósea es el colágeno de tipo I que supone entre el 90 y 95% de la matriz orgánica. Las fibrillas de colágeno son similares a las que se presentan en otros tejidos y están distribuidas aleatoriamente formando un entramado.

El siguiente producto en importancia es la osteonectina, una fosfoproteína que puede interaccionar tanto con el colágeno como con las sales inorgánicas, es una proteína altamente reactiva que se localiza preferentemente en las áreas de mayor grado de calcificación, la osteonectina (también llamada SPRC o BM-40 (Secreted Protein Cystein Rich) está codificada por el gen 5q31.3-q32, su expresión descontrolada está asociada a diversos tipos de cáncer.

La osteocalcina (también llamada Proteína Gla) se caracteriza por la presencia de tres residuos de ácido g-carboxiglutámico⁴⁻⁵.

Otras proteínas, no colagenosas, son la osteopontina (también llamada sialoproteína I) que se une a la hidroxiapatita y es producida por los ostoblastos estimulados por la 1- α -1,25-dihidroxitamina D, las proteínas óseas morfogénicas (BMPs) que juegan un papel similar al de los factores de crecimiento y los proteoglicanos ácidos que se encuentran en concentraciones mayores en el área osteide en comparación con la matriz calcificada⁷.

En cada laminilla ósea, las fibrillas colágenas están paralelas entre sí, pero las laminillas sucesivas alternan ordenadamente la orientación de sus fibrillas en ángulos rectos.. Esta disposición alternada de las fibrillas colágenas en laminillas sucesivas destaca particularmente al observar cortes de hueso con microscopía de luz polarizada (Fig. 11).

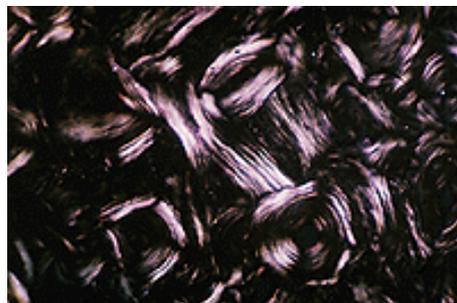


Figura 11

El resto de los componentes orgánicos son principalmente glicoproteínas como la osteonectina, proteínas ricas en ácido g-carboxiglutámico como la osteocalcina, y proteoglicanos de condroitín y queratán-sulfato, son moléculas ricas en grupos ácidos con gran tendencia a asociarse entre sí, capaces de unirse a calcio y que juegan un rol importante en el proceso de mineralización de la matriz ósea.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

PROTEÍNAS DE LA MATRIZ OSTEOIDE⁴

<i>COLÁGENO</i>	<i>TIPO I</i> <i>TIPO III</i> <i>TIPO V</i> <i>TIPO XII</i>
<i>PROTEOGLICANOS</i>	<i>CONDROETIN SULFATO</i> <i>DECORINA</i> <i>BIGLICANO</i> <i>HIALURONANO</i>
<i>PROTEÍNAS CON ÁCIDO CARBOXIGLUTÁMICO</i>	<i>OSTEOCALCINA</i> <i>PROTEÍNA DE LA MATRIZ CON ÁCIDO CARBOXIGLUTÁMICO</i>
<i>GLICOPROTEINAS</i>	<i>OSTEONECTINA</i> <i>FOSFATASA ALCALINA</i> <i>PROTEINAS CON RGD:</i> <ul style="list-style-type: none"> - <i>FIBRONECTINA</i> - <i>TROMBOSPONDINA</i> - <i>OSTEOPONTINA</i> - <i>VITRONECTINA</i> - <i>SIALOPROTEÍNAS ÓSEAS</i>
<i>PROTEÍNAS DEL PLASMA</i>	<i>ALBÚMINA</i> <i>2 SH GLICOPROTEÍNA</i>
<i>FACTORES DE CRECIMIENTO</i>	<i>IGF-I</i> <i>IGF-II (INSULIN GROWTH FACTOR)</i> <i>TGF (TRNASFORMING GROWTH FACTOR BETA)</i> <i>PDGF (PLATELET DERIVED GROWTH</i>

	<i>FACTOR)</i>
--	----------------

Tabla 2. Proteínas de la matriz osteoide

b. Constituyentes inorgánicos:

La matriz ósea contiene abundantes sales minerales en forma cristalizada, en particular la hidroxiapatita o fosfato tricálcico $[Ca_3(PO_4)_2(OH)_2]$, carbonato cálcico y fosfato octacálcico. En cantidades pequeñas se encuentran los sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio, todas estas sales se encuentran depositadas en una redícula formada por las fibras de colágeno.

El proceso por el cual estas sales se depositan y cristalizan en la redícula se denomina calcificación. Aunque la dureza del hueso se debe a sus componentes minerales, sin la existencia de la redícula de colágeno, el hueso sería frágil.

Las fibras de colágeno y otras proteínas presentes en la matriz aportan flexibilidad, resistencia a la tensión, si faltan las fibras de colágeno o están son defectuosas se producen enfermedades como la osteogénesis imperfecta, también conocida como huesos de cristal; por el contrario, si se eliminan las sales minerales del hueso por disolución en un ácido débil como la fórmula del vinagre, resulta una estructura flexible, esponjosa y gomosa, son las sales minerales inorgánicas depositadas en el tejido osteoide, que confieren al tejido su rigidez y dureza y actúan como una reserva de sales minerales, sensibles a estímulos endocrinos.

Las más abundantes son fosfato de calcio amorfo y cristales de hidróxidos de calcio y de fosfato llamados hidroxiapatita $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, que son cristales aplanados (30nm por 3 nm) y se adosan a lo largo de las fibrillas colágenas, a intervalos de unos 67 nm.

La superficie del cristal está hidratada y existe una vaina de agua e iones rodeándolo, lo que facilita el intercambio de iones entre el cristal y el líquido intersticial.

El hueso no es completamente macizo, sino que muestra muchos espacios entre sus componentes duros, por estos espacios discurren los vasos sanguíneos que nutren las células óseas y reducen el peso del hueso, según el tamaño y naturaleza de estos espacios, los huesos se denominan compactos o esponjosos^{4,7}.

c. Sustancia amorfa (matriz amorfa o sustancia fundamental)

Es un gel semilíquido muy hidratado en el que se encuentran embebidas las células y las fibras, de forma que permite la movilidad de las células y la difusión de sustancias. Formada, principalmente por glucosaminoglicanos, polímeros largos de disacáridos repetidos, que pueden ser no sulfatado (ácido hialurónico) o sulfatados (heparina)⁵⁶.

Aparecen asociados a proteínas, formando proteoglicanos, centros protéicos a los cuales se enlazan de manera covalente varios glucosaminoglicanos y glucoproteínas de adherencia, moléculas grandes que se encargan de asegurar los diversos componen consistente en fibras microscópicas en forma de hilos, las fibras están dispersas en una matriz, un gel ligero compuesto de polisacáridos, secretada por las células que unen los componentes de la matriz extracelular entre sí y a integrinas y proteoglicanos de la membrana celular.

El fibroblasto sintetiza colágeno y glucosaminoglicanos de la sustancia amorfa.

La función principal es la difusión de nutrientes y dar consistencia al tejido ya que retiene el agua.

CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO

Al considerar las células del tejido óseo es necesario diferenciar los elementos que pertenecen estrictamente a dicho tejido de aquellos que pertenecen a la médula ósea, los progenitores de los osteoclastos son células hematopoyéticas también consideradas como células óseas, por consiguiente, se consideran como células óseas las células progenitoras, los osteoblastos, los osteocitos, las células tapizantes del hueso o de revestimiento óseo (denominadas por los anglosajones "bone lining cells") y los osteoclastos, aunque los tres primeros se consideran como tipos celulares distintos, hay pruebas convincentes de que uno puede transformarse en otro y es más razonable considerarlos como estadios funcionales diversos de un mismo tipo celular. También pueden distinguirse monocitos, linfocitos, macrófagos, adipocitos y células endoteliales⁶.

Células óseas⁴

ESTROMA MEDULAR	TEJIDO ÓSEO
Stem Cells hematopoyéticas	Osteoblastos
Stem cells mesenquimales	Pre-osteoblastos
Adipocitos	Osteocitos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos
Células endoteliales	Células linfoides

Tabla 3. Células óseas

a. Células osteoprogenitoras

Son unas células no especializadas, derivadas del mesénquima que pueden experimentar mitosis y transformarse en osteoblastos, estas células se encuentran en la capa interna del periostio, en el endostio y en los canales perforantes y de Havers, ocasionalmente y bajo la influencia de

factores de crecimiento como el TGF β (factor de crecimiento transformante β) algunas células hematopoyéticas de la médula ósea pueden diferenciarse a células osteoprogenitoras.

Se sabe desde los trabajos de Friedestein⁷ en 1976, y Owen⁵ en 1988, que de las células mesenquimales embrionarias pueden originarse cinco estirpes celulares diferentes: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipoblastos y mioblastos⁴, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes, se encuentran en el periostio, endostio y canales del hueso que contienen los vasos sanguíneos son células alargadas con citoplasma poco prominente, que proceden de las células mesenquimáticas primitivas y forman una población de células troncales capaces de dividirse.

Son células no especializadas derivadas del mesénquima, el tejido del que derivan todos los tejidos conjuntivos. Se encuentran células osteoprogenitoras en la capa interna del **periostio**, en el **endostio** y en los canales del hueso que contienen los vasos sanguíneos, a partir de ellas se generan los **osteoblastos** y los **osteocitos** para dar origen a células que se diferencian para dar lugar a osteoblastos.

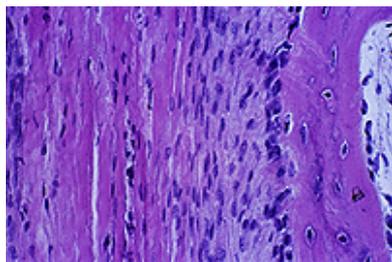


Fig. 13. Osteoblastos

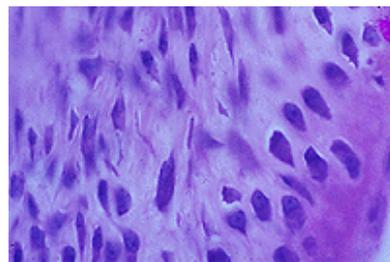


Fig. 14. Osteoblastos

b. Osteoblastos

Los osteoblastos son células diferenciadas que sintetizan el colágeno y la sustancia fundamental ósea, son células procedentes de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares⁶, su vida media es de 1 a 10 semanas⁴

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μ m)⁴, poliédricas con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas que son rodeadas por el osteoide producido y que se asocian mediante uniones de comunicación (nexos o gap junction) con prolongaciones similares de los osteoblastos vecinos (Fig. 3).

La diferenciación osteoblástica viene determinada por la *genética y los factores de crecimiento*, así como por los *marcadores de diferenciación*⁴.

- a. Genética y marcadores de crecimiento: La diferenciación hacia la especie osteoblástica está controlada por genes de la familia Hedgehog, por el factor de transcripción Cbfa 1, y por proteínas morfogenéticas óseas⁸.
- b. Marcadores de diferenciación: A medida que las células precursoras se van diferenciando, expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadoras como el factor CBfa 1, colágeno I, osteopontina, fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea y la osteocalcina⁸.

Son las células que sintetizan la parte orgánica (colágeno y glucoproteínas) de la matriz ósea a un ritmo de 2-3 μ m por día y participan en la mineralización de la misma, al expresar una enzima característica, la fosfatasa alcalina, que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μ m por día⁴.

Se disponen siempre en la superficie ósea, lado a lado, en una disposición que recuerda al epitelio simple. Los osteoblastos tienen dos destinos posibles: ser rodeados por la matriz ósea que

producen y pasan a ser osteocitos o permanecer en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo, se ubican siempre en la superficie del tejido óseo ya que este sólo puede crecer por aposición, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo⁴.

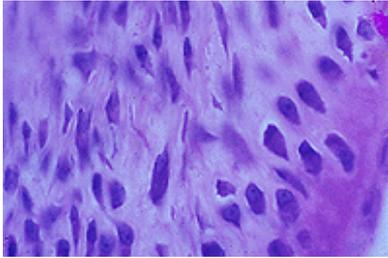


Fig. 14. Osteocitos

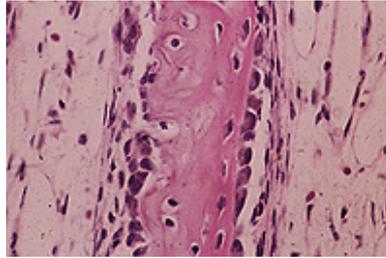


Fig. 15. Osteocitos

Son células que forman el tejido óseo pero que han perdido la capacidad de dividirse por mitosis, secretan colágeno y otros materiales utilizados para la construcción del hueso y se encuentran en las superficies óseas y a medida que segregan los materiales de la matriz ósea, esta los va envolviendo, convirtiéndolos en **osteocitos**.

Cuando están en plena actividad (Fig. 1) su forma es cuboidea con un citoplasma basófilo, que refleja su ergastoplasma muy desarrollado, tienen además un prominente aparato de Golgi, y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante⁴, son células polarizadas que vacían sus productos de secreción por la zona del citoplasma en contacto con la matriz ósea ya formada, (matriz intercelular preósea o osteoide) (Fig. 2).

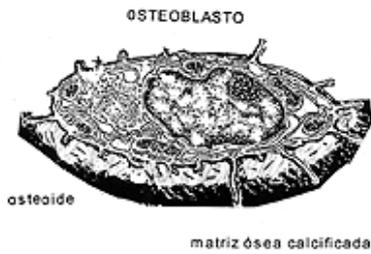


Fig. 16. Osteoblasto

Forman una capa en las superficies de los huesos en crecimiento, o como en el caso de la osificación intramembranosa, rodean áreas de osificación, parte de su membrana se encuentra en contacto con el borde osteoide, llamándose así el área donde está teniendo lugar la calcificación, como otras células que fabrican activamente

proteínas, los osteoblastos tienen abundante retículo endoplásmico rugoso y un área de Golgi muy desarrollada, se reconocen fácilmente vesículas de pinocitosis cerca de la membrana responsables de la secreción del colágeno.

El principal producto de los osteoblastos maduros es el colágeno de tipo I que constituye el 90% de las proteínas del hueso, además, producen otras proteínas como la osteocalcina y las proteínas Gla matriciales, y glicoproteínas fosforiladas incluyendo las sialoproteínas I y II, la osteopontina y la osteonectina, las principales proteínas con actividad enzimática producidas por los osteoblastos son la fosfatasa alcalina y la colagenasa, que son las encargadas de sintetizar y secretar la parte orgánica de la matriz ósea durante su formación .

Los osteoblastos son las células responsables de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y de su posterior mineralización, además liberan algunos factores que son probablemente mediadores de la resorción ósea.

Los osteoblastos participan también en el proceso de mineralización de la matriz orgánica ya que producen vesículas de matriz, de unos 100nm de diámetro, rodeadas de membrana celular, que acumulan Ca^{++} y PO_4^- y son ricas además en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas que capaces de generar iones PO_4^- , elevando su concentración en el medio extracelular y creando centros de nucleación para el depósito de las sales minerales.

Los osteoblastos:

- Sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso.
- Dirigen la posición de las fibrillas de la matriz extracelular.
- Contribuyen a la mineralización de la matriz osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina.
- Median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de citoquinas específicas⁹, como la osteoprotegerina (OPG).
- Sintetizan factores de crecimiento⁴.

c. Osteocitos

Son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos), y tienen forma estrellada y los procesos citoplasmáticos se hallan comunicados entre sí a través de los *conductos calcóforos*⁴, son las células propias del tejido óseo formado, su citoplasma presenta ergastoplasma, aparato de Golgi y puede presentar lisosomas.

Son células óseas maduras derivadas de los **osteoblastos** que constituyen la mayor parte del tejido óseo, al igual que los osteoblastos han perdido la capacidad de dividirse.

Los osteocitos no segregan materiales de la matriz ósea y su función es la mantener las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho. Así, controlan el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado *mecanotransducción*¹¹.

Un cierto número de osteoblastos quedan atrapados en las lagunas de la matriz, una vez mineralizada, pasando a ser osteocitos . Los osteocitos están interconectados por un sistema de canalículos aunque ya no excretan materiales de la matriz, los osteocitos pasan por varias fases de maduración hasta que quedan completamente rodeados por la matriz y se mantienen en un estado de aparente reposo.

La fase formativa es la que tiene lugar cuando todavía mantienen una actividad osteoblástica quedando atrapados en un tejido parcialmente osteoide. La fase de reabsorción corresponde a un período de la vida del osteocito en la que es capaz de resorber la matriz ósea del borde de su laguna (fase osteolítica) y, finalmente, en la fase degenerativa caracterizada por la picnosis y la fragmentación del núcleo, los osteocitos mueren. Se desconocen las causas de la degeneración de los osteocitos, pero mediante la determinación de fosfatidilserina (marcador de apoptosis) en cultivos de osteocitos, se ha observado que el flujo de fluido canalicular fisiológico ($0,6 \pm 0,3$ Pa a una frecuencia de 5 Hz) inhibe la apoptosis de los mismos, mientras que el estancamiento del fluido la favorece.

El proceso de apoptosis parece mediado por Bcl-2 (proteína antiapoptótica) que se ve aumentada cuando se aplica un estrés de cizallamiento sobre los osteocitos, se ha observado que este fenómeno no afecta a los osteoblastos de superficie (lining cells), siendo específico de los osteocitos, esto confirma la hipótesis que el estrés del fluido interviene sobre el sistema canalicular pero no en las superficies del mismo⁷².

Martin⁸⁶ estableció la hipótesis que los osteocitos, como mecanosensores, mantendrían continuamente una señal inhibitoria (de naturaleza molecular desconocida) con las células de revestimiento para que no se inicie la remodelación. Parece que las cargas normales mantendrían esa señal inhibitoria, y al tener un desuso importante desaparecería esa señal favoreciendo la remodelación, por otro lado en casos de sobrecarga moderada existirían microfracturas que podrían inducir la apoptosis de los osteocitos⁸⁶.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Son capaces de sintetizar y de reabsorber, en forma limitada, a componentes de la matriz ósea ("osteolisis osteocítica"), procesos que tienen importancia en la regulación de la calcemia, cada uno, bañado por una delgada capa de líquido tisular, ocupa su laguna (Fig 17) y proyecta sus prolongaciones citoplasmáticas por los canalículos (Fig. 18), dentro de los cuales, toma contacto con prolongaciones de osteocitos vecinos mediante uniones de comunicación (Fig. 19), o con células de revestimiento óseo bañadas por el líquido tisular del tejido conjuntivo que rodea a los capilares sanguíneos (Fig 20).

Son los responsables de mantener la matriz ósea, que se ubican en cavidades o lagunas rodeadas por el material intercelular calcificado, su nutrición depende de canalículos que penetran la matriz ósea y conectan unos con otros y con canales vasculares que penetran en el hueso o que se ubican en las membranas conjuntivas que revisten la superficies del hueso (periostio y endostio), ningún osteocito se encuentra a más de una fracción de mm de un capilar sanguíneo, ya que ante un trauma en el hueso, se origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1 mm de un capilar intacto¹⁰.

Los osteoblastos y los osteoclastos se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en su interior.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

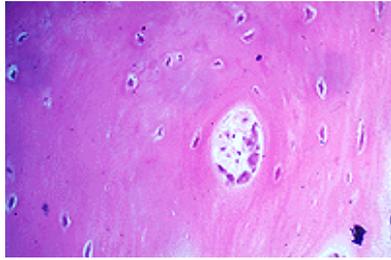


Fig. 17. Lagunas óseas

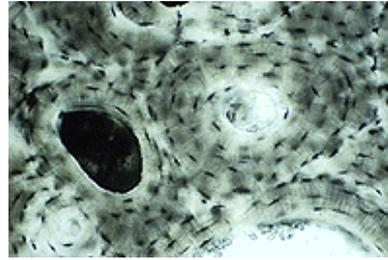


Fig. 18. Prolongaciones osteocitos

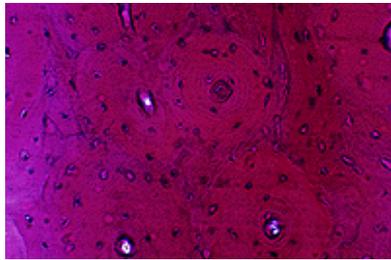


Fig. 19. Comunicaciones osteocitos



Fig. 20. Osteocitos

d. Células de revestimiento óseo

Las superficies inactivas del hueso están cubiertas por una capa de células planas muy delgadas similares a las células endoteliales, al parecer derivan de los osteoblastos (mantienen una actividad de fosfatasa alcalina) pero se desconoce cuáles son sus funciones, se cree que su papel más importante es separar el fluido intersticial de los fluidos del hueso y contribuir a mantener las concentraciones de calcio.



Fig. 21. Osteocito degenerado

Son células aplanadas que revisten las superficie óseas del interior de los huesos, y en su mayor parte corresponden a osteoblastos inactivos(Fig. 22), que están asociados entre sí y con prolongaciones de los osteocitos (Figs. 23 y 24).

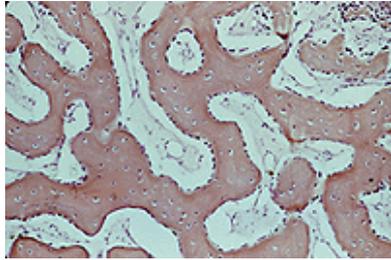


Fig. 22. Osteoblastos inactivos

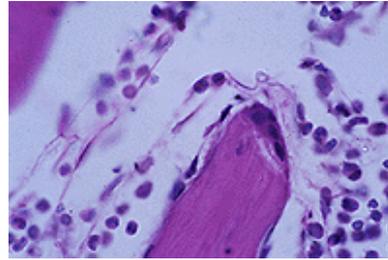


Fig. 23. Osteoblastos

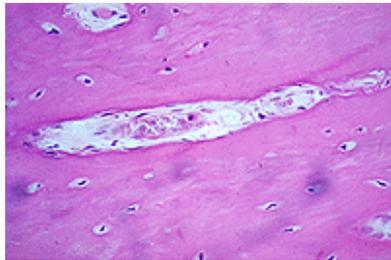


Fig. 24. Osteoblastos

e. Osteoclastos

Son células móviles, gigantes y multinucleadas, se localizan adosadas a la superficie de tejido óseo que debe ser removido (Fig.1).

Los osteoclastos tienen un origen diferente, son células derivadas de los **monocitos** circulantes que se asientan sobre la superficie del hueso, que proceden de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, localizándose en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea, y proceden a la destrucción de la matriz ósea (**resorción ósea**), siendo las células responsables de la reabsorción del tejido óseo, que participan en los procesos de remodelación de los huesos y pueden encontrarse en depresiones superficiales de la matriz ósea llamadas lagunas de Howship.

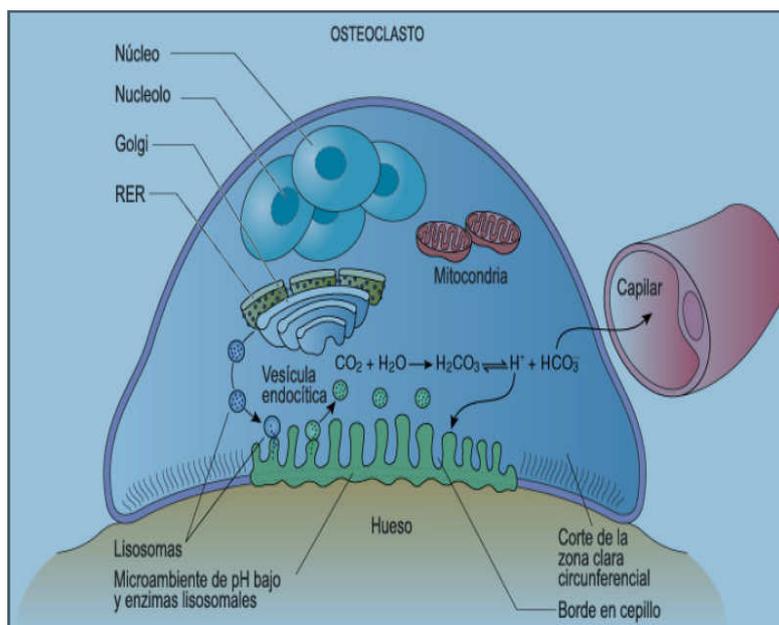


Fig. 25. Representación esquemática de un osteoclasto. Esquema extraído de Texto Atlas de Histología de Gartner.⁵⁶

Los osteoclastos se forman por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea mostrando muchas propiedades de los macrófagos que se caracterizan por disponer de una porción de su membrana "arrugada" ,en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos, llamada "zona clara" con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas (receptores especializados del hueso). El proceso de resorción se inicia cuando el aparato de Golgi de la células excreta lisosomas con enzimas capaces de producir un microambiente ácido por debajo de la membrana arrugada como consecuencia del transporte de protones mediante la bomba de protones ATP-dependiente, el intercambio Na^+/H^+ y la anhidrasa carbónica. Las enzimas lisosomales de los osteoclastos implicadas en este proceso son cistein-proteasas como la catepsina y sobre todo, la fosfatasa ácida tartrato-resistente (esta última se utiliza como marcador del fenotipo osteoclástico), las enzimas lisosomales sólo son liberadas en la zona clara en las proximidades del borde arrugado produciéndose en este área las reacciones de degradación de la matriz que deben producirse antes que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

La resorción osteoclástica depende de una serie de factores reguladores externos como la hormona paratiroidea, la 1,25-dihidroxitamina D3 y la calcitonina, otros factores que afectan la funcionalidad de los osteoclastos son los glucocorticoides y las prostaglandinas⁶.

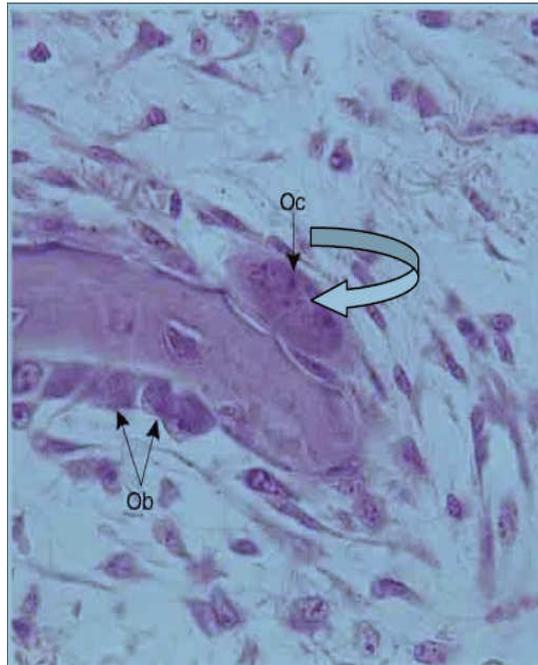


Fig. 26. Osteoclastos realizando la reabsorción ósea.

Se originan por fusión de monocitos que han abandonado la sangre circulante y pertenecen de hecho al sistema de fagocitos mononucleares, contienen numerosos lisosomas y en la superficie del osteoclasto que está en contacto con la matriz a remover se distinguen dos zonas distintas (Fig. 2): un anillo externo o zona clara que corresponde a una especialización de la superficie celular, la membrana se asocia estrechamente al hueso que delimita el área que se va a reabsorber, y la región central o borde estriado que presenta profundos repliegues de la superficie celular bajo los cuales se concentran gran cantidad de lisosomas y mitocondrias, además de ergastoplasma y cisternas del Golgi.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

La membrana de los lisosomas primarios se fusiona con la membrana celular que reviste a los repliegues del borde festoneado, liberando las enzimas lisosomales hacia el exterior y produciendo una acidificación del microambiente que baña al tejido óseo a reabsorber, el borde festoneado contiene además gran cantidad de vesículas endocíticas y lisosomas secundarios, indicando que ocurre además un proceso de fagocitosis del material parcialmente solubilizado, por el ambiente ácido y la acción lítica de las enzimas lisosomales⁶.

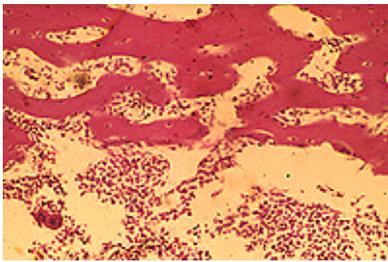


Fig. 27. Lisosomas

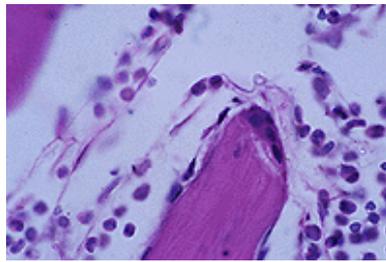


Fig. 28. Lisosomas

4.1.2- ESTRUCTURA SEGÚN EL TIPO DE HUESO

Histológicamente, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada, la disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso⁴, los dos contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral.

a. Estructura del hueso compacto o cortical

Constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo, constituye una protección y un soporte, tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados **canales de Havers** que se extienden longitudinalmente, recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos⁴, éstos están conectados con otros canales llamados **canales de Volkmann** que perforan el periostio y ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso, entre las láminas concéntricas de la matriz mineralizada hay pequeños orificios o **lacunae** donde se encuentran los osteocitos, para que estas células puedan intercambiar nutrientes con el líquido intersticial, cada lacuna dispone de una serie de **canalículos** por donde se extienden prolongaciones de los osteocitos, los canalículos están conectados entre sí, y eventualmente a los canales de Havers.

El conjunto de un canal central, las láminas concéntricas que lo rodean, las lacunae, canalículos y osteocitos en ellas incluidos recibe el nombre de **osteón o sistema de Havers**, las restantes láminas entre las osteonas se llaman láminas intersticiales.

b. Estructura del hueso esponjoso o trabecular

A diferencia del hueso compacto, el hueso esponjoso no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas **trabéculas**, en forma de red que delimitan cavidades areolares⁴, y estos tabiques forman una estructura esponjosa en cuyo interior se dejan huecos que están llenos de la **médula ósea roja**.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lacunae con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos, están formados por delgadas trabéculas (Fig. 29), que, en los huesos ya formados, corresponden a tejido óseo laminar (Figs. 30 y 31) rodeadas por células de revestimiento óseo; los osteocitos de las trabéculas óseas se mantienen desde los capilares sanguíneos vecinos ubicados en la médula ósea.

La orientación de cada trabécula y la disposición de sus laminillas óseas mineralizadas está determinada por las tensiones mecánicas locales con el objeto de resistir distintas fuerzas a las que son sometidos, así como a fin de una mejor transmisión de las mismas y si cambia la dirección de los requerimientos mecánicos a que es sometida una trabécula (aumento de peso del individuo, crecimiento u otro) ella debe cambiar su orientación.

El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos así como de los huesos cortos e irregulares.

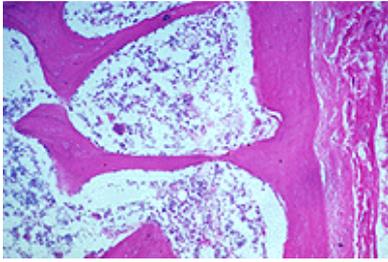


Fig. 29. Tejido óseo laminar

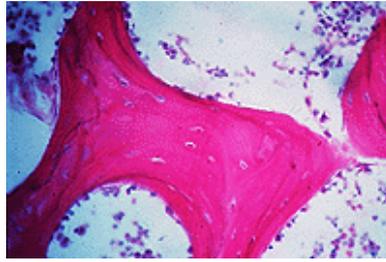


Fig. 30. Tejido óseo laminar

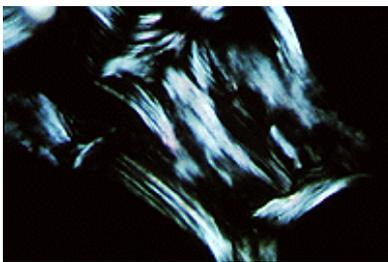


Fig. 31. Tejido óseo laminar

4.1.3- OSIFICACIÓN

Es el proceso mediante el cual se forma el hueso se denomina osificación. En el embrión, existe un precursor del esqueleto formado por tejido cartilaginoso hialino y mesénquina embrionario que ya tiene una forma característica a partir de las seis semanas.

La formación de hueso sigue dos procesos diferentes¹⁶⁷:

a. Osificación membranosa:

La osificación intramembranosa es la que produce preferentemente huesos planos, como su nombre indica tiene lugar dentro de una membrana de tejido conjuntivo, en este proceso, algunas de las células mesenquimatosas que forman las membranas de tejido conjuntivo son transformadas en osteoblastos constituyendo un centro de osificación alrededor del cual se va formando hueso.

Se pueden distinguir los siguientes pasos:

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

- Las células mesenquimatosas se agrupan en racimos en el centro de osificación y se transforman primero en células osteoprogenitoras y luego en osteoblastos.
- Los osteoblastos segregan matriz ósea y fibrillas de colágeno hasta que quedan rodeados por completo por hueso neoformado.
- Cuando están rodeados por completo por matriz ósea, los osteoblastos se transforman en osteocitos formando lagunas y canalículos entre ellos y las fibras de colágeno quedan atrapadas en la sustancia fundamental.
- El depósito de calcio y de sales minerales endurece la matriz ósea al cabo de unos días
- Mientras se produce la calcificación de la matriz ósea aparecen las trabéculas o espículas óseas que se unen en una estructura en forma de malla dando lugar al hueso esponjoso, la lámina central de hueso esponjoso se recubre por cada uno de sus lados por placas de tejido óseo compacto. Una vez formado, el hueso plano crece de tamaño mediante la adición de más hueso por sus bordes

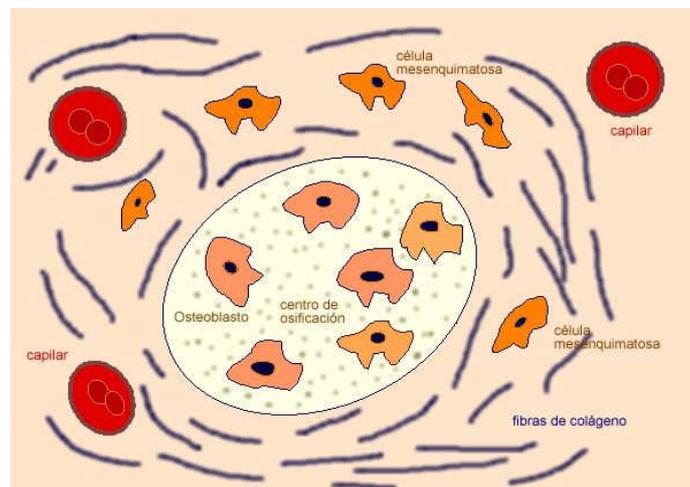


Fig. 29. Elementos involucrados en la osificación membranosa

b. Osificación endocondral

Casi todos los huesos del cuerpo se forman a partir de estructuras cartilaginosas en las que la osificación se extiende desde el centro hasta los márgenes, un proceso denominado crecimiento aposicional. Al mismo tiempo la división celular de los condrocitos seguida de la secreción de sustancias que forman la matriz da lugar a un crecimiento intersticial. A partir de la semana 5 ó 6 de la gestación, el modelo cartilaginoso del hueso largo está completamente formado, el modelo cartilaginoso desarrolla un periostio, y en el centro se desarrolla un collar, en el que los osteoblastos (que se han diferenciado a partir de condrocitos) depositan hueso. Poco después de la aparición de este collar óseo, el cartílago comienza a calcificarse formándose un centro de osificación primario al penetrar un vaso en el centro de la diáfisis, simultáneamente a la osificación endocondral que avanza desde la diáfisis hacia las epífisis de forma la cavidad medular, creciendo el hueso en longitud.

La diáfisis que una vez fué una masa sólida de cartílago hialino, es sustituida por hueso compacto en el centro del cual la cavidad medular se llena de médula ósea roja, cuando los vasos penetran en las epífisis, se forma un centro de osificación secundario, a partir del cual el proceso de osificación es similar al producido en el centro primario; estos centros de osificación secundarios suelen aparecer en el momento del nacimiento, con la diferencia de que se forma hueso esponjoso, y no se desarrolla una cavidad medular, en los extremos de las epífisis queda una porción remanente de cartílago constituyendo el cartílago articular, y entre las epífisis y la diáfisis se mantiene la placa epifisaria, también cartilaginosa a partir de la cual el hueso irá creciendo durante el desarrollo del niño hasta desaparecer en la edad adulta.

La placa epifisaria constituye el lugar a partir del cual el hueso puede crecer en longitud durante la infancia y adolescencia, en ella se distinguen varios tipos de estructuras o zonas que se extienden sin solución de continuidad, siendo éstas :

- Zona de cartílago en reposo: cerca de la epífisis, consiste en condrocitos dispersos que no proliferan y que sirven de punto de anclaje, uniendo las epífisis a las diáfisis

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

- Zona de cartílago en proliferación: es una lámina formada por condrocitos, algo mayores que los anteriores, que se encuentran apilados y experimentando una mitosis activa y, como consecuencia de ésta, la capa se espesa y toda la placa crece longitudinalmente
- Zona de cartílago hipertrófico o maduro: consiste en condrocitos más grandes todavía dispuestos de forma columnar. La división celular es, igualmente, la responsable del crecimiento de la placa, aunque en este área, algunos de los condrocitos experimentan cambios degenerativos asociados con depósitos de calcio.
- Zona de cartílago calcificado: consiste en un área de tan sólo algunas células de espesor, en la que las células han muerto o están próximas a morir como consecuencia de que la matriz alrededor de ellas se ha calcificado, a medida que la calcificación progresa, este área se vuelve frágil siendo invadido por osteoblastos y capilares, quedando una capa calcificada sólida entre la placa epifisaria y la diáfisis.

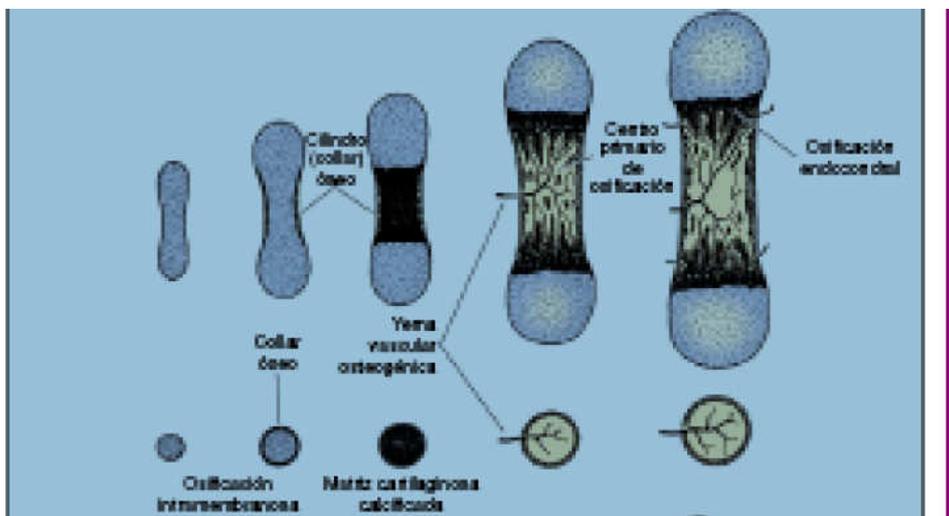


Fig. 30. Esquema osificación endocondral

La región entre la diáfisis y las epífisis en las que la matriz calcificada es remplazada por hueso, se denomina metáfisis⁷. El crecimiento de la placa epifisaria está controlado por la hormona del crecimiento producida por la pituitaria y por las hormonas sexuales, y durante el crecimiento, el proceso de calcificación y sustitución por hueso hace que la diáfisis sea cada vez más larga, permaneciendo constante la placa epifisaria. Si se produce una fractura que afecte a esta placa (fractura epifisaria) la cicatrización de la misma, inhibe parcialmente el crecimiento del hueso resultando un hueso algo más corto que el contralateral, esto se debe a que por ser el cartílago un tejido avascular, se consumen preferentemente los recursos de reconstrucción quedando parcialmente marginado el crecimiento óseo, en cambio, si la fractura afecta sólo al hueso, al estar este vascularizado, su cicatrización no afecta a la función de la placa epifisaria.

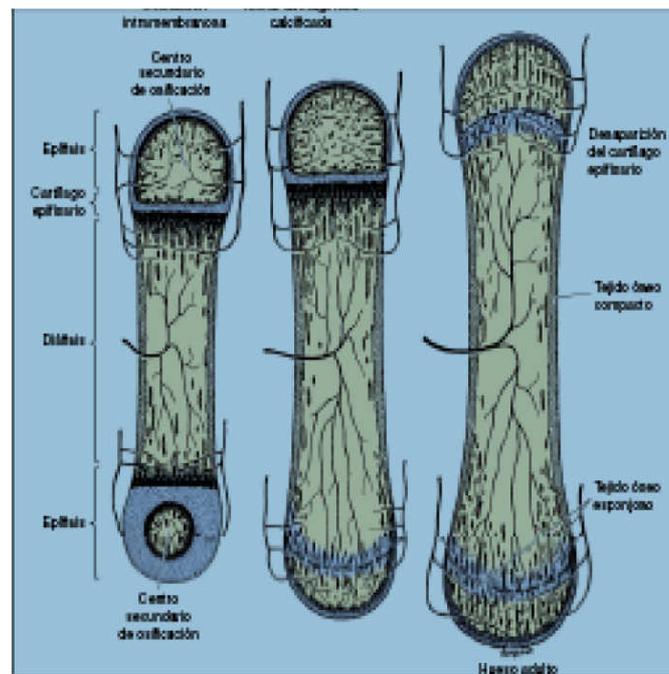


Fig. 31. Esquema osificación endocondral. Figura extraída de Histología Básica de Junqueira⁵⁵

4.1.4. REMODELACIÓN ÓSEA

El remodelado óseo consiste en la reabsorción de una cantidad determinada de hueso llevada a cabo por los osteoclastos, así como la formación de la matriz osteoide por los osteoblastos, y su posterior mineralización. Este fenómeno tiene lugar en determinadas áreas de la cortical denominadas *unidades básicas de remodelado óseo*⁴ (BMU).

Al igual que la piel, la mayor parte del hueso se forma antes del nacimiento, pero es renovado continuamente a lo largo de la vida.

El tejido óseo no se encuentra nunca en reposo sino que constantemente se renueva, por lo que es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción, este proceso dinámico, denominado *proceso de remodelado*, permite la renovación de 5-15% del hueso total al año, en condiciones normales⁶.

El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse, permitiendo la *restituto ad integrum* tras el trauma⁴, incluso los huesos largos que al llegar la edad adulta han adquirido su forma y tamaño definitivos son continuamente remodelados, destruyéndose hueso viejo que es sustituido por hueso nuevo, este remodelado permite que el hueso pueda ser una reserva continua del calcio que el organismo necesita para otras funciones, estando regulado por varias hormonas, vitaminas y otros factores.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

FACTORES ESTIMULANTES DE LA REABSORCIÓN ÓSEA	FACTORES ESTIMULANTES DE LA FORMACIÓN ÓSEA
<p><i>Prostaglandinas</i></p> <p><i>Leucotrienos</i></p> <p><i>Interleuquinas (IL1, IL3, IL6, IL10, IL17)</i></p> <p><i>Factores de necrosis tumoral (TNFα, TNFβ)</i></p> <p><i>Factores estimulantes de colonias:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF)</i> - <i>Macrofágicas (M-CSF)</i> <p><i>Factor inhibidor de la leucemia (LIF)</i></p>	<p><i>Interleuquina</i></p> <p><i>Factor transformante beta</i></p> <p><i>Proteínas morfogenéticas del hueso (BMP)</i></p> <p><i>Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)</i></p> <p><i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)</i></p> <p><i>Interferón gamma (IFN-γ)</i></p> <p><i>Factores de crecimiento similares a la insulina:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>IGF-1</i> - <i>IGF-2</i>

Fig. 4. Factores involucrados en remodelación ósea

Cuando se produce una fractura, se coloca un implante osteointegrado o se realiza un injerto para aumentar el sustrato óseo, antes de la inserción de un implante, lo que se pretende es la regeneración ósea, es decir, la formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente⁴.

A día de hoy, los conocimientos que se tienen sobre las alteraciones dimensionales que ocurren en la cresta alveolar tras una extracción dentaria, los procedimientos clínicos disponibles para preservar la dimensión de la misma, y los crecientes estudios en humanos y perros, demuestran que la curación del sitio edéntulo se caracteriza por una marcada reducción del grosor de la tabla ósea vestibular y el adelgazamiento de la cresta alveolar, también se pone de manifiesto que tras una extracción dentaria y la inmediata colocación de un implante, se produce también una

alteración dimensional de la cresta ósea. Rellenar el alvéolo con un biomaterial no reabsorbible y altamente osteoconductor, está enfocado a compensar la pérdida de hueso vestibular y a mantener el máximo volumen de la cresta alveolar, para lo que podemos ayudarnos de los biomateriales²⁹.

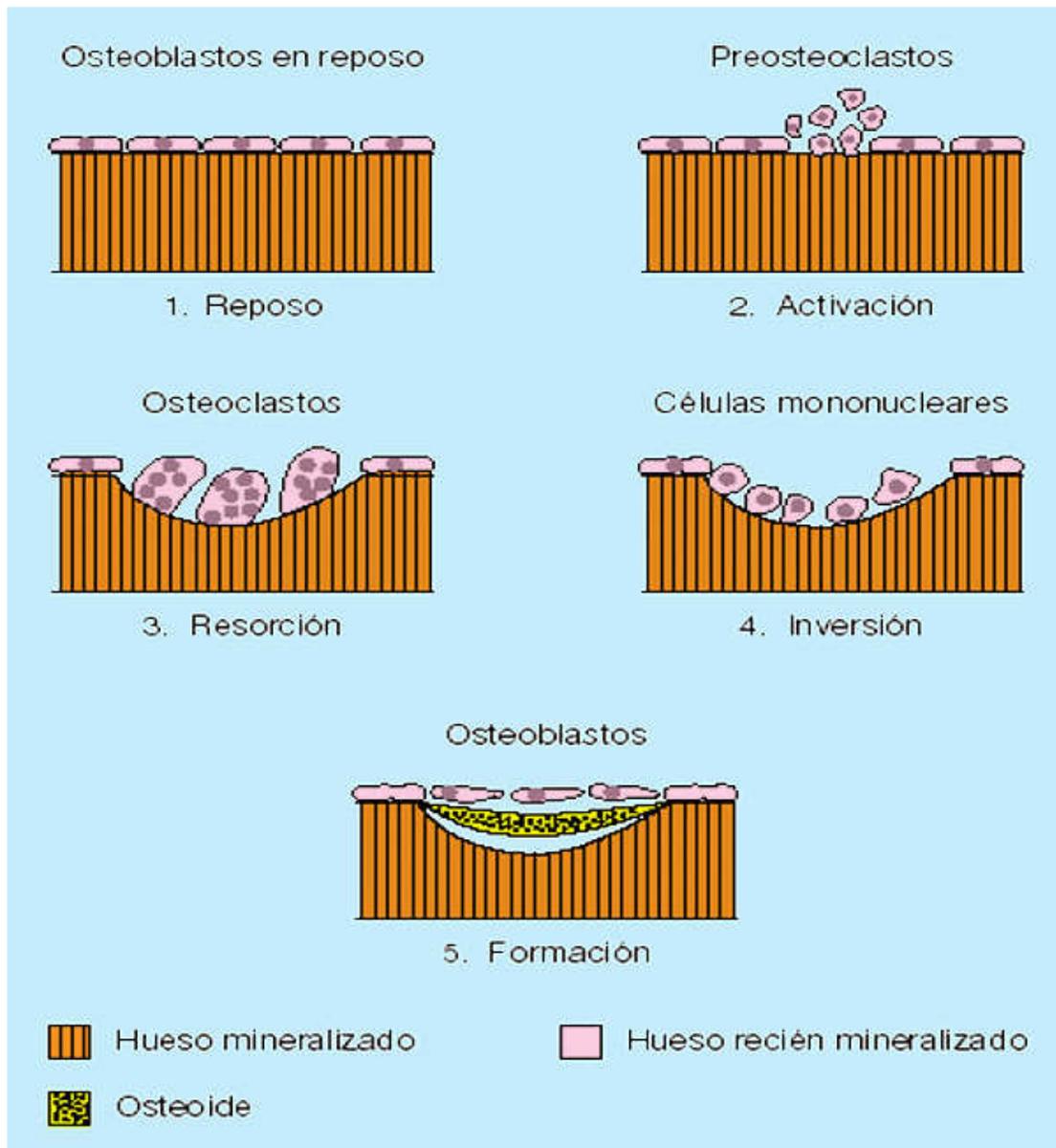


Fig. 32. Esquema del ciclo de remodelación ósea.

Las extracciones dentales se realizan debido a caries, fracturas e infecciones periodontales, sin embargo, se ha prestado poca atención a la subsecuente pérdida de volumen de cresta ósea que, inevitablemente, tiene lugar.

El proceso alveolar, con su correspondiente volumen, es lo que necesitamos conservar tras una extracción, o lo que tenemos que regenerar en muchos casos para poder reemplazar el diente perdido con implantes, este proceso alveolar podría definirse como el tejido óseo que rodea un diente totalmente erupcionado, se limita coronalmente por el hueso marginal de las paredes del alvéolo mientras que una línea imaginaria parte el fondo del alvéolo en una dirección perpendicular al eje axial de la raíz que lo limita apicalmente, por encima de tal línea, se encuentra el hueso basal de la mandíbula o del maxilar, las paredes del alvéolo se llaman lámina propia alveolar y la estructura dura remanente es el hueso alveolar. En la lámina propia alveolar, las fibras de Sharpey conectan el ligamento periodontal con el hueso alveolar y el esqueleto, en el lado contralateral del ligamento periodontal, las fibras de Sharpey conectan el ligamento periodontal con el cemento y la dentina del diente. Al igual que el cemento dental, la lámina propia del hueso alveolar es una estructura dependiente del diente, por tanto, tras una exodoncia se pierde gradualmente²⁹.

Para contestar por qué se pierde hueso vestibular tras una extracción dentaria, es importante reseñar que el hueso alveolar vestibular es más estrecho que su homólogo lingual, además, el hueso vestibular frecuentemente es sólo hueso alveolar y, consecuentemente, desaparece tras la exodoncia^{26,29}.

El proceso de curación del alvéolo tras una exodoncia puede dividirse en tres fases principales: primero la inflamatoria, luego la proliferativa y, finalmente, la remodelativa³⁰. Después de una extracción dental, la forma del proceso alveolar será el resultado de la remodelación del hueso que tiene lugar en la última fase de la remodelación ósea^{26,27}. El modelado óseo es igual en la zona bucal y lingual del proceso alveolar, pero será la pared bucal, más delgada,

la que tenga una pérdida vertical más evidente. Además, el sitio desdentado se caracterizará por una marcada reducción del grosor de la cresta ósea vestibular^{26,28,31}.

El primer paso para preservar el volumen del hueso alveolar tras la exodoncia es intentar hacer la extracción de forma atraumática para preservar la integridad de las paredes del hueso. Los instrumentos para la misma deberían usarse de modo que la raíz no se fuerce bucalmente para evitar la fractura de la tabla ósea vestibular²⁹. Otro concepto muy extendido entre los profesionales es que la colocación de un implante inmediato postextracción evitaría tanta atrofia de la cresta. Los estudios sobre modelos caninos demostraron, sin embargo, que la colocación de un implante en el sitio de exodoncia inmediatamente tras la misma, no siempre prevenían el remodelado óseo y se puede producir una pérdida vertical sustancial de la pared vestibular²⁶⁻²⁸, y existen varios estudios que han confirmado que la colocación inmediata del implante es incapaz de prevenir la pérdida ósea³²⁻³⁴, además, el implante inmediato es un procedimiento arriesgado que puede incluir alteraciones en la cresta como recesiones de los tejidos blandos periimplantarios que podrían conllevar indeseables efectos estéticos.

Recientemente, varios estudios sobre humanos y sobre animales han ido enfocados a evaluar la hipótesis de que la introducción de un biomaterial en el alvéolo inmediatamente después de la extracción dentaria representaría una solución para la pérdida de proceso alveolar. Los estudios clínicos randomizados han demostrado que con un xenoinjerto como sería el hueso bovino liofilizado, insertándolo en el alvéolo inmediatamente después de la exodoncia, puesto que es un material osteoconductor, compensa en parte el colapso de la tabla ósea tras la exodoncia, pero es un material no reabsorbible, tiene un buen efecto de andamiaje, por lo que podría ser una opción relativamente buena para mantenimiento de la cresta ósea, pero no regenerará fielmente un buen soporte óseo nuevo^{30,35}.

Otros estudios preclínicos se han llevado a cabo usando injertos bifásicos, con cerámicas de fosfato cálcico con plasma rico en plaquetas^{2,36}, con algunos mejores resultados, o incluso injertos

bifásicos de hidroxiapatita y β -TCP (Bone ceramic^R)³⁷, en los que se han observado buenas propiedades; la eficiencia de estas cerámicas en las que se une HA/TCP, está continuamente demostrada por los resultados de los estudios clínicos, sin embargo, existen diferencias importantes en la tasa de regeneración del hueso y la reconstrucción ósea, al emplear el sustituto óseo sintético; estas diferencias en rendimiento y eficiencia se pueden vincular al sitio de la operación, al paciente y a la técnica quirúrgica, están vinculadas fundamentalmente también a las características químicas (HA, TCP, mixtos bifásicos) y las estructuras (poros, superficie específica de la constitución de cristal de la cerámica)⁶⁴⁻⁶⁷.

a. Remodelación de trabéculas en el hueso esponjoso:

El cambio en la forma de una trabécula se realiza mediante dos procesos coordinados que ocurren en zonas precisas de la trabécula a remodelar:

- Crecimiento por aposición de la trabécula por acción de los osteoblastos que depositan laminillas sucesivas de tejido óseo, en la zona en que existe un requerimiento mecánico.
- Remoción del tejido óseo de la trabécula por acción de los osteoclastos en los sitios en que no está sometido a tracciones ni a compresiones (Figs. 33 y 34).

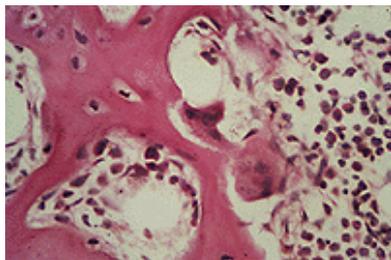


Fig. 33. Acción osteoclastos

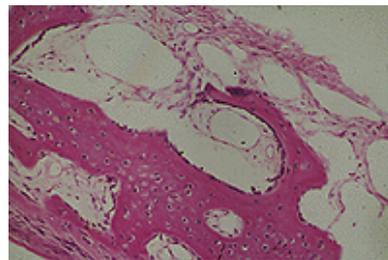


Fig. 34. Acción osteoclástica

Los investigadores han descubierto que la estructura de los huesos humanos es enormemente diferente a la que previamente se creía, los hallazgos tendrían implicaciones en cómo se tratan algunos desórdenes debilitantes de los huesos.

Se ha descubierto, estudiando la mineralización en huesos de caballo usando una herramienta de análisis como es la RMN, que las características de dureza y rigidez de los huesos son predominantemente debidas a la presencia de azúcares especializados, no sólo proteínas, como se creía anteriormente, sus hallazgos podrían tener impactos radicales en los tratamientos para la osteoporosis y otros desórdenes óseos¹².

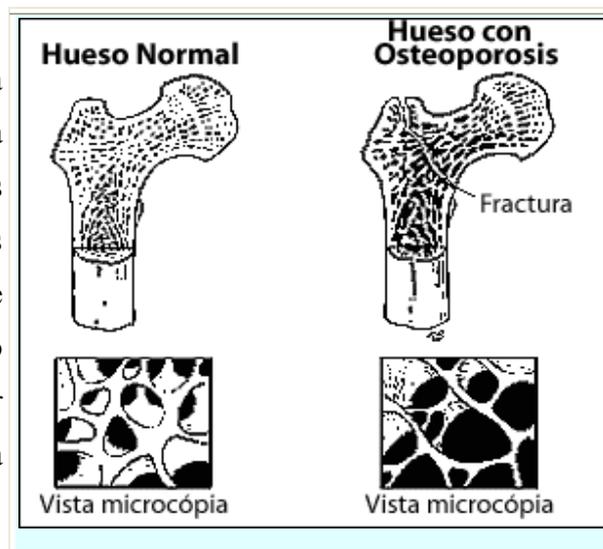


Fig. 35. Esquema hueso osteoporótico

Durante muchos años se mantuvo la opinión de que el colágeno y otras proteínas eran la llave molecular responsables de estabilizar la estructura ósea normal, esta creencia ha sido la base de algunas de las medicaciones actuales para los desórdenes óseos y la sustitución de material óseo, del mismo modo, los investigadores prestan poca atención al rol de los azúcares (carbohidratos) en el complejo proceso del crecimiento óseo, se ha encontrado que los azúcares, particularmente proteoglicanos y glicosaminoglicanos, parecen jugar un papel tan importante como el de las proteínas en el control de la mineralización ósea, el proceso por el cual los huesos de reciente formación son endurecidos con minerales como el fosfato de calcio¹².

4.2 ESTADO ACTUAL DE LAS INVESTIGACIONES EN CEMENTOS

CÁLCICOS⁴⁷

Las técnicas de regeneración de hueso constituyen un procedimiento quirúrgico para incrementar la cantidad y la calidad de hueso en áreas donde el volumen insuficiente de huesos hace peligrar la estabilización de los implantes osteointegrados. Los biomateriales para la estimulación de la regeneración ósea deberían combinar las capacidades de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, además, debería poder reabsorberse y ser reemplazado gradualmente por hueso neoformado. El uso de varios sustitutos óseos ha sido descrito para la regeneración ósea, sin embargo, sólo los **injertos autólogos** reúnen todas las propiedades mencionadas, siendo el material ideal (gold standard), sin embargo, la limitada disponibilidad de injertos en las áreas intraorales y las posibles complicaciones post-operatorias asociadas al empleo de injertos extraorales, fuerza a los profesionales a usar otros biomateriales en la regeneración ósea¹³⁻¹⁵. Aunque históricamente, el hueso autólogo ha sido considerado el material ideal, su empleo implica ciertas desventajas, como la necesidad de dos zonas quirúrgicas, el limitado volumen de injerto para la rehabilitación de grandes defectos y una elevada morbilidad³⁹.

Una alternativa a los autoinjertos, son los **aloinjertos** (injertos de otro individuo de la misma especie), tales como hueso liofilizado y desmineralizado (DFDBA), procedente de bancos de tejidos, desafortunadamente, hay mucha controversia hacia la capacidad de osteoinducción de estos materiales¹⁶, además del riesgo de reacciones inmunológicas y de transmisión de infecciones, actualmente, sólo las proteínas morfogenéticas (BMP) parecen tener las propiedades de osteoinducción y osteoconducción pero su uso está muy limitado debido a su alto coste¹⁷⁻²².

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Las propiedades osteoconductoras ofrecidas por los sustitutos naturales óseos de origen animal (xenoinjertos), tales como el colágeno y la hidroxiapatita bobina solucionan algunas de las limitaciones de los injertos autógenos¹⁷⁻¹⁸.

El hueso bovino era uno de los más empleados en el campo dental dentro de los xenoinjertos, estos productos necesitan una preparación compleja de proteinización, eliminación de agentes infecciosos, y esterilización por rayos gamma, después de estos procesos aún mantiene un variable volumen de proteínas diferentes al colágeno y colágeno de tipo 1, pero mantiene la estructura esponjosa.

Los productos de origen animal pueden producir alergias, transmitir agentes contaminantes (EBS) incluso inmunógenos, este tipo de técnica requiere controles obligatorios de sanidad, y muchas veces es imposible obtener el 0% de riesgo que se obtiene con las estructuras sintéticas. Especificaciones reguladoras en países, como Francia, prohíben a los pacientes asistidos con ambas técnicas de regeneración ósea ser donantes de sangre de por vida, esta regulación es fruto de la imposibilidad de dar garantías en este tipo de técnicas⁷¹⁻⁷².

Las técnicas de aloinjerto y xenoinjerto no se reabsorben fácilmente debido a su alta densidad, después de 14 años, partículas de hueso bovino son fácilmente observables en pacientes sin ningún signo de reabsorción^{71,142}, de ahí que, cada vez más, se recurra a los sustitutos sintéticos, fundamentalmente los basados en hidroxiapatita o en fosfato tricálcico, existe una multitud de sustitutos sintéticos. El funcionamiento y los resultados varían en función de la proporción de HA/TCP, la proporción entre estos dos componentes es crucial en la fabricación del biomaterial, ya

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

que controlan los parámetros de reabsorción ósea y la regeneración del hueso. El TCP es más soluble que la HA, así pues la reabsorción del biomaterial será proporcional a la cantidad de TCP que contenga, por lo tanto, es posible asociar HA y TCP en proporciones variables en función de la aplicación del material. El porcentaje de porosidad (macro y microporos) es muy importante para la colonización del material por los fluidos biológicos, cuanto más permeable es el material para las células, más eficiente es el crecimiento del hueso^{68,71}.

Por ejemplo, la composición del hueso bovino es muy similar a la hidroxiapatita del hueso humano, ya que contiene una proporción de calcio/fósforo de 1.67, idéntica a la existente en la hidroxiapatita humana¹⁸⁻²¹, su matriz mineral contiene cristales de calcio de 100 µm de diámetro, presentando así propiedades morfológicas y estructurales muy similares a las del hueso humano¹⁷⁻¹⁹. Además, la topografía rugosa del Bio-Oss^R favorece el anclaje de los osteoblastos, la proliferación y la síntesis de la matriz ósea en su superficie²⁰, y es actualmente, uno de los biomateriales más frecuentemente usados en los procedimientos regenerativos, sin embargo, los materiales basados en hidroxiapatita tienen una reabsorción muy lenta *in vivo*, lo que puede aumentar en varios meses el proceso de maduración del hueso neoformado, así, el futuro se enfoca al desarrollo de los biomateriales reabsorbibles con propiedades osteoconductivos y osteoinductivos¹⁶.

Estudios recientes, han demostrado que los nuevos cementos de brushita producen una regeneración vertical en defectos óseos mayor que la hidroxiapatita bovina¹⁴.



Fig. 36. Sección de calota de conejo injertada con Nuevo material de brushita. El biomaterial está rodeado de tejido óseo y puede observarse neoformación ósea en las zonas donde se ha reabsorbido la estructura del injerto¹⁴. Sección ampliada x 20

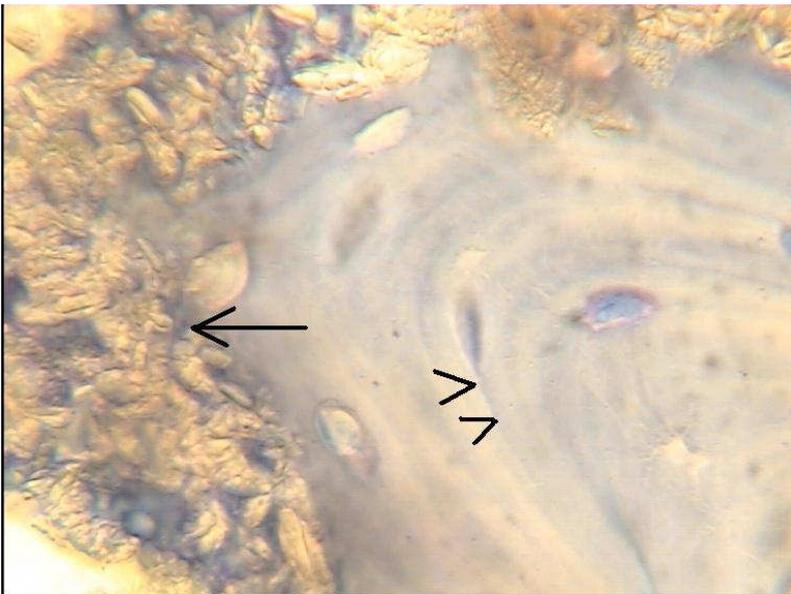


Fig. 37. Sección de calota de conejo injertada con Nuevo material de brushita. La fotografía muestra neoformación ósea en una orientación laminar en contacto con el material¹⁴. Sección ampliada x 40.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA



Fig. 38. Sección de calota de conejo injertada con Bio-Oss. Se muestran nuevas zonas de neoformación ósea creciendo en la superficie de los gránulos de Bio-Oss¹⁴. Sección ampliada x 10

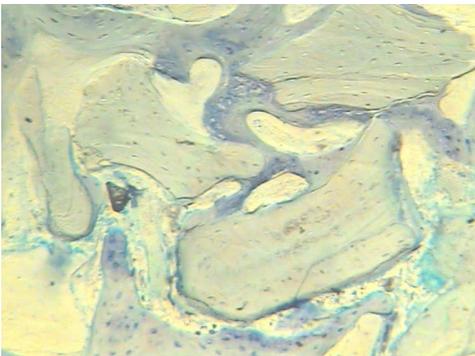


Fig. 39. Sección al microscopio de injerto de Bio-Oss. Se observan osteoblastos formándose sobre la superficie de los gránulos de Bio-Oss, pero no se ve reabsorción en los mismos¹⁴. Sección ampliada x 20

Las condiciones ideales de los biomateriales destinados a la regeneración ósea han variado desde los requisitos iniciales de biocompatibilidad y osteoconducción, y deben estimular una respuesta biológica y celular adecuada, deben ser reemplazados de forma progresiva por nuevo tejido, surgiendo la denominada “ingeniería de tejidos”³⁹. La reabsorción del biomaterial no debe ser demasiado rápida para permitir la colonización de los poros por células madre, que deben ser diferenciadas entre osteoblastos y osteoclastos, debe haber un equilibrio óptimo entre reabsorción y crecimiento interno de hueso, sin pérdida de volumen¹⁴².

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

El biomaterial debe formar un sólido material arquitectónico bioactivo, que gracias a la interacción de los fluidos biológicos y a las células del medio ambiente favorecen la colonización progresiva del hueso a fin de sustituir totalmente la matriz por hueso vivo, arquitectónicamente similar al hueso existente en el paciente⁶⁸⁻⁶⁹.

Las distintas formas de los minerales basados en fosfato cálcico son de gran utilidad en odontología y cirugía ortopédica, estos materiales están compuestos de los mismos elementos que se encuentran en el hueso y por ello son bien tolerados por el organismo mostrando gran capacidad osteoconductora y osteoinductora.

Los materiales con base de fosfato cálcico pueden ser de origen natural, como el hueso humano, el coral, y el hueso animal, o sintéticos como las cerámicas y cementos.

Las **cerámicas** son productos inorgánicos, vidriosos e iónicos que se preparan a altas temperaturas, poseen excelentes propiedades mecánicas pero carecen de la posibilidad de ser moldeadas o adaptadas al lugar de aplicación quirúrgica y su estructura suele consistir en cristales grandes, las más usadas son las cerámicas de fosfato cálcico, que pueden clasificarse en función de la reacción que producen como³⁹⁻⁴⁰:

- Cerámicas bioinertes: representadas fundamentalmente por los compuestos de alúmina y óxido de zirconio, se han empleado mucho en zonas de carga funcional como la cadera, debido a su excelente resistencia mecánica y durabilidad.
- Cerámicas bioactivas o biovidrios: con capacidad de adhesión directa al hueso mediante la formación de una capa de apatita en la interfase, fueron ideadas por Hench en los años 70⁴⁰⁻⁴².

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

- Cerámicas bioreabsorbibles, con capacidad de degradación progresiva y sustitución por hueso neoformado. El fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), y la hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, son las más usadas, siendo más soluble y con mayor degradación el TCP³⁹ (fosfato tricálcico).

Los derivados del fosfato cálcico, y en concreto, las biocerámicas se emplean en cirugía oral y craneofacial, odontología, cirugía ortopédica, traumatología y como relleno óseo en cirugías resectivas tumorales⁵¹. Existen más de 50 preparados comerciales disponibles en el mercado y se realizan alrededor de 250000 injertos óseos anuales³⁹. El TCP ayuda a regenerar las células del tejido óseo⁶¹, si se une con hidroxiapatita, una de las estructuras biológicas más cercana a la composición natural del hueso (apatita), junto con una tasa de reabsorción controlada y una adhesión celular integrada y capacidad de regeneración ósea, la rápida disolución del cristal permite la formación de cristales de apatita ósea, generando nuevo hueso⁶²⁻⁶³. El sustituto de hueso debe responder a una función principal: regenerarse a cargo de la arquitectura del hueso vivo (mismas propiedades mecánicas que el hueso original). Si es implantado en el hueso esponjoso, éste adquirirá estas propiedades, más aún que el cortical.

El sustituto de hueso que permita propiedades mecánicas será gracias al potencial osteoconductor⁷⁰.

Las condiciones ideales de los biomateriales destinados a la regeneración ósea han variado desde los requisitos iniciales de biocompatibilidad y osteoconducción, deben estimular una respuesta biológica y celular adecuada y deben ser reemplazados de forma progresiva por nuevo tejido^{42,43}.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Los cementos se preparan a partir de una mezcla de polvo y líquido que carece de propiedades mecánicas interesantes, pero una vez inducida la reacción de fraguado, se convierten en una pasta moldeable que al endurecer adquiere propiedades mecánicas de un sólido, y puede adaptarse a la forma necesaria durante la intervención quirúrgica u odontológica. Además su estructura microcristalina les otorga una gran área superficial, facilitando su uso como vehiculizantes de liberación controlada de fármacos¹⁰⁰, estas cualidades de los cementos de fosfato cálcico están provocando un creciente interés por los mismos reflejado en el aumento exponencial del número de trabajos publicados en los últimos años, que ya supera al de cerámicas de fosfato cálcico.

Los cementos óseos están divididos en dos familias: cementos de fosfato cálcico y cementos poliméricos de metilo metacrilato.

Los **cementos de fosfato cálcico** son materiales biocompatibles y biodegradables que pueden inyectarse y ser utilizados en procedimientos quirúrgicos tan variados como:

- 1) Fijaciones de fracturas, dando estabilidad a las mismas y reduciendo la necesidad de injertos¹⁰¹.
- 2) Vertebroplastias y kifoplastias¹⁰².
- 3) Reparaciones craneales y reconstrucciones óseas¹⁰⁴.
- 4) Endodoncia como sellador pulpar, siendo una alternativa a los irritantes selladores de ZnO-E¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.
- 5) Recubrimiento de pulpa dental, como alternativa a los citotóxicos cementos de zinc, composites y ionómeros de vidrio¹⁰⁵⁻¹⁰⁶.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

<i>Resumen de las propiedades y utilidades de los cementos óseos</i>					
<u>Cemento</u>	<u>F. compresión</u>	<u>Osteoconducción</u>	<u>Reabsorción</u>	<u>Tratamientos</u>	
				<u>Dentales</u>	<u>Médicos</u>
Hidroxiapatita ---- Fosfato cálcico	180MPa	Sí	Muy lenta	Ttos. Canal Fijación implantes Recubrimiento pulpar Defectos periimplante Defectos periodontales	Fijación fractura Vertebroplastia Craneoplastia Craneoplastia Aumento nasal Fracturas tibia Quiste óseo Defectos craneo
Brushita -----	30 MPa	Sí	Rápida	En estudio	Fijación tornillos Craneoplastia Vertebroplastia
Sulfato cálcico	45 MPa	Sí	Muy rápida	Defectos periodontales Obturación temporal Elevación seno ¹⁷³ Conservación alvéolo Postexodoncia	Kifoplastia Vertebroplastia
Polimetilmetacrilato	5,2 GPa	No	Nula	Base prótesis	Kifoplastia Vertebroplastia Fijación fractura Artroplastia cadera Craneoplastia Hemangioma Mieloma

Tabla 5. Propiedades y utilidades de los cementos cálcicos

Los **cementos de metacrilato** son materiales poliméricos, fáciles de manejar, radiopacos y tienen buenas propiedades mecánicas, tiempos de fraguado, e inyectabilidad ¹⁰⁷, no obstante, el metacrilato es menos biocompatible que el fosfato cálcico, fragua en una reacción exotérmica irritante, y no puede ser reabsorbido por el organismo¹⁰⁸, además el residuo que liberan estos cementos aumenta la reabsorción ósea ya que provoca la producción de sustancias como la interleukina-1, el factor de necrosis tumoral, la prostaglandina E2, la Interleukina-6 y la calcitonina relacionadas con la reabsorción ósea¹⁰⁹⁻¹¹²; por estas razones los cementos de fosfato

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

cálcico están siendo investigados como alternativa a los cementos de metacrilato y a las cerámicas óseas abriendo muchas puertas en el horizonte de los materiales para regeneración ósea tanto en traumatología y odontología (como en endodoncia, cirugía oral, odontología conservadora e implantología¹¹³).

<i>Compañía</i>	<i>Nombre Cemento</i>	<i>Componentes</i>	<i>Producto final</i>
ETEX	á-BSM Embarc Biobon	Polvo: ACP 50%, DCPD 50% Solución: H ₂ O (Solución salina)	HAP
Stryker-Leibinger Corp	BoneSource	Polvo: TetCP 73%, DCP 27% Líquido: H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ Y NAH ₂ PO ₄	HAP
	Cementek	Polvo: á-TCP, TetCP, Na Glicerofosfato Solución: H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄	HAP
	Cementek LV	Polvo: á-TCP, TetCP, Na Glicerofosfato, dimetilsiloxano Solución: H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄	
Biomet	Calcibon	Polvo: á-TCP 61%, DCP 26%, CaCO ₃ 10%, PHA 3% Solución: H ₂ O, NaH ₂ PO ₄	HAP
	Mimix	Polvo: TetCP, á-TCP, C ₆ H ₄ O ₇ Na ₃ , 2H ₂ O Solución: H ₂ O, C ₆ H ₈ O ₇	
	Quick-Set Mimix	Polvo: ND Solución: ND	HAP
Mitsubishi Materials	Biopex	Polvo: á-TCP 75%, TetCP 18-20%, DCPD 5%, HA 0-2% Solución: H ₂ O, succinato sódico 12%, condroetín sulfato sódico 5-5,4%	HAP
	Biopex-R	Polvo: á-TCP, TetCP, DCPD, HA, Mg ₃ (PO ₄) ₂ , NaHSO ₃ Solución: H ₂ O, succinato sódico 12%, condroetín sulfato Sódico 5-5,4%	HAP
Kyphon	KyphOs	Polvo: á-TCP 77%, Mg ₃ (PO ₄) ₂ 14%, MgHPO ₄ 4.8%, SrCO ₃ 3.6% Solución: H ₂ O, (NH ₄) ₂ , (3.5 M)	HAP
Skeletal Kinetics	Callos	Polvo: ND Solución: ND	HAP
Shangai Materials Co.	Rebone	Polvo: TetCP, DCP Solución: H ₂ O	HAP

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Synthes-Norian	Norian CRS Norian SRS	Polvo: α -TCP 85%, CaCO ₃ 12%, MPCM 3% Solución: H ₂ O, Na ₂ HPO ₄	HAP
	Norian SRS Fast Set Putty	Polvo: ND Solución: ND	HAP
	ChronoOS Inject	Polvo: α -TCP 73%, MPCM 21%, MgHPO ₄ 3H ₂ O 5%	Brushita
Kasios	Eurobone	Polvo: α -TCP 98%, Na ₄ P ₂ O ₇ 2% Solución: H ₂ O, H ₃ PO ₄	Brushita
CalciphOs	VitalOs	Polvo: - Componente 1: α -TCP 1,34g, NaH ₂ P ₂ O ₇ 0,025g, H ₂ O PBS 0.05M Ph 7.4 - Componente 2: MPCM 0.78g, CaSO ₄ H ₂ O 0.39g, H ₂ O H ₃ PO ₄ 0.05M	

Tabla 6. Cementos óseos comercializados

Brown y Chow en 1986, fueron los primeros en desarrollar un cemento de fosfato cálcico ortopédico/dental que producía hidroxiapatita después de fraguar¹¹⁴, a partir de entonces se han desarrollado diferentes formulaciones de cementos de hidroxiapatita que emplean varios precursores de la reacción de fraguado¹¹⁵. Un cemento de fosfato cálcico con una diferencia esencial al propuesto por Brown y Chow es el cemento de brushita, descrito por Lemaitre en 1987, que se obtiene mezclando monofosfato cálcico con fosfato tricálcico¹¹⁷⁻¹¹⁸. Existen, dependiendo del resultante de la reacción química, dos familias de cementos de fosfato cálcico: cementos de hidroxiapatita (HAP) y cementos de dihidrato de fosfato dicálcico (DCPD o Brushita).

Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han concentrado en el desarrollo de los cementos de hidroxiapatita por tres razones principales:

- 1) Está presente en el hueso.
- 2) Tiene buenas propiedades mecánicas.
- 3) Fragua con un pH neutro.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

A pesar de estas ventajas que tienen los cementos de hidroxiapatita, los cementos de brushita han levantado recientemente un gran interés debido a su capacidad de ser reabsorbidos por el organismo de manera mucho más rápida que la hidroxiapatita^{13,118}, se ha comprobado que se encuentra en defectos negativos de hueso, tratados con Bio-Oss y con cementos basados en Brushita, que el aumento de hueso es menor en los tratados con Bio- Oss, por lo que los nóveles cementos de brushita producirían mejor regeneración vertical de hueso que el Bio-Oss¹³, justo 4 semanas tras la implantación de los dos materiales en huesos de calota de conejo, muestra reabsorción del material basado en cementos de brushita, mientras que el Bio-Oss permanece sin reabsorber¹⁴.

Los granulados de hidroxiapatita bovina, han sido usados extensamente en la regeneración de hueso por ser un material osteoconductor, aunque su lenta reabsorción compromete la calidad de la regeneración ósea a lo largo del tiempo¹³⁻¹⁴.

La reabsorción de la hidroxiapatita es debida principalmente a la acción celular y está limitada a la superficie del material, ya que las células no pueden penetrar la estructura microporosa del cemento y este se mantiene estable en el organismo durante períodos superiores a 12 meses¹¹⁵, los cementos de brushita son más solubles y reabsorbibles que los de hidroxiapatita al pH fisiológico de 7,4.

Por los motivos anteriormente expuestos, el uso de los cementos de brushita está enfocado a situaciones en las que se necesita regeneración ósea, mientras que los cementos de hidroxiapatita se utilizan cuando la reabsorción del material es innecesaria, como en los procesos de vertebraloplastia

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

o de obturaciones dentales, en la tabla se muestra la lista de cementos de fosfato cálcico comercializados hasta el momento junto con sus composiciones¹¹⁹.

Los cementos de brushita se preparan mediante una reacción ácido-base que ocurre entre el fosfato tricálcico beta y protones donados por un fosfato cálcico ácido como el fosfato monocálcico dihidrógeno, o simplemente aportados mediante una solución de un ácido como el fosfórico o el sulfúrico. Aunque estos cementos son biocompatibles y reabsorbibles, tienen un tiempo de fraguado demasiado rápido, y son demasiado viscosos lo que ha limitado su empleo clínico¹²⁰, los cementos de brushita han sido mejorados incorporando en su composición sustancias que prolongan el tiempo de fraguado y mejoran las propiedades mecánicas y el manejo de los mismos, se han utilizado con éxito retardantes químicos como el pirofosfato sódico, iones de citrato, iones de fitatocitrato y citrato de sodio, para prolongar el tiempo de fraguado¹²¹⁻¹²², también se han ensayado diferentes soluciones ácidas como precursoras de la reacción de fraguado con el fin de mejorar las propiedades mecánicas del cemento y su inyectabilidad; en un principio se usó agua destilada, ácido fosfórico y el ácido sulfúrico¹²², a los que posteriormente se añadieron polímeros como el ácido hialurónico y goma de xantham mejorando el manejo del cemento¹²³, se ha demostrado recientemente que con el uso de aditivos poliméricos gelificantes en la fase líquida del cemento aumenta la cohesión del mismo¹⁰⁰.

4.3- DESCRIPCIÓN DE LOS MINERALES QUE CONSTITUYEN LOS CEMENTOS CÁLCICOS.

4.3.1 BRUSHITA

Brushita es el nombre que se le otorga al mineral de fosfato cálcico dibásico dihidratado de fórmula $\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; que cristaliza en una celdilla monoclinica de dimensiones $a = 5,83 \text{ \AA}$; $b = 15,19 \text{ \AA}$; $c = 6,26 \text{ \AA}$; $\beta = 116,47^\circ$.

Su peso molecular es de 172,10. Su composición por peso es la siguiente: Calcio (23,29 %), Fósforo (18,0 %), Hidrógeno (2,93 %), Oxígeno (55,78 %), o también: H_2O (26,17 %), CaO (32,59 %), P_2O_5 (41,24 %).

Es prácticamente insoluble en agua, poco soluble en ácido acético y soluble en HCl o HNO_3 , se usa en odontología en la pasta de dientes, en la alimentación, en la fabricación de vidrio y en fertilizantes¹²⁴.

La estructura cristalina de la brushita consiste de laminas compactadas de cadenas paralelas en las que los iones de calcio están coordinados por seis átomos de oxígeno de los aniones de fósforo, y por 2 átomos de oxígeno de las moléculas de agua. La brushita contiene 2 tipos de moléculas de agua, una con un ángulo H-O-H igual a $106,6^\circ$ y la otra con $105,4^\circ$. Las uniones de hidrogeno de estas moléculas varían entre si, el primer tipo de molécula tiene enlaces de hidrógeno de forma lineal mientras que el segundo tipo los tiene con ángulos de $167,3^\circ$ y $165,8^\circ$ ¹²⁵. La brushita es un electrolito sólido con una capa de moléculas de agua adsorbidas sobre su superficie que con sus uniones de hidrogeno contribuyen a la emigración protónica en el complejo¹²⁶.

La brushita es el fosfato cálcico menos estable según la regla de paso de Oswald y siendo una fase metaestable en condiciones fisiológicas. Por ello es mucho más reabsorbible

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

que la hidroxiapatita y que el fosfato tricálcico beta ¹²⁷⁻¹²⁹. De hecho, la brushita puede reabsorberse a una velocidad ligeramente superior a la de neoformación de hueso lo cual es muy interesante en procesos de regeneración ósea ¹³⁰.

La velocidad de disolución de la brushita es de $4.26 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ a pH de 5,5. Este valor es 3,4 veces mas rápido que el del α -TCP ($1,26 \times 10^{-4}$), y mucho mas rápido (300 veces) que el de la hidroxiapatita carbonatada $1,42 \times 10^{-6}$, que es la hidroxiapatita con velocidad de reabsorción más alta ¹³¹.

En el hueso, la brushita es una de las primeras fases de fosfato cálcico que se forma en el comienzo de la nucleación y crecimiento de los cristales de HAP siendo un mineral importante en el crecimiento de la hidroxiapatita *in vivo* ¹³².



Fig. 40. Imagen brushita

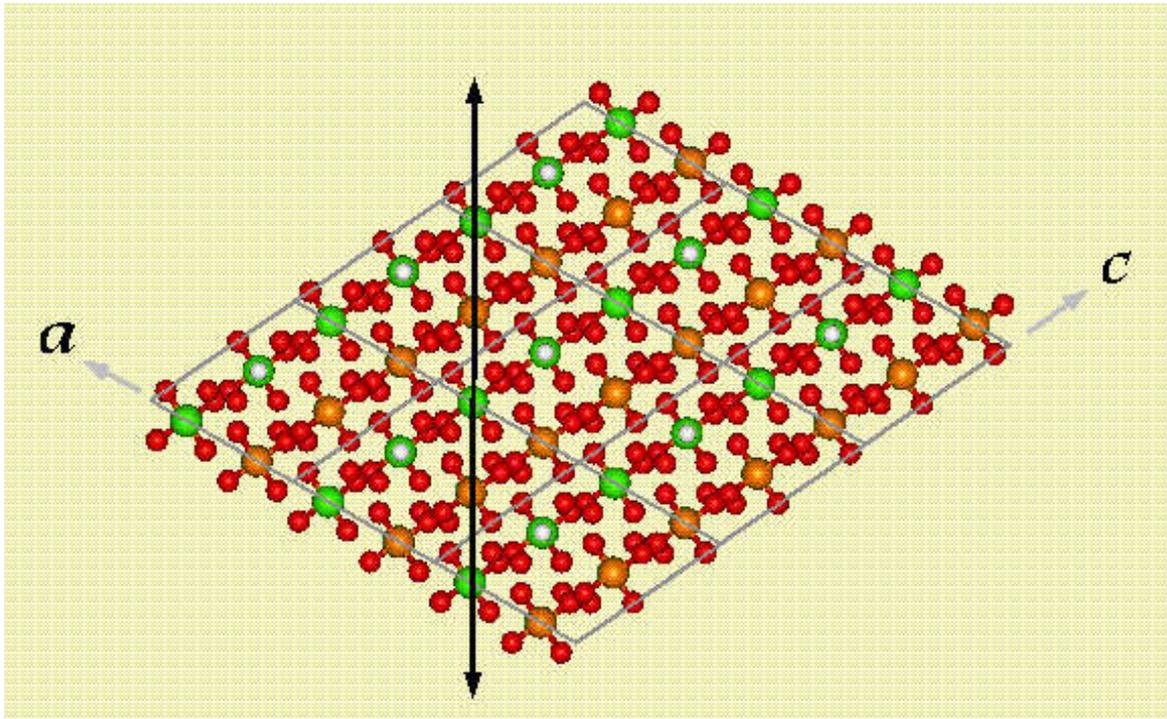


Fig. 41. Composición atómica brushita

4.3.2- FOSFATO TRICÁLCICO β O EHITLOCKITA



Fig. 42. Whitlockita (Jeff Weissman/Photographic Guide to Mineral Species)

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Es un fosfato cálcico tribásico y terciario conocido también como “bone ash” o “ceniza de hueso”, su forma cristalizada se conoce como también como whitelockita y es la que observamos en la figura 43. Su estructura química es $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. El peso molecular es 310,2 D, su densidad es de 3,13g/cm³ y su forma de cristalización es trigonal-ditrigonal piramidal con dimensiones de celda: a = 10,33 Å; c = 37,103 Å; Z =6. La composición en peso es: calcio (38,76 %); fósforo (19,97 %) y oxígeno (41.27%). Ó también: CaO (54,24 %); PO₄ (61,24 %); H₃PO₄ (63,19 %); P₂O₅(45,76 %). Se suele presentar como un polvo blanco sin sabor.

Es insoluble en agua, alcohol o ácido acético; es soluble en HCl y HNO₃, se usa en la industria del vidrio, de los productos lácteos, en polvos dentales para pulir, en porcelanas, cerámica, en la industria alimenticia, textil, y en piensos de animales. También se utiliza como antiácido [Casa Merk Index]. El α -Fosfato tricálcico tiene buena biocompatibilidad, bio-reabsorción y osteoconducción, por ello se usa desde hace años en el ámbito quirúrgico de la regeneración ósea^{77,133}.

4.3.3- MONOFOSFATO CÁLCICO

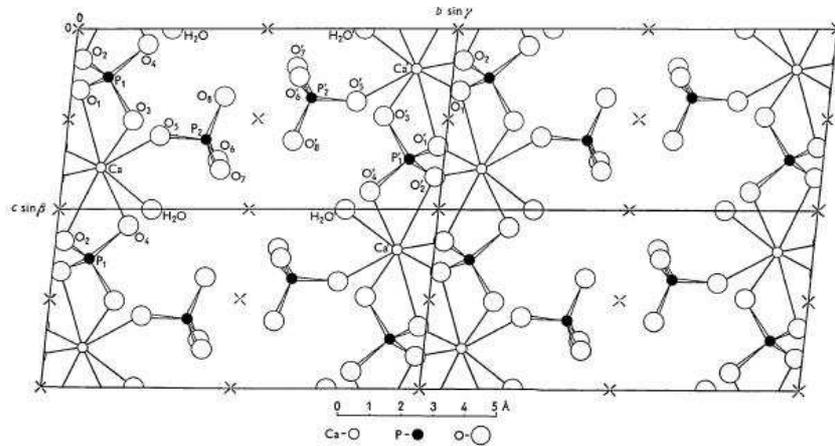


Fig. 43. Unidad de celda del mono fosfato cálcico.

También se puede llamar fosfato monocálcico, fosfato cálcico monobásico, bifosfato cálcico, fosfato clásico primario o calcio superfosfato.

Su estructura química es la siguiente: $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; su peso molecular es de 252,09 D y su composición en peso es: Ca (15.90%), P (24.58%), O (57%), H (2%), tiene sabor ácido fuerte, densidad de 2,20g/cm³, parcialmente soluble en agua, se descompone en H₃PO₄ y en sal insoluble dibásica o tribásica, es soluble en HCl, HNO₃ y en ácido acético, se utiliza en los bicarbonatos para la fabricación del pan, en las harinas y como complemento alimenticio¹³⁴.

3.4- MATERIAL IDEAL PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA

El material ideal para regeneración ósea, además de ser biocompatible, osteoconductor, osteoinductor y osteogénico, debe tener buenas propiedades mecánicas, ser fácil de manejar, fácil de adaptar y debe tener una velocidad de reabsorción equiparable a la velocidad de crecimiento óseo.

La osteoconducción es la capacidad de una material para guiar y soportar la neoformación de hueso (por ejemplo la hidroxiapatita). La osteoinducción es la capacidad de un material para estimular la diferenciación de células mesenquimales en células osteoformadoras (por ejemplo las proteínas morfogenéticas), y la osteogénesis es la capacidad de crear hueso donde antes no lo había mediante transporte celular (por ejemplo las células osteoprogenitoras). El único material que cumple todas estas cualidades es el autoinjerto óseo.

La mandíbula humana, tiene un modulo de elasticidad de $96,2 \pm 40,6$ MPa y su componente de hueso trabecular tiene una fuerza de compresión de $3,9$ MPa $\pm 2,7$ [95]. El fémur humano, tiene un modulo de elasticidad de 15200 MPa, la fuerza compresión del hueso cortical esta en torno a 170 MPa¹³⁵, aunque estos valores descienden con la edad nos dan una idea de las importantes diferencias que hay entre los distintos huesos del cuerpo y los materiales de regeneración ósea deben de cubrir las necesidades específicas de cada caso. La facilidad de manejo y adaptabilidad está limitada en los injertos en forma de bloque y forma granular, lo contrario sucede con los cerámicos diseñados con CAD/CAM y los cementos óseos que se adaptan de manera excelente a los defectos que hay que tratar^{119, 136}. La velocidad de reabsorción *in vivo* del biomaterial debe ser similar a la de la neoformación del hueso, que tiene un valor de 20 $\mu\text{m}/\text{día}$. En la siguiente tabla mostramos algunos de los biomateriales empleados en regeneración ósea y sus propiedades.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

<u>Propiedades de distintos biomateriales para regeneración ósea</u>				
	<u>Materiales inorgánicos</u>		<u>Materiales orgánicos</u>	<u>Combinaciones</u>
MATERIAL	Fosfato cálcico-sulfato cálcico vidrio Cerámicas	Cementos	Polímeros y plásticos	Composites
COMPOSICIÓN	Cerámicas de Hidroxiapatita coralina Cerámicas de Hidroxiapatita bovina Cerámicas de Hidroxiapatita sintética Cerámicas de TCP Cerámicas bifásicas Sulfato cálcico Biovidrio	HAP Brushita Sulfato cálcico	Poliéster: Poliglicólico Poliláctico Polibutírolacton Policaprolactona Poliamidas: Polipéptidos Polianhidrido Poliorotoesteres Polifosfacenos	Combinaciones componentes orgánicos e inorgánicos
FORMA	Cerámica porosa Cerámica granulada Cerámica en bloque	Líquido/Sólido	Plástica sólida	Distintas formas
DEGRADACIÓN	HAP: muy lenta TCP: rápida Sulfato calcio: Muy rápida Bioglass: según composición	HAP: lenta Brushita: rápida Sulfato cálcico: Rápida	Hidrólisis	Depende composición
PRODUCTOS	Calcio y fosfato	Calcio y fosfato	Moléculas inorgánicas	Depende composición
PROPIEDADES	Biocompatible Osteoconductor Porosidad definida No moldeable Se fija mal en defectos Radiopaco	Biocompatible Osteoconductor Porosidad no definida Moldeable Se fija bien en defectos Radiopaco Inyectable	Biocompatible Buenas propiedades Buenas propiedades mecánicas iniciales pero empeoran con el tiempo No radiopaco Flexible No moldeable	Destintos grados de Biocompatibilidad Osteoconductividad y manejabilidad Radiopaco

Tabla 7. Propiedades biomateriales para regeneración ósea

Los materiales ideales para los procedimientos de aumento vertical de hueso no sólo deberían ser osteoconductivos, biocompatibles y fuertes mecánicamente, sino que debería poder ser aplicado en procedimientos mínimamente invasivos y mantenerse estable en las superficies óseas originales, de este modo, la exposición al implante y la infección podrían prevenirse y conseguirse más fácilmente una buena estabilidad mecánicas.

1- En cuanto a los materiales de regeneración ósea inorgánicos:

- Las cerámicas (como son los biovidrios formados por silicatos cálcicos, o el Cerasorb^R, que contiene TCP), son materiales que tienen propiedades mecánicas muy favorables.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Sin embargo, son materiales que se sintetizan a muy altas temperaturas, lo que da origen a cristales muy grandes, por lo que se reabsorben muy lentamente, además, tienen el inconveniente de que no pueden mezclarse con partículas bioactivas, como son los antibióticos.

Los cementos se sintetizan a temperatura ambiente, lo cual hace que se den partículas más pequeñas que se reabsorben más rápidamente, y aportan la ventaja de poder incorporarles partículas bioactivas, convirtiéndose en vehículo para las mismas.

Se usan mucho algunos como el sulfato cálcico dihidratado, la hidroxiapatita, y actualmente comienzan a verse las ventajas del uso de la brushita.

La brushita es $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Es un material reabsorbible y biocompatible, tiene muy aceptables propiedades mecánicas, aunque no tanto como la hidroxiapatita; la ventaja que ofrece frente al sulfato de calcio, es que éste último se reabsorbe a una velocidad más rápida que la velocidad de regeneración del hueso.

La velocidad de reabsorción de la brushita es la más parecida a la velocidad de regeneración ósea.

Presenta un pH ácido al sintetizarse, pero a día de hoy, ya no supone un problema al fabricarse granulada ya que al introducirlo en suero salino, cambia su pH y se convierte en hidroxiapatita, por lo que hacerlo granulada también soluciona este inconveniente.

2- En cuanto a los materiales de regeneración ósea orgánicos:

- El polietilenglicol es muy biocompatible pero tiene malas propiedades mecánicas.
- El polilácticoglicólico es muy usado, muy caro y origina reacciones inflamatorias, aunque no de las más graves.
- La caprolactona y el metilmetacrilato eran muy usados, pero también originan muchas reacciones inflamatorias.
- Los cementos de fosfato de calcio son materiales biocompatibles y osteoconductivos que pueden ser inyectados en procedimientos mínimamente invasivos como las vertebroplastias y la kifoplastias, entre estos cementos, los cementos basados en brushita, tienen la ventaja añadida de ser biodegradables *in vivo*, además, este tipo de material podría tener especial interés en los procedimientos de aumento de hueso mínimamente invasivos.

Sin embargo, los cementos de brushita se preparan en condiciones de acidez, y podrían bajar el pH de los tejidos circundantes cuando se aplican *in vivo*, pudiendo comprometer la biocompatibilidad del material y la supervivencia del procedimiento quirúrgico.

Se han llevado a cabo varios estudios para analizar el pH de los cementos de brushita, sin embargo, ninguno ha comprobado la evolución del pH en un ambiente dinámico con continuos cambios en las soluciones de incubación.

4.5- REGENERACIÓN ÓSEA CON GRANULADO DE CEMENTO DE BRUSHITA

El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse completamente después de un trauma (*restitution ad integrum*)¹³⁷, no obstante, esta capacidad es limitada, como se observa después de una extracción dental, por ejemplo, después de la extracción se pierden 2mm de hueso durante los primeros 2 meses, y posteriormente se sigue reabsorbiendo el hueso a un ritmo de 2 mm por año, lo cual provoca dificultades a la hora de aplicar algunos tratamientos dentales¹³⁸.

El gran desarrollo de la cirugía dental e implantológica en los últimos años ha sido posible gracias a la investigación en técnicas quirúrgicas y en biomateriales, pero la falta de hueso sigue siendo un problema biológico a solucionar, dedicándose muchos esfuerzos para encontrar una forma de prevenir o de tratar la atrofia de la cresta alveolar¹³².

Para obtener la regeneración ósea necesaria se han probado diversos materiales osteoconductores que aportan una matriz apropiada para guiar la nueva formación de hueso, los materiales pueden ser de origen biológico (autoinjertos óseos, gel de fibrina, hueso desmineralizado liofilizado, quitosano, hidroxiapatita bovina, colágeno...etc.) o sintéticos (ácido poli (láctico-co-glicólico), fosfato tricálcico, sulfato cálcico, hidroxiapatita sintética...etc.)^{87,140-147}.

Los materiales sintéticos están ganando creciente interés porque son más baratos y no

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

presentan los problemas indeseados de infecciones y reacciones inmunitarias relacionados al uso de materiales de origen humano o animal, recientemente, los fosfatos cálcicos han empezado a utilizarse en las clínicas demostrando en estudios *in vivo* su aptitud como injertos óseos en cirugía dental con un futuro prometedor^{119,141-147}.

La composición química de los materiales de fosfato cálcico es apropiada para preparar matrices y estructuras porosas que pueden favorecer la proliferación de células y vasos sanguíneos durante los procedimientos de regeneración ósea¹⁴⁴. Para conseguir un aumento de la cantidad de hueso y también de su cualidad, es necesaria una velocidad de reabsorción aceptable que permita el crecimiento del hueso a medida que se va eliminando el material, la mayoría de los fosfatos cálcicos, como HAP, tiene una velocidad de reabsorción muy lenta que dificulta la formación de hueso nuevo durante muchos meses después de su implantación.

Existen algunos fosfatos cálcicos como el α -TCP y el DCPD que tiene una capacidad de reabsorción aceptable.

Estudios recientes *in vivo* han demostrado que el α -TCP es capaz de promover el depósito de calcio, aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, se reabsorbe y tiene mejor compatibilidad que el α -TCP^{133,136,144, 145, 147, 148}.

La importancia de los cementos basados en brushita viene de su capacidad de descomponerse en ambientes fisiológicos y ser reabsorbida por el organismo¹³⁰.

La brushita se disuelve al menos 3 veces más rápido que la HAP o el α -TCP¹⁴⁹. Sin embargo,

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

la eliminación de la brushita de la zona implantada es compleja y depende de distintos procesos fisiológicos³, según estudios *in vivo* parte de la brushita es convertida en HAP después de 2 semanas de su implantación, y a las 8 semanas, la actividad de remodelado mediada por células osteoclásticas es predominante¹⁵⁰. Esta conversión en HAP no es deseada porque desacelera la velocidad de reabsorción, y ocurre a través de una reacción química que libera protones y puede acidificar severamente el pH local comprometiendo la biocompatibilidad del material, se han dedicado muchos estudios a impedir esta conversión en HAP y a conseguir la reducción del pH, añadiendo sales de magnesio o aumentando la fracción de α -TCP en el cemento.

El potencial regenerativo de los cementos de fosfato cálcico ha sido estudiado aplicándolos en forma de pasta de fraguado, pero recientemente, su uso en forma de gránulos o bloques fabricados a partir del cemento ya fraguado está ganando interés debido a dos ventajas principales:

- Primera, la preparación del cemento ya fraguado se realiza a bajas temperaturas lo cual permite añadir agentes activos durante la reacción de fraguado.
- Segunda, la mayor fracción superficie/volumen de los gránulos del cemento fraguado es más apropiada para una liberación controlada de medicamentos¹¹⁹.

Además, se sabe que la transformación de brushita en HAP depende del pH local entre otros factores¹²⁹, al añadir el cemento al hueso en forma de gránulos en vez de pasta, se puede ayudar a controlar mejor el cambio del pH local y la transformación de DCPD en HAP¹²⁶.

Los estudios *in vivo* aportan los datos necesarios para poder empezar los análisis clínicos. Los cementos de fosfato cálcico han sido ensayados en diversos modelos animales^{3,150}, existen

dos modelos *in vivo* para examinar la capacidad de los biomateriales como injertos óseos: el modelo del defecto de tamaño crítico y el modelo de la cámara ósea de titanio, en ambos casos, el defecto creado tiene que ser lo suficientemente grande como para que el hueso adyacente no pueda rellenarlo de manera espontánea^{151,152}.

La mayor parte de las investigaciones de osteoconducción de biomateriales *in vivo* han sido realizadas utilizando el modelo del defecto de tamaño crítico, de esta manera el hueso neoformado es evaluado a medida que progresa desde las paredes y suelo del defecto hacia el material.

En cirugía oral, el hueso neoformado tiene que crecer en una dirección vertical emergiendo de la superficie del hueso alveolar¹³⁶. El modelo de la cámara de titanio es más apropiado para cuantificar la regeneración vertical del hueso, en éste se introducen unas barreras en el defecto óseo que impiden la formación lateral del hueso y permiten su crecimiento solo de una manera vertical al suelo del defecto y hacia el cuerpo del biomaterial como se ve ilustrado en la figura^{153,154-156}.

Hemos desarrollado y probado un material que combinara características de reabsorción y osteoconducción, hemos diseñado y sintetizado un nuevo tipo de cemento de DCPD/ β -TCP que fragua utilizando una solución de ácido glicólico (DCPD/ β -TCP/GA) y muestra propiedades fisicoquímicas y mecánicas interesantes. El ácido glicólico es empleado en la reacción de fraguado del cemento por su capacidad para estimular la secreción de la interleukina 6 que es un factor importante en el remodelado óseo y puede beneficiar las propiedades biológicas del cemento aumentando su velocidad de reabsorción¹⁵⁷, con este cemento se fabricó un granulado

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

que luego injertamos en unas cámaras de titanio adaptadas a la calota de un grupo de conejos y se evaluó a la capacidad regenerativa de hueso de este nuevo biomaterial.

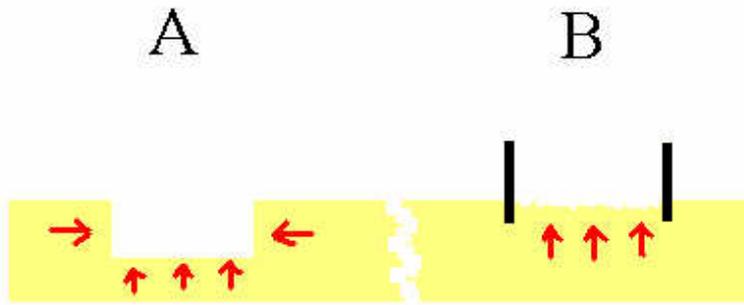


Fig. 43. Representación esquemática de las dos posibles formas de evaluar la regeneración ósea in vivo: a) regeneración ósea con una dirección indefinida, y b) regeneración ósea vertical.

El tejido óseo es representado como el fondo amarillo, las direcciones del crecimiento con las flechas rojas y los obstáculos utilizados para limitar el crecimiento del hueso se representan como las líneas negras de trazo grueso.

5. JUSTIFICACIÓN

5.JUSTIFICACIÓN

Los biomateriales son todos aquellos compuestos orgánicos o inorgánicos, que son capaces de sustituir partes del organismo humano. Cuando los tejidos vivos comienzan a envejecer o sufren un trauma o enfermedad, es obligado el cambio, sustitución o restitución del mismo. El reto que tiene ante sí el diseño de biomateriales nace del hecho de tener que reemplazar a tejidos vivos cuyas propiedades físicas son el resultado de milenios de evolución y optimización natural, con la particularidad de que el tejido vivo tiene la capacidad de crecer, de regenerarse y de repararse en caso de sufrir daño.

El estudio de la obtención de biomateriales es uno de los temas de investigación que actualmente consumen más medios económicos y humanos junto con el de las investigaciones sobre el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. El poner a punto materiales que no tengan ninguna reacción perjudicial con los tejidos vivos, y que, además, posean buenas propiedades mecánicas y químicas, supone uno de los retos tecnológicos y humanos más importantes.

Deben responder a un compromiso en sus propiedades resultante de la conjunción de varios factores físicos, fisiológicos, clínicos y técnicos, que deben ser tenidos en cuenta a la hora de su diseño con el fin de lograr un óptimo que se aproxime a la estructura viva a reemplazar, aunque existen materiales que cumplen amñliamente las condiciones de tipo mecánico, son muy pocos los que satisfacen todas las requeridas ⁴².

La principal condición que tiene que cumplir un biomaterial es la de la biocompatibilidad, es decir, no producir reacciones de rechazo por parte de los tejidos vivos, pero un material es biocompatible, si es capaz de favorecer los procesos vitales de las células que lo rodean, otra condición necesaria del biomaterial que posea unas condiciones mecánicas, de módulo elástico, resistencia a la tracción o a la compresión, módulo viscoso, etc., quedarán similares a las del tejido óseo que se pretenda sustituir ⁴¹, sin embargo, como ya hemos mencionado anteriormente,

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

las condiciones ideales de los biomateriales destinados a la regeneración ósea han variado desde los requisitos iniciales de biocompatibilidad y osteoconducción y, deben estimular una respuesta biológica y celular adecuada y deben ser reemplazados de forma progresiva por nuevo tejido^{39,158}.

El empleo de materiales sintéticos mejora en parte las desventajas que presentan los injertos autólogos (material ideal) y además aportan otras ventajas como el empleo de sustancias activas de liberación local, siendo usados como vehículo para la liberación de sustancias farmacológicamente activas^{39,45-48}, otras de las ventajas de algunos materiales sintéticos, como es el caso de los fosfatos cálcicos, es la posible incorporación de iones a su estructura, dando excelentes resultados y demostrando la capacidad de desarrollar el comportamiento biológico de sus homólogos sin sustitución y permitiendo la alteración de ciertas propiedades físico-químicas^{39,49}, lo que sería objeto de otro estudio más concreto.

La incorporación de los implantes osteointegrados en el campo de la odontología ha resultado ser una solución fiable que se emplea de una manera habitual en la práctica diaria. La inserción de implantes implica un trauma óseo que tenderá a cicatrizar de forma natural con la aposición de nuevo hueso, pero la ausencia de hueso en determinadas zonas estratégicas para la inserción de los implantes desemboca, en muchos casos, en fracaso de la técnica, para ello se busca mejorar la regeneración ósea mediante materiales osteoinductivos, osteoconductores u osteogénicos.

Nuestra hipótesis analiza la regeneración ósea del hueso con un material, la brushita, que, según la hipótesis de trabajo, permitirá obtener materiales osteoconductores con mejores propiedades físico-químicas, obteniéndose una buena regeneración ósea *in vivo*.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1- Materiales de experimentación

6.1.1- Preparación de la fase sólida del cemento

6.1.1.1- Síntesis del fosfato tricálcico-beta

6.1.1.2- Síntesis del polvo de cemento

6.1.2- Preparación de la fase líquida del cemento

6.1.2.1- Soluciones de ácidos carboxi

6.1.2.2- Síntesis de geles y soluciones de sílice y C4S

6.1.3- Tratamiento de los cementos con fluidos supercríticos

6.1.4- Preparación de los cementos de brushita

6.2- Animales de experimentación

6.2.1- Protocolo experimentación

6.2.2- Animales experimentación

6.3- Instrumental

6.3.1- Instrumental para diéresis

6.3.2- Instrumental para colocación de injerto

6.3.3- Instrumental para sinéresis

6.3.4- Instrumental complementario

6.3.5- Material farmacológico

6.3.6- Instrumental histológico

6.4- Método

6.4.1- Cirugía de colocación de injertos

6.4.2- Estudios in vitro e in vivo

6.4.3- Análisis de las muestras biológicas del hueso regenerado

6.5- Análisis estadístico

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. MATERIAL DE EXPERIMENTACIÓN

Los siguientes reactivos fueron utilizados para producir el polvo del cemento:

- Carbonato cálcico
- Dihidrogeno fosfato cálcico dihidrato
- Fosfato monocálcico
- Pirofosfato sódico.

Se han utilizado reactivos de la casa Sigma Aldrich. Para preparar las soluciones ácidas que reaccionan con el polvo del cemento se utilizó:

- Ácido glicólico (Casa comercial Sigma-Aldrich)
- Ácido acético (Casa comercial Merk)
- Ácido cítrico (Casa comercial Panreac)

Para producir las soluciones y geles de sílice se utilizó:

- Ácido fosfórico
- Aerosil^R (aditivo para mejorar la viscosidad de las resinas epoxi, poliéster y otros fluidos)
- Hidróxido de sodio (Panreac)
- Condroitin sulfato, (Sigma-Aldrich).

Todos los reactivos fueron adquiridos con la mayor pureza.

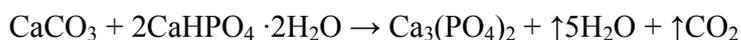
El cemento se fabricó preparando una fase líquida y una fase sólida que se mezclaron posteriormente.

6.1.1- PREPARACIÓN DE LA FASE SÓLIDA DEL CEMENTO

a. Síntesis de fosfato tricálcico beta

Para fabricar el fosfato tricálcico β se homogenizó con un mortero una mezcla estequiométrica de carbonato cálcico e hidrofosfato cálcico dihidratado y se calentó a 900°C durante 14 horas en un horno (Heraeus; Hanau kr-170).

La reacción química de formación del fosfato tricálcico beta viene dada por la ecuación:



La composición del producto obtenido se analizó con difracción de rayos X (difractómetro X'Pert PRO^R de Pananalytical) comprobándose que se había sintetizado fosfato tricálcico β puro.

b. Síntesis del polvo de cemento

Para obtener el polvo del cemento, se mezclaron manualmente y a temperatura ambiente, en un mortero dentro de una cámara de flujo laminar, 1,428 g de fosfato tricálcico con 0.8 g de fosfato monocálcico y 0,012 g de pirofosfato sódico.

El polvo de cemento obtenido se almacenó en una secadora hermética (RHX 5C^R, de Galaxiser Pharmaceutical Machinery Company) con gel sílice para mantenerlo en un ambiente seco ya que el cemento se degrada con la humedad.

6.1.2.- PREPARACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA DEL CEMENTO

a. Soluciones de ácidos carboxi: Ácido Cítrico Ácido Glicólico Ácido Acético, Ácido Fosfórico.

Se usan estos ácidos ya que mejoran, sobre todo en el caso del ácido cítrico, las propiedades mecánicas del cemento final^{1,3}.

Se prepararon soluciones de ácido acético, glicólico y cítrico a concentraciones de 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M; 2,0 M; 2,5 M; 3,0 M y 3,5 M. El análisis de pH de las soluciones se realizó mediante un pH-metro digital Mettler Toledo (MP230), y también se calculó matemáticamente a través del pKa específico de cada ácido.

Las lecturas del pH-metro fueron contrastadas con el pH teórico correspondiente a la molaridad de cada solución ácida. El pH teórico fue calculado a partir del pKa si HA es un ácido débil, A- es su catión y la formula de ionización del ácido se escribe:



La constante de acidez (Ka) se define: El pKa es una constante característica de cada ácido, y valor para los ácidos empleados en nuestros experimentos se da en la tabla 7, estando pKa en base logarítmica 10 y Ka su número natural correspondiente.

<u>PKa de los ácidos carboxi investigados</u>				
	<u>Ácido Acético</u>	<u>Ácido Glicólico</u>	<u>Ácido Cítrico</u>	<u>Ácido Fosfórico</u>
pKa1	4.75	3.83	3.15	2.12
pKa2	-	-	4.77	7.21
pKa3	-	-	5.19	12.7

Tabla. 7. PKa de ácidos utilizados (a 2, 1 y 0.5M)

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Cabe destacar que en el caso de los ácidos cítrico y fosfórico solo empleamos su primer pKa ya que pKa 2 y 3 del ácido acético y ácido glicólico no es registrable con este pH-metro.

El valor de la Ka viene dado por la ecuación:

$$K_a = \log^{-1} pK_a$$

Una vez obtenido el valor del Ka de cada ácido se procedió a calcular la concentración de H⁺ en cada solución:

$$[H^+] = \frac{K_a[HA]}{[A^-]}$$

En los ácidos débiles [HA] = la molaridad del ácido y [A⁻] = 1-[H⁺] como [H⁺] = [A⁻] resulta:

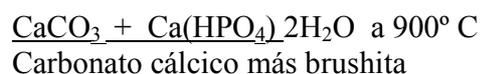
$$K_a = \frac{[H^+][H^+]}{1-[H^+]} = \frac{[H^+]^2}{1-[H^+]}$$

Una vez obtenido el valor [H⁺], se obtiene el pH mediante la ecuación que lo define, la ecuación de Sorensen¹⁶⁸, de este modo se puede calcular el pH de cada solución ácida en relación a su molaridad.

$$pH = \log [H^+]$$

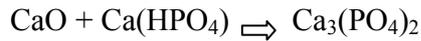
El cemento usado en este estudio será una mezcla de β-TCP y Brushita, siendo la síntesis del mismo:

a. Para sintetizar el β-TCP:



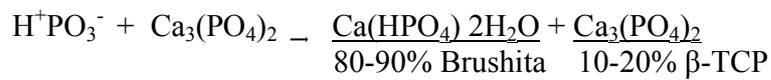
El C se evapora, al igual que el hidrógeno del H₂O, quedando:

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA



La forma β es más reabsorbible que el isómero α (que se consigue sintetizando el TCP a una temperatura de 1200°C), por lo que es el isómero de elección para regeneración ósea.

b. Para sintetizar el material de estudio



Se le añade ácido glicólico como retardante de la reacción de fraguado.

Si se añade Condroitil 4 sulfato (glucosaminoglicano que se encuentra en el hueso), se mejoran sus propiedades inductivas, por ser por sí mismo una sustancia bioactiva y osteoinductiva.

6.1.3 – TRATAMIENTO DEL CEMENTO CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La materia puede encontrarse en distintos estados siendo los más comunes el líquido, el sólido, el gaseoso y el plasmático. El estado en el que se encuentra una sustancia depende al mismo tiempo de su composición, de la presión y de la temperatura, sin embargo, son patrones ligables, así el efecto de aumento o disminución de presión va ligado al de la temperatura y viceversa.

Algunos compuestos y elementos pueden tener un estado adicional llamado estado supercrítico que reúne las propiedades de los líquidos y de los gases, ocurre cuando un gas se encuentra a una presión tan alta que debería convertirse en líquido, pero le resulta imposible por la alta temperatura a la que se encuentra.

En el diagrama de fases, la presión y temperatura mínima a la cual una sustancia pasa al estado supercrítico se denomina punto crítico. Sustancias tan comunes como el agua, el metanol o el dióxido de carbono, cuando se les somete a presiones y temperaturas por encima de unos ciertos valores, adquieren simultáneamente propiedades de los líquidos y de los gases que los hace muy útiles para la obtención, separación, purificación o tratamiento de muchos productos.

La cuestión esencial es que los así denominados *fluidos supercríticos* poseen densidades próximas a la de los líquidos, por lo que disuelven muchas sustancias, mientras que, como gases que realmente son, pueden penetrar fácilmente dentro de materiales porosos y arrastrar fuera la sustancia que nos interese.

El CO₂ pasa al estado supercrítico cuando esta a una temperatura superior a los 31,1 °C y por encima de 73,8 bar de presión. En el estado supercrítico el CO₂ tiene propiedades únicas que pueden ser utilizadas en aplicaciones como extracción de moléculas, síntesis de aerogel, tratamientos antisépticos y esterilización de materiales.

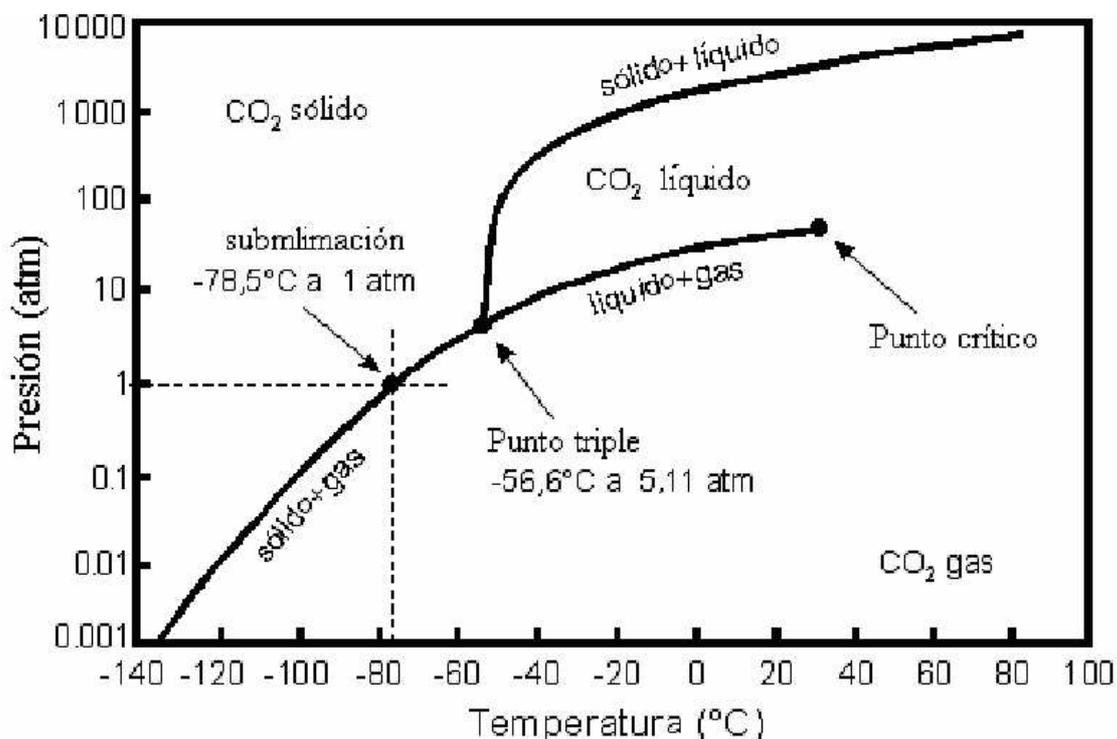


Fig. 44. Diagrama de fases del dióxido de carbono.

Los cuatro métodos más comúnmente utilizados en la esterilización de materiales biomédicos son la exposición a óxido de etileno (EtO), la radiación gamma, la autoclave y el calor seco.

El primero de los métodos mencionados consigue la esterilización mediante la introducción del biomaterial en una atmósfera de óxido de etileno al 100 %.

La esterilización con radiación gamma es realizada mediante la exposición del biomaterial a una radiación mínima de 21,5 KGy, la esterilización con autoclave se consigue al introducir el material en una atmósfera de humedad al 100 % con una temperatura mínima de 121 °C. Finalmente, la esterilización con calor seco se logra al calentar el material a altas temperaturas durante periodos de tiempo que varían entre 160 y 170 °C durante 4-2 horas, respectivamente.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Cada uno de los métodos mencionados tiene sus ventajas y limitaciones a la hora de esterilizar biomateriales, así, el autoclave es un método bastante económico y eficaz de esterilización, pero no se puede emplear con materiales sensibles a la humedad a temperaturas superiores a 121 grados, de la misma manera que el calor seco tampoco se puede utilizar con materiales termosensibles.

El óxido de etileno puede dañar la composición de algunos biomateriales, y es un gas tóxico que a veces tarda mucho tiempo en eliminarse del biomaterial una vez finalizado el proceso de esterilización. Hoy en día, los rayos gamma son la solución ideal para esterilizar un gran espectro de biomateriales que no podrían ser tratados con los otros tres métodos, pero la esterilización con rayos gamma es una técnica costosa que requiere unas infraestructuras especiales de protección para la radiación.

Los fluidos supercríticos de dióxido de carbono constituyen una alternativa ya que han demostrado conseguir una inactivación completa de un amplio rango de organismos bacterianos a bajas temperaturas y en ausencia de disolventes orgánicos o radiación.

Esta técnica ha sido utilizada para esterilizar materiales termolábiles e hidrolábiles como los polímeros biodegradables de ácido poli (láctico-co-glicólico) y ácido poliláctico sin causar daño alguno a las propiedades fisicoquímicas de estos biomateriales³⁰.

Los tratamientos con altas presiones para fines bactericidas se conocen desde los años setenta aunque su uso no fue muy generalizado debido a que las presiones, necesarias para obtener una eliminación eficaz de microorganismos, eran demasiado altas como para ser practicadas a niveles industriales.

El tratamiento con fluidos supercríticos de dióxido de carbono (SC-CO₂) podría convertirse en una alternativa relevante a los costosos tratamientos de altas presiones para la inactivación microbiana y esterilización en el campo biomédico.

La presión hidrostática necesaria para conseguir la inactivación microbiológica esta entre 2000 y 7000 bar. Empleando condiciones de SC-CO₂ con presiones entre 250 y 300 bar y temperaturas entre 35-75 °C ha conseguido reducir bacterias y esporas como *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, y *B. coagulan*^{64,65,134}, en estudios mas recientes, se consiguieron reducciones de 7 órdenes de magnitud para bacterias Gram Negativo, Gram Positivo y esporas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *B. subtilis*¹³⁵.

Los tratamientos con SC-CO₂ tiene un efecto letal también sobre células de hongos como *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, y sobre algunos virus como inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), Sindbis, polio Sabin tipo I, y virus de la pseudorabia (PRV)^{63,64}.

Los tratamientos con SC-CO₂ se pueden utilizar para eliminar las grasas en xenoinjertos y aloinjertos óseos, dejando la microporosidad del hueso más accesible y aumentando la osteoconducción³³, también se pueden utilizar los fluidos de SCCO₂ para eliminar contaminantes de biomateriales poliméricos como por ejemplo las prótesis de ligamento cruzado anterior de poliéster³⁵.

Los nuevos biomateriales para las terapias relacionadas con los tejidos óseos aportan polímeros, proteínas y moléculas orgánicas e inorgánicas que mejoran sus propiedades biológicas físicas y químicas. El uso de estos nuevos materiales limita en muchas ocasiones los métodos de esterilización con los que se pueden tratar previo a su aplicación *in vivo*.

La esterilización por temperatura puede utilizarse con sólidos como la apatita y el poliláctico, pero no se puede emplear con otras sustancias como las soluciones por que las degrada, además muchos biomateriales son termosensibles y por ello la esterilización térmica húmeda o seca puede destruirlos o alterar sus propiedades biológicas³⁰, por este motivo, hoy en día muchos biomateriales como poliésteres, los factores de crecimiento, y proteínas morfogenéticas, solo pueden ser esterilizados con la exposición a radiación gamma 25 (kGy) o al oxido de etileno sin alterar la estructura y las propiedades mecánicas^{38,108}.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Estas técnicas tienen también sus problemas, por ejemplo, se ha demostrado que los implantes óseos de copolímeros PLGA con HAP necesitan al menos 14 días de degasificación después de haber sido esterilizados con EtO. De hecho muchos materiales pueden tener efectos tóxicos significativos después de haber sido tratados con EtO por los problemas que tiene esta sustancia para ser eliminada.

Los rayos gamma por otro lado, son la opción a elegir para esterilizar una amplia variedad de biomateriales.

La ordenanza 11137 de organización de estándares internacionales ISO especifica que la radiación gamma necesaria para asegurar el nivel de esterilización requerido para materiales quirúrgicos es de 21,5 kGy.

Esta radiación no tiene efectos negativos sobre la composición o tiempos de fraguado de los cementos óseos poliméricos, pero sí que reduce el peso molecular de las cadenas poliméricas y empeora su resistencia a la fatiga así como la fuerza de tensión, de hecho todavía no está claro si es mejor utilizar EtO para esterilizar los cementos óseos poliméricos. Además, la radiación gamma altera la viscosidad de biomateriales como el quitosano, que provoca la hidrólisis del ácido poliláctico y necesita unos equipos y unas medidas de seguridad costosas.

La esterilización por ultrafiltración se emplea con los monómeros líquidos de los cementos de acrilato, porque estos no toleran la irradiación, pero los materiales con alta viscosidad como las soluciones de quitosano no pueden ser tratados con esta técnica, la mayoría de los biomateriales son sensibles y deben de ser esterilizados con métodos especiales.

Hay poca información en la literatura sobre las posibles técnicas de esterilización para los cementos de fosfato cálcico. El calor seco, el EtO y la autoclave son métodos inapropiados para tratar los cementos de hidroxiapatita ya que la autoclave provoca una agregación prematura de los gránulos del cemento, además prolongan el tiempo de fraguado

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

y reducen dramáticamente la fuerza de tensión diametral, a pesar de producir prolongaciones en el tiempo de fraguado y disminuciones en la fuerza de tensión diametral a medida que se aumenta la dosis, la radiación gamma es la única técnica aceptable hasta el momento para esterilizar los cementos de hidroxiapatita ya que es la única que no produce cambios en su estructura y composición¹³⁹.

La esterilización de biomateriales, y en concreto los destinados a la regeneración ósea y tisular, como los cementos de fosfato cálcico, es hoy por hoy un reto, ya que estos materiales son termosensibles e hidrosensibles.

La opción real de esterilización para muchos biomateriales por el momento es la radiación gamma, con sus consecuentes problemas técnicos y de costo, así como posibles efectos adversos que puede tener sobre las propiedades mecánicas y biológicas de los injertos óseos, por estas afirmaciones, hemos decidido evaluar la posibilidad de emplear los fluidos SC-CO₂ como tratamiento alternativo para la desinfección y esterilización de cementos dentales y óseos^{38,63,64,72,139}.

6.1.4- Preparación de los cementos de brushita

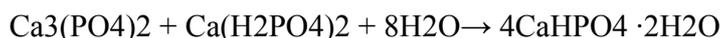
Se pesan 500 mg del polvo de cemento en una placa petri de 10cm de diámetro (Soria Greiner s.a.) y se vierte la solución o fase líquida sobre el centro del cúmulo de polvo de cemento mediante una micropipeta (Transferpette®), se espera a que el líquido sea absorbido por el polvo, y se mezcla la muestra a temperatura ambiente con una espátula durante 30 segundos hasta conseguir una pasta homogénea, los cementos se prepararon utilizando 3 proporciones diferentes de polvo líquido (P/L):

500 g/0,195 ml (2.56 g/ml)

500 g/0,290 ml (1.72 g/ml)

500 g/0,390 ml (1.28 g/ml)

La reacción de fraguado del cemento es la siguiente:



Se fabricaron pastillas introduciendo la pasta del cemento en cilindros de plástico con diámetro interior de 8 mm evitando la formación de burbujas introduciéndolo a presión para conseguir una distribución homogénea del material, posteriormente el cemento fue retirado después de haber fraguado obteniéndose pastillas con 8 mm de diámetro y 4 mm de espesor. Las pastillas se dejaron 48 h a temperatura y humedad ambiente antes de ser utilizadas para medir la fuerza de tensión diametral en seco, se tuvo en cuenta la fuerza de tensión diametral en condiciones de humedad, (más representativa clínicamente), fue analizada después de dejar las pastillas del cemento 24 horas a 37 °C sumergidas en agua destilada.

Para los análisis de difracción de rayos-X y DSC (Calorímetro diferencial de barrido) las muestras de cemento preparado fueron pulverizadas con un mortero. En el análisis de microscopia electrónica de barrido se examinaron las superficies de fractura de las distintas muestras.

Las medidas de tiempo de fraguado se realizaron introduciendo la pasta recién hecha en un cilindro de plástico de 1.5 cm de diámetro y 1 cm de longitud.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Los cilindros que se emplearon para preparar las pastillas de cemento fueron siempre de plástico, ya que cuando se intentó usar elementos de cristal o metal, el cemento se adhería a la pared y resultaba difícil de retirar.

El β -TCP se sintetiza con fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) y carbonato cálcico (CC) a 900 °C durante 14 horas, fosfato monocálcico deshidratado (MCPA) y ácido cítrico; confirmando la pureza del beta-TCP por análisis de difracción de rayos X.



La distribución del tamaño de las partículas de β -TCP y el polvo de MCPA se caracterizó usando una luz de difracción de laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments; Spring Laner, South Malvern, Worcertershire, UK). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y el diámetro medio de las partículas de β -TCP y MCPA estuvieron comprendidos entre 6.26 y 7.7 micrómetros y entre 5.8 y 51.3 micrómetros, respectivamente.

Para comparar, se usó una fórmula de cemento previamente publicada (cemento A) y se comparó con un cemento con exceso de β -TCP (cemento B).

El polvo de los dos cementos se preparó en condiciones asépticas en las siguientes cantidades:

Cemento 1 (27): 1.428 gramos de β -TCP mezclado con 0.8 g. MCPA

Cemento 2: 1.928 g. de β -TCP mezclado con 0.8g. MCPA

Ambos polvos de cemento fueron mezclados manual y homogéneamente en un mortero durante 10 min.

Las muestras de cemento se mezclaron con 500mm de solución de ácido cítrico con un ratio de 1.7 y se usó un molde para permitir crear muestras cilíndricas (12 mm x 6mm de diámetro) para su caracterización.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

La realización fue: 500 mg de β -TCP se usaron 220 μ l de ácido glicólico solución 1 Molar mezclándose con una solución de ácido glicólico 1M en una proporción polvo a líquido de 1.72 g/ml.

$$1 \text{ M ácido glicólico} \longrightarrow \frac{0.869 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$$

$$9.13 \text{ ml H}_2\text{O}_\text{ } \longrightarrow 0.87 \text{ ML glicólico}$$

Todo se realizó en condiciones asépticas y llevándose a cabo su esterilización con fluidos supercríticos.

6.2- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

6.2.1. Protocolo

Se escogió la implantación del protocolo por el comité ético de experimentos animales de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), llevándose a cabo los experimentos en concordancia con las directrices descritas por " The European Communities Council Directive" del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/CEE), adoptando las medidas adecuadas y enfocadas a minimizar el dolor y el disconfort de los animales.

6.3.2. Animales

Se usaron 10 conejas de la cepa Nueva Zelanda, adultas, de entre 6 y 8 meses de edad, y con un peso de media 3,5 Kg (entre 2,650 Kg y 4 Kg) para este estudio, según la legislación vigente.

Los animales fueron suministrados por el Animalario de la UCM (Centro de Asistencia a la Investigación en la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Consejería de Economía y Empleo de la Comunidad Autónoma de Madrid como centro de cría, suministrador y usuario de animales de experimentación, que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal) y se acomodaron y mantuvieron estabuladas en jaulas individuales en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid durante el período de experimentación, llevado a cabo cuando aún no se encontraba en funcionamiento el animalario de la URJC.

Dos de ellas fallecieron durante el proceso del estudio.

Las condiciones de estabulación del Animalario de la UCM son:

- Temperatura: 22-24°C
- Luz: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad
- Humedad: 55-70%
- Ventilación: 15 renovaciones del aire por hora.
- Alimentación: dieta de mantenimiento de Panlab S.L.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

- Agua: *ad libitum*



Fotos 1 y 2. Conejos de experimentación

ANIMAL	PESO (GRS.)
1	2.650
2	2.310
3	3.890
4	3.530
5	3.785
6	3.545
7	4.000
8	2.790
9	2.560
10	3.450

Tabla 8. Pesos animales experimentación

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA



Foto 3. Peso animal experimentación

6.3 INSTRUMENTAL DE EXPERIMENTACIÓN

6.3.1. Instrumental para **diéresis**:

- Bisturí con hoja del nº 15
- Periostotomo
- Separadores

6.3.2. Instrumental para la **colocación del injerto** (no usado en este caso por ser injerto subperióstico):

- Motor quirúrgico con depósito de suero fisiológico
- Contraángulo
- Trefina de 1 cm de diámetro
- Fresa redonda montada en pieza de mano

6.3.3. Instrumental para **sinéresis**:

- Porta-agujas tipo Mayo
- Pinzas de disección
- Sutura reabsorbible tipo dexon para planos perióstico y muscular y reabsorbible tipo seda para plano cutáneo, de tres ceros.

6.3.4. Material **complementario**:

- Suero salino
- Guantes estériles
- Mascarillas
- Paños estériles
- Antiséptico de superficie tipo Betadine

6.3.5. Material **farmacológico**:

- Xilacina comercializada bajo el nombre de Rompún^R
- Pentobarbital comercializado bajo el nombre de Doletal^R
- Cemento 1

- Cemento 2



6.3.6. Instrumental para estudio histológico:

- Microscopio óptico convencional
- Microscopio óptico con luz polarizada (Leica Microsystems GMBH)
- Líquidos de fijación (formol al 10% tamponado con bicarbonato cálcico)
- Solución fijadora al 2.5% de glutaraldehído
- Líquidos de inclusión (polímeros de metacrilato)
- Portaobjetos de metacrilato.
- Material para tinción de las muestras con azul de metileno y fuchina básica
- Sistema de corte y pulido para tejidos duros (EXAKT)
- Sistema de captura e imágenes histológicas, compuesto por una cámara de video y transferencia de la imagen al ordenador.
- Microcortadora de oro-paladio
- Software INCA para histomorfometría
- Microscopio electrónico de barrido Hitachi S3000-N VP-SEM

6.4- MÉTODO

El fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), el carbonato cálcico (CC), el fosfato monocálcico deshidratado (MCPA) (SIGMA-Aldrich) y ácido cítrico (Panreac: 14018) se adquirieron y usaron sin más purificación.

El β -TCP se sinteticó por calor y mezcla de CC y DCPD a 900° durante 14 horas. La pureza del β -TCP se confirmó mediante análisis por difracción de rayos X.



La difracción de rayos X (XRD) para las muestras de material fueron grabadas usando radiación monocromática Cu K α por el difractómetro (Philips, Almelo, The Netherlands). Los datos fueron colectados desde $2\theta = 20^\circ$ - 40° con un tamaño de 0.02° y un tiempo normalizado de 1 s/step.

La composición de fase se chequeó usando “The International Centre for Diffraction Data reference patterns” para α -TCP (PDF Ref. 09-0348), β -TCP (PDF Ref. 09-0169), monetita (PDF Ref. 09-0080) y brushita (PDF Ref. 09-0077).

Las mediciones con difracción de rayos X se tomaron por triplicado para cada preparación de cemento y no se observaron diferencias.

La densidad “strut” (ρ_s) de ambos cementos se midió por triplicado usando un picnómetro de helio (Accupyc 1330, Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA, USA).

La densidad aparente (ρ_a) de las muestras por triplicado se calculó desde su medida de peso y porcentaje de porosidad (P) y se calculó usando esta ecuación²:

$$P \approx \frac{\rho_s - \rho_a}{\rho_s} \times 100$$

6.4.1 Cirugía de colocación de injertos

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Las conejas se asignan aleatoriamente en dos grupos experimentales.

Tras ser inmovilizados en un cepo de contención, todas las conejas fueran anestesiadas con una dosis intramuscular de 0,75 mg/kg de ketamina (Imalgene 1000, Rhone Merieux, Francia) y 0,25 mg/kg de xilacina (Rompun^R; Bayer, Leverkusen, Alemania) para lograr su anestesia general.

Tras el rasurado de la región craneal de las conejas entre los pabellones auriculares se desinfectó pincelando la zona con la superficie cutánea mediante tintura de yodo y alcohol al 70%.

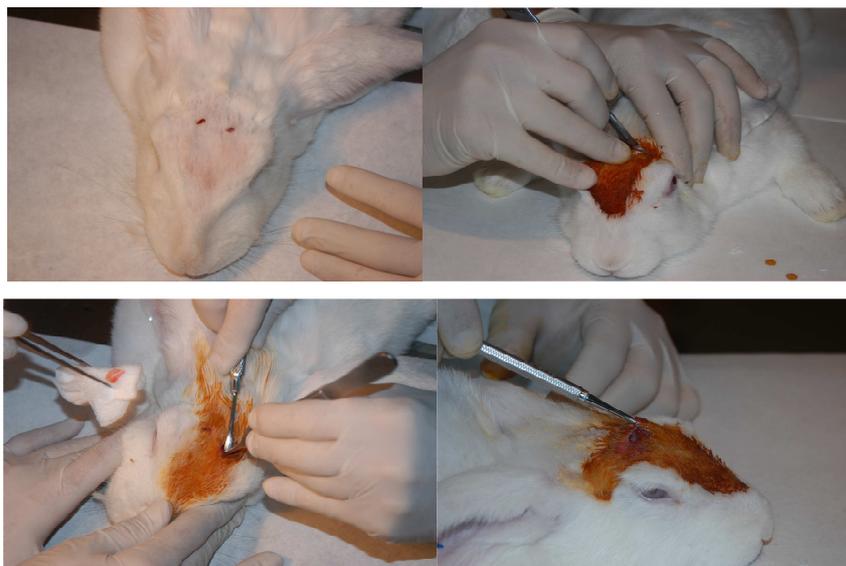
Los animales se colocaron en posición de decúbito prono previo a la operación quirúrgica.



Fotos 3 y 4. Anestesia animales de experimentación

Se les practicaron dos incisiones profundas, hasta el tejido óseo, bilaterales de 5 mm de longitud en la calota, en dirección coronal, se separó el periostio de la superficie ósea introduciéndose un periostotomo para elevar el periostio de la calota bajo la piel sin aumentar el tamaño de la incisión a través de una disección tunelizante.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA



Fotos 5-8. Incisiones



Fig. 9 y 10. Incisiones realizadas

Intraoperatoriamente, las preparaciones de cemento se mezclaron como se describió anteriormente y se inyectaron a través de la incisión con unas jeringas estériles, los cementos fueron depositados *in vivo*.

En cada conejo, una de las incisiones se rellenó con uno de los cemento de brushita que se prepararon y el contralateral con aproximadamente el mismo volumen de otro cemento de brushita preparado a distinta concentración.

- Cemento 1: Muestra con menos β -TCP + MCP
1,428 gr de β -TCP + 0,8 gr. de MCP + 0,012 gr. NaPy
- Cemento 2: Muestra con más β -TCP + MCP

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

1,828 gr de β -TCP + 0,8 gr. de MCP + 0,012 gr. NaPy

Este procedimiento se realizó de forma aleatoria, no siempre fue colocado el mismo material en el mismo lado de la calota.

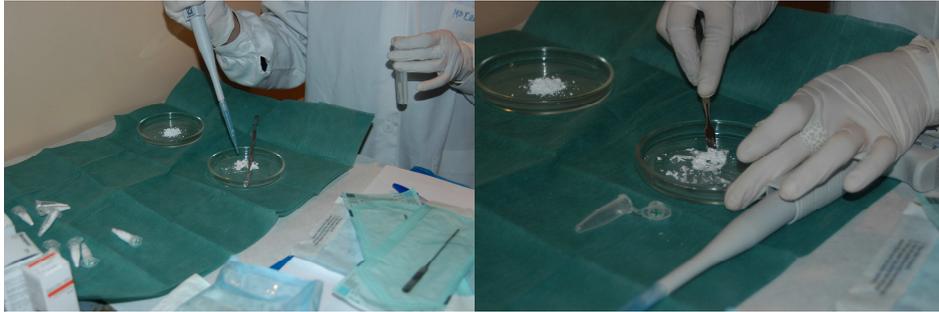


Foto 11 y 12. Mezcla cementos

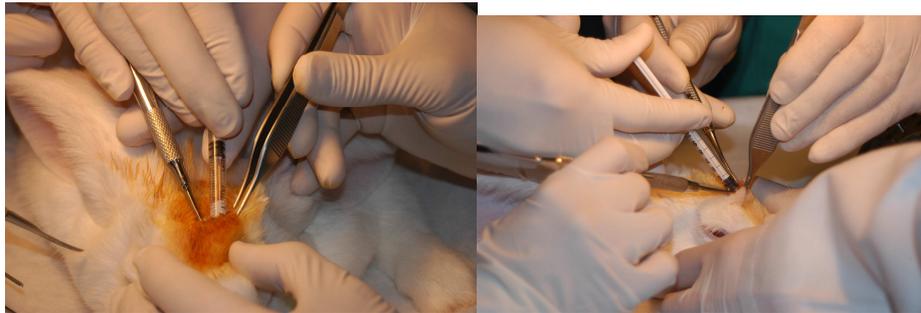


Foto 13 y 14. Inserción cementos en animales

Se suturó la herida por planos y la incisión se cerró con hilo de sutura sintético monofilamento de 3 ceros.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

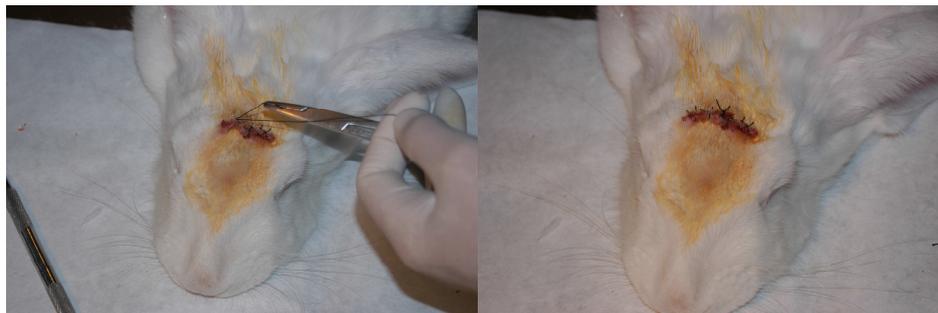


Foto 15 y 16. Sutura

El material presentó un buen manejo intraoperatorio y todos los animales se recuperaron bien de las cirugías sin registrarse complicaciones locales o generales.

En el postoperatorio se establece tratamiento antibiótico (Terramicina[®]) en el agua de bebida para prevenir infecciones postquirúrgicas.

A los 15 días se les inyectó un vial de tetraciclinas por vía subcutánea como marcador de crecimiento óseo (Vetranal[®]) consistente en tetraciclina hidrócloride, a razón de 0.25cc por kilo de peso.

Recordemos que la expresión de las proteínas marcadoras de pre-osteoblastos a osteoblastos, que aparecen cuando se inicia la mineralización, resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica⁸⁻¹¹³.

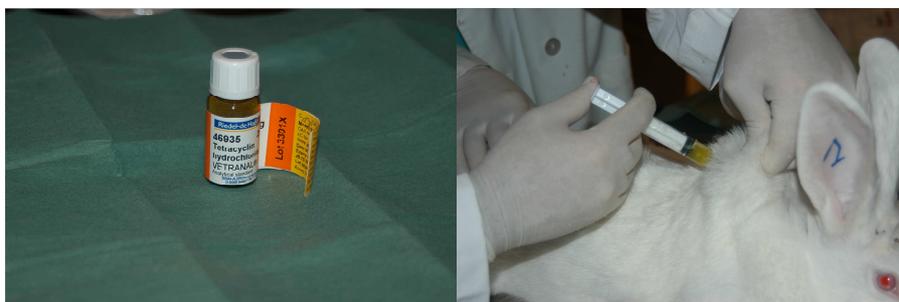


Foto 17 y 18. Inyección tetraciclina

A las 4 semanas más se les inyectó de nuevo un vial de antibiótico como marcador de crecimiento óseo, que en este caso es licirina, calcitonina y tetraciclina, respetando las mismas

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

cantidades de que con la inyección de tetraciclina 4 semanas antes.



Foto 19. Antibiótico marcador

Durante las 8 semanas los conejos recibieron dieta ad libitum. Durante la preparación de todo el proceso, no hubo complicaciones quirúrgicas y después, no se observaron signos de infección postoperatoria.

6.4.2. Estudios in vivo

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Los animales fueron sacrificados 8 semanas después de la intervención de las calotas, con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico IV a dosis letales, (Dolethal®, Vétoquinol, Lure, Francia), y se extrajeron las calotas para su posterior estudio histológico, tomándose después biopsias de las calotas de todos los animales y realizando en todas ellas un defecto circular mediante fresa redonda pequeña en el hueso frontal, para facilitar la orientación antero-posterior de la calota en el estudio histológico.

Se empleó para ello una fresa quirúrgica de carburo de tungsteno y a baja velocidad adaptada a una pieza de mano eléctrica lenta.

El estudio que se llevará a cabo será un análisis con densitometría ósea con radiología para ver la radiopacidad, que es engañosa, porque todos los materiales usados son radiopacos, y se llevará a cabo un estudio morfométrico e histológico.

El equipamiento para el procesado histológico de la muestra constó de:

Sierra de banda Canora industrial

Microcortadora de pulido LS 2 Remet

Máquina de pulido LS 2 Remet

Máquina de vacío Hersil SL

Lámpara de polimerizar Phillips 600 W

Los reactivos usados en el procedimiento fueron:

Formaldehído al 10% tamponado.

Glutaraldehído al 2.5%.

Etanol a concentraciones crecientes: 60°, 70°, 80°, 90°, 100°, e isopropílico 95°

Resina fotopolimerizable 2-hidroxietilmetacrilato Technovit® 7200 VLC (Exact®).

Adhesivo de metilmetacrilato Technovit® 7210 VLC (Exact®).

Azul de toluidina O solución 1% DC Panreac (Barcelona España)⁸⁷.

Los exámenes histológicos fueron realizados por el Departamento de Materiales

Dentales de la Facultad de Odontología de la Universidad de McGill de Montreal, Canadá, siguiendo la técnica descrita para el sistema Exakt®.

La evaluación de la neoformación ósea se realizó mediante microscopía óptica mediante secciones deshidratadas y secciones embebidas en resina, se fijaron las muestras en una solución al 2.5% de glutaraldehído, que se mantuvieron en la nevera durante 7 días, en una solución tampón fosfato con $\text{pH}=7$. Pasados los 7 días de fijación, se procedió a tallar el bloque en la sierra de banda, y a continuación se eliminó el exceso de tejido graso de los bloques tallados mediante bisturí, cada muestra se introdujo en un cestillo etiquetado con el número de muestra. Se lavó al chorro de agua unos segundos para eliminar el exceso de glutaraldehído y se inició el proceso de deshidratación mediante la inclusión de las muestras de hueso en etanol al 60% que se va sustituyendo por alcoholes de mayor concentración hasta terminar con la inclusión en etanol al 100% en la cámara de vacío, estando 24 horas sumergidas en cada una de las concentraciones.

Se prepararon los moldes aplicando una suave capa de spray antiadherente y se incluyeron las muestras en Technovit 100%, las muestras se preinfiltraron durante 24 h. y se infiltraron con resina durante otras 24 horas antes de ser embebidas en 2-hidroxi-etil-metacrilato, una resina para fijaciones a 20°C durante 14 días (Technovit, Leica Microsystems _itr Wetzlar, Germany), para formar bloques listos para cortar, éstas se polimerizaron con luz halógena blanca 24 horas y posteriormente 2 horas de luz UV, se realizó el pulido de cada bloque de metacrilato con discos de 800, 1200 y 2000, y se fijaron en los portas mediante adhesivo de metacrilato obteniéndose secciones de 200-micras de espesor con la microcortadora y posteriormente se redujeron hasta unas 70 micras con la pulidora. Por último, se tiñeron con azul de toluidina.

Una vez incluidas y cortadas, pasamos a la visión microscópica del hueso neoformado usando un microscopio óptico Leica Microsystems (itr, Wetzlar, Germany) y se fijaron con azul de metileno y fuchina básica⁸⁷ para realizar el estudio histológico que permita evaluar las diferencias de calidad entre ambos grupos de estudio

Con los bloques obtenidos se realiza un primer corte grueso y posteriormente, se

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

efectuarán distintos cortes de 200 micras de grosor con la microcortadora de oro-paladio, cada sección obtenida se lija con pulidora hasta conseguir el grosor final de 50-80 micras para su estudio con microscopía óptica.

Para realizar el análisis histomorfométrico, se capturaron imágenes de las muestras con una magnificación de 2x mediante una cámara digital asociada al microscopio.

Las imágenes se analizaron mediante el programa Image J®. De cada muestra biopsiada se analizaron 2 secciones histológicas, de cada sección se obtuvieron dos imágenes representativas del área con el objeto de realizar posteriormente la media de las mediciones resultantes de ambas.

En cada imagen se midió el área total, el área de hueso neoformado y el área de cemento de brushita remanente. Con estos datos se calculó la media de dichos valores.

El microscopio electrónico utilizado para examinar la microestructura de cemento fue Hitachi S3000-N VP-SEM (Hitachi-HT, Wodingham, Jberkshir, UK). Las secciones embebidas en resina se cortaron con microcortadora de oro-paladio. El análisis se llevó a cabo usando un detector Wxford y un software INCA (Oxford Instrumentes, Abingdon, Oxforshire, UK).

Los experimentos *in vitro* se realizaron para poner de manifiesto el efecto de la composición del cemento en el ph del medio circundante, las muestras cilíndricas de cemento se prepararon como se describe anteriormente y se incubaron separadamente en 5 ml de agua destilada a 37°C, midiendo el pH cada hora, hasta 6 horas después.

Con el test de Kolmogorov- Smirnov se comprobó si se cumplían los criterios de normalidad para todas las variables y una t de Student para muestras relacionadas para un valor de confianza del 95%.

Todos los resultados se expresaron midiendo la desviación estándar (SD) y el test T-Student`s, para evaluar las diferencias entre los valores de porosidad e histomorfometría. El test de Pearson se usó para estudiar la correlación entre las gráficas lineales; el análisis de variables se

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

usó para determinar las diferencias estadísticas significativas entre otros valores de medición. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) con un nivel significativo de P menor de 0.05.

6.4.3- Análisis mediante difracción de rayos X

Mediante la **difracción de rayos X** es posible identificar distintas estructuras cristalinas, ya que cuando el haz de rayos X incide en un material sólido, parte de este haz se dispersa en todas direcciones asociados a los átomos o iones que encuentra en el trayecto, pero el resto del haz puede dar lugar al fenómeno de difracción de rayos X, que tiene lugar si existe una disposición ordenada de átomos y si se cumplen las condiciones que vienen dadas por la Ley de Bragg, que relaciona la longitud de onda de los rayos X y la distancia interatómica con el ángulo de incidencia del haz difractado, si no se cumple esta ley, la interferencia es de naturaleza no constructiva y el campo del haz difractado es de muy baja intensidad. Todos los sólidos cristalinos poseen un difractograma característico, tanto cuantitativo como cualitativo, mediante la difracción de rayos X se expresa la relación entre la longitud de onda del haz de rayos X y los planos en el cristal.

En esencia, pues, la *Cristalografía estructural por difracción de rayos X*, consiste en medir las intensidades de la mayor cantidad posible de haces difractados del espectro tridimensional de difracción, obtener de ellas los módulos de los factores de estructura, y de sus valores, mediante algún procedimiento de asignación de fases a cada uno de estos factores, reconstruir la distribución electrónica en la celdilla elemental, cuyos máximos corresponderán a las posiciones atómicas.

Para el análisis estructural del β -TCP se usó un difractómetro Philips X'pert (Cu-Ka radiation, 45 KV, 40 mA) del departamento de Materiales Dentales de la Facultad de Odontología de la Universidad de McGill de Montreal, Canadá

Se ha utilizado la técnica de difracción en polvo.

Para la identificación de los modelos estructurales se empleó los patrones de DRX de la base de datos del "Internacional Centre for Structural Data (ICSD)": β -TCP (ICSD 06191). Se realizó la cuantificación de las distintas fases mediante el análisis de refinamiento de Rietveld.

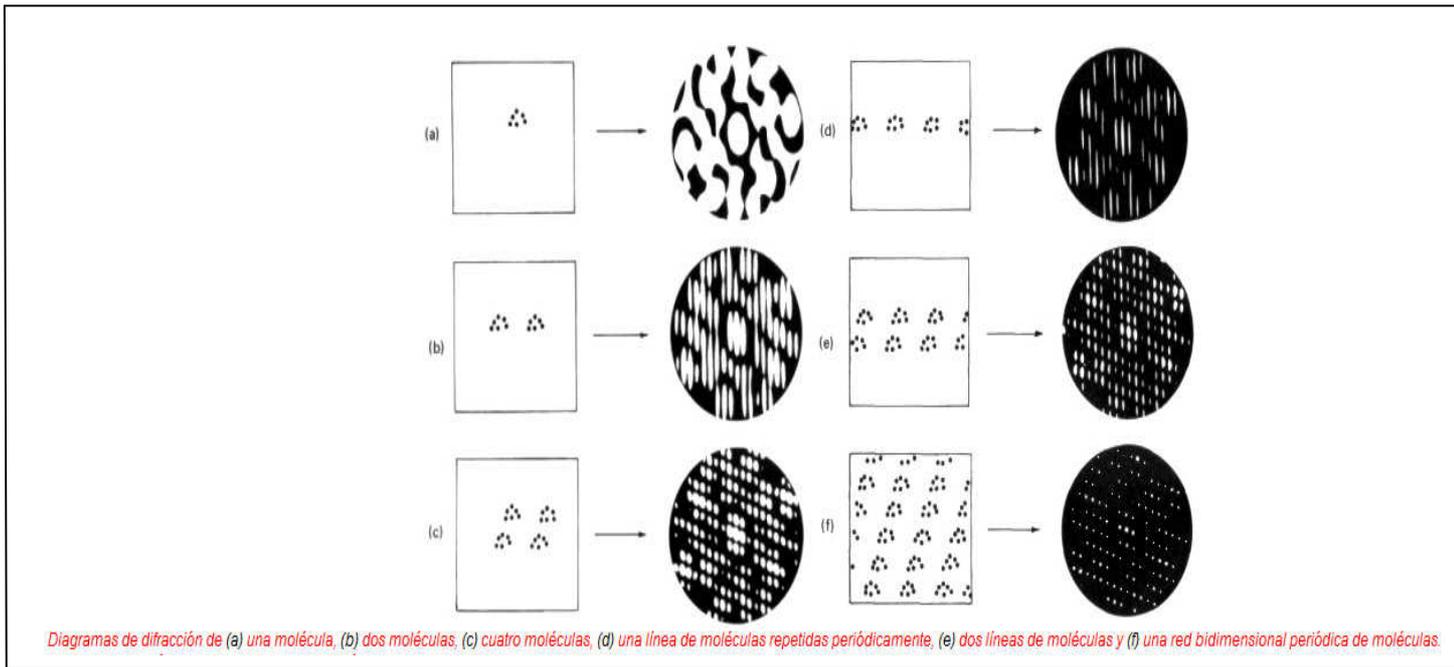


Fig. 45. Diagramas de difracción

6.4.4- Microscopía electrónica de barido.

La **microscopía electrónica de barrido** se llevó a cabo con un microscopio electrónico, haciendo incidir un delgado haz de electrones acelerado con alta resolución sobre una muestra del material consta de un dispositivo que emite un haz de electrones a los que se aplica un voltaje variable, cuando el haz choca con la superficie de la muestra algunos electrones son reflejados como retrodispersados y otros se liberan como electrones secundarios de baja energía, por la dispersión inelástica entre el haz de electrones incidentes y los electrones de los átomos de la superficie de la muestra. Los electrones retrodispersados y los secundarios son recogidos por un contador de centelleo que emite un pulso de luz a la llegada del electrón, la luz emitida es reconvertida a una señal eléctrica y ampliada por el fotoamplificador que pasa a un vídeo amplificador y posteriormente a la pantalla. Utilizando un microscopio electrónico Hitachi S3000-N VP-SEM (Hitachi-HT, Wodingham, Jberkshir, UK) se analizó la morfología de la superficie del material, operando con un voltaje acelerado de 15kV.

Las secciones embebidas en resina fueron recubiertas por una aleación de oro-paladio previo al análisis del destello electrónico a alto vacío, ambos secundarios a que se tomasen las micrografías electrónicas, y el análisis EDX se llevó a cabo usando un detector Oxford y un software INCA (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, UK).

Los experimentos in vitro se llevaron a cabo para determinar el efecto de la composición del cemento en la liberación media de pH, las muestras cilíndricas de cemento (tres muestras de cada cemento), se prepararon como ya se ha descrito, e incubadas separadamente en 5 ml de agua destilada a 37°C, midiendo el pH medio de incubación con un medidor de pH (pH211 miroprocessor Ph meter; Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA) cada hora, y la media fue renovada después de cada medición cada 6 horas.

Para la investigación posterior, la tasa de liberación de H⁺ de la matriz de cemento, la liberación acumulada de H⁺ (Mol/L) por fracción de tiempo (t) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$H^+ \text{ release} = \sum_{i=1}^t \exp(-pH_i) \quad (t= 1, \dots, 5)$$



Foto 20. Microscopio óptico de barrido

La tasa de liberación de H^+ fue examinada para determinar la liberación el mecanismo de liberación de protones. Se usó la ecuación conocida como “ecuación de Peppas” para evaluar la posibilidad de difusión del mecanismo de liberación mediante la ecuación lineal:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

M_t es el total de moléculas liberadas, mientras M_∞ es el total liberado en el tiempo ∞ , mientras que M_t / M_∞ es la fracción de moléculas liberadas en el tiempo “t”, “k” es la constante cinética y “n” es el exponente de difusión que está en el rango de $n=0.5$ (para la ecuación de difusión de Fickian), y $n=1$. En el caso de las muestras cilíndricas $n=0.45$ en lugar de 0.5 y 0.89 en lugar de 1.0. Para verificar el significado de la ecuación lineal, se calculó la regresión (R) y el coeficiente de correlación ajustado (adjusted- R^2)⁷³.

6.5 – ANÁLISIS ESTADÍSTICO

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los estudios fisicoquímicos y en los estudios *in vivo* se realizó con el software del programa Origin 7.0 para Windows Microsoft.

Los valores de densidad mineral ósea y porcentaje de regeneración ósea fueron utilizados para comparar los defectos experimentales con los defectos control. Primero se hicieron los análisis estadísticos descriptivos para ambas poblaciones. Luego se examinó que ambos grupos seguían una distribución gaussiana mediante un test t de student para una sola población con una nivel significativo de $p < 0,05$.

La t de student se obtiene a partir de la ecuación:
$$t \equiv \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

Donde “ \bar{x} ” es el tamaño de la población, “ μ ” es la media de la población es la media de la muestra y “ n ” es la varianza de la población.

Posteriormente, con el valor obtenido de t , en una tabla de intervalos de confianza se contrasta t con el tamaño de la población para obtener el intervalo de confianza

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

La fase de análisis XRD reveló que el cemento A tomaba forma casi de brushita pura, mientras que el cemento B mostraba elevados picos de brushita y de beta-TCP no reactivo. No se encontraron picos de MCPM sin reaccionar en ninguno de los dos cementos.

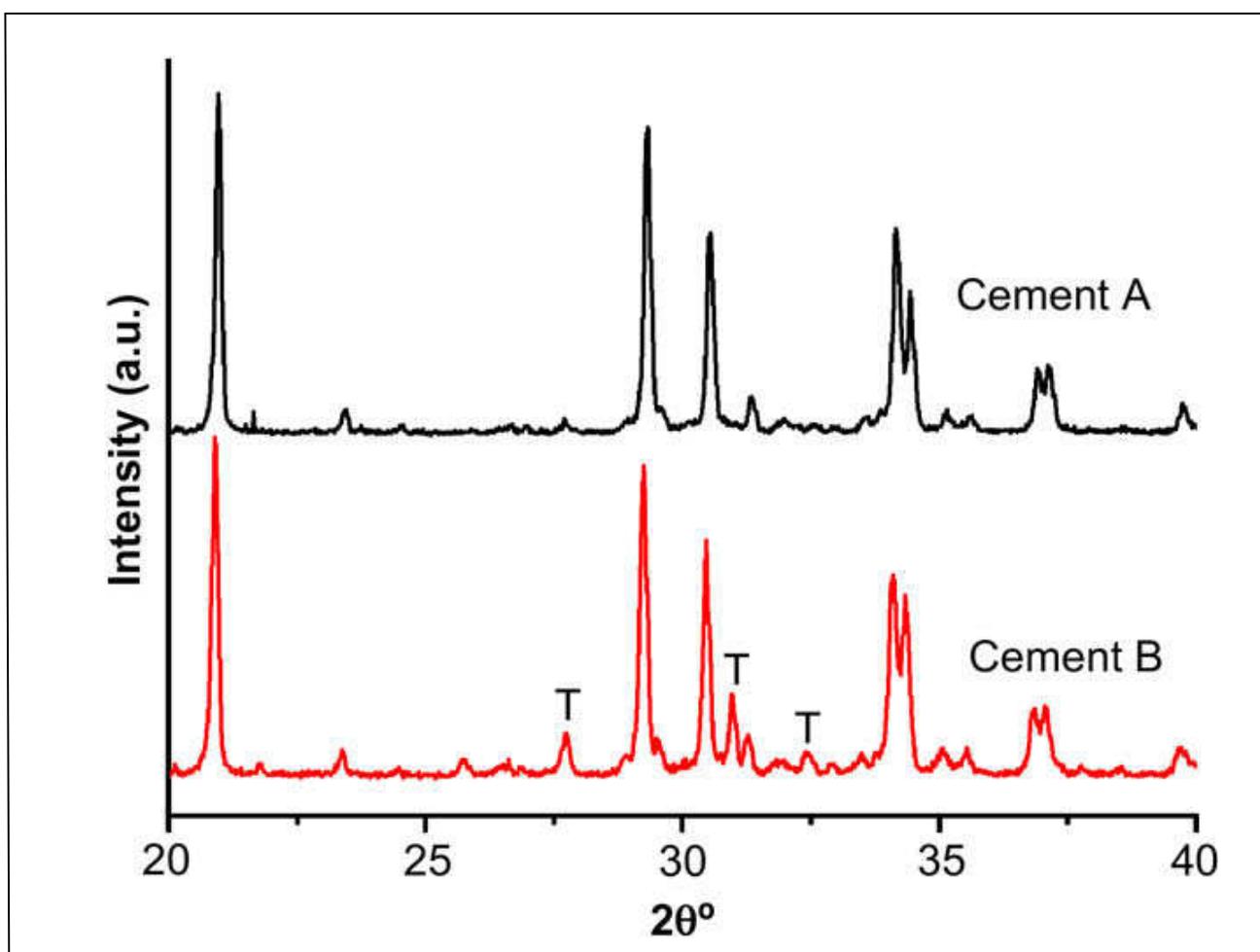


Fig. 46. Espectrometría de los cementos A y B usando una proporción polvo/líquido 1.7. La “T” marca los picos de β -TCP mientras que el resto de picos sin asignación corresponden a los cristales de brushita.

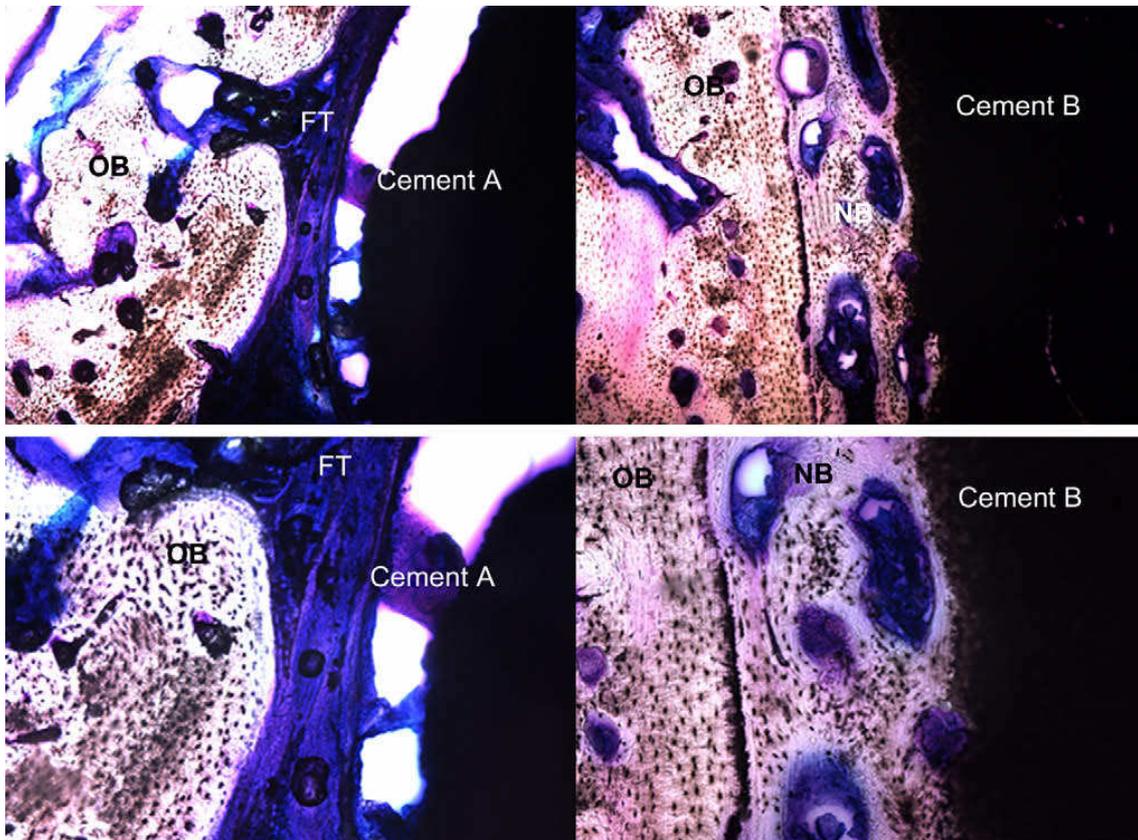
Los datos extraídos con XRD revelan que los cementos se prepararon con exceso de

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

β -TCP tenían una menor cantidad de brushita que el cemento A, y que el resultado final tenía una gran cantidad de β -TCP presente.

La porosidad que se encontró fue ligeramente mayor en las muestras preparadas con exceso de β -TCP (cemento B). Para calcular las diferencias entre la concentración esperada y la concentración de brushita medida en el cemento, se determinó que ambas reacciones del cemento habían sido completas.

La histología de los cementos A y B después de 8 semanas de implantación se presentan en la siguiente figura.



Fotos 21-24. Microscopía de la interfase cemento-hueso magnificación real x5 (tamaño de la muestra 4.0mm x 3.00 mm) y x10 (tamaño de muestra 2.0mm x 1.5 mm). Las secciones corresponden a los distintos cementos implantados en el mismo animal

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

La superficie de hueso en contacto con el cemento A parece haber sido sometida a una ligera reabsorción ósea.

Se observaron signos de reabsorción, tales como oquedades en la superficie original del hueso e invasión de tejido fibroso, además, el biomaterial remanente estaba separado del hueso original por una lámina fibrosa que rodeaba toda la muestra de cemento, sin embargo, se observaba un aumento vertical considerable de hueso en las superficies tratadas con cemento B, así como la formación de nuevo hueso formado entre el material reabsorbido y la superficie de hueso original.

El análisis SEM de los cementos confirmó la observación histológica de que el cemento B estaba en contacto directo con el hueso neoformado.

Comparando las diferencias entre las fotografías tomadas en la interfase del hueso y del cemento B, existe un alto grado de reabsorción de material y de neoformación ósea.

El análisis SEM revela una colocación en “piel de cebolla” de la muestra del cemento A. El análisis EDX del estrato más extremo revela una proporción Ca:P de aproximadamente 1.5 de ratio de B-TCP o de deficiente hidroxiapatita, mientras que el núcleo más interno tiene una proporción Ca:P de aproximadamente 1.0, típico de la brushita. Se observa que el cemento B es más continuo pero tiene una proporción Ca:P de aproximadamente 1.0 en el núcleo interno de la muestra y de aproximadamente 1.5 en las partes más externas.

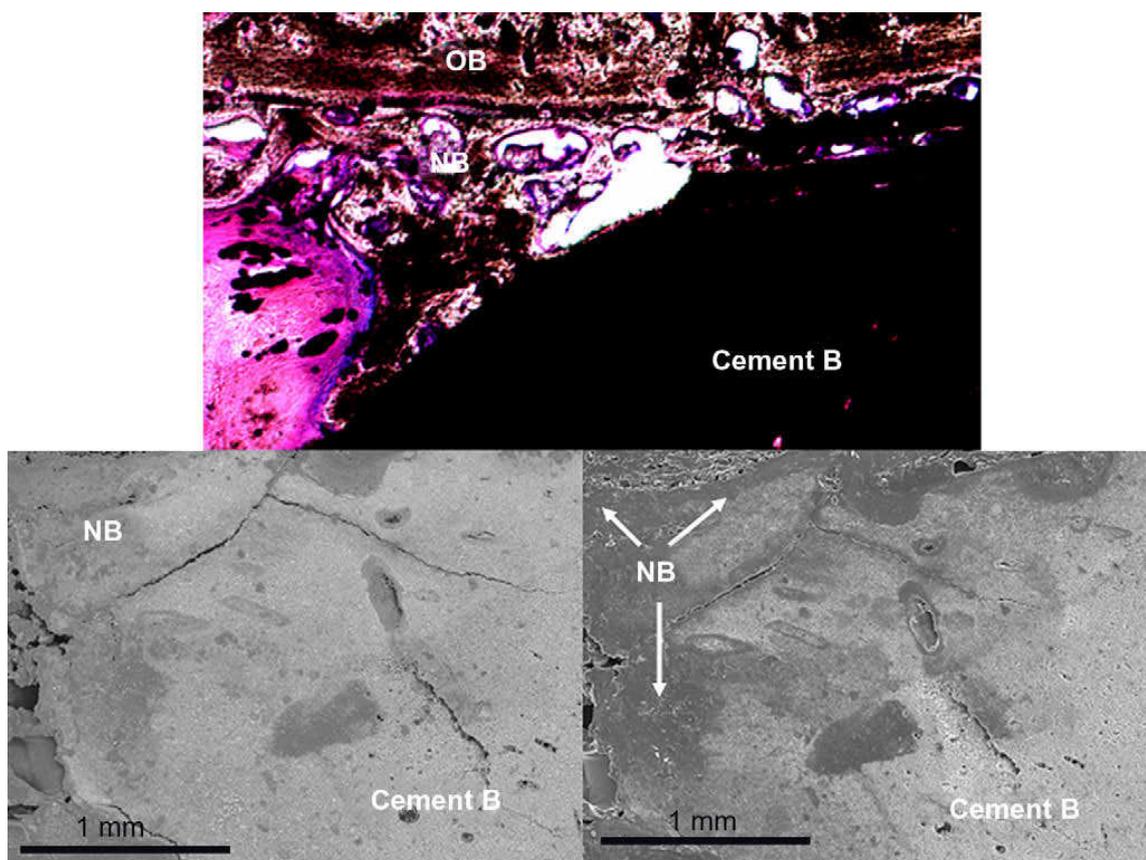


Fig. 25-27. Microscopía óptica de la muestra de cemento B. Las imágenes muestran los restos de cemento rodeando el hueso neoformado (NB)

El análisis histomorfométrico revela un significativo aumento vertical de hueso en las superficie de hueso con cemento B, mientras que no se observó dicho aumento con el cemento A.

Aumento vertical de hueso (valor medio +/- desviación estándar, n=4)				
	Aumento vertical de hueso(mm)		Grosor calavera	Altura implante+aumento vertical hueso
	Altura mínima	Altura máxima		
Cemento A	NR	NR	1.80+/-0.21	3.80+/-1.08
Cemento B	0.215+/-0.090	1.136+/-0.345	2.19+/-0.35	4.94+/-0.75

Tabla 10. Medidas histomorfométricas

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Además, se observó que las zonas de calota tratadas con el cemento A, sufrían una disminución del grosor de la calota, indicando que ocurre una considerable reabsorción de hueso. Las muestras de cemento se sumergieron en agua destilada a 37°C y se monitorizó el pH durante todo el proceso. Los cementos preparados con una cantidad más baja de beta TCP tenían un pH inicial similar a los preparados con un exceso del mismo, aunque ambas formulaciones de cementos alcanzaron un pH neutro; los cementos con un exceso de beta TCP alcanzaron el pH neutro a las 3 horas, mientras que los que tenían un contenido menor de beta TCP alcanzaron el pH neutro a las 5 horas.

La liberación de iones de hidrógeno, calculado desde los cambios de pH en las soluciones incubadas, fue muy similar para ambos cementos, aunque el cemento A tuvo una liberación más alta y significativa que el cemento B.

El cemento con menos cantidad de β -TCP tenía un pH inicial similar al cemento con exceso de β -TCP; sin embargo, el pH varía significativamente cuando los cementos se incuban durante un período largo de tiempo.

<i>Composición y caracterización de cementos (valor medio +/- desviación estándar, n=3)</i>					
	Porosidad (%vol.)	Brushita (% peso)		Grado reacción(%)	Liberación H ⁺ (%)
		Medida	Calculada		
Cemento A	48.9 ± 1.0	83.0 ± 1.0	86.5 ± 0.1	96.0 ± 1.2	0.077 ± 0.002
Cemento B	56.4 ± 0.8	66.4 ± 0.9	73.0 ± 0.1	90.9 ± 1.2	0.055 ± 0.002

Las diferencias entre cementos A y B son significativamente diferentes (P < 0.05)

Tabla 11. Composición y caracterización de cementos

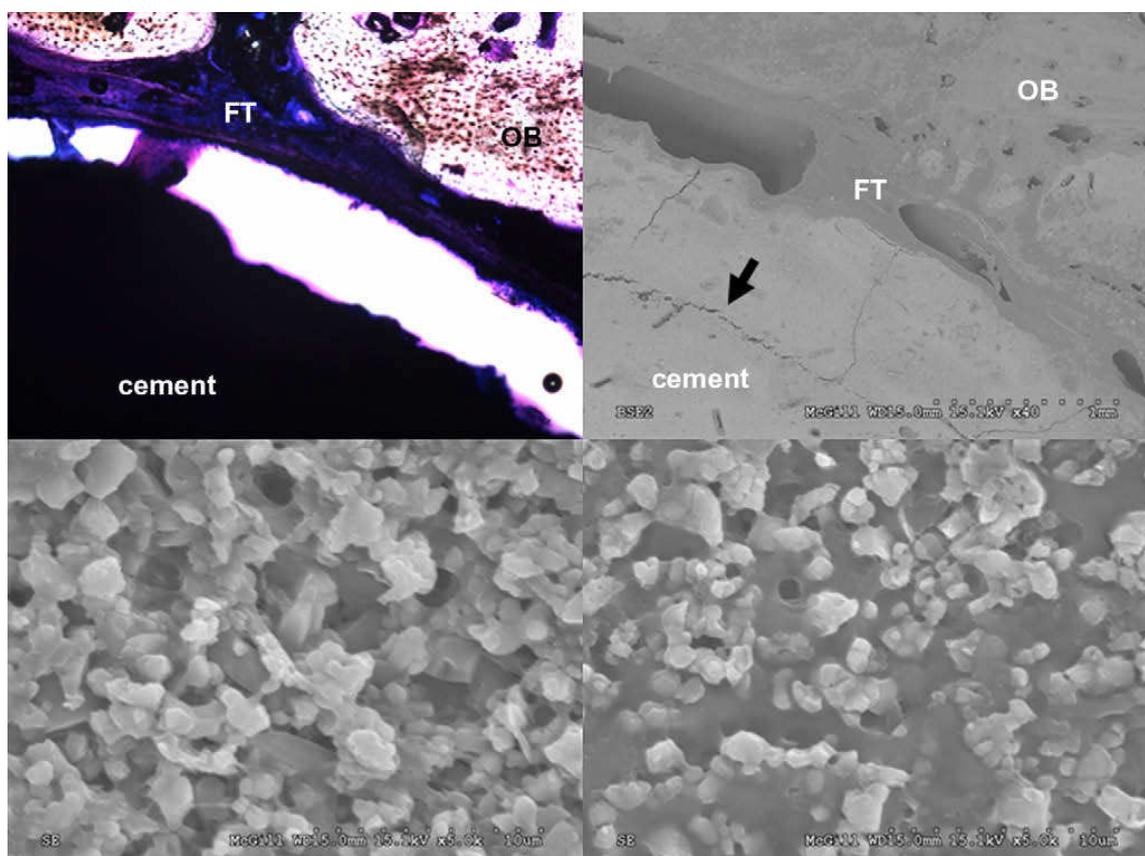
Se aplicó la ecuación Peppas para analizar los mecanismos de liberación al pH. El valor n con el valor R se muestran en la tabla 5.

Las gráficas muestran dos perfiles liberación distintos en ambas muestras de cemento; un

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

descenso escalonado durante las dos primeras horas, seguido de un segundo descenso más gradual durante las 4 horas siguientes, estos cambios en el mecanismo son debidos probablemente al sedimento del cemento, aunque se requiere más investigaciones para describir este fenómeno, sin embargo, el valor de n secundario era menor para ambas muestras de cemento y podría atribuirse a un perfil de liberación final que indicaría que la liberación del protón de hidrógeno es afectado por fenómenos químicos que interfieren en el transporte del ión; se sugiere un papel activo de la matriz del cemento en la liberación de los protones durante un prolongado período de tiempo.

El test de Pearson determinó que no existía correlación entre la n y la porosidad del cemento y entre el peso porcentual de la brushita de los cementos (p / mayor 0.2), puesto que el porcentaje porcentual de peso de la brushita no influenciaba en la liberación del protón de hidrógeno, un papel pasivo en la liberación de partículas beta-TCP en el control de la tasa final de liberación de hidrógeno parece verosímil.



Fotos 28-31. Microscopía cemento A (arriba izquierda). Microscopía óptica de barrido (arriba derecha y las dos inferiores). Puede observarse tejido fibroso (FT) y superficie de hueso original (OB). A una magnificación de 40x (arriba a la derecha) se observa un “gap” entre los núcleos interno y externo del cemento. En una magnificación de 5000x, el núcleo interno se ve formado por partículas de brushita (abajo a la izquierda), mientras que el núcleo externo contiene principalmente partículas de β -TCP (abajo a la derecha).

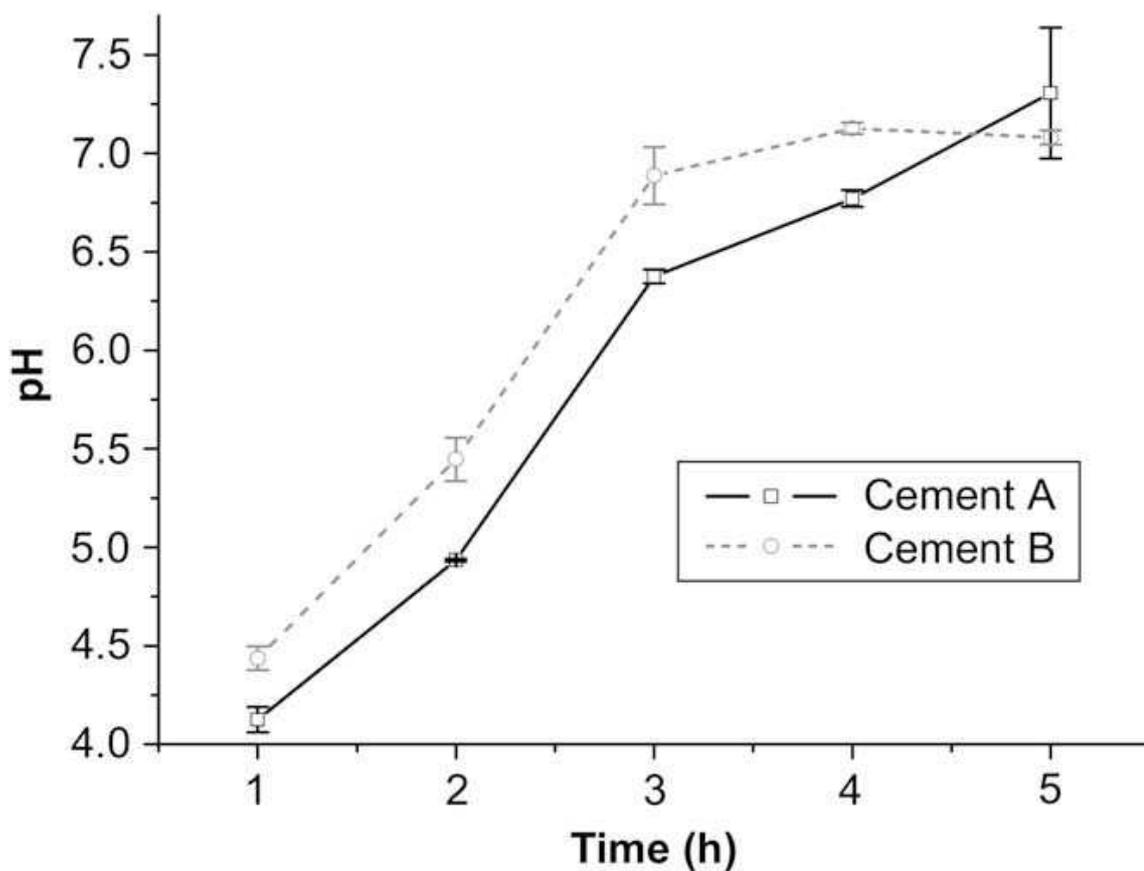


Fig. 47. Evolución ph de los cementos en función del tiempo.

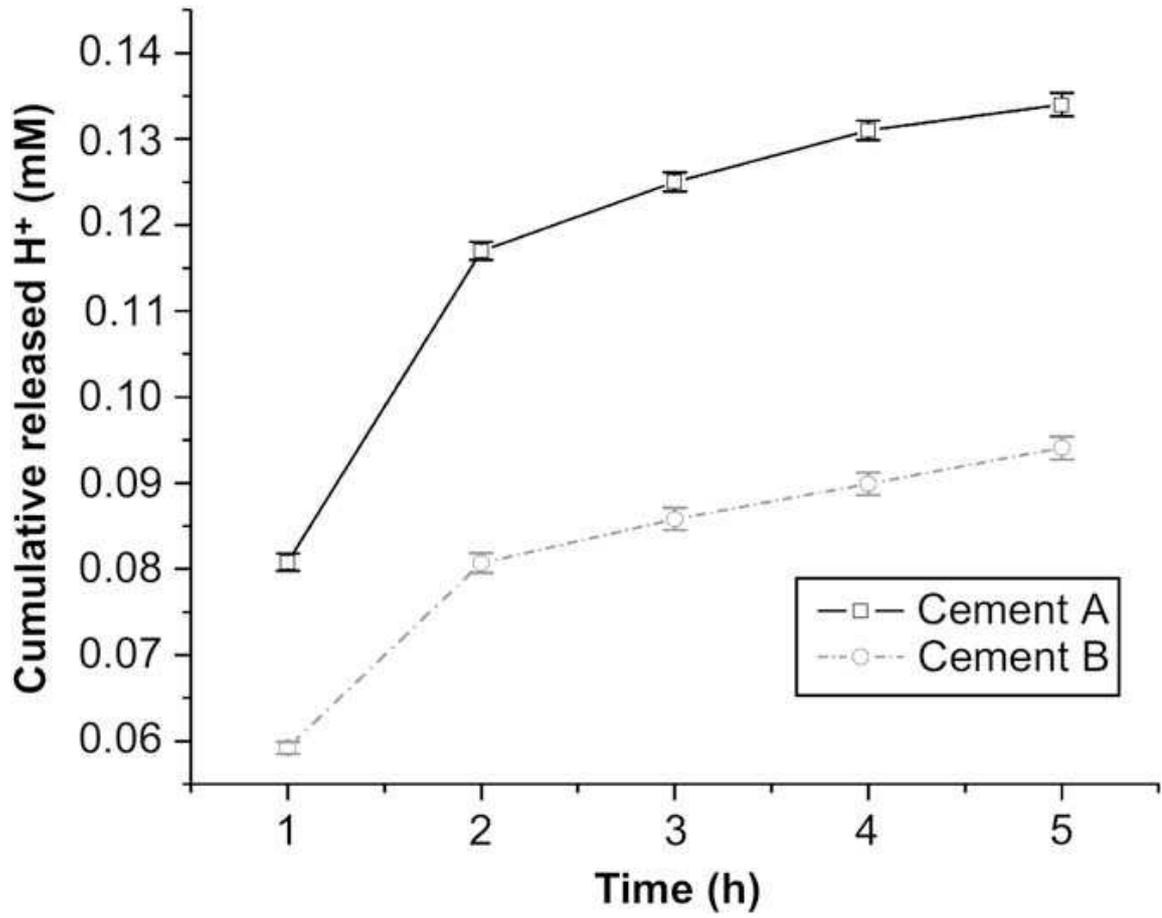


Fig. 48. Liberación iones H^+ de los cementos

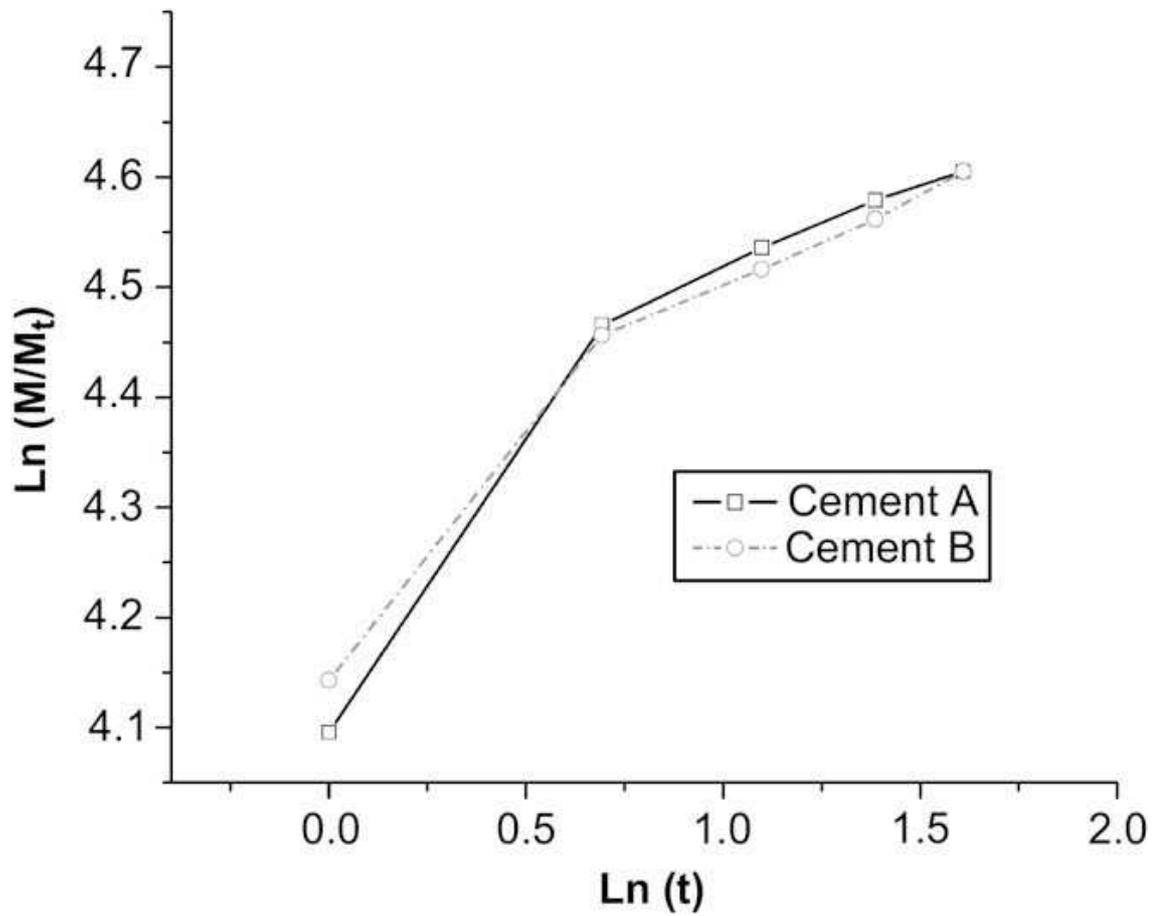


Fig. 49. Liberación ions H^+ según ecuación de Peepas

8. DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

El aumento de hueso vertical, sobre todo en el campo de la Implantología, es uno de los problemas más desafiantes que se presentan en cuanto a regeneración ósea, se han descrito muchas técnicas y materiales, entre las que destacan la osteodistracción , la GBR y el uso de bloques onlay, que han resultado ser procedimientos muy sensibles a la técnica y que han demostrado sólo tener un éxito parcial.

Uno de los grandes requisitos que se presentan en estos procedimientos es, por un lado la necesidad de estabilizar el injerto entre las que destacan la osteodistracción , la GBR y el uso de bloques onlay, aunque han resultado ser procedimientos muy sensibles a la técnica y y por otro el diseño de colgajos que permitan el cierre de la zona regenerada sin tensión.

Los dos principales factores de fracaso en regeneración vertical son justamente la ausencia de estabilidad del injerto y la exposición del mismo a la cavidad oral que desemboca en la infección y pérdida del injerto.

En este estudio, se describe una técnica mínimamente invasiva, en la que se inyecta un material biocompatible bajo la superficie subperióstica del hueso.

La técnica de tunelización mediante despegamiento mucoperióstico es una técnica prácticamente ciega ya que no permite una visión directa del área a regenerar por lo que también es un procedimiento sensible a la técnica, sin embargo las ventajas que ofrece son la rapidez de la técnica, y la mínima manipulación de los tejidos. En este estudio las pastas de cemento fabricadas eran sólidas en la superficie del hueso y endurecían en menos de 5 minutos tras la inyección, de este modo no eran necesarios apoyos adicionales tales como membranas o mallas, esta técnica ofrece una alternativa atractiva frente a los procedimientos quirúrgicos convencionales para simplificar las técnicas actuales y reducir el material y los costes quirúrgicos.

Los datos de XRD y de picnometría presentados en este estudio muestran que los dos cementos evaluados en este estudio, tenían una alta concentración de brushita, y que los cementos preparados con exceso de β -TCP tenían una alta cantidad residual de beta-TCP después del fraguado.

La degradación del cemento colocado fue ligeramente menor de lo que se predecía, indicando una inhibición de la reacción de colocación. El uso de una solución de ácido cítrico como componente líquido del cemento mejoró la manejabilidad y la viscosidad del material para hacerlo más fácilmente inyectable con agujas de entre 18 y 21G., además el uso de ácido cítrico mejoró las propiedades mecánicas y el tiempo de colocación del cemento de brushita²⁸, esto permite que el material pueda ser aplicado sin dificultad, sin embargo, el efecto inhibitorio del ácido cítrico en la colocación del material podría haber causado una ligera reducción en el grado de reacción.

La porosidad de los cementos preparados con un exceso de beta-TCP (cemento B) fue mayor que la del cemento A, probablemente debido a los grandes espacios entre los cristales de brushita creados por el exceso de beta-TCP.

Los estudios previos *in vivo* que usan cementos de brushita en procedimientos de regeneración ósea han sido evaluados sobre hueso trabecular^{24-27, 29-35}, desde nuestro conocimiento, éste es el primer estudio de este tipo que usa un modelo de hueso cortical. Los exámenes histológicos indicaron la buena compatibilidad de ambos cementos, con casi la completa ausencia de células inflamatorias como linfocitos, granulocitos o células multinucleares³⁹.

La conducción sobre la superficie intacta de cortical obtenida con los cementos basados en brushita, indican que dichos cementos podrían ser usados en procedimientos de aumento de hueso vertical sin la necesidad de métodos estabilizadores.

Con este método, pueden llevarse a cabo intervenciones mínimamente invasivas,

evitando zonas aperturas extensas, minimizando el riesgo de exposición de los injertos, mientras la estabilidad inicial mejora por la propia autoestabilización del cemento bajo el periostio; aún cuando el aumento de hueso es significativo, la mayor optimización del biomaterial inyectado podría llevar a tasas más altas de aumento de hueso, para este propósito, se requeriría un material con alta tasa de reabsorción *in vivo*.

La intervención mínimamente invasiva resulta en una rápida cicatrización de los animales con un postoperatorio ausente de complicaciones, no se observó en los animales ningún signo de estrés o discomfort posterior a la intervención, durante el período postoperatorio tardío, los sitios implantados con cemento A mostraban signos de inflamación, mientras que los sitios tratados con cemento B, tenían apariencia clínica de normalidad.

Los análisis histológicos confirmaron que el cemento A fue encapsulado con tejido fibroso en todos los lugares de implantación, mientras que el cemento B era osteointegrado consistentemente y reemplazado parcialmente por hueso neoformado, un exceso de β -TCP será necesario para prevenir la encapsulación fibrosa del implante.

En el estudio del pH, se ha demostrado que el preparado de cemento con exceso de β -TCP liberaba menos protones de hidrógeno y alcanzaba un pH neutro más rápidamente que el cemento con menor cantidad de β -TCP, esto es significativo en tanto en cuanto se pone de manifiesto que el cemento con mayor cantidad de MCP es mucho más propenso a ser rechazado por el cuerpo debido a un exceso de liberación de iones hidrógeno^{70,123,159,160}. Se ha postulado que el β -TCP es incapaz de interaccionar con el MCP debido a la formación de una línea pasiva sobre los cristales de β -TCP que inhibe su completa disolución, sin embargo, un exceso de β -TCP es necesario para neutralizar el pH del cemento en estadios iniciales¹⁶¹⁻¹⁶². La química del cemento permite un pequeño exceso de β -TCP tras la mezcla, hemos demostrado una fórmula que crea un aumento de hueso y evita la encapsulación fibrosa.

El ratio de brushita en la fórmula del cemento ha sido siempre un valor importante tanto en la biocompatibilidad como en el desarrollo *in vivo*.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

<i>Cuadro liberación de H⁺ acumulado (valor medio± desviación estándar, n=3)</i>							
	<i>Inicial 2h.</i>		<i>Final 4h.</i>		<i>R_f</i>	<i>R_t ajustada</i>	<i>P_t</i>
	<i>n_i</i>	<i>k_i</i>	<i>n_f</i>	<i>k_f</i>			
<i>Cemento A</i>	0.53408	40956	0.153±0.008	4.360±0.010	0.9971	0.9954	0.0028
<i>Cemento B</i>	0.45231	4.1428	0.160±0.007	4.342±0.008	0.9982	0.9971	0.0018

Tabla 12. Liberación H⁺

Aunque algunas regeneraciones de defectos óseos se han descrito con cementos que contenían altas concentraciones de brushita, las reacciones de cuerpo extraño y las encapsulaciones fibrosas se han observado con cementos que contenían entre un 70 y un 90% de brushita, respectivamente^{123,132,165}, nuestros hallazgos están de acuerdo con los resultados de la literatura en lo referente al cemento A (con un 86% de brushita). Los cementos con una menor concentración de brushita (menos del 50%) y con altas concentraciones de beta-TCP, demostraron un comportamiento de regeneración ósea excelente.

En este estudio, obtuvimos excelentes resultados con un cemento que contiene una concentración intermedia de brushita (66%), mucho mayor de los cementos exitosos anteriores descritos.

De acuerdo con las observaciones de cementos implantados, Bohner et al.¹⁶¹⁻¹⁶² habían señalado previamente que cuando se embebe en agua, la capa más superficial de los cementos de brushita podría experimentar una reabsorción rápida de fosfato monocálcico (MCP), dejando no reactivo el β-TCP en la superficie del material, mientras que las capas internas reaccionarían para formar brushita, la rápida reabsorción de MCP causa el descenso inicial de pH del cemento y de su capacidad amortiguadora debido a que el β-TCP no reactivo remanente está limitado por la formación de una capa pasiva de partículas de β-TCP que inhibe su disolución, sin embargo, se requiere un exceso de β-TCP para alcanzar una temprana neutralización de la incubación media como muestran los resultados.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Resumen de los estudios in vivo de los cementos de brushita													
Autor	Detalles cemento				Detalles quirúrgicos					Resultados histomorfométricos			
	Composición Polvo (% peso)		Aditivos	MCPM	Líquido	(P/L) (g/ml)	Brushita (% peso) después implantación	Animal	Localización	Período observación (semanas)	Forma aplicación	Área formación hueso (%)	Área material residual (%)
B-TCP	□ 0.3 mm	□ 0.3 mm											
MUNTING Y COLS.	8	56	CSH, CPY CC	16	H ₂ O	4.26	NR	Perros	Defectos metáfisis fémur	28	injerto en bloque	NR	NR
OHURA Y COLS.	64	-	CSH	19	H ₂ O	1.86	NR	Conejos	Cóndilo fémur	16	Bloques	23	13
	49.2	23.0	CSH	15	H ₂ O	2.23	NR	Conejos	Cóndilo fémur	16	Bloques	36	2
FRAYSSINET Y COL.	98.5	-	SP	NR	4.0 M PA 0.1 M SA	1.3	95	Conejos	Cóndilo	18	Inyectado	23	11
LU Y COLS.	54.7	12	-	133	H ₂ O	NR	NR	Conejos	Cóndilo tibia y fémur	24	Pasta	40 (a las 4 semanas)	40
PENEL Y COLS.	54	10	SHP	36	0.1 M SA 0.5% XG	2.78	NR	Corderos	Metáfisis fémur	52	NR	NR	NR
FLAUTRE Y COLS.	64	-	SHP	35	0.1 M SA 1% SG	2.5	NR	Corderos	Cóndilo femoral	52	Bloques inyectados	28	48
FLAUTRE Y COLS.	60	25	CSH, SHP	10	0.85 M SA	2.66	32	Conejos	Cóndilo fémur	24	Inyectado	50	20
	36	24	SHP	40	0.095 M SA	3.10	71	Conejos	Cóndilo fémur	24	Inyectado	50	26
FLAUTRE Y COLS.	60	25	CSH, SHP	10	0.85 M SA CON O SIN XG O HA	2.66	32	Conejos	Cóndilo fémur	24	Inyectado	20	35
	36	24	SHP	40	0.1 M SA CON O SIN XG O HA	3.10	71	Conejos	Cóndilo fémur	24	Inyectado	26	10

Tabla 13. Resumen estudios con cementos de brushita

La reabsorción de los iones de hidrógeno de las matrices de los cementos siguen el mismo patrón, consecuentemente, la adaptación de las curvas de reabsorción fue muy similar para todos las composiciones de los cementos, confirmando que la liberación de protones es más parecida por ser debida a reacciones químicas fuera de la matriz del cemento. La porosidad, el contenido final de brushita y P/L ratio de las muestras de cemento no se correlacionaban con el patrón de liberación de iones hidrógeno, lo que indica que el movimiento de protones a través de la matriz del cemento no estaba influenciada por las propiedades estructurales del cemento, probablemente debido a su pequeño tamaño, y aunque había diferencias en el recuento de reabsorción de β-TCP, parecía ser pasivo, no correspondiéndose tampoco con el patrón de liberación de iones hidrógeno.

De acuerdo con el análisis propuesto por Peppas y colaboradores⁷³, el exponente de reabsorción inicial de las muestras cilíndricas de cemento ($n= 0,45-0,50$) indicaban un mecanismo de difusión Fickian para ambos cementos⁷³. Esto es debido a la rápida reabsorción de MCP no reactivo en la media de incubación. Después de la reabsorción inicial de MCP, los protones se reabsorben por otros mecanismos mucho más lentos. La extremada lentitud del valor n calculado después de dos horas ($n= 0,15-0,16$) sugiere que la reabsorción de hidrógeno está afectada por una interacción físico-química antes que por difusión, probablemente debido a las continuas reacciones direccionales en la estructura del cemento. Éste mecanismo de liberación de hidrógeno, está en consonancia con las observaciones previas en las que se observaba una gran cantidad de beta-TCP no reactivo remanente en las capas externas del cemento implantado, debido a la pérdida inicial de MCP. Estos resultados indican que el uso de exceso de beta-TCP en el cemento no preveía el explosivo desprendimiento inicial de ácido alrededor del medio, sino que descendía en la cuenta final de liberación de ácido. La razón de que estas dos fases de liberación podrían ser debidas a los cambios en la microestructura del cemento durante su asentamiento. El volumen y la distribución de tamaños de los poros podrían haber sido modificada por la precipitación de la disolución de cristales, o por la recristalización de los cristales de DCPD dentro de los cristales de DCP. La descomposición de DCPD en DCP conduce a una pérdida de volumen que provoca un incremento de la porosidad¹²².

Podría parecer lógico que un cemento que contiene menos ácido se tolerase mejor biológicamente; sin embargo, los resultados *in vitro* indican que es sólo la cantidad de tiempo de exposición al ácido la que varía, no el pH en sí mismo, y sin embargo, es sólo cuestión de unas horas.

Esto hace que se planteen algunas preguntas interesantes.

Primero, hay un umbral de tiempo después del cual los daños en el tejido por el ácido se vuelven irreversibles.

Segundo, es un proceso inflamatorio el responsable de las diferencias en la curación.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

Finalmente, si la exposición prolongada ante un ambiente ácido puede inducir cambios fisiológicos, por ejemplo, la acidosis es una condición en la que el pH de la sangre desciende, y se ha encontrado que este fenómeno induce la activación de osteoclastos y, por tanto, de la reabsorción ósea¹⁶³. Ciertamente, a las 8 semanas, no había evidencia de necrosis en el cemento A, pero había evidencias de reabsorción.

Claramente, este estudio tiene, por su naturaleza, algunas limitaciones. Por ejemplo, se conoce la dificultad de correlacionar datos *in vitro* e *in vivo*⁶⁴, además, las diferencias de la fluidez de la composición, el medio local periosteal eran claramente diferentes y es concebible que el ácido podría haberse reabsorbido más que en los casos *in Vitro*.

Los experimentos futuros incidirán en la importancia del microentorno en las fases iniciales de la curación ósea para añadir mecanismos explicativos detrás de estos importantes hallazgos.

9. CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que los cementos basados en brushita son de gran interés en los procedimientos de aumento vertical de hueso debido a:

- 1- Tienen una gran capacidad de ser aplicados a través de técnicas mínimamente invasivas, por lo que mejora el postoperatorio.
- 2- La composición inicial del cemento juega un importante papel en el éxito de la intervención.
- 3- Los cementos que liberan menores cantidades de iones hidrógeno alrededor de la media, presentan los mejores resultados en el aumento vertical de hueso evitando encapsulaciones fibrosas y promoviendo la osteointegración, demostrándose su biocompatibilidad con la ausencia de células antiinflamatorias.
- 4- Se consigue un aumento considerable vertical en las superficies tratadas con cemento de brushita con exceso de β -TCP.
- 5- Existe un alto grado de reabsorción del material y de neoformación ósea.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Tamimi F, Torres J, López-Cabarcos E, Bassett D, Habibovic P, Lucerón E, Barralet JE. Minimally invasive maxillofacial vertical bone augmentation using brushite based cements. *Biomaterials*. 2009; 30: 208-216.
2. Torres García Denche, J. Influencia del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea; estudio densitométrico y morfométrico en calotas de conejas osteoporóticas. Tesis Doctoral. URJC. 2006.
3. Tamimi Mariño F. Síntesis, caracterización y aplicación en regeneración ósea de cementos de brushita fraguados con ácidos orgánicos, geles y coloides. Tesis Doctoral. UCM. 2006.
4. Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2006; 11: E47-51.
5. Owen M. Marrow stromal cells. *Journal of Cell Science*, 1988. 10: 63-76.
6. Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. En Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto, 2000; 1-14.
7. Friedenstein AJ. Precursors cells of mechanocytes. *International Reviews Cytology*, 1976; 142-160.

8. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetics Proteins, Hedgehods, an Cbfa 1. *Endocrine Reviews*, 2000; 21: 393-411.
9. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et als. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997; 89: 309-319.
10. Ham AW. Some histiophysiological problems peculiar to calcified tissue. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1952; 34: 701-706.
11. Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue International*, 1993; 53: 102-107.
12. Reid D. Bone Structure 'Vastly Different' Than Previously Believed. *ScienceDaily*, 2007: 10-16.
13. Tamimi F., Torres J., Tresguerres I., Clemente C., Lopez Cabarcos E., Blanco L. Vertical bone augmentation with a granulated brushite cement set with glycolic acid. *Clinical Oral Implants Research*, 2008; 19: 1246-53.
14. Tamimi F., Torres J., Tresguerres I., Clemente C., Lopez Cabarcos E., Blanco L. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *Journal of Clinical Periodontology*, 2006; 33: 922-928.
15. Block M.S.; Kent J.N. Sinus augmentation for dental implants, the use of autogenous bone. *Journal Oral and Maxillofacial Surgery*, 1997; 55: 1281-1286.
16. Schwartz Z., Goldstein M., Raviv E., Hirsch A., Ranly DM., Boyan BD. Clinical

- evaluation of demineralised bone allograft in a hyaluronic acid carrier for sinus lift augmentation in humans: a computed tomography and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research*, 2007; 18: 204-211.
17. Boyne PG. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *Journal Bone Joint Surgery*, 2001; 83(A), Suppl 1: 146-150.
 18. Von Arx T, Winzap-Kälin C. Laser Doppler Flowmetry for Assessment of Anterior Mandibular Teeth in Conjunction with Bone Harvesting in the Symphysis: A Clinical Pilot Study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 2007; 22 (3): 383-389.
 19. Rosen, B. V., Hobbs, L.W. & Spector, M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxiapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials*, 2002. 23: 921-928.
 20. Acil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B. & Jepsen, S. Three- dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *Journal of Biomedical Material Research*, 2000. 52: 703-710.
 21. Von Arx, T., Cochran, D.L., Hermann, J.S., Schenk, R.K. & Buser, D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers barrier membrane application. *Clinical Oral Implants Research*, 2001; 12 (3): 260-9.
 22. Nevins, M. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *International Journal of Periodontics Restorative Dentistry*, 1996. 16: 9-19.

REGENERACIÓN ÓSEA CON CEMENTOS DE BRUSHITA

23. Tamimi Mariño F, Mastio J, Rueda C, Blanco L, López-Cabarcos E. Increase of the final setting time of brushite cements by using chondroitin 4-sulfate and silica gel. *Journal of Materials Science- materials in Medicine*, 2007. 18 (6): 1195-1201.
24. Trueta J. The role of blood vessels in osteogenesis. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 1963; 45:402-407.
25. Tamimi, F.M., Lopez-Cabarcos, E., Blanco, L., Rueda, C., Tresguerres, I. & Torres, J. 2005. Granulado de cemento de brushita fraguado con ácido glicólico para regeneración ósea. Spanish patent number: 200503094/5.
26. Araújo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss[®] Collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 2011; 22: 1–8.
27. Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss[®] Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 2010; 21: 55–64.
28. Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2008; 28: 123-135.
29. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology*, 2004; 31:820-828.
30. Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 2005; 32: 435-440.

31. Pietrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. *Journal of Prosthodontics*, 2007; 16: 141-7.
32. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology*, 2004; 31: 820-8.
33. Chen ST, Darby IB, Reynolds EC, Clement JG. Immediate implant placement postextraction without flap elevation. *Journal of Periodontology*, 2009; 80: 163-72.
34. Evans CD, Chen ST. Esthetic outcomes of immediate implant placements. *Clinical Oral Implant Research*, 2008; 19: 73-80.
35. Boix D, Weiss P, Gauthier O, Guicheux J, Bouler JM, Pilet P et al. Injectable bone substitute to preserve alveolar ridge resorption after tooth extraction: a study in dog. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2006; 17: 1145-1152.
36. Araújo M, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 2011; 22 (1): 9-13.
37. Araújo M, Liljenberg B, Lindhe J. Beta-Tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 2010; 21(4): 445-454.
38. Araújo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research*, 2009; 20(1): 1-6.
39. Manchón Miralles A. Síntesis y caracterización de cerámicas de fosfato cálcico sustituidas por iones de estroncio, silicio y hierro. Tesis Doctoral. URJC, 2011.
40. Hench L, Ethridge E.C. *Biomaterials. An interfacial approach*. Edit. Academic Press. New York. 1980.

41. Rincón López J.M, Martínez Ruiz M. Los vidrios y materiales vitrocerámicos como implantes quirúrgicos. *Revista Española de Cirugía Ost*, 1984; 19: 77-95
42. Hench L. Ceramic Implants. *Glass and Ceramic Bulletin*, 1975; 22, 2-3: 82-88.
43. Chim H. Gosain A.K. Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical application. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2009; January (20): 20-29.
44. Bauer T.W., Muschler G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2000. 371: 10-27.
45. Otsuka M., Matsuda Y., Yu D. A novel skeletal drug delivery system for anti-bacterial drugs using self-setting hydroxyapatite cement. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1990; 38: 3500-3502.
46. Alkhraisat M, Rueda C, Babrejos-Azama J, et al. Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement. *Acta Biomaterials*, 2010; 6: 1522-1528.
47. Gbureck U., Vorndran E., Barralet JE. Modeling of vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomaterials*, 2008; 4: 1480-1486.
48. Melville J.A., Rodriguez-Lorenzo L.M., Forsythen J.S. Effects of calcination temperatura on the drug delivery behavior of Ibuprofen from hydroxyapatite powders. *Journal Material Science Matherial Medicine*, 2008; 19: 1187-1195.
49. Carlisle E.M. Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science*, 1970; 16: 279-280.
50. Hing D.A., Wilson L.F., Buckland t. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal*, 2007; 7: 475-490.
51. Fulmer N.L., Bussard G.M., Gampper T.J. Edlich R.F. Anorganic bovine bone and analogs of bone mineral as implants for craniofacial surgery: a literature revieix. *Journal*

- of Long Terms Effects of Medical Implants, 1998; 8: 69-78.
52. Díaz Riego E.M. Osteocalcina: evaluación de diferentes ensayos utilizados para su medida. Aplicación al estudio de las formas inmunorreactivas presentadas en el medio de cultivo de osteoblastos humanos y circulantes en suero. Tesis Doctoral. UCM. 1996.
53. Sommerfeldt D.W., Rubin C.t. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Espine Journal*, 2001; 10: 86-95.
54. Tavassoli M., Yoffey J.M.. Bone Marrow Structure and function. 1983. Alan Liss. New York.
55. Junqueira L.C., Corneiro J. Histología Básica. Edit. Masson. Barcelona, 6th edición. 2005.
56. Garnet L.P., Hyat J.L. Compendio de Histología. 2nd Edición. Mc Graw Hill. Interamericana, 2002.
57. Nery E.D., Lynch K.L., Hirthe W.M. Bioceramics implant in surgically produced infrabony defect. *Bioceramics Implants*, 1975; 328-347.
58. Daculsi G., Passuti N., Martin S., et als. A comparative study of bioactive calcium phosphate ceramics after implantation in cancellous bone in the dog. *Histological, ultrastructural and electron microprobe analysis. The French Journal of Orthopaedic Surgery*, 1989; 3 (1): 43-48.
59. Daculsi G., Lynch K.L., Legeros R., et als. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *Journal of Biomedical Material Research*, 1989; 23: 883-894.
60. Daculsi G., Legeros R., Heughbaert M., Barbieux I. Formation of Carbonate Apatite Crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcified Tissue International*, 1990; 46: 20-27.
61. Daculsi G., Goyenvalle E., Aguado E. Spongious and Cortical Bone Substitution

- kinetics at the expense of macroporous biphasic calcium phosphate: animal and human evidence. *Bioceramics*, 1999; 12.
62. Daculsi G., Laboux O., Malard O., Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2003; 195-200.
63. Edmundo JB., Legeros LI, Lynch L., et als. Tissue response of biphasic calcium phosphate ceramic with different HA/TCP ratios in periodontal defect. *Periodontology*, 1992; 9: 729-735.
64. Daculsi G., Goyenvalle E., Aguado E. Performance for bone ingrowth of biphasic calcium phosphate ceramic versus bovine bone substitute. *Bioceramics*, 1999; 12-17.
65. Mallard O., Gautier H., Daclsi G. In vivo demonstrataion of 2 types of microporosity on the kinetic of bone ingrowth and biphasic calcium phosphate bioceramics resorption. *Key Engineering Materials*; 2008.
66. Daculsi G., Jegoux F, Layrolle P. The micro macroporous biphasic calcium phosphate concept for bone reconstruction and tissue engineering. *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing and Applications*, Hohn Wiley & Sons, 2008; 1-6.
67. Daculsi G., Legeros RZ., Grimandi G, et als. Effect of sintering process of HA/TCP bioceramics on microstructure, dissolution, cell proliferation and bone ingrowth. *Key Engineering Materials*, 2008; 361-363: 1139-1142.
68. Rodríguez C., Jean A., Mitja S., Daculsi G. Five years clinical follow up bone regeneration with CaP Bioceramics. *Key Engineering Materials*, 2008; 361-363.
69. Mailhac N., Daculsi G. Bone ingrowth for sinus flift augmentation with micro macroporous biphasic calcium human cases evaluation using MicroTC and Histomorphometry. *Key Engineering Materials*, 2008; 1347-1350.
70. Kimakhe., Chbicheb S., Elwady W., et als. Biphasic calcium phosphate MBCP for

- maxillofacial bone filling before dental implantation. *Key Engineering Materials*, 2004; 254-256.
71. Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material BioOss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 2000; 11(3): 217-229.
 72. Cano Sánchez J., Campo-Trapero J., Sánchez Gutiérrez J.J., Bascones Martínez A. Mecanobiología de los huesos maxilares. Remodelación ósea. *Avances en Odontoestomatología*, vol.24, n°2; Marzo-Abril, 2008.
 73. Peppas NA. Analysis of Fickian and non Fickian drug release velocity upon surface from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1985; 60:110-111.
 74. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal Clinical Periodontology*, 2002; 29:197-212.
 75. Alpaslan C, Irie K, Takahashi K, et al. Long term evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone formation with a biologic and synthetic delivery system. *British Journal of Maxillofac Surgery*, 1996; 34: 414-418.
 76. Von Arx T, Hardt N, Wallkamm B. The TIME technique: a new method for localized alveolar ridge augmentation prior to placement of dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 1996; 11(3): 387-94.
 77. von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clinical Oral Implants Research*, 2006;17(4) :359-66.
 78. Sacco AG, Chepeha DB. Current status of transport-disc-distraction osteogenesis for mandibular reconstruction. *The Lancet Oncology*, 2007; 8(4): 323-30.

79. Rothstein SS, Paris DA, Zacek MP. Use of hydroxylapatite for the augmentation of deficient alveolar ridges. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1984; 42(4): 224–30.
80. Smiler D, Soltan M, Lee JW. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dentistry*, 2007; Marzo, 16(1):42–53.
81. Kent JN, Quinn JH, Zide MF, Guerra L, Boyne P. Correction of alveolar ridge deficiencies with nonresorbable hydroxyapatite. *The Journal of American Dental Association*, 1982; 105:993–1001.
82. Hasson O. Augmentation of deficient lateral alveolar ridge using the subperiosteal tunneling dissection approach. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology*, 2007;103(3):14–9.
83. Williams CW, Meyers JF, Robinson RR. Hydroxyapatite augmentation of the portion of the maxilla with a modified transpositional flap technique. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 1991;72(4):395–9.
84. Marshall SG. The combined use of endosseous dental implants and collagen/hydroxylapatite augmentation procedures for reconstruction/augmentation of the edentulous and atrophic mandible: a preliminary report. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 1989; 68(4): 517–26.
85. Rothstein SS, Paris DA, Zacek MP. Use of hydroxylapatite for the augmentation of deficient alveolar ridges. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1984; 42(4): 224–30.
86. Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*, 2000; 26(1): 1-6.
87. Block MS, Degen M. Horizontal ridge augmentation using human mineralized particulate bone: preliminary results. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2004; 62(9): 67–72.

88. Paniagua y col. *Citología e Histología Vegetal y Animal*. McGraw-Hill/Interamericana. 3ª Edición, 2002.
89. Mirtchi AA, Lemaitre J, Terao N. Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate–monocalcium phosphate system. *Biomaterials*, 1989; 10(7): 475–80.
90. Munting E, Mirtchi AA, Lemaitre J. Bone repair of defects filled with phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 1993; 4: 337–44.
91. Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaitre J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate–monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *Journal of Biomedical Material Research*, 1996; 30(2):193–200.
92. Penel G, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaitre J, et al. Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model. *Bone*, 1999; 25(2): 81–84.
93. Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams Rc et al. The effect of short-term application of a combination platelet derived growth factors on periodontal wound healing. *Journal of Periodontology*, 1991; 62: 458-467.
94. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Bohner M, et al. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 2005; 26(21): 4383–4394.
95. Barralet JE, Grover LM, Gbureck U. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II: hypodermic injection and strength improvement of brushite cement. *Biomaterials*, 2004; 25(11): 2197–2203.

96. Fray ME, Bartkowiak A, Prowans P, Slonecki J. Physical and mechanical behavior of electron-beam irradiated and ethylene oxide sterilized multiblock polyester. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 2000; 11(11): 757-62.
97. Gafni G, Septierand D, Goldberg M. Effect of chondroitin sulfate and biglycan on the crystallization of hydroxyapatite under physiological conditions. *Journal of Crystal Growth*, 1999; 205(4): 618-625.
98. Constanz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, Goodman SB, Gunasekaran S, Delaney DC, Ross J, Poser RD. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *Journal of Biomedical Material Research*, 1998; 43: 451-61.
99. Csizy M, Buckley RE, Fennell C. Benign calcaneal bone cyst and pathologic fracture--surgical treatment with injectable calcium-phosphate bone cement (Norian): a case report. *Foot and Ankle International*, 2001; 22(6): 507-10.
100. Böhner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials*, 2005; 26: 6423-6429.
101. Oner FC, Dhert WJ, Verlaan JJ. Less invasive anterior column reconstruction in thoracolumbar fractures. *Injury*, 2005; 36 (S2): 82-89.
102. Heini PF, Berlemann U, Kaufmann M, Lippuner K, Fankhauser C, van Landuyt P. Augmentation of mechanical properties in osteoporotic vertebral bones—a biomechanical investigation of vertebroplasty efficacy with different bone cements. *European Spine Journal*, 2001; 10(2): 164-71.
103. Tuncer S, Yavuzer R, Isik I, Basterzi Y, Latifoglu O. The fate of hydroxyapatite cement used for cranial contouring: histological evaluation of a case. *Journal Craniofacial Surgery*, 2004; 15(2): 243-6.

104. Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 2004; 25(17): 3453-3462.
105. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dental Materials*, 1998; 14(6): 429-40.
106. Gbureck U, Knappe O, Grover LM, Barralet JE. Antimicrobial potency of alkali ion substituted calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 2005; 26(34) :6880-6886.
107. Heini PF, Berlemann U. Bone substitutes in vertebroplasty. *European Spine Journal*, 2001; 10 (S2): 205-213.
108. Heini PF, Franz T, Fankhauser C, Gasser B, Ganz R. Femoroplasty-augmentation of mechanical properties in the osteoporotic proximal femur: a biomechanical investigation of PMMA reinforcement in cadaver bones. *Clinical Biomechanics*, 2004; 19(5): 506-512.
109. Herman JH, Sowder WG, Anderson D, Appel AM, Hopson CN. Polymethylmethacrylate-induced release of bone-resorbing factors. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 1989; 71(10): 1530-41.
110. Weiping R, Bin Wu, Lois Mayton, Paul H. Wooley. Polyethylene and methyl methacrylate particle-stimulated inflammatory tissue and macrophages upregulate bone resorption in a murine neonatal calvaria in vitro organ system. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002; 20(5): 1031-1037.
111. Wooley PH, Morren R, Andary J, Sud S, Yang SY, Mayton L, Markel D, Sieving A, Nasser S. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials*, 2002; 23(2): 517-526.
112. Zambonin G, Colucci S, Cantatore F, Grano M. Response of human osteoblasts to polymethylmetacrylate in vitro. *Calcified Tissue International*, 1998; 62(4): 362-5.

113. Ouyang J, Deng S, Zhong J. Crystallization of calcium oxalate monohydrate at dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers in the presence of chondroitin sulfate A. *Journal of Crystal Growth*, 2004; 270(3-4): 646-654.
114. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®. *Clinical Oral Implants Research*, 2003; 14: 137-43.
115. Grover LM, Knowles JC, Fleming GJ, Barralet JE. In vitro aging of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 2003; 24(23): 4133-41.
116. Lemaitre J, Mirtchi A, Mortier A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicate Industriels*, 1987; 10: 141-146.
117. Misch CE, Qu Z, Bidez MW. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: implications for dental implant treatment planning and surgical placement. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 1999; 57(6): 700-708.
118. Bohner M., Theiss F., Apelt D., Hirsiger W., Houriet R. G. Rizzoli, Gnos E., Frei C., Auer J. A. and Von Rechenberg B.. Compositional changes of dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials*, 2003; 24: 3463-3474.
119. Kent JN, Quinn JH, Zide MF, Guerra L, Boyne P. Alveolar ridge augmentation using nonresorbable hydroxyapatite with or without autogenous cancellous bone. *Journal Oral and Maxillofacial Surgery*, 1983; 41: 629-642.
120. Chiapasco M, Zaniboni M, Rimondini L. Autogenous onlay bone grafts vs. alveolar distraction osteogenesis for the correction of vertically deficient edentulous ridges: a 2-4-year prospective study on humans. *Clinical Oral Implants Research*, 2007; 18(4): 432-440.
121. Grases F, Ramis M, Costa-Bauza A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urological Research*, 2000; 28(2): 136-140.

122. Bohner M, Leimaitre J, Ring TA, Effect of sulfate pyro phosphate, and citrate ions on physiochemical properties of cements made of beta-tricalcium phosphatephosphoric acid-water mixtures. *Journal of the American Ceramic Society*, 1996; 79(6): 1427-1434.
123. Flautre B, Leimatre J, Maynou C, Van Landuyt P, Hardouin P. Influence of polymeric additives on the biological properties of brushite cements: an experimental study in rabbit. *Journal Biomedical Material Research* , 2003; 66(2): 214-223.
124. Reddi A: Extracelular matrix and development. In: Piez KA, Reddi AH (eds). *Extracellular Matrix Biochemistry*. New York: Elsevier, 1984; 375.
125. Delmas, P., Malaval, L., Arlot, M.E.: Serum bone-gla protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone*, 1985; 6: 339-342.
126. Baran, B.T., Braverman, L.E.: Thyroid hormones and bone mass. *Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1991; 72: 1182-1183.
127. Rico Lenza, H., Díaz Mediavilla, J.: Las células ósea sus orígenes e implicaciones. *Revista Clínica Española*, 1982; 166: 257-261.
128. Chow J, Lean JM, Chambers TJ: 17β -estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology*, 1992; 130: 3025-3032.
129. Mehlich DR, Taylor TD, Leibold DG, Hiatt R, Waite DE, Waite PD, et al. Collagen/hydroxylapatite implant for augmenting deficient alveolar ridges: twelve-month clinical data. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 1988; 46(10): 839-43.
130. Levy, J.R., Murray, E., Manolagas, S. et al.: Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1986; 119: 1786-1792.

131. Penel G, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaitre J, et al. Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model. *Bone*, 1999; 25(2): 81–84.
132. Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaitre J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone*, 1999; 25(2): 35–39.
133. Parfitt, A.M., Villanueva, A.R., Foldes, J., Rao, D.S.: Relations between histologic indices of bone formation. Implication for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1995; 10: 466-473.
134. Raghow R: The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1994; 8:823.
135. Kribbs, P.J., Chesnut, C.H., Kilicoyne, R.F.: Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *Journal Prosthetic Dentistry*, 1989; 62: 703-707.
136. Risteli, L.: Marcadores óseos procedentes del colágeno tipo I: PICP, ICTP y PINP. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 1996; 5: 81-85.
137. Hurley MM, Lee SK, Raisz LG et al.: Basic Fibroblast Growth Factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Bone*, 1998; 22(4): 309-316.
138. Block MS, Degen M. Horizontal ridge augmentation using human mineralized particulate bone: preliminary results. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 2004; 62(9): 67–72.
139. Morejon et al. Effect of the sterilization process on physical and mechanical properties of the Bonacryl bone cement. *Latin American applied research*, 2008; vol.38 (3): 201-204.

140. Hassager, C, Jessen, L.T., Podenhant, J., Thomsen, K., Christensen, C.: The carboxyterminal pyridoline cross-linked telopeptide of type I collagen in serum as a marker of bone resorption: the effect of nandrolone decanoate and hormone replacement therapy. *Calcified Tissue International*, 1994; 54: 30-33.
141. Levy, J.R., Murray, E., Manolagas, S. et al.: Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1986; 119: 1786-1792.
142. Åberg J, Henriksson HB, Engqvist H, Palmquist A, Brantsing C, Lindahl A, Thomsen P, Brisby H. 2012. Biocompatibility and resorption of a radiopaque premixed calcium phosphate cement. *Journal Biomedical Material Research, Part A* 2012.
143. Eriksen, E.F., Charles, P., Melsen, F., Mosekilde, L., Risteli, L: Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *Journal of Bone Mineral Research*, 1993; 8: 127-132.
144. Schaaf, O.P., Biering-Sorensen, F., Bohr, H.H.: Longitudinal study of bone mineral content in the lumbar spine, the forearm and the lower extremities after spinal cord injury. *Calcified Tissue International*, 1991; 48(suppl), 76: 280.
145. Kribbs, P.J., Chesnut, C.H., Kilicoyne, R.F.: Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic populaion. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 1990; 63: 86-89.
146. Toodgood AA, O'Neill PA, Shalet SM.: Beyond the somatopause: GH deficiency in adults over the age of 60 years. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1996; 81:460-465.
147. Vaughan, J.: Osteogenesis and haematopoyesis. *Lancet*, 1981; 2: 133-135.
148. Young MF: Bone matrix proteins: more than markers. *Calcified Tissue International*, 2003; 72: 2-4.

149. Mazzocco C, Buda S, De Paoli S. The tunnel technique: a different approach to block grafting procedures. *International Journal Periodontics Restorative Dentistry* , 2008; 1: 45–53.
150. Munting E, Mirtchi AA, Lemaître J. Bone repair of defects filled with phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *Journal Material Science: Material Medicine*, 1993; 4:337–444.
151. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal Clinical Periodontology*, 2002; 29: 197-212.
152. Price, C.P., Kirwan, A., Vader, C.: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. *Clinical Chemistry*, 1995; 41: 643-645.
153. Arbes H, Bösch P, Salzer M. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting, combined with the fibrine adhesive system (F.A.S). *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 1981; 98: 183-188.
154. Antonaides HN, Owen AJ. Growth factors and regulation of cell growth. *Ann Rev Am*, 1982; 33: 445-463.
155. Raisz, L.G.: Osteoporosis. *Journal of the American Geriatrics Society*, 1982; 30: 127-138.
156. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y et al: Interleukin 6: a potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *Journal Clinical Investigation*, 1992; 89: 46-52.
157. Raisz, G.: Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 1988; 318: 818-828.
158. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al: Genetic determinants of bone mass in adults. *Journal Clinical Investigation*, 1987; 80: 706-710.

159. Lu JX, About I, Stephan G, Van Landuyt P, Dejou J, Fiocchi M, et al. Histological and biomechanical studies of two bone colonisable cements in rabbits. *Bone*, 1999; 25(2): 41–45.
160. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Böhner M, et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 2004; 25(7–8): 1439–51.
161. Böhner M, Van Landuyt P, Merkle HP, Lemaitre J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement. *Journal Material of Science: Material in Medicine*, 1997; 8(11): 675–81.
162. Böhner M. pH variation of a solution after injection brushite cements. *Key Engineering Materials*, 2001; 192–195: 813–816.
163. Arnett TR. Extracellular pH regulates bone cell function. *Journal of Nutrition*, 2008; 138(2):415–418.
164. Grover LM, Gbureck U, Wright AJ, Tremayne M, Barralet JE. Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro. *Biomaterials*, 2006; 27(10): 2178–2185.
165. Frayssinet P, Gineste L, Conte P, Fages J, Rouquet N. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 1998; 19(11–12): 971–977.
166. Prados-Frutos JC, Nieva F. Anatomía e Histología del Hueso. *Clínicas de la Complutense 4*, 13-34. Publicaciones de la UCM. Madrid, 1996.
167. Eastell R, Hannon R.A. Biochemical markers of bone turnover. *Treatment of the postmenopausal woman: Basic and clinical aspects. Second edition.* Eds Rogerio A Lobo 1999. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 293-303.
168. Othmer K. *Enciclopedia de Tecnología Química. 3ª edición*, 1983. John Wiley-Intersciencie; New York, USA.

169. Kent JkN, Quinn JH, Zide MF, Guerra L, Boyne P. Alveolar ridge augmentation using nonresorbable hydroxyapatite with or without autogenous cancellous bone. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 1983; 41: 629–642.

170. Kent JN, Quinn JH, Zide MF, Block MS, Jarcho M. Reconstruction of the atrophic alveolar ridge with hydroxyapatite: a five year report. In: *Transactions of the annual meeting of the Society for Biomaterials in conjunction with the international biomaterials symposium, San Antonio, vol. 7; 1984. p. 247.*

171. Vanassche BJ, Stoelinga PJ, de Koomen HA, Blijdorp PA, Schoenaers JH. Reconstruction of the severely resorbed mandible with interposed bone grafts and hydroxylapatite. A 2–3 year follow-up. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 1988; 17(3): 157–160.

172. Kfir E, Kfir V, Eliav E, Kaluski E. Minimally invasive guided bone regeneration. *Journal Oral Implantology*, 2007; 33(4): 205–210.

173. Hoekstra JW, Klijn RJ, Meijer GJ, van den Beucken JJ, Jansen JA Maxillary sinus floor augmentation with injectable calcium phosphate cements: a pre-clinical study in sheep. *Clinical Oral Implants Research*, 2012; Febrero: 21-27

174. Torres J, Tamimi F, Hamdam Alkhraisat M, Prados Frutos J.C, Rastikerdar E, Gbureck U, Barralet J.E, López Tabarcos E. Vertical bone augmentation with 3D-synthetic monetite blocks in the rabbit calvaria. *Journal of clinical periodontology* 2011;38(12):1147-53.

10. ANEXO

10. ANEXO

α -TCP Fosfato tricálcico alfa

β -TCP Fosfato tricálcico beta

BMC: Contenido mineral ósea

BMD: Densidad mineral ósea

BMP: Proteínas morfogenéticas

BMU: Unidades básicas de remodelado óseo

C6S Condroitin 6 sulfato

C4S Condroitin 4 sulfato

CAD-CAM: (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing). Diseño asistido por computador/Fabricación asistida por ordenador.

CA: citric acid

CC Carbonato cálcico

CPY: calcium pyrophosphate

CS Condroitin sulfato

CSH: calcium sulphate hemihydrates

CPY: calcium pyrophosphate

DCP Fosfato dicálcico o monetita

DCPD Fosfato dicálcico dihidratado, o brushita.

DFDB Hueso desmineralizado liofilizado

DCPD Brushita

DSC Calorímetro diferencial de barrido

FC Fosfato cálcico

FTIR Espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier

g Gramo

h Horas

HAP Hidroxiapatita
HA: hyaluronic acid
HE Hematoxilina y eosina
ICSD Base de datos de la estructura de los cristales inorgánicos
IR Infrarrojos
L Litro
MCP Monocalcio fosfato
MCPM Monofosfato cálcico monohidratado
µm Micrómetros
min Minutos
mm Milímetro
MPa Megapascales
MHP: magnesium hydrogen phosphate
ND No disponible
NR: No disponible en el artículo
PA: phosphoric acid (H₃PO₄)
PBS Solución de tampón de fosfato
PFC: Colágeno purificado fibrilar bovino
PHA Hidroxiapatita precipitada
PLGA: polylactic-co-glycolic acid
PMMA Polimetacrilato de metilo
s Segundo
SC-CO₂ Fluido supercrítico de dióxido de carbono
SA: sulphuric acid (H₂SO₄)
TB Azul de toluidina
TetCP Fosfato tetracálcico
β-TCP Fosfato tricálcico beta
α-TCP Fosfato tricálcico alfa
UCM Universidad Complutense de Madrid