

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE
FORMULACIONES BIOACTIVAS PARA
APLICACIÓN EN TRAUMATOLOGÍA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Teresa Calvo-Fernández Babiano

Bajo la dirección de los doctores

Julio San Román del Barrio
M^a Blanca Vázquez Lasa

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-3468-3

TESIS DOCTORAL

**COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE
FORMULACIONES BIOACTIVAS PARA
APLICACIÓN EN TRAUMATOLOGÍA**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros
Departamento de Biomateriales

TERESA CALVO-FERNÁNDEZ BABIANO

MADRID, 2009

TERESA CALVO-FERNÁNDEZ BABIANO

TESIS DOCTORAL

**COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE
FORMULACIONES BIOACTIVAS PARA APLICACIÓN
EN
TRAUMATOLOGÍA**

Directores:

Dr. Julio San Román del Barrio

Dra. Blanca Vázquez Lasa



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros
Departamento de Biomateriales**

Madrid, 2009

Agradecimientos

Después de varios años, que con ciertas dudas me embarqué en este proyecto de investigación, que hoy ha culminado con esta Tesis Doctoral, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que con su ayuda han hecho posible la finalización de este trabajo.

A mis directores, Dr. Julio San Román y Dra. Blanca Vázquez, por aportarme pacientemente todos los conocimientos científicos que necesitaba para manejarme en un mundo nuevo para mí, como son los biomateriales, dedicando un gran esfuerzo e interés en que me sintiera a gusto en todo momento, algo que ciertamente han conseguido con su confianza y apoyo.

A la Unidad de Investigación Clínica y Biopatología Experimental del Hospital Provincial de Ávila, y en especial al Dr. Antonio López Bravo por su colaboración en el estudio histológico llevado a cabo en el tejido óseo de conejo y al Dr. Juan Parra tanto por su continuo asesoramiento, como por su enorme colaboración en el estudio in vitro y en el procesamiento y estudio histológico.

Al Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, especialmente al Dr. Francisco Collía y a la Dra. M^a Ángeles Pérez de la Cruz por su colaboración en el estudio histológico en el tejido conectivo de rata.

A todo el equipo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC), sin cuya ayuda no se habrían podido realizar muchas de las técnicas usadas en este trabajo, especialmente a la Dra. Mar Fernández por su colaboración en el estudio de cultivos celulares y a D. David Gómez por su ayuda en la caracterización por microscopía electrónica de barrido.

Al Dr. Felipe López-Oliva, por las veces que me ha ayudado en la cirugía experimental enseñándome sus habilidades quirúrgicas. Además ha supuesto un estímulo permanente para mi desarrollo profesional.

A la Dra. Esmerilda García, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por la ayuda que me ha ofrecido como tutora de esta Tesis Doctoral.

Por último, a todos aquellos que de una forma directa o indirecta, han contribuido a la satisfactoria conclusión de esta Tesis, ¡gracias!

**A mi madre.
A mi padre, que me acompaña
siempre en mi pensamiento...**

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Biomateriales	3
I.1.1. Introducción histórica.....	3
I.1.2. Definición de biomaterial. Biocompatibilidad	5
I.2. Aplicaciones generales de los cementos óseos acrílicos	7
I.3. Descripción y caracterización de los cementos óseos acrílicos comerciales	11
I.3.1. Composición química	12
I.3.1.1. Componente sólido.....	13
I.3.1.2. Componente líquido	14
I.3.2. Reacción de fraguado	15
I.3.2.1. Etapas físicas	16
I.3.2.2. Etapas químicas.....	16
I.3.2.3. Variables que afectan a la reacción de fraguado	17
I.3.2.3.1. Condiciones ambientales	18
I.3.2.3.2. Relación polvo/líquido	18
I.3.2.3.3. Método de mezclado	18
I.3.2.3.4. Tiempo de inserción	19
I.3.2.3.5. Espesor de la capa de cemento	19
I.3.2.3.6. Mezclado con antibióticos y otras inclusiones	19
I.3.2.3.7. Inclusión de agentes radiopacos	20
I.3.3. Caracterización de los cementos óseos acrílicos	20
I.3.3.1. Parámetros de curado. Norma ISO	20
I.3.3.2. Tiempo de estado pastoso	21
I.3.3.3. Tiempo de fraguado	21
I.3.3.4. Temperatura máxima	22
I.3.4. Monómero residual	23
I.3.5. Propiedades físico-químicas	23
I.4. Modificaciones del cemento óseo acrílico	24
I.5. Cementos óseos como sistemas de liberación de bisfosfonatos	27
I.6. Bibliografía	32
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
III. MATERIAL Y MÉTODOS	49
III.1. Formulación de los cementos óseos	51

III.1.1. Formulación del cemento óseo acrílico convencional. Grupo I (Grupo Control)	51
III.1.2. Formulación de cementos óseos portadores de metacrilato de vitamina E. (Grupos II, III y IV)	53
III.1.2.1. Obtención del monómero metacrilato de vitamina E (MVE)	53
III.1.2.2. Formulación del cemento óseo acrílico correspondiente al Grupo II	55
III.1.2.3. Formulación del cemento óseo acrílico correspondiente al Grupo III	56
III.1.2.4. Formulación del cemento óseo acrílico correspondiente al Grupo IV	56
III.2. Caracterización de los cementos óseos acrílicos	57
III.2.1. Determinación de los parámetros de curado	57
III.2.2. Determinación de monómero residual	60
III.2.3. Propiedades mecánicas: ensayo de compresión	61
III.2.4. Estudio de liberación de alendronato <i>in vitro</i>	62
III.3. Ensayos de biocompatibilidad	63
III.3.1. Introducción	63
III.3.2. Evaluación de la biocompatibilidad <i>in vitro</i>	64
III.3.2.1. Reactivos, cultivos celulares y muestras celulares	65
III.3.2.2. Ensayos bioquímicos y microscópicos	66
III.3.2.2.1. Citotoxicidad de monómeros y del fármaco alendronato	67
III.3.2.2.2. Citotoxicidad de los lixiviados	70
III.3.2.2.3. Morfología y proliferación celular bajo microscopía óptica	72
III.3.2.2.4. Proliferación celular	73
III.3.2.2.5. Morfología celular, proliferación y adhesión mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	76
III.3.2.2.6. Muerte celular	76
III.3.3. Evaluación de la biocompatibilidad <i>in vivo</i>	78
III.3.3.1. Selección del animal	80
III.3.3.2. Diseño experimental en rata	81
III.3.3.2.1. Modelo experimental	81
III.3.3.2.2. Formulaciones	81
III.3.3.2.3. Diagrama de tiempos	82

III.3.3.2.4. Procedimiento quirúrgico.....	82
III.3.3.2.5. Eutanasia	83
III.3.3.2.6. Obtención y procesamiento de las muestras.....	83
III.3.3.3. Diseño experimental en conejo	84
III.3.3.3.1. Modelo experimental	84
III.3.3.3.2. Formulaciones.....	84
III.3.3.3.3. Diagrama de tiempos	85
III.3.3.3.4. Procedimiento quirúrgico.....	85
III.3.3.3.5. Eutanasia	89
III.3.3.3.6. Obtención y procesamiento de las muestras.....	89
III.3.3.4. Material iconográfico	94
III.4. Bibliografía.....	95
IV. RESULTADOS	99
IV.1. Caracterización de los cementos óseos acrílicos	101
IV.1.1. Parámetros de curado.....	101
IV.1.2. Monómero residual	102
IV.1.3. Propiedades mecánicas.....	103
IV.1.4. Estudio de la liberación de alendronato <i>in vitro</i>	104
IV.2. Evaluación de la biocompatibilidad <i>in vitro</i>	106
IV.2.1. Cultivos de células Vero.....	106
IV.2.1.1. Morfología celular, proliferación y adhesión mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	106
IV.2.1.2. Citotoxicidad de los cementos	111
IV.2.1.2.1. Citotoxicidad de monómeros y del fármaco alendronato	111
IV.2.1.2.2. Citotoxicidad de los lixiviados	113
IV.2.1.3. Proliferación celular.....	114
IV.2.2. Cultivos de osteoblastos humanos	116
IV.2.2.1. Citotoxicidad de los cementos	116
IV.2.2.1.1. Citotoxicidad de monómeros y del fármaco alendronato	116
IV.2.2.1.2. Citotoxicidad de los lixiviados	118
IV.2.2.2. Morfología y proliferación celular bajo microscopía óptica.....	119
IV.2.2.3. Proliferación celular.....	126

IV.2.2.4. Morfología celular, proliferación y adhesión celular mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM)	127
IV.2.2.5. Muerte celular	130
IV.3. Evaluación de la biocompatibilidad <i>in vivo</i>.	
Estudio histopatológico.....	133
IV.3.1. Respuesta histológica del tejido conectivo.....	133
IV.3.1.1. Análisis macroscópico.....	133
IV.3.1.2. Análisis microscópico.....	133
IV.3.2. Respuesta histológica del tejido óseo	138
IV.3.2.1. Grupo I. Cemento control.....	139
IV.3.2.2. Grupo II.....	145
IV.3.2.3. Grupo III	155
IV.3.2.4. Grupo IV.....	163
IV.4. Bibliografía	167
V. DISCUSIÓN.....	169
V.1. Bibliografía	189
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	197

I. INTRODUCCIÓN

I.1. BIOMATERIALES

I.1.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

La utilización de los biomateriales con fines médico-quirúrgicos es tan antigua como la medicina misma, y se remonta a unos cuatro mil años, cuando se empleaban para suturas, materiales de origen natural como el cuero o el algodón.¹ Los primeros antecedentes documentables se remontan a 3.000 años a.C. en el antiguo Egipto. También en las civilizaciones clásicas de Grecia y Roma (siglo VII a.C. a siglo IV d.C.) se emplearon materiales no biológicos, en particular metales y otros materiales naturales para el tratamiento de las heridas y de algunas enfermedades.² Existen referencias con más de 2.500 años de antigüedad en la literatura oriental en las que se cita la utilización de materiales de origen natural (cuero, algodón, etc.).³ Asimismo se pueden encontrar prótesis implantadas en las momias egipcias que generalmente se trataban de dispositivos de cierre en los orificios de trepanación.⁴

Posteriormente la primera cita data del año 1550 sobre la aplicación de materiales biomédicos mediante la utilización de hilos de oro también como material de sutura,¹ y en la Europa del siglo XVI se emplearon el oro y la plata para la reparación dental y más tarde hilos de hierro para la inmovilización de fracturas óseas,² aunque la aplicación sistemática de este tipo de materiales no fue desarrollada de forma importante hasta la década de los sesenta en el siglo XX, consecuencia del desarrollo científico y tecnológico.

En el siglo XIX, el descubrimiento de la anestesia, de la cirugía en condiciones estériles y de los rayos X, dieron un fuerte impulso a la búsqueda de metales que pudieran ser utilizados en el interior del cuerpo.² Pero al poco tiempo de la aplicación de metales a este fin, aparecieron inconvenientes causados por la corrosión o porque los metales carecían de las propiedades mecánicas necesarias, para que el dispositivo cumpliera adecuadamente la función para la que había sido diseñado. La aplicación de biomateriales no metálicos comenzó también tempranamente. En la Edad Media fueron utilizados en algunos procedimientos quirúrgicos como ligaduras destinadas a detener hemorragias. Ya

en el siglo XX, su desarrollo se incrementó con el descubrimiento de materiales para fabricar hilos de sutura capaces de ser degradados y absorbidos por el organismo; sin embargo, la investigación sistemática y planificada de los materiales útiles para la fabricación de prótesis e implantes, sólo surge después de la Segunda Guerra Mundial como consecuencia del enorme aumento de demanda producida por la necesidad de rehabilitar a millones de inválidos de guerra y también por el avance en conocimiento en ciencia y tecnología de materiales. Este desarrollo corrió paralelo a avances en otros terrenos que crearon condiciones favorables para obtener soluciones eficaces. Entre ellas cabe mencionar la investigación y desarrollo en general de nuevos materiales, en especial los poliméricos, la disminución del riesgo de infecciones causada por la aparición de antibióticos eficaces y de los adelantos en el conocimiento de los procesos biológicos desencadenados como consecuencia del contacto de la materia viva con el biomaterial.⁵

La primera evaluación acerca de la biocompatibilidad descrita en la literatura científica aparece en el siglo XIX hacia 1830 y se trata de juicios carentes de rigor científico para el estudio de materiales dentales tales como el oro, el níquel, el hierro, etc.⁴ Posteriormente, hacia 1940, fue descrita la aparición de los primeros tumores malignos inducidos por la implantación de materiales sólidos, demostrándose posteriormente que era importante el número de materiales que presentaban, al menos potencialmente, la capacidad de producir una respuesta maligna ofreciendo en cambio, desde el punto de vista clínico, unos resultados óptimos.⁴ Se halló pues una disociación entre la experimentación y la clínica, por lo cual se planteó la necesidad de conseguir una normalización de protocolos de evaluación experimental.

A partir de la Segunda Guerra Mundial, algunos médicos cirujanos comenzaron una búsqueda más exhaustiva de biomateriales,⁴ entendiendo que éstos no debían:

- Producir respuesta del sistema inmune desde el sujeto al biomaterial.
- Ser tóxicos, ni por sí mismos, ni sus productos de degradación.
- Ser carcinógenos, ni a corto, ni a largo plazo, ni por sí mismos ni sus productos de degradación.

- Ser incompatibles médicamente hablando.
- Ser hemodinámicamente incompatibles.

Así se llegó a la conclusión de que la búsqueda debía dejar de ser empírica dándose paso a una “Ciencia de Biomateriales”.⁶

I.1.2. DEFINICIÓN DE BIOMATERIAL. BIOCOMPATIBILIDAD

Las sustancias utilizadas como biomateriales ocupan un amplio espectro: metales, cerámicas, vidrios, polímeros, fibras, elastómeros, materiales compuestos, etc. Podemos definir los biomateriales como “una clase de materiales de uso médico, dental o de aplicación farmacéutica que se encuentran en íntimo y sustancial contacto con los tejidos del cuerpo y generalmente, aunque no exclusivamente, implantados entre sus tejidos”.⁷

Podemos decir que la definición de biomaterial ha sido muy laboriosa y difícil, tal es así, que no se aprobó la primera hasta 1986 durante la Conferencia celebrada en Chester (Reino Unido), convocada por las diferentes Sociedades Internacionales de Biomateriales con el objetivo de encontrar por consenso definiciones comunes. Así, se definió un biomaterial, como “un material no vivo utilizado en un aparato médico y concebido para interactuar con sistemas biológicos”. Posteriormente, se celebró una segunda Conferencia de consenso igualmente en Chester en 1991 en la cual se elaboró una definición de biomaterial más amplia y ajustada: “un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano, o función del cuerpo”.⁸ Así, los biomateriales se distinguen de los demás materiales, en que éstos poseen una serie de propiedades químicas, físicas y biológicas que les permiten mantenerse en un medio extremadamente hostil hacia ellos, ya que se trata de cuerpos extraños al sistema biológico en el que son colocados.

Para que un biomaterial desarrolle satisfactoriamente la función para la cual ha sido diseñado debe cumplir dos requisitos fundamentales: biofuncionalidad y biocompatibilidad. El primero de ellos atiende a la capacidad que debe presentar para realizar la función específica en los tejidos y órganos, y el segundo está

relacionado con la aceptabilidad biológica.⁸ La bioaceptabilidad no sólo está dirigida al biomaterial, sino también a los diferentes productos, tanto de degradación física como química, del mismo. Basándose en este último requisito, Osborn⁹ publicó en 1979 la primera clasificación de biomateriales:

- Biotolerantes. En ellos no hay una respuesta local formadora de hueso. Son los cementos óseos (PMMA) y los metales.
- Bioinertes. En ellos no hay inhibición de la osteogénesis local. Son los materiales de carbono y óxidos de cerámica.
- Bioactivos. Se integran en el hueso mediante la formación de hueso nuevo en la superficie. Son las cerámicas de fosfato tetracálcico y tricálcico, biovidrios e hidroxiapatita.

En 1992, Black actualizó esta relación entre el implante y el huésped estableciendo cuatro formas o tipos de biomateriales:¹⁰

- Inerte: el material provoca escasa o nula respuesta.
- Interactivo: el material está diseñado para provocar que la respuesta del huésped sea específicamente beneficiosa (adherencia, crecimiento en superficie, etc.).
- Viable: El material incorpora células vivas en el momento de su implantación y el huésped lo trata como si fuera la matriz de un tejido normal. El material es relativamente reabsorbido y/o remodelado.
- Replante: El material consiste en un cultivo *in vitro* de células específicas previamente obtenidas del sujeto a implantar.

La utilización de nuevos materiales en clínica humana necesita de una evaluación preclínica indispensable, que incluye diversos niveles:

- a) Caracterización físico-química, por la que se realizará el estudio de las características mecánicas, estáticas y dinámicas del material a estudio, así como de su composición química.
- b) Evaluación biológica, que comprenderá el llamado estudio de biocompatibilidad.

Como aspectos de la biocompatibilidad de un material en cuanto a los fenómenos que suceden podremos describir:

- Procesos iniciales de la superficie del biomaterial.
- Corrosión y degradación del biomaterial.
- Respuesta local.
- Respuesta sistémica.

Es importante conseguir que los materiales no se deterioren. Un papel primordial en este deterioro lo tiene la reacción tejido-biomaterial. Esta reacción es compleja, larga e impredecible. Las exigencias sobre el biomaterial en relación a otros materiales, son tales que aquél debe mantener sus propiedades químicas, mecánicas, físicas y biológicas en un medio hostil. Esta respuesta frente a los biomateriales no es muy diferente a la que ocurre cuando se producen agresiones a un tejido, como pudiera ser un traumatismo o una infección. La inmediata reacción ante cualquier lesión es la inflamación, seguida de un proceso reparador.¹¹ El tiempo entre dicha inflamación y la reparación depende de la severidad de la lesión. En este sentido, la presencia de un implante lo que hace es prolongar los procesos de inflamación y reparación. Así el tejido de respuesta podrá estar estabilizado en un período de 4 a 8 semanas. Los factores que influyen sobre la respuesta de un tejido a un implante son las características químicas y físicas de la superficie del mismo y las variables fisiológicas tales como el sexo, la edad, el estado de salud y la farmacodinamia.¹²

I.2. APLICACIONES GENERALES DE LOS CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

Los cementos óseos acrílicos de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) se empezaron a utilizar por primera vez en el campo de la Odontología¹³ en 1937, donde se convirtieron en una práctica común desde 1945 aplicándose fundamentalmente en prótesis dentales y sistemas de adhesión. Se utilizaban en particular, moléculas poliméricas adhesivas, la mayoría basadas en la molécula de Bowen o BIS-GMA o metacrilato de diglicidiléter de bisfenol A,^{14,15,16} acompañados de monómeros tetrafuncionales que actúan como diluyentes. Sus resultados

fueron tan alentadores que en 1948 la base de todas las dentaduras se constituía de polímeros o copolímeros de metacrilato.¹³ Unos diez años después se empleó por primera vez en la craneoplastia por los neurocirujanos.⁴

En 1951 se describe la fijación de prótesis por este medio usándose por primera vez el poli(metacrilato de metilo) (PMMA) de la mano de cirujanos ortopédicos. En 1960, Charnley y Mc Kee¹⁷ desarrollaron su uso en cirugía ortopédica para la fijación de componentes protésicos de cadera. El cemento se preparaba mediante la mezcla del monómero líquido con el polímero sólido, convirtiéndose en una pasta que gradualmente fraguaba en el curso de unos 10 minutos. De esta forma era posible colocar el cemento parcialmente fraguado en el hueso y posteriormente colocar una prótesis antes de que el fraguado se completase, lo cual causó un gran impacto en la cirugía de cadera.

Con posterioridad, se comprobó que el uso del cemento producía algunos problemas debido a la introducción de un cemento semisólido en el canal femoral, ya que se asociaba al paso a la circulación de cantidades considerables de monómero líquido que resultaba tóxico para algunos órganos vitales.^{18,19} Además, se comprobó que la presión sanguínea caía tras la inserción del mismo.²⁰ Una adecuada hidratación del paciente previa a la utilización del cemento y evitar el uso de anestésicos vasodilatadores contrarrestaría este problema que ha pasado a ser poco frecuente hoy día a pesar de las cantidades masivas de cemento óseo utilizado.

Así se extendió su uso a otras articulaciones, comenzando a utilizarse en la década de los 70 para las artroplastias de rodilla.¹ Igualmente se ha empleado en la fijación de prótesis de articulación temporomandibular (ATM) y para estabilizar el componente glenoideo en dichas prótesis, por parte de los cirujanos orales y maxilofaciales.²¹ Estas prótesis articulares, pueden ser parciales (fosa o cóndilo) o totales (ambos), y aunque han sido desarrollados varios tipos, una de las prótesis más utilizadas es la de *Christesen*® (TMJ Implant, Inc., Golden, CO, USA). Ésta, consta de una fosa-eminencia construida en una aleación pulida de Cr-Co, de la cual existen varios modelos para una correcta adaptación a la neofosa articular, y de la prótesis condilar realizada en una aleación de Cr-Co con su superficie

articular construida inicialmente en poli(metacrilato de metilo); con posterioridad, se comprobó que el uso producía desgaste de esta pieza y ésta se realizó en Cr-Co. Las prótesis se estabilizan mediante 3-4 tornillos de Cr-Co la de fosa eminencia, y 6-7 tornillos mono o bicorticales de titanio la de cóndilo. El poli(metacrilato de metilo) en las reconstrucciones totales articulares ha sido en ocasiones utilizado tanto como sustancia cementante, como agente o material de relleno cuando quedan huecos entre el implante y el hueso basilar.²²

Más adelante, surgió de la mano de los cirujanos ortopédicos, la idea de incorporar antibióticos al cemento óseo, al comprobarse que la infección constituía un problema serio en la sustitución protésica de cadera, siendo el más utilizado para este fin la gentamicina.^{23,24} Así mismo, se desarrollaron los llamados rosarios de gentamicina donde el antibiótico se encontraba dispuesto en las perlas de PMMA a modo de rosario que se implantaba en áreas de osteomielitis crónica²⁵ y, de esta forma, se conseguía que el antibiótico se liberara gradualmente manteniendo concentraciones activas durante varios meses.

Los cementos óseos además de haber sido clásicamente utilizados en neurocirugía como material para craneoplastias,^{26,27} han sido ampliamente aplicados como material de reparación en cirugía craneofacial²⁸ para la osteoplastia de defectos óseos en hueso frontal y techo orbitario así como para la reconstrucción de defectos masivos cráneo-órbito-faciales^{29,30} entre otras muchas aplicaciones (reconstrucción en fosa temporal del hundimiento subsecuente a la transposición del colgajo de músculo temporal, algunos defectos mandibulares, etc.). Igualmente ha sido empleado en algunas prótesis faciales para la reconstrucción de defectos orbitarios y también para epítesis oculares colocadas sobre una bola intraorbitaria de poli(metacrilato de metilo).

Otra aplicación importante de los cementos óseos fue su utilización para el tratamiento de algunos tumores. Esto, se basa en el hecho de que durante el fraguado se alcanza una temperatura elevada, lo cual tiene un efecto destructivo sobre el tejido existente alrededor. Así, ha sido empleado para el tratamiento de tumores como el tumor de células gigantes que es un tumor grande y yuxtaarticular, el cual, a pesar de su naturaleza esencialmente benigna, presenta

el problema de que el curetaje simple de la lesión presenta un elevado índice de recurrencia a los cinco años (en torno a un 40%-50%).^{31,32} El empleo de cemento de PMMA en este caso para rellenar el defecto, contribuye a controlar el tumor y a prevenir la recurrencia; se ha sugerido que los radicales libres y los efectos térmicos de la reacción de polimerización podrían afectar a las células tumorales que pudiesen quedar en la cavidad tras el curetaje.³² Así el cemento óseo constituye la mejor manera de reconstruir la gran cavidad resultante del curetaje de la lesión y al mismo tiempo restaura su integridad estructural. Además, el PMMA es potencialmente destructor de tumor y a la vez permite detectar fácilmente las recurrencias de éste. Entre sus ventajas destacan que es fácil de trabajar cuando se trata de rellenar defectos irregulares y que su coste es relativamente bajo. Su principal desventaja la constituyen sus efectos biomecánicos a largo plazo, concretamente el daño que produce sobre el hueso subcondral y sobre el cartílago articular, con riesgo de desarrollar una artritis degenerativa. Asimismo produce una línea radiolúcida en la interfaz cemento-hueso,³¹ en probable relación con el daño térmico y que en cualquier caso no es progresiva y no afecta a su fijación.³¹

También se ha utilizado el cemento óseo como agente de relleno en defectos óseos y para estabilizar segmentos vertebrales, sobre todo a nivel cervical;^{5,33} aunque no es una fijación perfecta, resulta útil en pacientes de baja demanda que no requieren movilidad de ese segmento de la columna. Las fracturas patológicas asociadas a la osteoporosis han adquirido gran importancia en los últimos años debido a su elevada frecuencia y al coste que suponen anualmente, tanto desde el punto de vista económico como social. El PMMA y, más recientemente, los cementos de fosfato cálcico biodegradables, se han mostrado útiles para aumentar el poder estabilizador de los tornillos en el hueso osteoporótico. Tradicionalmente se aplicaba el PMMA antes de introducir el tornillo, lo cual conducía a la existencia de películas (*mantles*) de cemento muy variable y a una pobre penetración del cemento en el hueso. Aunque el PMMA tiene propiedades adhesivas, funciona más como un material de relleno que como adhesivo; de hecho, el PMMA ha mostrado una pobre adhesión al hueso, si bien el cemento que penetra en el hueso trabecular puede incrementar la capacidad estabilizadora del tornillo. Recientemente, las vertebroplastias y cifoplastias han

sido evaluadas para el tratamiento de fracturas por compresión en la vértebra osteoporótica donde, el PMMA, se introduce en el cuerpo vertebral por vía percutánea.³⁴ Igualmente ha sido empleado en el tratamiento de determinadas fracturas para mantener unidos los extremos óseos.³⁵ Así pues, las indicaciones de la vertebroplastia y cifoplastia han ido evolucionando, pasando de la estabilización de una fractura vertebral osteoporótica dolorosa, al refuerzo de un colapso vertebral secundario a metástasis.³⁶

Un nuevo uso del cemento óseo ha sido desarrollado, consistente en el recubrimiento de superficies articulares; en ellas se ha utilizado un derivado del cemento óseo para favorecer el crecimiento de nuevo hueso y cartílago allí donde existe daño articular. En estudios experimentales, se ha visto que la inyección de cemento en tales defectos facilita la formación de hueso y cartílago además de reparar la superficie articular.³⁷

Otra aplicación de los cementos óseos la constituye el producto comercial Artecoll® desarrollado por Lemperle.³⁸ Éste expuso la teoría del aumento subdérmico mediante la utilización de microesferas homogéneas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) uniformemente suspendidas en una solución de colágeno parcialmente desnaturalizado, que se utilizaría como microimplante inyectable para aumentos subdérmicos de larga duración.³⁹ Inicialmente, sus principales indicaciones fueron, la corrección de arrugas y otros defectos del tejido conjuntivo en diversas localizaciones a nivel de la cara y el aumento de los labios o del *philtrum*; posteriormente, se extendió su aplicación a la corrección de parálisis unilateral de cuerda vocal, al aumento del paladar blando en pacientes con fisura palatina para reducir la rinolalia y para cubrir pequeños defectos óseos en cara y base de cráneo.^{38,39}

I.3. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS COMERCIALES

Las formulaciones de cementos óseos acrílicos no han variado apenas desde su introducción en los años 60, habiéndose desarrollado fundamentalmente en Gran Bretaña. Las distintas formulaciones comerciales son muy parecidas unas

a otras y todas ellas están basadas en el poli(metacrilato de metilo) (PMMA)¹⁷ y se suministran en forma de dos componentes químicos separados: un componente sólido y un componente líquido.

Así pues, los cementos acrílicos quirúrgicos son materiales plásticos polimerizables en condiciones operatorias, mediante la mezcla de un polvo y un líquido, apareciendo el endurecimiento al cabo de 5-10 minutos, con producción de calor.⁴⁰

I.3.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las formulaciones de cementos óseos acrílicos contienen dos componentes agrupados en dos fases (Figura I.1), una sólida, de composición principalmente polimérica y otra líquida, de naturaleza monomérica.



Figura I.1. Componentes de un cemento óseo acrílico convencional.

El suministro de los dos componentes se hace por separado:

- Componente líquido: se presenta como un líquido incoloro en el interior de una ampolla oscura.
- Componente sólido: se presenta como un polvo blanco en el interior de una bolsa estéril.

I.3.1.1. Componente sólido

El componente sólido, y mayoritario, está constituido principalmente por partículas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) en una proporción aproximada del 90% p/p de la masa total de esta fase, en forma de partículas esféricas, también llamadas perlas, preparadas por polimerización en suspensión de su monómero. Si bien algunas formulaciones comerciales han introducido copolímeros al azar de metacrilato de metilo-estireno con un contenido inferior al 5% de estireno como comonómero, éste es el caso de Surgical Simple P.⁴¹ El componente polimérico se caracteriza por su peso molecular y su granulometría. El peso molecular del polímero hace variar las propiedades del cemento resultante, así, un alto peso molecular dará lugar a un cemento más resistente pero más difícil de trabajar, y a una viscosidad elevada, que dificultará la inyección mediante jeringa. La granulometría del polvo es la responsable de la calidad macroscópica del cemento. Si la granulometría es fina, será más fácil la mezcla, así como la distribución de las perlas de PMMA en el monómero, con lo cual el cemento final será más homogéneo.^{42,43}

El 10% del peso restante de esta fase, está constituido por un agente radiopaco, un componente inorgánico, incluido en las formulaciones para permitir el seguimiento y evolución radiológica del cemento después de la intervención quirúrgica. Este componente suele ser una sal u óxido de metales pesados, tales como el sulfato de bario o el óxido de zirconio.⁴⁴

Otro componente, presente en pequeñas cantidades es el peróxido de benzoílo (BPO), que actúa como iniciador de la polimerización (0,75-2% en peso). Este elemento es el más inestable, así como el más degradable con el tiempo, siendo el que condiciona la fecha de caducidad.

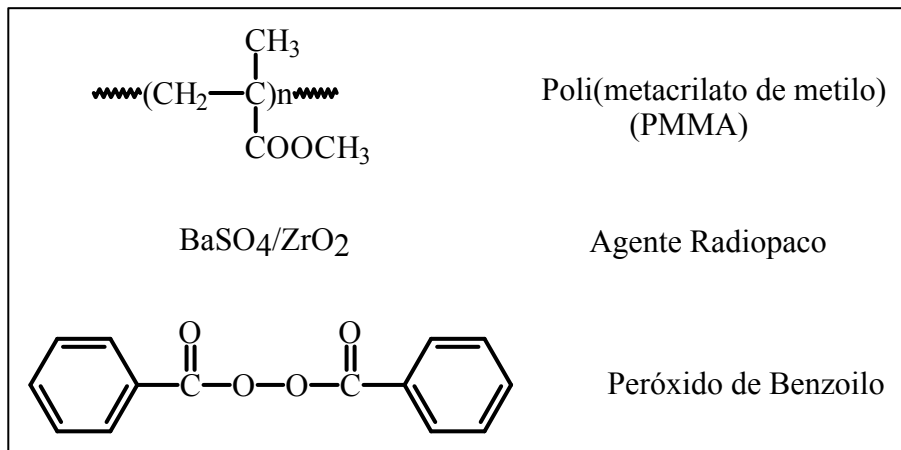


Figura I.2. Estructuras químicas de los constituyentes del componente sólido.

I.3.1.2. Componente líquido

Es el componente minoritario y contiene:

- El monómero, que en la mayoría de las formulaciones es el metacrilato de metilo (MMA) y constituye el 97-99% p/p de la masa líquida total.
- El activador de la reacción de polimerización: N, N-dimetilamino-4-toluidina (DMT). Su función consiste en inducir la descomposición del iniciador a baja temperatura para dar lugar a radicales libres encargados de iniciar la reacción de polimerización del monómero, siendo necesario por tanto para controlar la velocidad de la reacción.
- La hidroquinona (HQ), que se añade en 75-100 ppm, como inhibidor de la polimerización del monómero durante el almacenamiento.

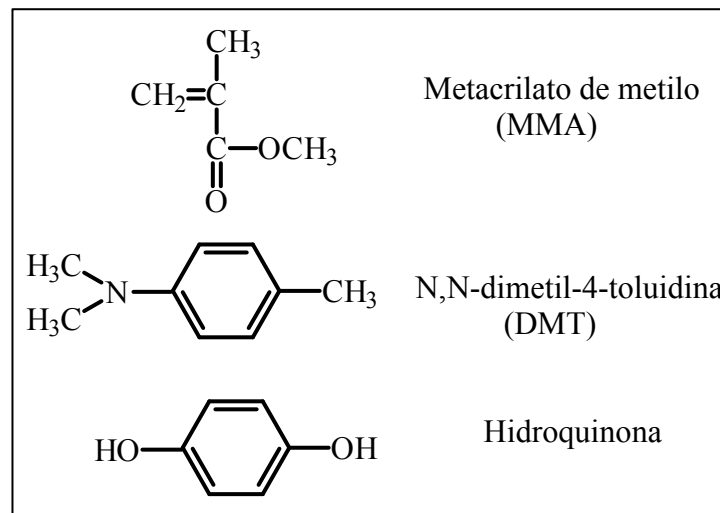


Figura I.3. Estructuras químicas de los constituyentes del componente líquido.

La relación polvo/líquido normalmente empleada es:

2 (en peso de polvo)/1 (en volumen de líquido)

Un aumento del componente líquido, producirá una mezcla más fácil y un cemento más fluido. Sin embargo la utilización de un exceso de líquido (MMA) puede ser peligrosa por elevar mucho el pico exotérmico. Hay también que tener en cuenta que no todo el monómero se polimerizará siendo liberada una parte a la circulación con un efecto tóxico importante.^{45,46}

I.3.2. REACCIÓN DE FRAGUADO

La reacción de fraguado engloba una gran variedad de procesos, tanto físicos como químicos, que comienzan cuando se ponen en contacto el componente sólido y el líquido. El cambio de consistencia que experimenta la masa de cemento a lo largo de los 10-15 minutos de curado, es el reflejo de los procesos que se están produciendo. Inicialmente el cemento es una masa viscosa que en pocos minutos pierde fluidez y puede trabajarse manualmente. Cuando la masa no se adhiere al guante quirúrgico se dice que se ha alcanzado el estado pastoso y, en este momento se introduce en la cavidad ósea, donde el material endurece rápidamente.⁴⁷

I.3.2.1. Etapas físicas

En la parte física del proceso de fraguado suceden una serie de etapas que se denominan: arenosa, fibrosa y pastosa; y preceden al fraguado y transformación del cemento en un material rígido.

En el conjunto de estas etapas se producirán diferentes fenómenos:⁴⁸

- Solvatación de las perlas de PMMA y del BPO por el MMA.
- Difusión del MMA hacia las perlas de PMMA.
- Difusión polímero-polímero.
- Evaporación de monómero desde la mezcla.

No se conocen muchos detalles acerca de la simultaneidad o coordinación de estos procesos, aunque se puede decir que durante las etapas arenosa y fibrosa predomina la evaporación de monómero en un porcentaje aproximado de un 2%.⁴⁹ El resto de los procesos físicos anteriormente mencionados conllevan la formación de una mezcla de apariencia pastosa al cabo de unos minutos.

La velocidad de difusión del monómero al interior de las perlas del polímero está influenciada por la microestructura del componente sólido. A lo largo de todo el proceso de fraguado se debe considerar que la velocidad de solvatación de las partículas de PMMA es sensible al peso molecular y así pues, podemos afirmar que la fracción de bajos pesos moleculares se disuelva más rápidamente.

I.3.2.2. Etapas químicas

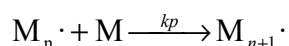
La etapa química del fraguado es bastante compleja debido a que se producen varias reacciones de forma simultánea. Comúnmente se cae en el error de considerar que los procesos químicos tienen lugar de forma separada y secuencial, sin embargo, es necesario destacar que son todos ellos simultáneos y sólo existen diferencias en cuanto a la velocidad relativa a lo largo de todo el proceso de fraguado. No obstante es indudable que la reacción predominante es la polimerización del monómero, que da lugar a la formación de un material bifásico compuesto por partículas de PMMA rodeadas y unidas por una matriz

formada por el monómero polimerizado. La reacción de polimerización del MMA se produce por el mecanismo típico de los monómeros insaturados, que implica una reacción de adición en cadena de tipo radicalario a través de las tres etapas características: iniciación, propagación y terminación.

En la etapa de iniciación se generan radicales libres, como resultado de la reacción redox entre el BPO del componente sólido y la DMT del componente líquido que, posteriormente, iniciarán la polimerización del MMA.



En la etapa de propagación⁵⁰ se produce la adición sucesiva de las unidades de MMA disponibles. Esta reacción es altamente exotérmica (130 cal/g por unidad de monómero) y, como consecuencia de ello, a nivel macroscópico se observa un aumento de temperatura.⁵¹ Este fenómeno es característico de las polimerizaciones radicalarias, y se produce como consecuencia del denominado efecto gel o efecto Trommsdorff⁵², que provocan una drástica disminución de la velocidad de la etapa de terminación por la elevada viscosidad del medio. Es interesante resaltar que en este punto la cadena polimérica tiene todavía naturaleza radicalaria.



La terminación de los radicales libres puede ocurrir bien por combinación para formar un enlace sencillo, bien por desproporción, a través de la transferencia de un átomo de H en beta.



I.3.2.3. Variables que afectan a la reacción de fraguado

De forma general, la composición química del cemento determina el proceso de fraguado del mismo.⁵³ No obstante, existen otra serie de variables,

como las condiciones ambientales, la relación polvo/líquido, el método de mezclado, el momento idóneo para la introducción del cemento, el espesor final de la capa de cemento, y el mezclado con antibióticos y otras inclusiones, que juegan un papel importante en propiedades como la manejabilidad, el tiempo de fraguado y la resistencia mecánica del cemento.

I.3.2.3.1. Condiciones ambientales

La reacción de fraguado del cemento está fuertemente influenciada por la temperatura a la que se hace la mezcla de sus dos componentes, y además depende de la humedad relativa y de la frecuencia de mezclado.⁵⁴ A medida que aumenta la temperatura ambiente tanto el tiempo de estado pastoso como el tiempo de fraguado y, en consecuencia, el intervalo de tiempo de trabajo, disminuyen, mientras que la temperatura máxima aumenta.⁵⁵

I.3.2.3.2. Relación polvo/líquido

La reacción de polimerización del monómero es la que da lugar al fraguado del cemento, por lo tanto, modificando la proporción de este componente en la formulación, se alterará el proceso de fraguado. Un aumento de la cantidad de monómero da lugar a temperaturas máximas más elevadas y a un alargamiento del tiempo de fraguado.⁵⁶ Además se ha comprobado que la cantidad de monómero evaporado también aumenta en comparación con el desprendido para una relación considerada como óptima de polvo/líquido = 2.^{48,57}

I.3.2.3.3. Método de mezclado

Se ha puesto atención sobre las propiedades de la masa de cemento con arreglo al método utilizado para el mezclado. Las técnicas de mezclado manual no son uniformes y a menudo producen capas de alto grado de porosidad.^{58,59} Así, se propuso la centrifugación del cemento óseo después de la mezcla. Es indudable que la centrifugación elimina los poros internos y por lo tanto, en ausencia de otros defectos estructurales, refuerza sus propiedades mecánicas.^{60,61} Igualmente la

mezcla al vacío tendría un efecto más pronunciado en la reducción de los huecos.^{62,63}

I.3.2.3.4. Tiempo de inserción

Un factor crítico en las propiedades finales del cemento es el momento en el que se introduce en la cavidad ósea. Se ha comprobado que la viscosidad del cemento aumenta de forma importante antes del fraguado y, como consecuencia de ello, el flujo del cemento en los intersticios del hueso se va dificultando en el transcurso de la reacción de fraguado. Unido a esto, el retraso en la introducción del cemento en la cavidad ósea no supone ningún beneficio para el paciente desde el punto de vista de que quede menos monómero sin reaccionar.⁵⁷ Por tanto se recomienda introducir el cemento después de alcanzar el estado pastoso.

I.3.2.3.5. Espesor de la capa de cemento

El calor desprendido durante el fraguado depende directamente de la cantidad de monómero y, así, un incremento de la cantidad de monómero produce un aumento en la temperatura máxima. Sin embargo, la temperatura máxima también depende de la velocidad de desprendimiento del calor generado, lo que está relacionado con el área a través de la cual se produce la disipación de calor.⁴⁸ En este sentido, el espesor de la capa de cemento colocada entre el vástago y el cemento será un factor a tener en cuenta. Este hecho es de gran trascendencia, ya que el desprendimiento de calor puede producir un deterioro del tejido óseo hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm.⁶⁴ Por esta razón hoy en día, se considera un espesor de cemento de 2-3 mm como el más adecuado.⁶⁵

I.3.2.3.6. Mezclado con antibióticos y otras inclusiones

Buchholz⁶⁶ introdujo el cemento óseo cargado de antibiótico para el salvataje de recambios totales de cadera infectados mezclando el cemento con gentamicina.

Se han publicado resultados contradictorios en torno a la alteración o no de las propiedades mecánicas con el agregado de antibióticos al cemento.^{67,68} Concentraciones de 0,5 a 2 g de polvo de antibiótico por paquete de 40 g de cemento, no comprometen la resistencia a la tensión ni a la compresión. Es importante recordar que sólo son aceptables los antibióticos en forma de polvo, ya que en forma líquida inhiben la polimerización.⁶⁹

Existen otras inclusiones como son las partículas de sangre y grasa que aparecen al introducir el cemento en la cavidad femoral, y cuyo efecto sobre la resistencia del material ha sido objeto de estudio. La resistencia a la tracción puede reducirse hasta un 77% y la resistencia a la cizalladura hasta un 69% en muestras que contengan sangre.⁷⁰ La interpretación que se suele hacer es que la sangre o grasa atrapadas en el cemento pueden actuar como concentradores de tensiones debido a su diferente consistencia en relación con el cemento y pueden ser así responsables de la nucleación y posterior propagación de grietas en el mismo.

I.3.2.3.7. Inclusión de agentes radiopacos

Asimismo, el cemento de PMMA no contenía al principio sulfato de bario y el cemento resultante era radiolúcido. La calidad radiopaca conseguida por el agregado de sulfato de bario permite determinar la distribución del cemento después de la cirugía y evaluar cualquier cambio tardío. El sulfato de bario añadido no modifica las características físicas del cemento, aunque sí las propiedades mecánicas.⁷¹

I.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

I.3.3.1. Parámetros de curado. Norma ISO

Los ensayos destinados a verificar los requisitos a cumplir por los cementos óseos, tanto en cuanto a la mezcla polvo/líquido como por el cemento después del fraguado, se recogen en la norma ASTM F451-99a⁷² y Norma ISO 5833.⁷³

En la Tabla I.1 se especifican los valores mínimos que tiene que cumplir cada una de las propiedades que van a ser descritas con más detalle a continuación.

Tabla I.1. Requerimientos de la norma ASTM F451⁷² para cementos óseos acrílicos.

PROPIEDAD	INTERVALO
Tiempo máximo para el estado pastoso (min)	5
Intervalo de tiempo de fraguado (min)	5-15
Temperatura máxima (° C)	90

I.3.3.2. Tiempo de estado pastoso

En el momento en que se mezclan el componente sólido y el líquido se pone en marcha un cronómetro y se procede al mezclado de los mismos. Durante el mezclado se van tomando muestras con los dedos cubiertos por guantes quirúrgicos, y, en el instante en el que la mezcla se separa limpiamente del guante, se alcanza lo que se denomina el estado pastoso, y que indica el momento más adecuado para la inserción del cemento en la cavidad ósea.⁵⁹ La norma exige para este parámetro un valor máximo de 5 minutos.

I.3.3.3. Tiempo de fraguado

El tiempo de fraguado se define como aquel tiempo para el cual la temperatura de la masa alcanza el valor correspondiente a:

$$T^a_{amb} + (T^a_{m\acute{a}x} - T^a_{amb})/2$$

Donde $T^a_{m\acute{a}x}$, es la temperatura máxima alcanzada durante el fraguado, y T^a_{amb} , es la temperatura ambiente (23 +/- 1° C). El tiempo de fraguado proporciona una idea del tiempo de trabajo durante el cual la mezcla polimerizante puede ser manipulada y aplicada sin que aparezcan problemas reológicos. La norma especifica que debe estar dentro del intervalo entre 5 y 15 minutos. La

representación típica de la evolución de la temperatura con el tiempo para los cementos óseos acrílicos es la que se muestra en la Figura I.4, donde señala el punto en el cual se alcanza el tiempo de fraguado.

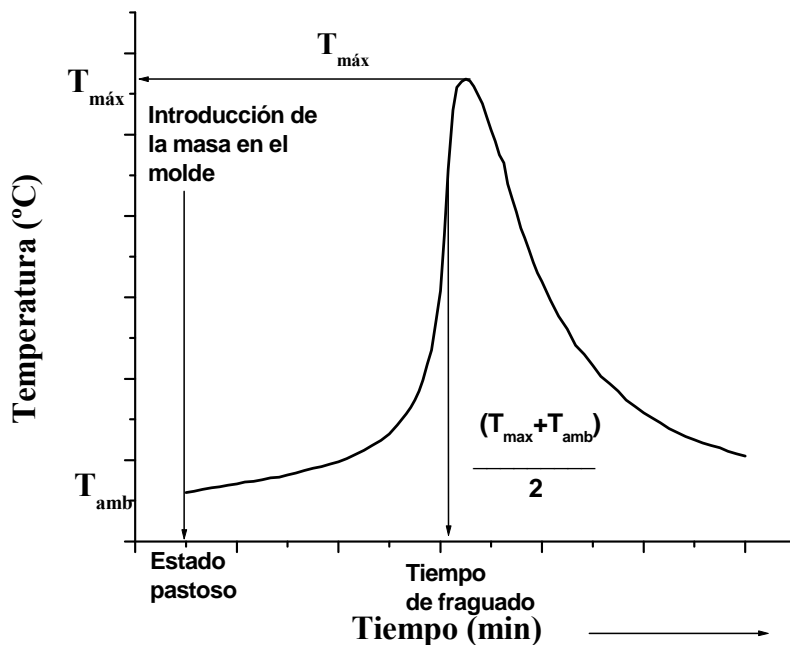


Figura I.4. Variación de la temperatura durante el fraguado de los cementos óseos acrílicos.

I.3.3.4. Temperatura máxima

Dentro del minuto siguiente a alcanzar el estado pastoso, la mezcla reaccionante se introduce en un molde de teflón, equipado con un termopar colocado en la parte inferior del molde, e introducido aproximadamente 3 mm en el interior de la masa de cemento. Con el cronómetro en marcha desde el comienzo del mezclado, se van tomando datos de la temperatura de la masa de cemento a lo largo del tiempo hasta que se vuelve a alcanzar la temperatura ambiente. La norma acepta como valor máximo para la temperatura alcanzada durante el fraguado del cemento $90^{\circ} C$, cuando las determinaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente ($23 \pm 1^{\circ} C$).

I.3.4. MONÓMERO RESIDUAL

Experimentalmente se ha comprobado que la utilización de cementos óseos acrílicos puede producir necrosis ósea en el lugar de la implantación, y esto puede achacarse entre otros factores al monómero que queda sin reaccionar en el momento de la introducción del cemento en el canal intramedular.⁷⁴ El contenido del monómero sin reaccionar en el estado pastoso se ha estimado por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) en un valor de aproximadamente el 20%.⁷⁵ En principio esto presenta una desventaja ya que la reacción de polimerización continuará produciéndose en el interior del hueso, desprendiéndose tanto calor como monómero, que puede dañar los tejidos de alrededor.

Durante el proceso de endurecimiento, ya en el interior de la cavidad ósea, y debido a que la mezcla de reacción se vuelve rápidamente viscosa, el proceso de polimerización se ve dificultado y la reacción se detiene sin que todo el monómero haya sido consumido. Desde el punto de vista químico, la cantidad de monómero que queda atrapado en el interior de la masa de cemento es el resultado de la disminución de la velocidad de difusión de los radicales libres como consecuencia del incremento de la viscosidad del medio.⁵² Habitualmente se admite que la mayor parte del monómero se consume durante el proceso de polimerización, pero después del proceso de fraguado todavía queda monómero atrapado en el interior de la masa de cemento en cantidades que oscilan entre 1,5 y 5%.⁷⁶ La cuantificación de este parámetro se ha llevado a cabo en numerosos estudios.^{57,77,78} Este monómero sin reaccionar queda ocluido durante períodos largos de tiempo y está sometido a un medio muy agresivo, el medio fisiológico, por lo que puede seguir siendo liberado después del cese de la reacción de polimerización.⁷⁶

I.3.5. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El PMMA comercial es un material amorfo, duro y transparente, más resistente al impacto que el vidrio, aunque menos resistente que éste al rayado. Se trata también de un material termoplástico y polar dependiendo de sus propiedades mecánicas, y de las condiciones de ensayo (velocidad, temperatura,

presión, etc.).⁷⁹ Dicho polímero es insoluble en agua, alcoholes e hidrocarburos alifáticos, resistente a aceites, grasas y reactivos inorgánicos acuosos, incluyendo álcalis y ácidos diluidos, y siendo, al mismo tiempo, poco resistentes a los álcalis fuertes. Gracias a todas estas propiedades ha sido ampliamente utilizado como material de anclaje de distintas prótesis metálicas y plásticas, siendo un inconveniente importante su baja tenacidad.⁸⁰

El PMMA quirúrgico es un polímero acrílico que fragua en frío, siendo sólido, transparente y quebradizo; soporta bien las fuerzas compresivas pero muy mal las de tracción y cizallamiento; no es adherente, por lo que no se fija a las superficies pulidas de los componentes, pero sí en cierta medida a la superficie áspera de los componentes femorales y a la superficie externa de las cúpulas y se fija con firmeza al hueso esponjoso si se introduce con presión en los intersticios.⁸¹

I.4. MODIFICACIONES DEL CEMENTO ÓSEO ACRÍLICO

La necesidad de dotar a las formulaciones de los cementos óseos acrílicos de funcionalidad implica el desarrollo de nuevas modificaciones que den como resultado un mayor campo de aplicación. Características tales como la mejora de la biocompatibilidad, el aumento de las propiedades mecánicas, la mejora de la porosidad y de la viscosidad, etc., son viables a través de la modificación tanto de los componentes del cemento como de las metodologías de preparación.

Dentro del ámbito de la mejora de las propiedades físicas, tales como porosidad y viscosidad, los esfuerzos se centran en la modificación de la técnica de preparación. La aplicación de un ligero vacío mediante reducción de la presión a la masa polimerizante reduce la inclusión de aire evitando la aparición de burbujas y poros, que van a dar lugar a un empeoramiento en las propiedades mecánicas de estos materiales. La aplicación de relaciones polvo/líquido (P/L) más altas conduce a la obtención de temperaturas de curado más bajas, pero por el contrario se obtienen masas mucho más viscosas que no penetran en su totalidad en los intersticios de la cavidad ósea.⁸²

La adición de nuevos componentes, tanto orgánicos como inorgánicos, a la fase sólida de las formulaciones es otra alternativa de aporte de funcionalidad a los cementos. Así la obtención de formulaciones porosas que promuevan la penetración de tejido óseo en los poros es una vía de mejora de la compatibilización del material con el tejido óseo circundante. Con este fin se preparan los cementos modificados con componentes biodegradables, tales como carbohidratos, celulosa, etc., cuya degradación en medio fisiológico deja paso al crecimiento de tejido vivo.⁸³ Materiales como perlas de vidrio,⁸⁴ partículas de hidroxiapatita (HA),⁸⁵ elastómeros,⁸⁶ fibras reforzantes,⁸⁷ etc., han sido empleados con el fin de mejorar las propiedades físicas de los cementos. La adición de partículas de vidrio de determinados tamaños proporciona una disminución en la temperatura pico, un aumento de la tenacidad a la fractura y una disminución de la velocidad de propagación de la grieta.⁸⁴ La modificación de un 25% p/p en la formulación de los cementos por la adición de HA, ha dado lugar a una disminución de la temperatura máxima de curado en un 10-15%, obteniéndose una resistencia en flexión de 68 MPa y una reducción significativa de la fluencia.⁸⁵ El aporte de partículas elastoméricas (ABS, acrilonitrilo-butadieno-estireno) en un 20% v/v disminuye sustancialmente el módulo elástico, la resistencia máxima en tracción y en compresión, pero provoca un aumento en la tenacidad a fractura y en el umbral de propagación de grietas por fatiga.⁸⁸ La fase sólida también ha sido objeto de modificación a través del estudio de la influencia del tamaño de partícula de perlas de PMMA, observándose una disminución lineal de la temperatura pico con el aumento del tamaño de las perlas.⁸⁹ La sustitución de perlas de PMMA por perlas de otros polímeros acrílicos, por ejemplo poli(metacrilato de n-butilo), ha provocado la modificación de las propiedades mecánicas, disminuyendo la temperatura de transición vítrea (T_g), hasta valores próximos a la temperatura ambiente (27° C), y disminuyendo el módulo elástico, comparado con el de cementos de PMMA.⁹⁰

La formulación de composites bioactivos para la mejora de la biocompatibilidad tejido-implante es otra de las vías de funcionalización de cementos óseos. En esta línea se han preparado cementos óseos basados en la combinación de hidroxiapatita y metacrilato de diglicidiléter de bisfenol A (bisGMA), obteniéndose una resina termocurable (CAP).⁹¹ Este cemento difiere de

los cementos comerciales de PMMA en la naturaleza del curado del material. El Bis-GMA es una resina epoxi que, además del grupo acrílico, presenta dos grupos fenilo que aportan rigidez y grupos hidroxilo que permiten el enlace intermolecular con otras unidades. La alta viscosidad de este monómero necesita del uso de dimetacrilatos que actúen como diluyentes. Este material permite disminuir la temperatura máxima, acortar el tiempo de curado y mejorar las propiedades mecánicas estáticas comparado con las formulaciones de PMMA. Además, estudios *in vivo* han demostrado que la implantación de CAP en conejo genera formación de nuevo tejido óseo en un período de tiempo inferior a dos semanas.

La fase líquida del cemento se ha modificado por sustitución del activador y la introducción de nuevos monómeros con el fin de obtener materiales con una mejor biocompatibilidad y nuevas propiedades. La N,N-dimetil-4-toluidina (DMT) es el activador de la reacción de curado más frecuentemente utilizado en los cementos comerciales. Es bien conocida la actividad citotóxica que presenta este compuesto en los tejidos circundantes.⁹¹ La obtención de nuevas aminas activadoras que disminuyan dicha actividad citotóxica ha sido y es un campo de investigación muy amplio. Compuestos tales como el 4-(N,N-dimetil) fenetanol,⁹² incluido en formulaciones comerciales (sulfix 60), N,N-dihidroxipropil-4-toluidina (Boneloc),⁹³ arilaminas,⁹⁴ (4-N,N-dimetilaminofenil) metanol y metacrilato de 4-N,N-dimetilaminobencilo,^{95,96} han dado como resultado la disminución de la actividad citotóxica, con respecto a la N,N-dimetilamino-4-toluidina.

La adición de nuevos monómeros a la fase líquida, sustituyendo total o parcialmente el metacrilato de metilo (MMA), se encuentra documentada en la literatura.⁵³ La introducción de monometacrilato de etoxitrietilenglicol en la fase líquida en una proporción del 20% p/p proporciona una disminución en la exotermia de curado y un aumento en la resistencia a la tracción y elongación a rotura.⁹⁷ El aporte de monómeros difuncionalizados como dimetacrilato de etilenglicol o dimetacrilato de hexametileno, provocan una disminución de la resistencia a compresión sin modificar sustancialmente los parámetros de curado.⁵³

La introducción de metacrilato de vitamina E en cantidades del 15-20% además de mejorar los parámetros de curado, mejora la biocompatibilidad del cemento fraguado como consecuencia de la acción antioxidante del monómero de vitamina E.⁹⁸

I.5. CEMENTOS ÓSEOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE BISFOSFONATOS

Los bisfosfonatos (BPs) son análogos estables (orgánicos) a la molécula de pirofosfato inorgánico, en la que la estructura P-O-P ha sido sustituida por la P-C-P; este doble grupo fosfónico confiere particular resistencia a la hidrólisis, que en el caso del pirofosfato es muy rápida. Las dos valencias libres del átomo de C se unen a radicales, R_1 y R_2 . El R_1 , junto con los átomos de P, forman un “tridente” mediante el cual el bisfosfonato se une a los cristales de hidroxiapatita con gran afinidad y, por lo tanto al hueso; esta unión es particularmente firme cuando R_1 es un radical -OH. El radical R_2 determina la potencia antirresortiva del fármaco, que crece con la longitud de la cadena hidrocarbonada hasta un máximo de 3-4 C, y aumenta con la existencia de un grupo amino.

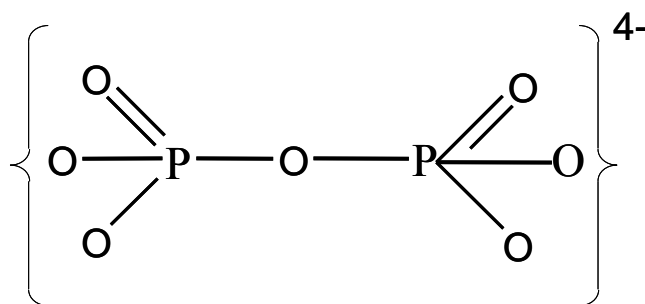


Figura I.5. Estructura química del pirofosfato

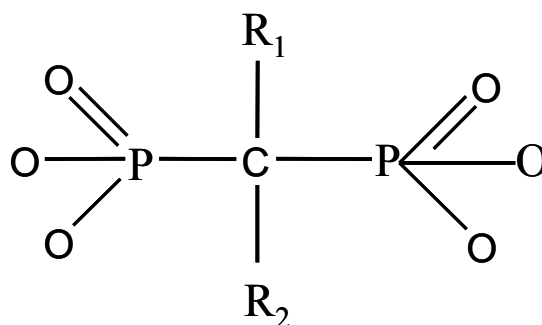


Figura I.6. Estructura química del bisfosfonato.

Los bisfosfonatos de primera generación están caracterizados por una cadena simple y la falta de átomos de nitrógeno, por ejemplo etidronato y clodronato. Los aminobisfosfonatos, que contienen grupos amino en el lado alifático de la cadena o un anillo heterocíclico con un átomo de nitrógeno (segunda y tercera generación), tienen al menos 100 ó 1000 veces más potencia antirresortiva.

Estos bisfosfonatos son eliminados a través de la circulación sanguínea, excepto una pequeña cantidad que se deposita en el hueso. Su potencia está relacionada con el mecanismo de acción, que es principalmente por la inducción de la interrupción de la vía metabólica del melavonato y, en consecuencia, la inhibición de la prenilación de proteínas pequeñas enlazantes de GTP, que al final lleva a la apoptosis indirecta y secundaria de los osteoclastos.⁹⁹

La acción de los bisfosfonatos sobre los osteoblastos también ha sido estudiada, sin embargo los resultados resultan ser controvertidos y el tema se encuentra en debate. Así, hay estudios que apoyan que fármacos como el alendronato y el risedronato promueven la proliferación y maduración de los osteoblastos¹⁰⁰ mientras que en otros estudios se ha encontrado que el clodronato, pamidronato y el ácido zolendrónico poseen efectos inhibidores en la deposición de calcio sobre células derivadas de osteoblastos.¹⁰¹

En términos generales, a nivel de los tejidos, la mayor parte de los bisfosfonatos inhiben la destrucción ósea y producen un incremento de la densidad mineral del hueso por decrecimiento de la resorción ósea y renovación del hueso. A nivel celular, el último blanco de la acción de los bisfosfonatos es la inhibición de la actividad de los osteoclastos, y hay evidencias del incremento de hueso maduro en apoptosis.

La acción antirresortiva se aprecia en diversas situaciones clínicas: osteoporosis, enfermedad de Paget, hipercalcemia por resorción ósea (especialmente, la de enfermedades malignas) y en las lesiones osteolíticas asociadas a metástasis óseas o al mieloma múltiple.

Retrasar el recambio óseo en pacientes con enfermedad de Paget y el tratamiento de las metástasis óseas en pacientes con cáncer, como el mieloma múltiple, representan dos aplicaciones comunes. En este sentido, los bisfosfonatos han disminuido notablemente la morbosidad de pacientes con cáncer y con metástasis óseas. El tratamiento ortopédico pediátrico ha sido testigo de la introducción de los bifosfonatos para el uso en enfermedades como la osteogénesis imperfecta y la displasia fibrosa. La investigación científica básica también señala la posibilidad de utilizar bisfosfonatos para el aumento de la salud periprotésica de los huesos y la longevidad de la artroplastia total articular.¹⁰²

El tratamiento y la prevención de la osteoporosis sigue siendo la indicación más común para el uso de bisfosfonatos, y un número de fármacos, incluyendo etidronato, alendronato, risedronato e ibandronato, ha ganado la aprobación de la FDA para esta indicación. Estos medicamentos han demostrado su utilidad tanto en la prevención primaria y secundaria, así como en el tratamiento de la osteoporosis y de las fracturas relacionadas con la osteoporosis.^{103,104} Tiludronato, alendronato, pamidronato, y risedronato se utilizan frecuentemente en el manejo de la enfermedad de Paget. Pamidronato y ácido zoledrónico se habían aprobado por la FDA para el tratamiento de la osteolisis metastásica y de la hipercalcemia maligna.¹⁰⁵

A pesar de estos resultados prometedores, han surgido informes de la FDA sobre efectos adversos graves asociados con los bisfosfonatos, que impulsaron a la FDA a revisar la seguridad de estos fármacos. La osteonecrosis mandibular¹⁰⁶ sigue siendo uno de los más conocidos y comúnmente citados. Así mismo, complicaciones oftálmicas y dermatológicas,¹⁰⁷ también han sido identificadas en la literatura.

Tabla I.2. Estado actual de bisfosfonatos comerciales.

Nombre genérico	Nombre del Productor	Potencia relativa	Estado actual
Etidronato	Didronel/Proctor & Gamble Pharmaceuticals, Cincinnati, OH	1	FDA-O (PO) FDA-HC (IV)
Clodronato	Bonefos, Clostoban, Loron, Ostac/Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ	10	Fase III completa En proceso
Tiludronato	Skelid/Sanofi Pharmaceuticals, New York,	10	FDA-O (PO)
Pamidronato	Aredia/Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ	100	FDA - B&MM (IV) FDA-HC (IV)
Alendronato	Fosamax/Merck & Co, West Point, PA	1.000	FDA-O (PO)
Ibandronato	Bondronat/Rhone-Poulenc Rorer, Collegeville, PA	10.000	Fase III completa
Ácido Zoledrónico	Zometa/Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ	100.000	FDA - B&MM (IV) FDA-HC (IV)

A finales del año 2003 y comienzos del 2004 se recogieron en la literatura científica los primeros casos que evidenciaban una asociación entre la administración de aminobisfosfonatos intravenosos y la presentación de exposiciones óseas de evolución tórpida de los huesos maxilares. En la actualidad se podría hablar de dos entidades con diferentes grados de información científica: las osteonecrosis de los maxilares en relación con la administración intravenosa de estos medicamentos y las osteonecrosis de los maxilares en relación con la administración oral de los mismos. Para el primer grupo las estrategias de prevención y tratamiento empiezan a estar consolidadas, mientras que para el segundo se precisará una mayor documentación científica para alcanzar este objetivo.¹⁰⁸

La mayoría de los BPs actualmente, son administrados por vía oral para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una resorción ósea osteoclástica excesiva, pero su absorción es muy pobre (alrededor del 1% de la dosis

administrada), y sólo el 20% del compuesto absorbido es incorporado en el hueso. Además, se observa que los BPs producen trastornos gastrointestinales como efectos secundarios. En consecuencia, se han desarrollado otras vías de administración como la nasal o inyección subcutánea o intramuscular. Pero el objetivo principal para estos fármacos es su administración in situ, evitando de este modo los efectos secundarios asociados con la terapia sistémica convencional. La literatura al respecto es todavía escasa.¹⁰⁹ Compuestos de fosfato cálcico (CaP) de varias composiciones han sido asociados a zoledronate y encontrados adecuados para la aplicación local, con una cinética de liberación del fármaco compatible con la inhibición de la resorción ósea.¹¹⁰ La incorporación de los BPs a los cementos óseos acrílicos también ha sido ensayada.¹¹¹ Se ha observado que la mezcla de etidronate (un BP de primera generación) con cemento óseo en base a poli(metacrilato de metilo) (PMMA) ha dado resultados positivos en la inhibición de la resorción ósea inducida por partículas de PMMA,¹¹² lo que abre una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de fenómenos de osteolisis debidos al aflojamiento aséptico.¹¹³ Recientemente, nuestro grupo de investigación ha sintetizado dos bisfosfonatos pertenecientes a la segunda y tercera generación y los ha incorporado a sistemas acrílicos inyectables basados principalmente en metacrilato de metilo (MMA) y metacrilato de vitamina E (MVE) con el fin de aplicar estas formulaciones para el refuerzo y la regeneración de tejidos duros de baja densidad o en el tratamiento de los cuerpos vertebrales lesionados, en la cirugía mínimamente invasiva.¹¹⁴

I.6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Biomaterials. Principles and Applications. Park JB, Bronzino JD (Editores). CRC Press. Boca Raton, Florida, 2000.
- ² Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (Editores). Academic Press. Nueva York, 1996.
- ³ Salvado Muñoz M. Estudio Osteorregenerativo tras Resección Crítica de Cúbito de Conejo. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, 2002.
- ⁴ Raya Cobo A. Estudio de la Biocompatibilidad de un Nuevo Cemento Óseo Acrílico. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 1992.
- ⁵ Lyman DJ, Rowland SM, Biomaterials. En: Kroschwitz JI (Editor). Polymers: Biomaterials and Medical Applications. Encyclopaedia Reprint Series. John Wiley & Sons. Nueva York, 1989, pp. 52-71.
- ⁶ Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (Editores). Academic Press. Nueva York, 1996.
- ⁷ Smith DC. Lutes, glues, cements and adhesives in medicine and dentistry. Biomed Eng 1973;8:108-115.
- ⁸ Williams DF. Biocompatibility of Implant Materials. Sector Publishing Limited. Londres, 1976.
- ⁹ Osborn JF. Biomaterials and their application to implantation. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd 1979;89:1138-1139.
- ¹⁰ Black J. Biological Performance of Materials. Fundamentals of Biocompatibility. Marcel Dekker. Nueva York, 1992.
- ¹¹ Black J. Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice. Churchill Livingstone. Nueva York, 1988.
- ¹² Williams DF. Biocompatibility of Tissue. Techniques of Biocompatibility Testing. CRC Press. Boca Raton. Florida, 1985.
- ¹³ Sweeny WT. Acrylic resins in prosthetic dentistry. Dent Clin North Am 1958;2: 593-601.
- ¹⁴ Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. Eur J Oral Sci 1997;105:97-116.
- ¹⁵ Brauer GM, Antonucci JM. Dental applications. En: Kroschwitz JI (Editor). Polymers: Biomaterials and Medical Applications. Encyclopaedia Reprint Series. John Wiley & Sons. Nueva York, 1989, pp. 109-130.

- ¹⁶ Wise DL. Biomaterials for dental implants. En: Wise DL (Editor). Encyclopaedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Part B, Vol 2. Applications. Marcel Dekker. Nueva York, 1995.
- ¹⁷ Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to shaft of the femur. J Bone Joint Surg 1960;42 (B):28-35.
- ¹⁸ Ellis RH, Mulvein J. The cardiovascular effects of methyl methacrylate. J Bone Joint Surg 1974;56 (B):59-61.
- ¹⁹ Phillips H, Cole PV, Lettin AW. Cardiovascular effects of implanted acrylic bone cement. Brit Med J 1971;3:460-461.
- ²⁰ Homsy CA, Tullos HS, Anderson MS, Diferrante NM, King JW. Some physiological aspects of prosthesis stabilization with acrylic polymer. Clin Orthop, 1972;83:317-328.
- ²¹ Martín-Granizo López R. Fisiopatología de la articulación temporomandibular. Anomalías y deformidades. Internet, 2001.
- ²² Mercuri LG. Measurement of the heat of reaction transmitted intracranially during polymerisation of methyl methacrylate cranial bone cement used in stabilization of the fossa component of an alloplastic temporomandibular joint prosthesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992;74:137-42.
- ²³ Elson RA, Jephcott AE, Mc Gechie DB, Verettas D. Antibiotic-loaded acrylic cement. J Bone Joint Surg 1977;59(B):200-205.
- ²⁴ Welch A. Antibiotics in acrylic bone cements. *In vitro* studies. J Biomed Mater Res 1978;12:679-700.
- ²⁵ Vecsei V, Barquet A. Treatment of chronic osteomyelitis by necrectomy and gentamicin-PMMA beads. Clin Orthop 1981;159:201-207.
- ²⁶ Luparello D, Bruschi S, Verna G, Bogetti P, Datta G, Fracalvieri M, Luparello V. Cranioplasty with polymethylmethacrylate. The clinico-statistical considerations. Minerva Chir 1998;53:575-579.
- ²⁷ Lara WC, Schweitzer J, Lewis RP, Odum BC, Edlich RF, Gampper TJ. Technical considerations in the use of polymethyl methacrylate in cranioplasty. J Long Term Eff Med Implants 1998;8:43-53.
- ²⁸ Habal MB, Leake DL. Experience in reconstructive surgery of craniomaxillofacial deformities with osteomesh, eleven years experience. En: Williams JM, Nichols MF, Zingg W (Editores). Materials Research Society. Symposia Proceedings. Vol 55. Biomedical Materials. 1986.

- ²⁹ Lynkins CL, Friedman CD, Costantino PD, Horioglu R. Hydroxyapatite cement in craniofacial skeletal reconstruction and its effects on the developing craniofacial skeleton. *Arch Otorrinolaringol Head Neck Surg* 1998;124: 153-159.
- ³⁰ Ripamonti U, Petit JC, Moehl T, van der Heever B, van Wyk J. Immediate reconstruction of massive cranio-orbito-facial defects with allogeneic and alloplastic matrices in baboons. *J Craniomaxillofac Surg* 1993;21:302-308.
- ³¹ Picknell B, Mizen L, Sutherland R. Antibacterial activity of antibiotics in acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg* 1977;59 (B):302-307.
- ³² Persson BM, Wouters HW. Curettage and acrylic cementation in surgery of giant cell tumours of bone. *Clin Orthop* 1976;120:125-133.
- ³³ Mathis JM, Barr JD, Belkoff SM, Barr MS, Jensen ME, Deramond H. Percutaneous vertebroplasty. A developing standard of care for vertebral compression fractures. *Am J Neuroradiol* 2001;22:373-381.
- ³⁴ Cotten A, Boury N, Cortet B, Assaker R, Demondion X, Leblond D, Chastanet P, Dukesnoy B, Deramond H. Percutaneous vertebroplasty: state of the art. *Radiographics* 1998;18:311-323.
- ³⁵ Schatzker J, Haeri GB, Chapman M. Methylmethacrylate as an adjunct in the internal fixation of intertrochanteric fractures of the femur. *J Trauma* 1978;18:732-735.
- ³⁶ Martínez-Quiñones JV, Aso-Escario J, Arregui-Calvo R. Refuerzo vertebral percutáneo: vertebroplastia y cifoplastia. Procedimiento técnico. *Neurocirugía* 2005;16:427-440.
- ³⁷ Hardouin P. Bone cements and their uses in orthopaedics and rheumatology. GRIBOI (Groupe de Reserche Interdisciplinaire sur les Biomateriaux Osteo-articulaires Injectables). *Presse Med* 1996;25:1860-1862.
- ³⁸ Lemperle G, Gauthier-Hazan N, Lemperle M. PMMA microspheres (Artecoll) for skin and soft tissue augmentation. Part II: Clinical investigations. *Plast Reconstruct Surg* 1995;96:627-634.
- ³⁹ Lemperle G, Gauthier-Hazan N, Lemperle M. PMMA-microspheres (Artecoll) for long lasting correction of wrinkles: refinements and statistical results. *Aesthetic Plast Surg* 1998;22:356-365.
- ⁴⁰ Hkiskes R. Heat regeneration and conduction analysis of acrylic bone cement in situ. *Acta Orthop Escand* 1980;185:43-105.
- ⁴¹ Kühn KD. *Bone Cements Up-to-Date Comparison of Physical and Chemical Properties of Commercial Materials*. Springer. 2000.

- ⁴² Volz RG, Gradisar IH. Polymethylmethacrylate an Update. American Academic of Orthopaedic Surgeon. Committee on Biomedical Engineering. Chairman Dunn HK. Las Vegas, 1985.
- ⁴³ Wilert HG. The morphology of polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement. Arch Orthop Trauma Surg 1979;94:265-292.
- ⁴⁴ De Wijn JR, Slooff TJJH, Driessens FCM. Characterisation of bone cements. Acta Orthop. Scand 1975;46,38-51.
- ⁴⁵ Norrelikke J, Coridon L. Corneal ulcer after exposure to vapours from bone cements methylmethacrylate and hydroquinone. Int Arch Occup Environ Health 1985;56:161-165.
- ⁴⁶ Svartling N, Plaffi P. Blood levels and half life of methylmethacrylate after tourniquet release during knee artroplasty. Arch Orthop Trauma Surg 1986;105:36-39.
- ⁴⁷ Mulroy RD Jr, Harris WH. The effect of improved cementing techniques on component loosening in total hip replacement. An eleven-years radiographic review. J Bone Joint Surg 1990;72 (B):757-760.
- ⁴⁸ Lautenschlager EP, Stupp SI, Keller JC. Structure and Properties of Acrylic Bone Cement. Functional Behaviour of Orthopaedic Biomaterials. CRC Press. Boca Raton. Florida, 1987.
- ⁴⁹ Lee AJ, Ling RS. Further studies of monomer loss by evaporation during the preparation of acrylic cement for use in orthopaedic surgery. Clin Orthop 1975;106:122-125.
- ⁵⁰ Brauer GM, Davenport RM, Hansen WC. Autoaccelerating effects of amines in polymerisation of methylmethacrylate. Modern Plastics 1956;34:153-256.
- ⁵¹ Jefferiss CD, Lee AJ, Ling RS. Thermal aspects of self-curing polymethylmethacrylate. J Bone Joint Surg 1975;57 (B):511-518.
- ⁵² Odian G. Principles of Polymerisation. Wiley Interscience. Nueva York, 1991.
- ⁵³ Brauer GM, Steinberger DR, Stansbury JW. Dependence of curing time, peak temperature and mechanical properties on composition of bone cement. J Biomed Mater Res 1986;20:839-852.
- ⁵⁴ Noble PC. Selection of acrylic bone cements for use in joint replacement. Biomaterials 1983;4:94-100.
- ⁵⁵ Meyer PR Jr, Lautenschlager EP, Moore BK. On the setting properties of acrylic bone cement. J Bone Joint Surg 1973;55 (A):149-156.

- ⁵⁶ Turner RC, Atkins PE, Ackley MA, Park JB. Molecular and macroscopic properties of PMMA bone cement: free-radical generation and temperature change versus mixing ratio. *J Biomed Mater Res* 1981;15:425-432.
- ⁵⁷ Schoenfeld CM, Conard GJ, Lautenschlager EP. Monomer release from methacrylate bone cements during simulated *in vivo* polymerisation. *J Biomed Mater Res* 1979;13:135-147.
- ⁵⁸ Freitag TA, Cannon SL. Fracture characteristics of acrylic bone cement. II. Fatigue. *J Biomed Mater Res* 1977;11:609-624.
- ⁵⁹ Bayne SC, Lautenschlager EP, Compere CL, Wildes R. Degree of polymerisation of acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res* 1975;9:27-34.
- ⁶⁰ Burke DW, Gates EI, Harris WH. Centrifugation as a method of improving tensile and fatigue properties of acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg* 1984;66(A):1265-1273.
- ⁶¹ Davies JP, O'Connor DO, Burke DW, Jasty M, Harris WH. The effect of centrifugation on the fatigue life of bone cement in the presence of surface irregularities. *Clin Orthop* 1988;229:156-161.
- ⁶² Lidgren L, Bodelind B, Moller J. Bone cement improved by vacuum mixing and chilling. *Acta Orthop Scand* 1987;58:27-32.
- ⁶³ Wixson RL, Lautenschlager EP, Novak MA. Vacuum mixing of acrylic bone cement. *J Arthroplasty* 1987;2:141-149.
- ⁶⁴ Huiskes R. Some fundamental aspects of human bone replacement. Analysis of stresses and heat conduction in bone-prosthesis structures. *Acta Orthop Scand* 1980;185(Suppl):1-208.
- ⁶⁵ Mulroy RD Jr, Harris WH. The effect of improved cementing techniques on component loosening in total hip replacement. An eleven-years radiographic review. *J Bone Joint Surg* 1990;72(B):757-760.
- ⁶⁶ Buchholz HW, Gartman HD. Infection prevention and surgical management of deep insidious infection in total endoprosthesis. *Chirurg* 1972;43:446-453.
- ⁶⁷ Nelson RC, Hoffman RO, Burton TA. The effect of antibiotic additions on the mechanical properties of acrylic cement. *J Biomed Mater Res* 1978;12:473-490.
- ⁶⁸ Wright TM, Sullivan DJ, Arnoczky SP. The effect of antibiotic additions on the fracture properties of bone cements. *Acta Orthop Scand* 1984;55:414-418.
- ⁶⁹ Lautenschlager EP, Marshall GW, Marks KE, Schwart J, Nelson CL. Mechanical strength of acrylic cements impregnated with antibiotics. *J Biomed Mater Res* 1976; 10:837-845.

- ⁷⁰ Gruen TA, Markolf KL, Amstutz HC. Effects of laminations and blood entrapment on the strength of acrylic bone cement. *Clin Orthop* 1976;119:250-255.
- ⁷¹ Lee AJ, Ling RS, Vangala SS. Some clinically relevant variables affecting the mechanical behaviour of bone cement. *Arch Orthop Trauma Surg* 1978;92:1-18.
- ⁷² American Society for Testing Materials (ASTM). ASTM Standard F451-99a: Standard specification for acrylic bone cement. *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 13.01. West Conshohocken, PA, United States.
- ⁷³ International Organisation for standardisation (ISO). ISO 5833:2002(E): Implants for surgery – Acrylic resin cements. Switzerland.
- ⁷⁴ Mazullo S, Paolini M, Verdi C. Numerical simulations of thermal bone necrosis during cementation of femoral prosthesis. *J Math Biol* 1991;29:475-494.
- ⁷⁵ Sheinin EB, Benson WR, Brannon WL. Determination of methylmethacrylate in surgical acrylic cement. *J Pharm Sci* 1976;65:280-283.
- ⁷⁶ Willert HG, Frech HA, Bechtel A. Measurements of the quantity of monomer leaching out of acrylic bone cement into the surrounding tissues during the process of polymerisation. En: *Biomedical Applications of Polymers*. Plenum Press. Nueva York, 1975.
- ⁷⁷ Brauer GM, Termini DJ, Dickson G. Analysis of the ingredients and determination of residual components of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res* 1977;11: 577-607.
- ⁷⁸ Miettinen VM, Vallittu PK. Release of residual methylmethacrylate into water from glass fibre-poly(methylmethacrylate) composite used in dentures. *Biomaterials* 1997;18:181-185.
- ⁷⁹ *Encyclopaedia of Polymer Science and Technology*. Second Edition. Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G (Editores). Wiley-Interscience Pbl. Nueva York, 1989.
- ⁸⁰ Holm NJ. The modulus of elasticity and flexural strength of some acrylic bone cements. *Acta Orthop Scand* 1977;48:436-442.
- ⁸¹ Robinson RP. Mechanical properties of poly(methylmethacrylate) bone cements. *J Biomed Mater Res* 1981;15:203-208.
- ⁸² Lautenschlager EP, Schoenfeld CM, Bayne SC, Meyer PR Jr. The status of acrylic bone cement properties. *Proc. 6th Ann Int Biomater Symp*. Clemson University. Clemson S. C. 1974.
- ⁸³ Pereira CS, Cunha AM, Reis RL, Vázquez B, San Román J. New starch-based thermoplastic hydrogels for use as bone cements or drug-delivery carriers. *J Mater Sci Mater Med* 1988;9:825-833.

- ⁸⁴ Guida G, Riccio V, Gatto S, Migliaresi C, Nicodemo L, Nicolais L, Palomba C. A glass bead composite acrylic bone cements. En: Ducheyne P, van der Perre G, Aubert AE (Editores). *Biomaterials and Biomechanics*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 1984.
- ⁸⁵ Olmi R, Moroni A, Castaldani A, Cavallini A, Romagnoli R. *Ceramics in Surgery*. Elsevier. 1983.
- ⁸⁶ Murukami A, Behiri JC, Bonfield W. Rubber-modified bone cement. *J Mater Sci Mater Med* 1988;23:2029-2036.
- ⁸⁷ Taylor D, Moalic JM, Clark FM, Mc Cormack B, Sheeham J. Fibre reinforcement of bone cement. *Eng Med* 1988;17:31-35.
- ⁸⁸ Vila MM, Behiri JC, Planell JA. Biomaterial-tissue interfaces. *Advances in Biomaterials*. Elsevier. 1992, p. 10.
- ⁸⁹ Pascual B, Vázquez B, Gurruchaga M, Goñi I, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, Levenfeld B, San Román J. New aspects of the effect of size and size distribution of the setting parameters and mechanical properties of acrylic bone cements. *Biomaterials* 1996;17:509-516.
- ⁹⁰ Litsky AS, Rose RM, Rubin CT, Thrasher EL. A reduced modulus acrylic bone cement: preliminary results. *J Orthop Res* 1990;8:623-626.
- ⁹¹ Saito M, Maruoka A, Mori T, Sugano N, Hino K. Experimental studies on a new bone bioactive bone cement: hydroxyapatite composite resin. *Biomaterials* 1994; 15:156-160.
- ⁹² Fritsch EW. Static and fatigue properties of two new low-viscosity PMMA bone cements improved by vacuum mixing. *J Biomed Mater Res* 1996;31:451-456.
- ⁹³ Trap B, Wolf P, Jensen JS. Acrylic bone cements: Residual and extractability of methacrylate monomers and aromatic amines. *J Appl Biomater* 1991;3:51-57.
- ⁹⁴ Tanzi MC, Levi M, Danusso F. Amides from N-phenyl piperazine as low toxicity activators in radical polymerisations. *Polymer* 1990;31:1735-1738.
- ⁹⁵ Vázquez B, Elvira C, Levenfeld B, Pascual B, Goñi I, Gurruchaga M, Ginebra MP, Gil FX, Planell JA, Liso PA, Rebuelta M, San Román J. Application of tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res* 1997;34:129-136.
- ⁹⁶ Liso PA, Vázquez B, Rebuelta M, Hernaez ML, Rotger R, San Román J. Analysis of the leaching and toxicity of new amine activators for the curing of acrylic bone cements and composites. *Biomaterials* 1997;18:15-20.
- ⁹⁷ Oysaed H. Dynamic mechanical properties of multiphase acrylic systems. *J Biomed Mater Res* 1990;24:1037-1048.

- ⁹⁸ Mendez JA, Aguilar MR, Abraham GA, Vázquez B, Dalby M, Di Silvio L, San Román J. New acrylic bone cements conjugated to vitamin E: curing parameters, properties and biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 2002;62:299-307.
- ⁹⁹ Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88:2961-78.
- ¹⁰⁰ Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25:4105-15.
- ¹⁰¹ Kellinsalmi M, Mönkkönen J, Leskeä H-V, Parikka V, Hämäläinen M, Lehenkari P. In vitro comparison of clodronate, pamidronate and zoledronic acid effects on rat osteoclasts and human stem cell-derived osteoblasts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97:382-391.
- ¹⁰² Shanbhag AS. Use of bisphosphonates to improve the durability of total joint replacements. *J Am Acad Orthop Surg* 2006;14(4):215-225.
- ¹⁰³ Wells GA, Cranney A, Peterson J, et al. Etidronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(1):CD003376.
- ¹⁰⁴ Wells G, Cranney A, Peterson J, et al. Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(1):CD004523.
- ¹⁰⁵ Morris CD, Einhorn TA. Bisphosphonates in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(7):1609-1618.
- ¹⁰⁶ Grewal VS, Fayans EP. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a clinician's reference to patient management. *Today's FDA* 2008;20(8):38-41, 43-46.
- ¹⁰⁷ Belhadjali H, Slim R, Aouam K, Youssef M, Zili J. Cutaneous vasculitis induced by risedronate. *Allergy* 2008;63(10):1405.
- ¹⁰⁸ Junquera LM, Martín Granizo R. Diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial (SECOM). *Rev. Esp.Cir. Oral y Maxilofac* 2008;30(3):145-156.
- ¹⁰⁹ Ezra A, Golomb G. Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv Drug Deliver Rev* 2000;42:175-95.
- ¹¹⁰ Josse S, Faucheux C, Soueidan A, Grimandi G, Massiot D, Alonso B, Janvier P, Laïb S, Pilet P, Gauthier O, Daculsi G, Guicheux J, Bujoli B, Bouler JM. Novel biomaterials for bisphosphonate delivery. *Biomaterials* 2005;26:2073-80.

¹¹¹ Simpson H, Athanasou N, Yates AJ. Bisphosphonate cement composition to prevent aseptic loosening of orthopaedic implant devices. Patent WO 96-US8515 19960603.

¹¹² Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray DW, Athanasou NA. Bisphosphonates in bone cement inhibit PMMA particle induced bone resorption. *Ann Rheum Dis* 1998;57:614-8.

¹¹³ Shanbhag AS. Use of bisphosphonates to improve the durability of total joint replacements. *J Am Acad Orthop Surg* 2006;14:215-225.

¹¹⁴ Rodríguez-Lorenzo LM, Fernández M, Parra J, Vázquez B, López-Bravo A, San Román J. Acrylic injectable and self-curing formulations for de local release of bisphosphonates in bone tissue. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2007; 83B:596-608.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación más amplio realizado conjuntamente por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC), la Unidad Asociada ICTP (CSIC) – Unidad de Investigación Clínica y Biopatología Experimental del Hospital Provincial de Ávila y el Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Nuestra hipótesis de trabajo ha consistido en desarrollar nuevas formulaciones de cemento óseo acrílico basadas en metacrilato de vitamina E como sistemas inyectables en cirugía máxilofacial y cirugía ortopédica, para el refuerzo y la regeneración de tejidos duros de baja densidad, y en el tratamiento de los cuerpos vertebrales lesionados, en cirugía mínimamente invasiva.

Así mismo, se han desarrollado formulaciones cargadas con un bisfosfonato para su aplicación en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una alta resorción ósea como la osteoporosis.

Con esta hipótesis de trabajo, los objetivos han sido la preparación y caracterización de diferentes formulaciones de cementos en base a metacrilato de vitamina E y la evaluación de su comportamiento biológico tanto *in vitro* como *in vivo*, basándonos, en ambos casos, en las directrices recomendadas en la Norma UNE-EN-ISO 10993.

Así los objetivos concretos han sido:

- Preparar y caracterizar nuevas formulaciones inyectables de cementos óseos acrílicos mediante incorporación de metacrilato de vitamina E a la matriz polimerizada.
- Preparar y caracterizar las formulaciones inyectables en presencia de un bisfosfonato para que actúen como sistemas de liberación local del medicamento.

- Evaluar el comportamiento *in vitro* de las formulaciones mediante cultivos celulares utilizando diferentes estirpes como células de tipo fibroblástico y osteoblastos humanos.

- Evaluar la respuesta del tejido conectivo *in vivo* tras inyección subcutánea del sistema en su estado inyectable utilizando la rata como animal de experimentación.

- Evaluar la respuesta del tejido óseo *in vivo* mediante aplicación del sistema inyectable en dicho tejido utilizando el conejo como animal de experimentación.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. FORMULACIÓN DE LOS CEMENTOS ÓSEOS

III.1.1. FORMULACIÓN DEL CEMENTO ÓSEO ACRÍLICO CONVENCIONAL. GRUPO I (GRUPO CONTROL)

La formulación del cemento óseo acrílico control es una formulación en base a poli (metacrilato de metilo) (PMMA) de acuerdo con la composición de las formulaciones comerciales. El cemento se prepara por la mezcla de un componente líquido y un componente sólido.

El componente líquido está formado principalmente por el monómero metacrilato de metilo (MMA) y el activador. La N, N-dimetil-4-toluidina (DMT) es el activador más comúnmente empleado en las formulaciones comerciales, sin embargo, debido a su alta toxicidad,^{1,2,3,4} en este trabajo la DMT se sustituye por una amina de menor toxicidad.⁵ La amina utilizada es la 4,4'-bis-dimetilaminobenzidrol (BZN). Este compuesto contiene dos grupos amino en su estructura, lo que resulta en un aumento de su eficacia, y su estructura química presenta gran similitud con aquella del violeta de genciana, un conocido antiséptico muy utilizado a nivel hospitalario. La estructura química de la amina BZN se muestra en la Figura III.1.

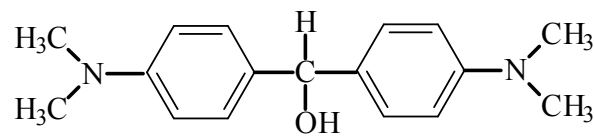


Figura III.1. Estructura química del activador BZN.

Estudios previos⁵ sobre la biocompatibilidad del activador BZN han mostrado que presenta una citotoxicidad considerablemente menor frente a leucocitos polimorfonucleares y una dosis letal 50 (LD₅₀) de 3 a 4 veces menor que la de la DMT. Así mismo, la amina BZN posee una mayor actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos gram-positivos y gram-

negativos. Además, el estudio de implantación de cemento óseo acrílico formulado con este activador en el fémur de conejo, ha puesto de manifiesto una más temprana neoformación ósea en comparación a la observada tras la implantación de un cemento comercial activado por DMT.

El MMA (Acros) estabilizado con 100 ppm de monometiléter de hidroquinona, y el activador de baja toxicidad, 4,4' bis dimetilamino-benzidrol, (BZN), son utilizados como se reciben del proveedor (Sigma). El activador se añade al monómero en una cantidad de 1,0 %-p respecto del peso total de la fase líquida.

El componente sólido está formado por partículas esféricas de poli(metacrilato de metilo), PMMA, también llamadas perlas, suministradas por Industrias Quirúrgicas de Levante (IQL), cuyas características químico-físicas se recogen en la Tabla III.1, y la distribución de tamaños de partícula se muestra en la Figura III.2. Esta fase contiene también un 10 %-p de dióxido de zirconio (ZrO_2) (Comercial Riba, S.A.), polvo blanco de tamaño de partícula 14 μm diámetro promedio, que se incorpora como agente radiopaco para el posterior seguimiento radiológico de la prótesis.

Al componente sólido se añade un 1,5 %-p, de peróxido de benzoilo (BPO) (Merck) como iniciador radicalario, que se utiliza previamente purificado por recristalización en metanol.

Tabla III.1. Características de las partículas de PMMA (IQL) utilizadas en este trabajo.

Diámetro promedio de partícula, (μm)	33,1
Peso molecular promedio en número (\overline{M}_n)	$64 \cdot 10^3$
Polidispersidad ($\overline{M}_w / \overline{M}_n$)	2,02
Tacticidad (σ_i)	0,262

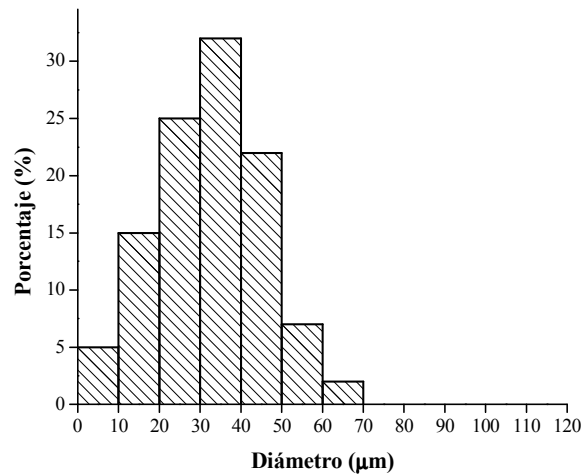


Figura III.2. Distribución del tamaño de partícula de las partículas de PMMA (IQL).

La relación sólido:líquido en la formulación control es 2:1 de acuerdo con la que se utiliza en las formulaciones comerciales.

III.1.2. FORMULACIÓN DE CEMENTOS ÓSEOS PORTADORES DE METACRILATO DE VITAMINA E (GRUPOS II, III y IV)

Como se ha comentado en la introducción de esta memoria, durante el proceso de curado de los cementos óseos acrílicos se derivan fenómenos citotóxicos debido a la liberación de radicales libres al medio fisiológico.⁶ Con el fin de paliar estos efectos se preparan cementos óseos que incorporan metacrilato de vitamina E a la fase líquida. La estructura química de la vitamina E se modifica con el fin de obtener un producto susceptible de ser polimerizado e incorporado a la matriz del cemento.

III.1.2.1. Obtención del monómero metacrilato de vitamina E (MVE)

En la obtención del derivado acrílico de la vitamina E (MVE) se utilizan los siguientes reactivos: vitamina E (α -tocoferol) (Merck), utilizada sin purificación previa, cloruro de metacrililo (Acros), purificado por destilación a

99° C, y trietilamina (Acros), purificada por reacción con hidruro cálcico a reflujo, durante 24 h y posterior destilación a 86-89° C.

El metacrilato de vitamina E se obtiene a través de la reacción del α -tocoferol con cloruro de metacrililo según se muestra en la Figura III.3. Para ello, en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml de capacidad, a temperatura ambiente se disuelven 8 g (0,019 moles) de vitamina E en 90 ml de éter dietílico seco. Efectuada la disolución del reactivo se añaden 2,6 ml (0,019 moles) de trietilamina. La mezcla se agita y a través de ella se pasa una corriente de nitrógeno durante 10 min. A continuación se añaden gota a gota 7 ml (0,072 moles) de cloruro de metacrililo, disueltos en 10 ml de éter dietílico seco. Finalizada la adición, la corriente de nitrógeno se mantiene por un período de 30 min, tras el cual la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 48 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se filtra, se lava con una disolución acuosa de hidróxido sódico (5 % p/v) y con agua destilada y se seca sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se evapora a presión reducida hasta pesada constante.

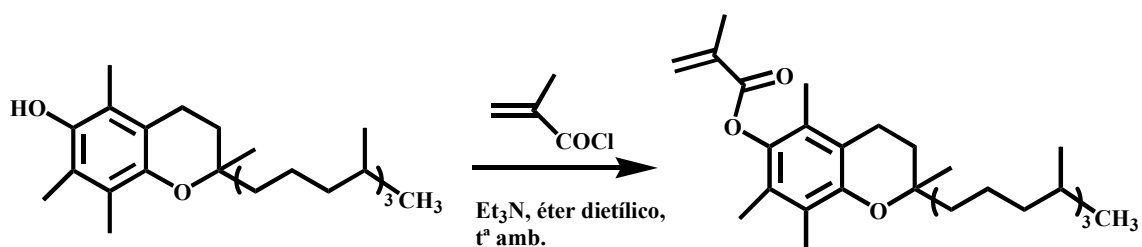


Figura III.3. Síntesis de metacrilato de vitamina E (MVE).

El producto bruto obtenido se cromatografía sobre gel de sílice con mezclas cloroformo:hexano (9:1). Se extrae una fracción de 7,3 g (75 %) que se caracteriza a través de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H RMN) en un equipo Varian XL300. Se preparan muestras del monómero en cloroformo deuterado (10 % p/v) usando tetrametilsilano como referencia interna y se registra el espectro a temperatura ambiente (Figura III.4).

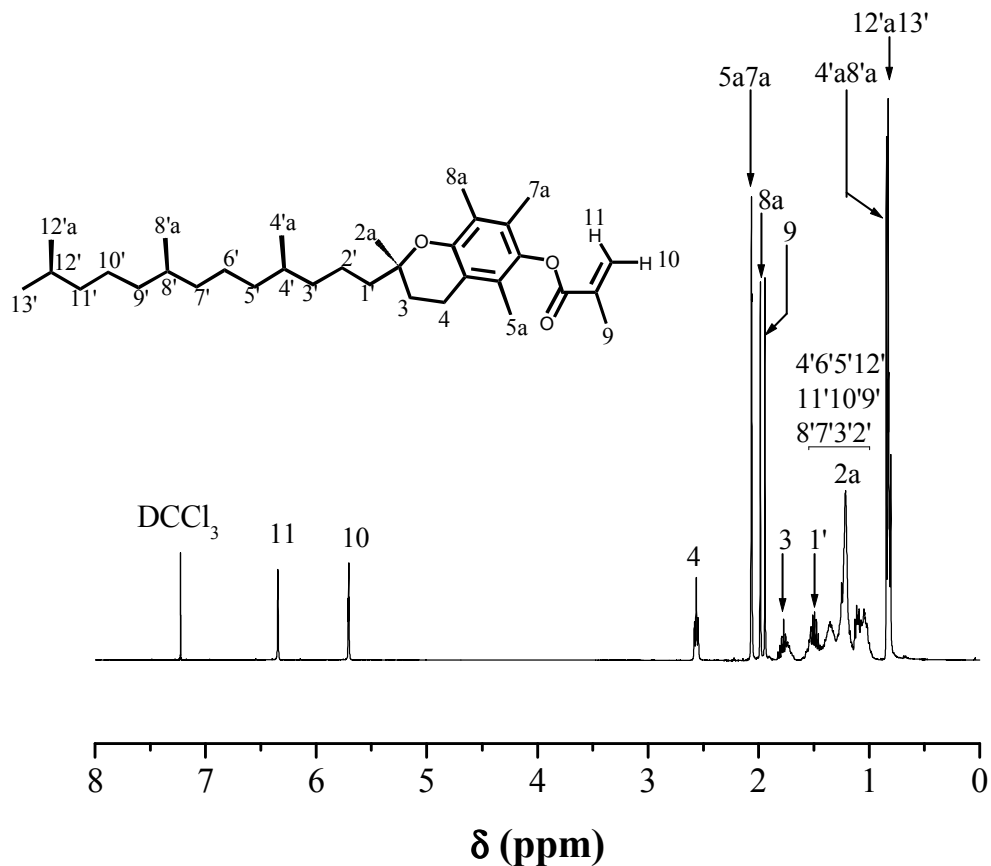


Figura III.4. Espectro de ^1H RMN de metacrilato de α -tocoferilo (MVE).

III.1.2.2. Formulación del cemento óseo acrílico correspondiente al Grupo II

La formulación correspondiente al Grupo II se obtiene mediante sustitución de un 20 %-p del monómero MMA por MVE en la fase líquida, manteniéndose la fase sólida con la misma composición descrita para el cemento control. La relación entre el peso de las fases sólida y líquida (s:l) se ajusta a 1,8:1 debido al aumento de la viscosidad de la fase líquida con la introducción de un monómero de elevado peso molecular como es el MVE, y con el fin de obtener una buena homogeneidad de la masa de cemento resultante.

III.1.2.3. Formulación del cemento óseo acrílico correspondiente al Grupo III

La formulación correspondiente al Grupo III es una extensión de la del Grupo II en la que se sustituye otro 10 %-p del monómero MMA por dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA) (Fluka) en la fase líquida, manteniéndose el 20 %-p de MVE, y de igual modo, se conserva la fase sólida del grupo control. La molécula de TEGDMA se caracteriza por poseer en su estructura dos grupos acrílicos susceptibles de participar en la reacción de polimerización, lo que da lugar a la obtención de materiales entrecruzados al reaccionar el TEGDMA con los monómeros acrílicos MMA y MVE. La estructura química del TEGDMA se muestra en la Figura III.5.

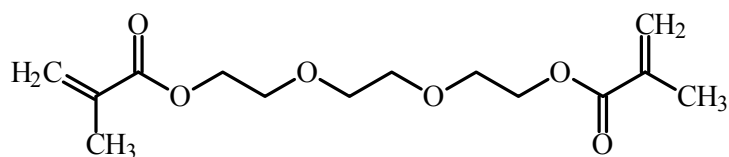


Figura III.5. Estructura química del dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA).

III.1.2.4. Formulación del cemento óseo acrílico correspondiente al Grupo IV

La formulación correspondiente al Grupo IV es una extensión de la del Grupo III en la que se mantiene la fase líquida de este grupo y se incluye un 1,5 %-p de un bisfosfonato comercial en la fase sólida. Esta formulación se diseña para evaluar los efectos biológicos de la liberación *in situ* de este medicamento. En este trabajo se utiliza como bisfosfonato la sal monosódica trihidratada del ácido alendrónico (ALEN) (suministrada por Merck), cuya fórmula empírica es $C_4H_{18}NNaO_{10}P_2$, donde los dos grupos unidos covalentemente al carbono

geminal son un grupo hidroxilo (-OH) y un radical aminopropilo $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$. En la Figura III.6 se muestra la estructura química del ácido alendrónico.

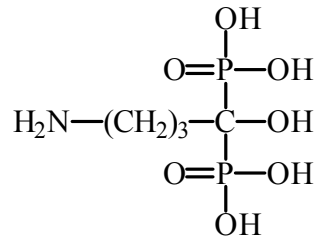


Figura III.6. Estructura química del ácido 4-amino-1-hidroxibutilideno bisfosfónico (ácido alendrónico).

En la Tabla III.2 se exponen las composiciones de las fases sólida y líquida de los cementos así como la relación sólido/líquido (s:l) de las cuatro formulaciones de cementos óseos estudiadas en este trabajo (Grupos I a IV).

Tabla III.2. Composición de las formulaciones acrílicas estudiadas en este trabajo.

Grupo	Fase Líquida (%-p)				Fase Sólida (%-p)				s:l
	MMA	MVE	TEGDMA	BZN	PMMA	ZrO ₂	BPO	ALEN	
Grupo I	99	-	-	1	88,5	10	1,5	-	2:1
Grupo II	79	20	-	1	88,5	10	1,5	-	1,8:1
Grupo III	69	20	10	1	88,5	10	1,5	-	1,8:1
Grupo IV	69	20	10	1	87	10	1,5	1,5	1,8:1

III.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

III.2.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CURADO

En este experimento se estudia la variación de la temperatura de la masa de cemento reaccionante a medida que transcurre la reacción de polimerización. Una vez que la masa de cemento adquiere una consistencia pastosa caracterizada por su no adherencia al guante de látex, tiempo que se

denomina de estado pastoso, se introduce en un molde cilíndrico, termostatzado a 25° C, de 10 mm de diámetro y 15 mm de altura, como el que se muestra en la Figura III.7. Las dimensiones de este molde difieren de las del molde descrito en la norma ISO 5833⁷ recomendado para la medición de los parámetros de curado. Las ventajas de utilizar el molde descrito en este trabajo son que la cantidad de muestra necesaria para obtener los datos requeridos es mucho menor y que el molde está dotado de una camisa que se puede termostatzar a la temperatura de interés. Además, el tamaño y la forma del molde responden a la geometría de la cavidad intrafemoral. La correlación de este molde con el descrito en la citada norma se ha analizado a través de experimentos paralelos y la desviación de la temperatura por ambos métodos ha sido menor de $\pm 2^{\circ}$ C.

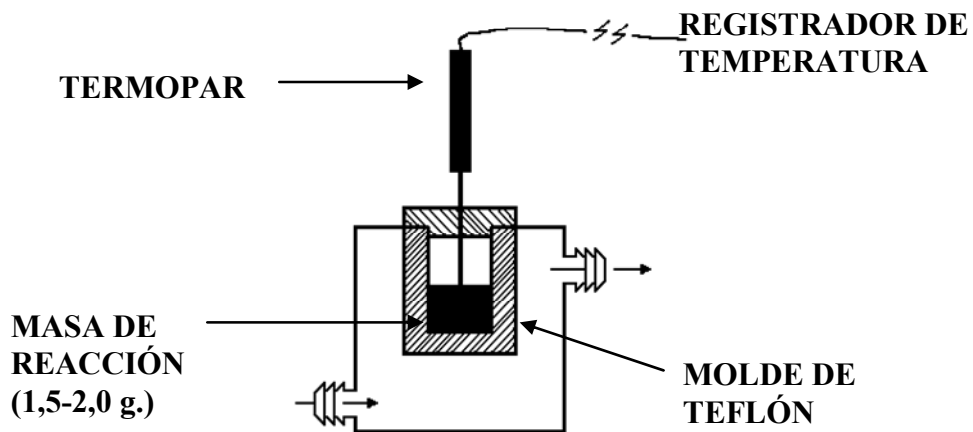


Figura III.7. Molde de teflón para el estudio de los parámetros de curado de cementos óseos acrílicos.

La variación de la temperatura respecto del tiempo de fraguado se sigue a través de un termopar, introducido en el centro del molde, a una altura de 3 mm del fondo del mismo. Con un cronómetro, conectado desde el inicio del mezclado de las fases, se efectúa la adquisición de datos de temperatura con

el tiempo, hasta que nuevamente se alcanza la temperatura ambiente, después de registrarse la temperatura máxima de curado.

Así se obtienen los perfiles temperatura-tiempo que se representan en la Figura III.8, de los que se extraen los valores de los parámetros de curado, tiempo de fraguado y temperatura máxima. La temperatura máxima es la registrada en el máximo de la exoterma y el tiempo de fraguado es el tiempo en el que la temperatura de la masa es:

$$T_{amb}^a + \frac{(T_{máx}^a - T_{amb}^a)}{2}$$

Siendo T_{amb}^a la temperatura ambiente (23 ± 1 °C) y $T_{máx}^a$ la temperatura máxima alcanzada durante el proceso de curado. Otro parámetro que tiene interés desde un punto de vista práctico es el tiempo de trabajo, que se define como la diferencia entre tiempo de fraguado y tiempo de estado pastoso.

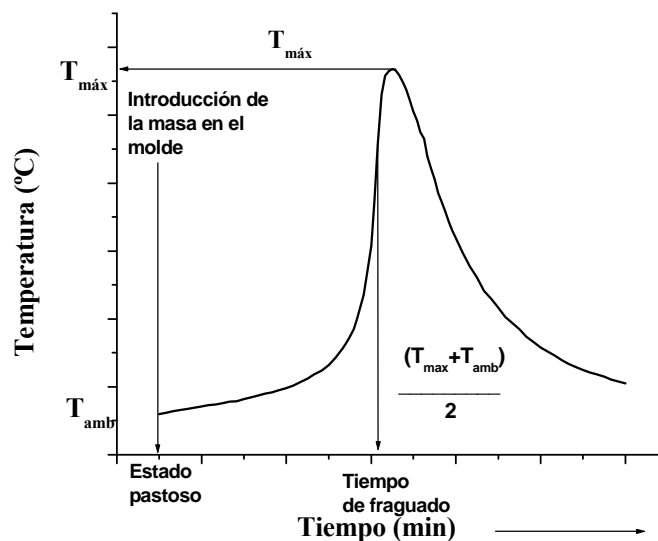


Figura III.8. Variación de la temperatura durante el fraguado de los cementos óseos acrílicos.

III.2.2. DETERMINACIÓN DE MONÓMERO RESIDUAL

La determinación de monómero residual se realiza por gravimetría de acuerdo con el protocolo publicado para resinas entrecruzadas,⁸ ya que la introducción del TEGDMA en las formulaciones de los Grupos III y IV da lugar a productos entrecruzados y, por tanto, insolubles. Para este ensayo se preparan muestras rectangulares de cementos óseos de dimensiones 10 x 30 x 1 mm, según se muestra en la Figura III.9.

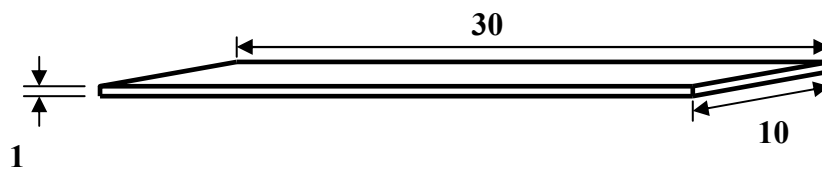


Figura III.9. Probeta de cemento óseo acrílico utilizada para la determinación de monómero residual.

Las probetas se sumergen en 10 ml de una mezcla etanol/agua 75/25 v/v y se mantienen a 37° C en estas condiciones durante una semana. Pasado este tiempo, las probetas se lavan exhaustivamente y se secan en estufa a 60° C hasta pesada constante. La cantidad de monómero residual se determina por gravimetría de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Monómero residual} = 100 \times (W_i - W_s) / W_i$$

Donde W_i es el peso de la probeta inicial seca antes de ser sumergida en el fluido y W_s es el peso de la probeta seca en estufa después de una semana en el fluido. Se realizan tres medidas por cada formulación que se promedian.

Los extractos de los cementos disueltos en la mezcla etanol/agua 75/25 v/v se aíslan y se analizan por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H RMN) en un equipo Varian XL300. Las muestras se disuelven en cloroformo deuterado (5% p/v) usando tetrametilsilano como referencia interna y se registran los espectros a temperatura ambiente.

III.2.3. PROPIEDADES MECÁNICAS: ENSAYO DE COMPRESIÓN

Para la obtención de las probetas de compresión se utiliza un molde de teflón como el mostrado en la Figura III.10, el cual presenta una serie de perforaciones cilíndricas de 6 mm de diámetro por 12 mm de altura y que se corresponden con las especificaciones de la norma ISO 5833. Las bases de las probetas cilíndricas obtenidas deben de ser planas y paralelas y formar ángulo recto con el eje longitudinal de la misma.

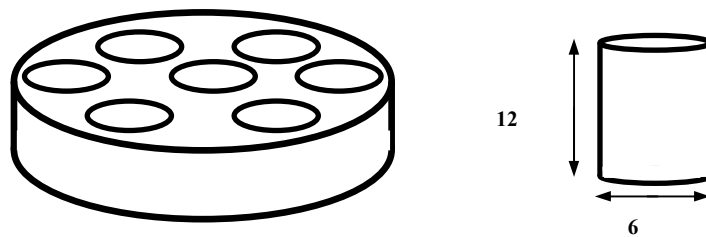


Figura III.10. Molde y probeta de ensayo mecánico de compresión.

Las probetas se ensayan en una máquina universal de ensayos Instron 4301 (Figura III.11). Para la ejecución de este experimento se fijan las siguientes condiciones:

- Temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ \text{C}$).
- Célula de carga de 5 kN.
- Deformación máxima aplicada = 30 % de la longitud total de la probeta.
- Velocidad de ensayo = 20 mm/min.

Se ensayan un mínimo de 5 probetas para cada formulación. Todos los cementos preparados en este trabajo se ensayan en mojado después de inmersión en suero fisiológico simulado,⁹ durante un período de 1 mes.

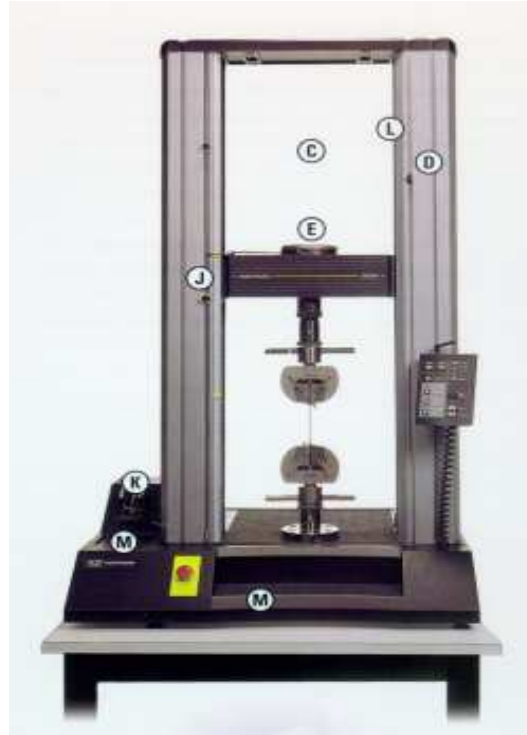


Figura III.11. Máquina universal de ensayos mecánicos Instron.

III.2.4. ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE ALENDRONATO *IN VITRO*

Para el ensayo de liberación se preparan probetas rectangulares similares a la que se muestra en la Figura III.9, correspondientes al cemento del Grupo IV y a un cemento control de poli(metacrilato de metilo) que ha sido cargado en la fase sólida con una cantidad equivalente de alendronato (1,5 %-p). Las probetas se sumergen en 10 ml de una disolución tamponada (Titrisol, KH_2PO_4 0,026 mol/l, Na_2HPO_4 0,041 mol/l, pH= 7,0) a 37°C. El medio de disolución se cambia con tampón fresco a determinados tiempos y el medio sustituido se estudia a través de espectroscopía UV-VIS en un equipo Perkin-Elmer Lambda 35. Se analiza el pico de máxima absorbancia a una longitud de onda de 202,4 nm correspondiente al alendronato. La concentración del medicamento se evalúa aplicando la ecuación de Lambert-Beer ($A = \varepsilon \cdot l \cdot C$, siendo ε el coeficiente de extinción molar, l el espesor de la muestra en cm y C la concentración) utilizando una recta de calibrado, previamente obtenida a partir de la medición de la absorbancia de disoluciones de concentración conocida de alendronato. El ensayo se realiza por triplicado.

Paralelamente, en probetas similares sumergidas en el mismo medio y a 37° C de temperatura se estudia el hinchamiento de los cementos con el tiempo de inmersión, determinándose el grado de hidratación (% H) mediante la siguiente expresión:

$$\% H = 100 \times (W_h - W_o)/W_o$$

Donde W_o es el peso inicial de la muestra, W_h es el peso de la muestra hidratada a tiempo t.

El análisis estadístico de los resultados de las propiedades mecánicas se lleva a cabo por análisis de la varianza (ANOVA) considerando $p < 0,05$ como estadísticamente significativo (95%).

III.3. ENSAYOS DE BIOCMPATIBILIDAD

III.3.1. INTRODUCCIÓN

Aunque los cementos óseos acrílicos fueron regulados inicialmente como un fármaco por la FDA (Food and Drug Administration) dentro de la sección de Cirugía y Odontología, en la actualidad se encuentran catalogados como dispositivos biomédicos y clasificados en la sección 21 del Código de Regulaciones Federales (21 CFR) de los Estados Unidos de América. Dentro de las sugerencias y recomendaciones que la Sección de Dispositivos Ortopédicos de la FDA sugiere para la caracterización y evaluación de los cementos óseos acrílicos relacionados con la necesidad de evaluación clínica, cabe señalar que no todos los cambios aplicados a un cemento óseo aprobado requieren datos clínicos. Por ejemplo, los cambios efectuados en la composición del cemento tales como, el tipo de polímero de la fase sólida, el iniciador, el estabilizador o el activador, pueden garantizar los datos clínicos. Después de analizar los datos preclínicos la FDA determinará si es necesario realizar estudios adicionales o incluso datos clínicos para caracterizar adecuadamente la formulación.¹⁰

Los ensayos de biocompatibilidad de cualquier biomaterial vienen determinados por la Norma Española UNE-EN-ISO 10993-1,¹¹ según la cual los cementos óseos acrílicos se encuentran catalogados según la naturaleza del contacto con el cuerpo, como productos implantables en tejidos / huesos (productos que entran en contacto con los huesos) y según la duración del contacto con el cuerpo como productos de contacto permanente (productos cuya utilización o contacto único, múltiple o a largo plazo es superior a 30 días). La evaluación biológica puede incluir tanto un estudio de la experiencia relevante acumulada como la realización de ensayos propiamente dichos. Tal evaluación puede llevar a la conclusión de que no es preciso efectuar los ensayos si el material posee un historial documentado que demuestre su utilización segura y eficaz en una aplicación específica que sea equivalente a la del producto objeto del diseño.

III.3.2. EVALUACIÓN DE LA BIOCOPATIBILIDAD *IN VITRO*

La evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* de los diferentes cementos experimentales, se lleva a cabo mediante la aplicación de diversos ensayos bioquímicos y análisis microscópicos, que tienen por objetivo caracterizar la interacción biológica entre estos materiales y los cultivos de las estirpes celulares utilizadas en este trabajo. Según viene descrito en la Norma UNE-EN ISO 10993-1 estos ensayos evalúan la lisis celular (muerte de las células), la inhibición del crecimiento celular y otros efectos sobre las células causados por los productos sanitarios, los materiales y/o sus extractos. Los ensayos de citotoxicidad se describen en la Norma UNE-EN ISO 10993-5.¹² Los ensayos realizados en este trabajo se diseñan atendiendo a los criterios que dicta la citada Norma en relación a los siguientes puntos:

- Preparación de la muestra.
- Líneas celulares.
- Medio de cultivo.
- Procedimiento del ensayo.
- Controles positivos y negativos.
- Evaluación de la respuesta celular.

III.3.2.1. Reactivos, cultivos celulares y muestras celulares

Como control negativo (no citotóxico) se utilizan discos Thermanox™ (TMX), suministrados por Labclinics y como control positivo una disolución acuosa de triton x-100 (Aldrich).



Figura III.12. Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 5) transcurridas 24 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X).

El material plástico es suministrado por Sarstedt. Los medios de cultivo, aditivos, la tripsina, el tampón salino fosfato (PBS) y el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) son aportados por Sigma. Las líneas celulares empleadas son células Vero (ATCC CCL-81, *Cercopithecus aetiops*) y osteoblastos humanos (hOB; Pharmakine DPK-BOBC-H) cultivadas ambas a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

El medio de cultivo utilizado para las células Vero es Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) modificado con HEPES (Sigma), con un 10 % SFB (suero fetal bovino), 200 mM de L-Glutamina y un 1% de una disolución de penicilina-estreptomicina (10000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomicina;

Sigma). El medio de cultivo utilizado para los osteoblastos es una mezcla 1:1 de Medio Modificado de Eagle-Dulbecco y solución nutritiva de Ham F-12 (DMEM/F12 HAM) modificada con HEPES (Sigma), suplementado con un 15% de suero fetal bovino (SFB; Gibco) y un 1% de una disolución de penicilina-estreptomicina (10000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomicina; Sigma).

Los osteoblastos empleados en los distintos ensayos se encuentran entre los subcultivos 4 y 9; mientras que los cultivos de células Vero empleados se encuentran entre los subcultivos 10 y 25. Cada pase se realiza antes de alcanzar el 80-90% de la confluencia, transcurrido un periodo de entre 4 y 5 días después de realizar la siembra, utilizando una disolución de tripsina (0,5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0,2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank (Sigma), para liberar las uniones intercelulares y las de las células con la superficie de cultivo.

Las muestras de los cementos correspondientes a los Grupos I a IV son discos de 10mm de diámetro y 1mm de espesor, esterilizadas con óxido de etileno.

III.3.2.2. Ensayos bioquímicos y microscópicos

El análisis de la biocompatibilidad *in vitro* de las distintas formulaciones se realiza a partir de una serie de experimentos, que pueden englobarse en tres bloques. El primer grupo de experimentos tiene por objetivo analizar la citotoxicidad de algunos de los componentes, monómeros o fármacos, empleados en la síntesis del sistema polimérico. El objetivo del segundo grupo es determinar si el material libera o no componentes tóxicos que puedan afectar cuantitativa o cualitativamente al cultivo celular. Mientras que el tercer bloque de ensayos tiene como objetivo principal el estudio del establecimiento del cultivo, la proliferación y la muerte de las células que lo componen, cuando la siembra se realiza directamente sobre la superficie de los materiales estudiados. Estos estudios además de proporcionar información sobre la toxicidad de las formulaciones, aportarán una valiosa información de cómo afecta la superficie de los materiales a la adhesión celular.

Así pues, el análisis de la biocompatibilidad *in vitro* de las distintas formulaciones estudiadas se completa a partir de una serie de experimentos con los siguientes objetivos:

- Cuantificar la citotoxicidad de algunos de los componentes, monómeros o fármacos, empleados en la síntesis de los sistemas poliméricos desarrollados.
- Cuantificar la citotoxicidad de los productos liberados en medio de cultivo por los sistemas estudiados durante un periodo de 7-14 días, mediante la utilización del reactivo MTT.^{13,14}
- Analizar bajo microscopía óptica el efecto que los lixiviados obtenidos a 1 y 2 días provocan sobre la viabilidad, morfología y disposición de las células que componen los cultivos estudiados tras permanecer 24 y 96 h en contacto con estos lixiviados.
- Estudiar la evolución temporal de la proliferación celular, durante un periodo de 21 días, en cultivos establecidos directamente sobre la superficie de los materiales mediante la aplicación del ensayo *Alamar Blue*.^{15,16}
- Analizar la viabilidad celular y la adhesión en cultivos establecidos sobre la superficie de las formulaciones estudiadas mediante su análisis bajo microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Cuantificar la mortalidad celular mediante la detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células lisadas.^{17,18}

III.3.2.2.1. Citotoxicidad de monómeros y del fármaco alendronato

El reactivo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], es una sal de tetrazolio que puede ser absorbida activamente por las células cultivadas y reducida en una reacción dependiente de la actividad mitocondrial, generando formazán y virando su color. Este producto se acumula en el interior de las células, ya que no es capaz de atravesar la membrana celular. Tras la adición de un disolvente, como el dimetilsulfóxido (DMSO), los cristales de formazán formados se disuelven, pudiendo cuantificar colorimétricamente la intensidad del cambio de color mediante técnicas de espectroscopía.

En este trabajo, se estudia la citotoxicidad del metacrilato de vitamina E (MVE), del dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA) y del fármaco alendronato (ALN) mediante el empleo del reactivo MTT.¹⁹ Debido al carácter hidrófobo del metacrilato de vitamina E, y por ser insoluble en el medio, en primer lugar se prepara una disolución de un agente tensioactivo (Tween 80) al 0,66 %-p en medio de cultivo completo libre de suero, que a continuación se utiliza para preparar la disolución madre del MVE al 2 %-p. Para el agente de entrecruzamiento TEGDMA y el fármaco alendronato, debido a su carácter hidrófilo, se prepara la disolución madre por disolución directa del compuesto en medio de cultivo completo libre de suero fetal bovino. Una vez preparadas estas disoluciones de partida, se diluyen sucesivamente con medio libre de suero.

Paralelamente se realiza la siembra de células (n=8), a una concentración de 11×10^4 células/ml, utilizando medio de cultivo completo fresco sobre placas de 96 pocillos. Tras 24 h de incubación a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂, se extrae el medio, añadiendo en su lugar 100 µl de la disolución del producto correspondiente (dilución del monómero o fármaco previamente preparadas), incubando a continuación las muestras a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante otras 24 h. Transcurrido ese tiempo, se retira el contenido de los pocillos, añadiendo en su lugar la disolución de trabajo en medio de cultivo libre de suero del reactivo MTT, a una concentración de 0,5 mg/ml, obtenida tras diluir al 10% la disolución madre de MTT en tampón fosfato (PBS) y filtrarla. El reactivo MTT se mantiene en contacto con los cultivos, de nuevo a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂, durante 4 h, tras las que se extrae el contenido de los pocillos, para añadir en cada uno de ellos 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), con el fin de disolver los cristales de formazán que se pudieran haber formado.

El procedimiento es igual para los osteoblastos, solamente difiere la concentración celular, que en este caso es de 10^5 células/ml y el medio de cultivo utilizado que, como se describe anteriormente, es una mezcla 1:1 de Medio Modificado de Eagle-Dulbecco y solución nutritiva de Ham F-12 (DMEM/F12 HAM) modificada con HEPES (Sigma), suplementado con un 15%

de suero fetal bovino (SFB; Gibco) y un 1% de una disolución de penicilina-estreptomicina (10000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomicina; Sigma).

Después de mezclar el contenido de los pocillos mediante agitación, se mide la densidad óptica (DO) utilizando un detector Biotek ELX808IU, a una longitud de onda de 570 nm, que, como se puede ver en la Figura III. 13, es donde el MTT alcanza el máximo de absorbancia, con una longitud de onda de referencia de 630 nm.

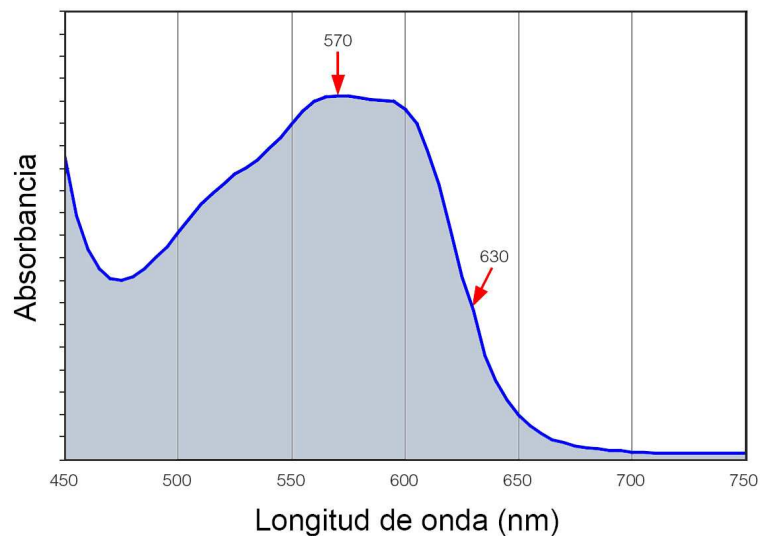


Figura III.13. Espectro de absorción del reactivo MTT.

La viabilidad celular relativa (%VR) se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\%VR = \frac{DO_S - DO_B}{DO_C} \times 100$$

Donde, DO_S , DO_B y DO_C son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio introducido en pocillos sin células) y el control, respectivamente. A continuación, se construye una curva dosis-respuesta para la viabilidad celular relativa, con el fin de calcular la concentración inhibitoria media, IC_{50} , a la que se produce la muerte del 50 % de las células presentes en el control

negativo. La concentración IC_{50} es el parámetro habitualmente utilizado para cuantificar la toxicidad de un fármaco u otro tipo de aditivo.

III.3.2.2.2. Citotoxicidad de los lixiviados

El ensayo MTT se utiliza también para cuantificar la citotoxicidad de los productos liberados por los cementos estudiados. Para ello se sumergen discos del control negativo (TMX) y de los cementos estudiados en 5 ml de medio fresco y estéril. Estas muestras se mantienen a 37° C en agitación durante un periodo de tiempo determinado. A determinados intervalos de tiempo, se retira el medio en contacto con los discos, que denominamos “lixiviado”, reemplazándolo con otros 5 ml de medio fresco, trabajando en todo momento bajo condiciones estériles.

Una vez recogidos los lixiviados, se procede a realizar la siembra de células en una microplaca de 96 pocillos a una densidad adecuada (11×10^4 células/ml para las células Vero y 5×10^4 células/ml para los osteoblastos) en el medio específico de cultivo completo. Posteriormente estas placas se incuban durante 24 h a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO_2 . Transcurrido este período, el medio de cultivo se reemplaza por los extractos de los materiales que permanecieron en contacto con los cultivos, durante otras 24 h a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO_2 (Figura III. 14).

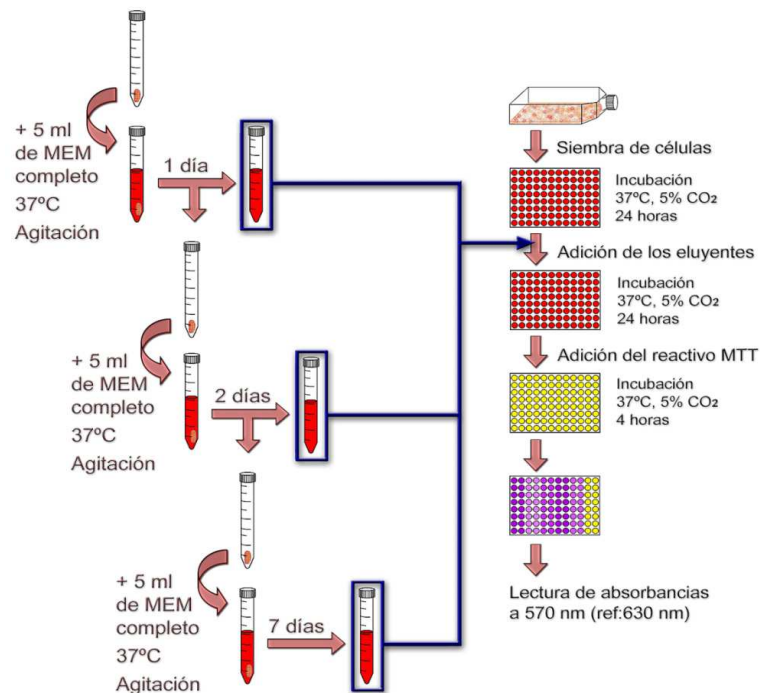


Figura III.14. Desarrollo de un experimento tipo para evaluar la liberación de componentes citotóxicos empleando el reactivo MTT. Los lixiviados recogidos a 1, 2 y 7 días se van a emplear para cultivar células, evaluando espectroscópicamente su efecto sobre los cultivos.

A continuación, se añaden 100 µl de la disolución de MTT en todos los pocillos, incubando las placas durante 4 h a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂, transcurridas las cuales se añaden 100 µl de DMSO a cada pocillo para disolver el MTT reducido por las células. Después de mezclar el contenido de los pocillos mediante agitación, se realiza la lectura de la densidad óptica (DO) utilizando un detector Biotek ELX808IU, a una longitud de onda de 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm.

Una vez realizada la lectura, la viabilidad celular relativa (%VR) se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\%VR = \frac{DO_S - DO_E}{DO_C} \times 100$$

Donde, DO_S , DO_B y DO_C son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio introducido en pocillos sin células) y el control, respectivamente.

A partir de los valores de viabilidad celular relativa se realizan una serie de análisis de la varianza (ANOVA), con el objetivo de detectar la existencia de diferencias significativas entre la distribución de los valores medidos para el control negativo y los obtenidos para los grupos experimentales estudiados.

III.3.2.2.3. Morfología y proliferación celular bajo microscopía óptica

Los lixiviados obtenidos a 1 y 2 días se emplean así mismo, para analizar bajo microscopía óptica la posible aparición de alteraciones demográficas, morfológicas y funcionales en los cultivos de osteoblastos mantenidos durante 24 y 96 h en contacto con estos lixiviados.

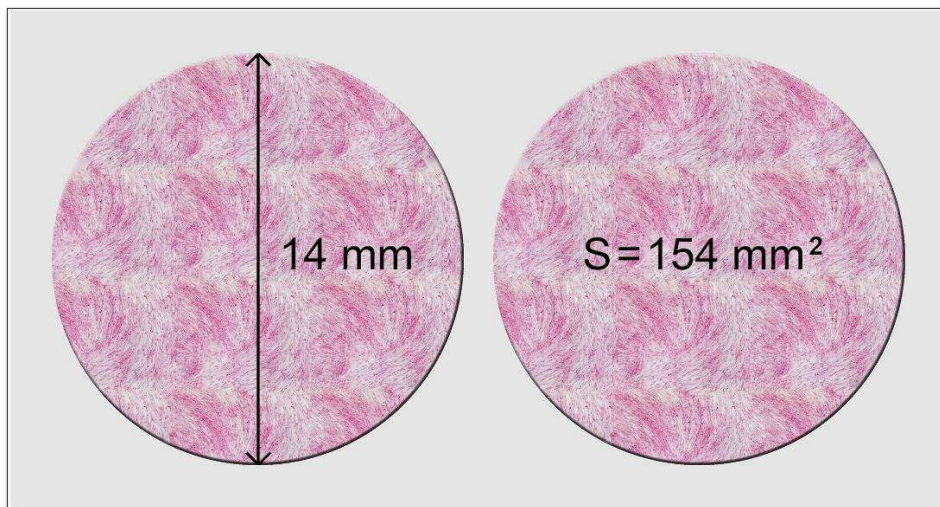


Figura III.15. Cultivos sobre cubreobjetos de vidrio empleados en el análisis microscópico de las muestras cultivadas con los lixiviados de los materiales estudiados.

Para completar este análisis se aplica el siguiente protocolo:

- Siembra de osteoblastos a una concentración de 10^5 células/ml en medio de cultivo completo fresco ($n=2$), sobre cubreobjetos de vidrio de 14

mm de diámetro y 154 mm² de superficie (Figura III.15) introducidos en placas de 24 pocillos.

- Incubación de 24 h a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂.
- Extracción del medio de cultivo, añadiendo en su lugar los lixiviados obtenidos a 1 y 2 días.
- Incubación de 24 y 96 h a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂.
- Fijación de las muestras con líquido de Bouin - 10% formaldehído (Panreac), 5% ácido acético glacial (Probus) y ácido pícrico (Panreac) saturado en agua, tinción hematoxilina de Carazzi (Panreac)-eosina alcohólica al 1% (Panreac) y montaje (Eukitt®) sobre portaobjetos de vidrio.
- Observación de las muestras, análisis y captura de fotografías bajo microscopio óptico (Nikon Eclipse E600 con cámara digital Nikon DXM1200 acoplada al sistema óptico; Nikon ACT-1).

III.3.2.2.4. Proliferación celular

Se aplica un método espectrofotométrico para cuantificar la proliferación celular directamente sobre la superficie de las formulaciones estudiadas, en el que se utiliza el reactivo *Alamar Blue*TM (AB; Serotec). Este método valora la reducción química del ambiente celular.

El reactivo AB en su estado oxidado (resazurin), presenta un color azul índigo no fluorescente y al reducirse (resofurin) vira su color a rosa fluorescente (Figura III.16).²⁰

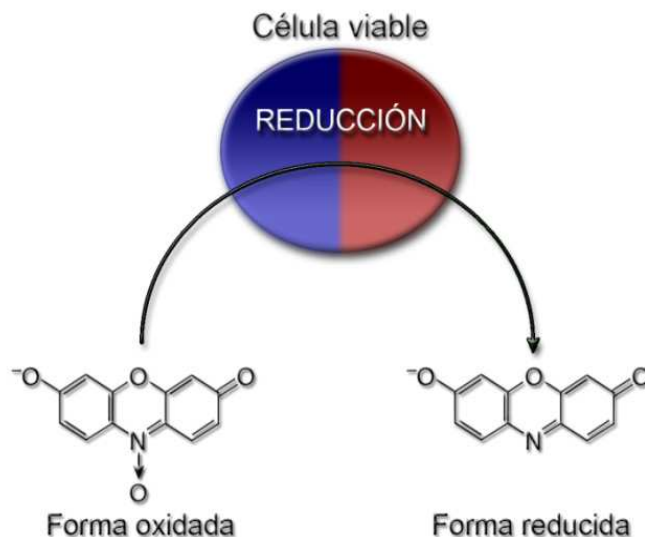


Figura III.16. La reducción del reactivo *Alamar Blue*, desde su estado oxidado (resazurin) a su estado reducido (resofurin) conlleva un cambio en su color.

Mediante este ensayo se cuantifica la actividad celular y se analiza la proliferación en cultivos de células Vero sembradas sobre la superficie del control negativo TMX y los cementos de los Grupos I a IV, durante un período de 14 días; y en cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre la superficie del control negativo TMX y los cementos de los Grupos III y IV durante un periodo de 21 días.

Para completar estos ensayos, en primer lugar se realiza la siembra de células, a una concentración adecuada (14×10^5 células/ml para las células Vero y 5×10^4 células/ml para los osteoblastos) en medio de cultivo completo fresco, sobre placas de 24 pocillos (1 ml de concentrado de células/pocillo) (Figura III.17). Tras incubar estas placas durante 24 h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 , se retira el medio de cultivo, añadiendo en su lugar una disolución al 10% del reactivo AB en medio completo libre de rojo fenol (1 ml/pocillo), que se mantiene en contacto con los cultivos durante 4 h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 . Transcurrido este tiempo, se trasvasa el contenido de los pocillos a placas de 96 pocillos (100 μl /pocillo; $n=16$), reponiendo medio completo fresco en las placas inicialmente sembradas (1 ml/pocillo).

Por último, se realiza una lectura de densidad óptica por cada tiempo al que se realiza el ensayo, en un espectrofotómetro Biotek ELX808IU a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm, de las muestras, restando los valores de absorbancia medidos para el blanco a los valores obtenidos para las distintas muestras.

El protocolo anteriormente descrito se realiza a 1, 3, 7, 14 y 21 días (hasta 14 días en el ensayo realizado con células Vero), lo que permite obtener el patrón que modeliza la proliferación celular sobre la superficie del control TMX y sobre la superficie de los correspondientes cementos experimentales.

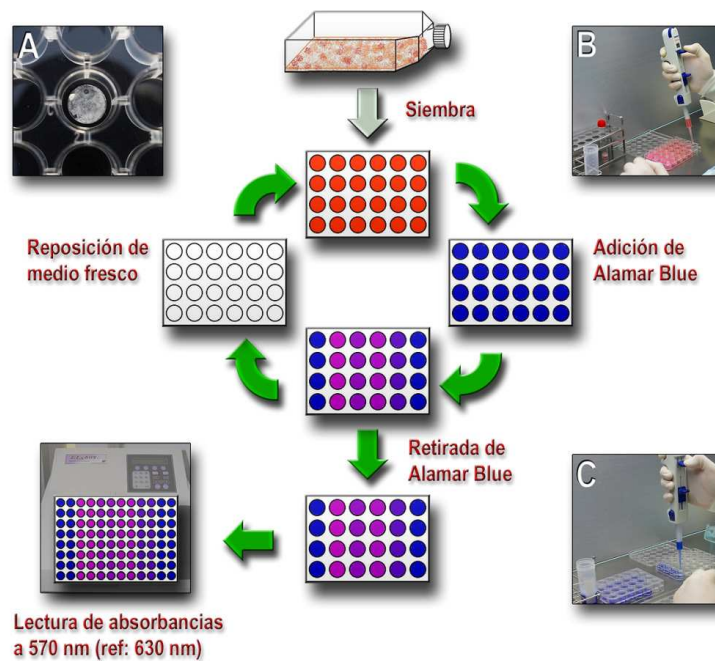


Figura III.17. Desarrollo de un experimento tipo empleando el reactivo *Alamar Blue*. Tras introducir las muestras de los materiales en los pocillos (A) y realizar la siembra (B), es posible establecer un ciclo de lecturas de absorbancia a diferentes periodos de tiempo, mediante la adición (C) y retirada del reactivo.

Transcurrido este tiempo se realiza el análisis de datos, que tiene por objetivo detectar diferencias en este patrón entre los distintos grupos experimentales, mediante la aplicación de análisis de la varianza (ANOVA).

III.3.2.2.5. Morfología celular, proliferación y adhesión mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se lleva a cabo el estudio microscópico de los cultivos de células Vero y osteoblastos humanos sembrados y mantenidos, durante 24 y 48 h, sobre la superficie del control TMX y los cementos experimentales bajo microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para completar este estudio se aplica el siguiente protocolo:

- Siembra de células (n=2), utilizando medio de cultivo completo fresco, a una concentración adecuada (10^5 células/ml), sobre las muestras de las formulaciones estudiadas introducidas en placas de 24 pocillos (1 ml de concentrado de células/pocillo).
- Incubación 24 y 48 h a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂.
- Extracción del medio de cultivo contenido en los pocillos, adicionando en su lugar 1 ml por pocillo de una disolución al 2,5% de glutaraldehído (Fluka) en tampón sodio cacodilato 0,1 M (Sigma).
- 4 h a temperatura ambiente en oscuridad (posteriormente las muestras se conservan en oscuridad a 4° C).
- 2 lavados con agua destilada estéril.
- Secado de las muestras a 37° C.
- Metalizado de las muestras y observación bajo microscopio electrónico de barrido (Philips XL30) a una aceleración de voltaje de entre 15 y 20 KeV.

III.3.2.2.6. Muerte celular

Se realiza un ensayo colorimétrico, para cuantificar la muerte celular que sufren los cultivos de osteoblastos sembrados sobre la superficie del control TMX y las formulaciones de los Grupos III y IV, mantenidos en incubación durante 1, 2 y 7 días, mediante la detección de la lactato deshidrogenasa (LDH), enzima citosólica que se libera al medio de cultivo cuando se produce la

rotura de la membrana plasmática. Por tanto, un incremento en la muerte celular en un cultivo, conlleva un aumento en los niveles de enzima LDH liberada por las células lisadas en el medio de cultivo.

Este ensayo comienza introduciendo, en condiciones de esterilidad, las muestras de los cementos experimentales y el control negativo (TMX) en placas de 24 pocillos. En cada uno de los pocillos se realiza la siembra en medio de cultivo completo fresco (1 ml de concentrado de células/pocillo) a una concentración de 5×10^4 células/ml. En este caso además se siembran células sobre otras muestras que actúan como control positivo merced a la adición de 10 μ l de triton X100, 2 h antes de la extracción de los medios. Las muestras se mantienen durante 1, 2 y 7 días en incubación (Figura III.18), a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂, se extraen los medios de cultivo que las bañaban, y se conservan a -20° C hasta su uso posterior.

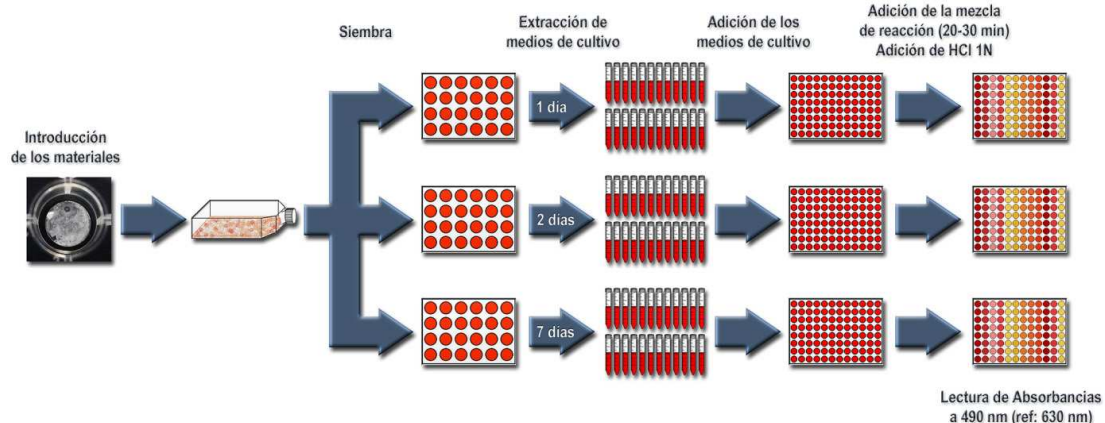


Figura III.18. Desarrollo de un experimento tipo para cuantificar la mortalidad celular mediante el registro de la actividad LDHasa.

Una vez recogidos los medios en la totalidad de los tiempos estudiados se realiza el ensayo colorimétrico, mediante la adición de éstos a placas de 96 pocillos (25 μ l/pocillo; n=8). Sobre cada una de estas muestras se añade a continuación el reactivo colorimétrico (Sigma TOX-7; 50 μ l/pocillo), tras mezclar a partes iguales cofactor, sustrato y solución de tinción. Posteriormente, las muestras se mantienen 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, transcurridas las cuales se detiene la reacción mediante la adición de 10

μ l/pocillo de ácido clorhídrico 1N (Panreac), para realizar a continuación la lectura de densidad óptica a 490 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm, en un lector de placas Biotek ELX808IU.

Los valores de absorbancia obtenidos se emplean, tras restar los valores medidos para el blanco, para contrastar mediante análisis de la varianza (ANOVA), la posible existencia de diferencias significativas en el número de células lisadas, entre los cultivos establecidos sobre las distintas formulaciones estudiadas y los sembrados sobre el control no citotóxico a 1, 2 y 7 días.

III.3.3. EVALUACIÓN DE LA BIOCOPATIBILIDAD *IN VIVO*

Para evaluar la biocompatibilidad *in vivo* del cemento óseo se llevan a cabo ensayos de implantación. Según la definición dada en la Norma UNE-EN ISO 10993-1 estos ensayos evalúan los efectos patológicos locales sobre los tejidos vivos, tanto a nivel macroscópico como microscópico de una muestra de material o producto final que se implanta quirúrgicamente o se coloca dentro de una zona o tejido de implantación apropiado para la aplicación prevista.

La parte 6 de esta Norma (ISO 10993-6),²¹ especifica los métodos de los ensayos que se deben realizar para la evaluación de los efectos locales de un material implantado en un tejido vivo tanto a nivel macroscópico como microscópico. El material a ensayar se implanta en el tejido apropiado para la evaluación biológica del mismo y no debe ser sometido a carga mecánica o funcional. Los efectos locales deben ser evaluados por comparación de la respuesta del tejido al implante en cuestión, con la respuesta producida por un material usado clínicamente y cuya aceptabilidad ha sido ya establecida.

Los ensayos para evaluar efectos locales después de la implantación se utilizan para evaluar bien efectos subcrónicos (a corto plazo, hasta las 12 semanas) o bien efectos crónicos (a largo plazo, períodos mayores de 12 semanas).

En este trabajo se realizan los ensayos descritos en la Norma ISO 10993-6 que corresponden a la implantación en la zona subcutánea de la rata a corto plazo (2 semanas) y en tejido óseo de conejo a corto plazo (2 semanas, 4 semanas y 8 semanas) y a largo plazo (24 semanas). Los ensayos se diseñan siguiendo las recomendaciones de esta norma concernientes a los siguientes puntos:

- Preparación de especímenes.
- Selección y cuidado de los animales.
- Procedimiento quirúrgico.
- Evaluación macroscópica.
- Preparación de muestras para el estudio histológico.
- Evaluación histológica.

Para estudiar la respuesta *in vivo* del tejido conectivo y del tejido óseo, se procede a la implantación del cemento en su estado pastoso bien en la zona subcutánea dorsal de la rata o bien en la cavidad medular de la zona metafiso-epifisaria distal del fémur del conejo.

Los ensayos de experimentación *in vivo* se realizan en el Animalario del Área de Investigación del Hospital de FREMAP en Majadahonda (Madrid). Durante el tiempo que dura el estudio, los animales permanecen estabulados en dicho animalario en condiciones de aislamiento, en jaulas individuales y bajo control de las variables ambientales (temperatura, ventilación, humedad y luz), cumpliendo los requerimientos de la normativa española vigente, RD 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

El experimentador se encuentra en posesión de la acreditación de la categoría necesaria para la utilización de animales para experimentación y otros fines científicos, según Anexo I del RD 1201/2005, otorgada por la Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural de la Comunidad de Madrid.

III.3.3.1. Selección del animal

Para este estudio se selecciona en primer lugar la rata de laboratorio, *Rattus norvegicus* (variedad albina) cepa Wistar, como animal experimental, ya que es un animal dócil, de fácil manipulación, de coste asequible y con una excelente adaptación a las condiciones de laboratorio.

Se utilizan un total de 9 ratas adultas hembras con un peso medio de 300 gr \pm 10 gr. Esto se corresponde con una edad de aproximadamente de 12 semanas. Los animales permanecen alojados en jaulas (Tecniplast®) compuestas por una cubeta de policarbonato tipo III H cuyas medidas de largo, ancho y altura son 425 x 266 x 185 mm y el área del suelo es de 800 cm², y una rejilla de acero inoxidable. Las cubetas se colocan en una estantería de acero inoxidable (Tecniplast®) dentro de una habitación climatizada con una temperatura entre 20° C y 24° C, humedad relativa del aire del 55% \pm 10% e iluminación con fotoperíodo de 12h/12h de luz/oscuridad. Se les alimenta con una dieta completa de mantenimiento para rata/ratón (Panlab®) y durante el período de adaptación y postoperatorio, los animales pueden comer y beber *ad libitum*.

En segundo lugar se selecciona el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y de entre las 77 variedades incluidas en la American Rabbit Breeders Association (ARBA), la variedad New Zealand white. Los criterios establecidos para su selección son entre otros, su bajo coste y fácil provisión, su alto nivel inmunitario, su elevado metabolismo óseo, su docilidad y su estructura esquelética adecuada. Este animal se encuentra entre los recomendados por la Norma ISO 10993-6 para el ensayo de implantación en tejido óseo.

Se utilizan un total de 48 conejos adultos de peso medio 3,820 Kg (3,450-4,260 Kg) y una edad de tres meses al comienzo del estudio. Los animales permanecen alojados en unas jaulas (Tecniplast®), fabricadas en Noryl EN130S, que se colocan en un rack (Tecniplast®) de acero inoxidable (con capacidad para 3 jaulas). La superficie útil de la jaula es de 3.844 cm² e incluye un estante a una altura de 25 cm, que permite al animal subirse o

escondarse, lo cual permite un enriquecimiento ambiental que incrementa el bienestar animal. Además esta superficie y altura (50 cm) permiten el ejercicio físico adecuado a los requerimientos legales.

Los animales son alojados individualmente después de la cirugía, pero los Racks pueden interconectarse para contacto social entre los animales, además lateralmente tienen un separador de un material plástico transparente, que permite que los animales se vean entre sí. Los animales se mantienen en la sala a una temperatura comprendida entre 15° C y 21° C, una humedad relativa de aire del 55% ± 10 % e iluminación con fotoperíodo también de 12h/12h de luz/oscuridad, y se les alimenta con una dieta completa de mantenimiento para conejo (Panlab®) y durante el período de adaptación y postoperatorio, los animales pueden comer y beber *ad libitum*.

III.3.3.2. Diseño experimental en rata

III.3.3.2.1. Modelo experimental

Se trata de la administración subcutánea de cemento sin fraguar en la zona dorsal de la rata Wistar, hasta un total de 9 animales, variando la composición de tres en tres.

III.3.3.2.2. Formulaciones

- Grupo I: Cemento óseo control de PMMA.
- Grupo II: Formulación experimental con MVE (20 %-p) en la fase líquida.
- Grupo III: Formulación experimental con MVE (20 %-p) y TEGDMA (10 %-p) en la fase líquida.

III.3.3.2.3. Diagrama de tiempos

El período de sacrificio establecido es de dos semanas (tiempos cortos) para cada uno de los tres grupos.

Tabla III.3. Diseño experimental. Número de ratas por tiempo de supervivencia.

Cemento	Nº de ratas
Grupo I	3
Grupo II	3
Grupo III	3

III.3.3.2.4. Procedimiento quirúrgico

Es el mismo para cada uno de los 9 animales. Se selecciona como área idónea para la implantación del cemento, la parte central de la zona dorsal de la espalda. Tras pesar al animal se procede a anestesiarse con el siguiente protocolo:

- ✓ Ketamina 100 mg/Kg + Diacepam 5 mg/Kg, intraperitoneal (IP). Se prepara 2 veces la dosis, en la misma jeringa, para poder redosificar (25-30% adicional).

Tras un período de aproximadamente 5 min, en que el animal está ya anestesiado, se coloca el animal en la mesa de operaciones sobre un paño en decúbito esternal y se prepara la piel de la espalda desinfectando con abundante pincelado de povidona iodada (Betadine®) y se cubre con un paño estéril fenestrado, dejando expuesta la zona quirúrgica. A continuación, se procede a la preparación del correspondiente cemento mediante la mezcla de sus dos componentes, sólido y líquido, previamente esterilizados. Cuando la mezcla adquiere una consistencia pastosa se introduce en una jeringa de 10 ml previa extracción de su émbolo. Posteriormente, con guantes estériles, se toma un pellizco de piel de la zona dorsal, y en el hueco que deja el pellizco se

introduce la mezcla ayudándonos por un catéter intravenoso estéril de 14G, en una cantidad de 1 ml aproximadamente. Después se retira el catéter, se desinfecta el punto de inyección y se mete al animal en una jaula individual y se lleva al postoperatorio con comida y agua *ad libitum* controlando su evolución.

En el postoperatorio se administra como terapia analgésica y antiinflamatoria un AINEs, el Meloxicam a una dosis de 2 mg/kg por vía subcutánea (SC) cada 24 h durante dos días.

III.3.3.2.5. Eutanasia

Una vez cumplido el período del ensayo, se procede al sacrificio de los animales mediante inyección de pentobarbital sódico (Eutalender[®]) diluido, por vía intraperitoneal, a una dosis triple a la anestésica (40 mg/kg).

III.3.3.2.6. Obtención y procesamiento de las muestras

Tras comprobar el fallecimiento del animal, se procede a colocarlo en el quirófano experimental y a cubrirlo con un paño quirúrgico estéril, dejando visible la zona de implantación del cemento. Tras la desinfección de la misma con povidona iodada (Betadine[®]), se realiza una incisión cutánea, tras palpación de la masa, para localizar y extraer el material ensayado y el tejido que rodea al mismo. La pieza obtenida se coloca inmediatamente en un recipiente estéril que contiene formol tamponado al 10% para su fijación.

Posteriormente, se procede a la inclusión de las muestras del tejido que rodea el material en parafina durante 24 h, según técnica habitual, al punto de fusión de 53° C. Las muestras incluidas en parafina se tiñen con Hematoxilina-Eosina (H/E), según técnicas convencionales, mediante sucesivos pases en xilol y alcohol de distinta graduación, para su desparafinación y deshidratación:

- Desparafinar en estufa durante 24h.
- Xilol puro, 3 pases de 10 min.

- Deshidratación (etanol): 100°, 1 pase de 10 min.
 - 96°, 1 pase de 5 min.
 - 80°, 1 pase de 5 min.
- Lavado con agua bidestilada, 1 pase de 5 min.
- Hematoxilina, 5 min.
- Lavado con agua bidestilada, durante 15 min.
- Eosina, 4 min.
- Deshidratación (etanol): 80°, 1 pase de 15 min.
 - 96°, 1 pase de 15 min.
 - 100°, 2 pases de 10 min.
- Carboxilol-creosota, 1 pase de 10 min.
- Xilol puro, 3 pases de 10 min.

Una vez realizada la tinción, se colocan los cubreobjetos, empleando bálsamo de Canadá como medio de montaje.

III.3.3.3. Diseño experimental en conejo

III.3.3.3.1. Modelo experimental

Consiste en la creación de un defecto óseo en ambos cóndilos externos del fémur, con una perforación que alcanza el tejido esponjoso de dicho fémur. El tamaño aproximado del defecto es de 6 mm de diámetro y 8-10 mm de profundidad.

III.3.3.3.2. Formulaciones

- Grupo I: Cemento óseo control de PMMA.
- Grupo II: Formulación experimental con MVE (20 %-p) en la fase líquida.
- Grupo III: Formulación experimental con MVE (20 %-p) y TEGDMA (10 %-p) en la fase líquida.

- Grupo IV: Formulación experimental con MVE (20 %-p) y TEGDMA (10 %-p) en la fase líquida y el fármaco alendronato (1,5 %-p) en la fase sólida.

III.3.3.3.3. Diagrama de tiempos

Los períodos de sacrificio se establecen con el fin de estudiar la respuesta del tejido al material gradualmente con el tiempo, tanto a corto, como a largo plazo teniendo en cuenta que según establece la Norma ISO-10993-6, el estado estacionario en tejido óseo se alcanza en un período de tiempo cercano a las 24 semanas.

Tabla III.4. Diseño experimental. Número de conejos y tiempos de supervivencia.

Cemento	2 Semanas	4 Semanas	8 Semanas	24 Semanas
Grupo I	3	3	3	3
Grupo II	3	3	3	3
Grupo III	3	3	3	3
Grupo IV	3	3	3	3

III.3.3.3.4. Procedimiento quirúrgico

Se selecciona como área idónea para la implantación del cemento el nivel metafiso-epifisario distal del fémur del conejo, para conseguir que toda la superficie del implante quede rodeada de tejido óseo.

Se utiliza el mismo método anestésico, cuidado antiséptico y técnica quirúrgica en todas las intervenciones. Tras pesar el animal se procede a anestesiario, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- ✓ Ketamina 35 mg/kg IM + Xilacina 5 mg/kg IM. Se prepara 2 veces la dosis, en la misma jeringa, para poder

redosificar (25-30% adicional). También se administra como profilaxis intraoperatoria un antibiótico, la Cefazolina, a dosis de 20 mg/kg IM.

Para acceder al área seleccionada, el nivel metafiso-epifisario distal del fémur, se busca la vía de abordaje de la zona lo menos traumática y sangrante posible, como es la lateral externa, para evitar pérdidas sanguíneas y la formación de grandes hematomas con la posibilidad de infección local o en el peor de los casos la muerte del animal.

Tras un período de aproximadamente 10 min, en que el animal está ya anestesiado, se procede al rasurado del muslo desde la articulación femoro-tibial hasta el tercio proximal del mismo. Se coloca el animal en la mesa de operaciones y se prepara la piel del muslo con abundante pincelado de povidona iodada (Betadine®). Se dispone en decúbito supino y se cubre con paños estériles, dejando expuesta la zona quirúrgica con un paño fenestrado.

Se practica una incisión cutánea en la cara lateral externa, desde el borde lateral de la rótula en sentido oblicuo y ascendente, de unos 20-25 mm. Separado el plano cutáneo, se incide el tabique intermuscular que separa los músculos Tensor Fasciae Latae por arriba, y Gluteus Superficialis y Bíceps Femoris por debajo, encontrando inmediatamente bajo este plano muscular el epicóndilo femoral externo. Se desperiostiza de forma discreta el área seleccionada para la colocación del implante, desde el epicóndilo lateral hasta el tercio medio-distal de la diáfisis.

Para crear el defecto óseo a nivel metafiso-epifisario distal del fémur en todo su espesor se hace manualmente utilizando la aguja o fiador metálico de un catéter intravenoso grueso (14G) estéril. Tras clavar la punta de la aguja en el periostio, se hacen movimientos circulares ejerciendo presión en la zona, hasta que se llega a la zona medular del hueso. Se procede de igual forma en la cara externa del tercio distal de la diáfisis femoral. Una vez conseguido el lecho apropiado, se lava de forma exhaustiva con suero fisiológico salino,

procurando arrastrar todas las partículas producidas durante la perforación del hueso.

A continuación, se procede a la preparación del correspondiente cemento mediante la mezcla de sus dos componentes, sólido y líquido, que hasta ese momento se encontraban en envases separados, y que fueron previamente esterilizados.

La mezcla se efectúa tras el vertido del componente líquido en el recipiente que contiene el polvo a temperatura ambiente y en condiciones de máxima esterilidad. Se remueve a una frecuencia de unas 30 batidas por minuto con el fiador metálico de un catéter intravenoso (14G) hasta conseguir una mezcla completa.

Cuando la mezcla adquiere una consistencia pastosa, es decir, no se adhiere al guante quirúrgico, se introduce en una jeringa de 10 ml previa extracción de su émbolo. Posteriormente, ayudado por el catéter intravenoso recortado, se introduce la mezcla en los defectos óseos creados en el fémur del conejo.

Dada la presión intraósea ejercida por el paso del cemento, se taponan el defecto distal al introducir la masa de cemento por el agujero proximal, y viceversa, cuando la pasta se introduce por el agujero distal. El defecto óseo así creado, se rellena completamente con el implante correspondiente. Taponados los dos orificios, se espera aproximadamente unos 10 min para permitir el fraguado completo del cemento.

A continuación, tras un nuevo lavado exhaustivo, se procede al cierre por planos de la herida, comenzando por el plano muscular profundo con puntos sueltos reabsorbibles (vicryl 3/0), pues éste, va a contribuir a la estabilidad del implante y se cierra la piel con puntos sueltos de seda de 3/0. Finalmente se aplica un apósito plástico, aerosol del tipo Novecutan®. Antes de que los animales despierten de la anestesia, se introducen de forma individual

en sus jaulas, permitiéndoles una actividad libre dentro de la misma. Podemos observar en la Figura III.15, detalles de la técnica quirúrgica empleada.

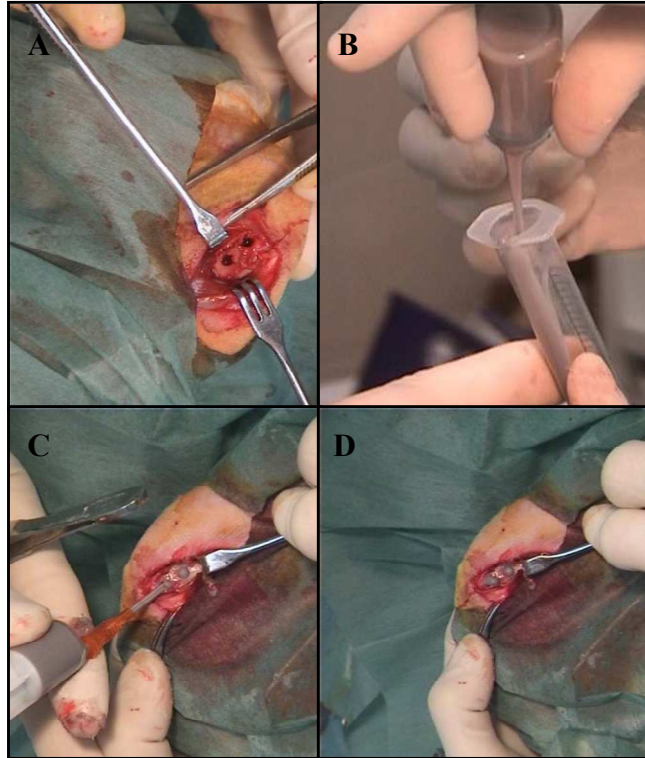


Figura III.15. Técnica quirúrgica. **A:** Imagen quirúrgica de los orificios creados a nivel metafiso-epifisario distal y tercio distal de la diáfisis femoral del animal. **B:** Imagen del cemento en estado pastoso preparado para su inoculación posterior en el animal de experimentación. **C:** Imagen quirúrgica que muestra la introducción del cemento en los dos orificios creados. **D:** Imagen quirúrgica de los orificios epifisario distal y diafisario distal perfectamente rellenos con el cemento.

En el postoperatorio se administra como terapia profiláctica, el mismo antibiótico utilizado en la fase intraoperatoria, la Cefazolina 20 mg/kg IM cada 24 horas durante 5 días y para la analgesia e inflamación se administra un AINEs, el Meloxicam a dosis de 0,2 mg/kg IM cada 24 horas durante 7 días. Esta pauta anestésica resulta cómoda de aplicar, ya que consigue un tiempo anestésico suficiente, buena relajación muscular y analgesia, carece

prácticamente de complicaciones, es de efecto tóxico mínimo y produce en el animal un despertar suave y progresivo.

III.3.3.3.5. Eutanasia

Una vez cumplidos los períodos de ensayo, se procede al sacrificio de los animales mediante sobredosis de tiopental sódico (Pentothal[®]) por venopunción en la vena marginal de la oreja.

III.3.3.3.6. Obtención y procesamiento de las muestras

Tras comprobar el fallecimiento del animal, se procede a la desinfección de la cicatriz quirúrgica con Betadine[®], se realiza una incisión cutánea siguiendo la misma de la cirugía primaria, llegando hasta hueso femoral y se desarticula el hueso a nivel de cadera y rodilla. Una vez aislado el fémur se realiza la limpieza de partes blandas y se introduce rápidamente en un recipiente estéril con formol tamponado al 10% para su fijación.

A continuación se procede a la inclusión en metacrilato. Previamente deben tenerse preparados tubos de vidrio con una base de metil-metacrilato polimerizado. Para ello, deben llenarse los tubos de vidrio con la mezcla de metil-metacrilato hasta una altura de 2,5 cm, se cierran herméticamente con papel de parafilm[®] y se dejan en la estufa a 32° C hasta que el metil-metacrilato endurezca. Se sacan de la estufa y se tienen en reserva para la inclusión.

Componentes del metil-metacrilato

- 100 ml de metacrilato de metilo monómero estabilizado con hidroquinona.
- 20 ml de nonifenol poliglicol-éter acetato (Plastoid N).
- 2 ml de dibutil-ftalato.
- 5 g de peróxido de benzoilo.

Inclusión en plástico

El catalizador (peróxido de benzoilo) se adiciona de inmediato. Una vez preparada la mezcla, se guarda en un frasco cerrado, en nevera a 4° C. Antes de abrir la botella se espera a que esté a temperatura ambiente.

La pieza idealmente debe fijarse en alcohol de 70°, aunque si se ha fijado en formol se puede lavar durante uno o dos días y posteriormente fijarse en alcohol de 70° de 3 a 5 días, agitando a temperatura ambiente.

El protocolo de inclusión se realiza de la siguiente manera:

Día 1	Alcohol de 96° 24 h.
Día 2	Alcohol de 96° 24 h.
Día 3	Alcohol absoluto 24 h.
Día 4	Alcohol absoluto 24 h (sólo hasta las 12 del mediodía).

Una vez finalizado este primer proceso de inclusión, se incluye en un recipiente con metacrilato guardado en la nevera, y se añaden el resto de componentes que forman el metil-metacrilato. Se deja 2 días para piezas normales, y en este caso 7 o más días con piezas de conejo. Este alargamiento del tiempo favorece una mejor inclusión y posteriormente mejor corte y tinción.

A continuación en un tubo con la base de metacrilato se introduce la pieza y la etiqueta con el número de la pieza, se recubre de metacrilato y se mete en la estufa para la polimerización. Una vez polimerizado, se parte el tubo y queda el bloque hecho, que se procede a cortar con una sierra antes del corte definitivo.

Serrado el bloque, se lija y se coloca en el microtomo *Microm* HM 350 S. Se moja el bloque y la cuchilla con alcohol de 70° constantemente. Los primeros cortes a 30 µm hasta llegar a la pieza vigilando y mojando con alcohol. La orientación del bloque para la realización de cortes transversales,

tiene que ser con las corticales perpendiculares a la cuchilla. Se llega hasta la mitad del cilindro.

Se empieza a cortar a 5 μm rehusando los primeros que salen. Se pone el corte de 5 μm sobre un porta gelatinado con gelatina de Haupt. Se echa encima unas gotas de alcohol de 95°. Se mantienen varios cortes con alcohol de 95° durante 5 ó 6 min. Se coloca encima el film de polietileno y se aplanan bien con el dedo o un rodillo de goma. El plástico no envuelve al corte sino que se deja colgando. Se van apilando los cortes uno encima de otro y cuando se tienen unos 30 se colocan en la prensa con unos soportes de madera o metacrilato de 5 u 8 mm de grosor. Se aprieta la prensa hasta encontrar resistencia. Se dejan en la estufa toda la noche a 60° C.

Gelatinado de los portas

Composición de la gelatina de Haupt:

- 1 g gelatina.
- 100 ml agua destilada.
- 15 ml glicerina.
- 2 g fenol.

Pasos a seguir:

1. Calentar el agua a 55° C y añadir la gelatina.
2. Cuando se enfríe añadir la glicerina y el fenol.
3. Para gelatinizar el porta poner una gota sobre él y extenderlo frotando ligeramente con otro porta.

Las tinciones utilizadas en el estudio histológico del hueso sin descalcificar son las de Tricrómico de Goldner y Von Kossa.

Tinción Tricrómico de Goldner

Procedimiento:

1. Desplastificar hasta agua destilada. Primero sacar el film del polietileno, colocar los portas en metil-acetato durante unos 20 ó 30 min. Lavar en alcoholes decrecientes hasta agua destilada.
2. Hematoxilina férrica 15 min.
3. Agua corriente 10 min.
4. Ponceau de xilidina 45 min.
5. Lavado rápido en ácido acético al 1%.
6. Lavado rápido en agua destilada.
7. Diferenciar en ácido fosfotúngstico- orange G 7 min.
8. Lavado rápido en acético al 1%.
9. Lavado rápido en agua.
10. Verde luz 15 min.
11. Lavado rápido en acético al 1%.
12. Lavado rápido en agua destilada.
13. Deshidratar y montar.

Ponceau de xilidina

- 2 g de ponceau de xilidina.
- 1 g de fucsina ácida.
- 200 ml de agua destilada.
- 0,4 ml de ácido acético glacial.

Ácido fosfotúngstico orange g

- 2 g de ácido fosfotungstico.
- 1 g de orange G.
- 200 ml de agua destilada.

Verde luz

- 0,4 g de verde luz.
- 200 ml de agua destilada.
- 0,4 ml de ácido acético glacial.

Tinción Von Kossa

Procedimiento:

1. Nitrato de plata al 3%, 5 min.
2. Agua destilada, 5 min, dos veces.
3. Formol-carbonato de sodio, 5 min.
4. Agua corriente, 10 min.
5. Sulfato de sodio al 5%, 5 min.
6. Agua corriente, 10 min.
7. Ponceau de xilidina, 45 min.
8. Lavado rápido en ácido acético al 1%.
9. Lavado rápido en agua destilada.
10. Diferenciar en ácido fosfotungstico- orange G, 7 min.
11. Lavado rápido en acético al 1%.
12. Lavado rápido en agua destilada.
13. Deshidratar y montar.

Formol- Carbonato de sodio

- 10 mg de carbonato de sodio.
- 150 ml de agua destilada.
- 50 ml de formaldehído al 37%.

III.3.3.4. Material iconográfico

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas de tejido conectivo se obtienen utilizando una cámara digital Nikon COOLPIX 995 acoplada a un microscopio Nikon. Microphot - FXA 5511557.

Para la observación de las muestras de tejido óseo, análisis y captura de fotografías se utiliza un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600 con cámara digital Nikon DXM1200 acoplada al sistema óptico; software Nikon ACT-1).

III.4. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Taningher M, Pasquini R, Bonatti S. Genotoxicity analysis of N,N-dimethylaniline and N,N-dimethyl-p-toluidine. *Environ Mol Mutagen* 1993;21:349-356.
- ² Stea S, Granchi D, Zolezzi C, Ciapetti G, Visentin M, Cavedagna D, Pizzoferrato A. High-performance liquid chromatography assay of N,N-dimethyl-p-toluidine released from bone cements: evidence for toxicity. *Biomaterials* 1997;18:243-246.
- ³ Bosch P, Harms H, Lintner F. Toxicity of bone cement component. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 1987;31:87-89.
- ⁴ Haddad FS, Levell NJ, Dowd PM, Cobb AG, Bentley G. Cement hypersensitivity: a cause of aseptic loosening? *J Bone Joint Surg* 1995;77(B):329-330.
- ⁵ De la Torre B, Fernández M, Vázquez B, Collía F, De Pedro JA, López Bravo A, San Román J. Biocompatibility and other properties of acrylic bone cements prepared with antiseptic activators. *J Biomed Mater Res, Part B: Appl Biomater* 2003;66B:502-513.
- ⁶ Morejón L, Davidenko N, Sastre R. Aspectos básicos sobre la toxicología de los cementos óseos acrílicos. *Rev Plast Mod* 1999;511:90-98.
- ⁷ International Organisation for standardisation (ISO). ISO 5833:2002(E): Implants for surgery – Acrylic resin cements. Switzerland.
- ⁸ Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 1990;6:282-287.
- ⁹ Ebisawa Y, Kokubo T, Ohura K, Yamamuro T. Bioactivity of Ca.SiO₂-based glasses: in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med* 1999;1:239-244.
- ¹⁰ Demian HW, McDermott K. Regulatory perspective on characterization and testing of orthopaedic bone cements. *Biomaterials* 1999;19:1607-1608.
- ¹¹ ISO. Versión Oficial en Español de la Norma Internacional, ISO-10993/1:1997. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 1: Evaluación y ensayos. Norma Española 1998.
- ¹² ISO. Versión Oficial en Español de la Norma Internacional, ISO-10993/5:1997. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. Norma Española 1998.
- ¹³ Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988 Feb;48(3):589-601.

¹⁴ Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF. A study of the reproducibility of the MTT test. *J Mater Sci: Mater Med* 1994;5(3):154-159.

¹⁵ Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *J Immunol Methods* 2001;252:131-138.

¹⁶ Springer JE, Azbill RD, Carlson SL. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. *Brain Res Brain Res Protocols* 1998;2(4):259-263.

¹⁷ Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988;15:61-69.

¹⁸ Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D, Hache J. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *J Biotechnol* 1992;25:231-243.

¹⁹ Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationship of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997;37:517-524.

²⁰ Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 1997;204:205-208.

²¹ ISO Specification 10993-6:1994. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation. 1994.

IV. RESULTADOS

IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

IV.1.1. PARÁMETROS DE CURADO

La reacción de curado de los cementos óseos acrílicos se sigue a través de la variación de la temperatura de la masa reaccionante con el tiempo. Las exotermas de polimerización registradas a 25° C se muestran en la Figura IV.1. Como puede apreciarse la introducción del monómero portador de la vitamina E produce un drástico descenso de la velocidad de polimerización con relación al Grupo I, lo que da lugar a un aumento del tiempo de fraguado acompañado de un descenso de la temperatura pico o máxima. Por su parte, la incorporación del agente de entrecruzamiento TEGDMA y del alendronato en las formulaciones de los Grupos III y IV respectivamente, acelera la polimerización con relación al Grupo II, acortando los tiempos de fraguado y aumentando ligeramente la temperatura pico.

Los parámetros de curado extraídos de las exotermas de polimerización se muestran en la Tabla IV.1, junto con los valores del tiempo del estado pastoso y del tiempo de trabajo. Se puede observar que la incorporación del monómero MVE apenas modifica el tiempo del estado pastoso con relación al Grupo I, pero sin embargo, la presencia del monómero tetrafuncional TEGDMA aumenta ligeramente este parámetro, así como la presencia del fármaco alendronato. Por otra parte, la adición del monómero metacrílico derivado de la vitamina E en cualquiera de los tres grupos provoca el aumento del tiempo de trabajo con relación al control de poli(metacrilato de metilo), lo que resulta interesante desde el punto de vista de la aplicación por inyección de estos sistemas. Además, cuanto mayor sea el tiempo de manipulación menor será el efecto tóxico durante la implantación del cemento, ya que hay trabajos¹ que han mostrado que cuanto más tiempo tarda el cemento en endurecer, más cantidad de monómero puede evaporarse.

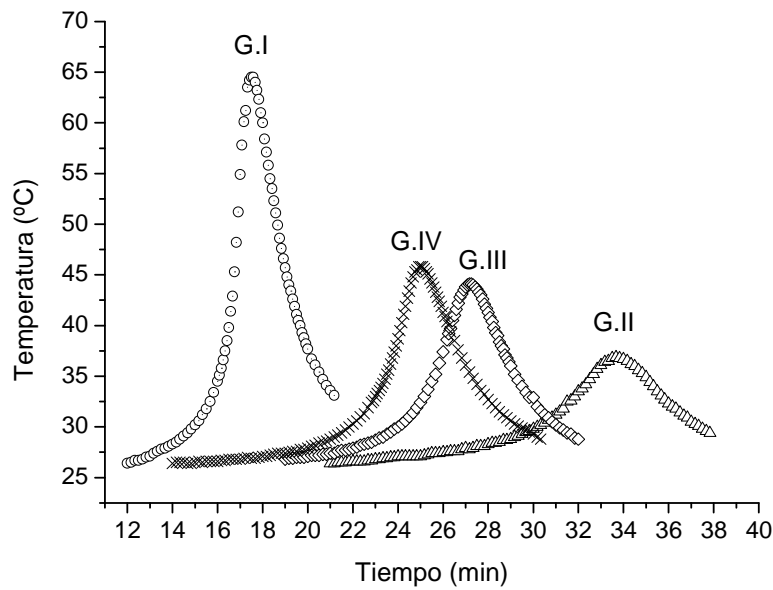


Figura IV.1. Exotermas de polimerización de las formulaciones correspondientes a los Grupos I a IV.

Tabla IV.1. Valores del tiempo de estado pastoso, tiempo de fraguado, tiempo de trabajo y temperatura máxima de las formulaciones control y las modificadas con MVE.

Formulación	t_{pastoso} (min) [d.s.]	t_{fraguado} (min) [d.s.]	t_{trabajo} (min) [d.s.]	$T^a_{\text{máxima}}$ [d.s.]
Grupo I	6,5 [0,2]	16,6 [0,8]	10,1 [0,5]	64,5 [0,7]
Grupo II	6,7 [0,1]	30,8 [1,6]	24,1 [1,3]	37,6 [1,1]
Grupo III	9,7 [0,3]	26,0 [1,1]	16,3 [1,1]	44,0 [0,1]
Grupo IV	8,0 [0,1]	24,1 [1,1]	16,1 [0,9]	44,8 [1,5]

IV.1.2. MONÓMERO RESIDUAL

La cantidad de monómero residual se determina por gravimetría a partir de los valores de pérdida de peso del material debido a la liberación de compuestos de bajo peso molecular. Los resultados se exponen en la Tabla IV.2. Los valores de monómero residual de los grupos que contienen

metacrilato de vitamina E son comparables al valor obtenido por el control y en todos los casos se encuentran por debajo del 3%-p.

Tabla IV.2. Valores de monómero residual liberado de los cementos acrílicos ensayados en este trabajo.

Formulación	Mon. Res. (%-p) [d.s.]
Grupo I	2,8 [1,2]
Grupo II	2,6 [0,1]
Grupo III	2,3 [0,1]
Grupo IV	2,0 [0,2]

La composición del monómero residual se analiza por Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{H-RMN}$). En los cementos de los Grupos I y II el monómero residual es MMA mientras que en los cementos de los Grupos III y IV el monómero residual es una mezcla de MMA, MVE y TEGDMA, en una relación molar MVE/TEGDMA/MMA de 1:0,27:0,06.

IV.1.3. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los cementos óseos se evalúan mediante ensayos de compresión tal como indica la norma internacional ISO 5833.² En este ensayo se obtienen los valores de resistencia a compresión (σ_c) y de módulo elástico (E_c) que se recogen en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3. Valores de propiedades mecánicas en compresión de los cementos acrílicos ensayados tras 1 mes de inmersión en suero fisiológico simulado.

Formulación	σ_c (MPa) [d.s.]	E_c (GPa) [d.s.]
Grupo I	104 [3]	1,4 [0,1]
Grupo II	100 [9]	1,4 [0,2]
Grupo III	99 [6]	1,3 [0,1]
Grupo IV	99 [10]	1,2 [0,2]*

*Diferencias significativas con respecto al Grupo I ($p < 0,05$).

Los valores de la resistencia a compresión son muy superiores a 70 MPa en todos los grupos y no se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se comparan cada grupo con el control de PMMA, Grupo I. El módulo elástico oscila entre 1,3 y 1,4 GPa, en los cementos de los Grupos I a III, sin observarse diferencias significativas cuando se comparan los valores de los Grupos II y III con el control respectivamente. Sin embargo, el módulo del cemento del Grupo IV disminuye significativamente con respecto al control, dando un valor de 1,2 GPa.

IV.1.4. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE ALENDRONATO *IN VITRO*

La liberación del alendronato del cemento correspondiente al Grupo IV en un medio tamponado a $\text{pH}=7,4$ y a 37°C se muestra en la Figura IV.2 junto con la liberación a partir de un cemento control de poli(metacrilato de metilo). Se puede observar que en ambos casos, en los primeros estadios de la cesión, durante las primeras 8 h, la liberación sigue una cinética de orden cero, ajustándose el porcentaje de alendronato liberado a una ecuación del tipo:

$$\% \text{ Lib} = a + b t$$

Donde a se refiere a la cantidad inicial liberada, que normalmente tiene lugar con la salida del medicamento que se encuentra en la superficie del cemento, y la constante b indica la velocidad de liberación en este tiempo. Los resultados para cada cemento son:

Control	$a=15,7 \pm 0,35$	$b=1,25 \pm 0,08$	$R=0,992$
Grupo IV	$a=10,5 \pm 0,43$	$b=2,46 \pm 0,09$	$R=0,997$

Paralelamente se estudia el comportamiento de hinchamiento de estas formulaciones con el tiempo y los resultados se muestran en la Figura IV.3.

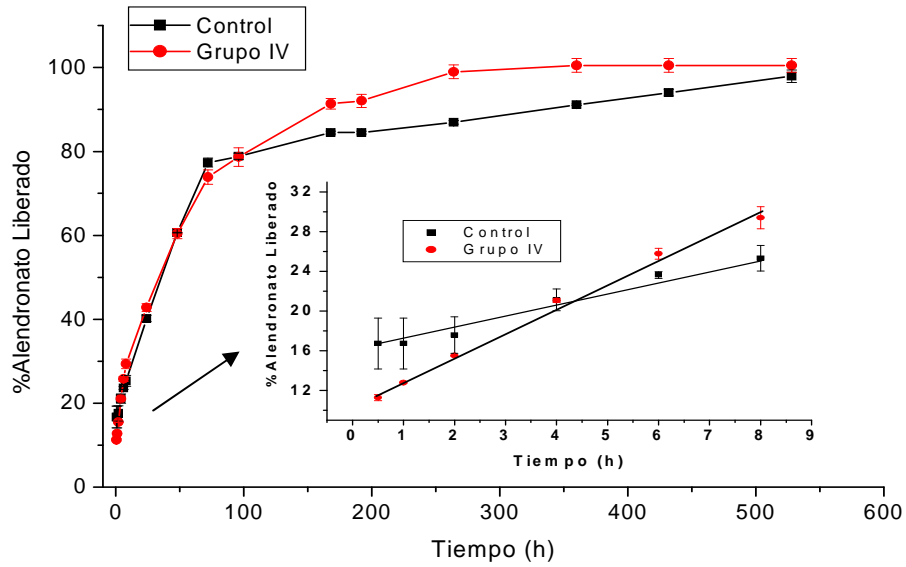


Figura IV.2. Liberación de alendronato del cemento correspondiente al Grupo IV y de un cemento control de PMMA en tampón fosfato (pH=7,4) y a 37° C de temperatura.

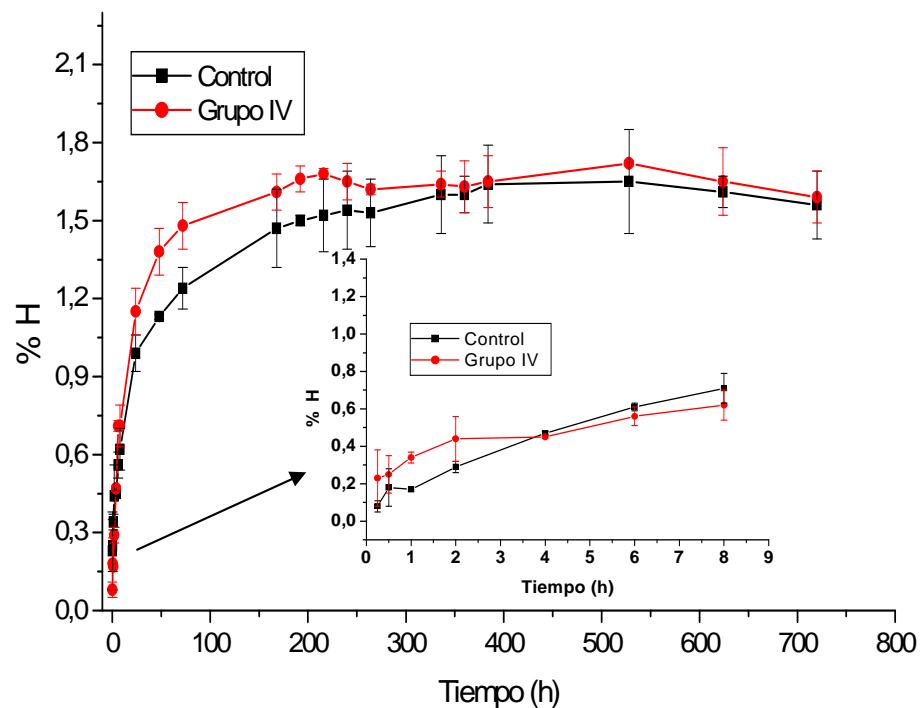


Figura IV.3. Variación del grado de hidratación con el tiempo de inmersión del cemento experimental cargado con alendronato (Grupo IV) y de su correspondiente control, en tampón a pH = 7,4 y 37 ° C de temperatura.

IV.2. EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO*

Los resultados de los ensayos de la citotoxicidad *in vitro* se determinan tal como indica la Norma UNE-EN ISO 10993-5³

IV.2.1. CULTIVOS DE CÉLULAS VERO

IV.2.1.1. Morfología celular, proliferación y adhesión mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las Figuras IV.4 a IV.7 muestran las microfotografías (SEM) de la colonización de células Vero sobre el cemento control (Grupo I) y sobre los tres tipos de cementos portadores de metacrilato de vitamina E (Grupos II a IV).

De forma general se puede decir que las células son capaces de adherirse y proliferar formando una monocapa en las superficies de los Grupos I a III, indicando que no hay efectos tóxicos y que el metabolismo celular es normal.

Por el contrario el comportamiento celular frente al cemento del Grupo IV muestra diferencias considerables. Según se observa en la Figura IV.7, apenas se produce adhesión celular. Este cemento presenta la misma composición de la fase líquida que la del cemento del Grupo III pero en la fase sólida lleva incorporado un 1,5 % de alendronato.

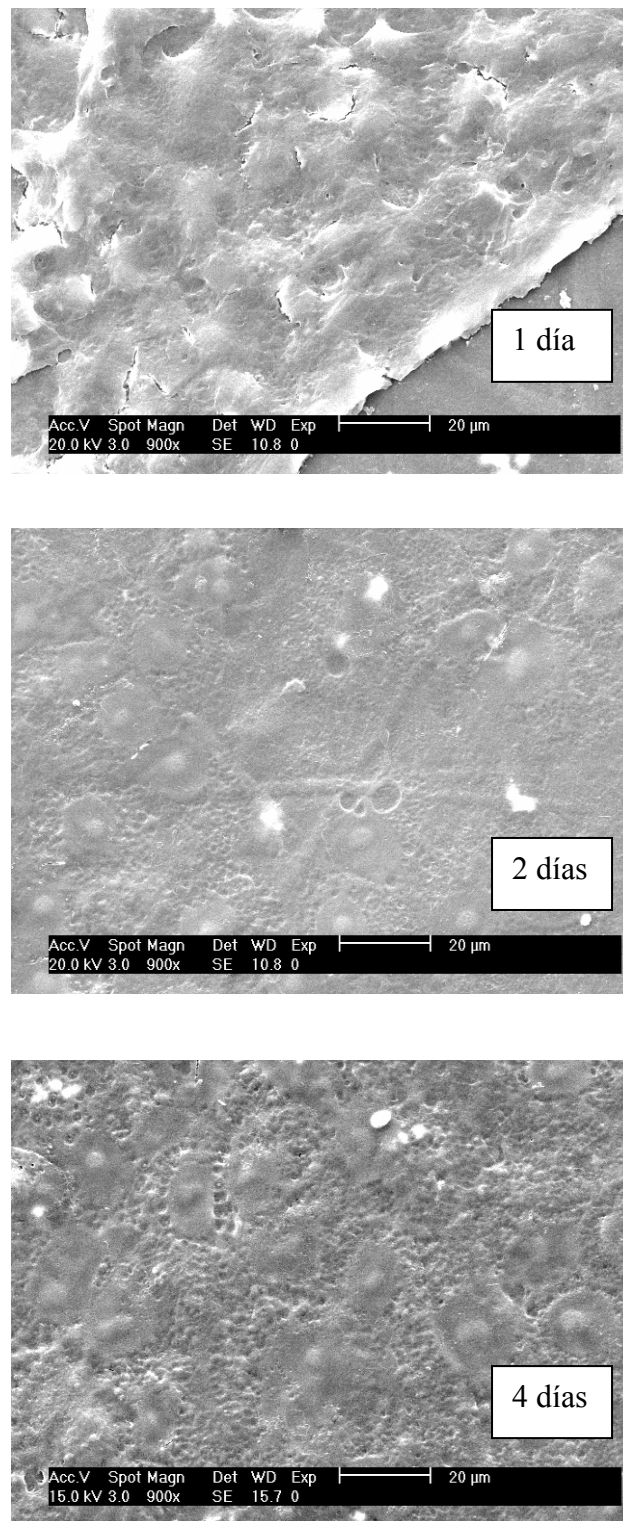


Figura IV.4. Imágenes SEM de la colonización de células Vero sobre el cemento del Grupo I a diferentes tiempos.

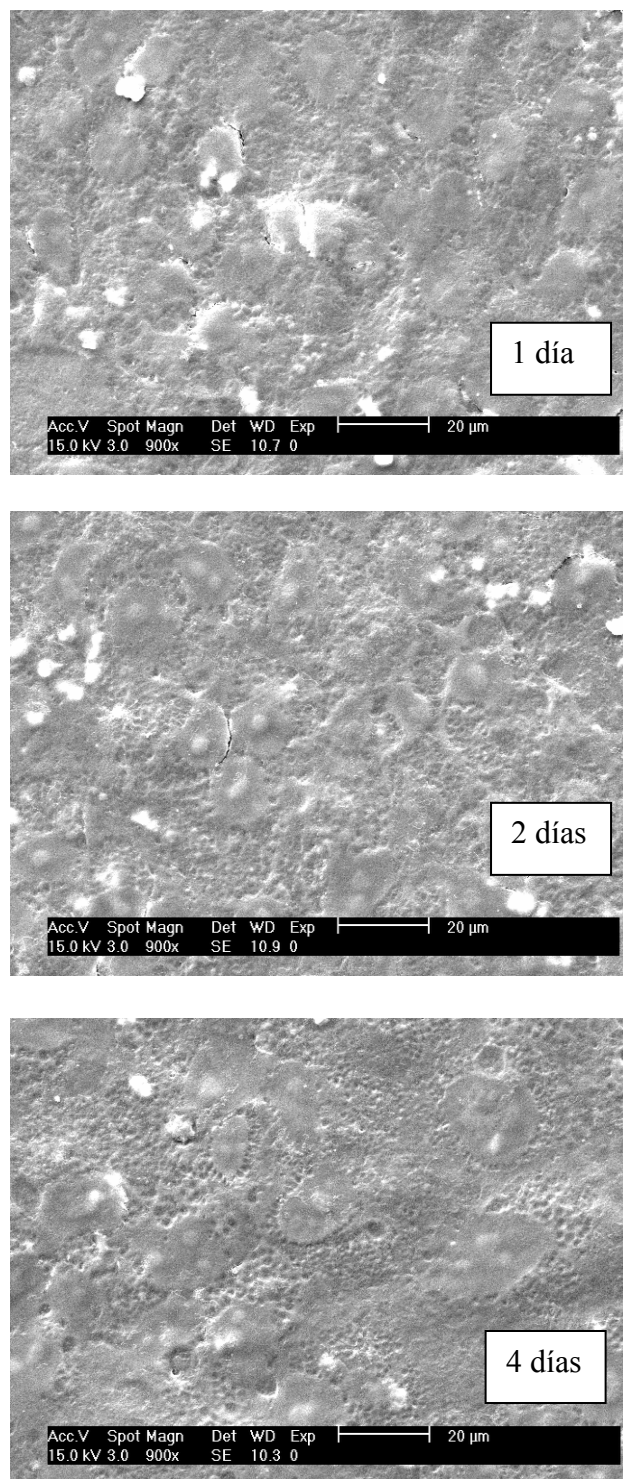


Figura IV.5. Imágenes SEM de la colonización de células Vero sobre el cemento del Grupo II a diferentes tiempos.

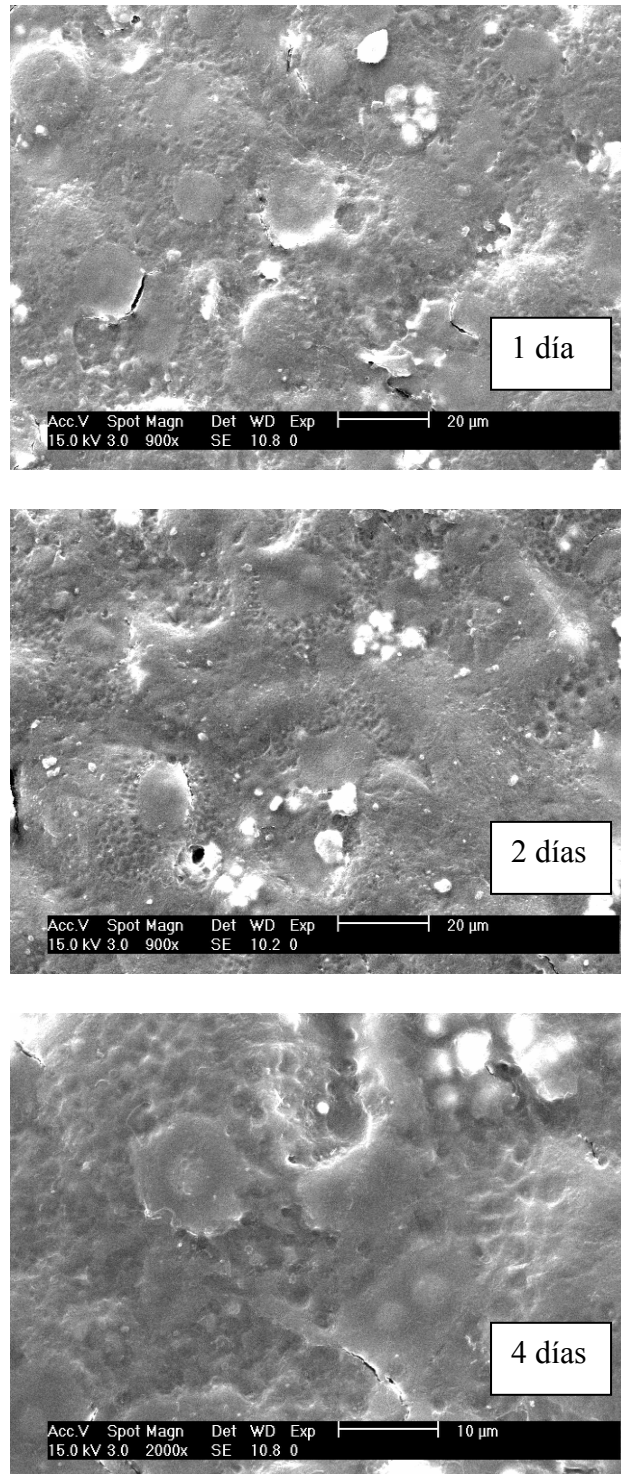


Figura IV.6. Imágenes SEM de la colonización de células Vero sobre el cemento del Grupo III a diferentes tiempos.

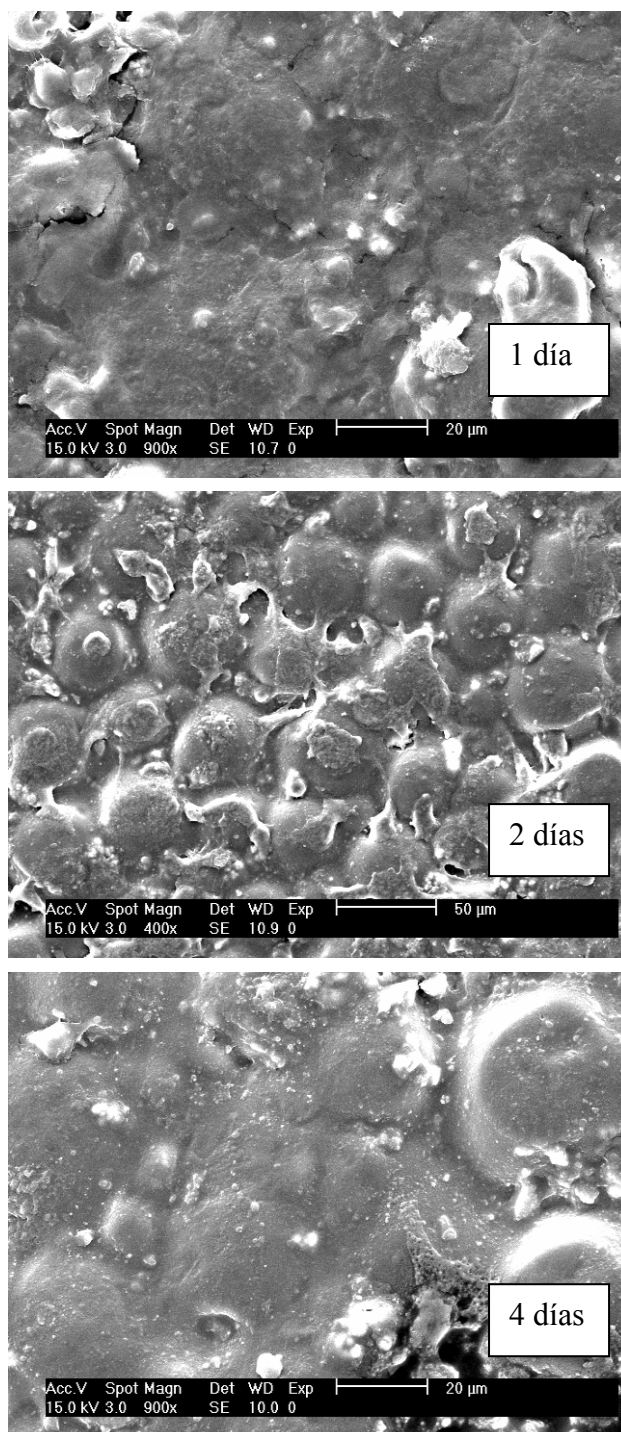


Figura IV.7. Imágenes SEM de la colonización de células Vero sobre el cemento del Grupo IV a diferentes tiempos.

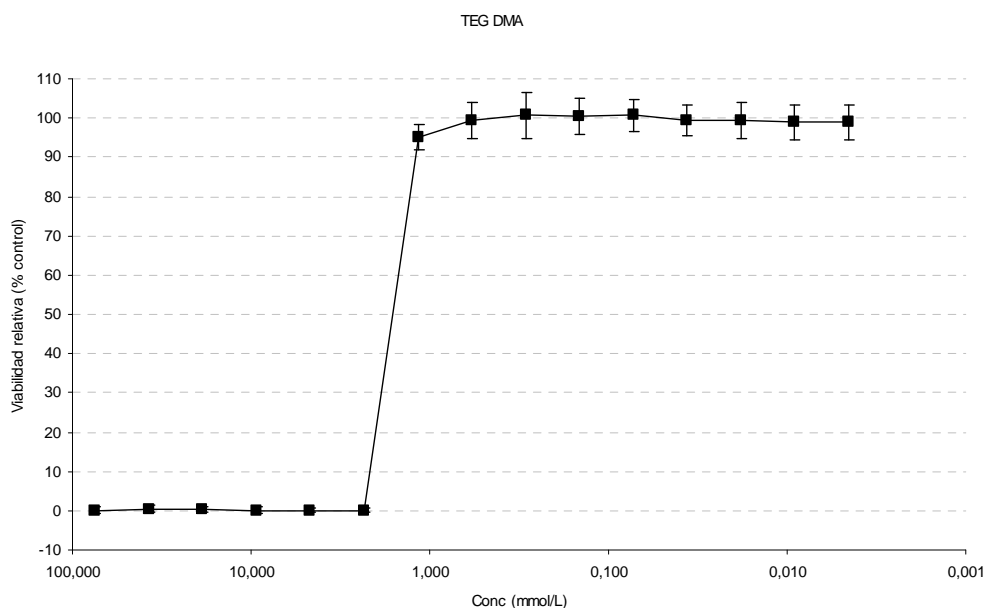


Figura IV.9. Evolución de la citotoxicidad del TEGDMA con la concentración.

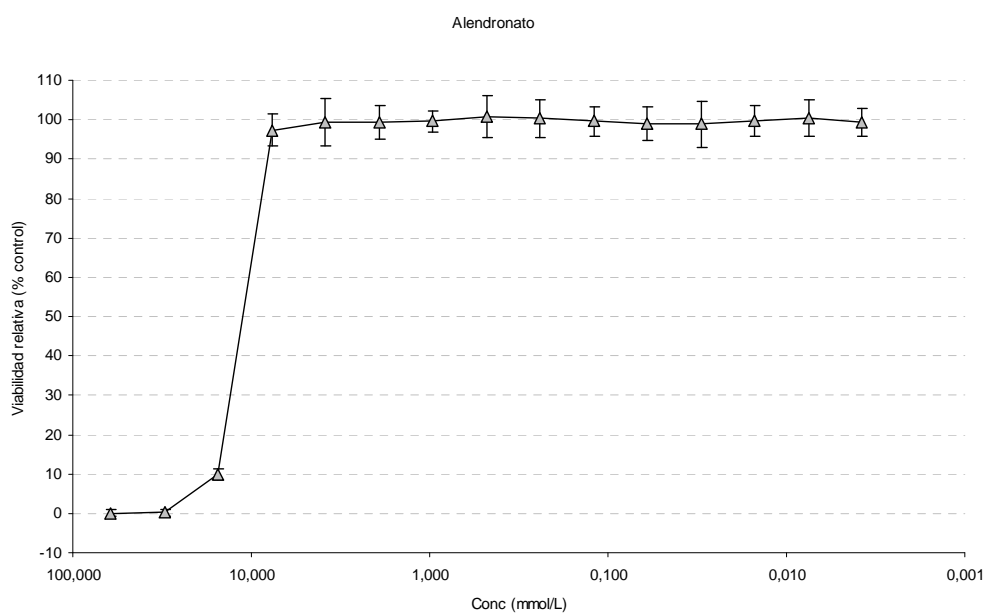


Figura IV.10. Evolución de la citotoxicidad del alendronato con la concentración.

A partir de las gráficas de las Figuras IV.8 a IV.10, se determinan los valores IC_{50} que corresponden a la concentración del compuesto ensayado que proporciona un descenso del 50% de la viabilidad celular. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla IV.4. Como puede observarse, la

citotoxicidad del TEGDMA es muy elevada comparada con la del MVE, y con la del alendronato.

Tabla IV.4. Valores de índice de citotoxicidad 50 (IC_{50}) \pm intervalo de confianza al 95% para el metacrilato de vitamina E, dimetacrilato de trietilenglicol y alendronato.

Compuesto	IC_{50} (mM)
MVE	14,026 \pm 0,396
TEGDMA	1,7168 \pm 0,0173
ALEN	11,842 \pm 0,160

IV.2.1.2.2. Citotoxicidad de los lixiviados

Los resultados de este ensayo para los cementos de los cuatro grupos se exponen en la Figura IV.11. Se observa un descenso significativo en la viabilidad celular en presencia de los extractos de cualquiera de los grupos ensayados con relación al control negativo TMX, más marcado en los días 1 y 2, pero posteriormente la viabilidad de estas muestras se recupera en las siguientes extracciones, como se refleja en los resultados obtenidos a 7 y 14 días, indicando la ausencia de daño mitocondrial.

Los cementos de los Grupos III y IV presentan valores de viabilidad celular significativamente inferiores al del control TMX en todo el intervalo de tiempos, aunque la viabilidad celular no llega a suprimirse sino que alcanza niveles comprendidos entre el 80 y 90 % con relación al TMX.

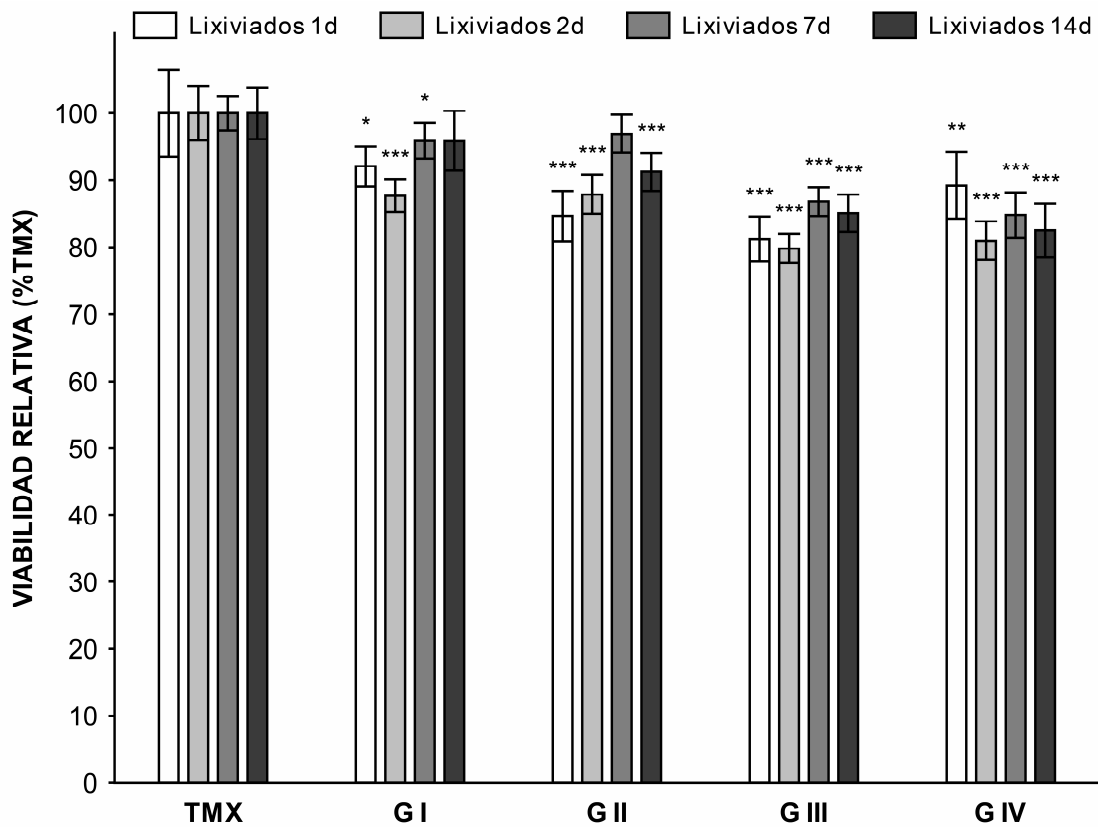


Figura IV.11. Resultados del ensayo MTT para los cuatro grupos de cementos. Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95 % (n= 16) y las diferencias significativas obtenidas con respecto al TMX: *:p<0,05; **:p<0,01; ***p<0,001)

IV.2.1.3. Proliferación celular.

Los resultados del ensayo *Alamar Blue* referentes a la proliferación celular para los cuatro grupos de cementos preparados en este trabajo se representan en la Figura IV.12.

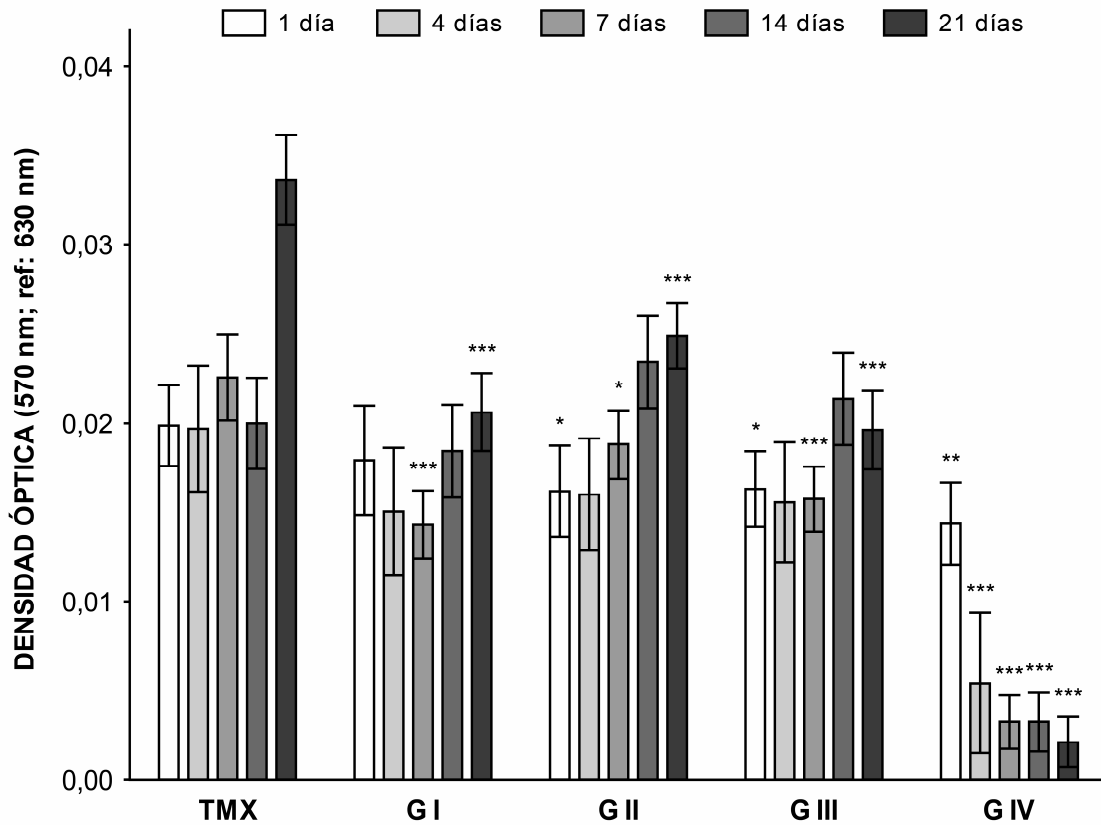


Figura IV.12. Resultados del ensayo *Alamar Blue* para los cuatro grupos de cementos. Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95 % (n= 8) y las diferencias significativas obtenidas con respecto al TMX: *:p<0,05; **:p<0,01; ***p<0,001)

Se puede observar que en los cementos de los Grupos I a III las células Vero proliferan entre 1 y 7 días principalmente y para el Grupo II, que contiene un 20% de MVE, se observó un aumento significativo de la proliferación celular a los 14 y 21 días, con respecto al Grupo I.

Sobre el cemento del Grupo III la proliferación celular fue ligeramente inferior a la observada sobre el Grupo II. Más diferente fue el comportamiento obtenido para el cemento del Grupo IV portador del medicamento alendronato. En este caso la proliferación celular mostró una caída considerable especialmente a partir del día 4. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos previamente sobre la adhesión y crecimiento directo de células Vero sobre la superficie del cemento. Como se comentó anteriormente, este

cemento mostró una escasa adhesión celular y consecuentemente al no haber una buena adhesión celular la proliferación se ve impedida.

IV.2.2. CULTIVOS DE OSTEBLASTOS HUMANOS

IV.2.2.1. Citotoxicidad de los cementos

IV.2.2.1.1. Citotoxicidad de monómeros y del fármaco alendronato

La evolución de la citotoxicidad del metacrilato de vitamina E, dimetacrilato de trietilenglicol y del fármaco alendronato, con la concentración se muestra en las Figuras IV.13 a IV.15.

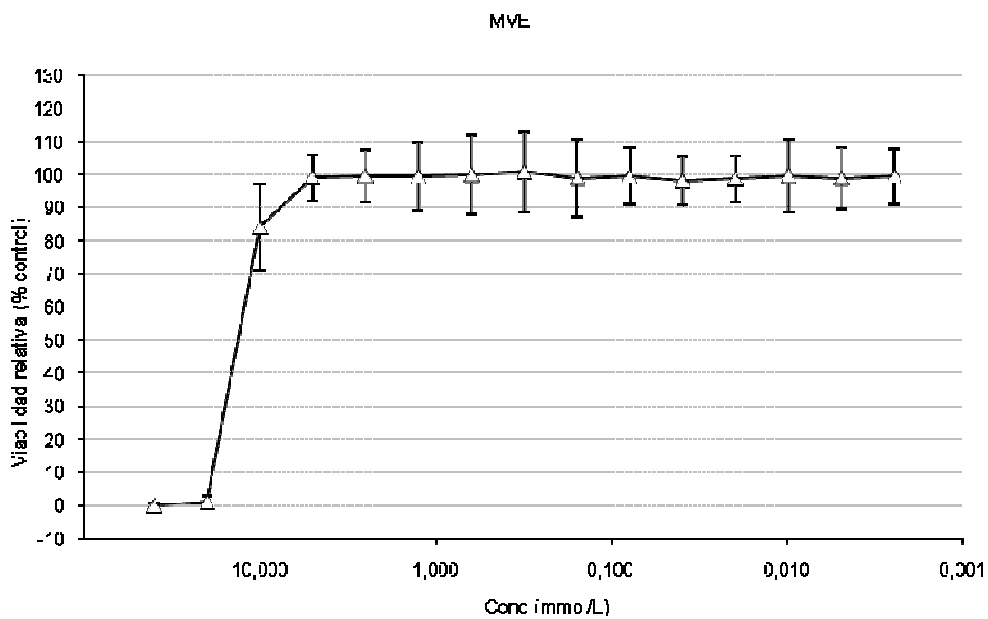


Figura IV.13. Evolución de la citotoxicidad del metacrilato de vitamina E con la concentración.

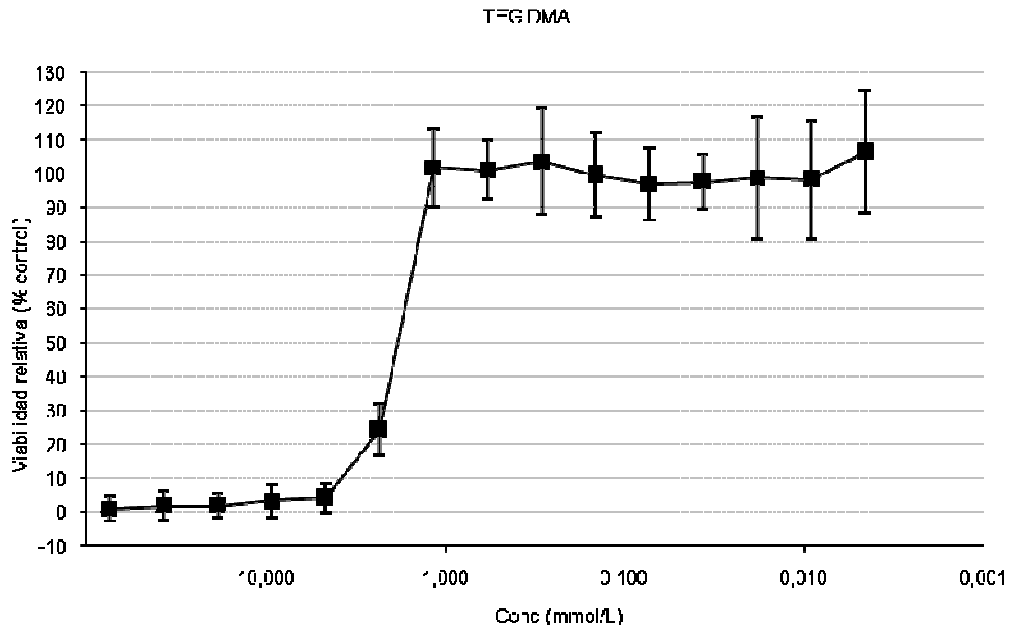


Figura IV.14. Evolución de la citotoxicidad del TEGDMA con la concentración.

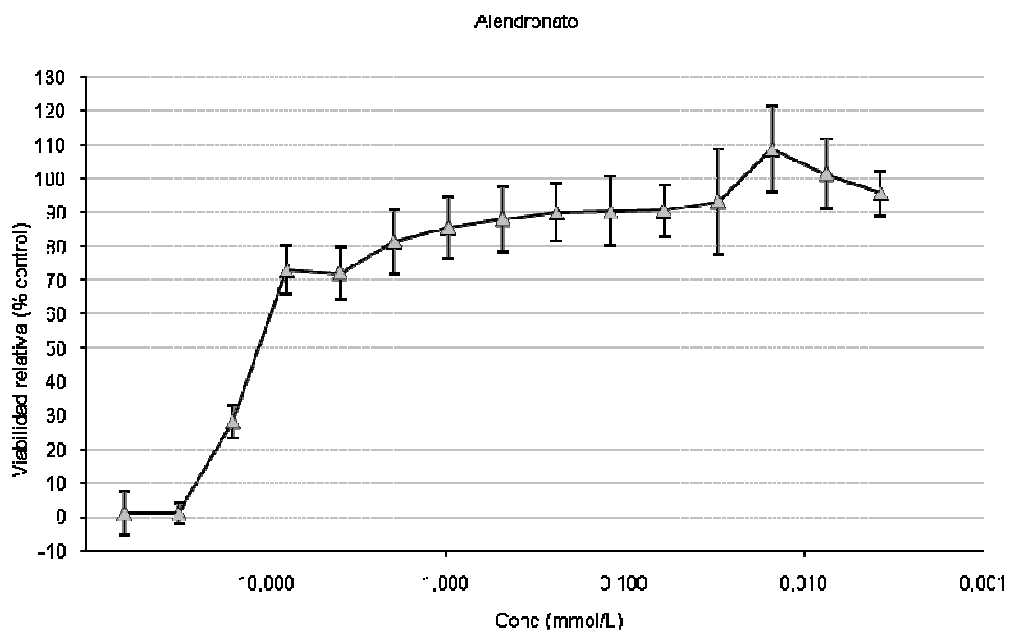


Figura IV.15. Evolución de la citotoxicidad del alendronato con la concentración.

A partir de las gráficas de las Figuras IV.13 a IV.15 se determinan los valores IC_{50} que se muestran en la Tabla IV.5. Estos valores se correlacionan con los obtenidos previamente frente a cultivos de células Vero.

Tabla IV.5. Valores de índice de citotoxicidad 50 (IC₅₀) ± intervalo de confianza al 95% para el metacrilato de vitamina E, dimetacrilato de trietilenglicol y alendronato.

Compuesto	IC ₅₀ (mM)
MVE	14,017 ± 0,872
TEGDMA	1,9451 ± 0,0890
ALEN	11,606 ± 0,609

IV.2.2.1.2. Citotoxicidad de los lixiviados.

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT indican que los cultivos de osteoblastos humanos mantenidos con los lixiviados de los Grupos III y IV experimentan un descenso en la viabilidad celular relativa con respecto a los cultivos mantenidos con los lixiviados del control no citotóxico (TMX).

Como puede verse en la Figura IV.16, este efecto es más acusado en el caso de los cultivos mantenidos con los lixiviados de Grupo IV, de hecho se detectan diferencias significativas con respecto a TMX a 1, 2 y 7 días (descenso de entre un 27% y un 40% en la viabilidad relativa con respecto a TMX).

En el caso de Grupo III el descenso en la viabilidad celular es menos intenso (entre un 5% y un 25% con respecto a TMX), no encontrándose diferencias significativas con respecto a los cultivos mantenidos con los lixiviados de este control a 2 días. Este último resultado indica que la liberación de productos tóxicos se ralentiza tras las primeras 24 horas, si bien no desaparece, puesto que los resultados obtenidos para las muestras cultivadas con los lixiviados de 7 días se obtienen de nuevo valores de viabilidad relativa significativamente inferiores a los obtenidos para el control.

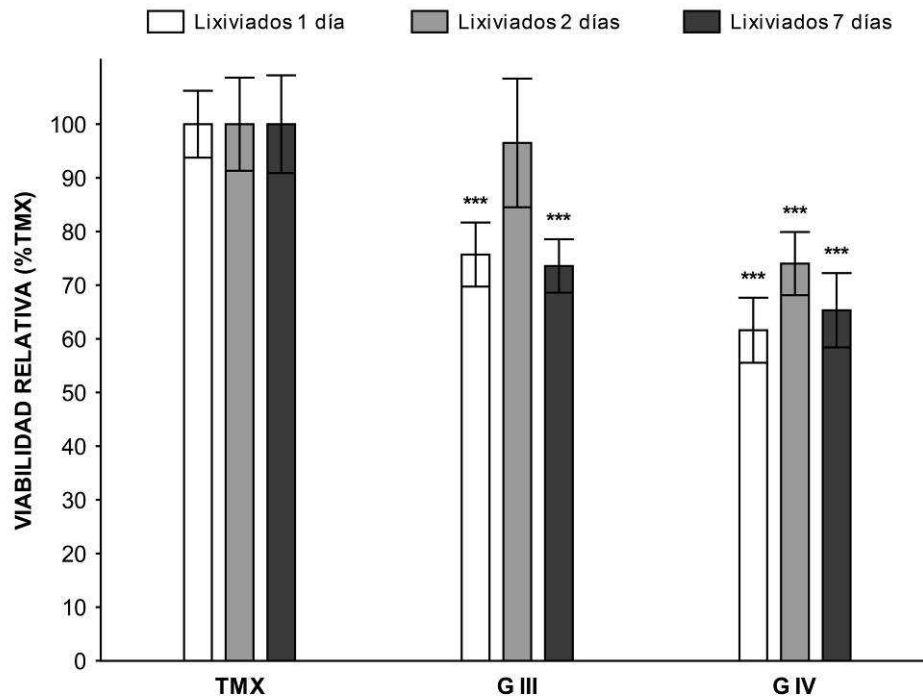


Figura IV.16. Resultados del ensayo MTT realizado utilizando osteoblastos humanos (hOB) para el control TMX y las formulaciones estudiadas. Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95% (n=16) y el nivel de significación obtenido en los ANOVAs frente al TMX (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

El descenso en la viabilidad celular medido para las muestras cultivadas con los lixiviados de Grupo IV es más acusado en todos los periodos estudiados. A pesar de que se ha detectado una leve ralentización en la liberación de productos tóxicos entre 1 y 2 días, ésta permanece durante todo el periodo de estudio. Cabe destacar así mismo, que se han detectado diferencias significativas en la distribución de valores de viabilidad celular relativa entre los cultivos de osteoblastos mantenidos con los lixiviados del Grupo III y del Grupo IV a 1 ($F_{1,30}=12,478$; $p < 0,01$), 2 ($F_{1,30}=12,880$; $p < 0,01$) y 7 días ($F_{1,30}=4,262$; $p < 0,05$).

IV.2.2.2. Morfología y proliferación celular bajo microscopía óptica

Los extractos obtenidos a 1 y 2 días se analizan bajo microscopía óptica para determinar la posible aparición de alteraciones demográficas,

morfológicas y funcionales en los cultivos de osteoblastos mantenidos durante 24 y 96 h en contacto con estos lixiviados.

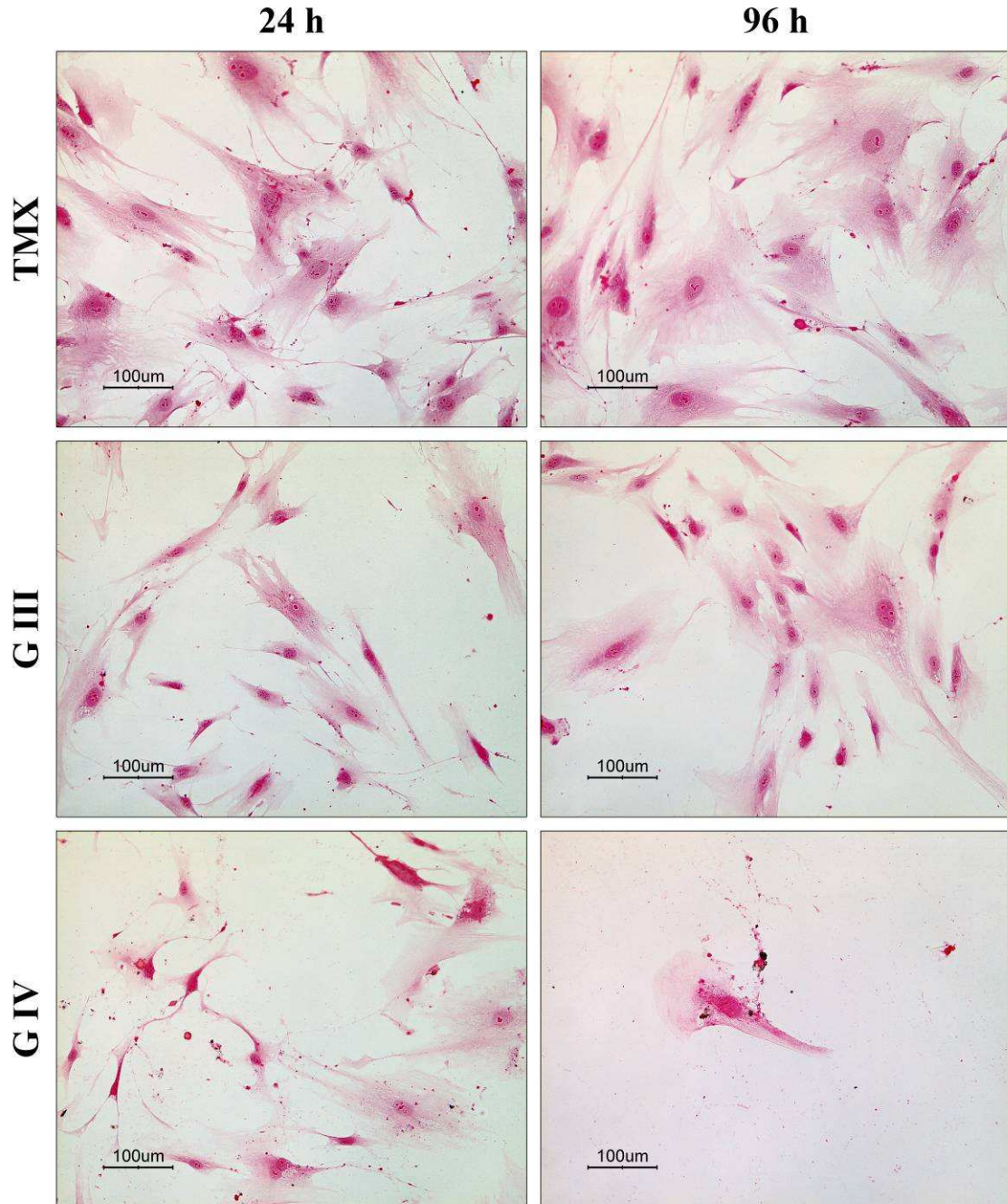


Figura IV.17. Micrografías obtenidas bajo microscopía óptica (tinción hematoxilina-eosina; 200X) de los cultivos de osteoblastos humanos mantenidos durante 24 y 96 h en contacto con los lixiviados de las formulaciones recogidos a 1 día.

Como puede verse en la Figura IV.17, correspondiente a las muestras cultivadas durante 24 y 96 h con los lixiviados obtenidos a 1 día del TMX y de los cementos de los Grupos III y IV, la respuesta de los osteoblastos difiere en los diferentes grupos experimentales.

Los cultivos mantenidos con los lixiviados de TMX presentan células de morfología no alterada tanto tras 24 como 96 h. En este último periodo el número de células es más elevado, apareciendo numerosas zonas de confluencia.

En el caso de las muestras cultivadas con los lixiviados del Grupo III, tras 24 horas aparece una elevada proporción de células de menor tamaño, con una marcada atrofia celular (Figura IV.18), y restos celulares, cuya presencia indica que en estos cultivos han tenido lugar procesos de muerte celular.

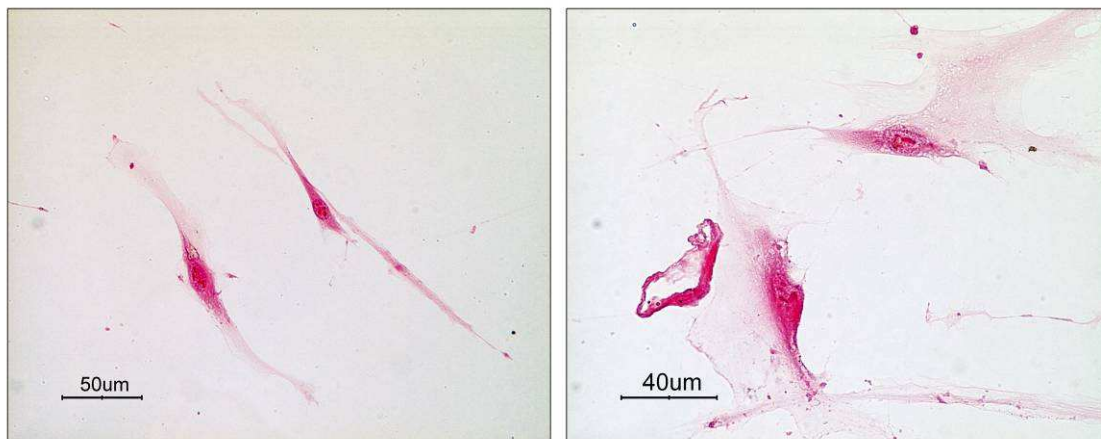


Figura IV.18. Atrofia celular en cultivos de osteoblastos mantenidos durante 24 h en contacto con los lixiviados de Grupo III recogidos a 1 día (tinción hematoxilina-eosina; 400X, izquierda; 600X, derecha).

Otro indicador de la existencia de procesos de muerte celular detectado para este grupo es la presencia de numerosos osteoblastos fagocitando restos celulares (Figura IV.19).

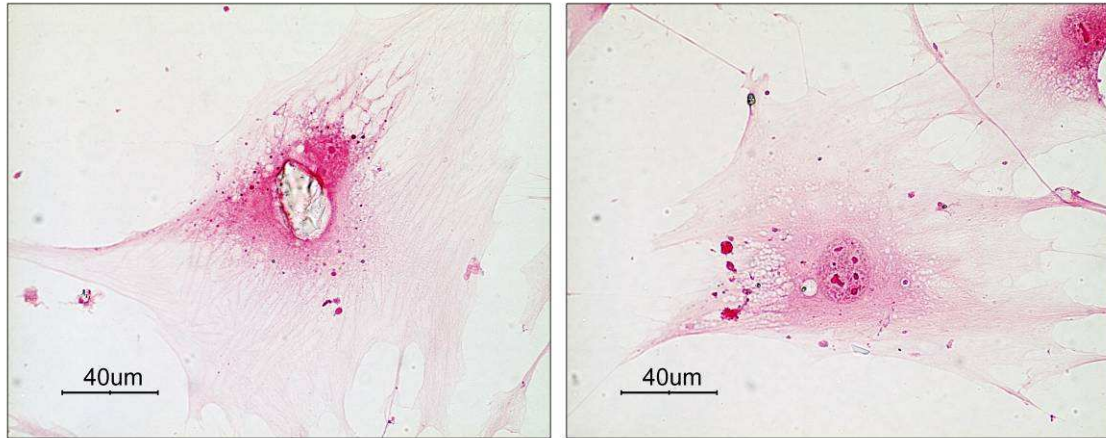


Figura IV.19. Fenómenos de fagocitosis de restos celulares observados en cultivos de osteoblastos mantenidos durante 24 h en contacto con los lixiviados del Grupo III recogidos a 1 día (tinción H/E; 600X).

Esta serie de alteraciones observadas en las muestras mantenidas 24 h en contacto con los productos liberados por las muestras del Grupo III a 1 día se repiten, aunque son menos frecuentes, en las muestras cultivadas con los lixiviados de esta misma formulación durante 96 h. En este caso, a pesar de encontrar osteoblastos de menor tamaño a los observados en el control, el número de células es similar al de los cultivos control, apareciendo incluso zonas de confluencia (Figura IV.17).

En las muestras cultivadas con los lixiviados del Grupo IV a 1 día también aparecen notables alteraciones con respecto a los cultivos control. En estos cultivos, los procesos de atrofia celular son más intensos y los restos celulares notablemente más numerosos (Figura IV.20).

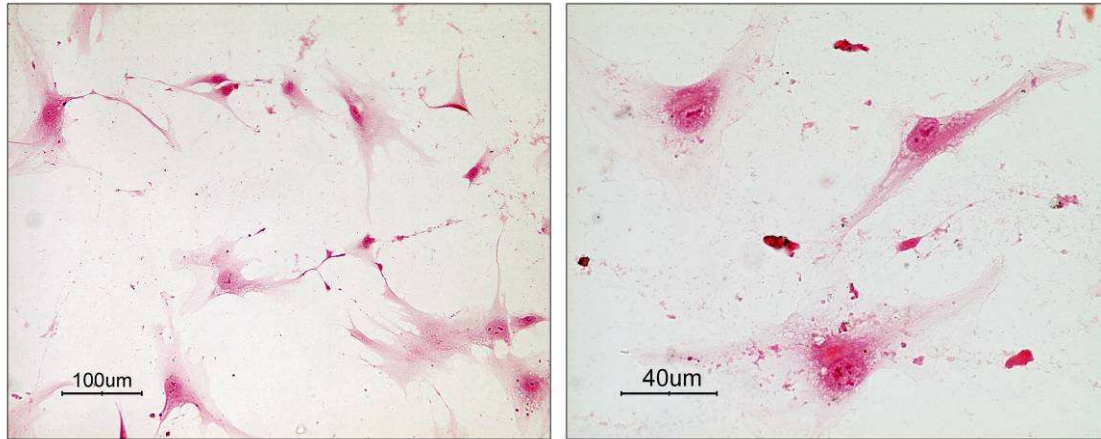


Figura IV.20. Cultivos de osteoblastos humanos mantenidos durante 24 h en contacto con los lixiviados de Grupo IV a 1 día (tinción hematoxilina-eosina; 200X, izquierda; 600X, derecha).

En este caso, además de fenómenos de atrofia celular, se han detectado diversas patologías celulares, entre las que se encuentran procesos de degeneración vacuolar y diversas alteraciones nucleares.

Se estudian también las muestras mantenidas 96 h en contacto con los productos liberados por las muestras de Grupo IV a 1 día. En este caso no se detectan apenas células vivas, estando la superficie de la muestra ocupada mayoritariamente por restos celulares (Figura IV.21 izquierda).

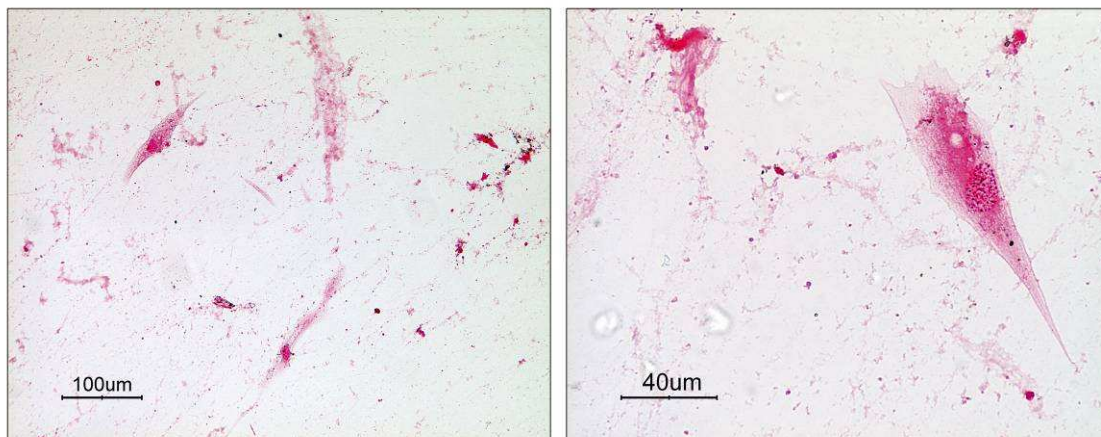


Figura IV.21. Cultivos de osteoblastos humanos mantenidos durante 96 h en contacto con los lixiviados de Grupo IV a 1 día (tinción hematoxilina-eosina; 200X, izquierda; 600X, derecha).

La mayor parte de las células identificadas en estas muestras están muertas o se encuentran notablemente deterioradas, exhibiendo signos característicos de diferentes patologías celulares, como son tumefacción vacuolar, atrofia o diversas alteraciones del núcleo (ejemplo en Figura IV.21 derecha; cromatorrexis).

Tras analizar las muestras cultivadas con los lixiviados obtenidos a 1 día, se puede afirmar que la toxicidad de los productos liberados por el Grupo III tiende a remitir conforme avanza el tiempo de cultivo, siendo además reversibles la mayor parte de las lesiones observadas tras 24 h de cultivo. Por el contrario, los lixiviados del Grupo IV a 1 día provocan alteraciones irreversibles en los osteoblastos cultivados, hecho que desemboca en la práctica ausencia de células tras 96 h de cultivo.

En el caso de las muestras cultivadas con los lixiviados de 2 días (Figura IV.22), los resultados presentan características comunes a los ya comentados para los cultivos mantenidos con los lixiviados de 1 día, si bien las alteraciones celulares observadas son generalmente menos severas y su prevalencia inferior.

Los cultivos mantenidos con los lixiviados de TMX a 2 días no presentan diferencias con respecto a los vistos para las muestras cultivadas con los lixiviados de este mismo control a 1 día. Sin embargo, sí se encuentran diferencias para las muestras mantenidas con los lixiviados de los Grupos III y IV. En ambos casos tras 24 h de cultivo, se detecta un descenso en el número de células con respecto al control, observando numerosas células alteradas (atrofia, tumefacción vacuolar) y restos celulares (más abundantes en las muestras del Grupo IV, pero no tanto como en las cultivadas con los lixiviados obtenidos a 1 día a partir de esta misma formulación). Por el contrario, el número de alteraciones nucleares observadas es inferior. Tras 96 h de cultivo,

la mayor parte de estas alteraciones desaparecen, siendo el número de células muy similar al de las muestras cultivadas con los lixiviados de TMX.

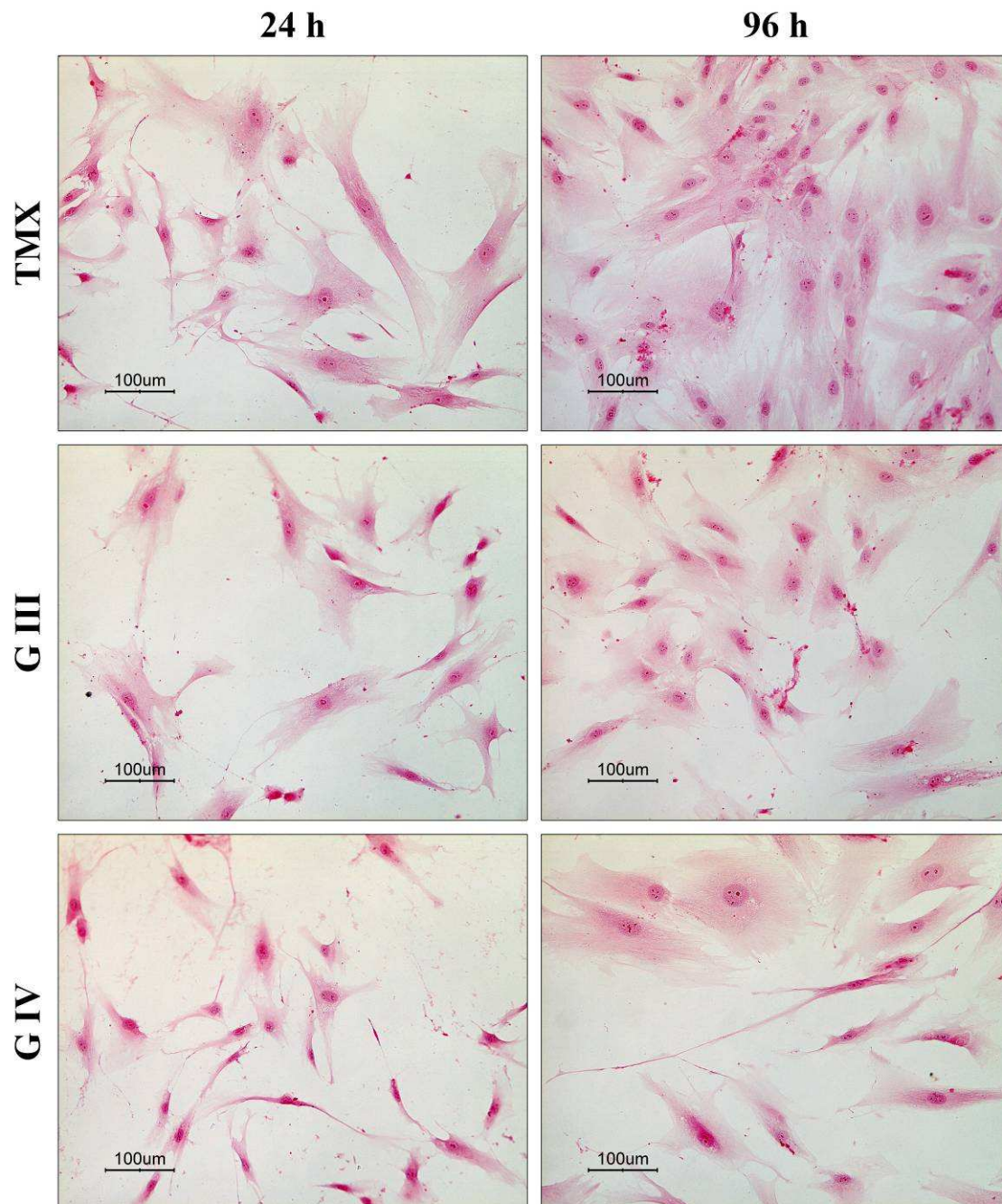


Figura IV.22. Micrografías obtenidas bajo microscopía óptica (tinción hematoxilina-eosina; 200X) de los cultivos de osteoblastos humanos mantenidos durante 24 y 96 h en contacto con los lixiviados de las formulaciones recogidos a 2 días.

Este último resultado parece indicar que los lixiviados a 2 días de los Grupos III y IV son menos tóxicos para los osteoblastos. A pesar de que provocan la aparición de alteraciones tras 24 h en contacto con las células, éstas no son lo suficientemente severas como para que el proceso degenerativo sea irreversible (hecho que se confirma al analizar los cultivos mantenidos 96 h en contacto con los lixiviados).

IV.2.2.3. Proliferación celular.

De los resultados obtenidos en el ensayo *Alamar Blue* (Figura IV.23), es preciso destacar en primer lugar que la evolución de la actividad celular en los cultivos sembrados sobre las muestras de los Grupos III y IV difiere notablemente con respecto a la seguida por las muestras cultivadas sobre el control negativo. Por otra parte, los patrones obtenidos para estas dos formulaciones experimentales presentan también marcadas diferencias. Atendiendo únicamente a los cultivos sembrados sobre las muestras del cemento del Grupo III, se puede destacar que la lectura realizada tras las primeras 24 h de cultivo no presenta diferencias significativas con respecto a TMX, hecho que indica que la mayor parte de las células sembradas se han adherido sobre la superficie del material. En las lecturas posteriores los valores de actividad exhiben un patrón similar al del control, incrementándose hasta prácticamente el final del experimento, si bien su magnitud es sensiblemente inferior (entre un 35% y un 45%). La tendencia obtenida para las muestras sembradas sobre las muestras del Grupo IV es totalmente diferente. Tras 24 h de cultivo ya se obtienen valores de actividad celular significativamente inferiores a los medidos para el control negativo, si bien en este caso el descenso, en torno al 30%, no es demasiado severo. Este resultado indica que los osteoblastos sembrados ven comprometida su adhesión tras la siembra. En las lecturas realizadas transcurridos 3, 7, 14 y 21 días desde la siembra, el descenso en la actividad celular es mucho más acusado, entre un 85% y un 95%, y pone de manifiesto que la supervivencia de las células sembradas sobre el cemento del Grupo IV es muy baja.

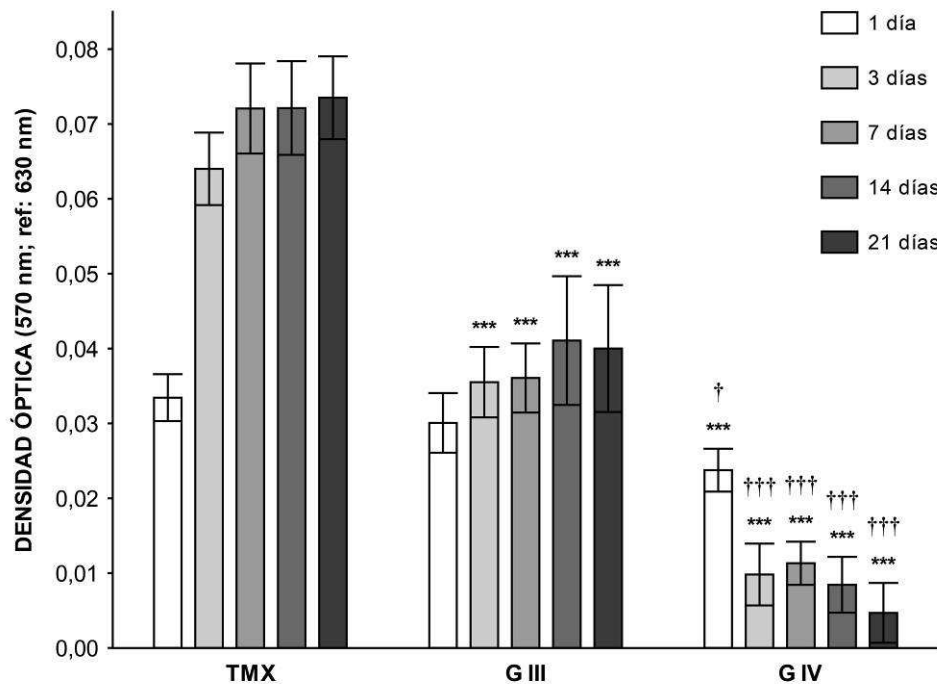


Figura IV.23. Resultados del ensayo *Alamar Blue* para los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre el control TMX y las formulaciones estudiadas. Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95% ($n=16$) y el nivel de significación obtenido en los ANOVAs frente al TMX (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$) y frente al Grupo III (†: $p<0,05$, ††: $p<0,01$, †††: $p<0,001$).

Por tanto, resulta evidente que el comportamiento de los cultivos sembrados sobre los cementos de los Grupos III y IV difiere notablemente, hecho que se confirma al comparar los valores obtenidos para estas dos formulaciones a lo largo del periodo estudiado. Como puede verse en la Figura IV.23, se obtienen diferencias significativas en los análisis de la varianza ANOVA realizados en todos los periodos incluidos en el diseño.

IV.2.2.4. Morfología celular, proliferación y adhesión mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realiza también el estudio de los cultivos de osteoblastos humanos sembrados y mantenidos, durante 24 y 48 h, sobre la superficie del control

TMX y los cementos de los Grupos III y IV bajo microscopía electrónica de barrido (SEM).

Como puede verse en la Figura IV.24, los cultivos sembrados sobre el control negativo TMX y fotografiados bajo microscopio electrónico de barrido (SEM), presentan osteoblastos perfectamente adheridos a su superficie tras 24 h. En las muestras mantenidas en cultivo durante 48 h el número de células es superior, lo que indica que bajo las condiciones empleadas en este estudio los cultivos se encuentran activos, y que las células que los componen han proliferado sobre la superficie de este control.

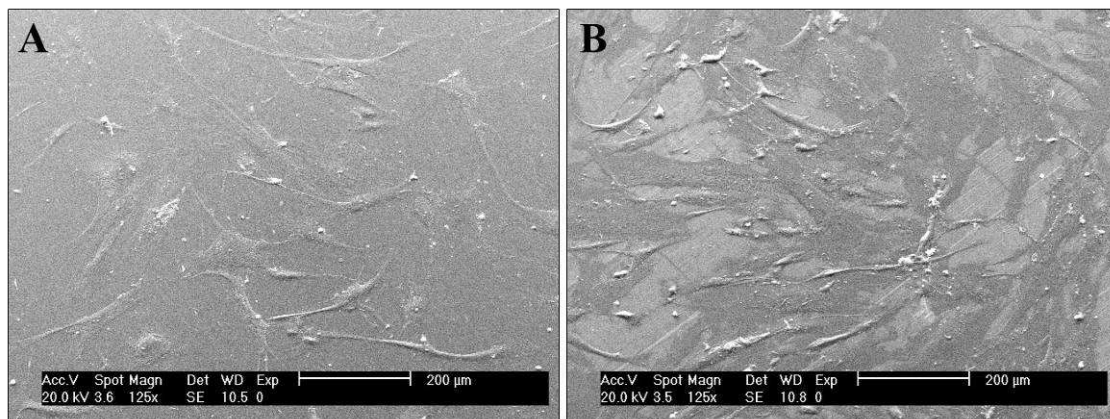


Figura IV.24. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido (125X), transcurridas 24 (A) y 48 h (B) desde su siembra sobre la superficie del control negativo TMX.

Los cultivos sembrados sobre las muestras de las formulaciones experimentales de los Grupos III y IV presentan notables diferencias con respecto a los establecidos sobre la superficie de las muestras de TMX (Figura 2.25). Tras 24 h de cultivo, el número de células sobre la superficie de ambos materiales es menor al visto sobre las muestras del control, además se encuentran numerosas células con alteraciones, la mayoría con una marcada atrofia. Sobre las muestras del Grupo IV la densidad de células es inferior a la encontrada sobre el cemento del Grupo III, siendo además el número de células con alteraciones y el de restos celulares más elevado. Tras 48 h, estos

resultados se intensifican en el caso del cemento del Grupo IV, en cuyas muestras apenas aparecen células adheridas, y las que lo están presentan notables alteraciones. La cantidad de restos celulares también se incrementan en este caso con respecto a las muestras analizadas tras 24 h de cultivo. Por otra parte, en las muestras del cemento del Grupo III tras 48 h de cultivo, los resultados son muy similares a los obtenidos tras 24 h, tanto en lo referente al número de células adheridas sobre la superficie de la muestra como en lo que respecta al número de células que aparecen con signos de alteración. En este último caso los restos celulares son menos abundantes que en las muestras de la formulación del Grupo IV a 48 h.

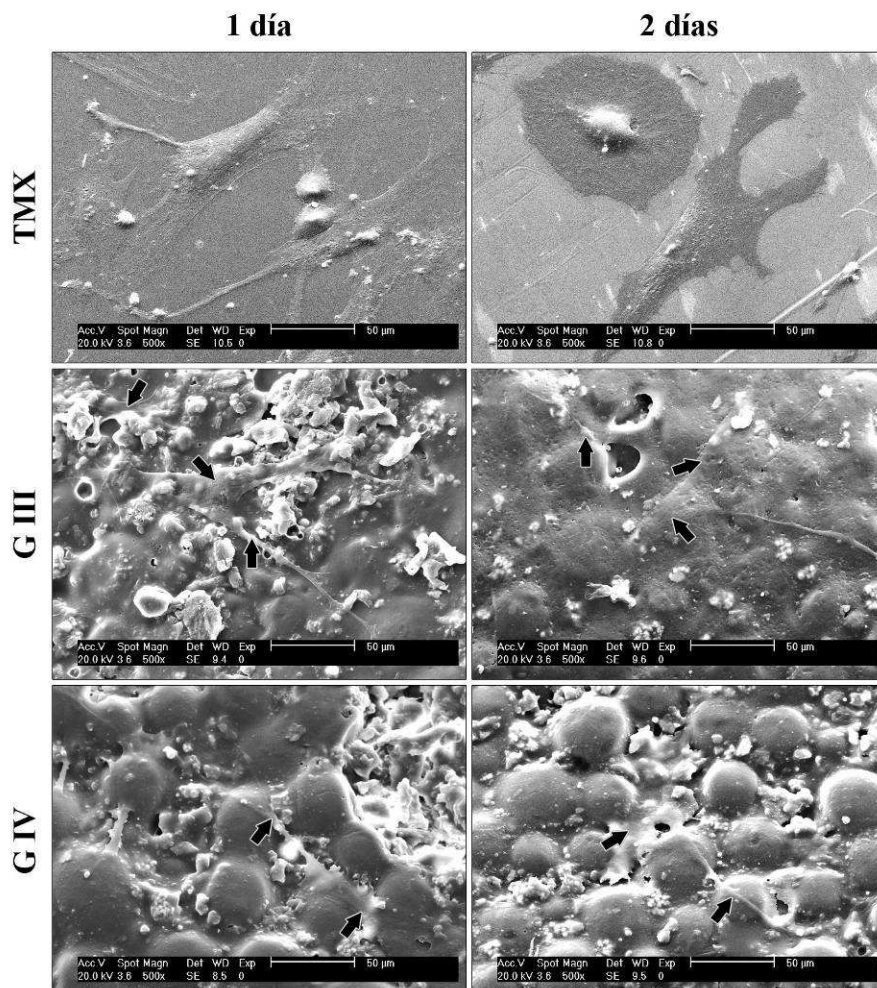


Figura 2.25. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopía electrónica de barrido (500X) transcurridas 24 y 48 h desde su siembra sobre la superficie del control negativo TMX y los sistemas Grupo III y Grupo IV (en las muestras de estas dos últimas formulaciones las células adheridas aparecen señaladas con flechas).

Este conjunto de resultados presentan una elevada concordancia con los obtenidos en el ensayo *Alamar Blue* anteriormente comentado, en el que se pone manifiesto que los niveles de actividad celular detectados en las muestras sembradas sobre los cementos de los Grupos III y IV son inferiores a los medidos en los cultivos establecidos sobre TMX; presentando las muestras del Grupo IV unos valores inferiores a las del Grupo III.

IV.2.2.5. Muerte celular.

Se ha completado un ensayo para cuantificar la muerte celular que sufren los cultivos de osteoblastos sembrados sobre la superficie del control TMX y las formulaciones estudiadas, mantenidos en incubación durante 1, 2 y 7 días, mediante la detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio por las células lisadas.

Los resultados obtenidos en este ensayo indican que el número de células lisadas en los cultivos mantenidos durante 7 días sobre los cementos de los Grupos III y IV apenas difieren del valor medido para el cultivo control sembrado sobre TMX (Figura IV.26). Las muestras correspondientes al control positivo (TMX/TRIT) presentan a lo largo de todo el periodo de estudio unos valores notablemente más elevados.

El hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre las muestras sembradas sobre el cemento del Grupo III y el control negativo, y de que las encontradas entre las muestras del Grupo IV y este mismo control sean muy pequeñas (aunque significativas a 1 y 2 días), parece no concordar con los resultados expuestos hasta ahora. Sin embargo, este resultado puede justificarse teniendo en cuenta que a pesar de que en términos absolutos el número de células lisadas en las muestras de los Grupos III y IV no difiere sustancialmente con respecto al valor medido en los cultivos establecidos sobre TMX, en términos relativos la mortalidad es superior. Como puede verse en la Figura IV.23, correspondiente a los resultados obtenidos en el ensayo *Alamar Blue*, la proliferación celular de los cultivos sembrados sobre los Grupos

III y IV es notablemente inferior, especialmente para esta última formulación, a la de los cultivos sembrados sobre TMX; de forma que si el número de células que componen los cultivos es notablemente inferior y la mortalidad no difiere, la relación células lisadas/células totales viables ha de ser muy superior en las muestras correspondientes a los grupos experimentales III y IV.

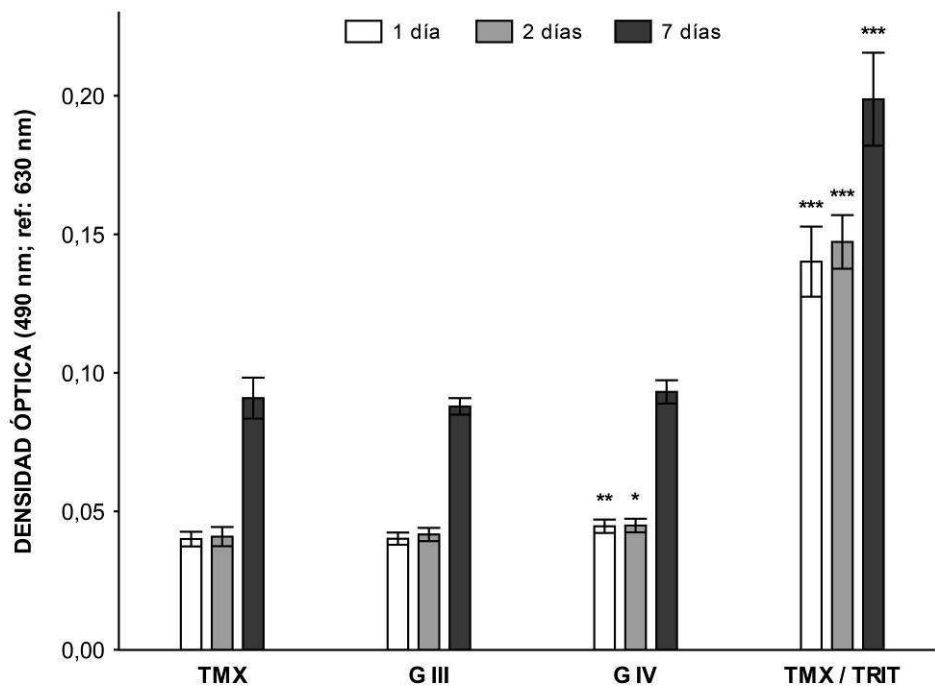


Figura IV.26. Resultados del ensayo de detección de la enzima LDH liberada en los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre los controles (TMX y TMX/TRIT) y las formulaciones estudiadas. Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95% (n=8) y el nivel de significación obtenido en los ANOVAs frente al TMX (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Con el objetivo de contrastar este proceso se ha diseñado un análisis que tenga en cuenta el número de células viables sobre cada una de las muestras. Los valores de mortalidad celular se han relativizado con respecto al número total de células viables adheridas sobre la superficie de las formulaciones a 1 y 7 días, obteniéndose la gráfica incluida en la Figura IV.27.

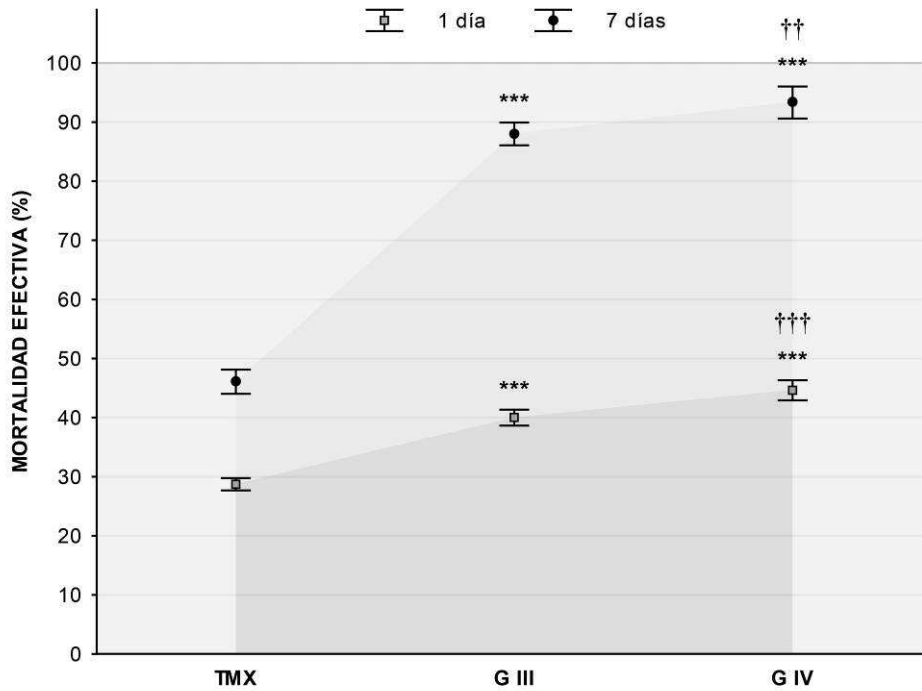


Figura IV.27. Mortalidad efectiva en los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre el control negativo (TMX) y las formulaciones estudiadas (Grupo III y Grupo IV). Se representa la media \pm intervalo de confianza al 95% (n=8) y el nivel de significación obtenido en los ANOVAs frente al TMX (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) y frente a G III (†: $p < 0,05$, ††: $p < 0,01$, †††: $p < 0,001$).

Como se aprecia en la Figura IV.27, la proporción de células lisadas es significativamente superior en los cultivos sembrados sobre ambas formulaciones experimentales con respecto a los cultivos control, tanto a 1 como a 7 días. Los resultados obtenidos al final del periodo de estudio ponen de manifiesto que tras 7 días de cultivo el número de células vivas sobre el Grupo III es muy bajo (han desaparecido en torno al 90%), mientras que sobre las muestras del sistema cargado con alendronato prácticamente han desaparecido en su totalidad.

Entre las formulaciones de los Grupos III y IV los valores obtenidos en el ensayo de cuantificación de la enzima LDH liberada apenas difieren (Figura IV.26). Sin embargo, al tener en cuenta en el análisis de datos que la actividad celular en los cultivos establecidos sobre el Grupo III supera notablemente a la

de los cultivos sembrados sobre el Grupo IV (Figura IV.23), se encuentran diferencias significativas en la mortalidad efectiva que sufren los cultivos de osteoblastos mantenidos sobre su superficie a lo largo de todo el periodo de estudio (Figura IV.27).

IV.3. EVALUACIÓN DE LA BIOCMPATIBILIDAD *IN VIVO*. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

IV.3.1. RESPUESTA HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CONECTIVO

IV.3.1.1. Análisis macroscópico

Macroscópicamente se observa que el fraguado del cemento da como resultado una estructura sólida con forma ovoide de gran dureza, difícil de procesar con el bisturí.

IV.3.1.2. Análisis microscópico

Desde el punto de vista microscópico, y tal como indica la norma ISO-10993-6,⁴ se evalúa fundamentalmente, la extensión de la cápsula fibrosa, la distribución de los tipos de células inflamatorias, y la presencia o no de necrosis en los tejidos adyacentes al implante.

En los resultados histopatológicos, no se encuentran diferencias significativas en la respuesta histológica a la implantación de las diferentes formulaciones (Grupos I a III). En todos los casos, alrededor del cemento se observa una fina cápsula de tejido conectivo moderadamente denso constituido por fibroblastos con algunas fibras de colágeno⁵ (Figuras IV.28, Grupo I o control y Figura IV.29, Grupo II).

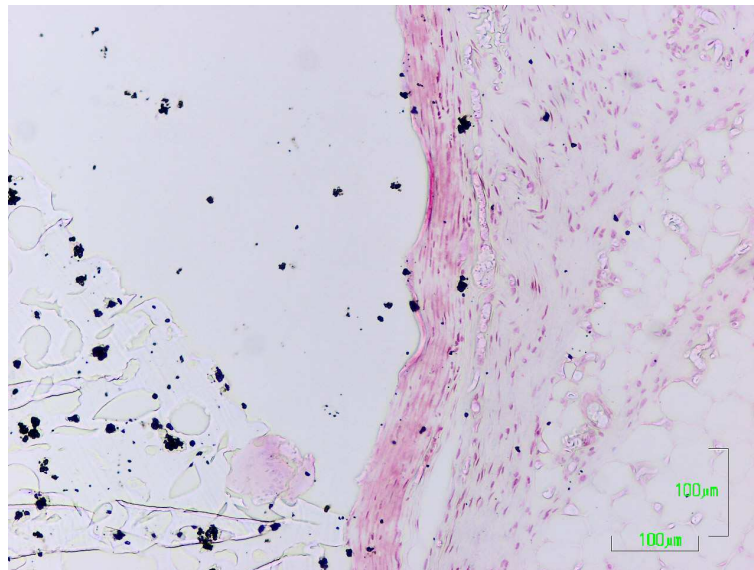


Figura IV.28. Micrografía en la que el cemento aparece rodeado por una fina cápsula de tejido conectivo constituido por fibroblastos con algunas fibras de colágeno (tinción H/E).

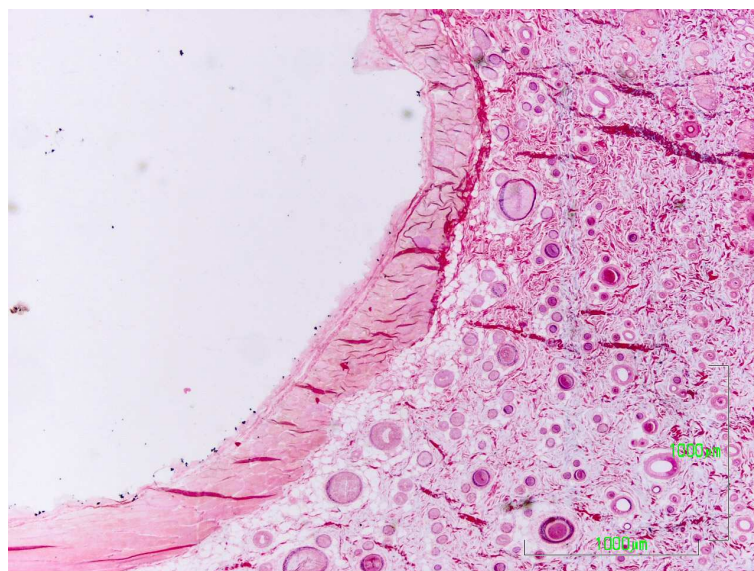


Figura IV.29. Micrografía en la que se aprecia el detalle de la línea tisular que rodea al cemento (tinción H/E).

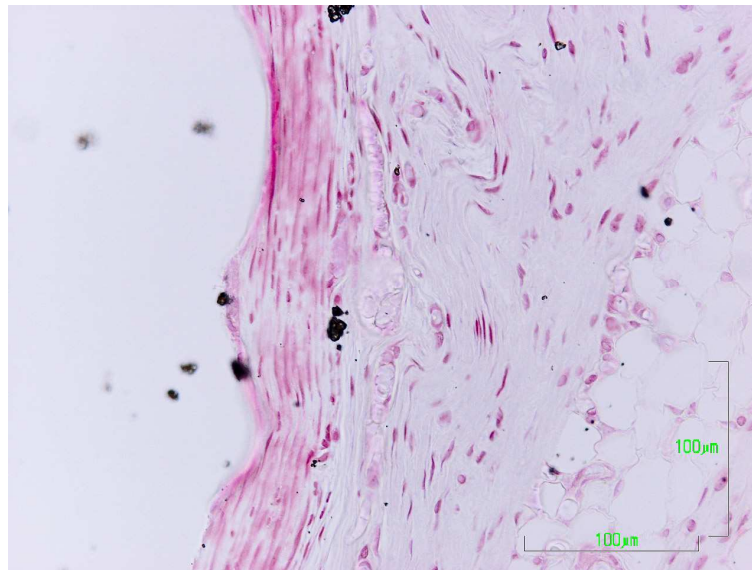


Figura IV.30. Micrografía en la que se aprecia que no existen alteraciones en los vasos sanguíneos ni en el tejido adiposo (tinción H/E).

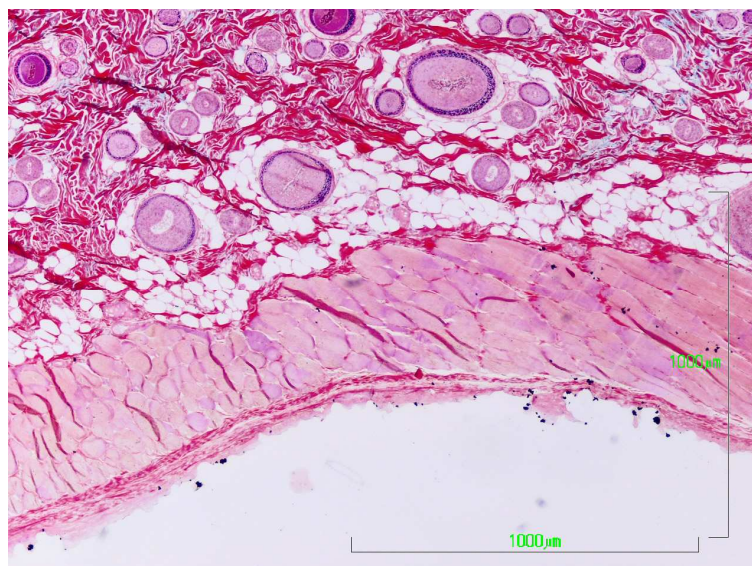


Figura IV.31. Micrografía en la que se observa que no existen alteraciones en la piel ni anejos pilosos (tinción H/E).



Figura IV.32. Micrografía en la que se aprecia el músculo estriado sin alterar (tinción H/E).

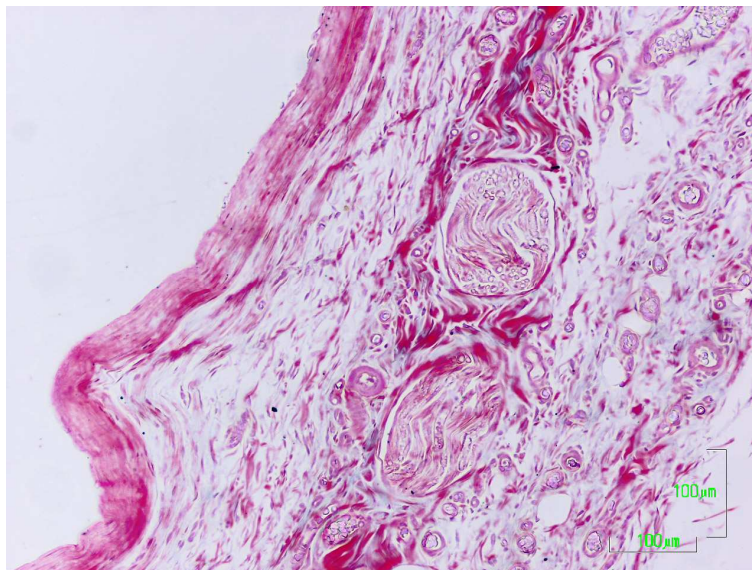


Figura IV.33. Micrografía que muestra el nervio periférico sin alteraciones (tinción H/E).

Con respecto al comportamiento de la cápsula de tejido conectivo con el cemento, se observan pequeñas excrecencias en forma de papilas o lengüetas dirigidas desde la cápsula hacia el interior del cemento (Figuras IV.34, IV.35 y IV.36. Grupo II). Estas papilas presentan forma variable, a veces filiforme, a

veces bulbosa y parecen estar constituidas por células de núcleo redondeado, con nucleolo aparente, y de hábito epitelial, no conectivo.



Figura IV.34. Imagen micrográfica que muestra comportamiento de la cápsula de tejido conectivo con el cemento (tinción H/E).

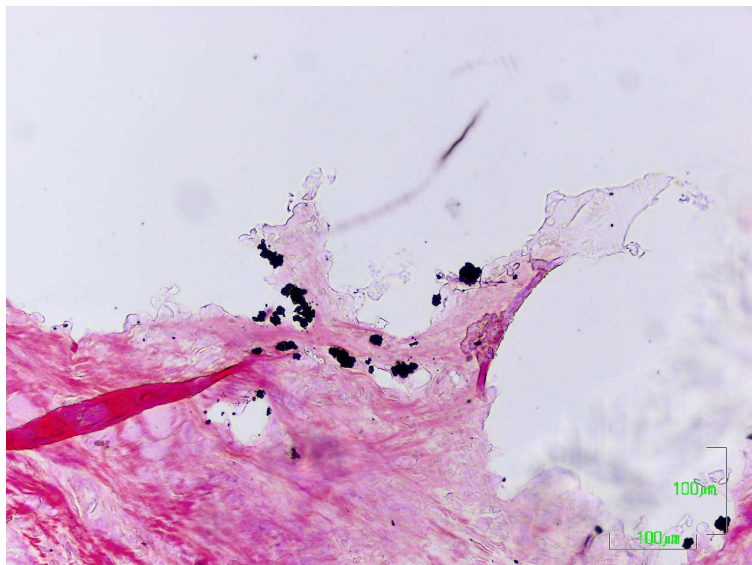


Figura IV.35. Imagen micrográfica que muestra comportamiento de la cápsula de tejido conectivo con el cemento (tinción H/E)

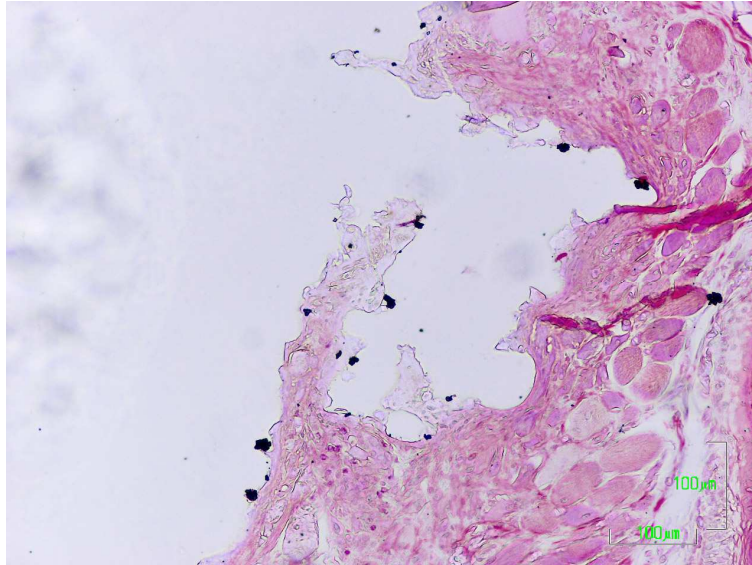


Figura IV.36. Imagen micrográfica que muestra comportamiento de la cápsula de tejido conectivo con el cemento (tinción H/E).

No se observa en ningún caso calcificación en el tejido adyacente al cemento, ni por supuesto fenómenos de osificación, así como tampoco se observa reacción inflamatoria, leucocitos, células plasmáticas ni células gigantes de cuerpo extraño.

IV.3.2. RESPUESTA HISTOLÓGICA DEL TEJIDO ÓSEO

La sistemática empleada en los resultados histopatológicos del tejido óseo, consiste en describir los hallazgos encontrados en los distintos grupos estudiados: Grupo I (control), animales a los que se les implanta cemento óseo control, Grupo II, aquellos a los que se les inyecta cemento modificado con un 20%-p de MVE en la fase líquida, Grupo III, los correspondientes al cemento modificado con 20%-p de MVE y 10%-p de TEGDMA en la fase líquida, y por último, el Grupo IV a los que se les trata con cemento cargado con alendronato en la fase sólida. Los resultados obtenidos para cada grupo experimental se exponen por orden cronológico, indicando el tipo de tinción empleada en cada caso (tinción Tricrómico de Goldner, TG; o tinción de Von Kossa, VK).

IV.3.2.1. Grupo I. Cemento Control

Transcurridas 4 semanas desde su implantación, las muestras correspondientes al grupo control presentan una porción central de cemento englobada por hueso, en parte neoformado, que en ocasiones va a limitar bien con médula ósea y tejido conectivo o bien con espículas óseas, en su mayoría activas.

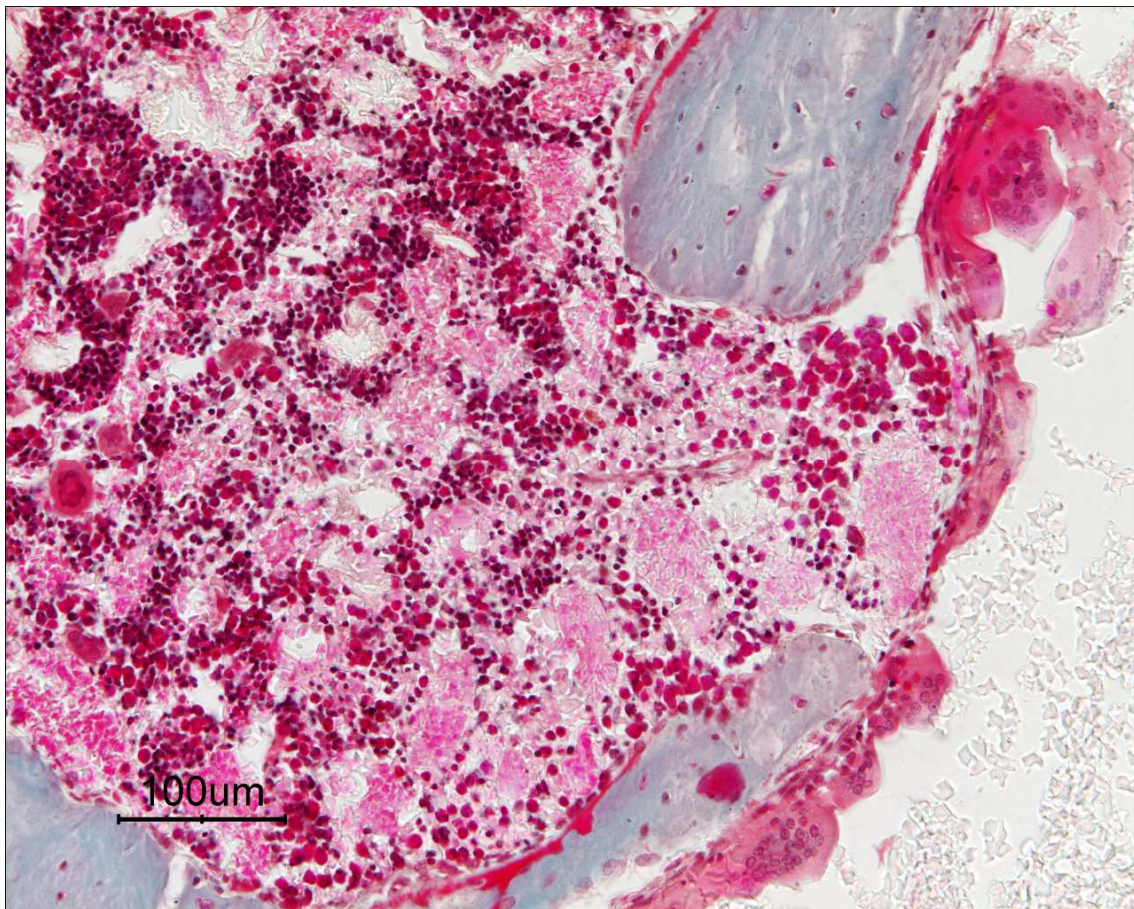


Figura IV.37. Visión general de la respuesta histológica al cemento del Grupo I a las 4 semanas de la implantación (TG; 200X). Médula ósea con tejido hematopoyético de aspecto normal y espículas óseas con osteoblastos y osteoclastos hipertróficos.

Las respuestas de tipo defensivo (reacción de cuerpo extraño, fibrosis, etc.) son escasas. La médula ósea presenta un aspecto normal, conservando

la proporción entre la serie blanca y la serie roja, según se muestra en las Figuras IV.37 y IV.38.

Las zonas donde se detecta proliferación ósea muestran características normales, con presencia de osteocitos y osteoblastos acompañados de osteoclastos que ponen de manifiesto una actividad remodeladora de la estructura (Figura IV.37).

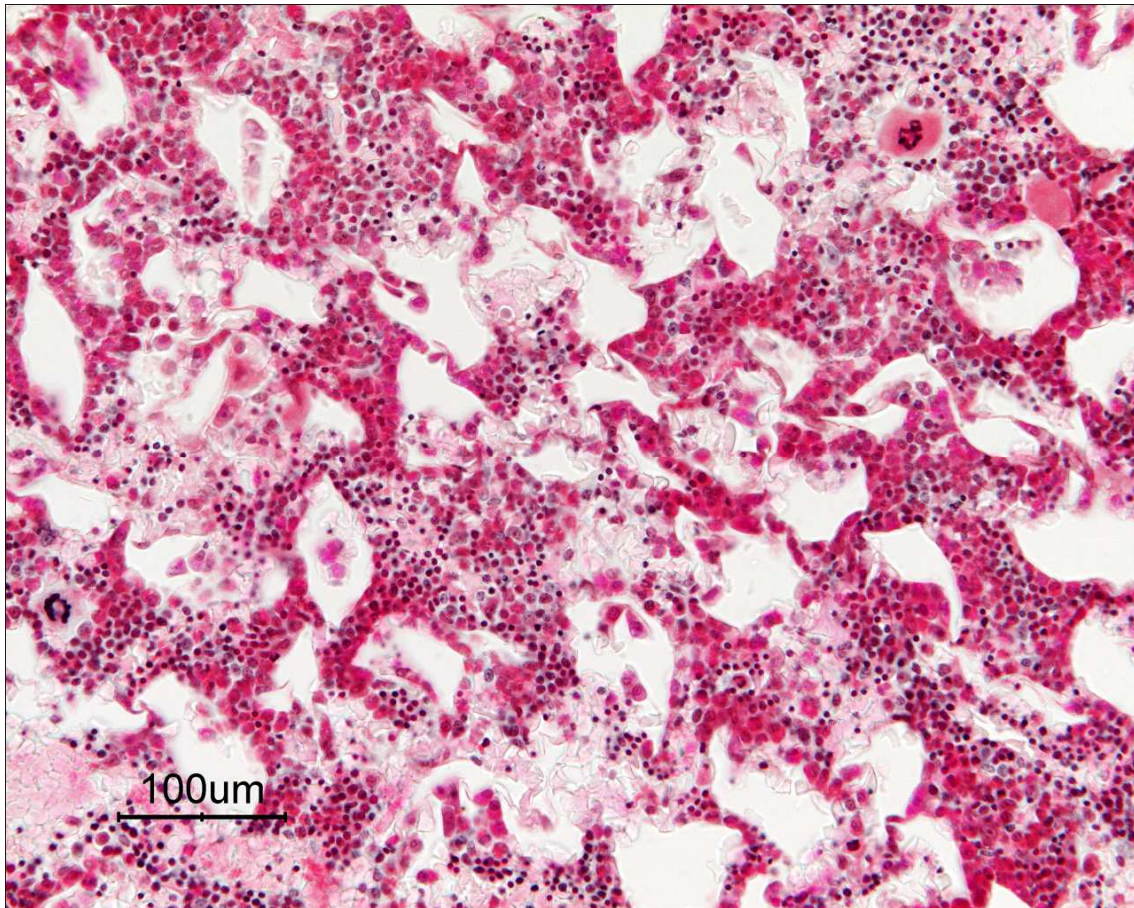


Figura IV.38. Detalle de los caracteres morfológicos del tejido hematopoyético del Grupo I a las 4 semanas de la implantación (TG; 200X).

A pesar de que no es un fenómeno generalizado, en algunas muestras se han observado fenómenos de mielofibrosis periférica asociados a focos de necrosis, así como la presencia de eosinófilos (Figura IV.39).

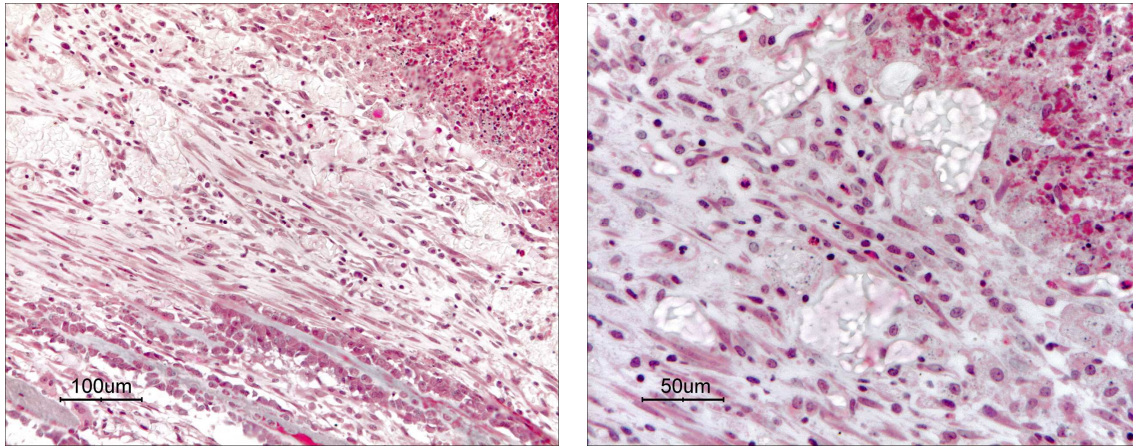


Figura IV.39. Áreas de mielofibrosis periférica asociada a focos de necrosis del Grupo I a las 4 semanas de la implantación (TG; 200X izquierda, 400X derecha). En la micrografía de la izquierda se observan espículas óseas activas con una marcada hiperplasia osteoblástica.

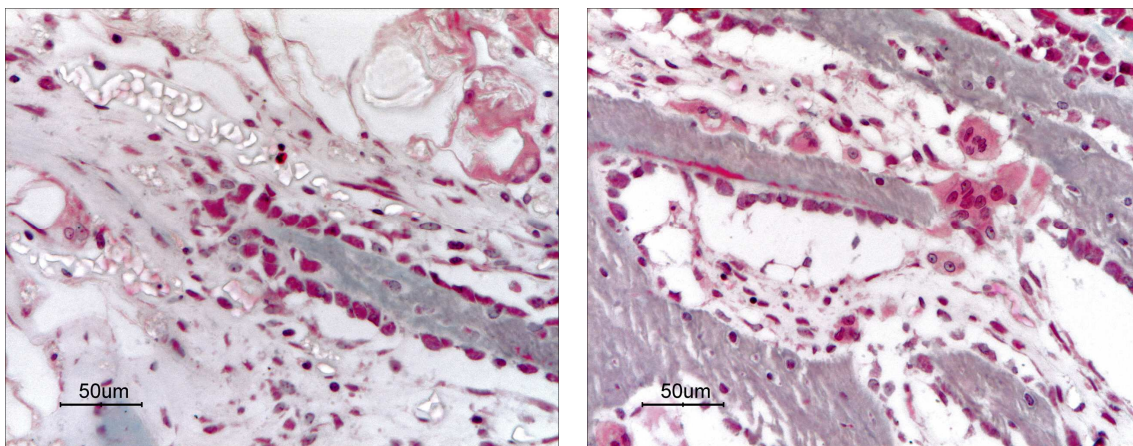


Figura IV.40. Dos ejemplos en los que se observa reacción de cuerpo extraño y espículas neoformadas, con hiperplasia e hipertrofia osteoblástica tras la implantación del cemento del Grupo I a las 4 semanas. Se observan así mismo osteocitos en el espesor de la espícula (TG; 400X).

Por otra parte, en las zonas donde se observa reacción de cuerpo extraño, ésta se caracteriza por abundancia de macrófagos y presencia de células multinucleadas (Figura IV.40).

El estudio microscópico de las muestras correspondientes a 8 semanas revela un engrosamiento de las corticales óseas a expensas de proliferación ósea fundamentalmente en la cara endóstica de estas corticales. Esta proliferación ósea se realiza a expensas de trabéculas óseas anastomosadas con componentes celulares de tejido óseo de morfología y características normales. En la cavidad medular aparecen tanto áreas de hematopoyesis entre el material intramedular como focos de reacción de cuerpo extraño, con tejido conectivo con un grado de infiltración variable de células inflamatorias y más periféricamente tejido óseo en distintas etapas de neoformación. Las técnicas realizadas para demostrar la calcificación de este tejido neoformado demuestran la mineralización normal del mismo, tanto en las trabéculas formadas inicialmente, como en las adyacentes al tejido conectivo medular, más jóvenes.

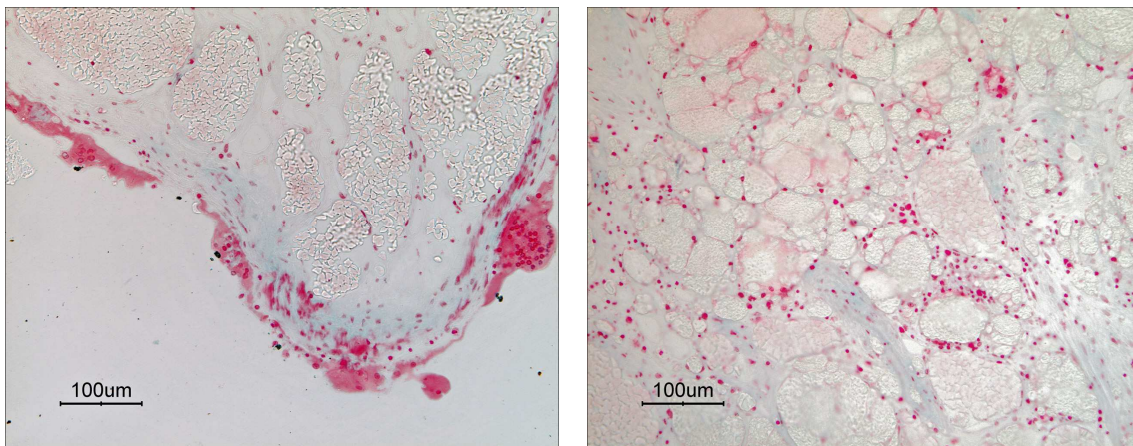


Figura IV.41. Muestras en las que el cemento del Grupo I aparece aislado en grupos por tejido fibroso a las 8 semanas de la implantación (TG; 200X). En la micrografía de la derecha se observan focos de reacción de cuerpo extraño y elementos hematopoyéticos dispersos.

El material implantado aparece frecuentemente aislado en grupos por bandas fibrosas de diferente grosor y aspecto cicatricial (Figura IV.41), con una intensa reacción de cuerpo extraño caracterizada por la presencia de abundantes células multinucleadas.

Con respecto a la actividad osteogénica, cabe destacar que gran parte de las espículas óseas observadas conservan el frente osteoblástico (Figura IV.42).

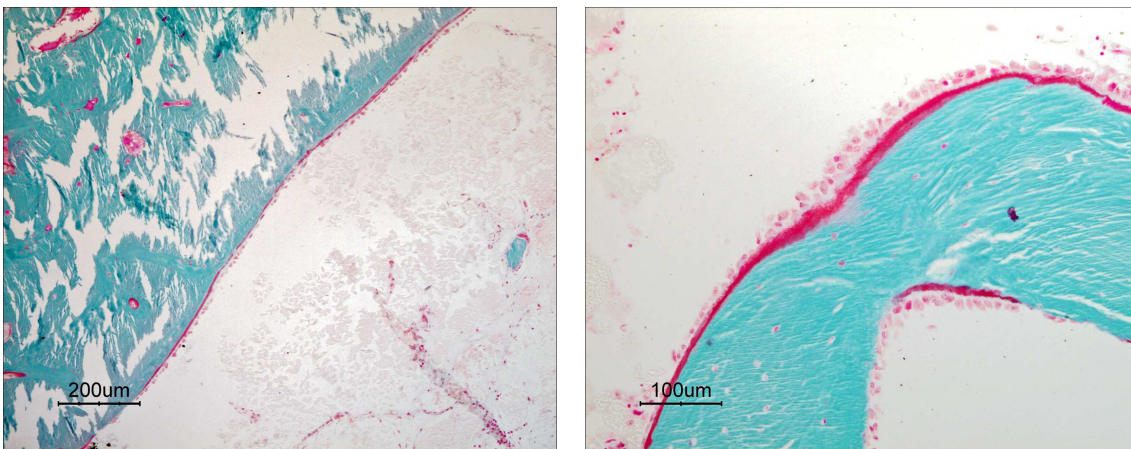


Figura IV.42. Micrografías de la respuesta al cemento del Grupo I a las 8 semanas de la implantación en las que se observan frentes osteoblásticos activos. (TG; 100X izquierda, 200X derecha)

Transcurridas 12 semanas los resultados son similares, tanto el hueso como la médula ósea hematopoyética presentan características normales. El tejido conectivo ha experimentado un aumento en fibras densificándose progresivamente.

El fenómeno más destacable es el intento de regeneración de los focos hematopoyéticos a expensas de la granulopoyesis (Figura IV.43). Se han observado así mismo elementos en apoptosis e hiperplasia megacariocítica.

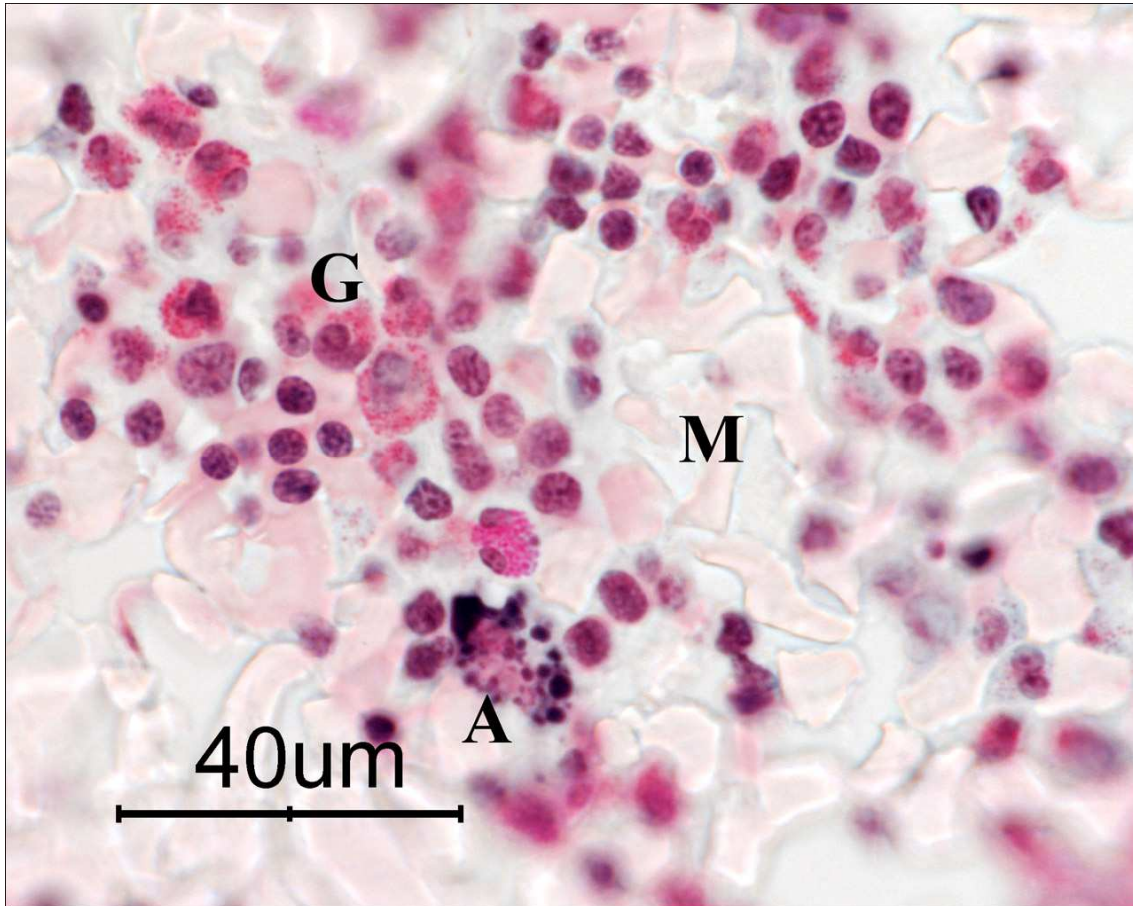


Figura IV.43. Micrografía de la respuesta al cemento del Grupo I a las 12 semanas de la implantación (TG; 600X) en la que se observan acúmulos del material (M), elementos celulares en apoptosis (A) y un foco hematopoyético de granulocitos eosinófilos (G).

Los focos de eritropoyesis son escasos y generalmente aparecen en áreas con abundante presencia de megacariocitos. Así mismo, sigue siendo evidente la presencia de eosinófilos (Figura IV.44).

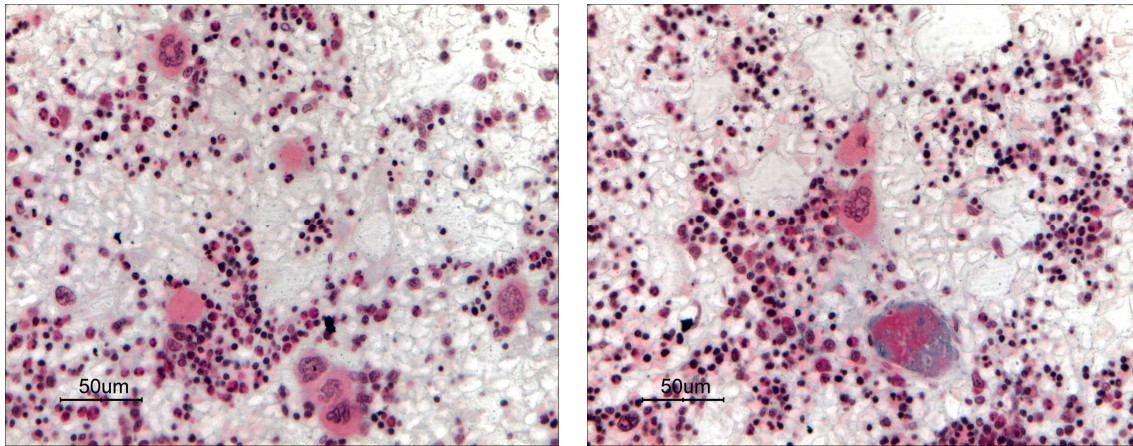


Figura IV.44. Micrografías de la respuesta al cemento del Grupo I a las 12 semanas de la implantación (TG; 400X) en las que se pueden observar megacariocitos hiperplásicos e hipertróficos, así como granulopoyesis con predominio eosinofílico.

Tras 24 semanas, en la mayoría de las muestras se mantiene la osteogénesis. La médula ósea presenta un aspecto normal.

En algunas muestras se detectan variaciones en los elementos osteogénicos. La reacción de cuerpo extraño es poco evidente y la respuesta hematopoyética es más débil, con predominio de la serie granulopoyética sobre la eritropoyesis (se conserva el predominio de eosinófilos).

IV.3.2.2. Grupo II

Transcurridas 2 semanas desde la implantación de las muestras correspondientes al Grupo II no se detectan alteraciones reseñables en la actividad osteogénica, observándose en las muestras analizadas espículas activas, en las que aparecen numerosos frentes de osteoblastos (Figura IV.45).

Por otra parte, la médula ósea se conserva en buen estado, predominando, como es previsible, la serie roja.

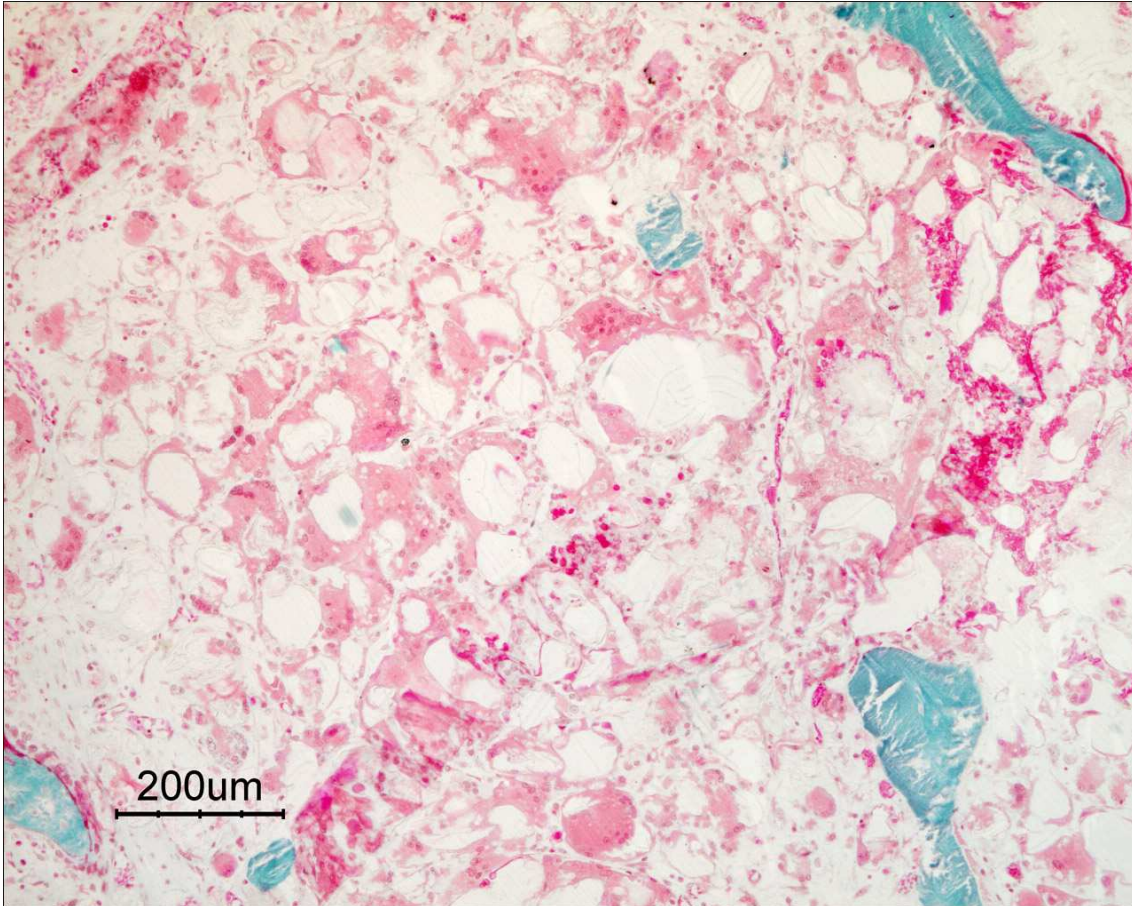


Figura IV.45. Micrografía de la respuesta al cemento del Grupo II a las 2 semanas de la implantación (TG; 100X) en la que se observan espículas óseas activas, con numerosos frentes de osteoblastos. También aparecen numerosas células gigantes de cuerpo extraño englobando acúmulos del cemento implantado.

El fenómeno defensivo más destacable observado es la respuesta de cuerpo extraño, caracterizada en este conjunto de muestras por la presencia de muy abundantes células multinucleadas (Figuras IV.45-IV.47), cuyo tamaño parece estar condicionado a su vez por el tamaño de los acúmulos del material implantado.

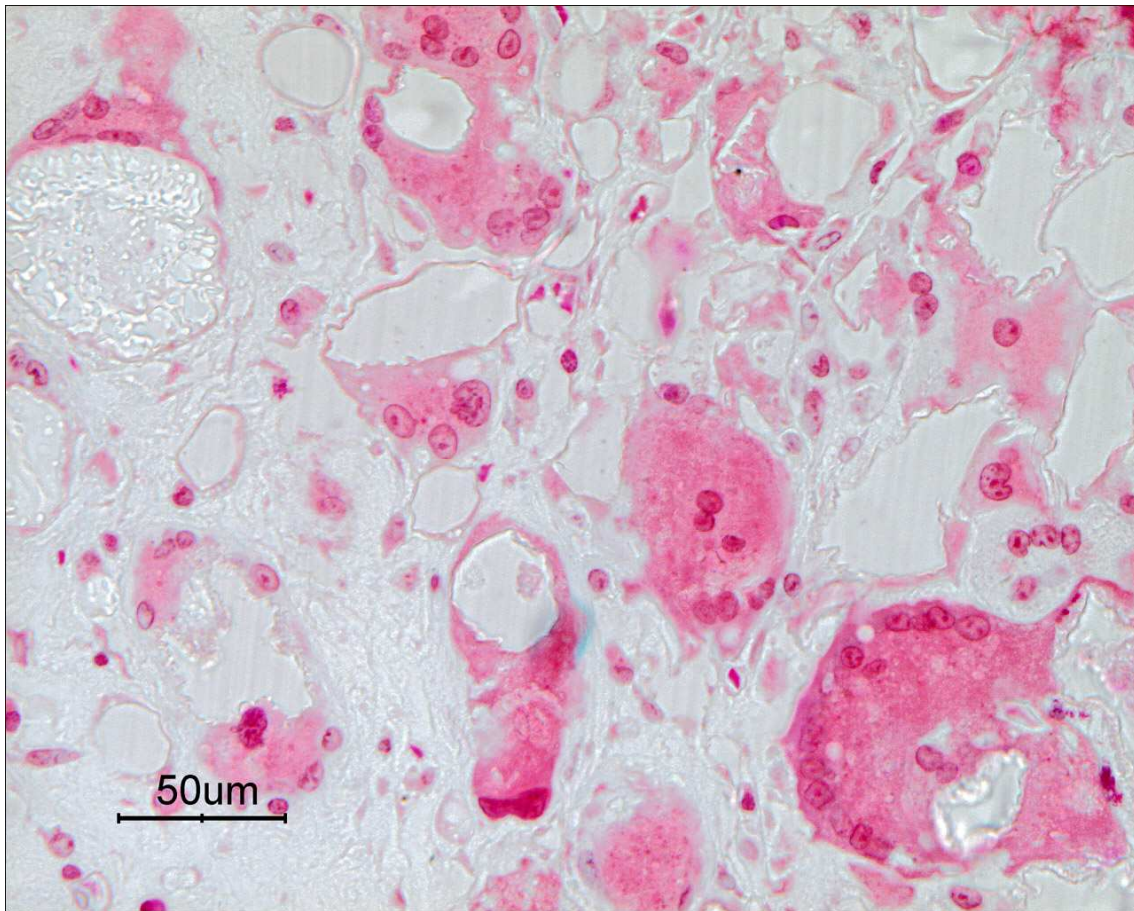


Figura IV.46. Reacción de cuerpo extraño al cemento del Grupo II a las 2 semanas de la implantación con numerosas células gigantes multinucleadas englobando restos del cemento implantado (TG; 400X).

Adicionalmente, en algunas áreas de estas muestras del cemento del Grupo II a las 2 semanas de la implantación se detectan fenómenos de fibrosis reactiva que se pueden apreciar en la Figura IV.47.

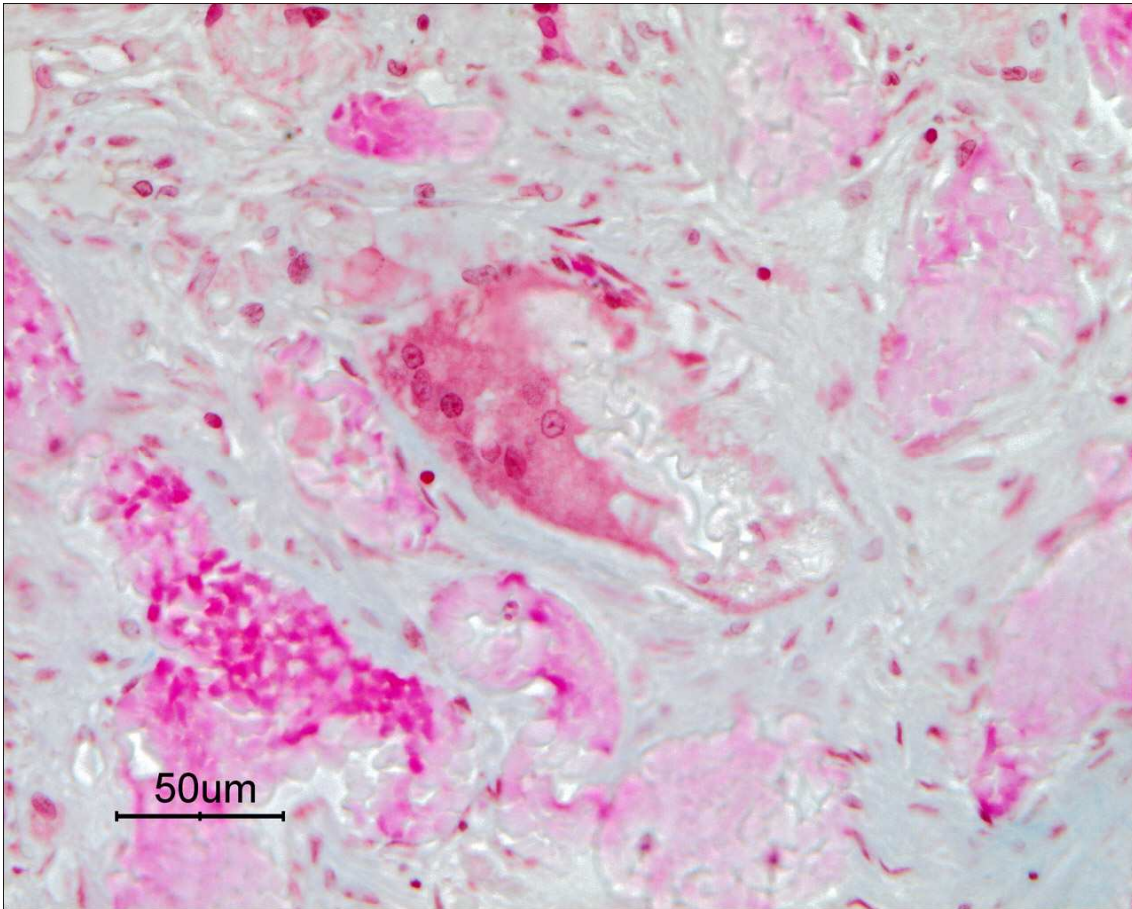


Figura IV.47. Reacción reactiva al cemento del Grupo II a las 2 semanas de la implantación, caracterizada por la presencia de células de cuerpo extraño y la aparición de zonas de fibrosis (TG; 400X).

A las 4 semanas de tratamiento, se observan territorios de la médula ósea en los que se conserva la fibrosis vista tras 2 semanas de tratamiento (Figura IV.48 izquierda), y otras áreas de sustitución adiposa (Figura IV.48 derecha), mientras que la reacción de cuerpo extraño es menos evidente. Por otra parte, aparecen indicios de regeneración hematopoyética (pequeños focos; Figura IV.48).

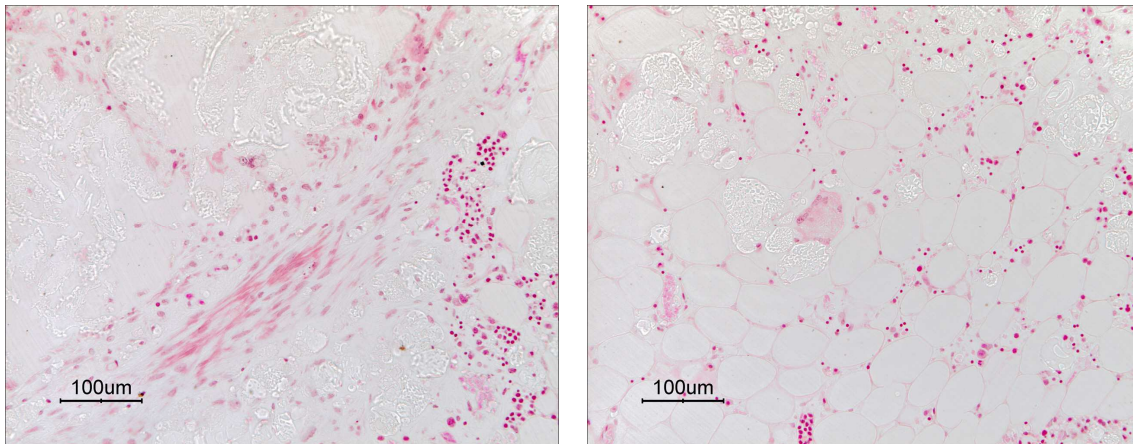


Figura IV.48. Micrografías de la respuesta al cemento del Grupo II a las 4 semanas de la implantación (TG; 200X) en las que se observa zonas de proliferación fibroblástica, junto con restos hematopoyéticos y acúmulos del material implantado (izquierda); en la fotografía derecha se observan zonas de sustitución adiposa de la médula, junto con alguna célula gigante de cuerpo extraño, restos hematopoyéticos y acúmulos del cemento.

En contraste, en otras muestras analizadas de este grupo la respuesta hematopoyética es muy evidente, con presencia de las dos series, pero con predominio de la serie blanca (Figura IV.49).

Así, para el cemento del Grupo II, que incorpora metacrilato de vitamina E, se observa una respuesta hematopoyética de distribución irregular, apareciendo tanto fenómenos de sustitución fibro-adiposa, como marcadas respuestas reactivas hematopoyéticas.

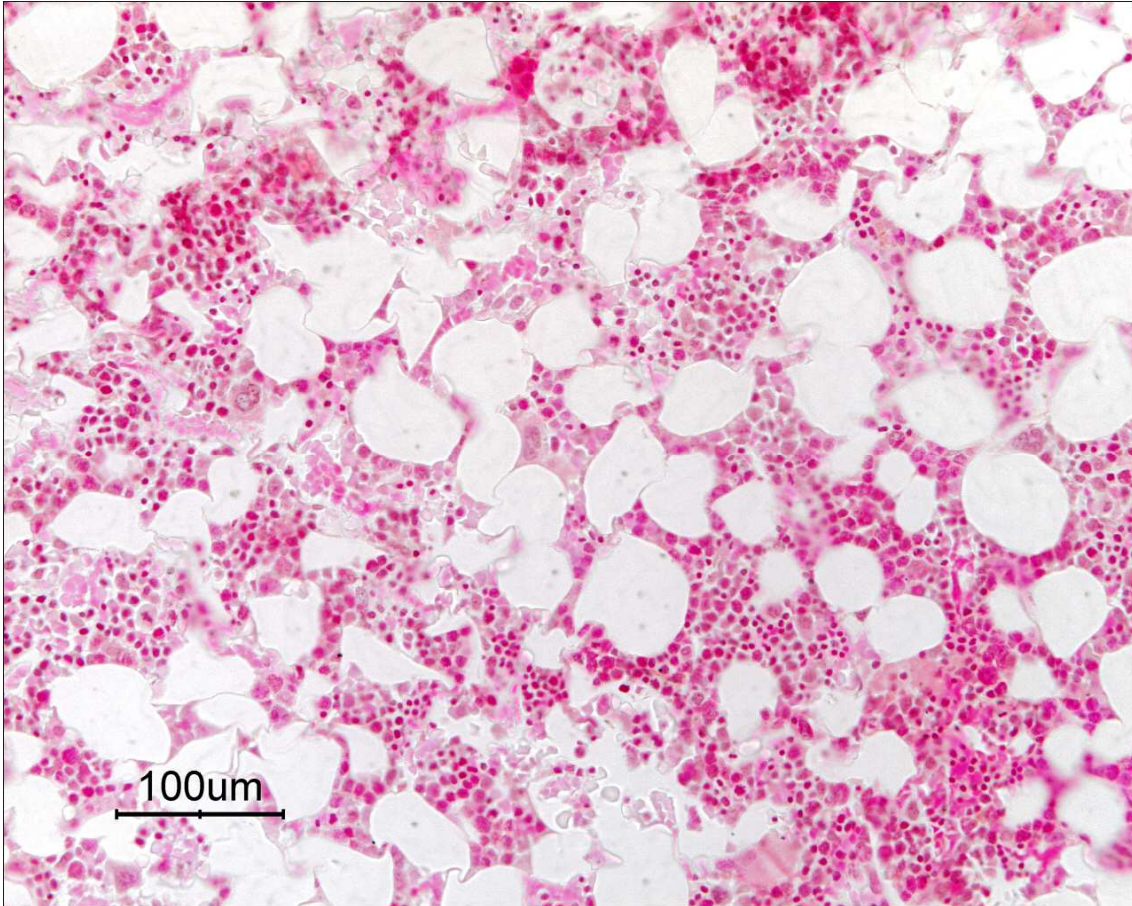


Figura IV.49. Respuesta histológica al cemento del Grupo II a las 4 semanas de la implantación. Medula ósea (TG; 200X).

Transcurridas 8 semanas, la médula ósea se conserva, a pesar de que en algunas muestras es escasa, y se mantienen tanto los fenómenos de reacción de cuerpo extraño, con presencia de células multinucleadas (Figura IV.50), como los procesos de fibrosis reactiva en torno al cemento implantado (Figura IV.51).

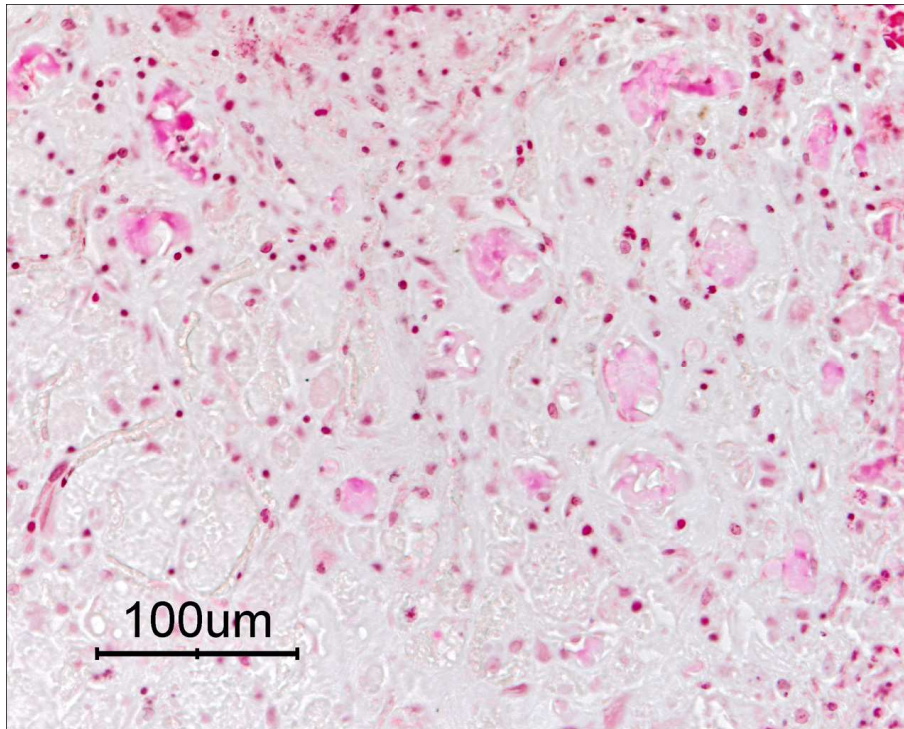


Figura IV.50. Focos de reacción de cuerpo extraño con presencia de células multinucleadas. Grupo II a las 8 semanas de la implantación (TG; 200X).

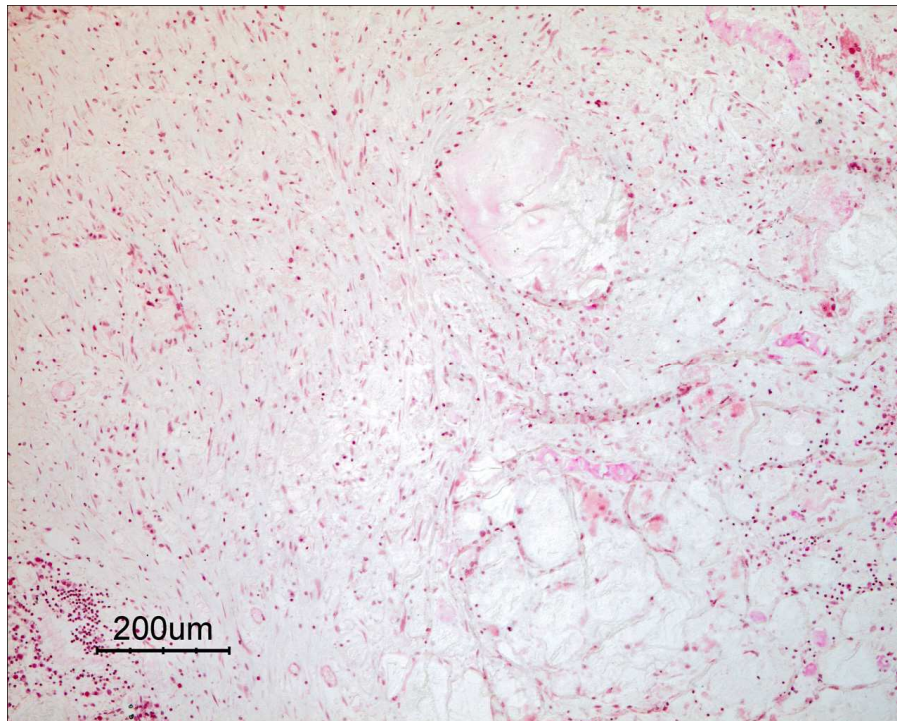


Figura IV.51. Micrografía (TG; 100X) correspondiente al cemento del Grupo II a las 8 semanas de la implantación, en la que se observan amplias zonas de fibrosis, junto con restos del material implantado y pequeños focos de células hematopoyéticas.

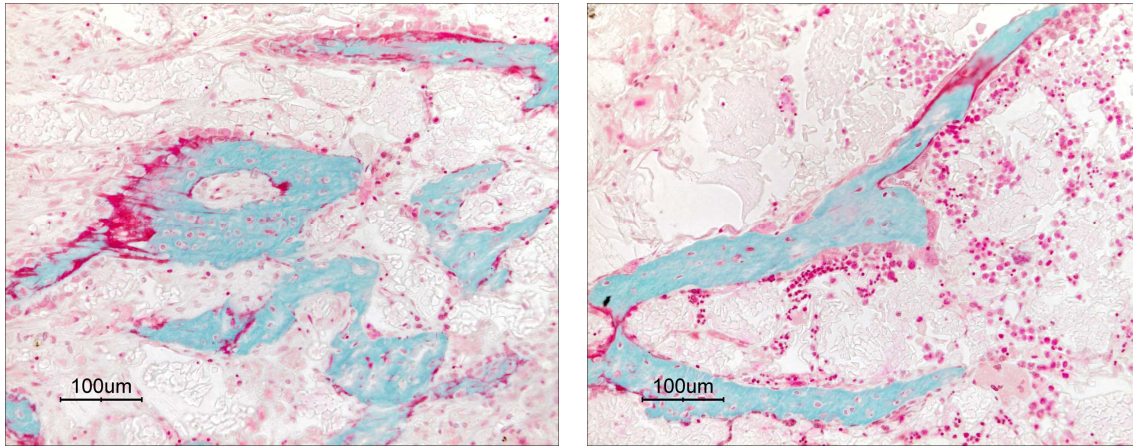


Figura IV.52. Micrografías (TG; 200X) correspondientes al cemento del Grupo II a las 8 semanas de la implantación en las que se observan espículas óseas activas rodeadas del material implantado.

Así mismo, para el cemento del Grupo II, cemento que incorpora un 20% de MVE, tras 8 semanas de la implantación se detecta la neoformación de espículas óseas, mostrada en la Figura IV.52, con hiperplasia e hipertrofia de osteocitos, y presencia de osteoblastos y osteoclastos (Figura IV.53), lo que indica que la remodelación ósea se mantiene activa en estas muestras.

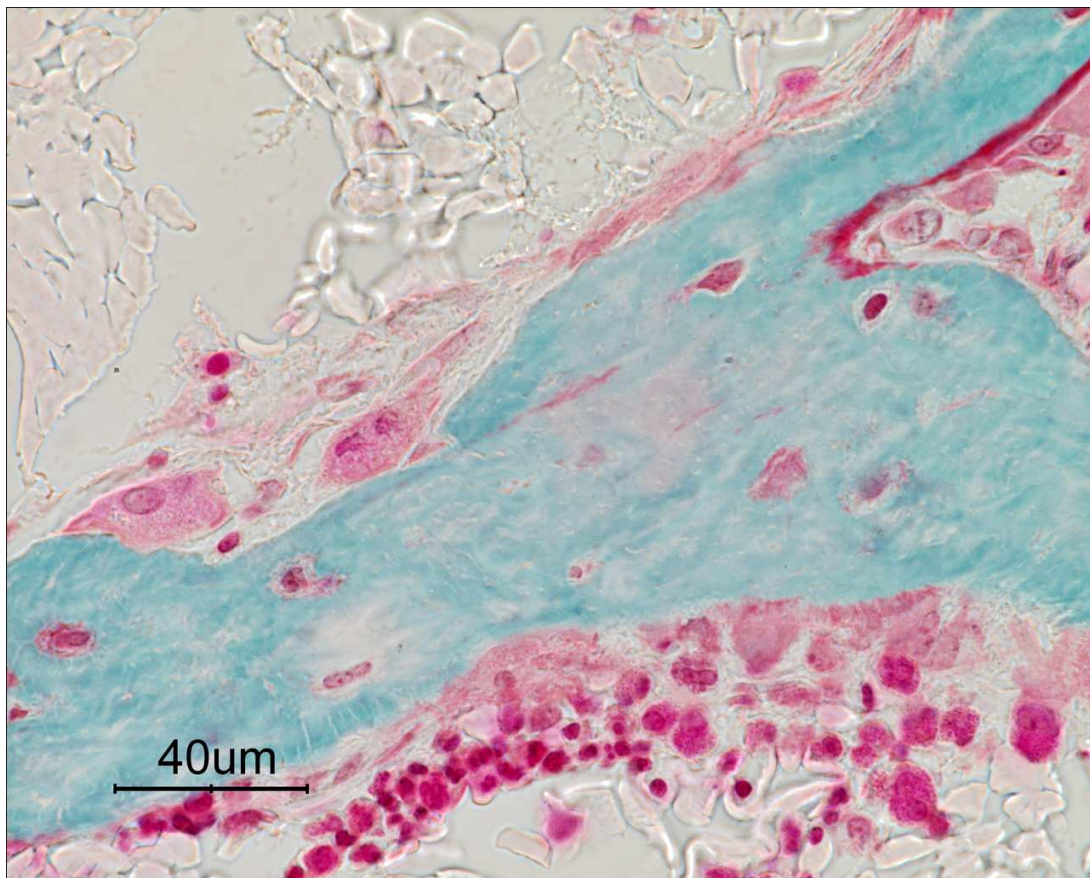


Figura IV.53. Detalle de una espícula ósea activa rodeada de restos del cemento del Grupo II a las 8 semanas de ser implantado (TG; 600X).

A las 24 semanas de la implantación, se mantienen los fenómenos de osteogénesis, mientras que el material implantado se conserva, si bien éste se encuentra, en su mayor parte, aislado por tejido fibroso (Figura IV.54).

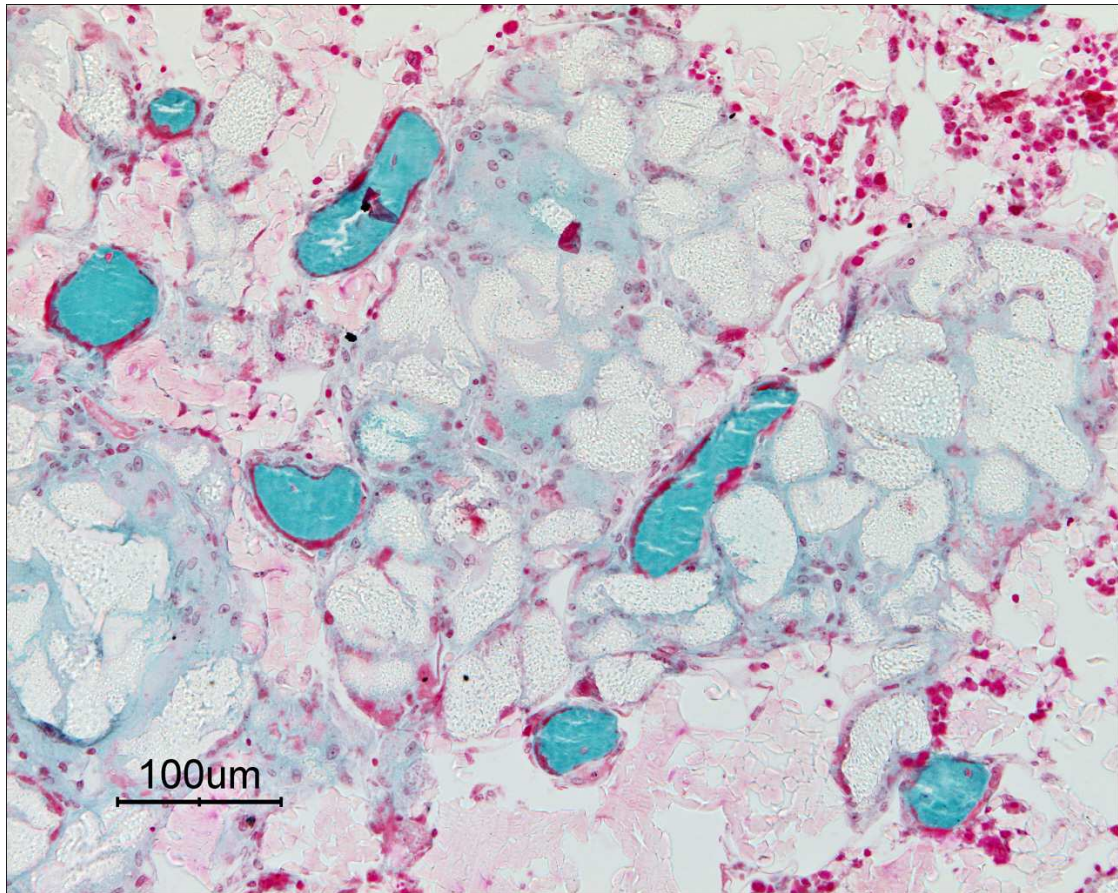


Figura IV.54. Micrografía en la que se observa el cemento del Grupo II tras 24 semanas de ser implantado, englobado por bandas fibrosas, junto con espículas óseas activas (TG; 200X).

Tras 24 semanas, los fenómenos de reacción de cuerpo extraño son menos evidentes, lo que se relaciona con el incremento en el aislamiento del material por parte del tejido fibroso. Adicionalmente, se aprecia una respuesta de regeneración hematopoyética de carácter difuso (Figura IV.55).

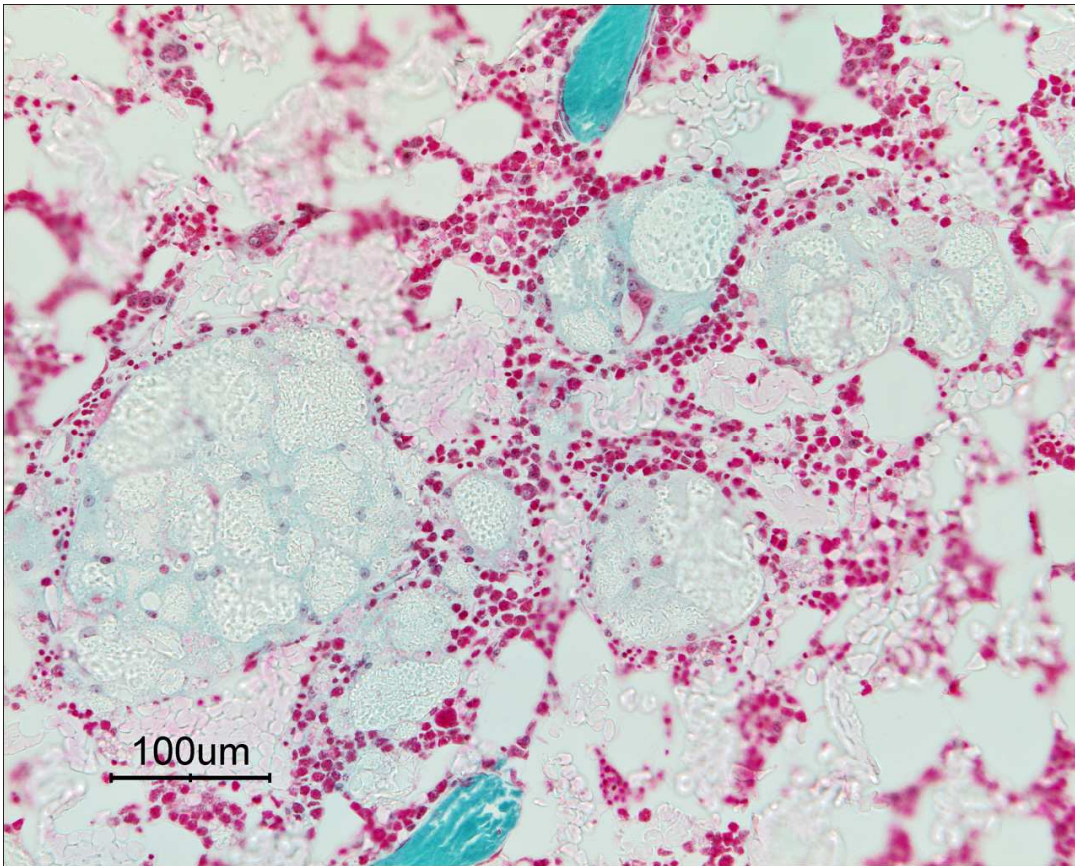


Figura IV.55. Micrografía en la que se observan focos de regeneración hematopoyética, mientras que el cemento implantado aparece encapsulado (TG; 200X). Grupo II a las 24 semanas de la implantación.

IV.3.2.3. Grupo III

Las muestras del cemento experimental Grupo III analizadas tras 2 semanas de tratamiento exhiben una acusada reacción de cuerpo extraño, con numerosas células multinucleadas, asociada además a procesos de fibrosis reactiva (Figura IV.56).

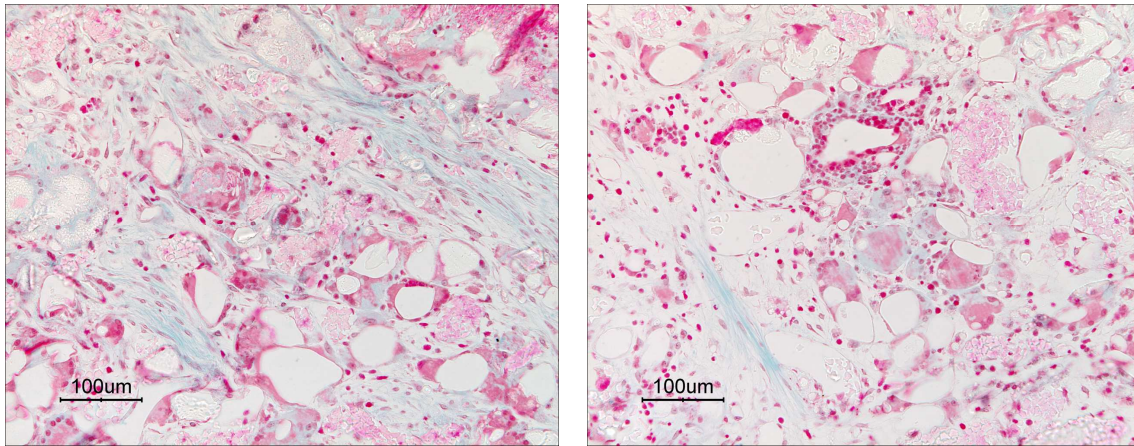


Figura IV.56. Micrografías en las que se observan tanto fenómenos de fibrosis reactiva como reacción de cuerpo extraño, con presencia de células multinucleadas, frente al cemento del Grupo III a las 2 semanas de ser implantado (TG; 200X).

Junto con lo descrito anteriormente, cabe destacar la aparición de importantes áreas de necrosis (Figura IV.57 izquierda) y, ocasionalmente, de pequeños focos de calcificación distrófica encapsulados por tejido fibroso (Figura IV.57 derecha).

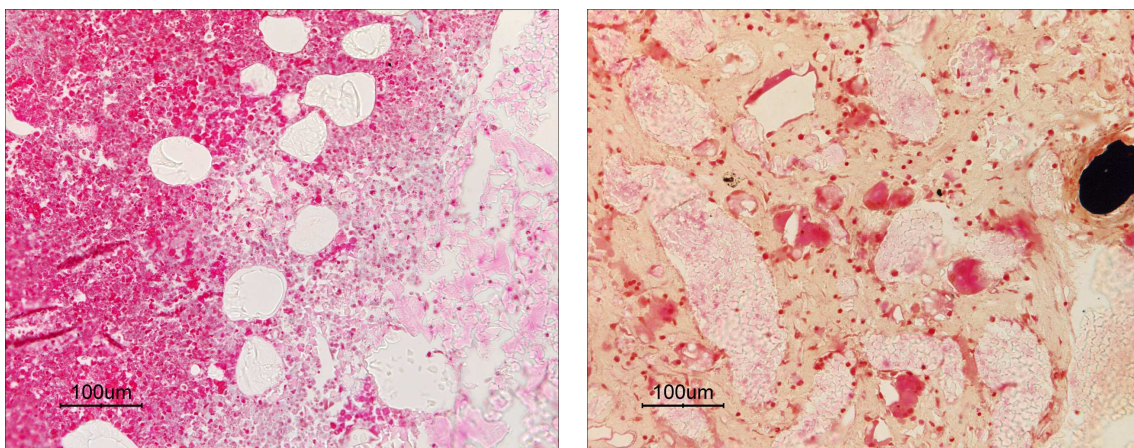


Figura IV.57. Foco de necrosis asociado al cemento del Grupo III tras 2 semanas de ser implantado (izquierda, TG; 200X). Reacción de cuerpo extraño, fibrosis y foco de calcificación distrófica (derecha, VK; 200X).

Los fenómenos de osteogénesis son, en este caso, muy poco evidentes, por contra predominan los procesos reactivos de cuerpo extraño.

Transcurridas 4 semanas desde la implantación del cemento, persisten tanto los fenómenos de fibrosis que aíslan acúmulos de este material (los tractos fibrosos se han engrosado con respecto al periodo anterior), como los fenómenos de reacción de cuerpo extraño con presencia de células multinucleadas (Figura IV.58).

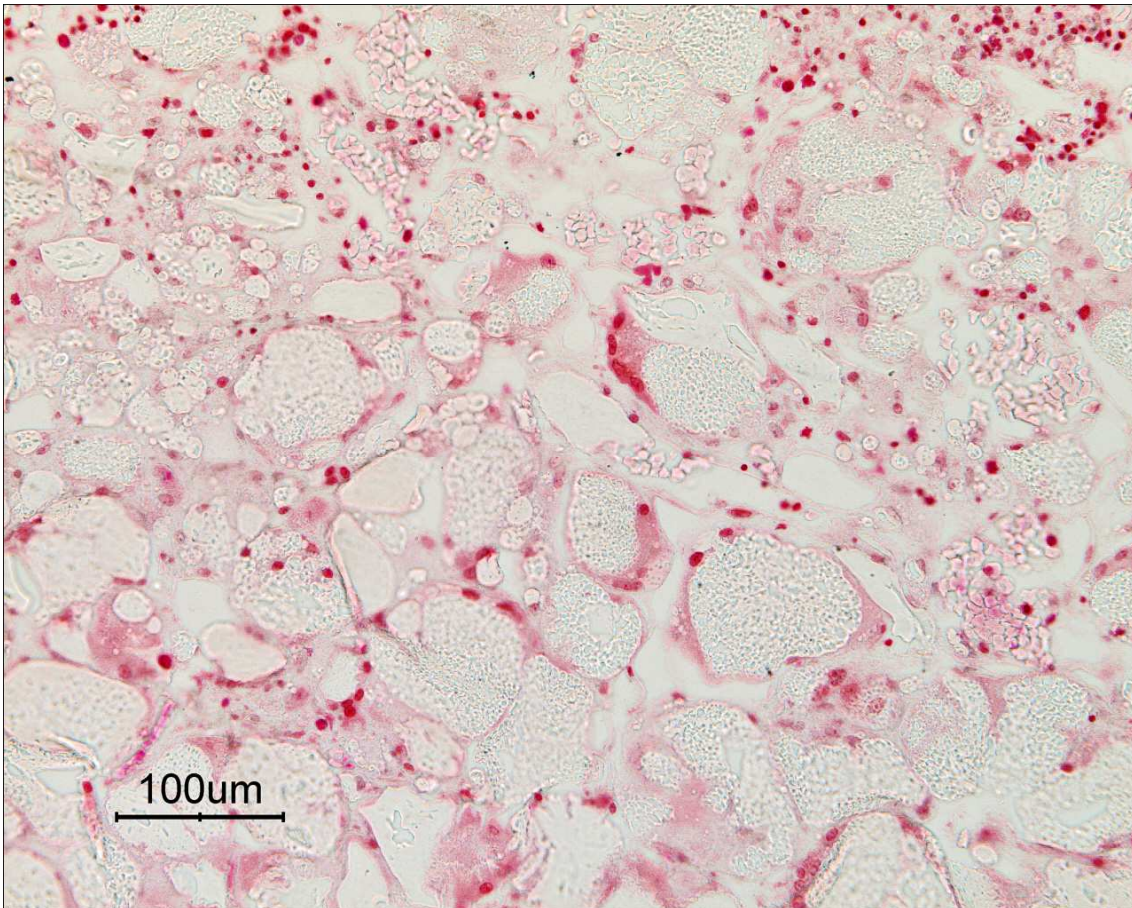


Figura IV.58. Respuesta histológica al cemento del Grupo III a las 4 semanas de la implantación. Procesos de fibrosis y reacción de cuerpo extraño con presencia de células multinucleadas (VK; 200X).

Por otra parte, en distintas muestras se localizan focos de hematopoyesis irregularmente repartidos (Figura IV.59).

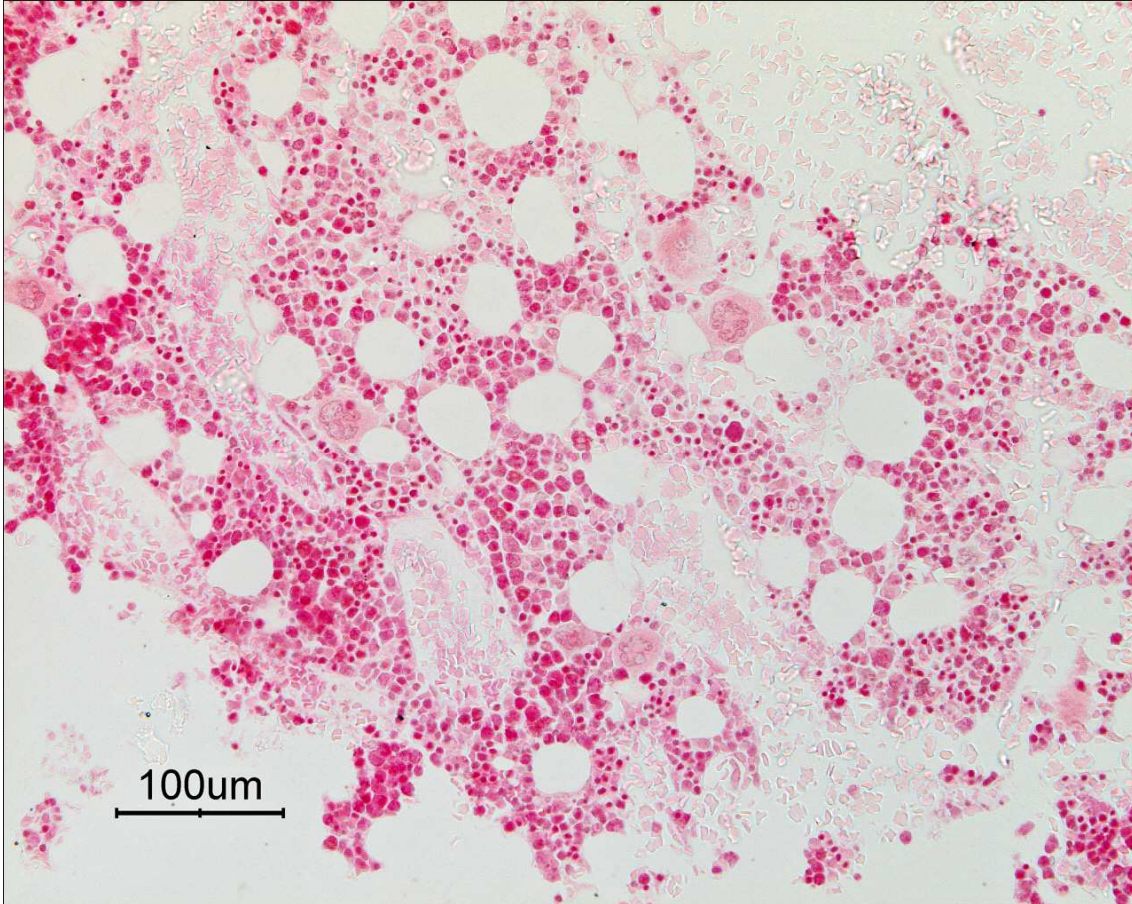


Figura IV.59. Área en la que la médula ósea se encuentra en perfectas condiciones rodeada por el cemento del Grupo III a las 4 semanas de ser implantado (TG; 200X).

A las 8 semanas de tratamiento, junto con una notable reacción de cuerpo extraño, destaca la aparición de bandas de fibrosis que separan acúmulos del material (Figura IV.60 izquierda). Además, cabe reseñar la aparición de fenómenos de angiogénesis (Figura IV.60 derecha), entre los que también se observan elementos fibroblásticos.

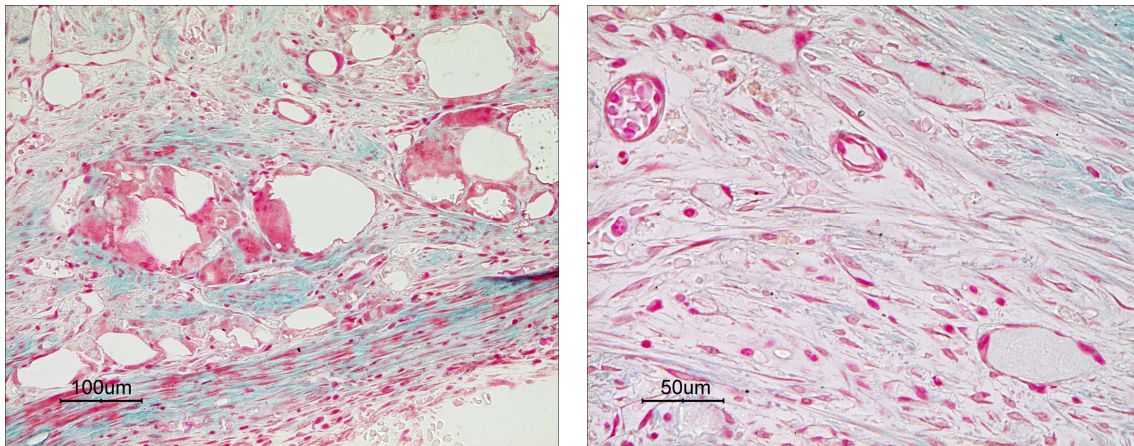


Figura IV.60. Junto con áreas de reacción de cuerpo extraño (células multinucleadas) se observan gruesas bandas fibrosas englobando restos del cemento del Grupo III tras 8 semanas de su implantación (izquierda, TG; 200X). Angiogénesis (derecha, TG; 400X).

Por otra parte, cabe destacar que en numerosas espículas óseas se observan osteocitos, aunque no en todas. Siendo los indicadores de osteogénesis en muchos casos poco marcados, a pesar de que existen (Figura IV.61).

La aplicación de la técnica de Von Kossa ha permitido localizar depósitos cálcicos irregulares, unas veces de aspecto pulverulento (Figura IV.62 izquierda) y otras en acúmulos asociados a fibrosis (Figura IV.62 derecha), típicos de la calcificación distrófica y probablemente asociados a focos de micronecrosis (Figura IV.63).

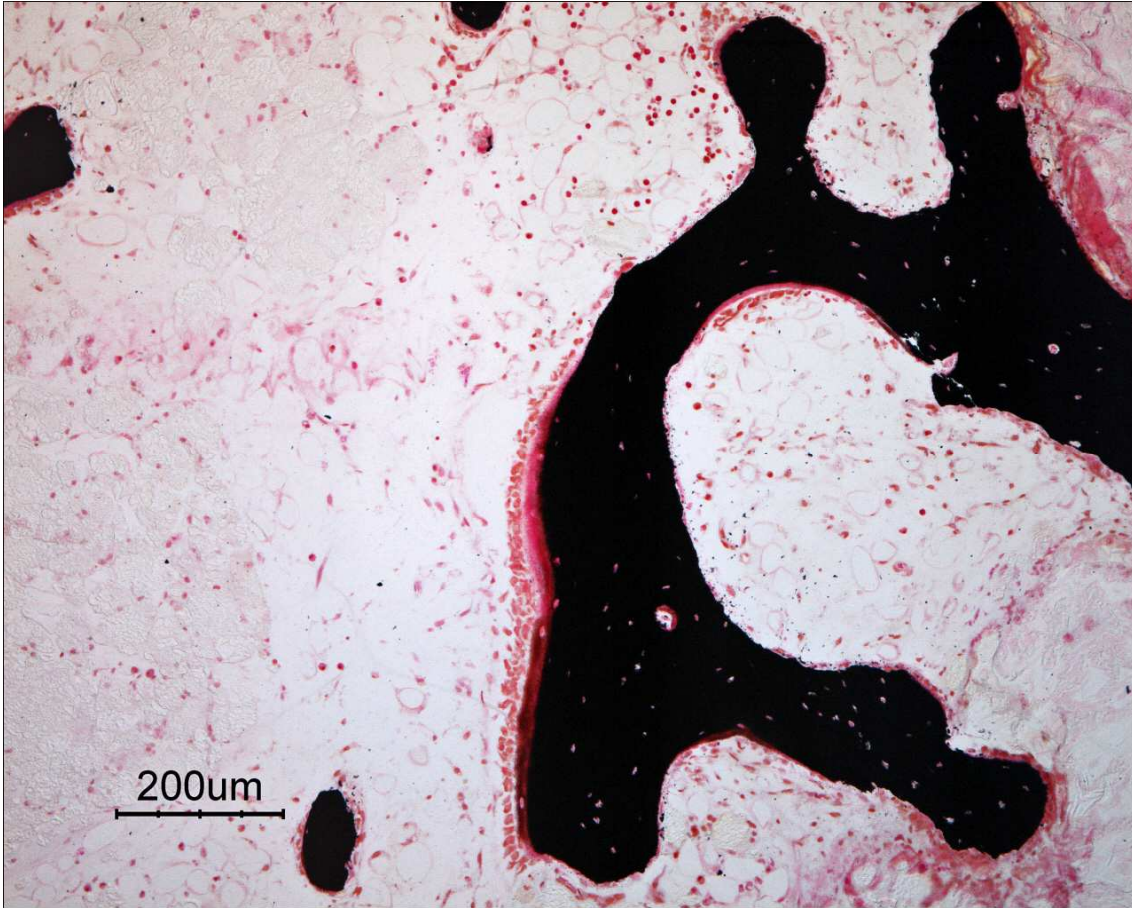


Figura IV.61. Micrografía en la que además de restos del cemento del Grupo III a las 8 semanas de su implantación, se observa una espícula ósea con osteocitos y frentes osteoblásticos activos (VK; 100X).

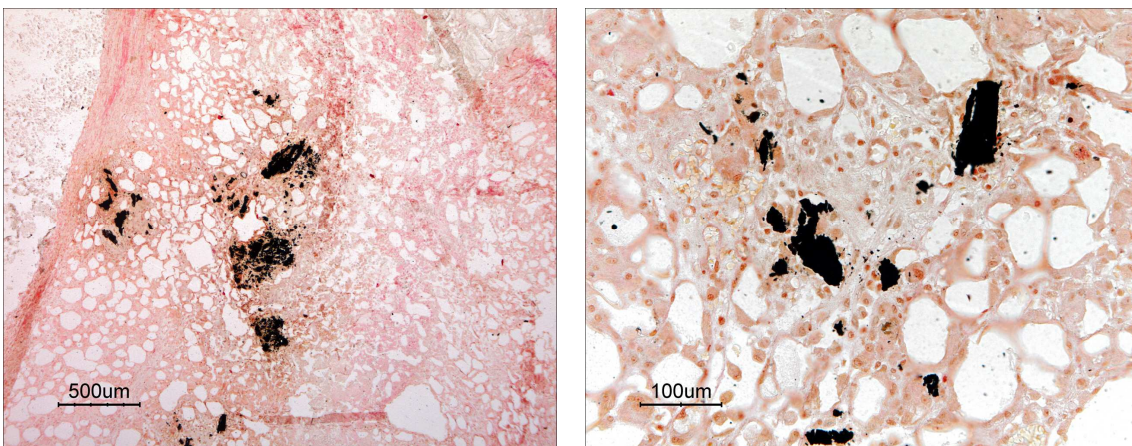


Figura IV.62. Respuesta del Grupo III a las 8 semanas. Calcificación distrófica (VK; derecha 40X, izquierda 200X).

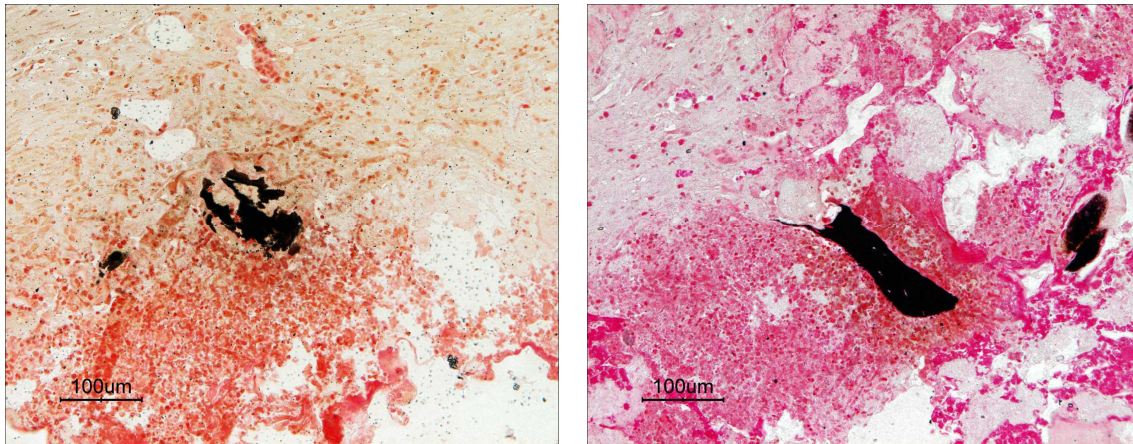


Figura IV.63. Respuesta del Grupo III a las 8 semanas. Ejemplos de calcificación distrófica asociada a fenómenos de micronecrosis (VK; 200X).

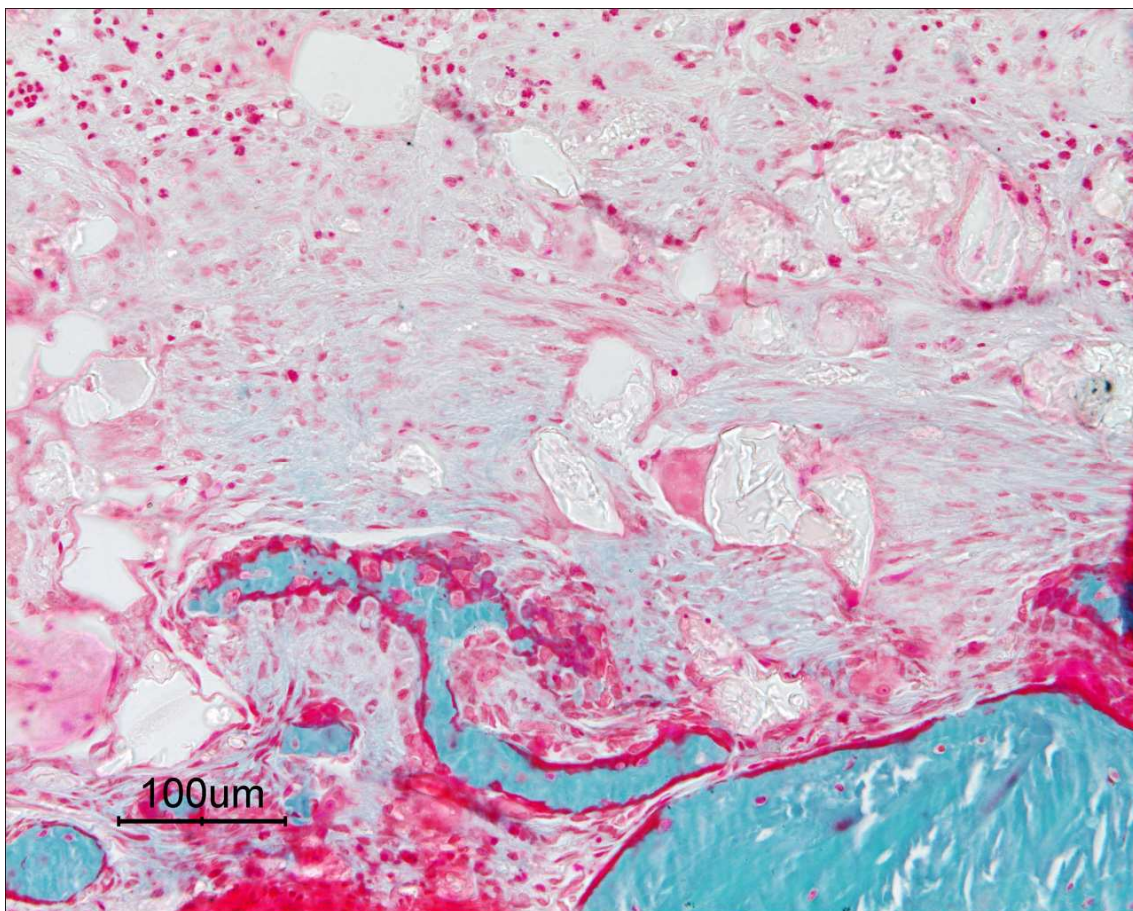


Figura IV.64. Micrografía en la que, además de áreas de fibrosis y focos de reacción de cuerpo extraño frente al material implantado, se observan espículas óseas activas tras 8 semanas de la implantación del cemento del Grupo III (TG; 200X)

En el conjunto de muestras analizadas los focos hematopoyéticos han sido escasos (atrofia hematopoyética), si bien en algunas de ellas, junto con fenómenos reactivos de fibrosis y de cuerpo extraño, se han localizado espículas óseas activas indicadoras del mantenimiento de la actividad osteoregeneradora (Figura IV.64).

Completadas las 24 semanas de tratamiento, la mayoría de las características ya comentadas se conservan, si bien se detecta una sustitución lipo-fibrótica de la médula ósea. En relación al material se observa que los fenómenos de reacción de cuerpo extraño se conservan (Figura IV.65).

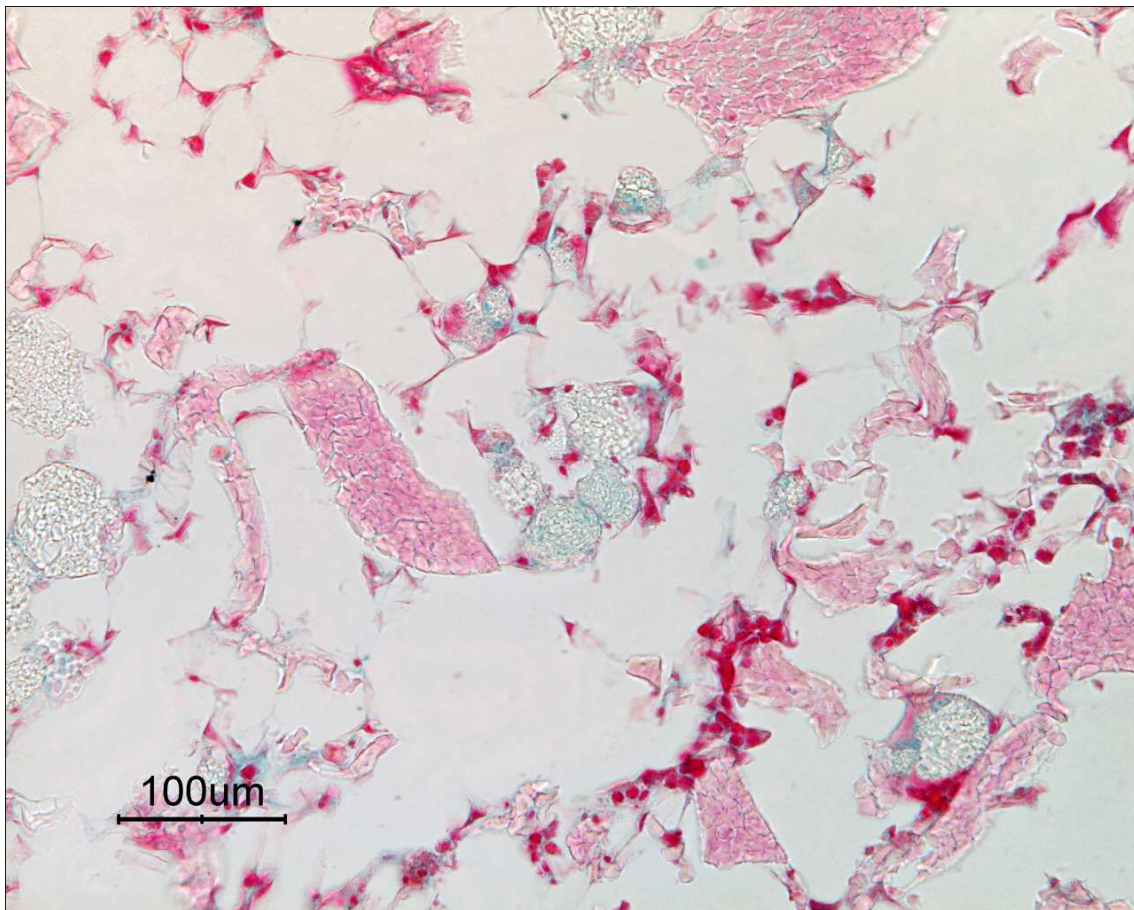


Figura IV.65. Respuesta histológica al cemento del Grupo III transcurridas 24 semanas desde su implantación (TG; 200X).

IV.3.2.4. Grupo IV

Las muestras del Grupo IV analizadas tras 2 semanas muestran una intensa reacción inicial de cuerpo extraño asociada a fibrosis, a pesar de lo cual conservan la respuesta osteogénica en las espículas óseas (Figura IV.66).

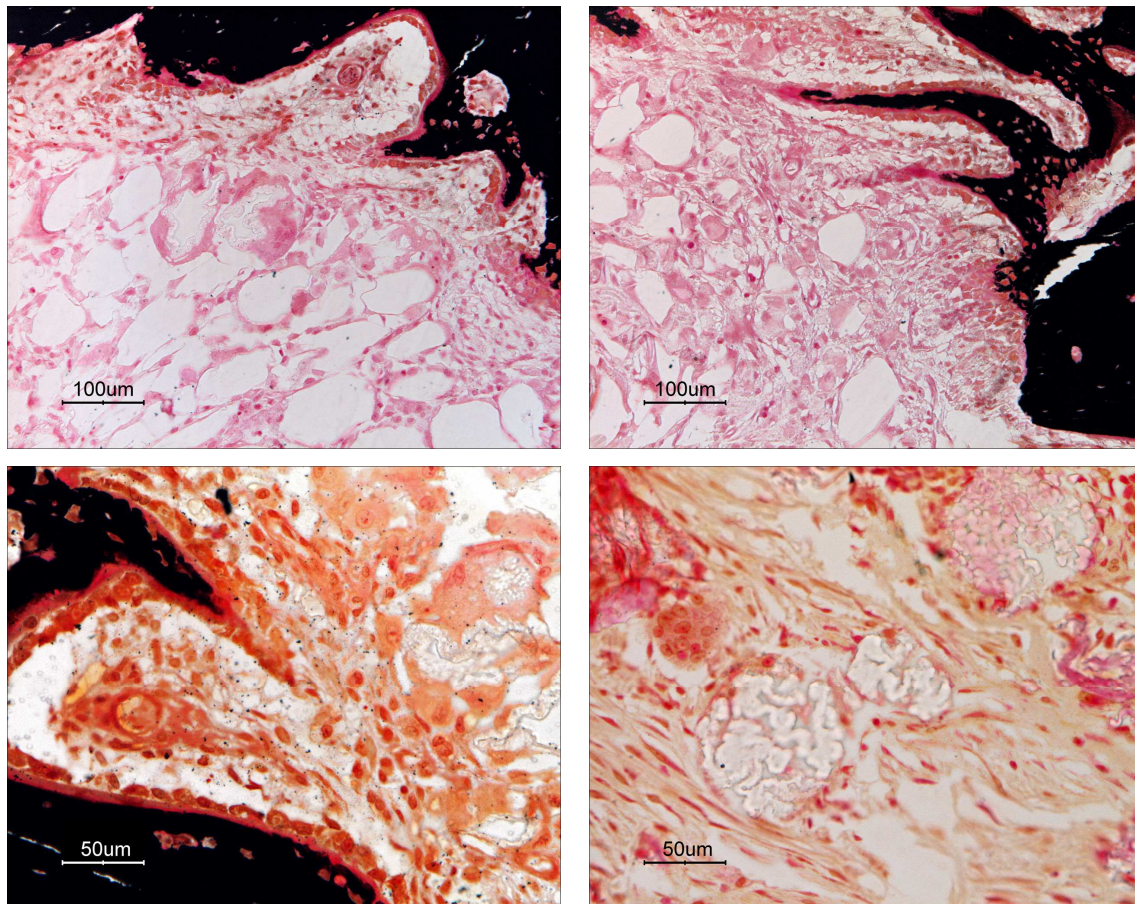


Figura IV.66. Fibrosis reactiva y reacción de cuerpo extraño, con presencia de células multinucleadas, en diferentes muestras del Grupo IV tras 2 semanas de la implantación. En los campos donde aparecen espículas óseas se aprecia que éstas conservan su actividad osteogénica (VK; arriba, 200X; abajo, 400X).

Transcurridas 4 semanas, las características descritas anteriormente se conservan, si bien los fenómenos de fibrosis son más acusados. Además se han localizado numerosos focos de necrosis (Figura IV.67).

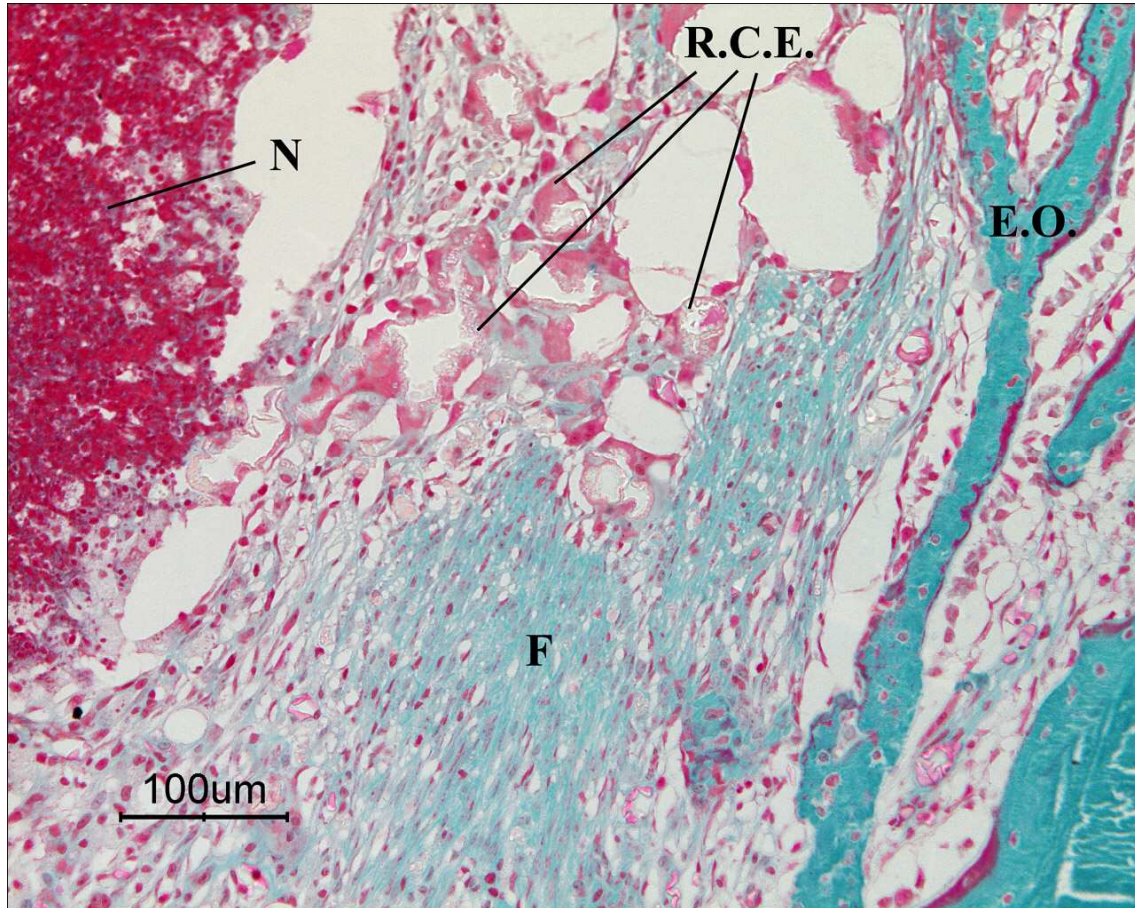


Figura IV.67. Muestra en la que se observan áreas de necrosis (N), fibrosis (F) y reacción de cuerpo extraño (R.C.E.) en respuesta al cemento del Grupo IV a las 4 semanas de ser implantado, así como espículas óseas activas (E.O.), en las que pueden distinguirse osteocitos, osteoblastos y osteoclastos (TG; 200X).

Tras 8 semanas se mantiene la misma situación (Figura IV.68), encontrándose además en algunas muestras núcleos sugestivos de calcificación distrófica.

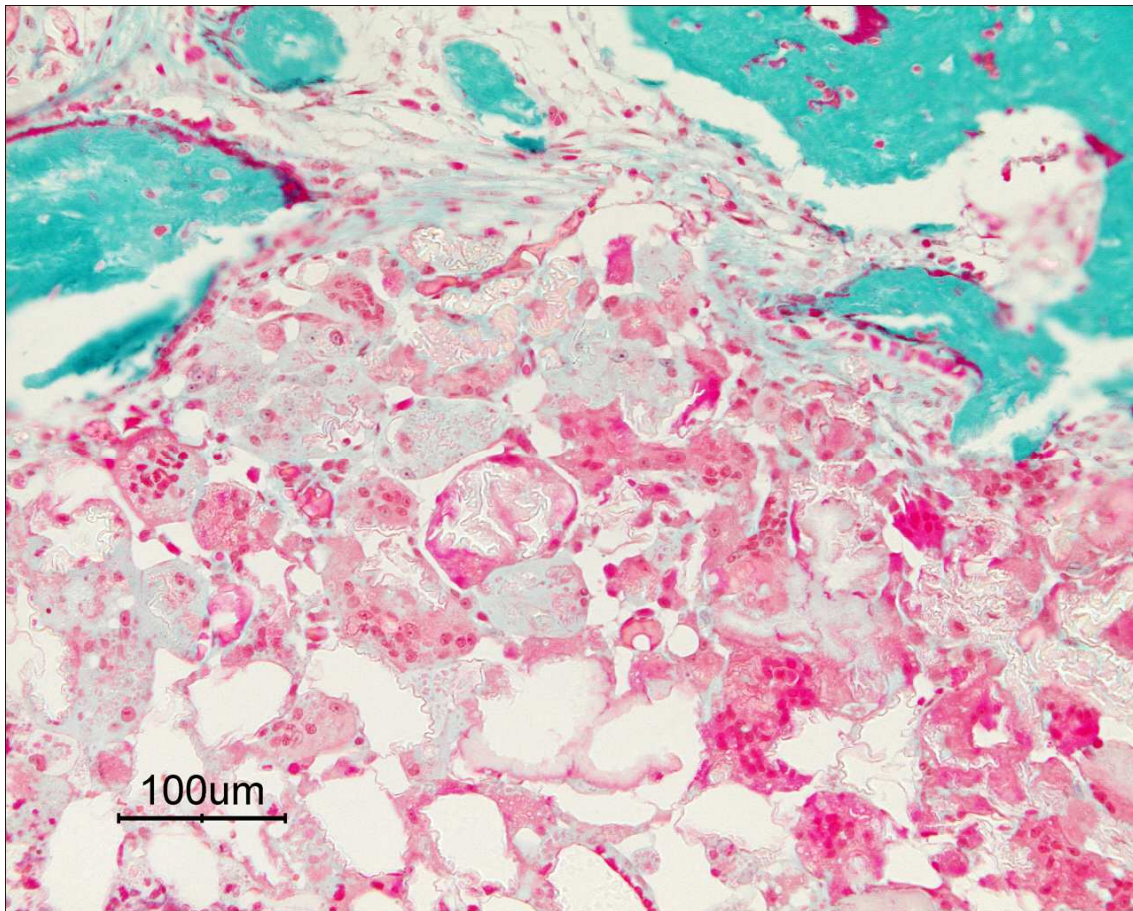


Figura IV.68. Muestra en la que se observan áreas de fibrosis y reacción de cuerpo extraño en respuesta al cemento del Grupo IV tras 8 semanas de ser implantado, así como espículas óseas activas (TG; 200X).

Una vez completadas las 24 semanas de tratamiento se mantienen las respuestas comentadas anteriormente, en especial los procesos de fibrosis (Figura IV.69 derecha), detectándose además los primeros focos de hematopoyesis asociados a la disminución de la reacción de cuerpo extraño, que es menos intensa a la vista hasta este momento en este grupo experimental (Figura IV.69 izquierda).

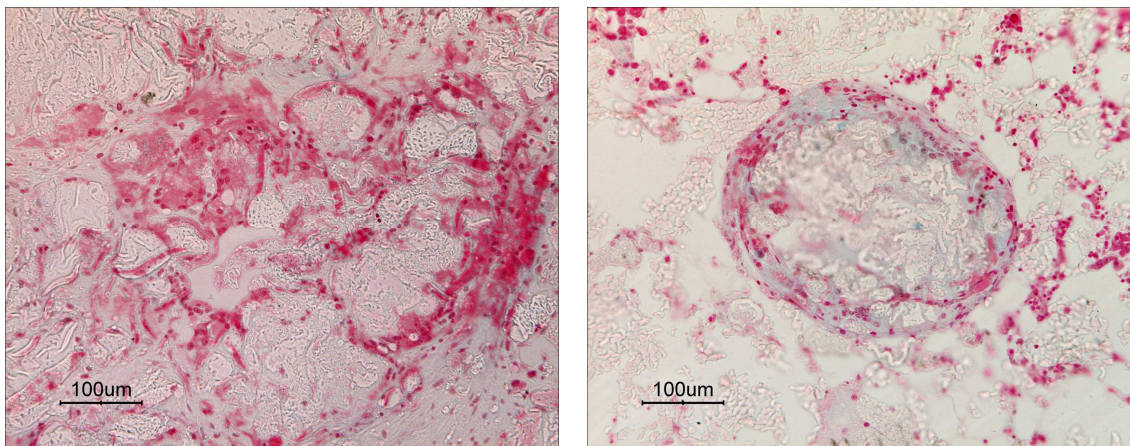


Figura IV.69. Fenómenos de reacción de cuerpo extraño y encapsulamiento fibroso observados en muestras del Grupo IV transcurridas 24 semanas desde su implantación (TG; 200X).

IV. 4. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Taninger M, Pasquini R, Bonatti S. Genotoxicity analysis of N,N-dimethylaniline and N,N-dimethyl-p-toluidine 1993;21:349-356.
- ² ISO Specification 5833. Standard specification for implants in surgery-acrylic resin. 1992.
- ³ ISO. Versión Oficial en Español de la Norma Internacional, ISO-10993/5:1997. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. Norma Española 1998.
- ⁴ ISO Specification 10993-6:1994. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation. 1994.
- ⁵ De la Torre B, Fernández M, Vázquez B, Collía F, de Pedro JA, López-Bravo A, San Román J. Biocompatibility and other properties of acrylic bone cements prepared with antiseptic activators. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 2003;66B:502-513.

V. DISCUSIÓN

El cemento óseo de poli(metacrilato de metilo) ha sido ampliamente utilizado en el sector sanitario en aplicaciones tales como relleno de defectos óseos, fijación de prótesis articulares o como sustituto óseo en la reparación craneomaxilofacial y odontológica. El fraguado del cemento tiene lugar *in situ* mediante la polimerización radical del monómero metacrilato de metilo en presencia de una cierta cantidad de polimetacrilato de metilo polvo, previamente polimerizado.¹ La reacción de polimerización se inicia a temperatura ambiente por reacción redox entre el iniciador, peróxido de benzoílo, y el activador, N,N-dimetil-4-toluidina, en la que se originan los radicales libres que actuarán sobre las moléculas de monómero para dar lugar a la matriz polimerizada de polimetacrilato de metilo. La desaparición de los radicales libres del cemento, una vez que la reacción de polimerización ha terminado, es un proceso que puede durar varias semanas^{2,3} y puede tener efectos citotóxicos adversos. Es sabido que los radicales libres se encuentran implicados en muchas enfermedades debido a su gran reactividad hacia las células y tejidos.⁴ En el caso de las operaciones de fijación de prótesis de cadera cementadas, se ha relacionado un cierto número de fracasos a largo plazo, con la resorción inducida por reacciones de carácter citotóxico o inflamatorio, que conduce al aflojamiento de la prótesis en la interfaz cemento/hueso.⁵ Así mismo, algunos estudios sobre la biocompatibilidad de los cementos óseos han puesto de manifiesto posibles efectos genotóxicos potencialmente inflamatorios⁶ atribuidos a alguno de los ingredientes del cemento.^{7,8,9,10}

La vitamina E es un antioxidante biológico de origen natural que impide la acumulación de peróxidos y protege a las células de los efectos dañinos provocados por los radicales libres. Esta vitamina asegura la estabilidad e integridad de las membranas biológicas.¹¹ La vitamina E también se ha descrito como un agente antiinflamatorio¹² aunque se necesitan periodos de investigación más prolongados para confirmar estos hallazgos. La capacidad antioxidante biológica de la vitamina E ha sido investigada *in vivo* mediante inyección intraperitoneal en ratas, y se ha concluido que esta vitamina juega un papel importante como antioxidante y como anticarcinogénico.¹³ Con relación a los efectos de la vitamina E en el cartílago y tejido óseo, se ha demostrado que

la vitamina E protege contra la peroxidación lipídica celular en el cartílago manteniendo el crecimiento óseo con normalidad.¹⁴ En este sentido, algunos experimentos *in vivo* han encontrado un efecto osteoprotector de la vitamina E.¹⁵

Con el fin de contrarrestar los efectos adversos producidos por los radicales libres del cemento, en este trabajo se preparan cementos acrílicos a los que se incorpora vitamina E previamente funcionalizada con un grupo metacrílico (MVE). Este derivado de la vitamina E es susceptible de participar en la reacción de polimerización durante el fraguado del cemento dando lugar a una matriz de carácter copolimérico (Grupos II a IV). El contenido de monómero MVE que se adiciona al cemento se establece a partir de los resultados obtenidos en estudios anteriores¹⁶ donde se prepararon formulaciones de cemento utilizando un intervalo de concentración de MVE comprendido entre 10% y 25%-p. Este estudio puso de manifiesto que concentraciones de MVE del 15-20%-p proporcionaban una mejora de los parámetros de curado y un aumento de la biocompatibilidad del cemento *in vitro*, sin comprometer las propiedades mecánicas.

En dos de las formulaciones (Grupos III y IV) se ha introducido además del MVE un agente de entrecruzamiento, el dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA) que se caracteriza por poseer en su estructura dos grupos acrílicos susceptibles de participar en la reacción de polimerización lo que dará lugar a la obtención de materiales entrecruzados, al reaccionar el TEGDMA con los monómeros acrílicos MMA y MVE. La molécula de TEGDMA posee tres grupos oxietilénicos que dotará al sistema de una cierta hidrofilia. La cantidad de agente introducida se establece en base a resultados anteriores obtenidos de la modificación de cementos óseos de PMMA con dimetacrilato de etilenglicol de diferente longitud de cadena.¹⁷ La incorporación de agentes de entrecruzamiento a las resinas dentales a base de polimetacrilato de metilo se introdujo con el fin de obtener una mejora en alguna de las propiedades químicas y físicas de las mismas.¹⁸ Así mismo, el TEGDMA es un monómero muy utilizado en la formulación de resinas dentales en base al metacrilato de diglicidiléter de bisfenol A (Bis-GMA) donde actúa como diluyente, debido a la

alta viscosidad que proporciona el monómero Bis-GMA.^{19,20} Estudios realizados sobre la incorporación de diferentes agentes de entrecruzamiento a este tipo de resinas han demostrado que es el TEGDMA el que mejores propiedades aporta²¹ ya que las resinas basadas en dimetacrilatos del tipo Bis-GMA se caracterizan por sufrir un tipo de rotura frágil cuando son sometidas a altas tensiones.²²

En la formulación del Grupo IV se ha introducido un fármaco de la familia de los bisfosfonatos. Los bisfosfonatos son compuestos que poseen una estructura química similar a la del pirofosfato inorgánico, regulador endógeno de la mineralización ósea²³ pero que se componen de dos grupos fosfonato unidos por enlaces fosfoéter a un átomo de carbono central (geminal) dando la estructura P-C-P, muy resistente a la hidrólisis en condiciones ácidas o por pirofosfatasas. En este trabajo se ha elegido el alendronato por ser uno de los bisfosfonatos comerciales más utilizados clínicamente en el tratamiento de osteoporosis. Así, en el cemento del Grupo IV se evalúan los efectos de este medicamento cuando su liberación tiene lugar *in situ*.

Las formulaciones de los Grupos II a IV, que incorporan el monómero de la vitamina E, presentan temperaturas máximas que oscilan entre los 44 y 38° C, es decir notablemente inferiores a la obtenida con el Grupo control, cemento de poli(metacrilato de metilo) (66° C). Este descenso de la temperatura máxima es muy beneficioso, ya que se alcanzan valores por debajo de los 56° C, temperatura de coagulación de la albúmina.²⁴ La reducción de la temperatura con la introducción del MVE se debe principalmente a la presencia de un monómero de elevado peso molecular. Como la cantidad de calor liberado depende del peso de monómero reaccionante, la presencia de MVE modifica notablemente el calor de polimerización en Julios/gramo con respecto al producido por MMA puro, ya que la relación de pesos moleculares de los monómeros MVE/MMA es 4,96. La reducción de la exoterma de la polimerización cuando se introducen en la misma monómeros de elevado peso molecular se encuentra ampliamente documentada en la literatura.^{25,26}

Los valores del tiempo de fraguado de los cementos experimentales se encuentran entre 24 y 30 minutos, siendo superiores al tiempo de fraguado del cemento control. La incorporación del monómero tetrafuncional proporciona un ligero aumento de la temperatura pico (Grupos III y IV) y un acortamiento del tiempo de fraguado como consecuencia de que este monómero aporta dos dobles enlaces por molécula. En cualquier caso, los valores del tiempo de fraguado pueden ser ajustados al trabajar con la dosis completa de cemento y si es necesario se puede producir un acortamiento del mismo, aumentando la temperatura durante el mezclado de los componentes en 2 ó 3° C. El tiempo de trabajo es un parámetro que no está descrito en las normas internacionales, pero que resulta valioso desde un punto de vista práctico a la hora de evaluar el tiempo de manipulación del cemento. Este parámetro se obtiene de la diferencia entre el tiempo de fraguado y el tiempo del estado pastoso. Los cementos experimentales presentan un aumento del tiempo de trabajo con relación al control, lo que puede ser muy interesante a la hora de utilizar este tipo de formulaciones en aplicaciones donde se requiera la inyección del cemento en lugares poco accesibles, como es el caso de las vertebroplastias y cifoplastias percutáneas.

La cantidad de monómero residual se analiza por gravimetría debido a la obtención de cementos entrecruzados, por extracción de las especies de bajo peso molecular en un fluido adecuado. La cantidad de residuos presente en cualquiera de las formulaciones es inferior al 3%-p, valores que se consideran dentro de los aceptados para formulaciones comerciales de cementos óseos acrílicos.²⁷ Estos valores indican que la reacción de polimerización alcanza conversiones elevadas en todos los cementos experimentales (Grupos II a IV) a pesar de los largos tiempos de curado obtenidos en estos casos. El análisis de los extractos por Resonancia Magnética Nuclear pone de manifiesto diferencias entre las especies encontradas en los diferentes grupos, como es de esperar debido a su diferente composición. El monómero residual de los cementos de los Grupos I y II es MMA mientras que los cementos de los Grupos III y IV contienen además de MMA tanto TEGDMA y MVE como monómeros residuales, y los monómeros se encuentran en una relación molar MVE/TEGDMA/MMA

1/0.27/0.06. Cuando la fase polimerizable contiene los dos monómeros MMA y MVE, debido a la parecida reactividad de estos dos metacrilatos, el MVE, que se encuentra como componente minoritario, reacciona en su totalidad, quedando como monómero residual el MMA, una vez que se ha alcanzado la vitrificación del cemento, igualmente a lo que acontece en la formulación control. Sin embargo, cuando la fase polimerizable contiene MMA, MVE y TEGDMA, la heterogeneidad del sistema debida a la presencia de monómeros de muy diferente polaridad, hace que durante la reacción de polimerización se pueda producir una segregación del monómero de MVE, quedando también como monómero residual. En cuanto a la conversión de los dimetacrilatos se sabe que es baja comparada con los monometacrilatos debido a que la vitrificación comienza más pronto como consecuencia de la formación del entrecruzamiento. Otro factor que limita la conversión de los dimetacrilatos es que los grupos metacrilatos sin reaccionar que quedan colgando en las moléculas del dimetacrilato no pueden difundirse por estar unidos a la cadena polimérica y sólo pueden reaccionar si un radical se aproxima al lugar. Loshaek y Fox²⁸ estudiaron la eficacia de entrecruzamiento en copolímeros de MMA y dimetacrilatos de etilenglicol preparados por vía radical térmicamente, determinando las insaturaciones residuales y mostraron que la restricción impuesta durante la polimerización por una red de poli(metacrilato de metilo) sobre la disponibilidad de los grupos vinílicos colgantes del agente de entrecruzamiento para reaccionar, hace que la reacción de entrecruzamiento no llegue a completarse y origina un aumento del material intersticial no reaccionado con la concentración de agente de entrecruzamiento que puede producir un efecto plastificante. Valores de monómero residual del orden del 6% se han publicado para una resina de curado en frío modificada con dimetacrilato de etilenglicol como agente de entrecruzamiento.²⁹

En cuanto a las propiedades mecánicas de los cementos evaluadas en ensayos de compresión, la resistencia a compresión no se ve alterada en las formulaciones de los cementos experimentales, ni con la introducción del MVE ni con la del agente de entrecruzamiento, ni con la presencia del alendronato. Por su parte, el módulo elástico no presenta diferencias significativas cuando se comparan los cementos de los Grupos I a III, pero se observa un descenso

significativo para el cemento del Grupo IV. Sin embargo en todos los casos el módulo de Young es superior a 1,2 GPa, es decir del mismo orden de magnitud que el que presentan los cementos comerciales de PMMA.²⁷ Algunos trabajos en la literatura han evaluado los efectos de incorporación de un bisfosfonato al cemento óseo de PMMA en las propiedades mecánicas. Los trabajos realizados por Healey y col³⁰ mostraron que la adición de 2 g de pamidronato a la fase sólida del cemento (5%-p/p) no produjo cambios significativos en los valores de resistencia a compresión. Sin embargo, en otros estudios se encontró que cuando se incorporaba pamidronato a la fase líquida del cemento comercial Palacos R[®] se producía una disminución significativa tanto del módulo en flexión como de la resistencia a la flexión.³¹ Se han comparado los efectos de la incorporación de alendronato al cemento óseo en forma de polvo o en líquido en las propiedades mecánicas, obteniéndose que la vida en fatiga del cemento no se ve afectada cuando éste se adiciona en forma de polvo, mientras que sí se ve reducida cuando se incorpora en un diluyente al componente líquido.³² Estudios posteriores han demostrado que la dilución aplicada a la fase líquida del cemento juega un papel muy importante en la magnitud de la pérdida de las propiedades mecánicas, no atribuible al propio medicamento.³³

Trabajos anteriores¹⁷ sobre la influencia de la estructura química y concentración del agente de entrecruzamiento en las propiedades de cementos óseos acrílicos de PMMA utilizando la serie de diferentes dimetacrilatos, dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), trietilenglicol (TEGDMA) y polietilenglicol ($M_n= 400$) (PEGDMA) revelaron que la resistencia a la tensión del cemento mejoraba con pequeñas concentraciones de cualquiera de los agentes. La concentración óptima para el TEGDMA fue del 10%-p con respecto a la fase líquida, que es la que se ha utilizado en este trabajo. Otros estudios³⁴ han propuesto la incorporación de agentes de entrecruzamiento al cemento radiopaco con la finalidad de paliar el deterioro de las propiedades mecánicas que produce la introducción del agente radiopaco sulfato de bario.³⁵ Se obtuvo que la adición de TEGDMA al cemento radiopaco proporcionaba un mantenimiento de las propiedades mecánicas con respecto a las del cemento

radiolúcido, indicando que la flexibilidad de los grupos oxietilénicos contrarrestan, de alguna manera, la rigidez de las partículas inorgánicas.

Otros investigadores han estudiado el efecto que produce la incorporación de diferentes agentes de entrecruzamiento en resinas de PMMA cubriendo un rango de longitud de cadena y flexibilidad.³⁶ En general se puede decir que la dureza no se ve afectada y la resistencia a la tensión mejora para un intervalo de concentración del agente. Concretamente cuando está presente el dimetacrilato de trietilenglicol en cantidades suficientes, los efectos de la plastificación tanto externa como interna pueden producir una considerable reducción en ciertas propiedades tal como módulo, tensión de rendimiento y dureza. Este efecto puede estar más localizado en determinadas áreas si la densidad de entrecruzamiento no es uniforme dentro de la estructura polimérica.³⁷ El grupo trietilenglicol (TEG) es una unidad de entrecruzamiento bastante flexible debido a la linealidad de la sección entrecruzante, que contiene enlaces éter. En compresión, la molécula de TEGDMA puede girar sobre su enlace éter y enrollarse bajo carga, impartiendo de esta manera flexibilidad al material.

La liberación *in vitro* del bisfosfonato del cemento del Grupo IV se ha estudiado paralelamente a la que se obtiene de un cemento de PMMA. Se observa un mayor “efecto estallido” en el cemento control de PMMA, con una liberación inicial del 16% en la primera media hora, mientras que para el cemento experimental el efecto estallido supone una liberación del 10% en el mismo tiempo. En periodos de tiempo posteriores los perfiles de liberación de ambos cementos se aproximan, llegándose a liberar el 60% y el 80% de alendronato (ALN) a las 48 y 96 horas, respectivamente en ambos casos. La velocidad de liberación global es mayor para el cemento del Grupo IV que para el cemento control, liberándose la totalidad del medicamento en un periodo de 12 días en el cemento del Grupo IV y en 22 días en el cemento control. Los trabajos publicados por Healey y col³⁰ mostraron que aproximadamente el 50% de pamidronato se liberaba *in vitro* de un cemento óseo acrílico en un tiempo aproximado de 72 horas, cuando este bisfosfonato se adicionaba a la fase

sólida del cemento, y que la liberación incluso se veía incrementada cuando en el cemento se encontraba presente un antibiótico, la doxorubicina.

Los perfiles grado de hidratación *versus* tiempo de inmersión correspondientes a estas dos formulaciones, Grupo IV y su control, alcanzan el equilibrio en un tiempo aproximado de 12 días de inmersión en solución de tampón fosfato, con valores de 1,5% en el equilibrio. Los perfiles de hinchamiento son muy similares en los dos cementos, sin embargo se observa que el cemento experimental en determinados periodos de tiempo presenta grados de hidratación ligeramente mayores, lo que se correlaciona con la mayor velocidad de liberación del alendronato para esta formulación. De forma general, se puede decir que la composición de la formulación del Grupo IV no modifica la hidratación del cemento con relación a la del PMMA, lo que indica que la naturaleza hidrófoba del MVE se contrarresta con la hidrófila del TEGDMA.

La respuesta biológica de los cementos experimentales se evalúa en primer lugar *in vitro* utilizando cultivos celulares de diferentes estirpes. Inicialmente se elige una línea celular inmortal atendiendo a las recomendaciones de la norma Norma UNE-EN ISO 10993-5³⁸ y en segundo lugar se elige una estirpe celular propia del tejido de aplicación de las formulaciones. Así se utilizan las células Vero, células epiteliales de riñón de mono verde africano, por su morfología de tipo fibroblástico y porque es una línea celular muy resistente, y los osteoblastos humanos como célula representativa del tejido óseo.

Con estas líneas celulares en primer lugar se evalúan los efectos citotóxicos de las especies de bajo peso molecular susceptibles de ser liberadas en el medio fisiológico una vez que han sido implantadas las formulaciones *in vivo*. Para ello se determina el índice de citotoxicidad 50 (IC₅₀) de los monómeros y del fármaco alendronato. El monómero MMA no se ha analizado debido a que su citotoxicidad se encuentra muy estudiada y referenciada en la literatura.³⁹ Este monómero es uno de los metacrilatos de menor toxicidad y presenta valores de IC₅₀ de 89,89 mM frente a la línea

celular HeLa S3, muy superior al valor del TEGDMA obtenido en esta misma línea celular ($IC_{50}=1,50$).⁴⁰ Los valores de IC_{50} obtenidos en este trabajo para los monómeros MVE y TEGDMA y el fármaco ALN en las diferentes líneas celulares, son muy similares entre sí y se corresponden con los obtenidos en trabajos anteriores utilizando cultivos de fibroblastos humanos.⁴¹ Además, concretamente el valor de IC_{50} del TEGDMA se correlaciona bien con el descrito previamente para la línea HeLa S3. El monómero de MVE presenta una citotoxicidad intermedia entre la del MMA y la del TEGDMA. De esta evaluación se deduce que la especie de bajo peso molecular de mayor toxicidad es el agente de entrecruzamiento TEGDMA, seguido del fármaco ALN y del MVE. Ambas especies monoméricas se encuentran presentes en los cementos de los Grupos III y IV, ya que los Grupos I y II únicamente contienen MMA como monómero residual. En el cemento del Grupo IV hay que considerar además, la presencia del fármaco alendronato.

La citotoxicidad de los extractos de los diferentes cementos se evalúa mediante el ensayo MTT. Este ensayo depende de la actividad de un enzima mitocondrial, succinato deshidrogenasa, que puede ser dañado cuando las células son expuestas a especies tóxicas. Los resultados para las células Vero indican que los extractos liberados en este medio de cultivo pueden considerarse no citotóxicos, ya que la viabilidad celular se sitúa entre el 80 y 90% en todos los casos. Los resultados de viabilidad celular para los osteoblastos humanos cultivados en presencia de los lixiviados de los cementos de los Grupos III y IV en este medio de cultivo, se sitúan en valores inferiores al 80% en la mayoría de los casos, siendo la única excepción los extractos recogidos a 2 días del cemento del Grupo III. Cuando se analiza la morfología celular de estos cultivos, se observa que el daño producido por estos extractos presenta diferencias dependiendo del grupo. Así, para el cemento del Grupo III el daño celular que los extractos proporcionan decrece con el tiempo de elución y con el tiempo de cultivo mientras que los lixiviados del cemento del Grupo IV tienen efectos más severos sobre los cambios celulares, independientemente del tiempo de elución. Además, el daño no decrece con un aumento del tiempo de cultivo de 24 a 48 horas.

Como se ha comentado anteriormente, los dos principales monómeros residuales en los cementos de los Grupos III y IV son el TEGDMA y el MVE, y por tanto, ambas especies pueden ser responsables de la toxicidad de los lixiviados. La liberación de ambas especies al medio de cultivo va a depender de su carácter más o menos hidrófobo y de su peso molecular. Así, es de esperar que el menos tóxico, el MVE, se libere en menor proporción que el más "hidrófilo", TEGDMA, que puede ser perfectamente liberado en un medio acuoso como se ha demostrado en diversos estudios *in vivo*.^{42,43} En cuanto a la toxicidad causada por los extractos del cemento del Grupo IV, además de los monómeros MVE y TEGDMA se debe de tener en cuenta el fármaco alendronato presente en esta formulación. La liberación del ALN conlleva un aumento de la porosidad del cemento que puede potenciar la liberación de los restantes residuos tóxicos, o incluso, ejercer una acción sinérgica en la toxicidad de ellos. En cuanto a los efectos de los bisfosfonatos sobre la viabilidad de los osteoblastos en modelos *in vitro* publicados en la literatura, hay resultados antagónicos. Algunos trabajos afirman que este tipo de fármaco puede comprometer la viabilidad de los mismos dependiendo de la concentración.⁴⁴ Así, algunos trabajos indican que el alendronato promueve la proliferación y maduración de osteoblastos en cultivos primarios de hueso trabecular humano y en cultivos de células de tipo osteoblástico MG-63⁴⁵ cuando se encuentra en concentraciones del orden de 10^{-8} M, pero en concentraciones del orden de 10^{-4} M produce inhibición en la proliferación celular. También se ha publicado que la administración de ALN (10^{-8} M) en cultivos de células estromales de médula ósea humana (BMSC) aumenta la proliferación celular e inicia la diferenciación osteoblástica.⁴⁶ Sin embargo, otros trabajos sostienen que el ALN no tiene efecto alguno sobre la diferenciación de osteoblastos en la línea celular de tipo osteoblástico MC3T3-E1 y en cultivos de células mesenquimales pluripotentes ST2 cuando se encuentra en ese intervalo de concentración.⁴⁷ En esta misma línea Moreno y col⁴⁸ revelaron que el alendronato en cultivos *in vitro* no afecta la viabilidad, proliferación y capacidad de deposiciones minerales de osteoblastos humanos a la concentración a la cual inhibe la actividad de los osteoclastos en un 50%.

El crecimiento y la proliferación celular se evalúan a través del ensayo Alamar Blue. Este ensayo se basa en una reacción de oxidación-reducción producida por la actividad metabólica celular que resulta en una reducción del medio circundante. Las células Vero presentan una buena adhesión y proliferación celular sobre la superficie de los cementos de los Grupos I a III, sin mostrar diferencias significativas, sin embargo, la proliferación celular disminuye drásticamente sobre el cemento del Grupo IV. Este resultado puede derivar de la presencia del propio fármaco ALN en esta composición, aunque sus efectos todavía no se han dilucidado. La proliferación celular del cemento del Grupo II (20% MVE) es superior a la obtenida para el control de PMMA (Grupo I) a 21 días. Este comportamiento se correlaciona con el descrito en trabajos anteriores donde se utilizaron cultivos de células de tipo osteoblástico¹⁶ y se atribuye a un efecto estimulante de la vitamina E anclada en la matriz polimérica, ya que los exudados de esta formulación contienen sólo MMA como monómero residual.

Los osteoblastos humanos presentan un comportamiento similar al observado con las células Vero en cuanto a adhesión y proliferación celular con los cementos de los Grupos III y IV, si bien, la adhesión sobre el cemento del Grupo III es ligeramente inferior a la observada con la línea inmortal. La respuesta celular al cemento del Grupo IV, muestra muy escasa colonización sobre esta superficie. Así, en estos casos, hay que considerar la liberación de restos tóxicos de las formulaciones de los Grupos III y IV y la presencia del alendronato en el Grupo IV, como posibles causas de la inferior o nula colonización de osteoblastos sobre los cementos de los Grupos III y IV respectivamente.

Como es sabido, cuando se implanta un biomaterial se van a producir una secuencia de acontecimientos que comienzan por una inflamación aguda, seguida de una inflamación crónica, para finalizar con el proceso de cicatrización.^{49,50} Éstos siguen un proceso cronológico y esta respuesta tisular dependerá del tejido implicado diferenciando entre tejido conectivo y tejido óseo. En el primer caso se producirá una reacción de fibrosis más o menos intensa dependiendo del material implantado, fundamentalmente de los efectos

de la superficie, tanto físicos como químicos.⁵¹ La respuesta del tejido óseo tenderá hacia un crecimiento y remodelación ósea dependiendo igualmente del material implantado.⁵²

La evaluación de la respuesta del tejido conectivo en el presente trabajo se lleva a cabo mediante implantación subcutánea de las formulaciones de los Grupos I a III en la espalda de rata. La implantación se realiza por inyección de la formulación en su estado pastoso, emulando las condiciones de aplicación clínica, con el fin de evaluar los efectos producidos por la exotermia de la reacción *in vivo* y por la liberación de las especies de bajo peso molecular durante la implantación. Los efectos se evalúan a corto plazo, estableciéndose como periodo adecuado 2 semanas.

Macroscópicamente se observa que el fraguado *in vivo* del cemento da por resultado una estructura sólida que adquiere forma ovoide de gran dureza, difícil de procesar. Microscópicamente, no se encuentran diferencias significativas en la respuesta histológica a la implantación de las diferentes formulaciones. En todos los casos, alrededor del cemento se observa una fina cápsula de tejido conectivo moderadamente denso constituido por fibroblastos con algunas fibras de colágeno. La implantación y fraguado de las formulaciones no produce alteraciones en las estructuras tisulares circundantes tales como vasos sanguíneos y tejido adiposo, piel y anejos pilosos, músculo estriado, o nervio periférico. En algunas formulaciones del Grupo II se observan pequeñas excrescencias en forma de papilas o lengüetas dirigidas desde la cápsula hacia el interior del cemento. No se observa en ningún caso calcificación en el tejido adyacente al cemento, ni por supuesto fenómenos de osificación, así como tampoco reacción inflamatoria, ni leucocitos ni células plasmáticas ni células gigantes de cuerpo extraño. En general se puede decir que la respuesta observada es muy similar a la que se obtuvo cuando se implantó la formulación de cemento del Grupo I polimerizado, en forma de varillas, intramuscularmente en rata,⁵³ respuesta que, a su vez, era coherente con la descrita en la bibliografía para partículas de PMMA curadas *in vitro*.⁵⁴ Así mismo, este comportamiento ha sido observado por Revell y col⁵⁵ tras la implantación de perlas de un nuevo

cemento acrílico polimerizado *in vitro* en la musculatura paraespinal de la rata. Esto indica que la polimerización del cemento *in vivo* realizada en el modelo seguido en este trabajo, no conlleva efectos adversos en la respuesta histológica provenientes de la exotermia de la reacción, o de la liberación de monómeros residuales. Por tanto, los resultados obtenidos muestran una buena biocompatibilidad de las formulaciones en el tejido conectivo en todos los casos.

La evaluación de la respuesta del tejido óseo se estudia mediante inyección de las diferentes formulaciones en su estado pastoso en el fémur de conejo. La inclusión de un implante en un organismo vivo plantea una serie de “interacciones” entre el implante y el hueso, con lo que este estudio debe abarcar una serie de puntos como son: la dinámica de evolución del implante y su interacción con el hueso, incluyendo la evolución posterior del tejido óseo neoformado, la toxicidad local, la vascularización y finalmente la permanencia del tejido óseo neoformado.

La respuesta *in vivo* del tejido óseo tras la implantación de las diferentes formulaciones (Grupos I a IV) se puede decir que presenta características generales en todas las formulaciones si se considera el periodo total de estudio. Estas características se pueden describir de la siguiente forma:

a) Se produce una reacción a cuerpo extraño caracterizada por la presencia de células gigantes multinucleadas y formación de fibrosis, que tiene una tendencia a remitir en un periodo de 24 semanas.

b) Se observa la presencia de espículas óseas con osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, indicativas de una neoformación de tejido óseo.

Sin embargo, se encuentran diferencias claras en cuanto a la intensidad y los tiempos de estos fenómenos en los diferentes grupos cuando se analiza cada periodo de tiempo por separado

En la respuesta a los cementos de los Grupos I y II la intensidad y evolución de los procesos mencionados a lo largo del tiempo de la experiencia son muy similares entre sí. Los fenómenos de reacción a cuerpo extraño son discretos y más intensos en los primeros periodos de tiempo y tienden a remitir hacia las 12 o 24 semanas de la implantación. Así mismo, en los periodos iniciales se observan espículas óseas activas en las que aparecen numerosos frentes de osteoblastos, indicativos de una buena actividad remodeladora de la estructura, que van en aumento con el tiempo de evaluación, llegando en 24 semanas a la obtención de matriz ósea mineralizada. La médula ósea se conserva en buen estado desde el comienzo, y en periodos de tiempo largos la médula ósea hematopoyética presenta características totalmente normales. De estos resultados se obtiene que la presencia de la vitamina E anclada en el cemento del Grupo II no produce un efecto estimulante en la regeneración ósea *in vivo*, como se había observado en los estudios de cultivos *in vitro* de células de tipo osteoblástico¹⁶ y de células Vero en este trabajo.

La respuesta histológica a los cementos de los Grupos III y IV se caracteriza por una reacción a cuerpo extraño más intensa en los periodos iniciales, que presenta una mayor necrosis y fibrosis, y que además se mantiene en periodos de tiempo más prolongados. Otro fenómeno común observado en los cementos de los Grupos III y IV es la aparición de calcificación distrófica derivada principalmente de zonas necróticas, este fenómeno también es más frecuente en la respuesta del Grupo III. Estos fenómenos se pueden correlacionar con la toxicidad de restos de especies de bajo peso molecular, principalmente del monómero MVE y del agente de entrecruzamiento TEGDMA, y su liberación al medio fisiológico durante y después del fraguado del cemento, pero también con la toxicidad de grupos metacrilato sin reaccionar que hayan quedado colgando de las moléculas de TEGDMA ancladas a la matriz.²⁸ El daño celular producido por los lixiviados de estos dos grupos de cementos en los cultivos de osteoblastos ha quedado demostrado en este estudio. En este sentido, se puede decir que se encuentra una correlación entre los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* de los cementos de los Grupos III y IV.

La biocompatibilidad del TEGMA está siendo debatida actualmente. Los estudios publicados presentan resultados contrapuestos. Por un lado, se ha observado que la relativamente alta hidrofilia de esta molécula y su penetrabilidad a los tejidos pueden comprometer la biocompatibilidad de los tejidos y se ha sugerido su sustitución por otros monómeros más voluminosos, hidrófobos y biocompatibles.⁵⁶ Así mismo, el TEGMA no reaccionado puede migrar del material polimerizado y producir irritación en el tejido blando. Se ha sospechado que el TEGMA puede favorecer el crecimiento bacteriano alrededor de la restauración.⁵⁷ Sin embargo, otros estudios sobre la citotoxicidad *in vitro* de los extractos de resinas dentales que contienen metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y dimetacrilato de trietilenglicol (TEGMA) sobre células L929, revelan que, a pesar de que los citados monómeros son citotóxicos para este tipo de células, la cantidad de monómeros extraídos no alcanzó una concentración suficiente como para suprimir la viabilidad o el crecimiento celular.⁵⁸ En esta misma línea, otros estudios que contemplan la exposición a corto plazo (dos semanas) de dosis subletales de HEMA, TEGDMA a monocitos humanos tipo THP-1 indican que, así como el monómero HEMA provoca alteración en la respuesta celular a corto plazo (24 horas) aunque no en la exposición crónica, el monómero TEGDMA no provoca ningún efecto adverso en ningún caso.⁵⁹

Los hallazgos de este trabajo apoyan los estudios previos citados⁵⁶ que cuestionan la biocompatibilidad de las resinas que contienen este agente de entrecruzamiento, y que abogan por la sustitución de este monómero por otros de carácter más hidrófobo, de mayor peso molecular y en resumen, más biocompatible.

Por otra parte, las respuestas histológicas tras implantación de los cementos de los Grupos III y IV presentan claras diferencias en lo relativo a la osteogénesis. La neoformación de tejido óseo con presencia de espículas óseas activas es mucho más leve en los primeros tiempos (2 semanas) tras la implantación del cemento del Grupo III, llegando a ser más patente y evidente hacia las 8 semanas post-implantación. Sin embargo, para el cemento del Grupo IV, la aparición de espículas óseas es clara a las 2 semanas, lo que

indica que la presencia de ALN ejerce un efecto positivo en la regeneración ósea, no encontrado en el cemento del Grupo III en tiempos cortos.

La actividad antirresortiva de los bisfosfonatos ha sido demostrada tanto *in vitro* como *in vivo*.^{60,61,62,63,64} Sin embargo, los efectos de estos fármacos sobre la formación de nuevo hueso son aún inseguros y en cierta medida controvertidos. Diferentes estudios a nivel experimental han evaluado el efecto de los bisfosfonatos tras administración sistémica en diversos modelos animales. Así, Peter y col utilizando un modelo canino, tras 3 años de tratamiento con alendronato, no observaron la formación de fracturas espontáneas ni cambios en las propiedades estructurales del fémur y vértebras.⁶⁵ En otros trabajos⁶⁶ no se encontró un retraso explícito en la reparación de fracturas, pero sí una cierta ralentización de la remodelación. Wang y col⁶⁷ tras administración oral de alendronato en perros, no detectaron efectos adversos sobre las propiedades biomecánicas y de composición del hueso, en periodos de hasta 23 semanas. Resultados similares son los publicados por Frenkel y col⁶⁸ y Masarachia y col⁶⁹ quienes observaron que la administración subcutánea de ALN no alteraba el crecimiento de hueso con respecto al grupo control.

Otros estudios realizados en modelo canino presentaron resultados más positivos, indicando que la administración oral de ALN, además de inhibir una osteolisis generada a través de partículas de desgaste, daba lugar a un aumento del 115% en el hueso mineralizado en las porosidades del implante acetabular.⁷⁰ En otros experimentos en ratas, la administración subcutánea de ALN produjo un efecto estimulante sobre la formación de nuevo hueso tras realizar un injerto autógeno⁷¹ y la administración de altas dosis de ibandronato (5 µg/kg/día) produjo una aceleración en la oseointegración de un implante recubierto de HA.⁷² Más recientemente, en un modelo de distracción osteogénica en conejos, se ha observado que la infusión de ALN aumentaba significativamente el contenido de hueso mineral alrededor del segmento alargado, e impedía la osteopenia característica de la fase de consolidación inicial.⁷³

La evaluación de los efectos de los bisfosfonatos tras su liberación local *in situ* es más incipiente. En un modelo de rata osteoporótica, Peter y col⁷⁴ han encontrado que la liberación local de zoledronato de un recubrimiento de fosfato cálcico sobre el implante ortopédico, mejora la fijación mecánica del mismo, y han sugerido que el uso de implantes cargados con bisfosfonatos puede ser beneficioso para pacientes con osteoporosis que necesiten un reemplazo total de cadera. Con relación al uso de bisfosfonatos en cementos óseos acrílicos las citas son más bien escasas. Se ha investigado el efecto de la adición de ácido zoledrónico a la fase líquida del cemento (*Antibiotic Simplex®*, cemento radiopaco con eritromicina y colistina) sobre la neoformación de tejido óseo en un modelo en rata, por implantación del cemento polimerizado *in vitro*, en el fémur del animal, y se ha comparado con el efecto que produciría la administración sistémica del fármaco en el mismo modelo.³³ Los resultados indicaron que la administración sistémica produjo un gran y significativo aumento de densidad mineral ósea (48,6%) mientras que la liberación local no produjo efecto alguno. Hay que tener en cuenta no obstante, que en este trabajo la cantidad de ácido zoledrónico liberada *in vitro* (un promedio de 131,4 ng) no superó el 1% de la cantidad total cargada en un periodo de 6 semanas.

De los estudios experimentales realizados cabe señalar que, aunque los resultados no son unánimes, una gran parte de ellos abogan por un efecto positivo del bisfosfonato sobre la inducción de la actividad osteoblástica en la regeneración ósea. En este sentido, los resultados histopatológicos obtenidos tras implantación del cemento cargado con alendronato (Grupo IV) en el presente trabajo son consistentes con los sostenidos en estos estudios.

De forma general, cabe concluir que, a pesar de los grandes avances realizados sobre el conocimiento de los efectos positivos y adversos del uso de los bisfosfonatos, todavía quedan algunos puntos abiertos a debate como es el uso de bisfosfonatos en pacientes que presentan una fractura ósea.^{75,76} Por tanto, se necesitan más datos antes de que las recomendaciones finales sobre el uso de los bisfosfonatos se puedan realizar. Se debe de pasar a estudios a largo plazo con una recopilación de resultados bien controlada antes de que

las indicaciones y contraindicaciones para el uso de estos fármacos se puedan definir y establecer correctamente.

V.1. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Lewis G. Properties of acrylic bone cements: State of the art. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1997;38:155-182.
- ² Looney MA, Park JB. Molecular and mechanical property changes during aging of bone cement in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res* 1986;20:555-563.
- ³ Moreau MF, Chappard D, Lesourd M, Montheard JP, Basle MF. Free radicals and side products released during methyl methacrylate polymerization are cytotoxic for osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 1998;40:124-131.
- ⁴ Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:21-48.
- ⁵ Papatheofanis FJ, Barmada K. Polymorphonuclear leukocyte degranulation with exposure to polymethyl methacrylate nanoparticles. *J Biomed Mater Res* 1991;25:761-771.
- ⁶ Thomson LA, Law FC, James KH, Matthew C A, Rushton N. Biocompatibility of particulate polymethyl methacrylate bone cements: A comparative study in vitro and in vivo. *Biomaterials* 1992;13:811-818.
- ⁷ Bigatti MP, Lamberti L, Rizzi FP, Cannas M, Allasia G. In vitro micronucleus induction by poly(methyl methacrylate) bone cements in cultures human lymphocytes. *Mutat Res* 1994;321:133-137.
- ⁸ Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. In vitro effects of bone cements on the cell cycle of osteoblast-like cells. *Biomaterials* 1995;16:1187-1192.
- ⁹ Ciapetti G, Granchi D, Cenni E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Cytotoxic effect of bone cements in HL-60 cells: distinction between apoptosis and necrosis. *J Biomed Mater Res* 2000;52:338-345.
- ¹⁰ Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Cervellati M, Pizzoferrato A, Toni A. In vitro testing of ten bone cements after different time intervals from polymerization. *J Biomater Sci Polymer Ed* 2000;11:481-493.
- ¹¹ Scott G. Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition. Chichester, UK: Albion Publishing;1997 (chapters 1 and 2).
- ¹² Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK. Inhibitory effects of vitamin E on collagen synthesis and wound repair. *Ann Surg* 1972;175:235-240.
- ¹³ Sakamoto W, Fujie K, Handa H, Ogihara T, Mino M. In vivo inhibition of superoxide production and protein kinase C activity in macrophages from vitamin E-treated rats. *Internat J Vit Nutr Res* 1990;60:338-342.

¹⁴ Xu H, Watkins BA, Seifert MF. Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage. *Calcif Tissue Int* 1995;57:293-300.

¹⁵ Adam O. Effects of vitamin E on immune and inflammatory responses in rheumatic diseases. *Fett/Lipid* 1997;99:70-73.

¹⁶ Mendez JA, Aguilar MR, Abraham GA, Vázquez B, Dalby M, Di Silvio L, San Roman J. New acrylic bone cements conjugated to vitamin E: Curing parameters, properties and biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 2002;62:299-307.

¹⁷ Deb S, Vázquez B, Bonfield W. Effect of crosslinking agents on acrylic bone cements based on poly(methylmethacrylate). *J Biomed Mater Res* 1997;37:465-473.

¹⁸ Jagger RG, Huggett R. The effect of cross-linking on indentation resistance, creep and recovery of an acrylic resin denture base material. *J Dent* 1975;3:15-18.

¹⁹ Brauer GM. Properties of sealants containing Bis-GMA and various diluents. *J Dent Res* 1978; 57: 597-607.

²⁰ Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997;105:97-116.

²¹ Sideridov I, Tserki V, Papanastasiou G. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2003;24:655-665.

²² Lambrechts P, Ameye C, Vanherle G. Conventional and microfilled composite resins. Pt II. Chip fractures. *J Prosthet Dent* 1982;48:527-538.

²³ Russell RGG, Visas S, Fleisch H, Curie HL, Rubinstein HM, Dietz AA, y col. Inorganic pyrophosphate in plasma, urine, and synovial fluid of patients with pyrophosphate arthropathy (chondrocalcinosis or pseudogout). *Lancet* 1970;2:899-902.

²⁴ Planell JA, Vila MM, Gil FJ, Driessens FCM. Acrylic bone cements. In: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz ER. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Part B: Applications. Vol 2.* New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995.

²⁵ Brauer GM, Steinberger DR, Stansbury JW. Dependence of curing time, peak temperature and mechanical properties on the composition of bone cement. *J Biomed Mater Res* 1986;20:839-852.

²⁶ Pascual B, Gurruchaga M, Goñi I, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, Levenfeld B, Vázquez B, San Román J. Mechanical properties of a modified acrylic bone

cement with ethoxytriethyleneglycol monomethacrylate. *J Mater Sci: Materials in Medicine* 1995;6:793-798.

²⁷ Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Bone cements. Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials. Springer, Germany, 2000.

²⁸ Loshak S, Fox TG. Cross-linked polymers. 1. Factors influencing the efficiency of cross-linking in copolymers of methyl methacrylate and glycol dimethacrylates. *J Am Chem Soc* 1953;75:3544-355.

²⁹ Hill RG. The crosslinking agent ethylene glycol dimethacrylate content of the currently available acrylic denture base resins. *J Dent Res* 1981;60:725-726.

³⁰ Healey JH, Shannon F, Boland P, DiResta G. PMMA to stabilize bone and deliver antineoplastic and antiresorptive agents. *Clin Orthop Relat Res* 2003;415:S263-S275.

³¹ Zenios M, Nokes L, Galasko CSB. Effect of a bisphosphonate, disodium pamidronate, on the quasi-static flexural properties of Palacos R acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2004;71B:322-326.

³² Lewis G, Janna S. Alendronate in bone cement: Fatigue life degraded by liquid, not powder. *Clin Orthop Relat Res* 2006;445:233-238.

³³ Yu NYC, Ruys AJ, Zenios M, Godfrey C, McDonald M, Kiely P, Mikulec K, Little DG, Schindeler A. Bisphosphonate-laden acrylic bone cement: Mechanical properties, elution performance and in vivo activity. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2008;87B:482-491.

³⁴ Deb S, Vázquez B. The effect of crosslinking agents on acrylic bone cements containing radiopacifiers. *Biomaterials* 2001;22:2177-2181.

³⁵ Rudigier J, Kirsschner P, Richter IE, Schweikert CH. Influence of different X-ray contrast materials and strength of bone cement. En Hastings GW, Williams DF (Editores). *Mechanical Properties of Biomaterials*. Wiley. Nueva York. 1980.

³⁶ Price CA. The effect of cross-linking agents on the impact resistance of a linear poly(methyl methacrylate) denture-base polymer. *J Dent Res* 1986;65:987-992.

³⁷ Beatty MW, Swartz ML, Moore BK, Phillips RW, Roberts TA. Effect of crosslinking agent content, monomer functionality, and repeat unit chemistry on properties of unfilled resins. *J Biomed Mater Res* 1993;27:403-413.

³⁸ ISO. Versión Oficial en Español de la Norma Internacional, ISO-10993/5:1997. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. Norma Española 1998.

³⁹ Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl

methacrylate on 4 cultured fibroblasts. Intern J Prosthodontics 2000;13:311-315.

⁴⁰ Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. J Biomed Mater Res 1997;37:517-524.

⁴¹ Rodríguez-Lorenzo LM, Fernández M, Parra J, Vázquez B, López-Bravo A, San Román J. Acrylic injectable and self-curing formulations for de local release of bisphosphonates in bone tissue. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 2007;83B:596-608.

⁴² Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. Biomaterials 2005;26:4111-4118

⁴³ Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. J Dent Res 2006;85:870-877.

⁴⁴ Bukowski JF, Dascher CC, Das H. Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action. Biochem Biophys Commun 2005;328:746-750.

⁴⁵ Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. Biomaterials 2004;25:4105-4115.

⁴⁶ Von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, Rubash HE, Shanbhag AS. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. Biomaterials 2005;26:6941-6949.

⁴⁷ Itoh F, Aoyagi S, Furihata-Komatsu H, Aoki M, Kusama H, Kojima M, Hogo H. Clodronate stimulates osteoblast differentiation in ST2 and MC3T3-E1 cells and rat organ cultures. Eur J Pharmacol 2003;477:9-16

⁴⁸ Moreno CG, Serrano S, Nacher M y col. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. Bone 1998;22:233-239.

⁴⁹ Black J. Biological Performance of Materials. Fundamentals of Biocompatibility. Marcel Dekker. Nueva York, 1992.

⁵⁰ Black J. Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice. Churchill Livingstone. Nueva York, 1988.

⁵¹ Van Mullem PJ, de Wijn JR, Vaandrager JM. Porous acrylic cement: evaluation of a novel implant material. Ann Plast Surg 1988;21:576-582.

⁵² Boss JH, Shajrawi I, Aunullah J, Mendes DG. The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. Isr J Med Sci

1995;31:203-209.

⁵³ De la Torre B, Fernández M, Vázquez B, Collía F, de Pedro JA, López-Bravo A, San Román J. Biocompatibility and other properties of acrylic bone cements prepared with antiseptic activators. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2003;66B:502-513.

⁵⁴ Meachim G, Brooke G, Pedley RB. The tissue response to acrylic particles implanted in animal muscle. *Biomaterials* 1982;3:213-219.

⁵⁵ Revell PA, Braden M, Weightman B, Freeman MAR. Experimental studies of the biological response to a new bone cement: II Soft reactions in the rat. *Clin Mater* 1992;10:233-238.

⁵⁶ Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-biological interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res* 2001;80:2046-2050.

⁵⁷ Hansel C, Leyhausen G, Mai U, Geurtsen W. Effect of various components extracts on the growth of *Streptococcus sobrinus*. *J Dent Res* 1998;77:60-67.

⁵⁸ Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater* 2001;17:333-339.

⁵⁹ Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H. Low-dose, long-term exposures of dental material components alter human monocyte metabolism. *J Biomed Mater Res* 2002;62:237-243.

⁶⁰ Fleisch H, New bisphosphonates in osteoporosis. *Osteoporos Int* 1993;2:15-22.

⁶¹ Kaynak D, Meffert R, Günhan Ö, Özkaya Ö, A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 2000;71:790-796.

⁶² Igarashi K, Mitani H, Adachi H, Shinoda H, Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1994;106:279-289.

⁶³ Igarashi K, Adachi H, Mitani H, Shinoda H, Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. *J Dent Res* 1996;75:1644-1649.

⁶⁴ Boivin G, Meunier PJ, Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002;2:538-543.

- ⁶⁵ Peter CP, Guy J, Shea M, Bagdon W, Kline WF, Hayes WC. Long-term safety of the aminobisphosphonate alendronate in adult dogs. I. General safety and biomechanical properties of bone. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;276:271-276.
- ⁶⁶ Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA. Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 1996;14(1):74-79.
- ⁶⁷ Wang X, Shanbhag AS, Rubash HE, Agrawal CM. Short-term effects of bisphosphonates on the biomechanical properties of canine bone. *J Biomed Mater Res* 1999;44:456-460.
- ⁶⁸ Frenkel SR, Jaffe WL, Della Valle C, Jazrawi L, Maurer S, Baitner A, Wright K, Sala D, Hawkins M, Di Cesare PE. The effect of alendronate (FosamaxTM) and implant surface on bone integration and remodelling in a canine model. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2001;58:645-650.
- ⁶⁹ Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of ³H-alendronate and ³H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 1996;19:281-290.
- ⁷⁰ Shanbhag AS, Hasselman CT, Rubash HE. The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clin Orthop* 1997;344: 33-43.
- ⁷¹ Altundal H, Gursoy B, Turkey I. The influence of alendronate on bone formation alter autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:285-291.
- ⁷² Eberhardt C, Habermann B, Müller S, Schwarz M, Bauss F, Kurth HA. The bisphosphonate ibandronate accelerates osseointegration of hydroxyapatite-coated cementless implants in an animal model. *J Orthop Sci* 2007;12:61-66.
- ⁷³ Abbaspour A, Takahashi M, Sairyo K, Takata S, Yukata K. Optimal increase in bone mass by continuous local infusion of alendronate during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2009;44:917-923.
- ⁷⁴ Peter B, Gauthier O, Laïb S, Bujoli B, Guicheux J, Janvier P, van Lenthe GH, Müller R, Zambelli P-Y, Bouler J-M, Pioletti DP. Local delivery of bisphosphonate from coated orthopaedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. *J Biomed Mater Res* 2006;76A:133-143.
- ⁷⁵ Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, Reiss TF, Ensrud KE. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *Lancet* 1996;348:1535-1541.
- ⁷⁶ Fleisch H. Can bisphosphonates be given to patients with fractures? *J Bone Miner Res* 2001;16(3):437-440.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se lleva a cabo el estudio del comportamiento biológico de nuevas formulaciones de cementos óseos acrílicos preparadas por la incorporación de metacrilato de vitamina E (MVE), junto con el agente de entrecruzamiento dimetacrilato de etilenglicol (TEGMA) o de ambos componentes con un fármaco del grupo de los bisfosfonatos, el alendronato, y se analiza con respecto a un cemento control de poli (metacrilato de metilo). Se caracteriza cada una de las formulaciones evaluando los parámetros de curado, propiedades mecánicas y comportamiento *in vitro* en fluido simulado. El comportamiento biológico de estas formulaciones se analiza *in vitro* mediante cultivos celulares de células Vero y de osteoblastos humanos. El comportamiento biológico *in vivo* se realiza mediante la aplicación de las formulaciones en tejido conectivo y en tejido óseo en diferentes animales de experimentación, analizándose la respuesta histopatológica de los correspondientes tejidos tras la implantación de las formulaciones en su estado pastoso o inyectable.

Como conclusiones de este trabajo cabe destacar:

1. Los cementos portadores de metacrilato de vitamina E (MVE) proporcionan una mejora de los parámetros de curado con relación al Grupo I (cemento de PMMA), con una reducción de la temperatura máxima y un incremento del tiempo de curado, lo que implica un menor riesgo de necrosis térmica en los tejidos adyacentes y un mayor tiempo de manipulación de las masas reactantes, lo que resulta interesante desde el punto de vista de la aplicación del cemento.
2. Los valores de monómero residual de los grupos que contienen metacrilato de vitamina E son comparables al valor obtenido por el Grupo I (control) y en todos los casos se encuentran por debajo del 3%-p, indicando que la reacción de polimerización alcanza una alta conversión durante el fraguado de todos los cementos.

3. La incorporación a la fase líquida de metacrilato de vitamina E (MVE) y dimetacrilato de etilenglicol (TEGDMA) en las formulaciones experimentales, no afecta a las propiedades mecánicas de los cementos curados con respecto a las que presentan las formulaciones de PMMA. Todas las formulaciones experimentales cumplen el requisito que marca la norma ASTM F451, presentando valores de resistencia a compresión superiores a 70 MPa.

4. La liberación de alendronato del cemento experimental (Grupo IV) es muy similar a la obtenida con un cemento de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) en su etapa inicial, pero la totalidad del medicamento se libera en un periodo menor de 12 días para el cemento del Grupo IV, en comparación a los 20 días para el de PMMA.

5. Los valores del índice de citotoxicidad 50 (IC_{50}) de los monómeros y el fármaco frente a las células Vero y frente a osteoblastos humanos son muy similares entre sí, y muestran que, de las especies de bajo peso molecular presentes en las formulaciones experimentales de los cementos estudiados, el dimetacrilato de etilenglicol (TEGDMA) es el componente más tóxico, seguido del fármaco alendronato y del metacrilato de vitamina E (MVE).

6. El estudio realizado en cultivos de células Vero pone de manifiesto un descenso significativo en la viabilidad celular en presencia de los extractos de cualquiera de los grupos ensayados con relación al control TMX, sin embargo estos valores se sitúan en niveles entre el 80-90% indicando que la biocompatibilidad no se ve comprometida. Además, estas células son capaces de adherirse y proliferar en las superficies de los cementos de los Grupos I a III, pero no lo hacen sobre el cemento del Grupo IV, lo que se puede relacionar con la presencia de alendronato.

7. En el estudio realizado con osteoblastos humanos se obtiene un descenso en la viabilidad celular en presencia de los lixiviados de los cementos de los Grupos III y IV, dando valores inferiores al 80% con respecto al control TMX. Las alteraciones celulares provocadas en los osteoblastos por estos lixiviados son de diferente magnitud y efecto. Así, para el Grupo III el daño celular de sus extractos decrece con el tiempo de elución y con el tiempo de cultivo mientras que los lixiviados del Grupo IV tienen efectos más severos y el daño no es reversible.

8. La adhesión de osteoblastos, y por tanto también su proliferación, se ha visto reducida en los cultivos sembrados sobre el cemento del Grupo III y prácticamente ha desaparecido en los sembrados sobre la superficie de las muestras del Grupo IV, dando una respuesta similar a la obtenida con los cultivos de células Vero.

9. El estudio histológico sobre el tejido conectivo tras la implantación subcutánea del cemento en la espalda de la rata, muestra que no se encuentran diferencias significativas en la respuesta histológica de las diferentes formulaciones (Grupos I a III). En todos los casos se observa una respuesta similar a la observada tras implantación de un cemento polimerizado.

10. El estudio histológico sobre el tejido óseo muestra que las cuatro formulaciones estudiadas presentan un comportamiento acorde con el esperado para este tipo de sistemas inyectables, si se tiene en cuenta el periodo de tiempo total del estudio: En todos los casos las alteraciones inicialmente provocadas por su implantación tienden a estabilizarse transcurridas 24 semanas. Conforme avanza el tiempo de estudio, la reacción de cuerpo extraño tiende a remitir, aparece una recuperación progresiva de la médula ósea y la regeneración ósea se consolida.

11. En periodos de tiempo más cortos, la respuesta histológica a los cementos de los Grupos III y IV se caracteriza por una mayor reacción

de cuerpo extraño, que además tarda más tiempo en remitir. Esta respuesta se correlaciona con la presencia de residuos tóxicos, presentes en estas formulaciones y susceptibles de ser liberados al medio.

12. Por último, el estudio histológico del cemento del Grupo IV revela la aparición de signos de regeneración ósea a tiempos menores que en el Grupo III. Por tanto, la inclusión de alendronato en la formulación de Grupo IV ejerce un efecto positivo en la formación de hueso *in vivo* con respecto al mostrado por el Grupo III. Sin embargo, la presencia de residuos tóxicos, principalmente la incorporación de TEGDMA en la formulación de ambos cementos, sí parece comprometer en cierta medida el comportamiento *in vivo* en los tiempos cortos tras implantación.

