

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



TESIS DOCTORAL

**Modificación de cementos de fosfato cálcico con fosfatos de magnesio
para la regeneración de defectos óseos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jatsue Cabrejos Azama

Directores

Luis Blanco Jerez
Enrique López Cabarcos
Mohammad Hamdan Ali Alkhraisat

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial
(Estomatología III)



**Modificación de Cementos de Fosfatos Cálcicos con
Fosfatos de Magnesio para la Regeneración de
Defectos Óseos**

Memoria presentada para optar al grado de doctor

Presentada por:

Jatsue Cabrejos Azama

Bajo la dirección de los Doctores:

Luis Blanco Jerez

Enrique López Cabarcos

Mohammad Hamdan Ali Alkhraisat

Madrid, 2012

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Es difícil resumir en pocas palabras todo lo que he tenido la suerte de vivir en estos años de trabajo científico. Ahora ha llegado el momento de dar las gracias, de nuevo, a todas las personas que me han ayudado durante este tiempo y sin las cuales no habría sido capaz de llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mis directores de tesis:

Al Dr. Luis Blanco Jerez le agradezco la oportunidad que me brindó, sus consejos, enseñanzas, ayuda, apoyo y exigencia importantes para mi formación académica.

Al Dr. Enrique López Cabarcos por poner a mi disposición los recursos técnicos y económicos necesarios y por el constante estímulo en el campo de la investigación, gracias por permitirme formar parte del grupo, eres un gran referente en el cual fijarse.

Al Dr. Mohammad Hamdan Ali Alkhraisat por sus enseñanzas en la caracterización de los cementos de fosfatos cálcicos, me ha transmitido su ilusión por la investigación y me ha ayudado con su inagotable capacidad de trabajo. Y por brindarme la posibilidad de ver lo grande que es el mundo y todas las oportunidades que existen para cada uno de nosotros.

A la Dra. Carmen Rueda “Monte” por sus enseñanzas, dedicación, consejos, cercanía, por su buen humor, por las conversaciones en el laboratorio y su disponibilidad dieron un buen empuje a este trabajo de investigación.

Al Dr. Jesús Torres por su ayuda en las cirugías experimentales en conejos en el animalario de la Facultad de Odontología – Universidad Rey Juan Carlos.

A la Dra. Conchita Pintado del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia – UCM por su colaboración en las pruebas in vitro de la liberación controlada de vancomicina.

Gracias a todos mis compañeros del departamento de Física-Química II de la Facultad de Farmacia – UCM, porque me han hecho pasar momentos muy agradables y especialmente a Julia con la que he compartido buenos y malos momentos, y quiero expresarle mi cariño. También quisiera agradecer a mis otros compañeros del grupo de investigación MATNABIO: Marco, Jorge, David y Paulino, gracias chicos.

A mi familia, que ha estado apoyándome desde siempre en todo lo que he hecho y por ello tengo que agradecerles especialmente su ayuda durante los casi cuatro años de tesis. A todos, aunque alejados, siempre los he sentido muy cerca.

A todos mis amigos que han compartido y sufrido en parte mi tesis, por su interés y por preguntar siempre que tal avanzaba y tener la paciencia de escucharme hablar de cementos, huesos y células. Gracias por estar ahí.

Y finalmente, agradezco a todos los que contribuyeron de alguna u otra forma en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Tejido óseo	8
2.1.1. Componente celular	9
2.1.2. Matriz ósea	11
2.1.3. Factores solubles	15
2.2. Formación, Remodelado y Reparación ósea	16
2.2.1. Formación ósea	16
2.2.2. Remodelación ósea	18
2.2.3. Reparación ósea	20
2.3. Injertos óseos	22
2.3.1. Tipos de Injertos óseos	23
2.4. Biomateriales de sustitución ósea	25
2.4.1. Conceptos básicos en el campo de biomateriales	27
2.4.2. Clasificación de los biomateriales implantables	29
2.5. Magnesio	34
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS	41
5. MATERIAL Y MÉTODO	43
5.1. Materiales	44
5.2. Métodos	47
5.2.1. Preparación de cementos dopados con magnesio	47
5.2.2. Difracción de rayos X	47
5.2.3. Determinación de tiempo de fraguado	48
5.2.4. Fuerza de tensión diametral	49
5.2.5. Determinación de la porosidad	50
5.2.6. Análisis de área de superficie específica	51
5.2.7. Determinación del pH	51
5.2.8. Caracterización microestructural	51
5.2.9. Liberación de iones	52
5.2.10. Citocompatibilidad	53
5.2.11. Vehículo transportador de medicamentos	55

5.2.12. Estudio <i>in vivo</i>	57
6. RESUSLTADOS y DISCUSIÓN	65
6.1. Resultados de síntesis y caracterización	66
6.1.1. Difraccion de rayos X de los materiales sintetizados	67
6.1.2. Cemento A	70
6.1.3. Cemento B	84
6.1.4. Cemento C	91
6.2. Discusión de síntesis y caracterización	99
6.3. Resultados de citocompatibilidad	105
6.3.1. Cemento A	106
6.3.2. Cemento B	112
6.3.3. Cemento C	116
6.4. Discusión de los resultados de citocompatibilidad	121
6.5. Resultados de cemento como vehículo transportador de medicamentos	125
6.5.1. Cemento A	126
6.5.2. Cemento C	135
6.6. Discusión de los resultados del cemento como vehículo transportador de medicamentos	143
6.7. Resultados del estudio <i>in vivo</i>	147
6.7.1. Cemento A	151
6.7.2. Cemento B	158
6.7.3. Cemento C	162
6.8. Discusión de los resultados <i>un vivo</i>	169
7. CONCLUSIONES	175
8. BIBLIOGRAFÍA	177

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

El déficit de tejido óseo en el campo de la odontología es uno de los mayores problemas a los que nos enfrentamos los profesionales cuando elegimos como opción terapéutica restauradora la colocación de implantes osteointegrados o en los casos en que es necesario el tratamiento de defectos óseos ocasionados por traumatismos, infecciones o tumores.

El tejido óseo posee una alta capacidad de reparación espontánea cuando es lesionado, reponiendo después de un breve intervalo de tiempo, toda la parte perdida. Sin embargo, existen algunos casos en que los defectos son extensos y no tienen la capacidad de repararse espontáneamente, por lo que es necesario utilizar diversas técnicas quirúrgicas en la tentativa de reparar la deficiencia ósea. La reconstrucción de estas lesiones óseas es un reto para la ciencia, siendo utilizados para tal fin hueso autógeno, homogéneo, liofilizado, desmineralizado, así como materiales artificiales o sintéticos.

La investigación y el desarrollo de biomateriales han atravesado por varias fases, pero siempre con un único objetivo: reducir o eliminar el déficit óseo con un tejido neoformado de calidad, en vista de una recuperación funcional. En los últimos años los biomateriales han experimentado un espectacular avance. Una motivación importante para ello ha sido el hecho que la esperanza de vida aumente de forma considerable ^[1]. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE) ^[2], en España, entre 1991 y 2009 la esperanza de vida al nacimiento masculina ha pasado de 73,5 a 78,0 años y la femenina de 80,7 a 84,4 años. La longevidad masiva tiene implicaciones individuales relacionadas con mantener la calidad de vida.

Estos factores sociológicos han impulsado un gran avance en los biomateriales, potenciando la investigación en este campo. Si a esto se le añade la mejora de las técnicas quirúrgicas, se puede entender el crecimiento acelerado en la utilización de prótesis, implantes, sistemas y aparatos médicos que deben trabajar en contacto con los tejidos corporales.

El primer objetivo en la búsqueda de materiales para la aplicación biomédica ha sido la obtención de materiales biocompatibles, ya que estos materiales tienen que permanecer en contacto con los tejidos vivos, por lo que es imprescindible que posean

1. Introducción

una buena compatibilidad, es decir, que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfaz tejido-material.

El injerto óseo autólogo es probadamente el mejor sustituto óseo, porque puede formar hueso nuevo por mecanismos de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. Sin embargo, tiene desventajas porque aumenta el tiempo del procedimiento quirúrgico, tiene limitada la cantidad y forma del injerto, y también aumenta la morbilidad de la zona donante ^[3].

Debido a las limitaciones del injerto óseo autólogo, muchos biomateriales sintéticos se han desarrollado y caracterizado para la sustitución ósea durante las últimas décadas. Entre ellos tenemos a los cementos de fosfato cálcico (CPC) que fueron propuestos a principios de los años ochenta por LeGeros et al. ^[4] y, Brown y Chow ^[5]. Estos cementos han acaparado un elevado interés ya que permiten disponer de unos materiales que son totalmente biocompatibles ^[6]. Permiten rellenar totalmente una cavidad ósea y endurecen como un cemento en el lugar de aplicación. Estas propiedades son muy deseables en un amplio abanico de aplicaciones quirúrgicas, ya que el cirujano dispone de las propiedades de moldeabilidad, inyectabilidad y de adaptación completa a la cavidad que le proporciona el material.

Los CPC fueron clasificados dependiendo de su producto final en cementos de hidroxiapatita (HA) y cementos de fosfato dicálcico dihidratado (brushita). Los cementos de HA tienen mejores propiedades mecánicas que los cementos de brushita, aunque ambos son débiles para ser utilizados en zonas sometidas a carga ^[7]. Por otra parte, los CPC de brushita pueden tener una reabsorción más rápida que los CPC de apatita ^[8]. Sin embargo, *in vivo* se ha observado la transformación de brushita a apatita ^[9], perjudicando su tasa de reabsorción.

Los CPC tienen una resistencia mecánica relativamente baja y tiempos de fraguado en ocasiones inadecuados. La disponibilidad de CPC con resistencia mecánica próxima a la resistencia del hueso esponjoso humano y con tiempos de fraguado adecuados, aumentaría considerablemente el campo de aplicaciones potenciales de estos materiales, en la actualidad limitado a la odontología, la cirugía maxilofacial y reparación de fracturas en los miembros superiores. Estos inconvenientes están siendo

1. Introducción

objeto de diferentes estudios con el fin de solventarlos en el futuro. Así, existen estudios que demuestran que la incorporación de iones de estroncio y pirofosfato en cementos de brushita mejoran la reacción de fraguado y las propiedades mecánicas del material resultante ^[10].

La apatita biológica no está compuesta exclusivamente por HA, sino que contiene un considerable porcentaje de carbonato y otros elementos minoritarios, entre los que destaca el magnesio. Se puede representar mediante la fórmula general $(Ca,X)_{10}(PO_4,HPO_4,CO_3)_6(OH)_2$, donde “X” corresponde a cationes como magnesio, sodio o estroncio. El Magnesio (Mg) es considerado un ion importante utilizado como sustitución del calcio para modificar el comportamiento biológico y químico de las apatitas ^[11]. La incorporación de iones de Mg^{2+} en los CPC es actualmente considerado como una vía prometedora para aumentar la bioactividad de estas matrices en ingeniería ósea ^[12, 13]. Esto está fundamentado por la participación de este ión en varios procesos biológicos, como: proliferación y diferenciación celular, interacción matriz-célula, funcionamiento normal de las glándulas paratiroides y en el metabolismo de la vitamina D ^[14].

Un ejemplo lo proporciona la adhesión plaquetaria al colágeno, que ocurre a través de un mecanismo que depende de Mg^{2+} . Esto puede indicar que los iones Mg^{2+} son mediadores de la adhesión celular vía el complejo VLA-2 al colágeno ^[15]. Además, se ha descrito que los iones Mg^{2+} mejoran la proliferación y diferenciación de células derivada de células óseas y causan altos niveles de expresión en los receptores de integrina ^[16, 17, 18]. También aumentan la actividad de reabsorción de los osteoclastos ^[19]. Por el contrario, el déficit de Mg afecta a todas las etapas del metabolismo esquelético, causando cese del crecimiento óseo, disminución de la actividad osteoblástica y osteoclástica, osteopenia y fragilidad ósea. El déficit de Mg ha sido propuesto como un potencial factor de riesgo para osteoporosis humana ^[20] y la terapia con Mg fue propuesta para aumentar la masa ósea en pacientes con osteoporosis post-menopausia ^[21].

Las apatitas biológicas tienen relativamente alta cantidad de iones de Mg^{2+} (6mol%) en las primeras etapas de mineralización, sin embargo, este contenido desaparece durante la maduración ósea. Esto incentivó el estudio de la sustitución de

1. Introducción

iones de Ca^{2+} por iones de Mg^{2+} en diferentes fosfatos cálcicos. Esta sustitución aumenta la estabilidad de fosfatos cálcicos amorfos en solución acuosa [22, 23]. La introducción de iones de magnesio en la estructura del fosfato tricálcico β (β -TCP) ha aumentado su estabilidad como indica el aumento de la temperatura necesaria para su transformación a la forma α [24]. Además, la solubilidad del β -TCP disminuye cuando aumenta el contenido de iones Mg^{2+} , debido a un aumento en la estabilidad estructural y posible formación de una fase de tipo whitlockita en su superficie [25]. La sustitución de iones de calcio por iones de Mg^{2+} en HA ha aumentado su solubilidad, y ha mejorado la osteoconducción y reabsorción de los gránulos de HA [26].

A continuación se revisan las principales componentes y características del hueso y de los sustitutos óseos que se utilizan para reemplazarlo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. Revisión Bibliográfica

El núcleo de este trabajo de Tesis Doctoral es el desarrollo de un biomaterial para una aplicación clínica. La palabra biomaterial articula la unión entre dos áreas complementarias: la biología y los materiales, y en armonía con este significado empezamos este apartado con la discusión de los aspectos biológicos esenciales que describen la dinámica del tejido óseo y después presentamos los biomateriales que se emplean para conseguir la regeneración ósea.

2.1. Tejido óseo:

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que juntamente con el cartílago forman el sistema esquelético. Tiene tres funciones principales: mecánica (soporta el cuerpo y es zona de unión de la musculatura); protectora (de los órganos vitales y la médula ósea); y metabólica (como reserva de iones, especialmente calcio y fosfato) ^[27].

Desde un punto de vista anatómico, en el esqueleto se encuentran dos tipos diferentes de huesos: huesos planos derivados de la osificación intramembranosa como la escápula, la mandíbula y los huesos del cráneo y huesos largos formados por osificación endocondral como la tibia, el fémur y el húmero.

Macroscópicamente, el hueso largo está formado por tres partes diferenciadas: tiene dos extremidades (epífisis), la parte central (diáfisis) y una zona de transición entre ambas que se encuentra en continuo desarrollo (metáfisis). La epífisis y la metáfisis se originan a partir de dos centros de osificación independientes, y durante el crecimiento están separadas por una capa de cartílago llamada cartílago epifisario o plataforma de crecimiento. La proliferación y expansión del cartílago epifisario son las responsables del crecimiento longitudinal de los huesos. Se mineraliza progresivamente y será reemplazada por tejido óseo al final del periodo de crecimiento.

En el tejido óseo humano adulto se observa que está formado por hueso cortical o compacto (80% del volumen total de hueso) y de hueso trabecular o esponjoso (20% del volumen total de hueso). El hueso cortical es la porción externa densa y compacta que predomina en la diáfisis de huesos largos. El trabecular, forma la malla interior en las vertebrae, en los huesos planos como el coxal y en la epífisis de los huesos largos ^[28].

2. Revisión Bibliográfica

El hueso cortical y el trabecular están formados por las mismas células y la misma matriz pero existen diferencias estructurales y funcionales entre ambos. La primera diferencia estructural es cuantitativa: entre el 80%-90% del volumen en el hueso cortical está mineralizado mientras que en el trabecular solo el 15- 25% está calcificado. Esto nos lleva a una diferencia funcional: el hueso cortical lleva a cabo funciones mecánicas y de protección, mientras que el hueso trabecular participa fundamentalmente en las funciones metabólicas. El hueso es un tejido dinámico en constante remodelación durante toda la vida ^[29]. Las unidades de remodelación renuevan al cabo del año un 3-4% del hueso cortical y un 25-30% del trabecular ^[30].

Microscópicamente, el tejido óseo está constituido por células, matriz ósea (componentes orgánicos e inorgánicos) y factores solubles (Figura 1.)

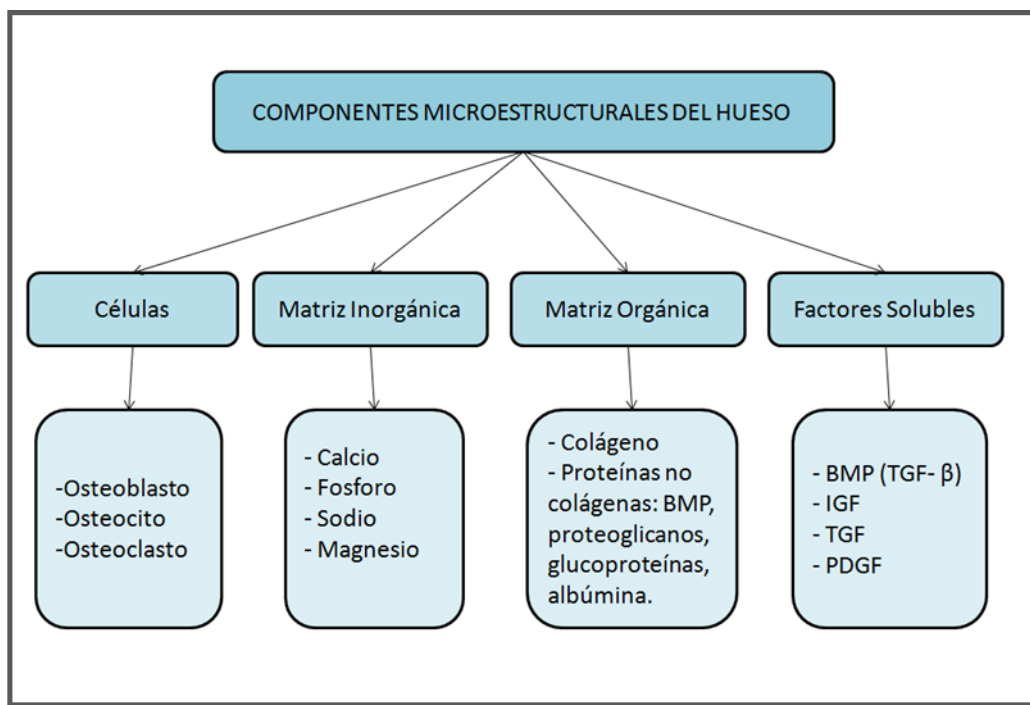


Figura 1. Componentes microestructurales del hueso

2.1.1. Componente celular:

En el hueso coexisten varios tipos de células: los osteoblastos son células encargadas de la formación del tejido óseo; los osteocitos son osteoblastos maduros rodeados de matriz mineralizada y los osteoclastos son células encargadas de reabsorber hueso.

2. Revisión Bibliográfica

- **Osteoblastos:** son las células responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética. Derivan de las células madre mesenquimales ^[31, 32]. La vida de un osteoblasto oscila entre una y diez semanas. Transcurrido ese tiempo pueden activar su mecanismo apoptótico antes de quedarse embebidos en la matriz ósea o bien convertirse en células de revestimiento (células del endostio o *lining cells*) o pueden quedar embebidos en la matriz ósea donde se diferencian hacia un estadio maduro dando lugar a los osteocitos ^[33].

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica, la Fosfatasa Alcalina (FA), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente, se sabe que los osteoblastos: 1) sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso; 2) dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular; 3) contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la FA; 4) median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas; 5) sintetizan factores de crecimiento ^[34].

- **Osteocito:** El osteocito es la célula más abundante del tejido óseo, constituyendo cerca del 95% del componente celular de este tejido ^[35]. Deriva de osteoblastos que han detenido la producción de matriz ósea y han quedado incorporados dentro de lagunas en el interior del hueso recientemente formado ^[36]. Tienen numerosas funciones, tales como actuar como un organizador de la remodelación ósea a través de la regulación de la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos. Esta célula tiene un papel en el metabolismo del fosfato y la disponibilidad de calcio y puede remodelar su matriz perilacunar. Los osteocitos pueden vivir durante años y quizás durante décadas, y son incapaces de dividirse ^[37].
- **Osteoclastos:** son células especializadas que derivan de monocitos que se originan en las células madres hematopoyéticas ^[38]. Son células de aproximadamente 100 μm de diámetro, multinucleadas y contienen entre 2 y 100 núcleos por célula ^[39]. Se encargan de la reabsorción del tejido mineralizado

2. Revisión Bibliográfica

en el recambio óseo normal y patológico ^[40], degradando la fracción orgánica de la matriz ósea mediante la producción de dos tipos de enzimas lisosómicas; las cisteínproteinasas (como la fosfatasa ácida tartrato resistente) que funcionan con pH ácido y las colagenasas, que actúan a pH neutro. La reabsorción ósea se desarrolla en dos fases, primero se solubiliza el mineral y luego se digiere la matriz orgánica, hasta que finalmente los osteoclastos mueren por apoptosis^[41].

2.1.2. Matriz ósea:

La matriz ósea mineralizada del hueso cortical (Figura 2) tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers que se extienden longitudinalmente.

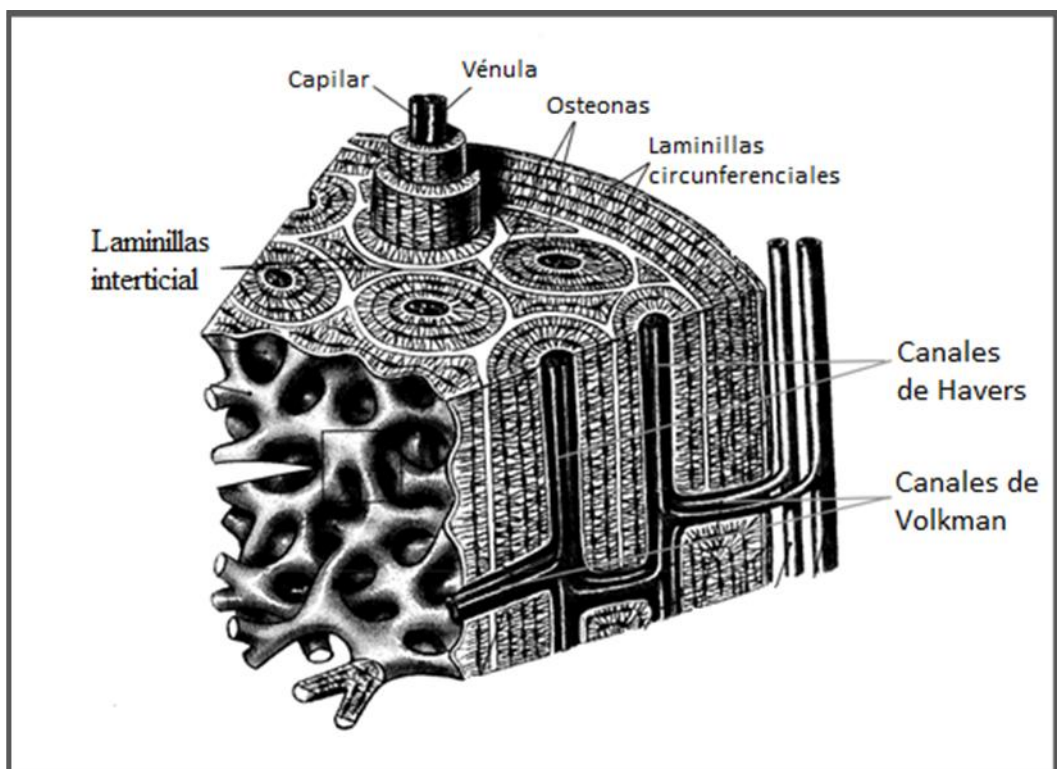


Figura 2. Estructura del hueso cortical ^[42]

Los canales de Havers están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkman que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños orificios o lagunas donde se

2. Revisión Bibliográfica

encuentran los osteocitos. Estas células intercambian nutrientes con el líquido intersticial a través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. El canal de Havers junto con las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos recibe el nombre de osteona o sistema de Havers. Las restantes láminas entre osteona se llaman láminas intersticiales.

A diferencia del hueso cortical, el hueso trabecular (Figura 3) no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estas trabéculas forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de la médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos.

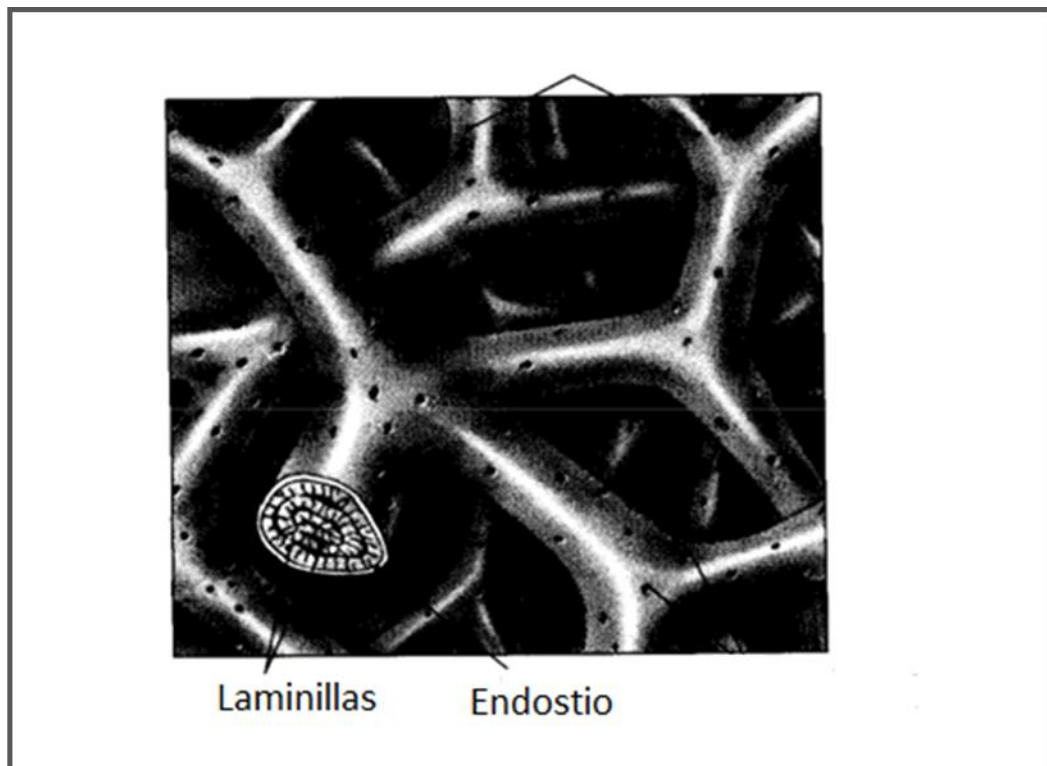


Figura 3. Estructura del hueso trabecular ^[42]

La matriz del tejido óseo es metabólicamente activa y se halla formada por una matriz inorgánica y una matriz orgánica:

2. Revisión Bibliográfica

A. Matriz Inorgánica:

La matriz inorgánica representa cerca del 50% del peso de la matriz ósea. Los iones más abundantes son el fosfato y el calcio. Hay también bicarbonato, magnesio, potasio, sodio y citrato en pequeñas cantidades (constituye alrededor del 99% del calcio, el 85% del fósforo y del 40 al 60% del sodio y el magnesio presentes en el cuerpo). El calcio y el fósforo forman cristales que, según muestran los estudios de difracción de rayos X, tienen la estructura de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)^[43].

B. Matriz Orgánica:

La parte orgánica de la matriz está formada por fibras de colágeno (85 - 90%) principalmente constituidas por colágeno de tipo I y una pequeña cantidad de sustancia fundamentalmente amorfa (10-15%) que contiene agregados de proteoglicanos y otras proteínas minoritarias (osteonectina, osteocalcina, sialoproteínas, etc.)^[44]. La asociación de hidroxiapatita con fibras colágenas es responsable de la dureza y resistencia característica del tejido óseo^[43].

- **Colágeno:** El 90% de la matriz extracelular está constituida por colágeno, sobre todo de tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y el colágeno tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas en la superficie de las células óseas^[45]. El colágeno contiene característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea^[46]. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre los aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.
- **Proteoglicanos:** Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de

2. Revisión Bibliográfica

proteoglicanos: el hialuronano y condroitín-sulfato que intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea, y el biglicano y la decorina de molécula más pequeña, que aparecen en las fases siguientes de la formación ósea ^[47, 48].

- **Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico:** Son la osteocalcina y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.
- **Glicoproteínas:** Son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD. La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal. La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico, necesario para la mineralización, a partir de ésteres fosfóricos. Existen varias isoenzimas y, entre ellas la isoenzima ósea, que se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica. Proteínas con el tripéptido RGD, también llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, con una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos ($\alpha v\beta 3$, entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales ^[47, 48].

2. Revisión Bibliográfica

- **Proteínas procedentes del plasma:** Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la α_2 -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

2.1.3. Factores solubles:

Son los factores integrados por proteínas con una importante actividad morfodiferenciadora y osteoinductora, fundamentalmente las proteínas morfogenéticas del hueso BMP-2, BMP-4 y BMP-7 que se expresan tanto en la osificación intramembranosa como endocondral ^[49,50]. Además de las BMP, relacionadas estructuralmente con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) ^[51], se encuentran también otros factores de crecimiento asociados a la matriz ósea, principalmente el factor de crecimiento insulínico (IGF) I y II, que ejercen una acción mitogénica y diferenciadora sobre los osteoblastos, y median en la interacción osteoblasto-osteoclasto ^[52], los TGF- β , producidas por los osteoblastos, que estimulan la síntesis de colágeno tipo I y de proteínas no colágenas ^[53], y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que estimula tanto la síntesis proteica por los osteoblastos como la reabsorción ósea por los osteoclastos ^[54]. La tabla 1 resume la acción biológica de las BMP y los factores de crecimiento ^[55].

Tabla 1. Acción biológica de las BMP y los factores de crecimiento ^[65]

Factores de Crecimiento	Acción Biológica
BMP-2	Morfogénesis de hueso y cartílago
BMP-4	Morfogénesis de hueso y cartílago
BMP-7	Diferenciación ósea
TGF- β	Estimula / inhibe la reparación ósea
IGF	Incrementa la densidad ósea
FGF	Actúa en fases finales de linaje osteogénico
PDGF	Incrementa la osteoinducción de matriz ósea desmineralizada

2. Revisión Bibliográfica

2.2. Formación, Remodelado y Reparación ósea:

Después de haber resumido los componentes principales del tejido óseo procedemos a describir los procesos de formación, remodelación y reparación ósea.

2.2.1. Formación ósea:

El desarrollo y formación del esqueleto (osificación) ocurre por 2 procesos distintos: osificación intramembranosa y osificación endocondral. Ambas osificaciones ocurren cerca del crecimiento vascular ^[56].

- **Osificación intramembranosa:**

La osificación intramembranosa es el proceso mediante el cual se forma hueso sobre las membranas de tejido conectivo fibroso. El hueso se forma a partir de la mesénquima, sin pasar por una etapa cartilaginosa. Este proceso se lleva a cabo de la siguiente forma:

Las células mesenquimatosas de las membranas de tejido conectivo fibroso se condensan en el sitio donde se desarrollará hueso, momento en el cual se diferencian, inicialmente en células madres (osteógenas) y luego en osteoblastos. Estos osteoblastos constituyen un depósito de matriz ósea que conduce a la formación de espículas óseas.

Estas espículas crecen y se desarrollan para luego fusionarse con otras espículas para formar trabéculas. Como el aumento de las trabéculas en tamaño y número se interconectan formando tejido óseo (una estructura desorganizada débil con una alta proporción de osteocitos), después de unos días, se deposita sales de calcio y otros minerales, endureciendo la matriz (calcificándola) que resultará en un tejido óseo más organizado, fuerte y laminar.

Entre la interfaz del tejido trabecular y el mesénquima se crean vasos sanguíneos y al exterior del hueso, la mesénquima se convierte en periostio.

Este tipo de osificación ocurre durante el desarrollo embrionario, y está involucrado en el desarrollo de los huesos planos del cráneo, gran parte de los huesos de

2. Revisión Bibliográfica

la cara, partes de la mandíbula y la clavícula ^[57, 58]. Por el contrario, los huesos de las articulaciones que soportan carga se desarrollan por osificación endocondral.

- **Osificación Endocondral:**

La osificación endocondral utiliza propiedades funcionales del cartílago y el hueso para proporcionar un mecanismo para la formación y el crecimiento del esqueleto. Esta osificación se lleva a cabo en dos etapas: condrogénesis y osteogénesis, de la siguiente forma: ^[59, 60].

Durante la condrogénesis las células mesenquimales proliferan y se diferencian en precondroblastos y posteriormente en condroblastos, estas células secretan matriz cartilaginosa y se van quedando embebidas en su propia matriz formando una laguna. Las células en la laguna se encuentran en fase de diferenciación terminal (condrocitos) y ayudan en el aumento de longitud del hueso gracias a su continua división y secreción de matriz cartilaginosa. Finalmente estos condrocitos crecen hasta hipertrofiarse para luego explotar y liberar su contenido, lo que modifica el pH de la matriz; este cambio activa la calcificación. Una pequeña cantidad de condrocitos mueren porque la matriz no puede difundir nutrientes con suficiente velocidad, formando entonces lagunas que se fusionan para formar cavidades pequeñas.

La etapa de osteogénesis comienza cuando la arteria nutricia penetra tanto el pericondrio como el cartílago en osificación por la parte central del modelo cartilaginoso, lo cual estimula a las células ubicadas en el pericondrio para diferenciarse en osteoblastos. Una vez ocurre esto, las células subyacentes al pericondrio se osifican en una capa delgada (hueso compacto). Cuando el pericondrio se osifica se denomina periostio. En el centro del cartílago (el cual se está osificando) se generan capilares periosticos que en conjunto con los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos recibe el nombre de yema periostica, cuando crece el modelo cartilaginoso, se crean centros de osificación, región en la cual se sustituye el cartílago por tejido óseo. Posteriormente, los osteoblastos depositan matriz ósea sobre los residuos de cartílago calcificado generando las trabeculas del hueso esponjoso, cuando el hueso se alarga los osteoclastos destruyen el tejido esponjoso, lo cual permite la osificación periostica. Los huesos

2. Revisión Bibliográfica

formados por este proceso incluyen los de columna vertebral, la pelvis y las extremidades [61, 62].

2.2.2. Remodelación ósea:

El hueso es una compleja estructura que está en un constante proceso de formación y destrucción durante toda la vida del individuo, en lo que se denomina remodelación ósea. Este fenómeno, balance entre la reabsorción y la neoformación ósea, permite una restructuración interna en función de las nuevas situaciones mecánicas y de cargas, compensando así el desgaste existente. Este fenómeno permite la renovación de un 3-4% del hueso cortical y un 25-30% del hueso trabecular cada año. Sólo hasta la tercera década el balance es positivo para la formación de hueso, manteniéndose el equilibrio hasta los 50 años. A partir de aquí, existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir. En este proceso se distinguen varias etapas (Figura 4).

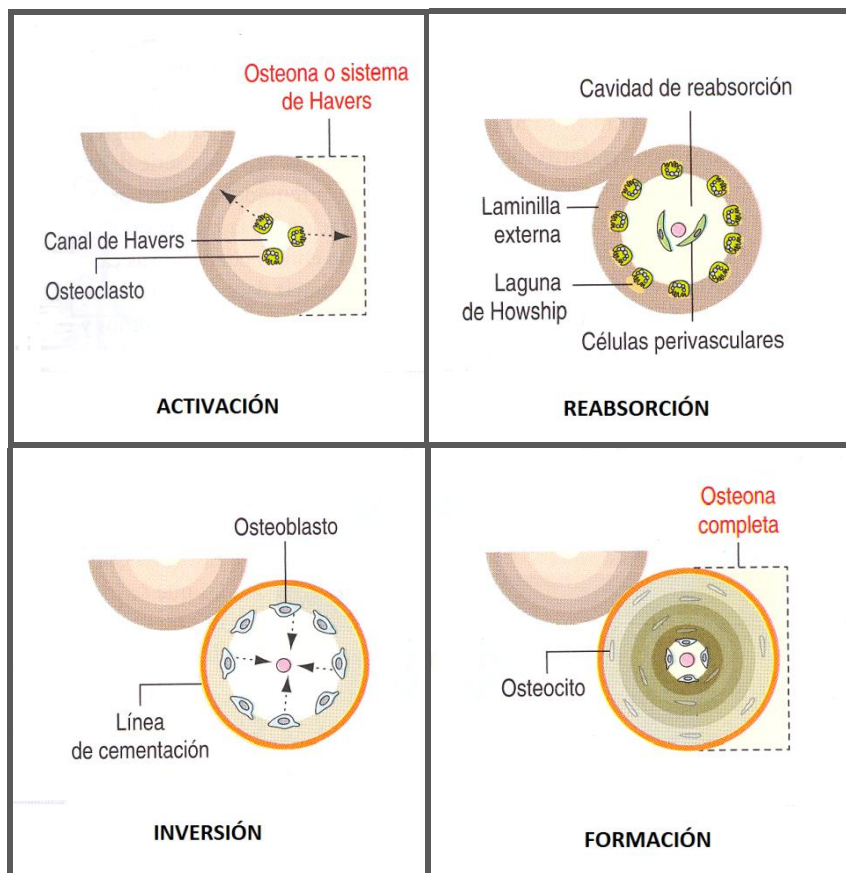


Figura 4. Fases de la remodelación ósea [62]

2. Revisión Bibliográfica

La primera etapa de la remodelación ósea involucra la **activación** de la superficie ósea en reposo antes de la resorción. Aunque el proceso de activación no se conoce bien, se cree que es por la retracción de las células del endostio y la digestión de la membrana del endostio, esto último posiblemente ocurra como resultado de la producción de colagenasas por las células del endostio ^[63], debido a “señales” no bien conocidas. Se estimulan estos eventos por cambios en las fuerzas mecánicas locales, cambios en la situación endocrinológica general del individuo, cambios en el ambiente paracrino del lugar que va a ser remodelado y cambios en la propia estructura ósea surgidos como consecuencia del envejecimiento o del sufrimiento de un daño.

Luego los precursores de osteoclastos son atraídos a la superficie expuesta del hueso mineralizado y se fijan al hueso gracias a la afinidad de una integrina presente en la superficie de los osteoclastos (avb3) por determinadas proteínas de la matriz ósea (vitronectina, fibronectina). Tal unión se sigue de la activación en el osteoclasto de la quinasa p60^{c-src}, molécula que interviene en la organización del citoesqueleto del osteoclasto, lo que permite a estas células adoptar la típica configuración que caracteriza al osteoclasto activo, con el borde rugoso y un anillo rico en filamentos de actina que rodea a la zona rugosa, y que al unirse a la matriz, sella el espacio que queda entre ambas, aislándolo del microambiente óseo. Tras fijarse a las superficies óseas, los osteoclastos maduros comienzan la **reabsorción** del hueso. Tras finalizar su actuación, los osteoclastos desaparecen por apoptosis.

Una vez finalizado el fenómeno de reabsorción, la superficie ósea queda libre de células, excepto por la presencia de unos pocos fagocitos mononucleares cuya estirpe se ha venido considerando macrofágica, aunque podría ser osteoblástica, y que, además de limpiar la cavidad, tiene la función de formar la línea de cementación sobre la que se depositará el hueso nuevo. Es la **fase de inversión**, durante la cual probablemente se establecen señales que reclutan osteoblastos. Tras este periodo de aparente inactividad van llegando al hueso los precursores de los osteoblastos que proliferan y se diferencian a osteoblastos maduros llenando con nuevo tejido óseo el hueco previamente labrado por los osteoclastos. No se conocen con exactitud los mecanismos íntimos que determinan el acoplamiento entre los osteoblastos y los osteoclastos, aunque se cree que intervienen algunos factores de crecimiento que, enterrados en la matriz ósea al

2. Revisión Bibliográfica

formarse la misma, son liberados desde ella cuando es destruida. Se desarrolla así la cuarta fase o de **formación** en la que los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz osteoide que posteriormente se mineralizará. A los 30 días del depósito de la matriz osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 días en el hueso trabecular.

Se considera que aproximadamente la mitad de los osteoblastos formadores de hueso mueren por apoptosis. La otra mitad, o bien se transforma en osteoblastos de superficie (células de recubrimiento) recubriendo el hueso recién formado, o bien, a medida que forman hueso, quedan enterrados en él, transformándose en osteocitos ^[30, 64].

2.2.3. Reparación ósea:

Más allá del recambio fisiológico, es sabido que cuando el hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica se origina su fractura y es cuando se pone en marcha un proceso de autoreparación que conduce a la reposición de la estructura y función perdidas. En contraste con otros tejidos la reparación ósea no deja cicatriz, así que se considera dicha transformación como regeneración ^[65].

La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Desde los estudios de Trueta ^[66], se sabe de la importancia de los vasos sanguíneos en la osteogénesis. Tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina. La respuesta inicial a una fractura es semejante a la respuesta a cualquier lesión que produzca destrucción de los tejidos y hemorragia. Los neutrófilos son las primeras células que llegan a la escena, seguidos por macrófagos que comienzan a limpiar el sitio de la lesión. Luego proliferan los capilares y los fibroblastos, que invaden el tejido dañado. Se forma un tejido conjuntivo laxo nuevo, el tejido de granulación, que se torna cada vez más denso y en algunas partes da origen a cartílago. Tanto los fibroblastos como las células periósticas participan en esta fase del proceso de curación. El tejido conjuntivo denso y el cartílago neoformado proliferan, cubren el hueso en el sitio de la fractura y forman un callo. El callo se formará aunque los fragmentos óseos no estén en

2. Revisión Bibliográfica

aposición uno frente a otro. Este callo contribuye a estabilizar y unir los fragmentos del hueso fracturado.

Mientras se está formando el callo las células osteoprogenitoras del periostio se dividen y se diferencian en osteoblastos. Los osteoblastos neoformados comienzan a sintetizar tejido óseo nuevo en la superficie externa del hueso a cierta distancia de la fractura. Esta osificación avanza hacia el sitio de la fractura hasta que el hueso nuevo forma una vaina ósea sobre el callo fibrocartilaginoso. Brotes osteógenos de este hueso nuevo invaden el callo y comienzan a sintetizar tejido óseo dentro de él, con lo que gradualmente se produce el reemplazo del callo fibroso y cartilaginoso original por un callo óseo. El cartílago del callo original se calcifica y es reemplazado por tejido óseo como en la osificación endocondral.

En la cavidad medular también hay proliferación y diferenciación endóstica y el hueso medular crece desde ambos extremos de la fractura hacia el centro. Cuando ambos frentes de proliferación ósea se fusionan en el centro de la fractura la unión ósea de los fragmentos del hueso fracturado producida por los osteoblastos derivados tanto del periostio como del endostio consisten en hueso trabecular. Al igual que en la osificación normal, el hueso trabecular gradualmente es reemplazado por el hueso cortical. Mientras se está formando el hueso cortical el callo óseo es eliminado por la acción de los osteoclastos y el remodelado gradual restablece la forma original del hueso.

En las personas sanas este proceso suele durar de 6 a 12 semanas, según la gravedad de la fractura y el hueso particular que se ha fracturado. La reducción de la fractura (reaproximación de los fragmentos óseos) y su contención, es decir su inmovilización en la posición normal por medio de fijación interna (clavos, tornillos) o fijación externa (férulas, escayolas), acelera el proceso de curación y suele permitir una restauración estructural y funcional mejor ^[67].

2. Revisión Bibliográfica

2.3. Injertos óseos:

El proceso de reparación ósea es un proceso que generalmente se da de manera natural. Sin embargo, en aquellos casos en los que el hueso no se regenera adecuadamente debido al tamaño del defecto o en las situación clínicas donde es necesario ganar materia ósea adicional (proceso de aumentación vertical, horizontal o ambos) se hace necesaria la utilización de un injerto de hueso o un sustituto óseo con la finalidad de restablecer la integridad anatómica y funcional de la estructura alterada.

El injerto óseo ideal debe inducir a los siguientes procedimientos:

- Osteogénesis: Las células (osteoblastos y preosteoblastos) vivas son transportados de una parte del organismo a otra, donde establecen centro de formación ósea ^[68]. El ejemplo más claro de utilización de este mecanismo es el hueso autólogo trasplantado.
- Osteoinducción: proceso por el que las células madre mesenquimatosas son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo ^[69, 70].
- Osteoconducción: es una propiedad de la matriz que favorece la osteogénesis posterior ^[71], es un proceso en el que tienen lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madres mesenquimatosas, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje o matriz permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interfase huésped-injerto ^[72].

2. Revisión Bibliográfica

2.3.1. Tipos de injertos:

Según el origen del injerto se clasifican en:

- **Autoinjerto:** La estrategia más usada durante años para solucionar problemas óseos ha sido el autoinjerto. Este tipo de injerto se compone por tejido tomado del mismo individuo, y proporciona mejores resultados, ya que es el único que cumple con todos los mecanismos de regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), además evita la transmisión de enfermedades y el rechazo inmunológico. Sin embargo, la obtención de un injerto autólogo presenta desventajas debido a que aumenta el tiempo del procedimiento quirúrgico, porque requiere de una segunda zona quirúrgica para obtener el hueso.

Las zonas donantes intraorales más frecuentes son el mentón y la región retromolar ^[73, 74]. Presenta ventajas al no requerir anestesia general y evitar las cicatrices cutáneas. Sin embargo, en ambos casos la cantidad de hueso disponible es limitada. Cuando la cantidad de hueso es mayor, se suele recurrir a zonas extraorales como la calota y la cresta iliaca ^[75, 76], esta intervención aumenta la morbilidad relacionada con la pérdida de sangre, complicaciones postoperatorias, pérdida sensorial local y dolor crónico ^[77, 78].

- **Aloinjertos (hueso de banco):** un aloinjerto es un tejido transferido entre dos individuos genéticamente diferente de la misma especie; este injerto cuenta con capacidad de osteoinducción y osteoconducción, y según Betts "se comporta como una estructura que permitirá la neoformación ósea a partir del remplazo gradual que sufre el injerto por el hueso del huésped, haciendo este proceso lento y con considerable pérdida de volumen" ^[79].

Las ventajas de la utilización de aloinjertos, es que el material está disponible en grandes cantidades, adecuado para defectos extensos, potencial osteoinductor (menor que el autoinjerto) y osteoconductor, ausencia de trauma para obtener el material y existe un banco de huesos. Y las limitaciones de la utilización de aloinjertos es que existe una posibilidad de infección, obstruyen mecánicamente

2. Revisión Bibliográfica

la cicatrización y pueden desencadenar una respuesta antigénica. Además, el injerto tiene que pasar por un proceso de preparación ^[80, 81], y este proceso de preparación no está muy detallado para proteger la patente de cada banco de hueso.

En odontología, aloinjertos como matriz dérmica acelular se ha utilizado ampliamente en cirugía plástica periodontal para corregir defectos mucogingivales y alveolares ^[82, 83]; También, la matriz de hueso desmineralizado es ampliamente empleado en el relleno de defectos óseos y en elevaciones sinusales ^[84, 85], entre otros.

- **Xenoinjertos:** Este tipo de injerto cuenta con la capacidad de osteoconducción y están fabricados de derivados naturalmente desproteinizados del hueso esponjoso de otra especie (como el hueso bovino, porcino y equino). El riesgo de la transmisión de enfermedades como la Encefalopatía Espongiforme Bovina es mínima, porque el componente orgánico del hueso es extraído. Las ventajas y desventajas de usar xenoinjertos son similares a los aloinjertos ^[86]. Numerosas publicaciones han referido el uso de hueso bovino desproteinizado en injertos de seno o alveolo de extracción ^[87, 88].
- **Aloplásticos:** son materiales de relleno de origen sintético, como los fosfatos cálcicos sintéticos (hidroxiapatita, fosfato tricalcico) o de origen natural (coralina). La filosofía que subyace en su empleo es aportar un material cuya composición mineral se asemeje a la del hueso, y que sirva como matriz osteoconductor sobre la que se vayan formando las nuevas estructuras óseas, hasta que finalmente, sea sustituida íntegramente por estas ^[89].

Estos materiales deben de tener los siguientes requerimientos:

- Ser biocompatibles.
- Deben ser capaces de servir como una superficie de anclaje para las células del huésped.
- Deben de ser porosos para permitir la osteoconducción.

2. Revisión Bibliográfica

- Deben ser progresivamente reabsorbidos y sustituidos por hueso nuevo ^[90].

La aplicación clínica de injertos aloplásticos se ha reportado en defectos vestibulares, en sitios de extracción, elevación interna del seno, elevación lateral del seno, expansión de cresta alveolar, en defectos periodontales, etc.

2.4. Biomaterial de sustitución ósea:

La investigación en el área de los biomateriales en sentido amplio se inició hace ya muchos siglos puesto que es posible encontrar trazas de prótesis implantadas en momias egipcias. Sin embargo, es a partir de la segunda guerra mundial cuando, en un intento de resolver los problemas cotidianos asociados al tratamiento masivo de pacientes, aparece un vasto campo asociado a la tecnología médica y en concreto va tomando cuerpo una ciencia de los biomateriales. La definición de biomaterial ha sido muy laboriosa y difícil. Tanto es así que no es hasta marzo de 1986, en una conferencia celebrada en Chester (Reino Unido) y convocada por las diferentes sociedades internacionales de biomateriales con el fin de encontrar por consenso definiciones comunes, cuando se aprueba la primera definición de biomaterial: “un material no vivo utilizado en un aparato médico y concebido para interactuar con sistemas biológicos”. La segunda conferencia de consenso sobre la definición en el campo de biomateriales, celebrada en Chester (Reino Unido) en 1991, consensuó 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 reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo” ^[91].

En la década de los 60 y 70, el principal objetivo para escoger un biomaterial era conseguir unas propiedades físicas adecuadas con una respuesta tóxica mínima. Se buscaba que los materiales fueran lo más inerte posible. En la década de los 80, se empezaron a introducir la denominada segunda generación de biomateriales. El objetivo no era sólo conseguir que la respuesta fuera lo menos tóxica sino una interacción controlada con el organismo. Este tipo de materiales suponía un avance respecto a la biocompatibilidad. Dentro de este grupo de materiales se pueden encontrar los materiales bioactivos: Materiales que producían una respuesta en el organismo llegando

2. Revisión Bibliográfica

a formar una unión directa con el mismo. Otro grupo de materiales de segunda generación, era los materiales reabsorbibles. Este grupo de materiales se degradaba in vivo una vez cumplida su función ^[92].

La tendencia actual en el mundo de los biomateriales es la búsqueda de lo que se ha denominado como biomateriales de tercera generación: aunar los conceptos de bioactividad y reabsorción en un sólo biomaterial y además se pretende que provoquen respuestas celulares específicas a nivel molecular. Esto hace que la investigación en esta área sea interdisciplinar entre distintos campos científicos. Es bajo este nuevo concepto de investigación que ha aparecido lo que se ha denominado como Ingeniería de Tejidos.

La Ingeniería de Tejidos, según la definición clásica de Langer y Vacanti, es la aplicación de los principios de la biología y de la ingeniería para el desarrollo de sustitutos funcionales para un tejido dañado. Las principales áreas de investigación van encaminadas a la reparación o sustitución de hueso, cartílago, piel, vasos sanguíneos y válvulas cardíacas ^[93].

El grado de sofisticación de los biomateriales ha aumentado significativamente. Actualmente, algunos biomateriales son ricos en información rutinaria e incorporan componentes biológicamente activos derivados de la naturaleza ^[94], procurando mitigar el sufrimiento, restituir las funciones y prolongar la vida ^[95].

El primer objetivo en la búsqueda de materiales para la aplicación biomédicas ha sido la obtención de materiales biocompatibles, debido a que los sistemas vivos, sobre todo los animales superiores, tienen un complejo sistema de protección contra la invasión de otros organismos, nuestro cuerpo tiene una capacidad increíble para determinar si un objeto es material propio del cuerpo o si es ajeno. Cualquier sustancia ajena al cuerpo podría generar una respuesta de nuestro sistema inmunológico. Los objetos de tamaño molecular son capturados por anticuerpos y eliminados, mientras que los objetos más grandes inducen una reacción inflamatoria en torno suyo. Algunos materiales son más biocompatibles; es decir, se integran más fácilmente al cuerpo sin reacciones inflamatorias. Los factores más importantes que determinan la biocompatibilidad son la naturaleza química y la textura de la superficie del objeto ^[96].

2. Revisión Bibliográfica

Las funciones que debe cumplir un biomaterial pueden ser muy variadas: desde una función mecánica, como en las prótesis ortopédicas hasta una función eléctrica, como en los marcapasos o quimicobiológicas como en el caso de membranas para diálisis. Por otra parte, para ciertas aplicaciones son necesarios biomateriales biodegradables, y para otras biomateriales inertes que a la larga no encuentre ningún tipo de rechazo. En cualquier caso, es imprescindible la estrecha colaboración entre expertos en ciencia de materiales, expertos en física y química de superficies, biólogos celulares, y médicos y cirujanos de las distintas especialidades involucradas para evaluar y seleccionar los biomateriales más adecuados para cada aplicación^[91].

2.4.1. Conceptos básico en el campo de biomateriales:

A continuación explicamos unos conceptos muy empleados en el campo de biomateriales: biocompatibilidad, materiales biodegradables, materiales bioinertes y materiales bioactivos

- **Biocompatibilidad:**

Como otros conceptos científicos importantes, que evolucionan con el tiempo, la definición de biocompatibilidad ha ido cambiando junto con los progresos realizados en materiales empleados para dispositivos médicos. Hasta hace pocos años, un material biocompatible era aquél que no hacía daño al organismo. Eran en esencia materiales inertes “con la propiedad de no producir efectos dañinos o tóxicos sobre sistemas biológicos”.

Sin embargo nuevos desarrollos, incluyendo los basados en el empleo de materiales activos, hacen que este concepto cambie al de “habilidad de un material para cumplir su misión de manera adecuada en una aplicación específica para un paciente concreto”. Así el concepto presenta cuatro facetas fundamentales:

- La biocompatibilidad no hace referencia a un evento o fenómeno aislado. Se aplica a un conjunto de procesos que incluyen diversos mecanismos de interacción entre el material y el tejido biológico adyacente.

2. Revisión Bibliográfica

- La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un material para realizar una función en el organismo y no simplemente a permanecer en dicho organismo de forma inerte. Además la capacidad del material para llevar a cabo su función, no sólo depende de propiedades fisicoquímicas intrínsecas al material, sino también de su interacción con los tejidos
- Es importante destacar la necesidad de considerar la respuesta positiva por parte del paciente concreto o huésped del dispositivo. Ya no se busca que no haya respuesta, sino que la respuesta, por mínima que sea, sea acorde a la función que el dispositivo debe realizar.
- La definición más actual hace también referencia a la aplicación específica. Por ejemplo un mismo material con geometrías diferentes o en órganos distintos puede dar lugar en un caso a una aplicación final biocompatible y puede fallar en la otra situación.

Así pues la biocompatibilidad no puede considerarse una propiedad intrínseca a un material, sino que debe enfocarse desde una perspectiva más global que implica al conjunto material – aplicación –organismo ^[97].

- **Materiales biodegradables o bioabsorbibles:** tienen la capacidad de ser compatibles con el organismo y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados, dando lugar a productos no tóxicos y que pueden ser eliminados o metabolizados por el organismo. Algunos materiales de esta familia son la hidroxiapatita porosa, las sales de fosfato de calcio, algunos poliuretanos, etc.
- **Materiales bioinertes:** Caracterizados por la muy baja reactividad con el organismo, de tal manera que coexiste con el tejido adyacente sin cambios aparentes en las funciones y propiedades de dicho tejido. Típicos materiales de este tipo empleados en dispositivos implantables son el tantalio, el titanio, el aluminio, óxido de zirconio.
- **Materiales bioactivos:** Tienen la capacidad de formar enlaces químicos directos con el tejido adyacente, permitiendo el libre crecimiento de dicho tejido sobre su

2. Revisión Bibliográfica

propia superficie. Como ejemplos de estos materiales pueden citarse la hidroxiapatita de alta densidad o el fosfato tricálcico ^[98].

2.4.2. Clasificación de los biomateriales implantables, según su composición química:

- **Biomateriales metálicos:**

Aunque históricamente se han utilizado diversos materiales metálicos para implantes en el organismo, en la actualidad el número de metales y aleaciones que se utilizan de manera más habitual es bastante limitado. El principal problema de los materiales metálicos es la corrosión, que se produce debido al contacto del metal con el fluido corporal salino que es altamente corrosivo. Como consecuencia de esta corrosión se liberan iones metálicos con una gran facilidad para incorporarse al torrente sanguíneo y cuyo efecto puede ser muy perjudicial, y como consecuencia el material se deteriora y el implante se debilita ^[99, 100, 101]. Los metales y aleaciones utilizados como biomateriales tienen como característica común una buena resistencia a la corrosión. Se utilizan aceros inoxidable, aleaciones base cobalto-cromo, y titanio y sus aleaciones. Otros metales usados en menor medida son el tantalio y metales nobles como platino y oro ^[91].

- **Biomateriales poliméricos:**

Los biomateriales poliméricos presentan alta ductilidad, bajo peso y fácil conformado y mecanizado. Otra propiedad importante es que se pueden presentar en forma de fibras, bloques densos, películas y geles. Sin embargo, debido a que presentan bajos módulos elásticos en comparación con el hueso, estos materiales se aplican principalmente en la sustitución de tejidos blandos como piel, cartílagos y ligamentos. Uno de los primeros materiales poliméricos usados en medicina ha sido el polietileno de alto peso molecular. Este polímero es de tipo termoplástico y está formado por cadenas de muy elevada longitud. Las cadenas largas, ayudan a transferir la carga de forma más efectiva lo que resulta en un material muy tenaz con una resistencia mecánica al impacto mejor que la de cualquier material polimérico termoplástico sintetizado hasta el momento. El polietileno de alto peso molecular es muy resistente a los productos químicos corrosivos con la excepción de algunos ácidos, tiene un coeficiente de fricción muy bajo ya que se caracteriza por presentar autolubricación y una elevada resistencia a

2. Revisión Bibliográfica

la abrasión. Las propiedades mecánicas y tribológicas de este material hacen que sea habitualmente utilizado en sustituciones de articulaciones.

Otro material polimérico muy utilizado en el campo de la medicina debido a su alto grado de biocompatibilidad con el tejido humano, es el polimetilmetacrilato. Este material se emplea principalmente como cemento óseo para fijar los implantes y remodelar el hueso desaparecido. El monómero se suministra en forma de polvo que se mezcla con un líquido para formar una pasta que se endurece gradualmente, sin embargo, aunque el polímero sea biocompatible, el monómero tiene efectos cancerígenos e irritantes.

La principal desventaja que presentan los materiales poliméricos utilizados en implantes articulares es el desgaste debido a la fricción producida entre las piezas de estos implantes. Este desgaste genera partículas de polímero que pueden derivar en un aflojamiento aséptico y reabsorción del tejido óseo al intentar ser fagocitadas. Por otro lado existe cierta tendencia por parte de algunos polímeros a desprender ácidos perjudiciales y otras toxinas durante el proceso de disolución.

- **Biomateriales cerámicos:**

En el siglo XX, en la década de los 70, la bioactividad de los fosfatos de calcio despertó un enorme interés, en aplicaciones relacionadas con los tejidos duros. La Traumatología, la Cirugía plástica y la Odontología intentaban dar solución a problemas relacionados con los tejidos óseos. Enfermedades como la osteoartritis, la artrosis, la osteoporosis, el osteosarcoma, las grandes pérdidas de masa ósea causadas por vía traumática llevan asociados problemas de sustitución, de relleno, de fijación, de osteointegración y de biocompatibilidad difíciles de resolver.

Los biomateriales cerámicos se introducen en una época en la que comenzaban a detectarse fracasos en los biomateriales utilizados hasta ese momento, como eran el acero, aleaciones de cobalto y polimetilmetacrilato. También como un sustituto ideal al injerto autólogo por sus limitaciones, por que los biomateriales cerámicos tienen una composición similar al del tejido óseo y tienen reconocidas propiedades osteoconductoras y son capaces de otorgar un andamiaje que en forma progresiva es

2. Revisión Bibliográfica

sustituido por tejido óseo diferenciado ^[6]. Hoy en día se dispone de información abundante sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos materiales.

Las cerámicas de fosfatos de calcio, como por ejemplo la hidroxiapatita (HA) o el fosfato tricálcico beta (β -TCP), pretenden dar solución al relleno de una cavidad y a su futura colonización por nuevo tejido óseo. Las cerámicas de HA y de β -TCP son biocompatibles y osteoconductoras, es decir, son toleradas por el organismo y, en el caso de que sean porosas, aportan una estructura abierta de poros interconectados sobre la que se facilita la aposición de nuevo tejido óseo por los osteoblastos. Desde un punto de vista cristalino, la HA es más semejante a la hidroxiapatita natural de los tejidos óseos que el β -TCP y, por lo tanto, representa un mejor material estructural para el crecimiento óseo. Por contra, la velocidad de reabsorción de la HA es extremadamente lenta comparada con el β -TCP y, por lo tanto, el hueso neoformado a través de la red porosa de la HA no puede experimentar la carga mecánica que necesita para remodelarse (Ley de Wolff) en tanto en cuanto la HA permanezca resistente. Otras cerámicas de fosfatos de calcio poseen solubilidades mayores que la capacidad regenerativa del tejido óseo y en este sentido tampoco son aptas para rellenar una cavidad que quiere ser colonizada y sustituida gradualmente por nuevo tejido óseo. Otros problemas asociados a este tipo de sustitutos óseos residen en la imposibilidad de obtenerlos en la forma y tamaño necesarios según la aplicación clínica en el momento de la intervención y, por lo tanto, se disponen en formas prefabricadas para ser utilizados como gránulos o bloques, con el consiguiente problema de desplazamiento dentro y lejos de la cavidad.

Ante estas perspectivas surgió, en la década de los 80, la idea de un nuevo sustitutivo óseo: los **cementos de fosfatos de calcio** propuestos por LeGeros et al. ^[2], Brown y Chow ^[3]. Un biomaterial que incorpora en sí mismo las ventajas de los fosfatos de calcio y además pudiera utilizarse como un cemento. Un sistema cementante se puede entender en base a la capacidad de una fase sólida que al ser mezclada con una fase líquida forma una masa coherente y moldeable que endurece con el tiempo resentando cierta resistencia mecánica. Las ventajas son enormes ya que el cirujano dispone de las propiedades de moldeabilidad, inyectabilidad ^[102] y de adaptación completa a la cavidad que le proporciona el material, in situ, en el lugar de operación. Asimismo, el tejido óseo implantado se ve beneficiado inicialmente por las propias

2. Revisión Bibliográfica

características de fraguado del material que aporta, en un tiempo clínicamente aceptable. La excelente biocompatibilidad de los cementos de fosfatos de calcio hace que sean potencialmente útiles en una gran variedad de aplicaciones quirúrgicas.

Los cementos de fosfatos de calcio presentan como ventajas respecto a los injertos óseos y otros biomateriales formulados para la sustitución ósea las siguientes características ^[103, 104, 105, 106]:

- Disponibilidad ilimitada del biomaterial para sus aplicaciones biomédicas validadas.
- Condición de materiales biodegradables que evita los potenciales efectos adversos o de toxicidad en el largo plazo.
- Características de biomateriales sintéticos por lo que carecen del riesgo de transmisión de enfermedades al receptor y ausencia de morbilidad quirúrgica en su obtención.
- Propiedades positivas para constituir materiales compuestos con otros biomateriales no cerámicos, como los polímeros.
- Moldeabilidad intraoperatoria que permite proporcionar al biomaterial la forma adecuada para rellenar el defecto óseo a sustituir.
- Buena fijación y aposición al defecto óseo que evita los problemas de migración del material que se observa con las formulaciones como polvos, gránulos o bloques.
- Reacción exotérmica limitada durante el fraguado, con escaso aumento de temperatura, que evita la lesión del tejido receptor.
- Versatilidad de procesamiento del cemento que permite obtener materiales con una fluidez inicial variable que hace posible la inyección percutánea al interior de un foco de fractura o de una cavidad ósea.
- Aportación de estabilidad inicial al defecto óseo otorgada por unas propiedades mecánicas más cercanas a las del hueso, que los diferencian positivamente de los materiales de osteosíntesis o de los cementos acrílicos empleados para la fijación de prótesis.
- Capacidad para ser empleados como vehículos para la liberación de sustancias, tales como antibióticos, fármacos, factores de crecimiento óseo, etc.
- Factible utilidad para la cementación de endoprótesis de sustitución articular, facilitando los recambios ulteriores por su condición biodegradable.

2. Revisión Bibliográfica

Los cementos basados en fosfatos de calcio son biomateriales cerámicos osteoconductivos, reabsorbibles, degradables, biocompatibles y osteointegrables, cuyas propiedades fisicoquímicas y biológicas han sido ampliamente estudiadas en numerosos ensayos experimentales y que han demostrado ser capaces de comportarse como sustitutivos óseos ventajosos. Esto ha permitido que se hayan empleado en clínica, aunque en forma limitada, especialmente para favorecer la consolidación de fracturas metafisarias de huesos largos, siempre asociados a las técnicas de osteosíntesis convencionales debido a sus deficientes propiedades mecánicas [5, 107, 108, 109,] .

- **Biomateriales compuestos:**

Los materiales compuestos son mezclas de dos o más materiales. La mayoría de ellos constan de un determinado material de refuerzo y una resina aglomerante compatible con objeto de obtener las características específicas y propiedades deseadas. Normalmente, los componentes no se disuelven recíprocamente y pueden ser identificados físicamente gracias a la interface entre los mismos. Los materiales compuestos pueden ser de muchos tipos. Los que predominan son los fibrosos (compuestos de fibras en una matriz) y los particulados (compuesto de partículas en una matriz). Existen muchas combinaciones diferentes de materiales de refuerzo y matrices que se pueden usar para producir materiales compuestos. Dos clases de materiales compuestos modernos son la fibra de vidrio que refuerza una matriz de poliéster o de resina epoxi y las fibras de carbono en una matriz epoxídica [110].

La composición química de los biomateriales ha sido el foco de su diseño en las últimas décadas, pero hay un creciente reconocimiento de la importancia de otras propiedades, incluyendo las señales topológicas, mecánicas y eléctricas, en la orientación de una respuesta biológica [111]. Independientemente de la composición química, la respuesta celular *in vitro* e *in vivo* pueden alterar drásticamente dependiendo de las propiedades mecánicas de los biomateriales [112].

2. Revisión Bibliográfica

2.5. Magnesio:

El magnesio es el cuarto catión más abundante del organismo y el segundo en importancia intracelular. Interviene en más de 300 reacciones bioquímicas en el cuerpo [113]. El magnesio interviene en la adhesión celular; actúa como regulador de la estructura del ribosoma, en el transporte de la membrana, en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos [114]; ayuda a mantener la masa muscular, en la generación y transmisión del impulso nervioso, en la contracción muscular y cardíaca así como en la fosforilación oxidativa; y ayuda a mantener los huesos fuertes. El magnesio también ayuda a regular los niveles de azúcar en la sangre, favorece la presión arterial normal, y es conocida por estar involucrada en el metabolismo energético [115, 115].

El magnesio se encuentra ampliamente distribuido por el organismo, existiendo en una persona, aproximadamente de 20 a 28 g. El 60-65% del total se encuentra en el hueso, alrededor del 27% en el músculo, 6-7% en otras células y aproximadamente 1% en el líquido extracelular. El magnesio en plasma se puede encontrar libre (55%), acompañado (13%) o unido a proteínas (32%) [116].

- **Magnesio y el tejido óseo:**

La salud del tejido óseo es mantenida con el apoyo de muchos factores, sobre todo calcio y vitamina D. Sin embargo, la deficiencia de magnesio puede ser un factor de riesgo adicional para la osteoporosis posmenopáusia [117]. Esto puede ser debido al hecho de que la deficiencia de magnesio altera el metabolismo del calcio y las hormonas que regulan el calcio [118]. Debido a que el magnesio regula la síntesis, secreción y acción de la hormona paratiroidea (PTH) y vitamina D; el magnesio funciona directa o indirectamente a través de la regulación del sensor receptor de calcio [119]. También se ha demostrado que en déficit de magnesio, hay reducción de la osteoprotegerina y un incremento de RANKL por la inmunocitoquímica, reflejando de esta manera la incrementada osteoclastogénesis y la reducción de la masa ósea [120]. Se ha propuesto la terapia de magnesio para aumentar la masa ósea en la prevención y tratamiento de osteoporosis [121].

Aunque el magnesio es un componente importante de los huesos, no es un componente constante de la estructura cristalina de hidroxiapatita. El magnesio se

2. Revisión Bibliográfica

encuentra principalmente en la superficie del cristal, y una parte se encuentra en equilibrio con el magnesio líquido extracelular ^[122]. El magnesio intracelular es importante en la diferenciación y regulación de las funciones de células óseas (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) y formación ósea ^[123].

Numerosos estudios de sustitución o incorporación de iones en diferentes biomateriales aplicados en regeneración ósea han demostrado que los componentes principales de los tejidos biológicos, tales como huesos, dientes y algunos esqueletos de invertebrados se componen de una fase mineral apatítico que contiene una variedad de otros elementos ^[124, 125]. De esta forma, la adición de Mg en diferentes injertos aloplásticos está atrayendo la atención debido a los efectos benéficos sobre las propiedades físico-químicas de los minerales ^[126, 127, 128] y en el metabolismo óseo ^[129, 130, 131].

Howlett et. al. ^[132], incorporaron iones de magnesio en disco de alúmina y determinaron que la incorporación de este ion aumenta significativamente la adhesión de osteoblastos desde los 90 minutos hasta las 24 horas del cultivo en comparación con los discos de alúmina sin magnesio, porque el magnesio *per se* tiene un efecto sobre el comportamiento celular de los osteoblastos.

Ryu et. al. ^[133], añadieron magnesio a la cerámica de hidroxiapatita/ β -TCP y determinaron según los estudios *in vitro* e *in vivo*, que la cerámica presentaba buena biocompatibilidad sin citotoxicidad y conservaba las propiedades de biodegradación de la cerámica sin magnesio. Sugiere que la cerámica dopada es un buen candidato como un material de injerto óseo bioactivo para superar los inconvenientes de las cerámicas de hidroxiapatita y β -TCP.

Landi et. al. ^[126], sintetizaron hidroxiapatita dopada con diferentes cantidades de magnesio (6-14% mol), determinando que el material dopado con 5,7% mol de Mg se comporta igual o mejor que la tradicional hidroxiapatita sin magnesio. Cuando se realizó el estudio *in vivo*. Observándose mayor osteoconductividad en el tiempo y mayor tasa de reabsorción del material. Resultó que la hidroxiapatita con magnesio, inicialmente promueve un crecimiento óseo lento, pero una vez que va penetrando los gránulos, se encuentran condiciones favorables para el crecimiento óseo. Debido a la

2. Revisión Bibliográfica

composición y nanodimensiones características de la superficie de la hidroxiapatita dopada con magnesio.

Schendel y Peauroi ^[134], realizaron un estudio comparativo, *in vivo*, utilizando cemento óseo con o sin la adición de magnesio. Ambos materiales fueron exitosamente incorporados en defectos óseos de calota de conejos. Después de 12 semanas, en el estudio histomorfométrico determinaron que el cemento óseo con magnesio presentaba una mayor reabsorción y que era remplazado por tejido óseo que los cementos sin magnesio.

Jia et. al. ^[135], realizaron un estudio *in vitro* con células MG-63 cultivadas sobre cementos de fosfatos de calcio (CPB) para compararlos con cementos de fosfatos de calcio y magnesio (MCPB). Los resultados demostraron que el MCPB es significativamente mejor que los CPB en promover el crecimiento y la proliferación de las células MG-63, concluyendo que tienen buena capacidad para soportar adhesión celular, proliferación y diferenciación, y exhiben buena citocompatibilidad.

Wei et. al ^[136], fabricaron cementos de fosfatos de calcio-magnesio con micro y macroporos (micro/ma-MCP) y determinaron que estos promueven mayor proliferación, diferenciación y muestra una mayor biocompatibilidad al ser cultivados con las células MG-63 para luego ser comparado con cementos de fosfatos de calcio. Los resultados de la evaluación histológica del estudio *in vivo* confirmaron que el micro/ma-MCP exhibe una elevada eficiencia en regeneración ósea. Concluyendo que micro/ma-MCP no solo presentan buena biocompatibilidad y biodegradabilidad si no también mayor y mejor efecto osteogénico.

Zeng et. al. ^[137], realizaron elevaciones sinusales en conejos para comparar 3 biomateriales: cementos de fosfato de calcio (CPC), cemento de fosfato de magnesio (MPC) y cemento de fosfato de calcio y magnesio (CMPC). Después de 8 semanas de realizadas las elevaciones sinusales, el análisis histomorfométrico reveló que el CMPC puede promover mayor formación y mineralización ósea que los materiales de CPC y MPC. Y el porcentaje de cemento residual fue menor para MPC, seguidos por CMPC y CPC, sugiriendo que la aceleración de la degradación del material se debe por la

2. Revisión Bibliográfica

incorporación de magnesio. Siendo estos materiales con magnesio una alternativa para la regeneración ósea maxilofacial.

En el trabajo realizado previo al desarrollo de esta tesis doctoral, que presenté para obtener el título de Máster en Ciencias Odontológicas, desarrollamos un nuevo método para incorporar iones de magnesio en cementos de fosfatos cálcicos, donde obtuvimos buenos resultados pero con algunas carencias en las propiedades del cemento. En esta tesis hemos desarrollado 3 métodos para incorporar iones de magnesio en los cementos de fosfatos cálcicos para mejorar las propiedades de los cementos y determinar su comportamiento en estudios *in vitro* e *in vivo*, para su aplicación en regeneración ósea.

3. HIPÓTESIS

3. Hipótesis

La incorporación de iones de magnesio a los cementos de fosfatos cálcicos modifica sus propiedades tanto físico-químicas como biológicas, con el resultado de adaptar la tasa de degradación del biomaterial y la formación ósea a las necesidades de cada uso clínico. También mejorar la capacidad del sustituto óseo para actuar como matriz para la liberación controlada de medicamentos.

4. OBJETIVOS

4. Objetivos

1. Desarrollar métodos para incorporar iones de magnesio a los cementos de fosfatos cálcicos y estudiar su influencia en las propiedades del biomaterial.
2. Evaluar la citocompatibilidad de los nuevos cementos fabricados con una línea celular osteoblastica MG-63.
3. Comprobar la capacidad de los nuevos cementos como vehículos para la liberación controlada de medicamentos.
4. Evaluar *in vivo* el comportamiento de los nuevos cementos con magnesio empleando un modelo de defecto óseo crítico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1. Materiales

Materiales comerciales

- Fosfato dicálcico di-hidratado, carbonato cálcico y fosfato monocálcico (MCPM), se adquirieron en Sigma-Aldrich con el mayor grado de pureza.
- Magnesio hidrógeno fosfato tri-hidratado se compró en Panreac.

Materiales sintetizados en el laboratorio

Todos estos materiales fueron elaborados en el laboratorio del Departamento de Física y Química II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

❖ Fosfato tricálcico β (β -TCP):

El β -TCP fue preparado de la mezcla de la brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y carbonato cálcico (CaCO_3) en una relación molar de 2:1 a 1000°C durante 14 horas. La masa sólida obtenida fue molida en un mortero con mano, luego se pasaron los gránulos por un tamiz con tamaño de poro de $200\ \mu\text{m}$.

❖ β -TCP sustituido parcialmente por magnesio:

Los iones de Ca^{2+} fueron sustituidos por los iones de Mg^{2+} en la mezcla para la síntesis del fosfato tricálcico- β (β -TCP) mediante la sustitución de fosfato dicálcico dihidratado por magnesio hidrógeno fosfato tri-hidratado (newberyíta; $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y obtener una relación molar ($\text{Mg}/(\text{Mg}+\text{Ca})$) entre 0 y 66.67% (Tabla 2), mientras la relación $(\text{Mg}+\text{Ca})/\text{P}$ fue mantenido en 1.5. Posteriormente, la cerámica sinterizada a 1000°C durante 14 horas fue triturada y tamizada en una malla con un tamaño de poro de $200\ \mu\text{m}$. Utilizaremos las iniciales Mg-TCP para referirnos a las cerámicas dopadas con magnesio.

5.1. Materiales

Tabla 2. Composición de la mezcla empleada para la preparación de β -TCP dopado con magnesio.

Muestras	CaHPO ₄ [mol]	MgHPO ₄ ·3H ₂ O [mol]	CaCO ₃ [mol]	[Mg/(Mg+Ca)] (%)
β -TCP	2	0	1	0
6.67% Mg-TCP	1.8	0.2	1	6.67%
13.33% Mg-TCP	1.6	0.4	1	13.33%
26.67% Mg-TCP	1.2	0.8	1	26.67%
40% Mg-TCP	0.8	1.2	1	40%
53.33% Mg-TCP	0.4	1.6	1	53.33%
66.67% Mg-TCP	0	2	1	66.67%

❖ Magnesio-MCPM:

Se fabrica MCPM mediante la reacción entre β -TCP sustituido por magnesio con ácido fosfórico 8M en una relación polvo/líquido de 1. Producto de la reacción se obtuvo una masa sólida que fue molida a mano con la ayuda de un mortero y posteriormente, tamizado con un tamaño de poro de 200 μ m. Utilizaremos las iniciales Mg-MCPM (Tabla 3) para referirnos a los cementos dopados con magnesio en MCPM.

Tabla 3. Composición de la mezcla de Mg-TCP + ácido fosfórico para obtener Mg-MCPM a diferentes concentraciones de magnesio.

Polvo	P/L	Líquido	Producto
MCPM			MCPM
6.67% Mg-TCP	1	Ac. fosfórico 8M	6.67% Mg-MCPM
13.33% Mg-TCP	1	Ac. fosfórico 8M	13.33% Mg-MCPM
26.67% Mg-TCP	1	Ac. fosfórico 8M	26.67% Mg-MCPM
40% Mg-TCP	1	Ac. fosfórico 8M	40% Mg-MCPM
53.33% Mg-TCP	1	Ac. fosfórico 8M	53.33% Mg-MCPM
66.67% Mg-TCP	1	Ac. fosfórico 8M	66.67% Mg-MCPM

5.1. Materiales

❖ Síntesis de cemento de fosfato cálcico:

Cualquier sistema de cemento consiste de dos fases: una fase sólida en forma de polvo y otra fase líquida que al mezclarse dan una masa que va endureciendo hasta obtener un cemento resistente a una fuerza mecánica.

La fase sólida del cemento cálcico en este trabajo consta de un fosfato cálcico básico y un fosfato cálcico ácido. El fosfato cálcico básico es el β -TCP o Mg-TCP mientras que el fosfato cálcico ácido es el MCPM o Mg-MCPM. Ambos componentes se mezclan en una relación equimolar en mortero con mano durante 5 minutos. Como fase líquida se utilizó agua bidestilada.

Para la fabricación del cemento, se pesaron 3 g de la fase sólida y se mezclaron con 1 ml de agua bidestilada en una placa de vidrio durante 30s. La pasta del cemento se utilizó para rellenar unos moldes de silicona de 10 mm de diámetro x 5 mm de grosor. Al paso del tiempo la pasta del cemento va endureciendo hasta obtener unas muestras sólidas (Figura 5A y 5B).



Figura 5A: Molde de silicona y 5B: Pastillas de cementos de fosfato cálcico

5.2. Métodos

5.2. Métodos

5.2.1. Preparación de cementos dopados con Mg

Se investigaron 3 métodos para producir cementos cálcicos dopados con magnesio con el fin de seleccionar el método que produzca muestras semejantes al cemento control de brushita.

❖ Método A:

En este método se preparó el cemento mezclando las diferentes cerámicas de β -TCP dopadas con magnesio con el MCPM que luego se reacciono con agua bidestilada.

❖ Método B:

En este método se preparó el cemento mezclando el β -TCP con las diferentes concentraciones de Mg-MCPM que luego se reacciono con agua bidestilada.

❖ Método C:

En este método se preparó el cemento mezclando la cerámica de 66.67% Mg-TCP con Mg-MCPM, que luego reacciono con agua bidestilada.

5.2.2. Difracción de rayos X:

La estructura cristalina de las cerámicas y cementos sintetizados en este trabajo de Tesis Doctoral se caracterizaron mediante la técnica de difracción de rayos X. Este método se basa en el modelo de Bragg^[138] que describe la estructura cristalina como un conjunto de planos que reflejan los rayos X.

Se obtuvieron los patrones de difracción de las muestras en polvo para identificar las fases cristalinas presentes en cada muestra en forma cuantitativa y estudiar orientaciones preferenciales. Los patrones de difracción de rayos X fueron registrados por el difractómetro Philips X`pert que opera a 45 kV y 40 mA. La radiación empleada fue Cu-K α . Los diagramas de difracción de rayos X se obtuvieron en intervalos de $2\theta = 10-40^\circ$ con un tamaño de paso de 0.02° y velocidad de barrido angular de 1s/paso. (Realizado en el servicio de CAI-UCM)

5.2. Métodos

Para la composición mineral del polvo TCP se utilizaron los archivos del modelo estructural del β -TCP (pdf-ref 70-2065), $\text{Ca}_{2.71}\text{Mg}_{0.29}(\text{PO}_4)_2$ (pdf-ref 70-682), $\text{Ca}_{2.589}\text{Mg}_{0.41}(\text{PO}_4)_2$ (pdf-ref 87-1582), Farringtonita ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$; pdf-ref 33-876) y Stanfieldita ($(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$; pdf-ref 73-1182). Mientras, para la composición del cemento se han utilizado los archivos anteriores, más los archivos de brushita (pdf-ref 72-713), monetita (pdf-ref 71-1760), y newberyíta (pdf-ref 35-780).

5.2.3. Determinación de tiempo de fraguado final (TFE):

El fraguado de cementos cálcicos es un proceso continuo que implica dos reacciones químicas conocidas: disolución y precipitación. Durante este proceso nuevos cristales son formados y con el tiempo crecen y se enredan, así que el cemento pierde sus propiedades viscosas para endurecerse ^[139]. Según la norma establecida ASTM C191-92 ^[140] el tiempo de fraguado es el tiempo que transcurre desde que se inicia la mezcla de las fases sólida y líquida hasta que la pasta de cemento es capaz de soportar una determinada presión estática, ejercida por una aguja Vicat de 5 cm de longitud y 1,13 mm de diámetro sostenida por una varilla de 300 g de peso (Figura 6).

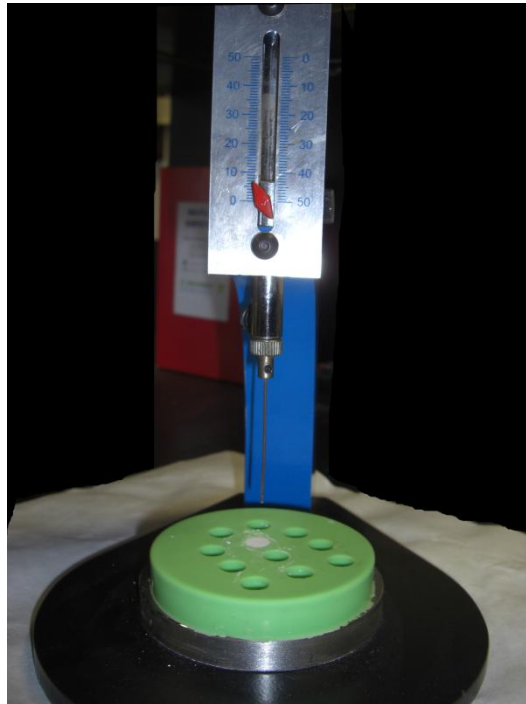


Figura 6. Aguja de Vicat

5.2. Métodos

El tiempo de fraguado final de los cementos fue medido (N=5) en condiciones atmosféricas normales del laboratorio (15-23°C y 50-60% humedad). Se rellenaron cilindros de silicona con la pasta del cemento y se realizó la prueba de la aguja de Vicat cada 30 segundos. Se consideró el cemento fraguado cuando la aguja de Vicat era incapaz de dejar indentación circular y visible en la superficie del cemento.

5.2.4. Fuerza de tensión diametral (FTD):

Se prepararon muestras de CPC en moldes de silicona de 10 mm de diámetro x 5 mm de grosor. Se utilizaron al menos cinco muestras cilíndricas de cada cemento. Se incubaron las muestras en tubos de ensayo con 10 ml de agua bidestilada a 37°C, durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se procedió a medir la fuerza necesaria para romper el cilindro del cemento utilizando un durómetro Pharma Test PTB 311 (Figura 7). La fuerza de tensión diametral (FTD) fue medido y calculado a partir de la carga aplicada a lo largo del plano diametral de las muestras (N=5).

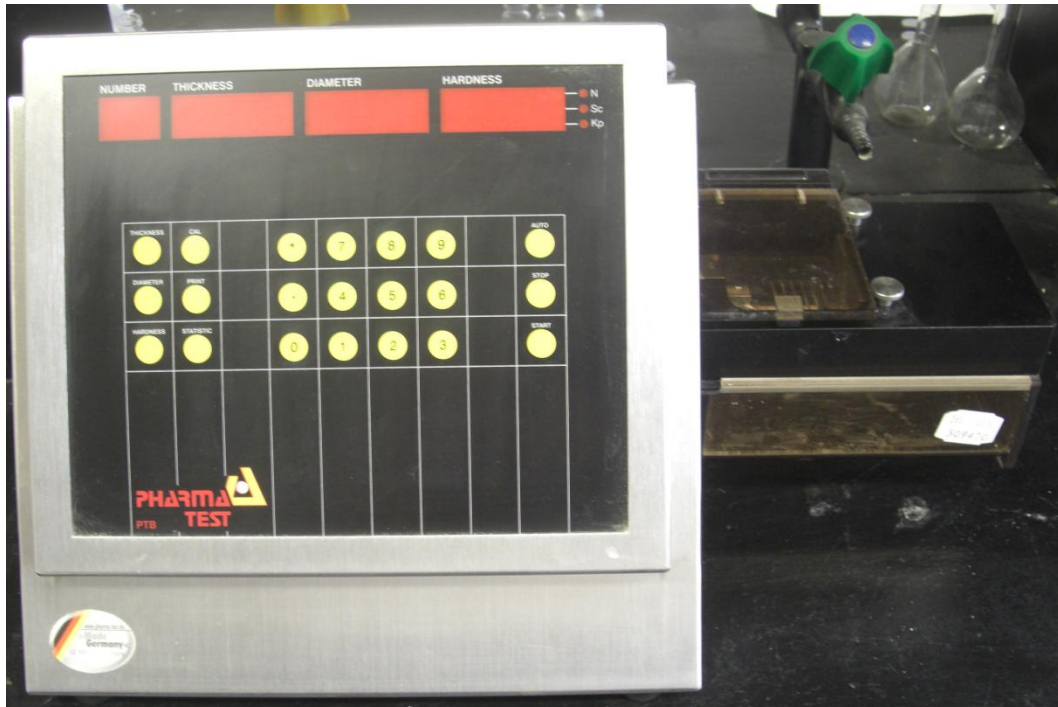


Figura 7. Durómetro Pharma Test PTB 311

5.2. Métodos

Se calculó la FTD utilizando la formula (Ec. (1)):

$$FTD = 2 * F / (\pi * D * E) \quad (1)$$

Donde FTD (MPa)

F = la fuerza en Newton

D = el diámetro de la muestra en mm

E = espesor de la muestra en mm

Se calculó la media y la desviación estándar para los valores de FTD obtenidos para cada formulación de cemento utilizando el programa Origin 8.

5.2.5. Determinación de la porosidad:

Esta prueba se basa en los fenómenos de capilaridad generados por los líquidos que no mojan los sólidos con los que están en contacto. Así, un líquido como el mercurio que no penetra espontáneamente en los conductos capilares, precisa una presión "p" para su introducción que es inversamente proporcional al radio "r" de los mismos:

$$r = 2 \sigma \cos \alpha / p$$

donde:

" σ " es la tensión superficial del mercurio, y

" α " el ángulo de contacto sólido-líquido.

El ensayo porosimétrico consiste en inyectar mercurio a presión y registrar el volumen de mercurio absorbido. Para cada intervalo de presión considerado, el volumen de mercurio absorbido nos indica el volumen de poros de la muestra que tienen un determinado intervalo de tamaño de acceso ^[141].

La porosidad y la distribución de los poros en los cementos se determino utilizando la porosimetría de mercurio (Micrometrics 9420, UK).

5.2. Métodos

5.2.6. Análisis del área de superficie específica:

El área de superficie específica (ASS) fue determinado utilizando el método Brunnauer, Emmet y Teller ^[142] (BET; GEMINI, Micrometrics, USA) que se basa en la interpretación de las isotermas de adsorción de N₂ a bajas temperaturas, que permite determinar la capa monomolecular teórica que se forma en un sólido cuando sobre su superficie se adsorbe isotérmicamente un gas a presiones por debajo de su presión de vapor saturado.

5.2.7. Determinación del pH de la pasta de cemento:

El pH de la pasta del cemento se determinó utilizando el pH-metro GLP 21 (CRISON) calibrado con tampones de pH 4 y 7,1. Para ello, se puso en un bote 6 g de la fase sólida del cemento y se mezcló durante 30 segundos con 3 ml de fase líquida del cemento (agua bidestilada). A continuación se colocó el electrodo del pH en la pasta del cemento y se registraron los datos cada 30 segundos hasta que se observó un pH estable.

5.2.8. Caracterización Microestructural:

La caracterización microestructural se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM - JSM6400) (Figura 8), que es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos con alta resolución.

Las imágenes de SEM para analizar la morfología de la superficie fueron realizadas en la superficie de rotura de los cementos que fueron utilizados en la prueba de propiedades mecánicas. Después de secar las muestras a 50 °C durante 24 horas, se montaron en porta muestras de cobre utilizando una cinta de grafito. Las muestras fueron recubiertas por una fina capa de oro para asegurar una buena conductividad, proceso que se realizó de forma automática utilizando una metalizadora Emitech modelo K550X. Además, hemos analizado el contenido del calcio, magnesio y fósforo de cristales individuales utilizando la técnica de **espectroscopia** de energía dispersiva de rayos X (EDX) acoplada al SEM.

5.2. Métodos



Figura 8. Equipo de microscopio electrónico de barrido (SEM - JSM6400)

5.2.9. Liberación de iones:

Dado que los cementos estudiados son degradables, es de gran interés determinar su capacidad de servir como matriz para la liberación de iones de calcio y magnesio. Más aún, cuando se trata de materiales que serán implantados dentro del cuerpo humano.

Para esta prueba se utilizaron muestras de cemento de 10 mm de diámetro x 5 mm de grosor. Se estudiaron dos muestras para cada tiempo estudiado. Las muestras fueron sumergidas en 10 ml de agua bidestilada a 37°C, durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, el agua fue renovada por otros 10 ml de agua bidestilada, esta operación se realizó durante 7 días continuos. Se midió la concentración de los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} que liberan las muestras mediante la espectroscopia de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).

5.2. Métodos

5.2.10. Citocompatibilidad:

Debido a que estos cementos han sido desarrollados con la finalidad de ser usados en aplicaciones biomédicas, es indispensable el estudio de la respuesta biológica que suscitan.

Los estudios *in vitro* son el primer paso que se suele utilizar para la comprensión de la interacción célula-biomaterial y la biocompatibilidad de los materiales. Los cultivos celulares son sistemas ideales para el estudio y observación de un determinado tipo de células bajo condiciones específicas, dado que estos sistemas no presentan la complejidad que conlleva un estudio *in vivo*, debido al gran número de variables que interaccionan.

Esta prueba se realizó en el laboratorio de ingeniería tisular de la Facultad de Odontología – UCM. Para la prueba de citocompatibilidad, se utilizó la línea celular osteoblástica MG-63^[143], es una línea celular de osteosarcoma humano de un niño de 14 años adquiridas en Sigma-Aldrich, las células se cultivaron a 37°C y atmosfera de CO₂ al 5%.

Las células MG-63 fueron cultivadas en frascos de cultivo utilizando el medio de cultivo “Dubelco’s Modified Eagle’s Médium” (DMEM), complementado con un 10% de suero fetal bovino, 0.5% de L-Glutamina 2 mM, 0.5% de penicilina y 0.5% de estreptomycin. El medio de cultivo se cambió cada dos días. Cuando los frascos alcanzaron la confluencia, las células se despegaron utilizando tripsina (Sigma) al 0,02% en PBS y HEPES 0,02 M. Después del centrifugado a 800 rpm durante 4 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió 10 ml de DMEM en el cual las células se resuspendieron. La vitalidad de las células se observó empleando la tinción azul de tripano y la densidad celular se calculó utilizando la cámara de Neubauer. La suspensión original de células se diluyó hasta la densidad deseada y se homogeneizó con la ayuda de una pipeta Pasteur antes de sembrarlas sobre los materiales.

Las muestras que utilizamos para esta prueba fueron cilindros de 14 mm de diámetro y 2 mm de grosor preparados con CPC y CPC sustituidos con Mg. Posteriormente se lavaron las muestras en agua bidestilada y se repitió el proceso hasta conseguir un pH estable del agua después de lavar las muestras. Se dejaron secar las

5.2. Métodos

muestras a temperatura ambiente. Una vez secas las muestras fueron sumergidas en etanol al 70% durante 60 minutos.

Se colocaron 4 cilindros por cada muestra en placa de cultivo de 24 pocillos que fueron incubadas durante 24 horas con DMEM. Posteriormente se retiró el DMEM y se sembró las células con una densidad inicial de 20000 células/ml (1 ml por cada pocillo) en DMEM reconstituido.

La proliferación celular se evaluó después de 3, 5, 7 y 10 días del sembrado. Primero se lavaron las muestras dos veces con PBS (tampón de fosfato pH 7,4) durante 30 segundos y luego se procedió a despegar las células de la superficie de cada muestra con 1 ml de Accutasa en incubadora de CO₂ a 37°C durante 7 minutos. Luego se neutralizó la actividad enzimática de la Accutasa con igual cantidad de DMEM. La cuantificación se realizó mediante el test de exclusión de colorante, que está basado en que las células muertas son permeables al mismo. Para esto, se tomó un volumen determinado de la suspensión celular y se preparó una dilución 1:2 con la solución azul Tripan (Sigma) al 0,4% en PBS, se mezcló bien y se introdujo en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) por capilaridad. Las células no teñidas (viables) fueron distinguidas de las teñidas (muertas) por microscopía óptica.

Los datos obtenidos fueron incorporados en un programa (Origin 8) para ser analizados con la prueba estadística ANOVA previa comprobación de la normalidad mediante el test Shapiro-Wilk para un valor de confianza del 95%.

Para el análisis morfológico de las células: primero se fijaron las muestras en glutaraldehído al 6.25% durante 30 minutos y luego se deshidrataron en acetona 2 veces cada 15 minutos a concentraciones crecientes (15%, 30%, 50%, 70%, 90% y 100%) y se dejó en acetona al 100% para luego ser secadas mediante la técnica del punto crítico y posteriormente se montaron las muestras con cinta de grafito en porta muestras de cobre. Las muestras fueron recubiertas con carbono utilizando el evaporador Balzers Union MED-010 y recubiertas con oro utilizando la metalizadora Emitech modelo K550X. Las imágenes de la superficie fueron registradas utilizando el SEM - JSM6400.

5.2. Métodos

5.2.11. Vehículo transportador de medicamento:

Otsuka et al, describió la eficacia de los CPC como vehículos transportadores de medicamentos antibacteriales ^[144]. Nosotros para esta prueba hemos utilizado la Vancomicina como droga modelo.

❖ Estudio de adsorción-desorción de la vancomicina:

Para este ensayo, se preparó una solución de vancomicina (5 mg/ml) y 5 cilindros por cada formulación de cemento para estudiar la adsorción del antibiótico a la superficie de los cementos previamente fraguados. Cada muestra se incubó en 1,5 ml de la solución antibiótica en un baño de agua a 37°C y en agitación constante de 90 rpm durante 24 horas. Para evaluar la cantidad del medicamento adsorbido, se desintegraron las muestras de los cementos en ácido clorhídrico al 2,5 M. Después de la disolución total del cemento, se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Cary 300 Bio spectrophotometer) operando a una longitud de onda de 237 nm. Para ello, se estableció una curva de calibración relacionando la concentración del antibiótico con la absorbancia de UV-visible con el espectrofotómetro UV-Vis operando a una longitud de onda de 237 nm, utilizando soluciones estándar de vancomicina y una cubeta de cristal de 1cm de longitud (Figura 9).

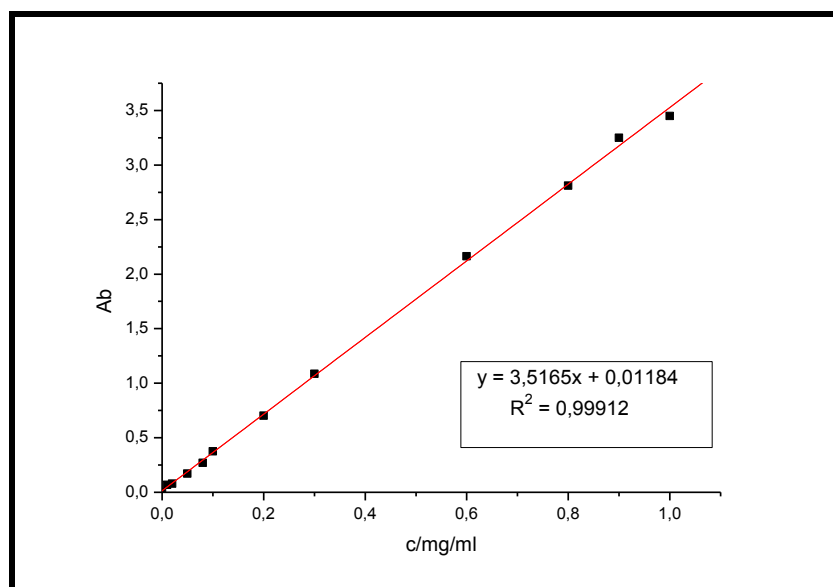


Figura 9. Curva de calibración entre la absorbancia de UV-Vis y la concentración de la vancomicina

5.2. Métodos

Para estudiar la desorción del medicamento, se prepararon nuevas muestras como se ha descrito anteriormente. La cinética de la desorción de la vancomicina fue estudiada empleando 5 ml de tampón fosfato con pH 7,44 a 37°C en un baño de agua y en agitación constante. La liberación del antibiótico se estudió con un seguimiento durante 11 días realizando mediciones a los 15, 30 minutos, 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 y 264 horas. Trascurrido los 11 días se desintegraron las muestras en ácido clorhídrico 2,5 M para valorar la cantidad residual de antibiótico no liberada al medio de incubación.

❖ Liberación del antibiótico de cementos fraguados con vancomicina:

La otra forma de cargar un agente bioactivo en los cementos es añadiéndolo a la fase líquida o a la fase sólida del cemento. En este trabajo se prepararon 5 cilindros por cada formulación de cementos a las cuales se les agregó 2 g de vancomicina a la fase polvo del cemento por cada 40 g de la fase sólida del cemento.

Para estudiar la liberación del medicamento, las muestras ya fraguadas fueron colocadas en tubos de ensayos de cristal con 5 ml de tampón fosfato con pH 7,44 a 37°C en baño de agua y en agitación constante (90 rpm). Se midió la liberación del medicamento a los 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 5h, 7h, 24h y una medida cada 24 horas durante 11 días. Pasados los 11 días se desintegraron las muestras en ácido clorhídrico 2,5 M para valorar la concentración de antibiótico no liberado por las muestras.

❖ Actividad antimicrobiana de la vancomicina liberada:

Se preparó en el medio de cultivo líquido una suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (a partir de un cultivo de 24 horas en agar triptonsoja), con una turbidez comparable al patrón 0,5 de la escala de McFarland.

Se mezclaron 3 ml de esa suspensión con 12 ml del medio líquido (dilución 1/5), preparándose así 15 ml con una turbidez comparable al patrón 0,1 de la escala de McFarland, que se añadieron a 600 ml del medio de cultivo Antibiótico Medio n°8 (Laboratorios BioCult, Ref:MD231) fundido y atemperado a 50°C, lo que corresponde a 3 ml por cada 120 ml (según protocolo de Obadia et al. 2003 ^[145]). Se repartió ese

5.2. Métodos

volumen en placas de Petri estériles a razón de, aproximadamente 25 ml por placa, dejándose solidificar el medio así inoculado a temperatura ambiente.

Se practicó en el centro de cada placa un defecto de unos 10 mm de diámetro utilizando un sacabocados estéril, suficiente para colocar en su interior un cilindro de cemento de 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor. Posteriormente, se procedió a colocar cada cilindro de cemento en una placa, haciéndose cada ensayo por triplicado.

Se incluyó también en el ensayo una placa inoculada que no contenía ningún cilindro (control negativo) y dos placas sobre las que se depositó un disco de vancomicina (30 µg), para comprobar la sensibilidad de la cepa (control positivo). Las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas y después se incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a los cilindros. Los datos obtenidos fueron incorporados en un programa estadístico (Origin 8) para ser analizados.

5.2.12. Estudio *in vivo*:

Las muestras que utilizamos para esta prueba fueron CPC preparados según los métodos A, B y C. Posteriormente se lavaron las muestras en agua bidestilada y se repitió el proceso hasta conseguir un pH estable del agua después de lavar las muestras. Se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron trituradas en un mortero y pasadas por un tamizador para obtener gránulos entre 0,5 y 0,8 mm (Figura 10). A continuación, las muestras se esterilizaron en etanol al 70% durante 60 minutos. Finalmente secaron las muestras debajo de una campana de flujo a temperatura ambiente.

5.2. Métodos



Figura 10. Cemento granulado entre 0,5 y 0,8 mm

Antes de comenzar el estudio animal *in vivo* el protocolo fue aprobado por el Comité Ético para experimentación animal. Los experimentos se realizaron de acuerdo a la normativa europea de 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC) y se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor y malestar de los animales.

El animal de experimentación elegido para este estudio fueron conejos New Zealand de 6 meses de edad y con peso entre 2,4 y 3,1 kg. Los conejos antes de la cirugía fueron sometidos a tricotomía del pelo de la cabeza, pesados y los cálculos referentes al volumen anestésico fueron realizados para cada animal. La anestesia de los conejos se realizó mediante inyección intramuscular con Buprenorfina (Buprex®) 0,3 ml, Ketamina (Imagene® Merial) 0,4 ml/kg y Xilacina (Rompun® Bayer) 0,25 ml/kg. Y se utilizó Atipamezol (Antisedan®) 0,2 ml/kg.

Los procedimientos operatorios experimentales fueron realizados bajo condiciones asépticas utilizándose instrumental estéril y campos desechables. Después de ser realizada la tricotomía de la zona quirúrgica (craneal) fue realizada la antisepsia con yodopovidona.

5.2. Métodos

El procedimiento quirúrgico fue dirigido a través del protocolo descrito por Alberius ^[146]. Se empieza la cirugía haciendo una incisión en la línea media de la cabeza con un bisturí N° 15 para descubrir el hueso parietal desplazando lateralmente la piel y el periostio con la ayuda de un periostotomo (Figura 11). A continuación se generaron defectos cilíndrico de 10 mm de diámetro incluyendo todo el espesor del hueso a cada lado de la línea media, utilizando una trefina de 10 mm de diámetro (Figura 12), acoplada a un contra-ángulo, montada en baja rotación en un motor eléctrico. El procedimiento fue realizado bajo constante irrigación con suero fisiológico, evitándose así el sobrecalentamiento del hueso.

El tapón óseo confeccionado por la trefina fue delicadamente retirado con la ayuda de una cureta (Figura 13). Preparados los 2 defectos óseos (Figura 14) procedemos al rellenado del defecto con el cemento granulado (Figura 15). Posteriormente, el periostio fue reposicionado y suturado con sutura reabsorbible (daxon® 3/0) mediante puntos simples y la piel con seda negra (3/0). A cada animal operado le fue realizada una aplicación tópica de yodopovidona como medida antiséptica local en el postoperatorio inmediato. Todos los animales recibieron tratamiento antibiótico (Terramicina®) en el agua de bebida y Buprenorfina (Buprex®) 2 dosis de 3ml por día, durante 2 días.

5.2. Métodos

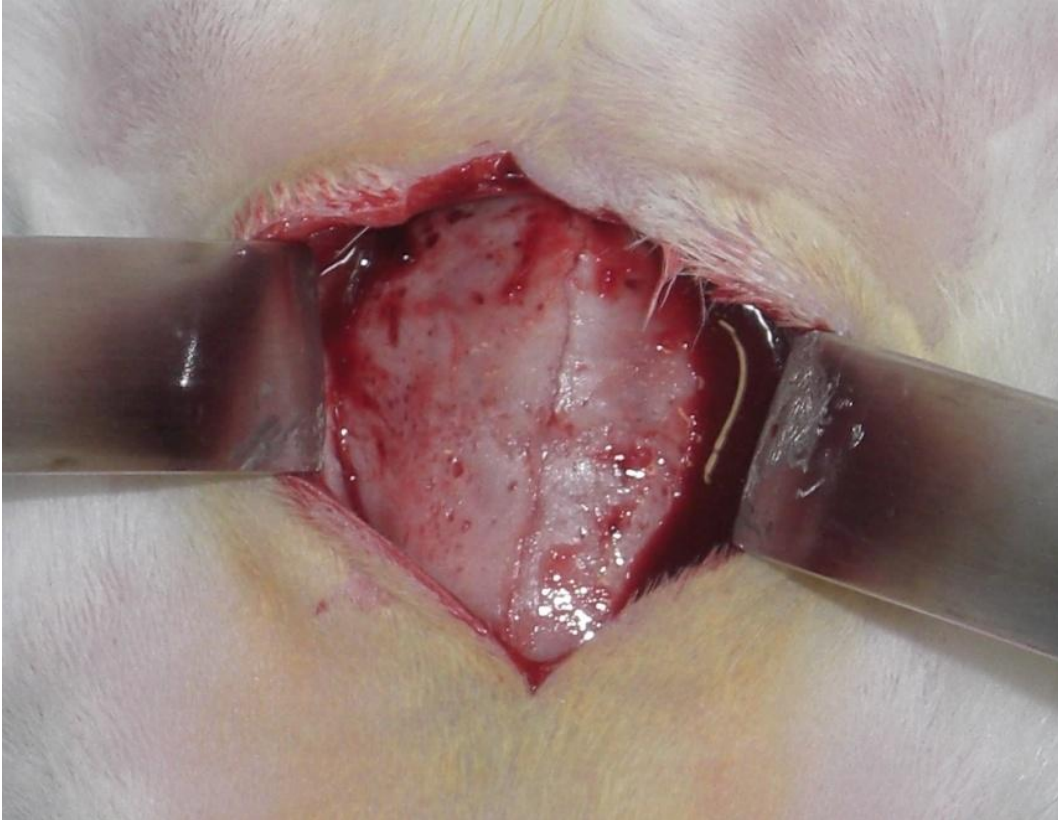


Figura 11. Calota del conejo expuesta

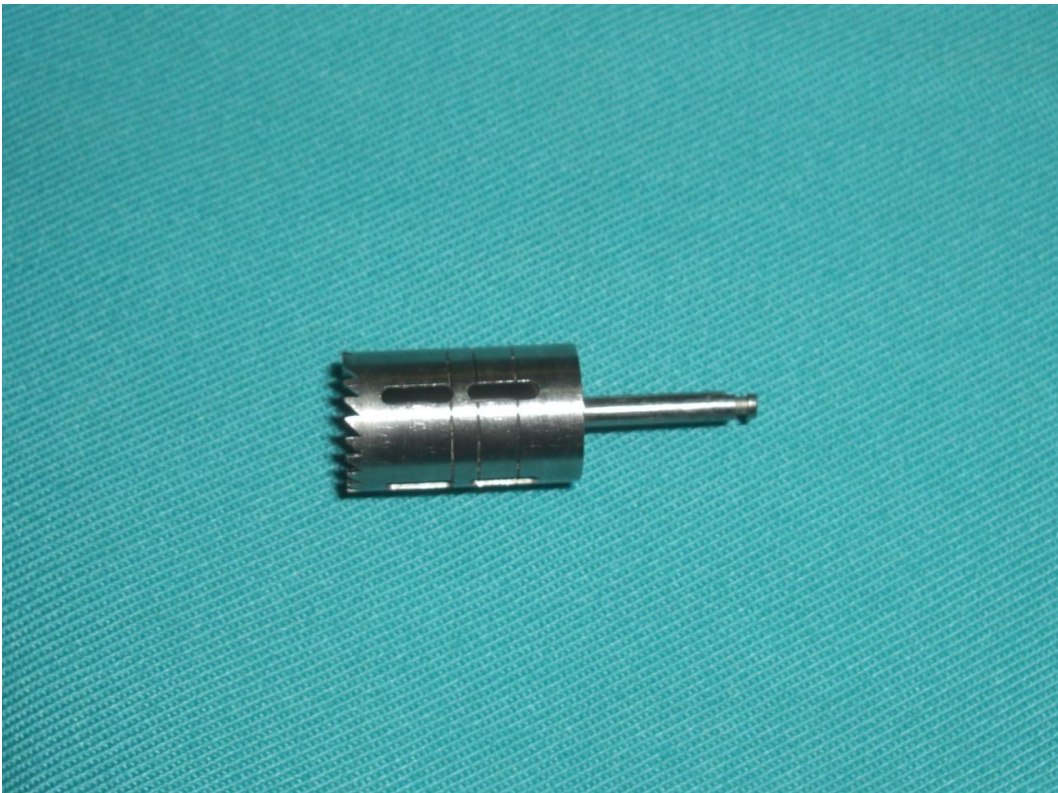


Figura 12. Trefina de 10mm

5.2. Métodos



Figura 13. Remoción del tapón óseo

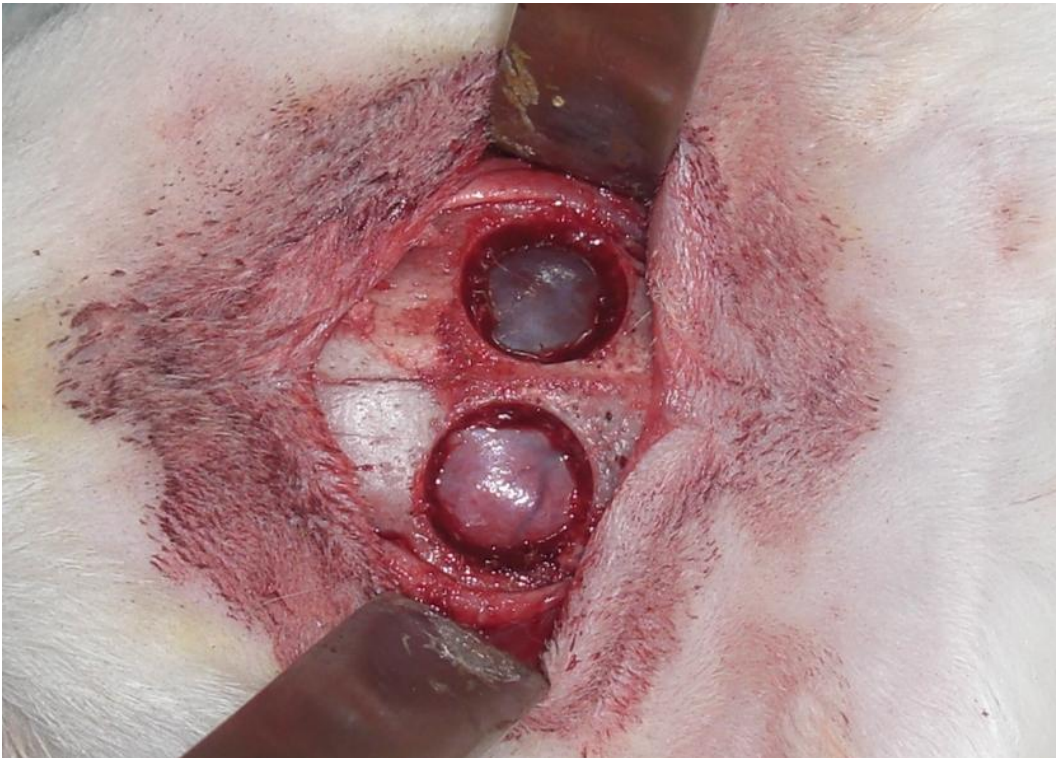


Figura 14. Cavidades óseas expuestas

5.2. Métodos



Figura 15. Cavidades rellenas con el cemento granulado

Después de 8 semanas, los conejos fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y las muestras fueron extraídas con un margen de seguridad de 1 cm alrededor del defecto para ser procesadas para el análisis histológico e histomorfométrico siguiendo la siguiente secuencia:

1. Se colocaron las muestras en formaldehído al 10% a pH 7.
2. Se deshidrataron las muestras utilizando alcohol al 60% que se va sustituyendo por alcoholes de mayor concentración hasta terminar con alcohol al 100%.
3. Las muestras deshidratadas fueron embebidas con Technovit® 7200 VCL (Exact®) al 50%, 75% y 100% en la cámara de vacío. Se dejaron las muestras durante 7 días en cada concentración.
4. Se incluyen las muestras en un polímero Technovit 7200 VLC, Kulzer, Wehrheim, German y se polimeriza con luz halógena blanca durante doce horas y posteriormente con luz ultravioleta (azul) durante 2 horas.
5. Cada bloque de metacrilato que contenía una muestra fue pulido con discos de 800, 1200 y 2000.

5.2. Métodos

6. Los bloques pulidos se fijaron en portaobjetos de vidrio mediante adhesivo de metacrilato.
7. Se realizan cortes con un espesor de 250 μm utilizando un micrótomo Remet (Bologna, Italia) para luego pulirlas hasta 80 μm utilizando una pulidora LS2 Remet (Bologna, Italia)
8. Las muestras fueron teñidas con azul de toluidina.
9. La histología fue evaluada con ayuda de un microscopio óptico Nikon Eclipse Ti-microscope (Japón).
10. El análisis histomorfométrico fue evaluado mediante la captura de imágenes de cada corte con una magnificación de 2x utilizando una cámara digital Nikon (Japón) acoplada al microscopio óptico. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa NIS-Elements versión 3.00. En cada corte se midió el área total, el área de hueso neoformado y el área de cemento remanente.

Para finalizar, los datos obtenidos del hueso neoformado y del cemento remanente se realizó primero el test de Kolmogorov-Smirnov para comparar si se cumplían los criterios de normalidad para todas las variables y luego los datos se analizaron con el test estadístico varianza (ANOVA) utilizando el programa Origin 8.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

6.1. RESULTADOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

6.1.1. Difracción de rayos X de los materiales sintetizados en el laboratorio:

❖ Análisis estructural del β -TCP y Mg-TCP:

Los picos del patrón de difracción de rayos X de la cerámica no modificada con los iones de magnesio corresponden a los picos característicos del β -TCP, localizados a valores 2θ de 27,80, 31,02 y 34,37°. El dopaje de los cementos con los iones de magnesio ha causado un desplazamiento de los picos de difracción del β -TCP hacia ángulos de difracción más altos (Figura 16) indicando un tamaño menor de la celdilla del cristal del β -TCP. El refinamiento Rietveld del β -TCP muestra una disminución casi lineal en los parámetros a y c de la celdilla del β -TCP a medida que aumenta la cantidad de iones de magnesio (Figura 17). Esta disminución se refleja en un volumen de celdilla menor cuando aumenta el contenido de iones de magnesio debido a que el radio iónico del magnesio (0,65 Å) es menor que el del calcio (0,99 Å), lo que explica el desplazamiento de los picos de difracción del β -TCP hacia ángulos más altos.

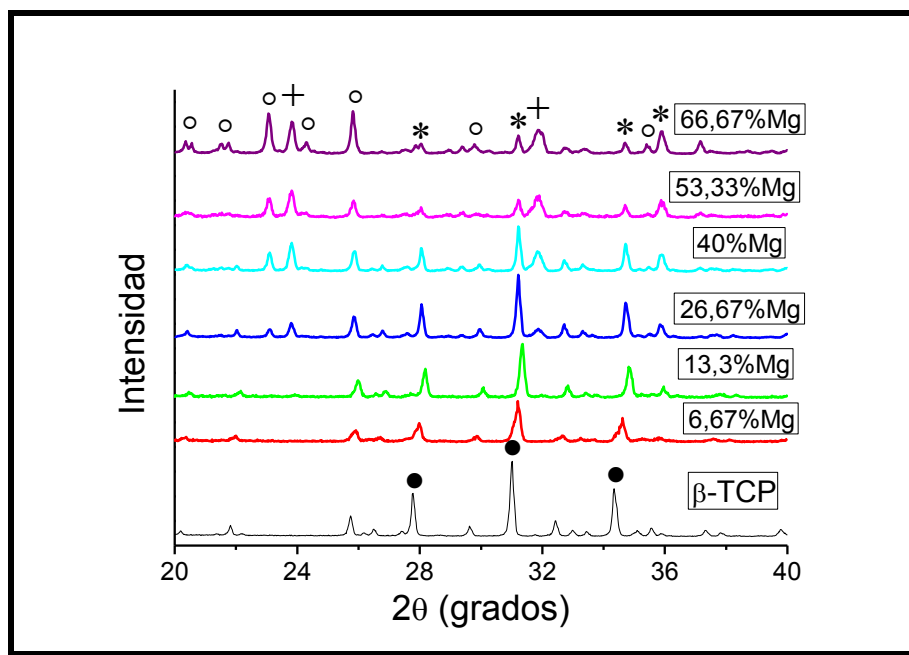


Figura 16. Resultados de difracción de rayos X del β -TCP dopados con Mg. Los picos más prominentes son: β -TCP (•), $\text{Ca}_{2.589}\text{Mg}_{0.41}(\text{PO}_4)_2$ (*), stanfieldita (+) y farringtonita (°).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

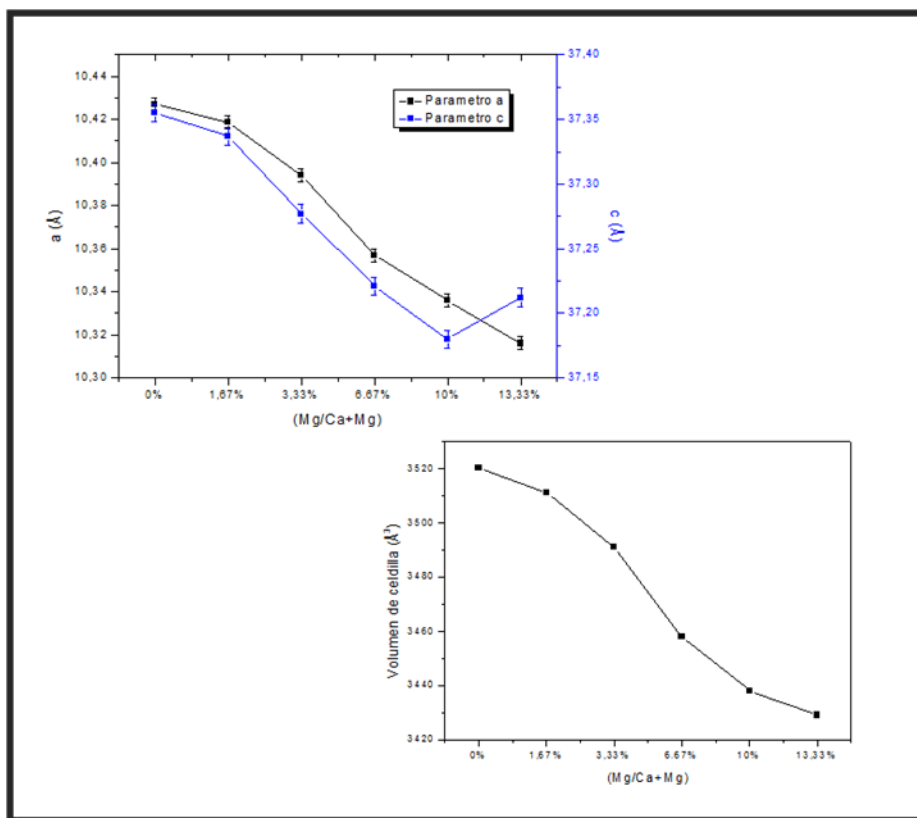


Figura 17. Efecto de la sustitución iónica de Mg en la celdilla del cristal del β -TCP.

Además, la aparición de nuevos picos de difracción que corresponden a una fase stanfieldita ($(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$) fue observado a una relación $\text{Mg}/[\text{Ca}+\text{Mg}] \geq 26,67\%$. Farringtonita ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) también fue identificada a una relación $\text{Mg}/[\text{Ca}+\text{Mg}] \geq 40\%$ (Figura 16). Así, se limita la preparación de una cerámica que solo está compuesta por β -TCP a una relación de $\text{Mg}/[\text{Ca}+\text{Mg}] \leq 13,3\%$. Este resultado confirma lo que se ha descrito en un estudio previo de que la máxima sustitución del Ca^{2+} lograda por el Mg^{2+} en el β -TCP es de 13,7% [35].

❖ Análisis estructural del Mg-MCPM:

El β -TCP dopado con Mg fue reaccionado con ácido fosfórico (8M) en una relación polvo/líquido de $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Producto de la reacción y según los resultados de difracción de rayos X, encontramos el monofosfato monocálcico (MCPM) como producto principal y pequeñas cantidades de monetita y brushita (Figura 18).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

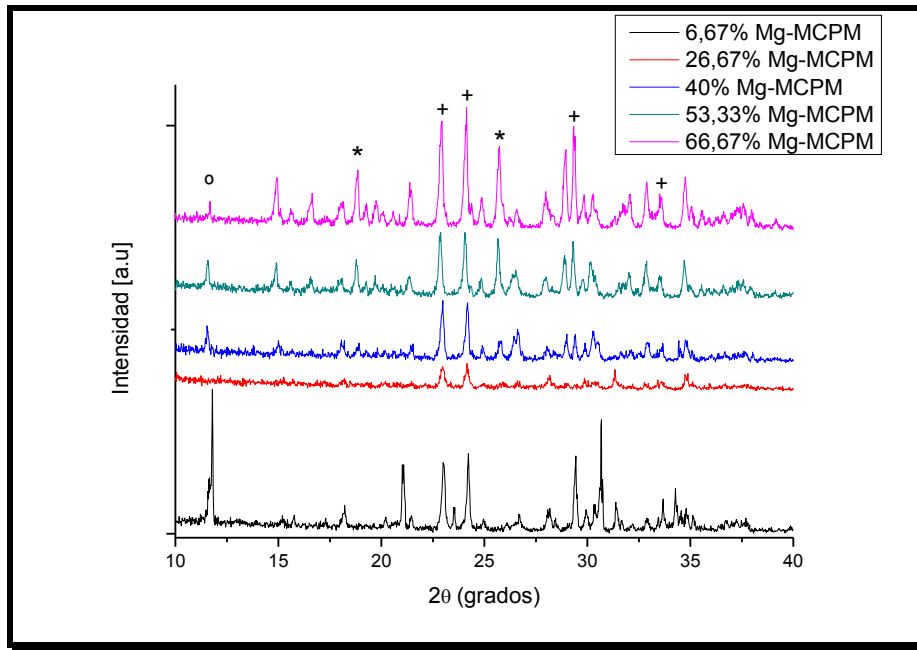


Figura 18. Resultados de difracción de rayos X. Los picos más prominentes son: brushita (\circ), MCPM ($+$) y ($*$)monetita.

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

6.1.2. Caracterización del cemento preparado según el método A:

Los cementos en este apartado fueron preparados mezclando las cerámicas de β -TCP dopadas con magnesio (Mg-TCP) con el monofosfato cálcico monohidratado (MCPM) en una relación equimolar empleando el agua como fase líquida.

❖ Difracción de rayos X:

La reacción de fraguado entre el β -TCP y el monofosfato cálcico monohidratado ha dado lugar a un cemento cuya matriz está compuesta principalmente de brushita y restos de β -TCP no reaccionado. El uso de una cerámica de fosfato cálcico dopado con magnesio ha inducido un desplazamiento de los picos de difracción de brushita hacia ángulos más bajos y además ha provocado un aumento en la intensidad del pico de difracción a $2\theta = 29,2^\circ$ correspondiente con un plano de cristal (14-1), indicando una posible preferencia de crecimiento en esta dirección (Figura 19). Además, el análisis de energía dispersiva de rayos X (EDX) de cristales individuales en la matriz del cemento ha indicado la presencia de iones de magnesio en unos cristales cuyo relación $[Ca+Mg]/P$ es igual a 1 (Tabla 4). Como la relación Ca/P característica de brushita es 1 y teniendo en cuenta el desplazamiento de los picos de difracción en los cementos dopados con magnesio, estos datos sugieren la introducción de los iones de magnesio en la estructura de la celdilla de brushita. Para confirmar este resultado se realizaron estudios de cristalografía más complejos empleando la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para realizar la difracción de electrones de área específica (SAED) y el análisis EDX para analizar cristales individuales con el objetivo de detectar la presencia de iones de magnesio.

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

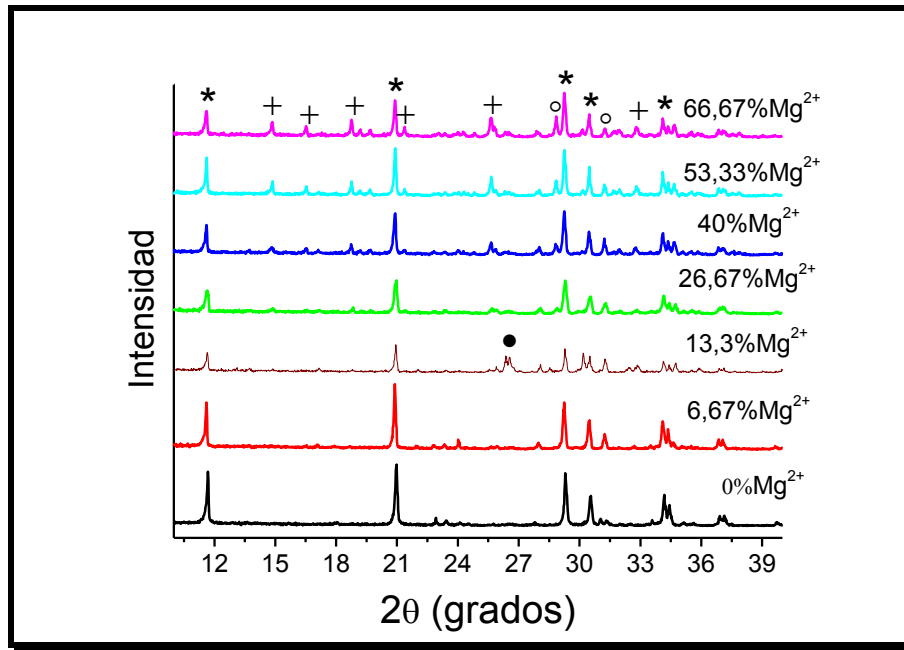


Figura 19. Patrones de difracción de rayos X de los CPC preparados con Mg-TCP. Los picos más prominentes son marcados para brushita (*), newberyíta (+), β -TCP ($^{\circ}$) y monetita (\bullet)

Tabla 4. Resultados de los análisis de SAED y EDX de cristales individuales de los cementos preparados con Mg-TCP

Análisis SAED		Análisis EDX					
Medida d(Å)	hkl	Ca	Mg	P	(Ca+Mg)/P	(Mg/Ca+Mg)%	Mineral
5,26316	020	2,43	47,63	49,94	1,0024	95,1%	Newberyíta
4,34783	102						
3,47826	221						
3,44444	122						
2,18579	214						
7,40741	020	46,81	1,50	51,68	0,9348	3,1%	Brushita
4,34783	12-1						
2,94118	12-1						
2,61438	150						
7,54717	020	45,95	1,36	52,69	0,8979	2,9%	Brushita
4,76190	110						
4,21053	12-1						
1,66667	25-3						

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

Los resultados de los análisis de SAED y EDX de los cristales individuales para identificar los cristales brushita y newberyíta (Figura 20 y la Tabla 4) mostraron la identificación de cristales brushita donde aproximadamente el 3% de los iones de calcio son sustituidos por iones de magnesio. Esto puede indicar que hay inclusión de iones de Mg^{2+} dentro de la red cristalina de brushita. De modo interesante, los cristales de newberyíta exhibieron aproximadamente 2,4% de iones de magnesio que han sustituidos iones de calcio.

La reacción de fraguado del cemento ha dado lugar a un elemento nuevo en la matriz de los cementos preparados con cerámicas cuyas relación $[Ca+Mg]/P \geq 26,67\%$. Los picos de difracción de esta fase nueva corresponden con newberyíta, un fosfato de magnesio ($MgHPO_4 \cdot 3H_2O$) (Figura 19). Además, restos de β -TCP no reaccionado fueron identificados en la matriz de los cementos. Así, hemos sido capaces de desarrollar un cemento nuevo que tiene un fosfato cálcico (brushita) y fosfato de magnesio (newberyíta), el cual podría tener propiedades interesantes para su uso como sustituto óseo y matriz de liberación de medicamentos. Por eso, a continuación, vamos a emplear varias técnicas para caracterizar este nuevo material.

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

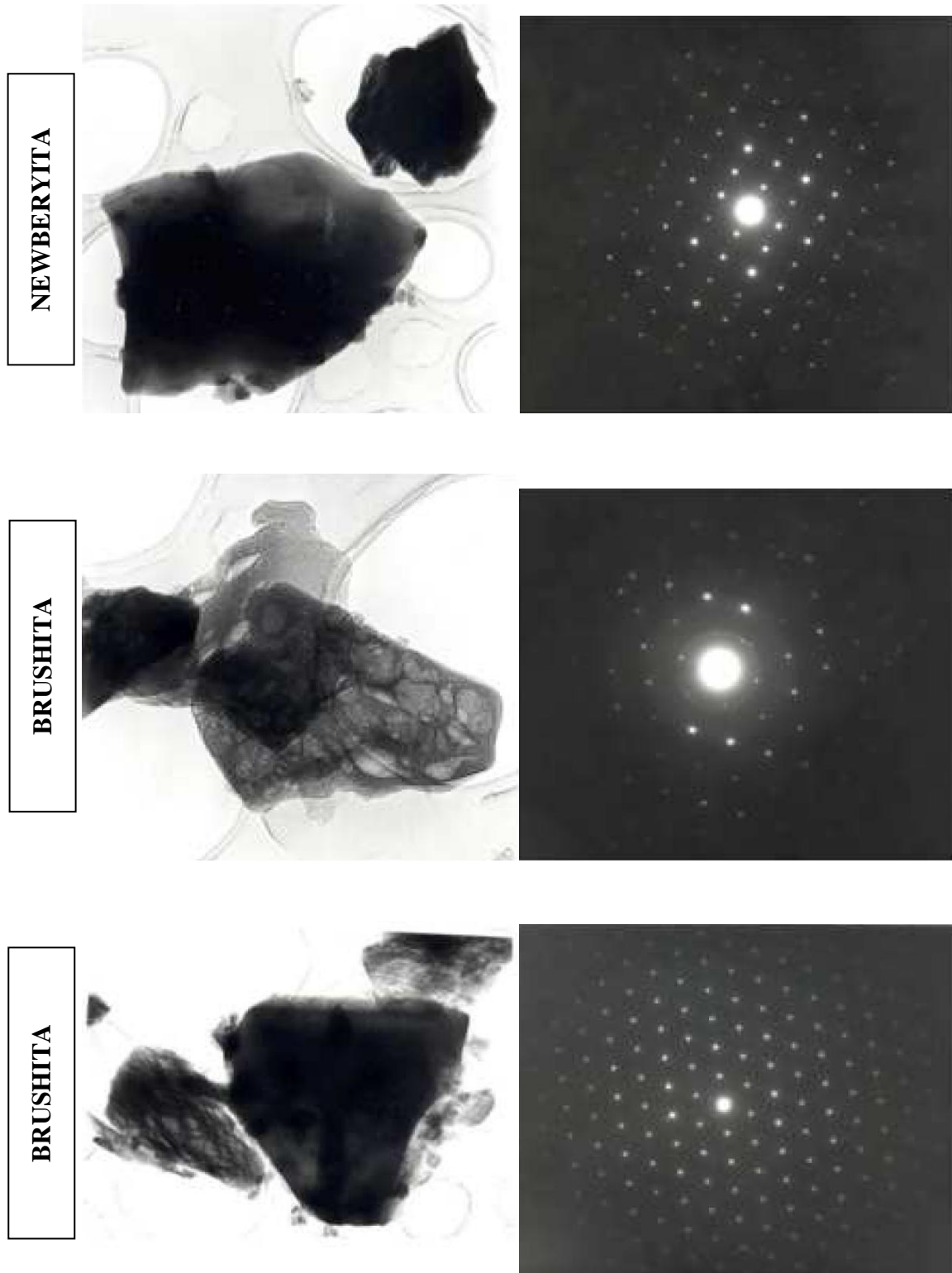


Figura 20. Imágenes de TEM y patrones SAED de cristales individuales en cementos de brushita preparados con cerámicas dopadas con Mg

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

❖ Determinación de tiempo de fraguado final (TFF) y fuerza de tensión diametral (FTD):

Caracterizamos el efecto de la incorporación de iones de Mg^{2+} sobre las propiedades de los cementos. El tiempo de fraguado final de los cementos de brushita (aprox. 2 minutos) fue significativamente incrementado por el dopaje de β -TCP por iones de Mg. El tiempo alcanzó un máximo de 95 min para los cementos preparados con 13,3% Mg-TCP pero disminuyó a aproximadamente 30 min para cementos preparados con 40% y 53,33% Mg-TCP. El tiempo final de fraguado fue aproximadamente de 60 min para cementos preparados con 66,67% Mg-TCP (Figura 21).

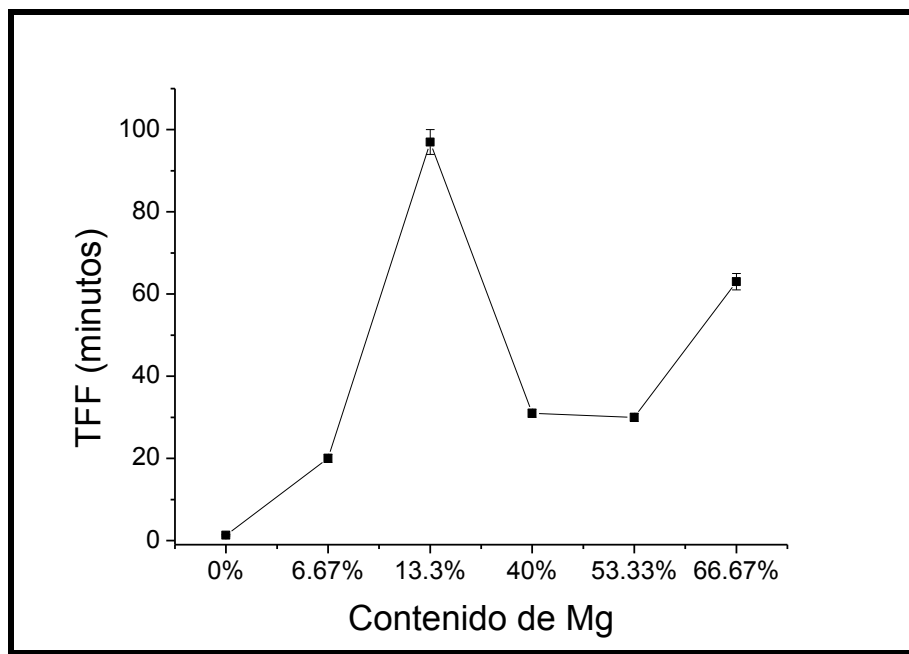


Figura 21. El tiempo final de fraguado (TFF) de los cementos preparados con Mg-TCP a relación PL de $3g.ml^{-1}$.

La FTD de los cementos sustituidos por Mg preparados en una relación polvo líquido (PL) de $3g.ml^{-1}$ fue medido después de ser sumergido en agua durante 24 horas. Los resultados indican deterioro en las propiedades mecánicas del cemento a bajo contenido de Mg. Es interesante, que los cementos sustituidos por Mg recuperan el FTD de los cementos control de brushita ($1,2 \pm 0,2$ MPa) a alto contenido de Mg (Figura 22).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

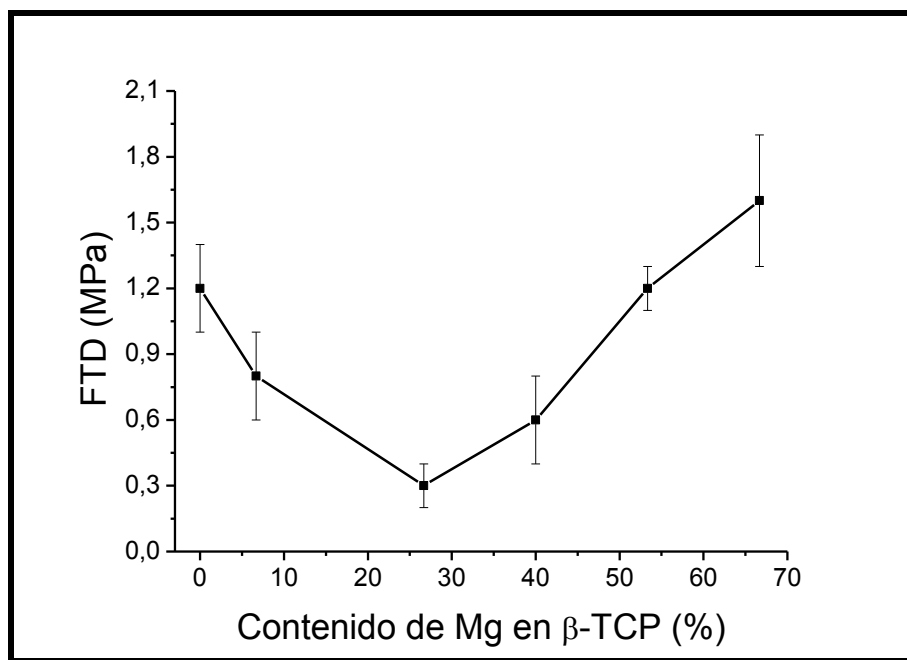


Figura 22. Fuerza de tensión diametral (FTD) de los cementos preparados con Mg-TCP a relación PL de 3 g.ml⁻¹.

❖ Determinación de la porosidad y el área de superficie específica

La porosidad del cemento fue caracterizada para muestras con diferentes contenidos de magnesio. La porosidad de los cementos de brushita es de 44% con un tamaño medio de poro de 0,63 μm y 81% de los poros tienen un tamaño menor de 1 μm . Esta porosidad se incrementa a un valor de 57% para el cemento preparado con un contenido de magnesio del 6,67% (Tabla 5). Sin embargo, el aumento en el contenido de magnesio también aumenta la densidad de los cementos como está indicado por el decaimiento casi lineal de la porosidad hacia un valor de 27% para el cemento preparado con 53,33% y 66,67% Mg-TCP (Tabla 5).

Sin embargo, la distribución de los diámetros de poro es significativamente desplazada hacia diámetros mayores de poro en los cementos preparados con Mg (Figura 23). Los cementos de brushita tienen una distribución bimodal del diámetro de poro con picos de 0,22 μm (bajo) y 0,44 μm (alto). Los cementos preparados con 6,67% Mg-TCP tienen también una distribución bimodal con picos en 0,82 μm (bajo) y 1,27 μm (alto) donde un 40% de los poros tienen un diámetro < 1 μm . Mientras, los CPC preparados con 26,67% de Mg-TCP tienen picos en 0,82 μm y 1,40 μm con 23% de

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

poros $< 1 \mu\text{m}$. Un nuevo pico aparece en $2,20 \mu\text{m}$ para los CPC preparados con 40% Mg-TCP con 17% de poros $< 1 \mu\text{m}$. Este nuevo pico aparece en $1,74 \mu\text{m}$ para cementos preparados con 53,33% Mg-TCP y 27% de los poros son $< 1 \mu\text{m}$. Para CPC preparados con $\leq 53,33\%$ de Mg, el 98% de los poros tienen un diámetro $< 10 \mu\text{m}$. La distribución del diámetro de los poros de 66,67% Mg-TCP tiene picos en $0,82, 1,23, 55$ y $216 \mu\text{m}$. Es interesante que el 5% de los poros tengan un diámetro $\geq 10 \mu\text{m}$ y 39% $< 1 \mu\text{m}$.

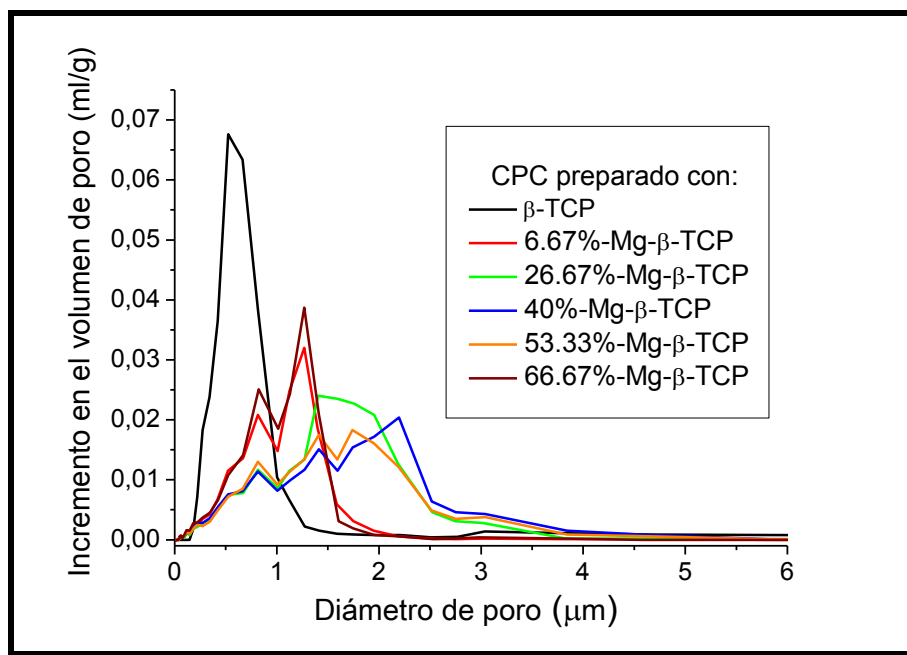


Figura 23. Distribución del diámetro de poros en CPC preparados con β -TCP de diferentes grados de contenido de Mg.

Tabla 5. Porosidad y diámetro de poro medio de los cementos preparados según el método A.

CPC preparados con	Porosidad de Hg	Diámetro de poro medio
β -TCP	44%	$0,63 \mu\text{m}$
6,67% Mg-TCP	57%	$1,12 \mu\text{m}$
26,67% Mg-TCP	45%	$1,07 \mu\text{m}$
40% Mg-TCP	38%	$0,64 \mu\text{m}$
53,33% Mg-TCP	27%	$0,31 \mu\text{m}$
66,67% Mg-TCP	27%	$0,07 \mu\text{m}$

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

La medición del área de superficie específica (ASE) indicó que solo los CPC preparados con 26,67% de Mg tienen una mayor ASE ($5,85 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) que los cementos de brushita ($5,10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). El ASE tiende a disminuir con el aumento en contenido de Mg. Valores de ASE de 2,44, 1,80 y $0,55 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ fueron determinados para CPC preparados con 6,67%, 53,33% y 66,67% de Mg respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del área de superficie específica de los cementos preparados según el método A.

CPC preparados con:	Área específica BET (m^2/g)
β -TCP	5,10
6,67% Mg-TCP	2,44
26,67% Mg-TCP	5,85
53,33% Mg-TCP	1,80
66,67% Mg-TCP	0,55

❖ Efecto de los iones de magnesio en el pH de la reacción de fraguado del cemento:

El pH de la reacción de fraguado del cemento no modificado es aprox. de 2 en los primeros minutos, que luego baja hasta llegar a un pH de 1,76; en el minuto 8 empieza a subir hasta llegar a un pH de 2,04 a los 144 minutos. Esta tendencia fue similar en el caso del cemento preparado con 6,67% Mg-TCP. Sin embargo, concentraciones altas de magnesio han producido un cambio notable en la cinética del pH. El pH de los cementos preparados con 26,67% Mg-TCP y 40% Mg-TCP empiezan a subir hasta llegar a un pH de 2,55 y 3,68 respectivamente. A partir de ese momento, el pH sigue estable en los cementos preparados con 26,67% Mg-TCP, mientras que el cemento preparado con 40% Mg-TCP registra una disminución de pH que empieza en el minuto 28 hasta el minuto 65 para luego mantenerse estable en un pH de 3,31.

El pH del cemento preparado con 53,33% Mg-TCP empieza con un valor de 3,49 para luego subir hasta 3,8, a los 11 minutos baja hasta 3,67 y a los 32 minutos el pH va subiendo paulatinamente hasta alcanzar 3,88 a los 144 minutos. Los cementos

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

preparados con 66,67% de Mg-TCP presentan un pH inicial de 2,84 que luego sube hasta 4,07 en los primeros doce minutos, para luego disminuir hasta 3,69 a los 28 min, posteriormente va subiendo ligeramente hasta hacerse estable en 3,81 (Figura 24).

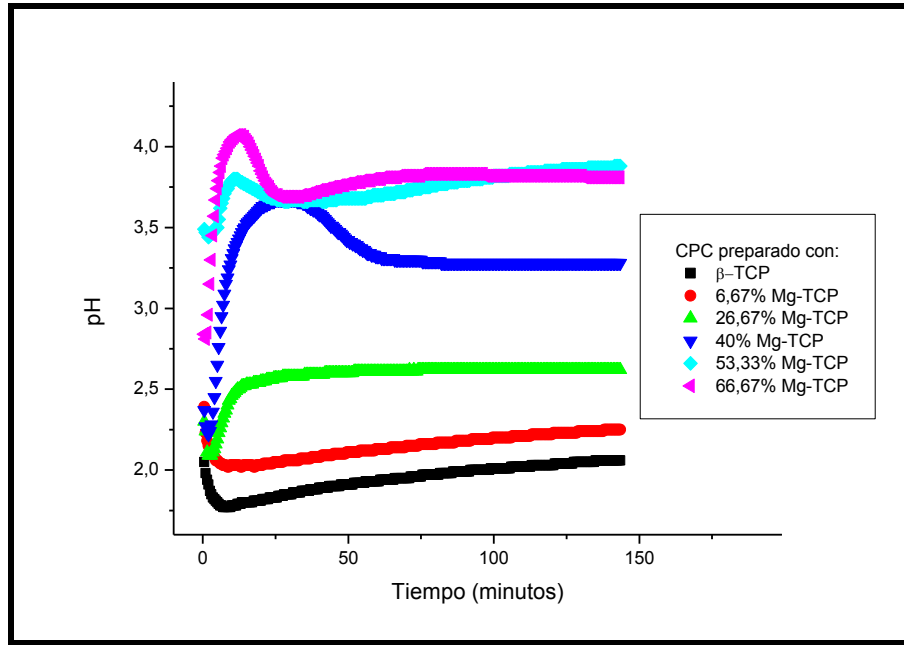


Figura 24. Registro del pH durante el fraguado del cemento.

❖ Caracterización morfológica y microestructural:

El análisis de SEM mostro que los cristales en forma de placa que comúnmente observamos en los cementos de brushita (Figura 25A) adoptan una forma redondeada al ser preparados con Mg-TCP (Figura 25B). Estos cristales redondos de los CPC preparados con Mg-TCP tienen dos diámetros principales de $2,2 \pm 0,3$ y $17 \pm 2 \mu\text{m}$ (Figura 25C y 25D). Los grandes cristales redondos dentro de la matriz del CPC preparado con 53,33% Mg-TCP tienen un promedio de diámetro de $11 \pm 1 \mu\text{m}$. Además, se observó una morfología de superficie compacta en el cemento preparado con 53,33% Mg-TCP debido a una red densa y sólida que rellena los microporos del cemento (Figura 25E).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

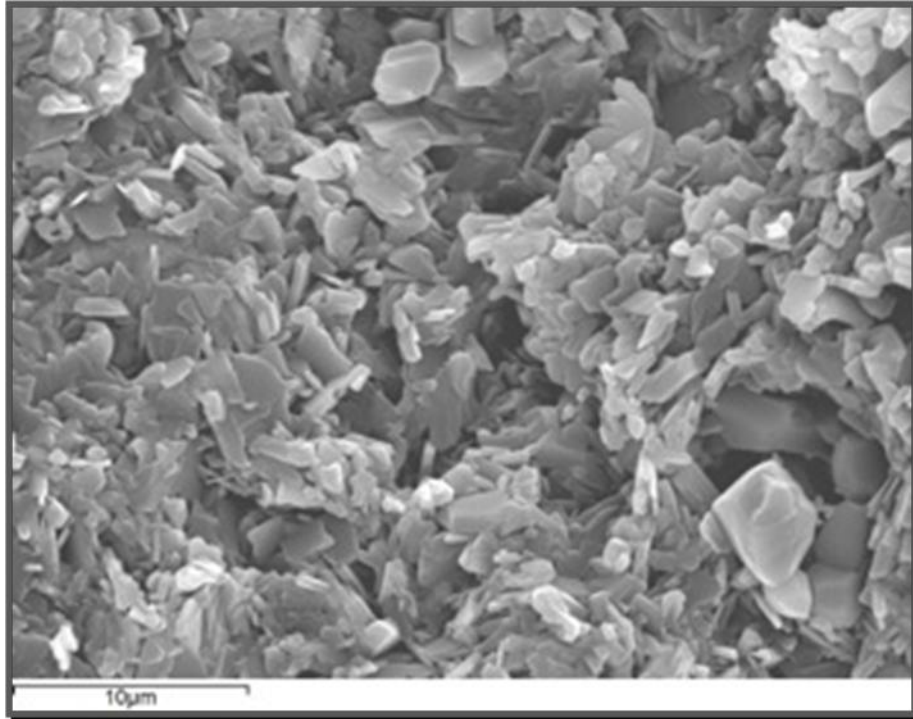


Figura 25A. SEM, imagen de la superficie del cemento de brushita sin magnesio.

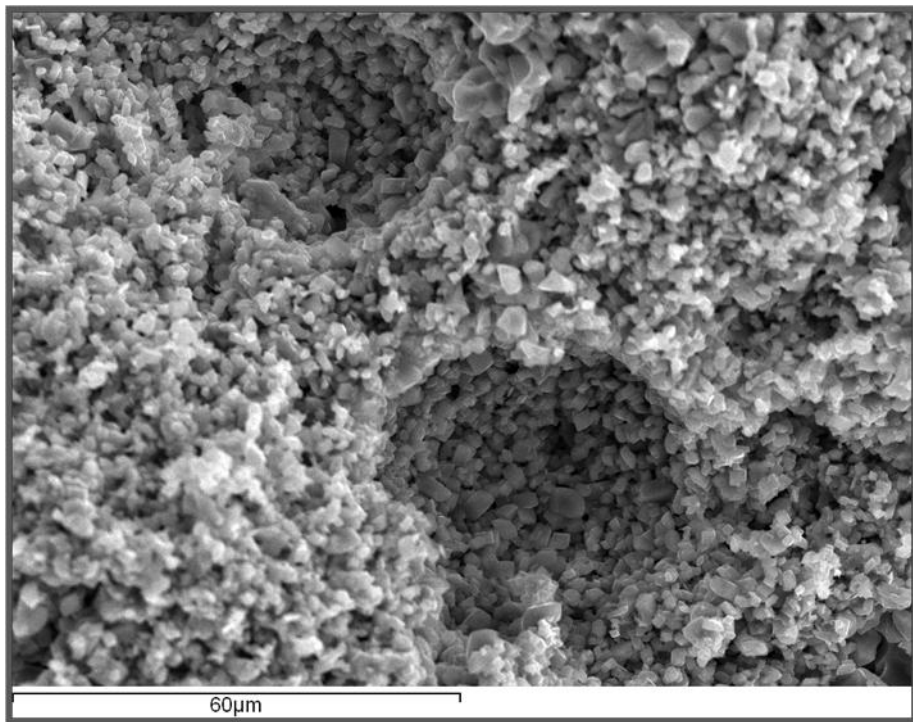


Figura 25B. SEM, imagen de la superficie de CPC preparado con 6,67% Mg-TCP

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

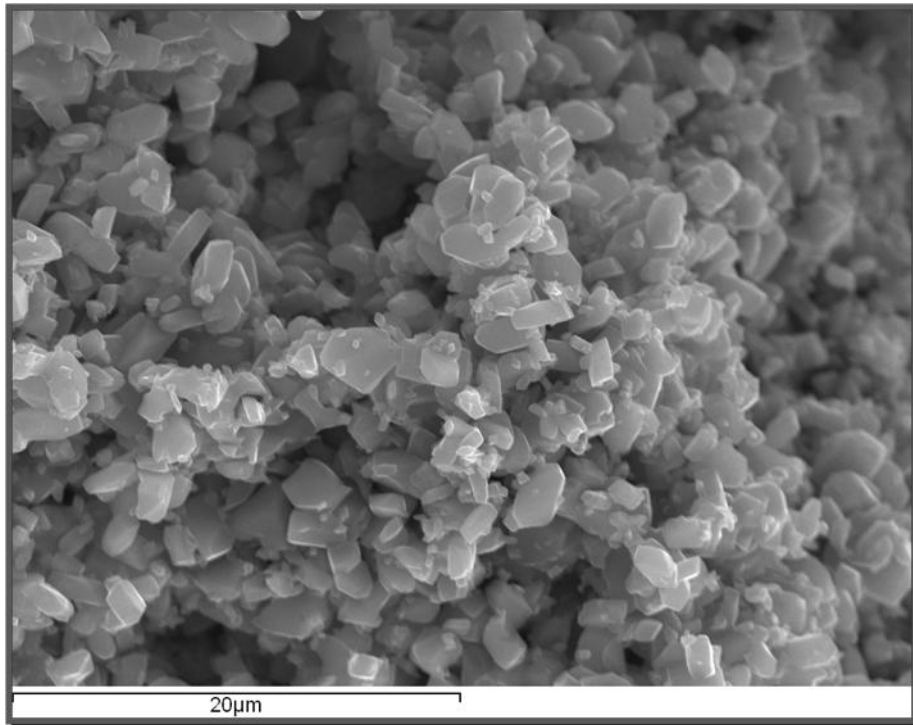


Figura 25C. SEM, imagen de la superficie de CPC preparado con 26,67% Mg-TCP.

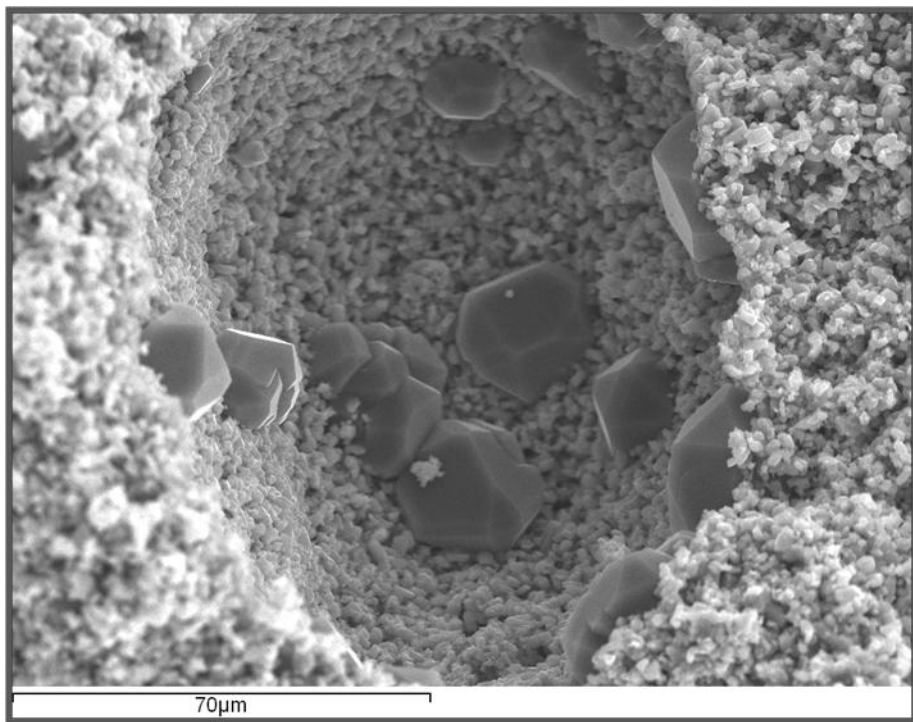


Figura 25D. SEM, imagen de la superficie de CPC preparado con 26,67% Mg-TCP.

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

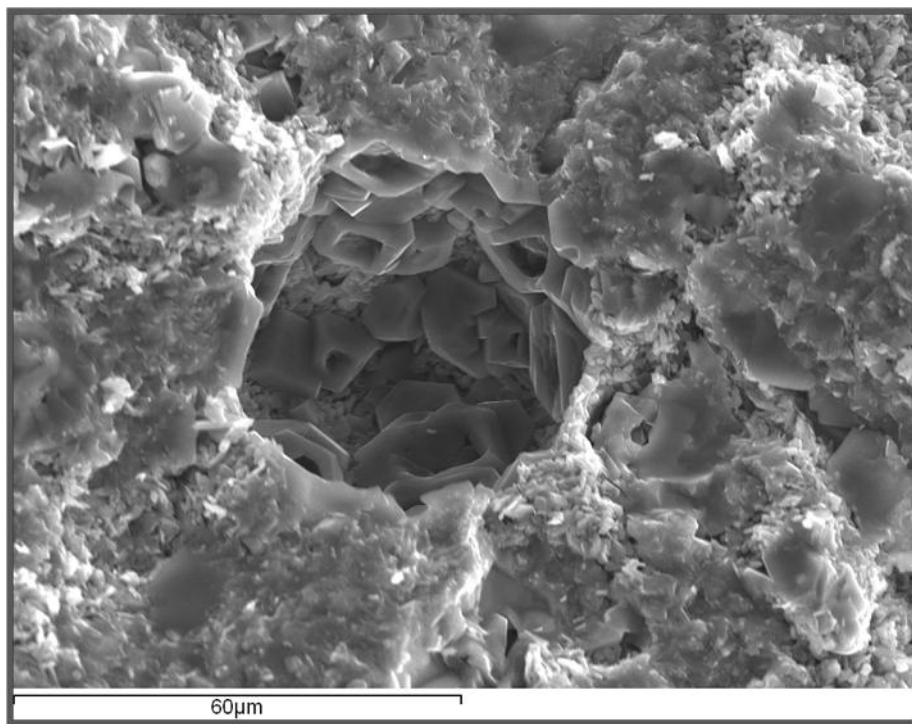


Figura 25E. SEM, imagen de la superficie de CPC preparado con 53,33% Mg-TCP.

❖ Liberación de iones:

Pensando en posibles aplicaciones, hemos estudiado la capacidad de estos cementos como sustratos para liberar iones de Ca^{2+} (Figura 26A) y Mg^{2+} (Figura 26B) mediante su inmersión en agua durante 7 días. Los resultados muestran que los iones liberados de las muestras de cemento fueron significativamente afectados por la incorporación de magnesio en cementos de brushita. La liberación de los iones de Ca^{2+} disminuyó por el aumento en el contenido de magnesio, mientras la liberación de los iones de Mg^{2+} fue mayor en los CPC preparados con 26,67% Mg-TCP. El perfil de la liberación iónica en CPC no dopado con magnesio y CPC preparado con 26,67% Mg-TCP consiste en una ráfaga inicial de aproximadamente 271 ppm/día y 170 ppm/día respectivamente, que pasa a ser constante (aprox. 39 ppm/día y 22 ppm/día respectivamente) después del segundo día de incubación. Curiosamente, los CPC preparados con 66,67% Mg-TCP liberan iones constantes de Ca (aprox. 13 ppm/día) y iones de magnesio (aprox. 60 ppm/día) durante todo el periodo de observación indicando una cinética de liberación de orden cero.

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

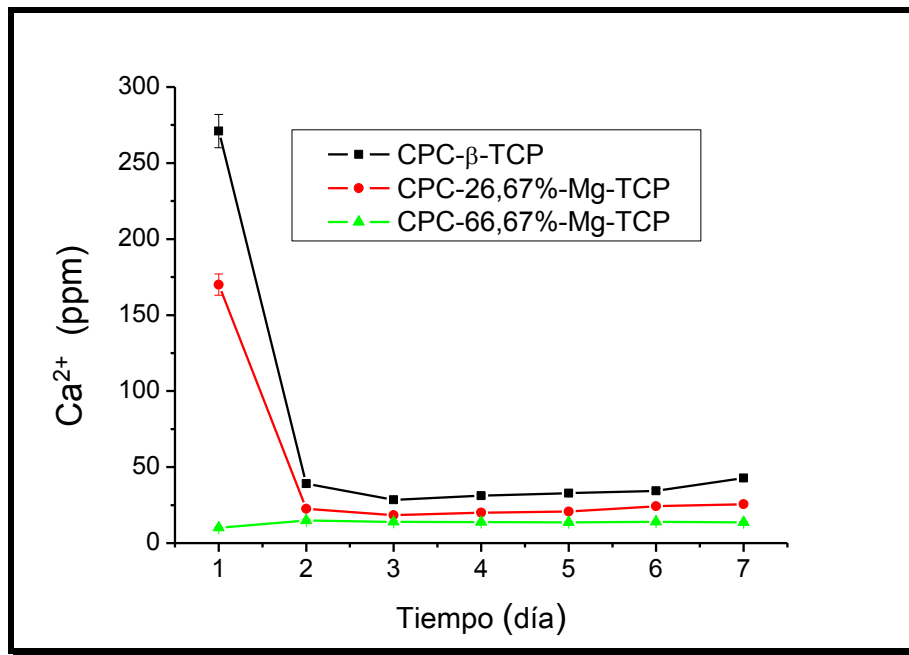


Figura 26A. Liberación de iones de Ca desde CPC preparados con β -TCP, 26,67% Mg-TCP y 66,67% Mg-TCP

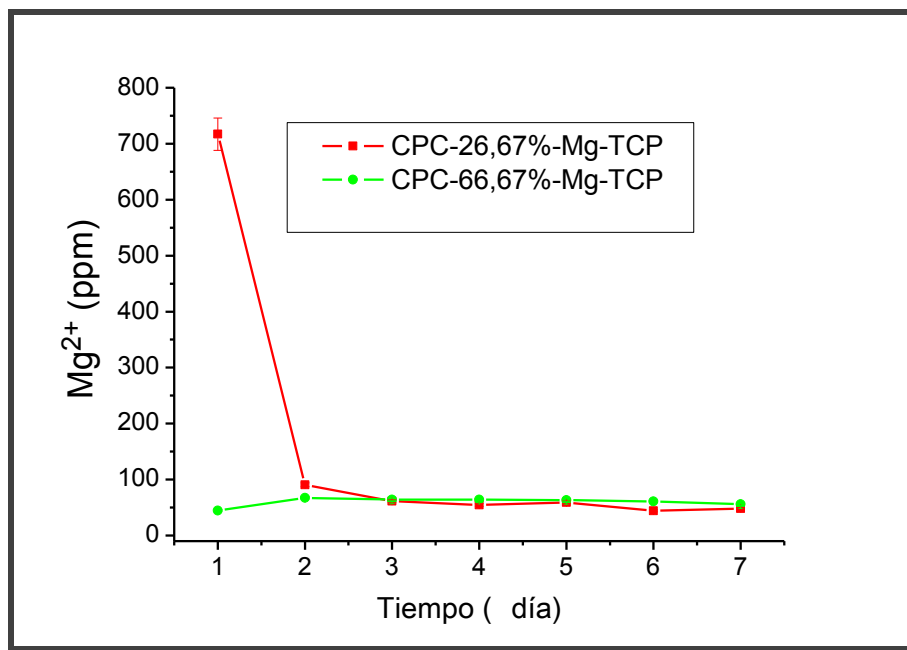


Figura 26B. Liberación de iones de Mg desde CPC preparados con β -TCP, 26,67% Mg-TCP y 66,67% Mg-TCP

El pH del medio de incubación muestra que los cementos de brushita sin sustituir son más ácidos que los cementos de brushita sustituidos parcialmente con

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

magnesio. Después de 48 horas de incubación el pH de los cementos preparados con β -TCP, 6,67%Mg-TCP y 26,66 % Mg-TCP estuvieron alrededor de 6,75 y el pH de los cementos con mayor contenido de magnesio (40% y 66,67% de Mg-TCP) estuvieron entre 7,25 y 7,74 respectivamente (Figura 27).

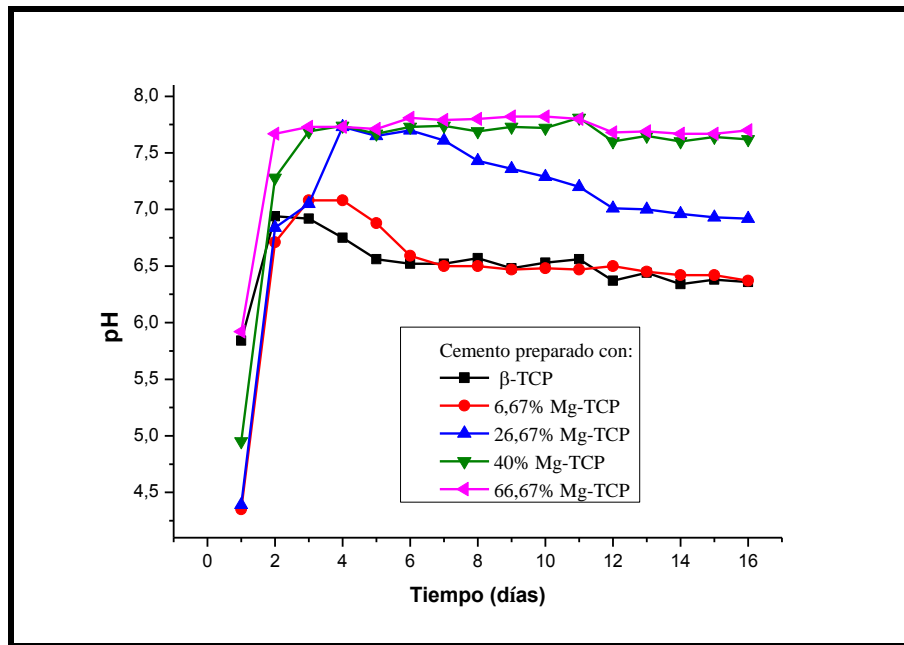


Figura 27. Cambios en el pH del medio tras la incubación de cemento.

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

6.1.3. Cementos preparados según el método B: β -TCP + Mg-MCPM:

❖ Difracción de rayos X:

El β -TCP sustituido con Mg fue reaccionado con ácido fosfórico (8M) que resultó en MCPM como producto principal y pequeñas cantidades de monetita. El producto fabricado fue triturado y tamizado con una malla menor de 500 micras de tamaño de poro y se reaccionó con β -TCP en presencia de agua que dio lugar como producto principal a la brushita. Los cementos dopados con magnesio muestran cambios en la composición de la matriz cristalina: monetita y aumento en el contenido β -TCP sin reaccionar son evidentes en los patrones de difracción de los cementos brushita dopados con magnesio. Sin embargo, este sistema de cemento ha inhibido la formación de la Newberyíta ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a favor de brushita en los cementos preparados con un contenido de magnesio $\leq 40\%$. En este caso se observa que, los picos de difracción de brushita se han desplazado a ángulos de difracción más bajas. Este desplazamiento es más alto para el CPC preparado con 66,67% Mg-MCPM y el más bajo para los CPC preparados con 6,67% y 53,33% Mg-MCPM (Figura 28).

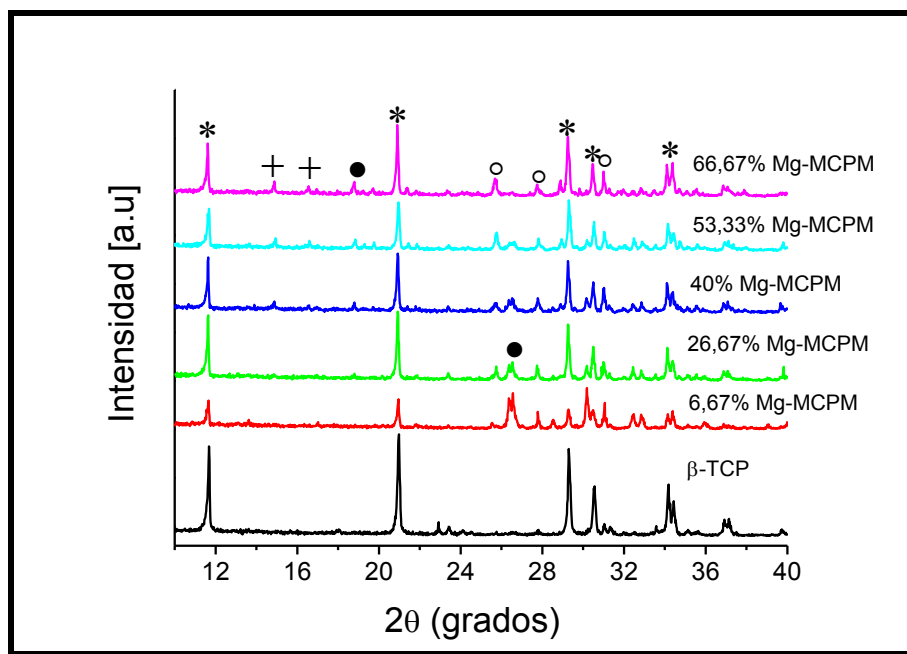


Figura 28. Patrones de difracción de rayos X de los CPC preparados con MCPM dopados con Mg. Son marcados los picos más prominentes de: brushita (*), newberyíta (+), monetita (•) and β -TCP (°).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

❖ Determinación del tiempo de fraguado final (TFF) y la fuerza de tensión diametral (FTD):

El tiempo de fraguado final de los cementos aumentó en los cementos preparados con 26,67% de Mg-MCPM (aprox. 96 minutos), sin embargo, al aumentar el contenido de magnesio el tiempo de fraguado final disminuye linealmente hasta alcanzar aproximadamente 30 minutos para los cementos preparados con 66,67% de Mg (Figura 29).

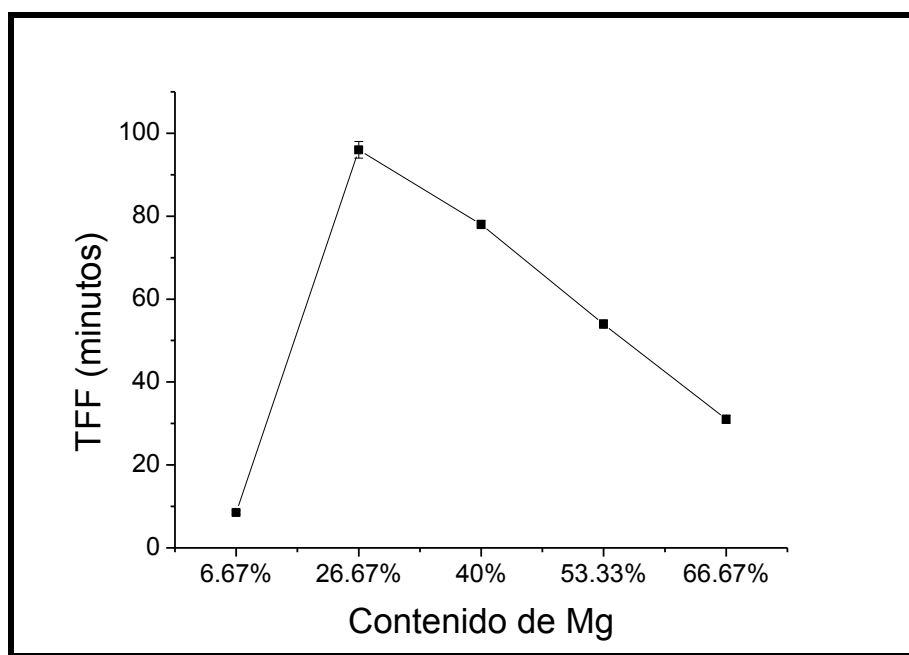


Figura 29. El tiempo final de fraguado de los cementos preparados en una relación polvo-líquida de 3 g.ml^{-1} con Mg-MCPM. El contenido de Mg va desde 6,67% a 66,67%.

La FTD de los CPC preparados con MCPM sustituidos con Mg fue disminuyendo con el aumento en el contenido de Mg en el MCPM. Sin embargo, los cementos preparados con 6,67% Mg-MCPM tienen mejor FTD que los cementos preparados con 66,67% Mg-MCPM. Este es una comparación con FTD de cementos de brushita preparados a PL de 3 g.ml^{-1} (Figura 30).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

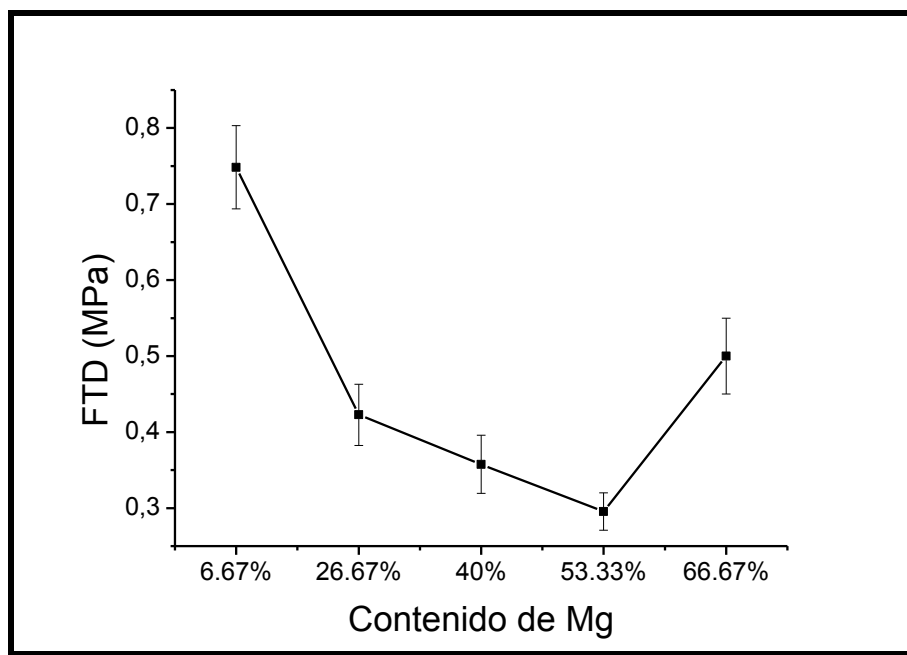


Figura 30. La FTD de cementos preparados con MCPM sustituidos con Mg después del envejecimiento en agua durante 24 horas.

❖ Determinación de la porosidad y el área de superficie específica:

La porosidad de los cementos de brushita sin sustitución es de 44% con una media de tamaño de poro de $0,63 \mu\text{m}$ y 81% de diámetro de los poros menor de $1 \mu\text{m}$. La porosidad de los cementos preparados con Mg-MCPM oscila entre 31% - 37% con una media de los diámetros de los poros entre $0,66 - 0,95 \mu\text{m}$ (Tabla 7).

Este sistema disminuye la porosidad de los cementos de brushita pero aumenta la media de los diámetros de los poros hasta $0,95 \mu\text{m}$ para CPC preparados con 26,67% Mg-MCPM. La distribución del tamaño de poro presentan múltiples picos en $0,9$; $1,1$; $1,5$ y $1,8 \mu\text{m}$ y un pico interesante de $216 \mu\text{m}$ para los cementos preparados con 6,67% Mg-MCPM, 26,66% Mg-MCPM y 40% Mg-MCPM. Sin embargo estos picos se desplazan a $0,2$, $0,3$ y $0,6 \mu\text{m}$ para cementos preparados con 53,33% Mg-MCPM y picos en $0,03$ y $0,47 \mu\text{m}$ para cementos preparados con 66,67% Mg-MCPM y este último mantiene el pico en $216 \mu\text{m}$. Los CPC con $\geq 40\%$ de Mg-MCPM tienen más del 95% de los diámetros de poros menos que $1 \mu\text{m}$ (Figura 31).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

Tabla 7. Porosidad y diámetro de poro medio de los cementos preparados según el método B.

CPC preparados con	Porosidad Hg	Diámetro de poro medio
β -TCP	44%	0,63 μm
6,67% Mg-MCPM	31%	0,66 μm
26,67% Mg-MCPM	37%	0,95 μm
40% Mg-MCPM	35%	0,88 μm
53,33% Mg-MCPM	30%	0,86 μm
66,67% Mg-MCPM	36%	0,74 μm

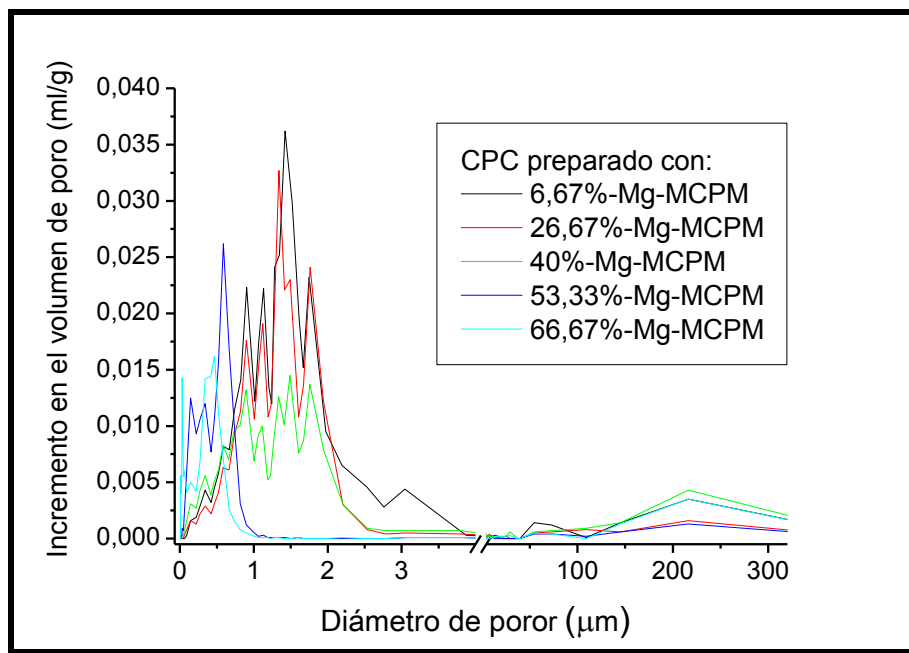


Figura 31. Distribución del diámetro de poros en CPC preparados con MCPM de diferentes grados de contenido de Mg.

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

❖ Determinación del pH del medio tras la incubación del cemento:

El pH del medio de incubación muestra que los cementos preparados con diferentes concentraciones de Mg-MCPM presentan resultados similares entre sí pero son alcalinos ($\text{pH} > 7,6$) con respecto a los cementos de brushita sin sustituir ($\text{pH} > 4,4$) durante las primeras 24 horas de incubación. A partir del segundo día, el pH del medio de incubación de los cementos de brushita sin sustituir aumenta hasta alcanzar un pH de 6,8 y se mantienen durante todo el experimento entre 6,4 y 6,6. En caso de los cementos preparados con Mg-MCPM presentan un pH entre 7,6 y 7,9 en el medio de incubación (Figura 32).

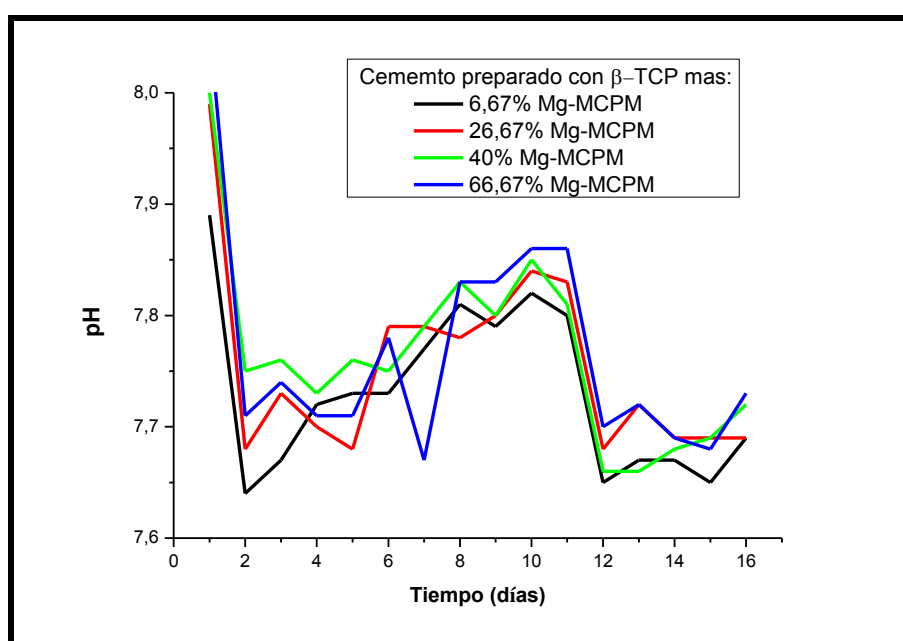


Figura 32. Cambios en el pH del medio tras la incubación de cementos.

❖ Caracterización Microestructural:

El análisis de las imágenes del microscopio electrónico de barrido demostró que los CPC preparados con Mg-MCPM presentan cambios morfológicos en los cristales comparados con los cementos sin sustituir. Esta morfología es la misma que los cementos preparados con Mg-TCP, que son cristales redondos como podemos observar en la figura 33A. Estos cristales presentan diámetros de $2,29 \pm 0,5$ y $11,84 \pm 0,4$ y también observamos macroporos con diámetros que van desde $112 \mu\text{m}$ hasta $160 \mu\text{m}$ (figuras 33B y 33C). Además, observamos cristales de $0,54 \pm 0,05$ en los cementos preparados con 53,33% Mg-MCPM, que son diámetros menores a los observados en los cementos preparados con Mg-TCP (Figura 33D).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

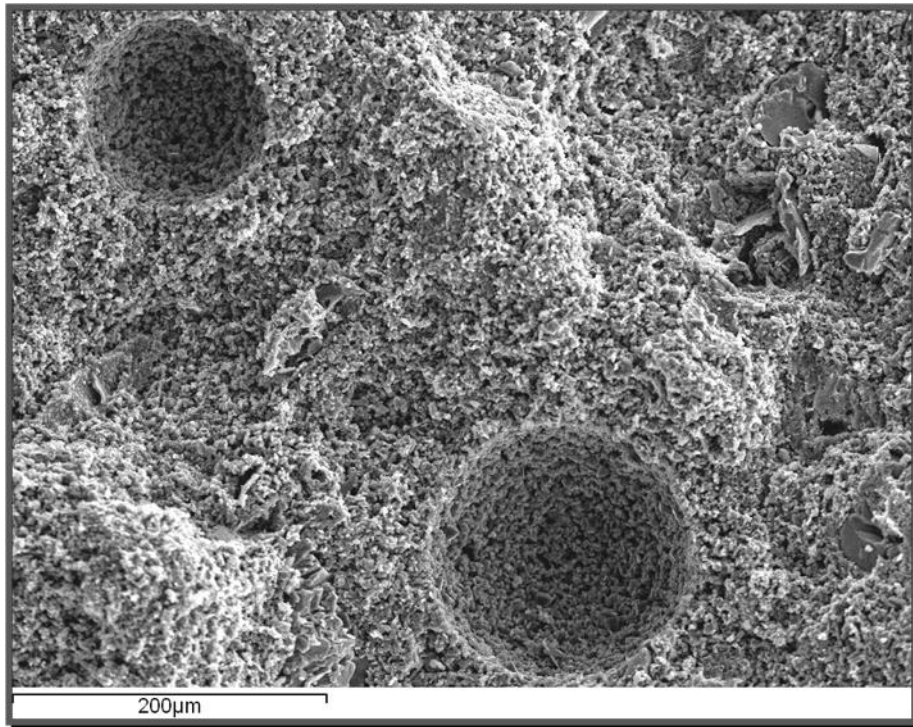


Figura 33A. Imagen de la superficie del CPC preparado con 26,66% Mg-MPCM

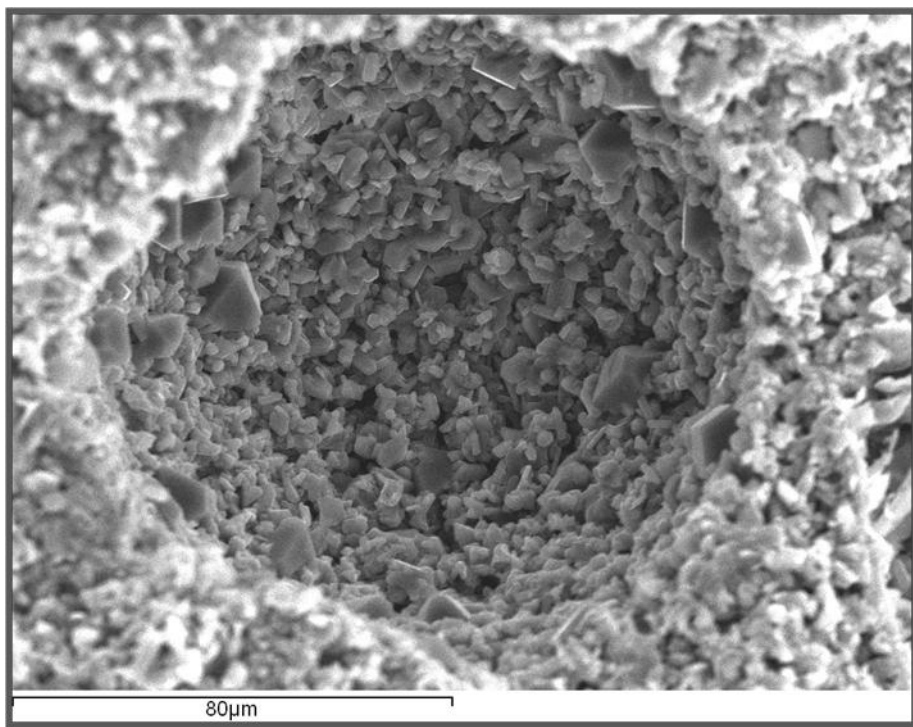


Figura 33B. Imagen de la superficie del CPC preparado con 26,66% Mg-MPCM

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

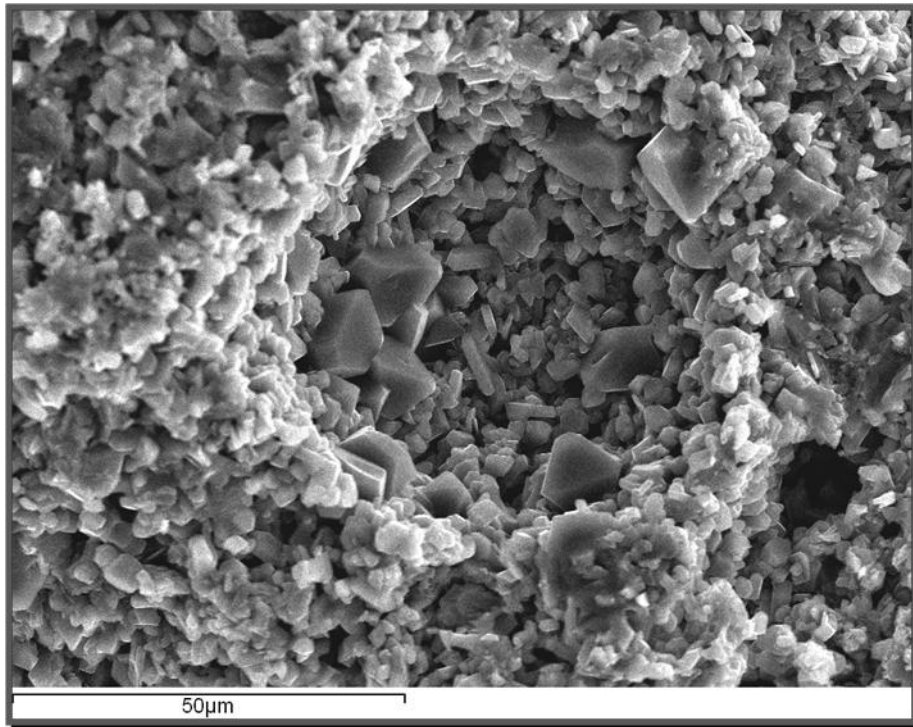


Figura 33C. Imagen de la superficie del CPC preparado con 26,66% Mg-MPCM

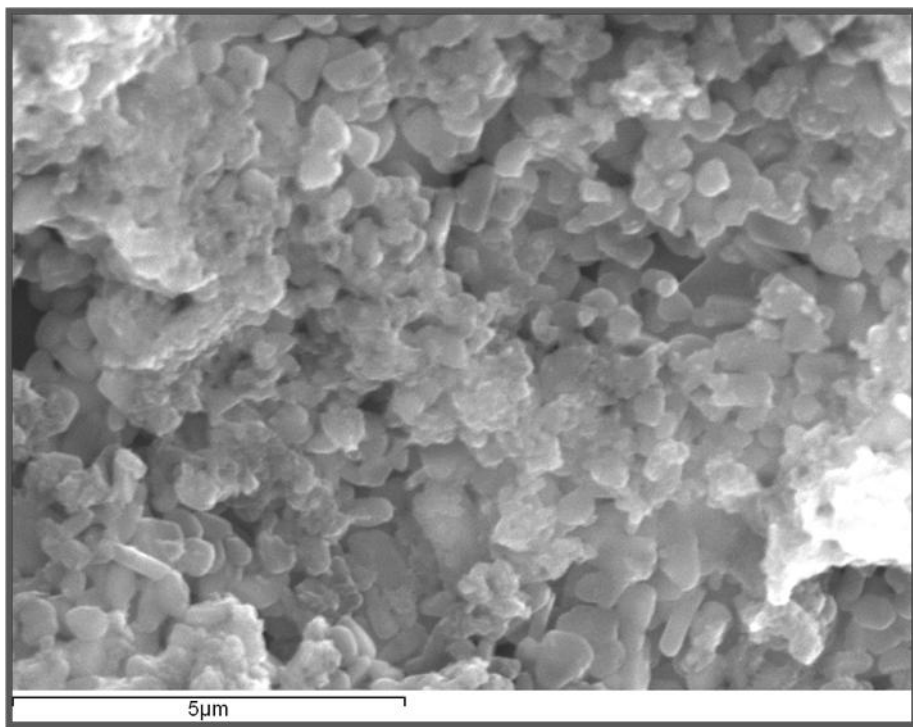


Figura 33D. Imagen de la superficie del CPC preparado con 53,33% Mg-MPCM

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

6.6.4. Cementos preparados según el método C: 66,67%Mg-TCP + Mg-MCPM

❖ Difracción de rayos X:

El análisis estructural de los CPC resultado de la reacción de 66,67%Mg-TCP con MCPM a diferentes contenidos de magnesio reveló que la matriz del cemento está compuesta de brushita, newberyíta, monetita y stanfieldita residual y sin reaccionar $\text{Ca}_{2.589}\text{Mg}_{0.411}(\text{PO}_4)_2$ (Figura 34). Es interesante observar que, al aumentar el contenido de magnesio en MCPM se induce la precipitación de más newberyíta a expensas de brushita y monetita hasta que se forma el componente predominante de la matriz del cemento a altas concentraciones de magnesio. Cabe mencionar, que los picos de brushita se han desplazado hacia ángulos de difracción más bajos.

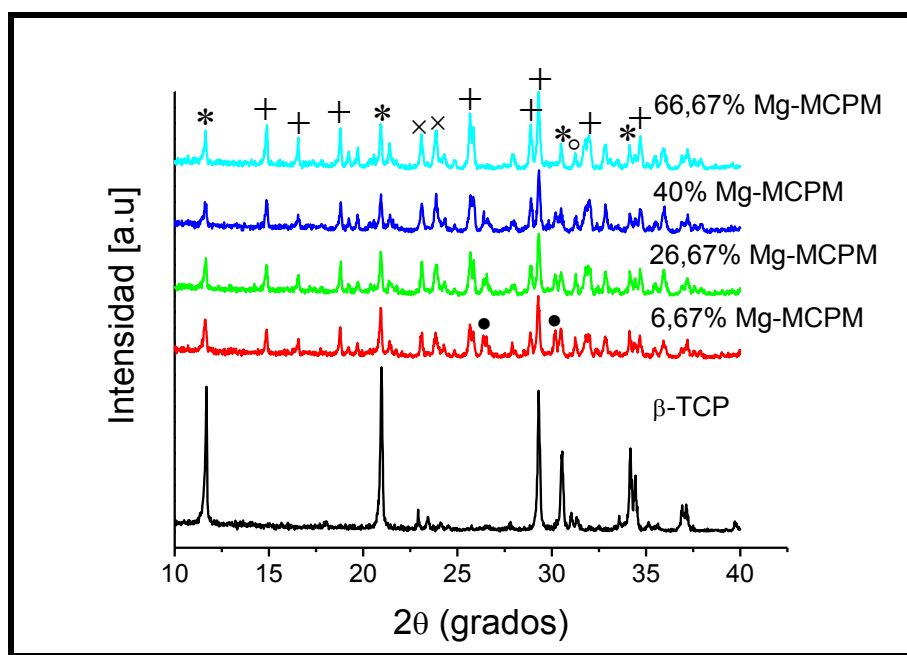


Figura 34. Patrones de difracción de rayos X de los CPC preparados por una reacción de 66.67%Mg-TCP con Mg-MCPM. Los picos más prominentes son para brushita (*), newberyíta (+), monetita (•), stanfieldita (×) y $\text{Ca}_{2.589}\text{Mg}_{0.411}(\text{PO}_4)_2$ (°).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

❖ Determinación del tiempo de fraguado final y la fuerza de tensión diametral (FTD):

La incorporación de iones de Mg^{2+} en el β -TCP y en el MCPM que se utilizan para la preparación de estos nuevos cementos aumenta el tiempo de fraguado final de los cementos de brushita hasta 11 minutos en los cementos preparados con 6,67%Mg-MCPM pero disminuyó hasta aproximadamente a 8 minutos 30 segundos para los cementos preparados con 26,67%Mg-MCPM, 40% Mg-MCPM y 53,33% Mg-MCPM llegando a alcanzar aproximadamente 7 minutos en los CPC preparados con 66,67%Mg-MCPM (Figura 35).

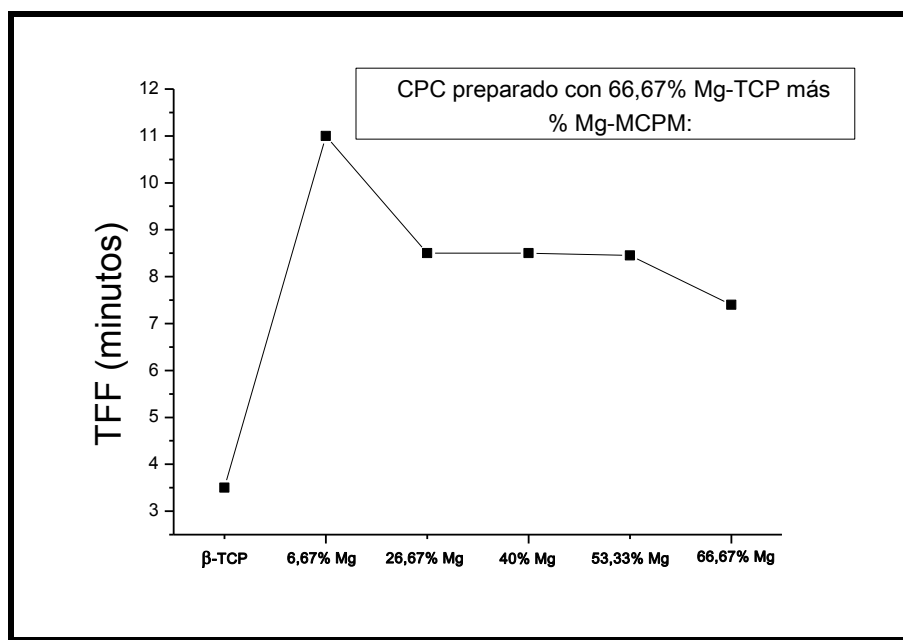


Figura 35. Tiempo de fraguado final de los cementos preparados con 66,67% de Mg-TCP y diferentes concentraciones de Mg-MCPM

La prueba mecánica de los cementos preparados con Mg reveló una mejora de la fuerza de tensión diametral, llegando a aproximadamente 2MPa para cementos preparados con 6,67%Mg-MCPM. El aumento en el contenido de Mg de los cementos resultó en valores de fuerza de tensión diametral comparables con cementos de brushita libre de Mg que es de aproximadamente 1 MPa (Figura 36).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

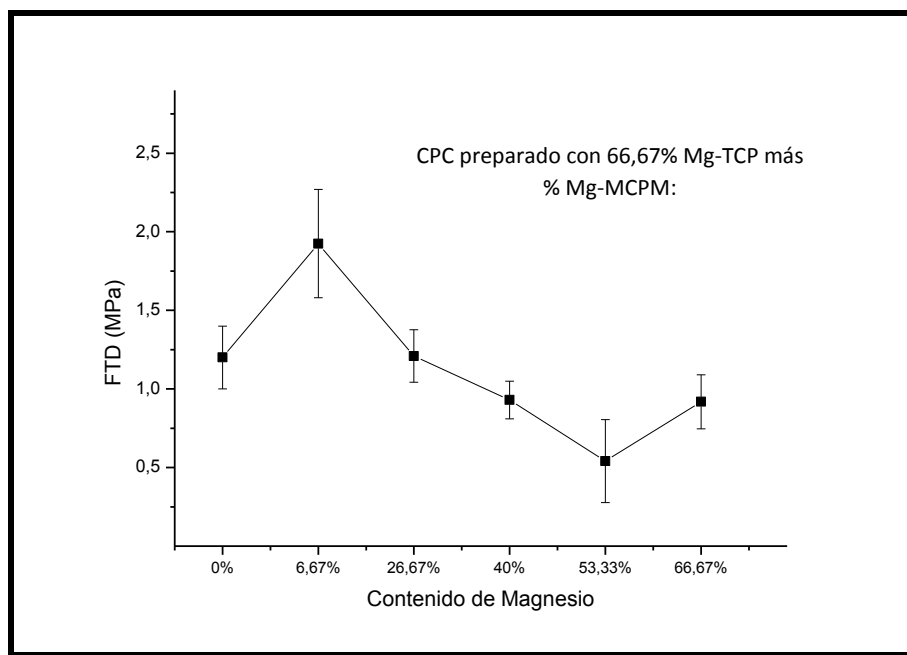


Figura 36. Fuerza de tensión diametral de los cementos preparados con 66,67% de Mg TCP y diferentes concentraciones de Mg-MCPM

❖ Determinación de la porosidad y el área de superficie específica :

La porosidad de los cementos de brushita es del 44%, este porcentaje disminuye al incorporarse iones de Mg^{2+} en el β -TCP y el MCPM oscilando entre 24% y 28%. La media del diámetro de poro disminuye ligeramente, oscilando entre $0,55 \mu m$ y $0,62 \mu m$ con respecto a los cementos de brushita sin sustitución iónica que es de $0,63 \mu m$ (Tabla 8). La distribución de los diámetros de poro de estos cementos presenta picos en $0,34 \mu m$, $0,90 \mu m$, $1,27 \mu m$ y un pico muy interesante en $215 \mu m$ (Figura 37).

Tabla 8. Porosidad y diámetro de poro medio de los cementos preparados según el método C.

CPC preparados con 66,67% Mg-TCP más	Porosidad Hg	Diámetro de poro medio
B-TCP	44%	$0,63 \mu m$
6,67% Mg-MCPM	24%	$0,55 \mu m$
26,67% Mg- MCPM	26%	$0,55 \mu m$
53,33% Mg- MCPM	30%	$0,57 \mu m$
66,67% Mg- MCPM	28%	$0,62 \mu m$

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

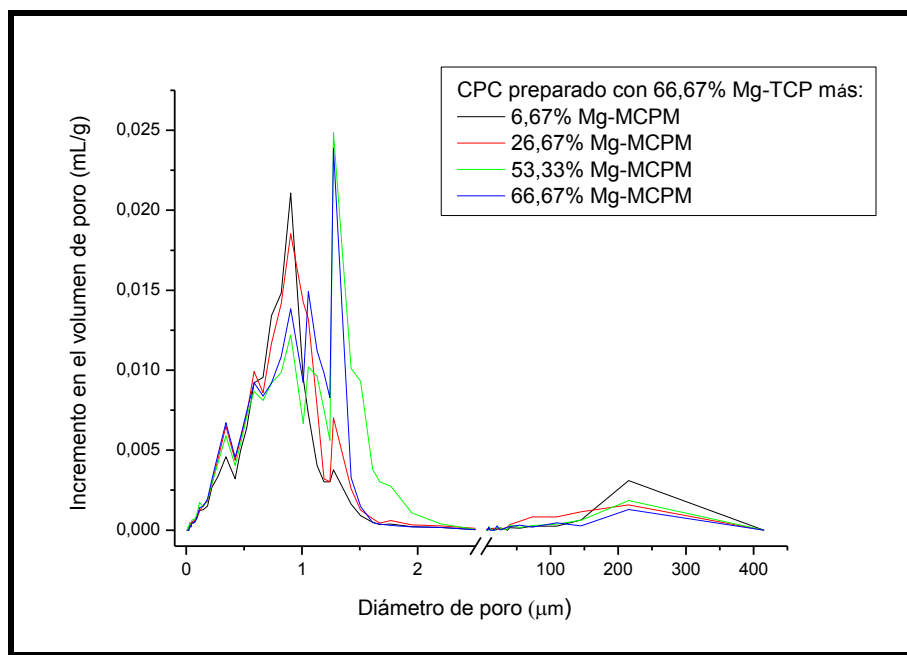


Figura 37. Distribución del diámetro de poros en CPC preparados con 66,67% de Mg TCP y diferentes concentraciones de Mg-MCPM

La medición del área de superficie específica (ASE) muestra que los cementos preparados con Mg tienen una menor ASE que los cementos de brushita ($5,10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). El ASE es similar para de los cementos preparados 6,67% Mg-MCPM y con 26,67% Mg- MCPM y valores de ASE de $1,24$ y $1,01 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ fueron determinados para los cementos preparados con 53,33% y 66,67% de Mg-MCPM respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del área de superficie específica de los cementos preparados según el método C.

CPC preparados con 66,67% Mg-TCP más	Área específica BET (m^2/g)
6,67% Mg-MCPM	0.8998 ± 0.0027
26,67% Mg- MCPM	0.8892 ± 0.0065
53,33% Mg- MCPM	1.2411 ± 0.0039
66,67% Mg- MCPM	$1,0143 \pm 0,0117$

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

❖ Determinación del pH de fraguado de la pasta del cemento:

La incorporación de iones de Mg^{2+} en los cementos de brushita ha aumentado significativamente el pH de la pasta del cemento en el momento del fraguado. El pH va aumentando al aumentar el contenido de Mg (Figura 38) hasta alcanzar un $pH \geq 7$ a los 400 minutos del análisis, volviéndose entonces constante hasta el final del experimento.

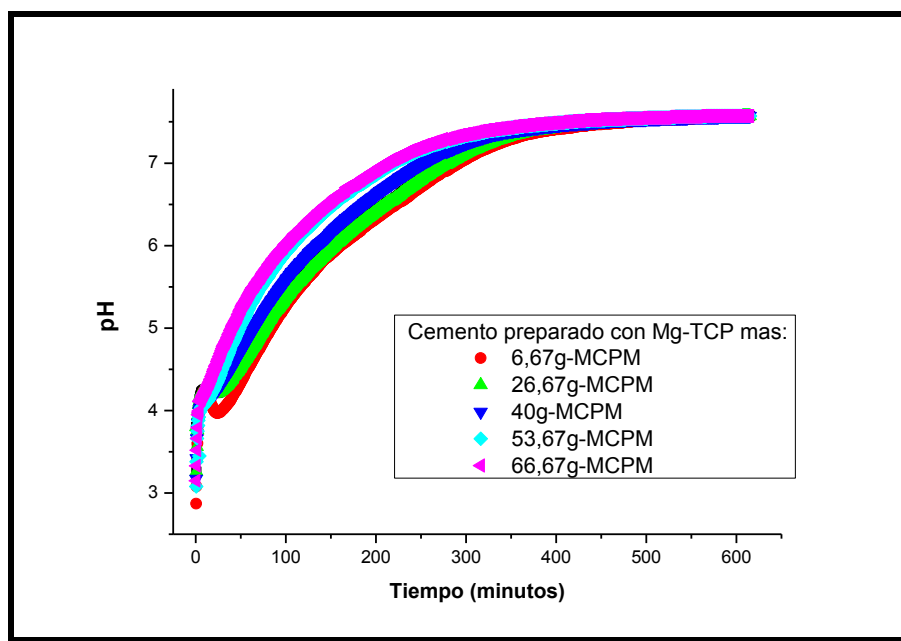


Figura 38. Registro del pH durante el fraguado de los cementos preparados según el método C.

❖ Caracterización morfológica y microestructural:

El análisis de las imágenes obtenidas en SEM mostró que los cementos preparados con 6,67% Mg-MCPM (Figura 39A) y 26,66% Mg-MCPM (Figura 39B) tiene cristales de diámetros diferentes siendo los cristales pequeños de $1,56 \pm 0,4 \mu m$ y los cristales grandes de $10,54 \pm 2,8 \mu m$. Estos cristales grandes tienen una característica peculiar ya que presentan defectos en los cristales que son una especie de agujeros en el centro de los cristales.

Los cementos preparados con 40% Mg-MCPM (Figura 39C), 53,33% Mg-MCPM (Figura 39D) y 66,66% Mg-MCPM (Figura 39E) presentan cristales rómbicos y cúbicos de diámetros que tienen $5,48 \pm 1,5 \mu m$ y la superficie de los cementos preparados con 66,66% Mg-MCPM tienen una superficie más compacta que el resto de los cementos (Figura 39F).

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

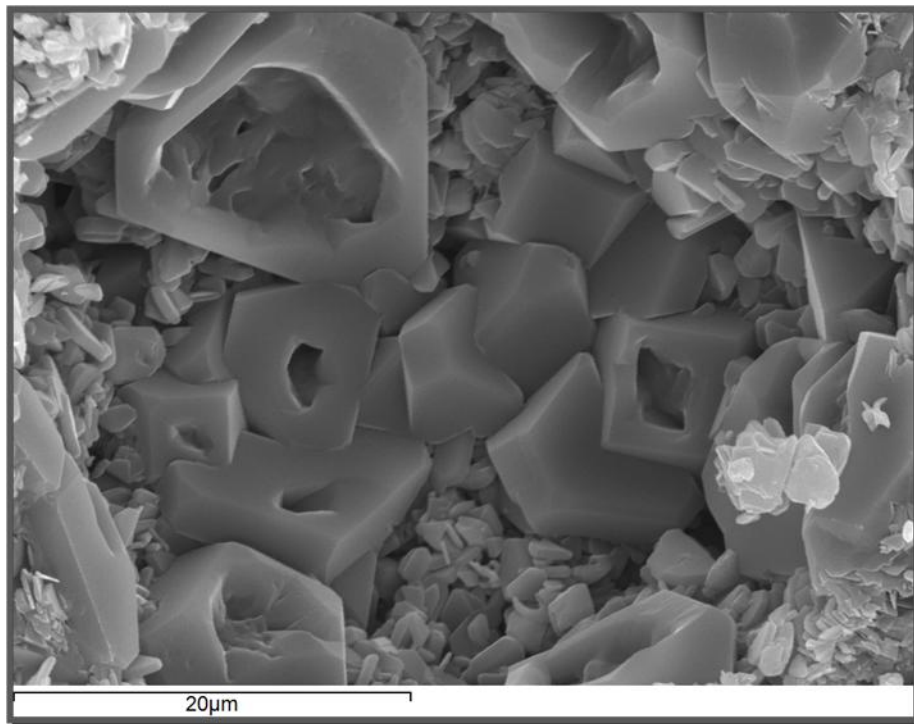


Figura 39A. Imagen de la superficie de cemento preparado con 66,67 % Mg-TCP más 6,67% Mg-MCPM

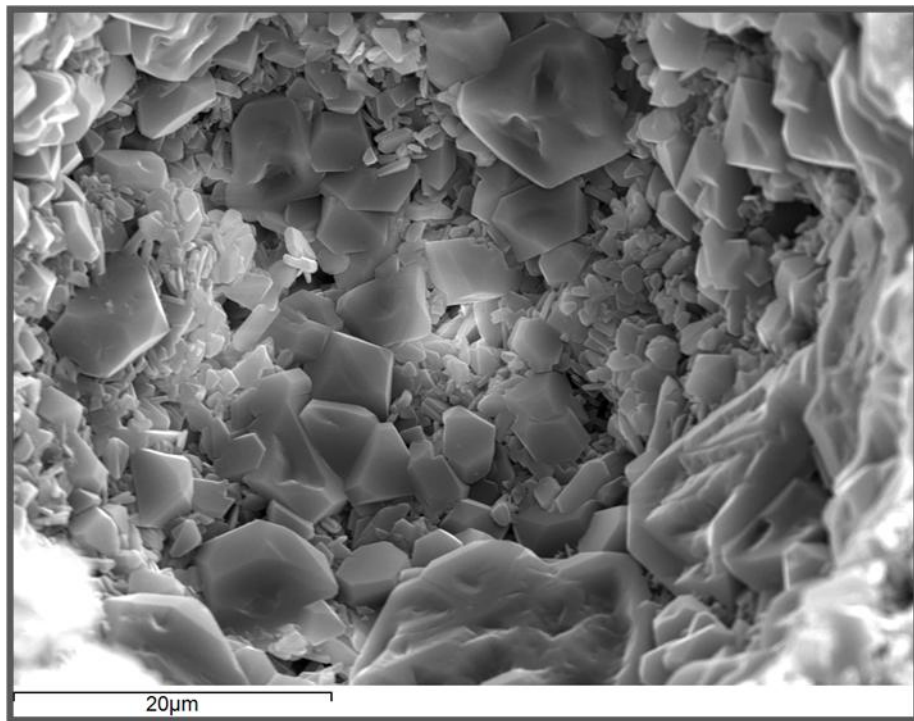


Figura 39B. Imagen de la superficie de cemento preparado con 66,67 % Mg-TCP más 26,67% Mg-MCPM

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

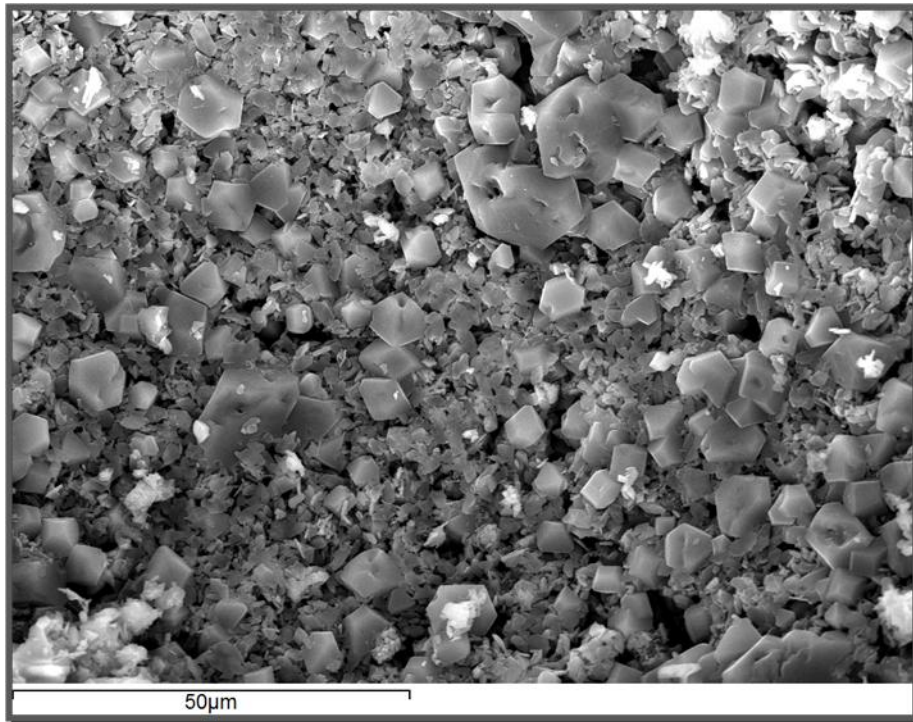


Figura 39C. Imagen de la superficie de cemento preparado con 66,67 % Mg-TCP más 40% Mg-MCPM

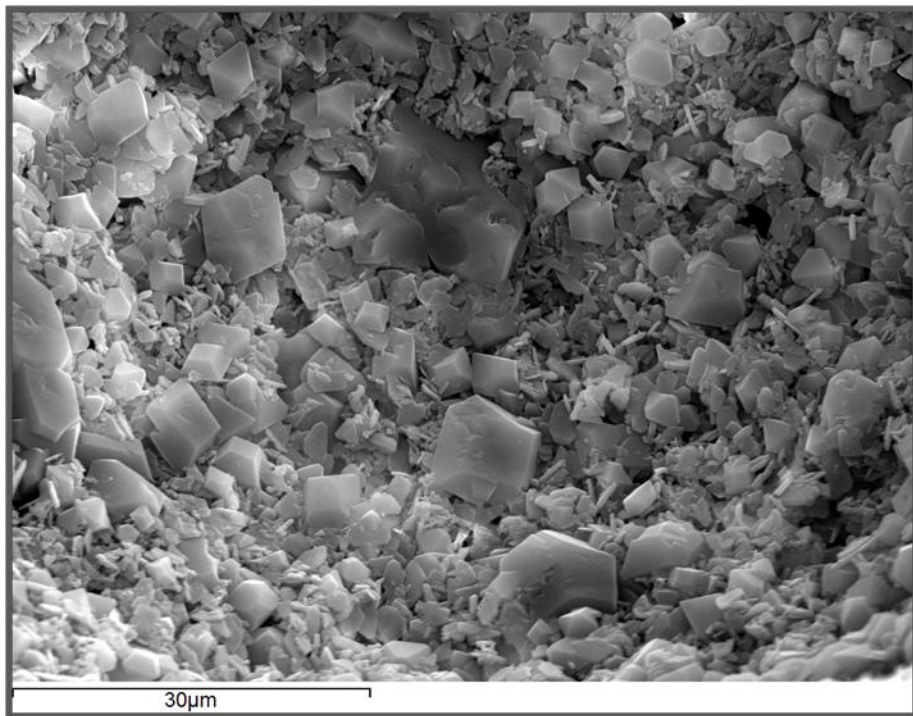


Figura 39D. Imagen de la superficie de cemento preparado con 66,67 % Mg-TCP más 53,33% Mg-MCPM

6.1. Resultados de Síntesis y Caracterización

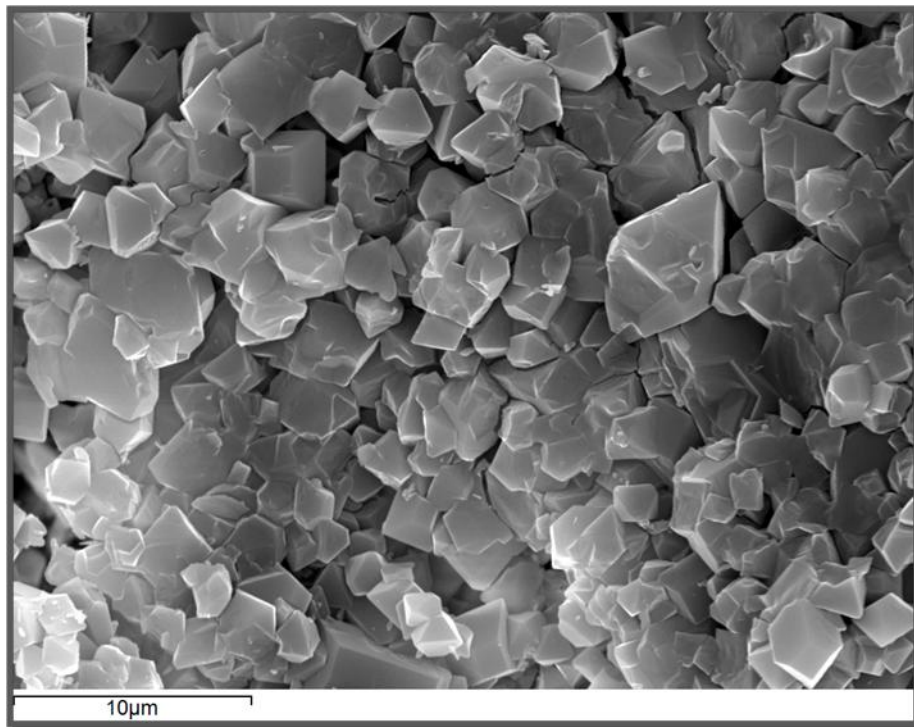


Figura 39E. Imagen de la superficie de cemento preparado con 66,67 % Mg-TCP más 66,67% Mg-MCPM

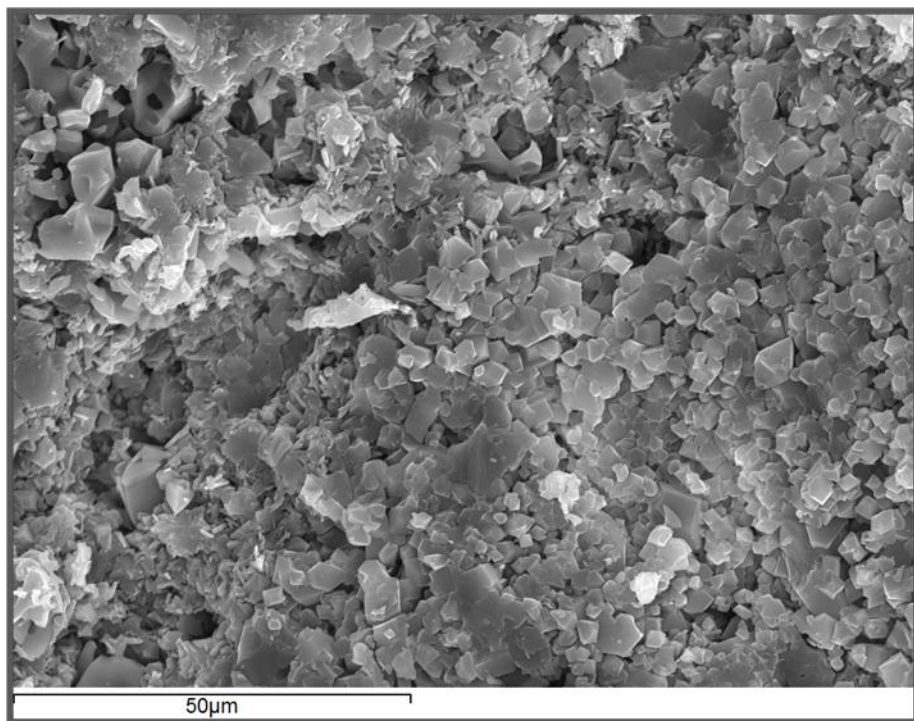


Figura 39F. Imagen de la superficie de cemento preparado con 66,67 % Mg-TCP más 66,67% Mg-MCPM

6.2. DISCUSIÓN DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

6.2. Discusión de Síntesis y Caracterización

Esta parte de la investigación está enfocada en mejorar los productos de fosfatos cálcicos biocompatibles en relación a su capacidad de regeneración ósea. Cualquier mejora de la bioactividad de estos materiales puede resultar en una patente y un producto comercial. La incorporación de factores de crecimiento es una estrategia eficaz [147, 148, 149], pero presenta varias desventajas, como: el alto coste, la necesidad de controlar muchas condiciones (como el pH, temperatura y el almacenamiento) para garantizar la funcionalidad de estas proteínas. Las cerámicas modificadas con iones metálicos presentan una alternativa atractiva por ser barata, eficiente y fácil [150]. Varios estudios han empleado la sustitución iónica en los fosfatos cálcicos para mejorar su capacidad de estimular la formación ósea, angiogénesis y la colonización celular [151, 152]. Y este es el método utilizado por nosotros.

Tal como hemos visto, la introducción de iones de magnesio provoca un desplazamiento de los picos de difracción del β -TCP hacia un fosfato cálcico sustituido con magnesio ($\text{Ca}_{2.589}\text{Mg}_{0.41}(\text{PO}_4)_2$). Además, aparecen nuevas fases como stanfieldita y farringtonita a una relación de $\text{Mg}/[\text{Ca}+\text{Mg}] \geq 26.67\%$ y una relación de $\text{Mg}/[\text{Ca}+\text{Mg}] \geq 40\%$, respectivamente.

El análisis del patrón de difracción de rayos X del cemento preparado con el β -TCP reveló la presencia de brushita como fase mayoritaria y la presencia de restos β -TCP no reaccionado. El uso de las cerámicas dopadas con magnesio, según el método A, ha dado lugar a un material nuevo compuesto principalmente por brushita y la fase de magnesio (newberyíta) que comenzó a aparecer a mayor contenido de Mg (Figura 19). La sustitución de iones de Ca por iones de Mg en los cristales de brushita se detectó mediante los análisis de SAED y análisis EDX (Figura 20 y la Tabla 4). Por otro lado, los cementos preparados según el método B, han reaccionado formando mayoritariamente brushita (Figura 28). La matriz de los cementos preparados según el método C, está compuesto de brushita, newberyíta, monetita y stanfieldita, pero al aumentar el contenido de Mg induce la precipitación de más newberyíta, siendo este el componente predominante de la matriz del cemento a altas concentraciones de Mg (Figura 34).

Además, el SEM mostró que la incorporación de iones de magnesio ha provocado un aumento de la presencia de una morfología redonda de los cristales en vez

6.2. Discusión de Síntesis y Caracterización

de cristales en la forma de placa habitualmente observada en los cementos de brushita. Resultados similares fueron explicados por el aumento de la inestabilidad de una morfología cristalina de placas causada por la incorporación de los iones de Mg ^[153]. Adicionalmente, fue posible observar la presencia de defectos en los cristales presentes en los cementos dopados con magnesio.

Una propiedad muy importante para su aplicación en odontología es el tiempo de fraguado del cemento. El tiempo de fraguado final de los cementos preparados según el método A fue significativamente aumentado por la incorporación de iones de Mg y se registró un tiempo máximo en el cemento preparado con 13,337% de Mg-TCP (Figura 21). Lo que indica que los iones de magnesio inhiben la reacción de fraguado del cemento de brushita. Esto podría estar relacionado con el aumento de estabilidad del β -TCP por los iones de Mg, explicado por la formación de una capa tipo whitlockite en la superficie del β -TCP ^[25]. Sin embargo, la precipitación de newberyíta en alto contenido de Mg ha dado lugar a una relativa disminución del TFF de estos cementos. En los cementos preparados según el método B se observa una disminución en el tiempo de fraguado final (Figura 29) al ser comparados con los cementos del método A. Y en los cementos según el método C hemos conseguido unos tiempos de fraguado adecuados (Figura 35) ya que los requerimientos para el manejo de CPC en clínica consiste en un tiempo de fraguado final ≤ 15 minutos ^[154].

Se ha reportado que la utilización de soluciones diluidas de ácido fosfórico permite obtener cementos de fraguado más rápido ^[155, 156, 157]. En las figuras 29 y 34 pertenecientes a los cementos preparados según los métodos B y C respectivamente se puede observar la disminución del tiempo de fraguado final de los cementos para concentraciones altas de magnesio. Así se podría controlar las propiedades de fraguado de los cementos de brushita dopados con magnesio para adecuarlas a los requisitos clínicos.

La disminución de la fuerza de tensión diametral en los cementos debido a la incorporación de iones de Mg fue descrito por primera vez por Lilley et al ^[158]. Este efecto de los iones de magnesio se relaciona con la creación de defectos en los cristales de brushita que disminuyen su microdureza ^[159] y también la transformación de brushita a una forma densa de monetita. Aquí, hemos mejorado el deterioro en las propiedades

6.2. Discusión de Síntesis y Caracterización

mecánicas de los cementos dopados con magnesio a través del aumento del contenido de Mg en el polvo de TCP resultando en la recuperación de fuerza de tensión diametral, de aproximadamente 1.2 MPa para los cementos preparados según el método A (Figura 22). Nosotros relacionamos esta mejora con la formación de newberyíta. Además, hemos aumentado la fuerza de tensión diametral hasta 2 MPa en los cementos preparados según el método C que se puede relacionar por la disminución de la porosidad y la disminución del tamaño de poro de estos cementos (Figura 36).

Generalmente, la presencia de iones de magnesio reduce la porosidad en los nuevos cementos y aumenta su densidad. Además, el área de superficie específica del cemento se redujo con el aumento en el contenido de Mg con la excepción de los Cementos A preparados con 26.67% Mg-TCP. La precipitación de nuevas fases como newberyíta podría contribuir a estos cambios al aumentar el contenido de magnesio.

Sabemos que, la reacción de fraguado de cementos de brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) es una reacción ácido-base. La pasta del cemento de brushita es ácida durante el proceso de fraguado debido a que la brushita solo se puede precipitar a $\text{pH} < 6$ ^[160]. El pH de los cementos de brushita es de 4.2. Debido a la precipitación de brushita en los cementos fabricados según el método A observamos que se mantiene el pH de fraguado por debajo 4. Sin embargo, este pH de fraguado en los cementos fabricados según el método C, empieza siendo < 4 en los primeros minutos para luego aumentar hasta llegar a un pH neutro después de 300 minutos desde el inicio del fraguado, estos resultados pueden ser debido a que en estos cementos se forma mayoritariamente newberyíta y no brushita.

El pH del medio de incubación de los cementos B es neutro durante el ensayo y los cementos C presentan un $\text{pH} < 4$ durante el fraguado que va aumentando hasta llegar a un pH neutro después de 300 minutos desde el inicio del fraguado. El método que hemos utilizado para la fabricación de cementos de brushita es de β -TCP + MCPM, el MCPM es estable a un $\text{pH} < 2$, y la disolución del MCPM se presenta entre un pH de 2-4,5, provocando la precipitación de brushita, estos resultados que hemos obtenido y coinciden con los resultados de Mirtchi ^[161] en relación a sus conclusiones termodinámicas sobre la formación de brushita como el producto final de la reacción de fraguado en el cemento compuesto por β -TCP + MCPM.

6.2. Discusión de Síntesis y Caracterización

La liberación de los iones de calcio y magnesio de los cementos cálcicos fue estudiada durante 7 días. Los resultados muestran que la liberación de iones de Ca se estableció en aprox. 33 y 21 ppm por día para los CPC preparados con β -TCP y 26.67% Mg-TCP tras una ráfaga inicial de aprox. 271 y 170 ppm, respectivamente (Figura 26A). Los CPC preparados con 66.67% Mg-TCP liberan iones de Ca a una velocidad constante de aprox. 13 ppm por día. Esta disminución en la liberación de iones de Ca podría estar relacionada con la disminución de SSA a $0.55 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para CPC preparados con 66.67% Mg-TCP. Además, se ha descrito que los iones de Mg inhiben la disolución de brushita^[162].

El perfil de liberación de los iones de Mg consiste en una ráfaga inicial de 717 ppm que se estabilizó a una tasa constante de aprox. 53 ppm/día. El cemento preparado con 66.67% Mg-TCP fue eficaz para cambiar el perfil de liberación a una cinética de orden cero (60 ppm/día) durante todo el periodo de observación (Figura 26B). Esta diferencia en los perfiles de liberación podría indicar que el aumento en el contenido de magnesio incrementa la estabilidad del cemento.

6.3. RESULTADOS DE CITOCOMPATIBILIDAD

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

Para determinar la citocompatibilidad de nuestros cementos hemos estudiado la respuesta *in vitro* de la línea celular osteoblástica MG-63 sobre la superficie de los cementos.

Cementos preparados según el método A: Mg-TCP + MCPM:

❖ Proliferación Celular:

Se estimó la proliferación celular a través del número de células medido a diferentes tiempos (3, 5, 7 y 10 días). Las diferencias en la proliferación celular entre las muestras en los diferentes tiempos se muestran en la Figura 40. En todas las muestras se observó crecimiento celular en función del tiempo de cultivo. A los tres días, las diferencias entre los cementos no eran significativas. A partir del quinto día el número de células incrementó notablemente en las muestras preparadas con 6,67% Mg-TCP, 26,67% Mg-TCP y 40% Mg-TCP. Sin embargo, el número de células en la muestra de β -TCP permaneció cercano al nivel del tercer día. Al séptimo día, el número de células aumentó en todas las muestras. Al final del ensayo, el décimo día, el cemento preparado con 40% Mg-TCP mostró la proliferación más alta seguido del cemento preparado con 26,67% Mg-TCP. Los cementos preparados con β -TCP y 66,67% Mg-TCP mostraron el menor número de células de todas las muestras. Las diferencias encontradas fueron significativas ($p < 0,05$).

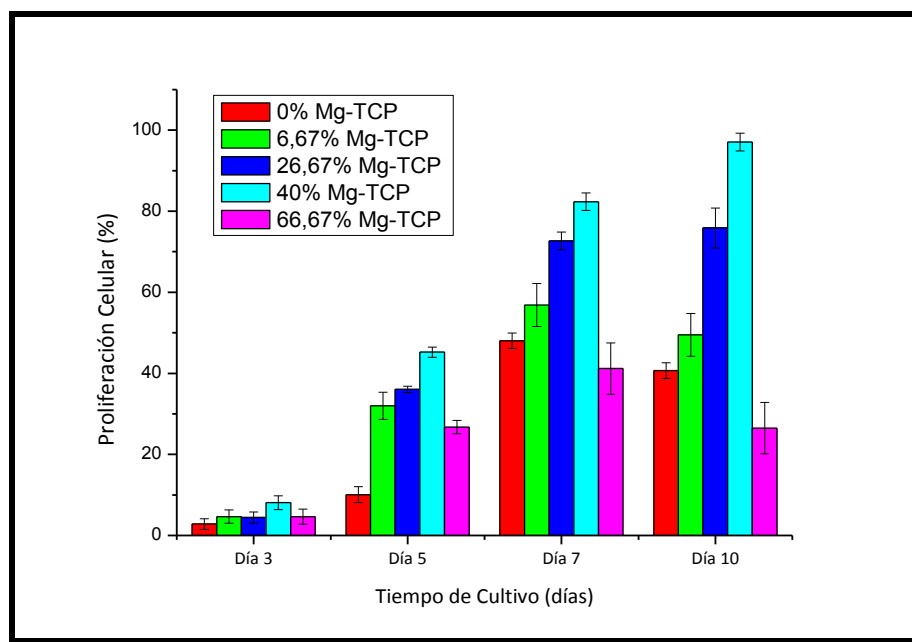


Figura 40. Proliferación celular sobre los cementos preparados según el método A

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) muestra que el tipo del material y el tiempo de cultivo afectan la proliferación celular de manera significativa (Tabla 10). Sin embargo, la interacción de ambos factores también son significativas indicando que estos factores no actúan de manera independiente.

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico (ANOVA de dos vías) de los datos de la proliferación celular sobre cementos preparados según el método A ($p < 0.05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P<0.05
Material	18457,38	4	717,18	929,13	< 0,0001
Tiempo	56819,81	3	3813,70	865,75	< 0,0001
Material * Tiempo	9693,13	12	162,65	33,38	< 0,0001

❖ Microscopia Electrónica de Barrido:

El estudio con la microscopia electrónica de barrido muestra que las células cultivadas sobre los cementos sin sustitución (Figura 41A y 41B) (muestra control) se adaptaron bien a la superficie del cemento después del tercer día de cultivo, al igual que las células cultivadas sobre los cementos dopados con magnesio como se muestra en la Figuras 41C y 41D. Las células adheridas a la superficie del cemento tuvieron una forma redonda en proceso de extensión y otra forma plana, alargada y extendida. Después de cinco días de cultivo las células van proliferando y penetrando los poros como se muestran en las Figuras 41E y 41F. Al séptimo día de cultivo las células cubren toda la superficie como se puede observar en los cementos preparados con 40% de Mg-TCP en las figuras 41G y 41H. Probablemente por el proceso de fijación y deshidratación de las muestras se observa numerosas células rotas, debido a que estos procesos pueden ser a veces agresivos para las células.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

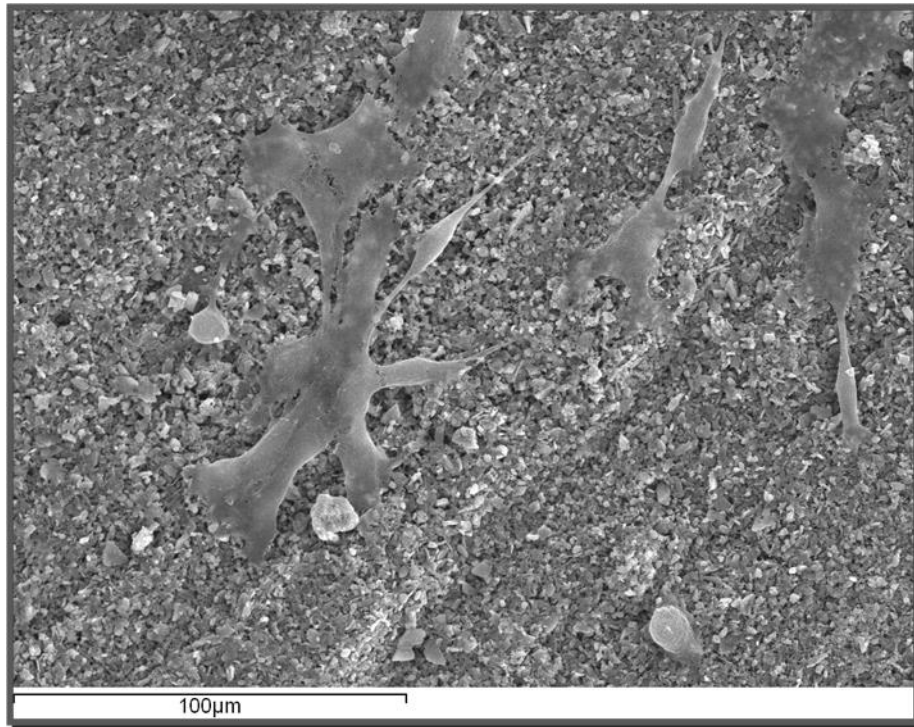


Figura 41A. SEM del cemento sin sustitución después de 3 días de cultivo (500x).

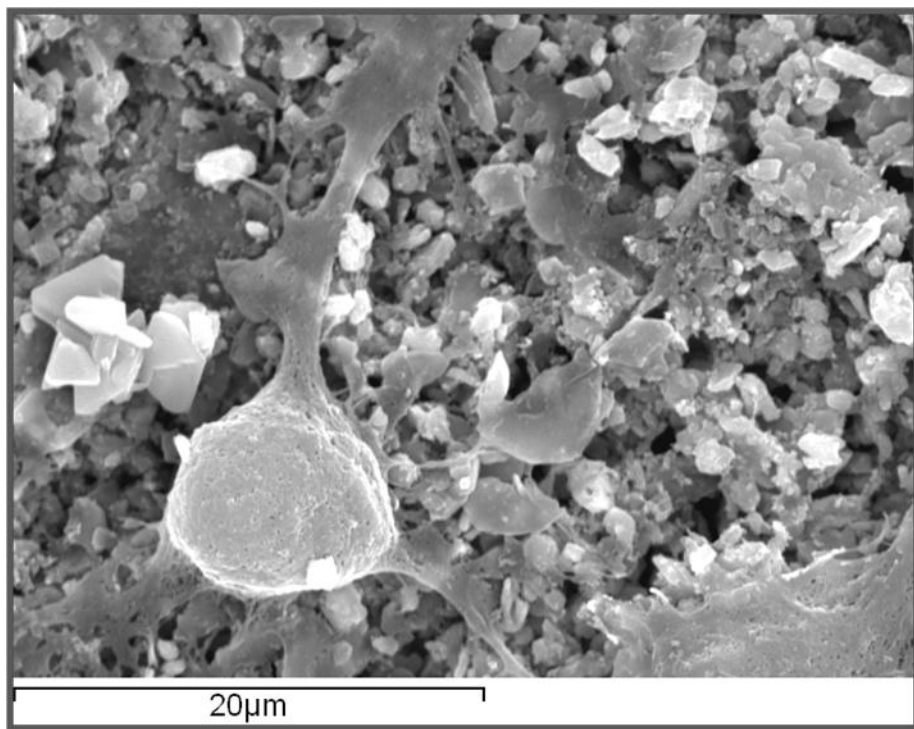


Figura 41B. SEM del cemento sin sustitución después de 3 días de cultivo (2000x).

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

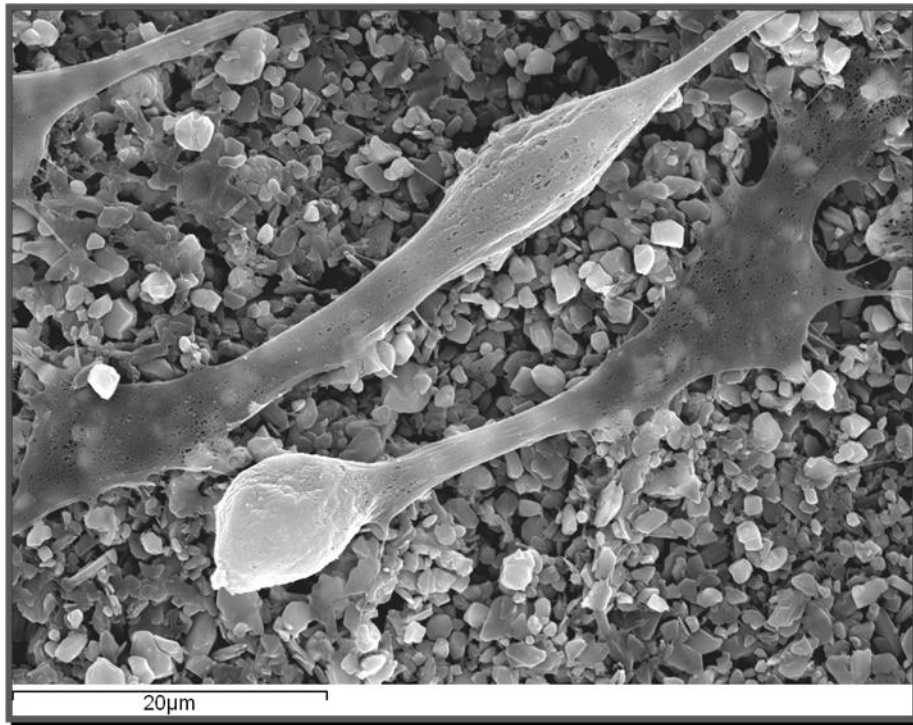


Figura 41C. SEM de CPC con 6,67% Mg-TCP después de 3 días de cultivo (2000x).

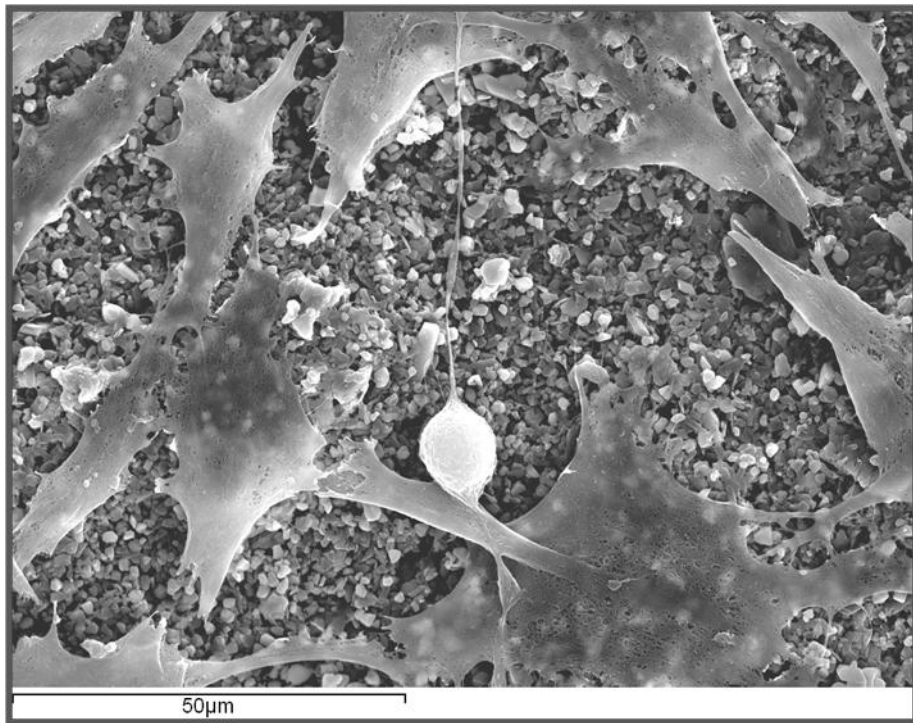


Figura 41D. SEM de CPC con 6,67% Mg-TCP después de 3 días de cultivo (1000x).

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

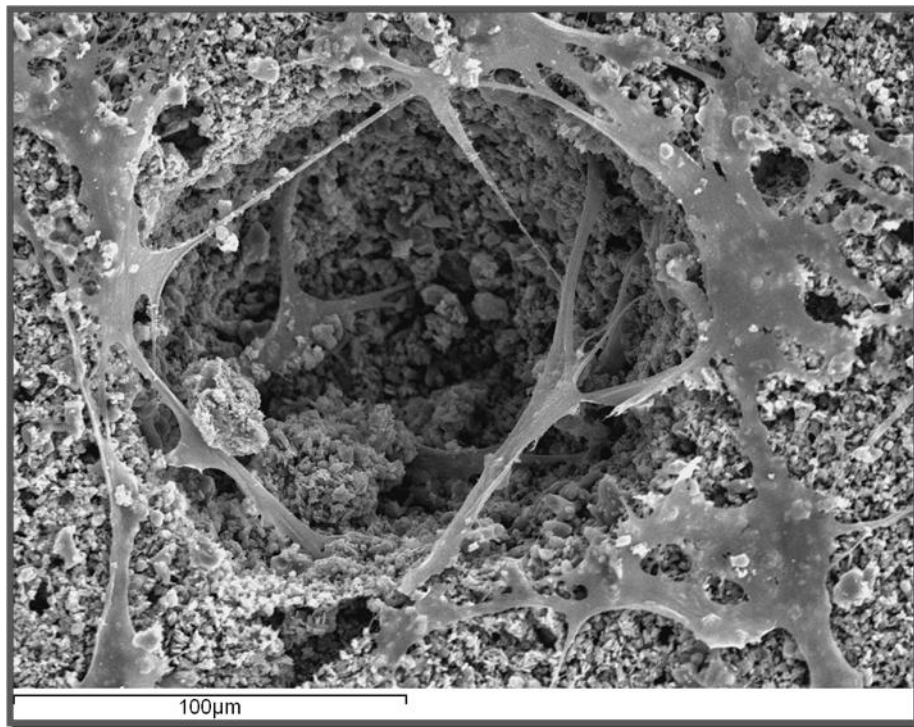


Figura 41E. SEM de CPC con 26,67% Mg-TCP después de 5 días de cultivo (500x).

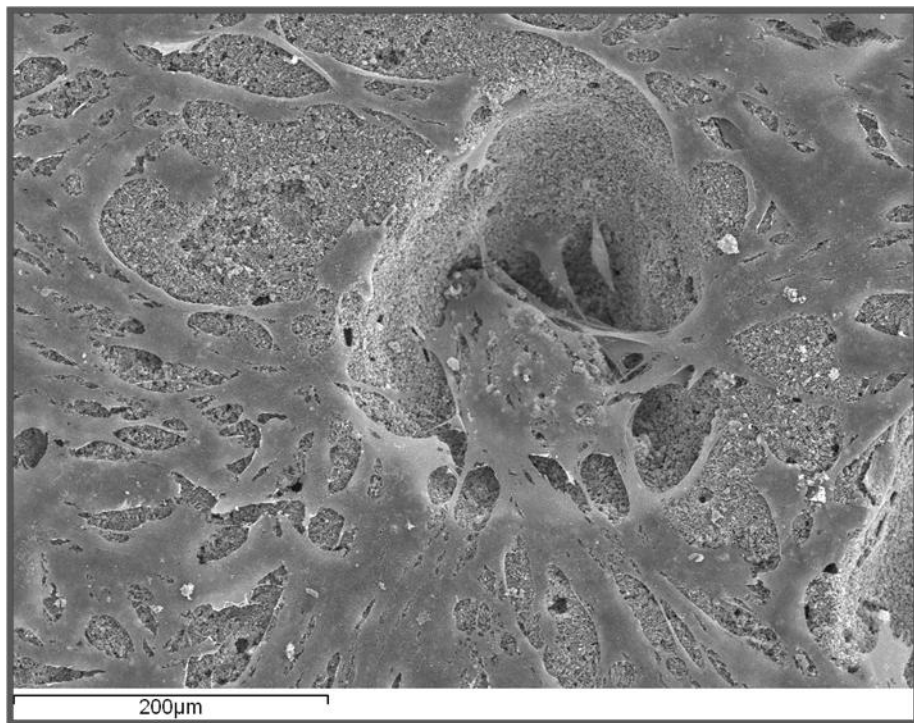


Figura 41F. SEM de CPC con 40% Mg-TCP después de 5 días de cultivo (200x).

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

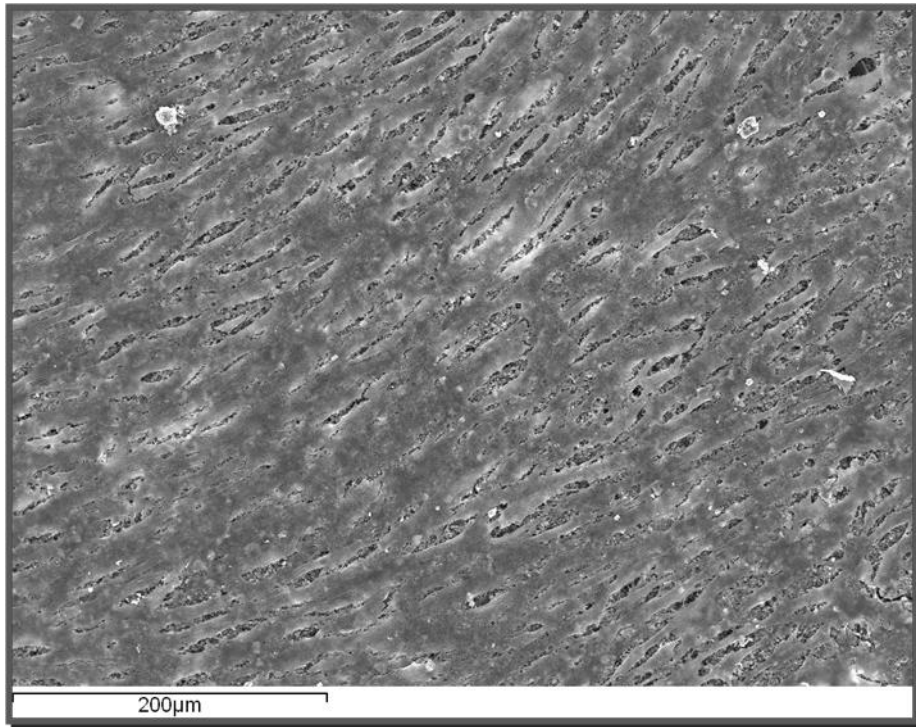


Figura 41G. SEM de CPC con 40% Mg-TCP después de 7 días de cultivo (200x).

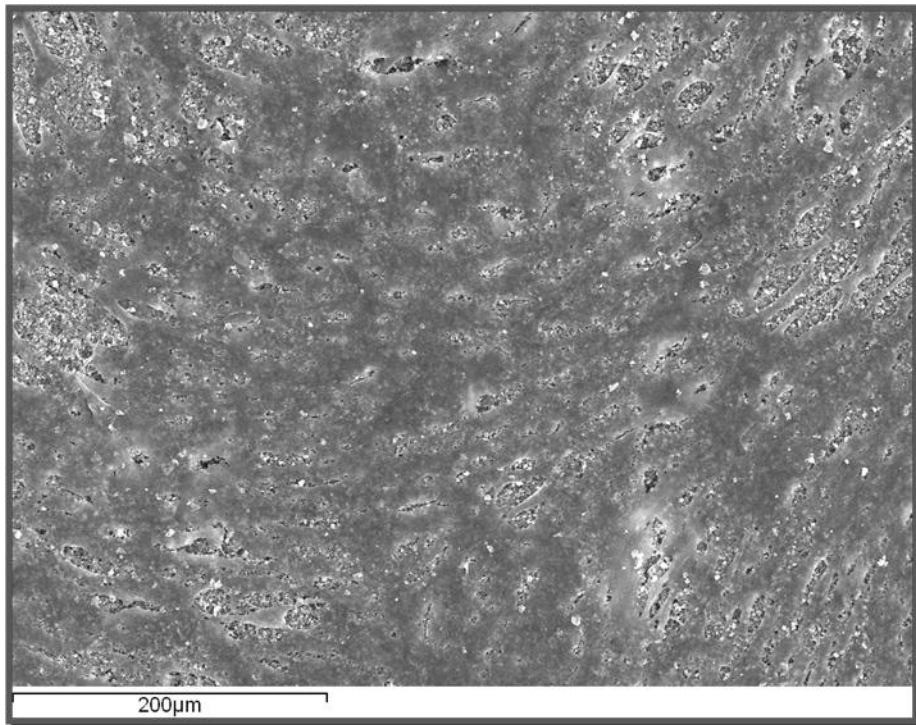


Figura 41H. SEM de CPC con 40% Mg-TCP después de 7 días de cultivo (200x).

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

Cementos preparados según el método B: β -TCP + Mg-MCPM:

❖ Proliferación Celular:

Se eligió el cemento preparado con 66.67% Mg-MCPM para ser comparado con el cemento sin sustitución por presentar mejores propiedades físicas. En los dos cementos se observó crecimiento celular en todo el periodo de estudio como se puede observar en la figura 42.

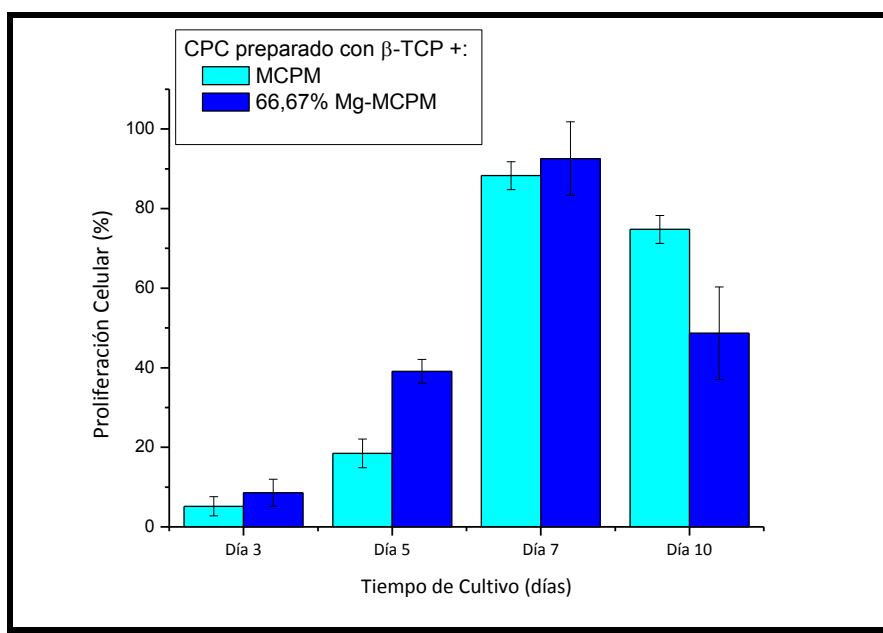


Figura 42. Proliferación celular sobre los cementos preparados según el método B.

La proliferación celular de osteoblastos sobre ambos cementos fue similar durante los diez días de cultivo. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) muestra que el tipo del material y el tiempo de cultivo afectan la proliferación celular de manera significativa (Tabla 11). Sin embargo, la interacción de ambos factores también son significativos indicando que estos factores no actúan de manera independiente.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico (ANOVA de dos vías) de los datos de la proliferación celular sobre cemento preparado según el método B ($p < 0.05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P<0.05
Material	30,36	1	30,38	6,22	0,0145
Tiempo	12754,08	3	4251,36	871,06	< 0,0001
Material * Tiempo	1325,38	3	441,79	90,52	< 0,0001

❖ Microscopia Electrónica de Barrido:

El estudio de la morfología celular muestra que las células cultivadas se adaptaron a la superficie del cemento después de 3 días de cultivo como se muestra en la figuras 43A y 43B. Después de 5 días de cultivo las células van proliferando y penetrando los poros como se muestran en las figuras 43C. A los 7 días de cultivo las células van cubriendo la superficie como se puede observar en la figuras 43D.

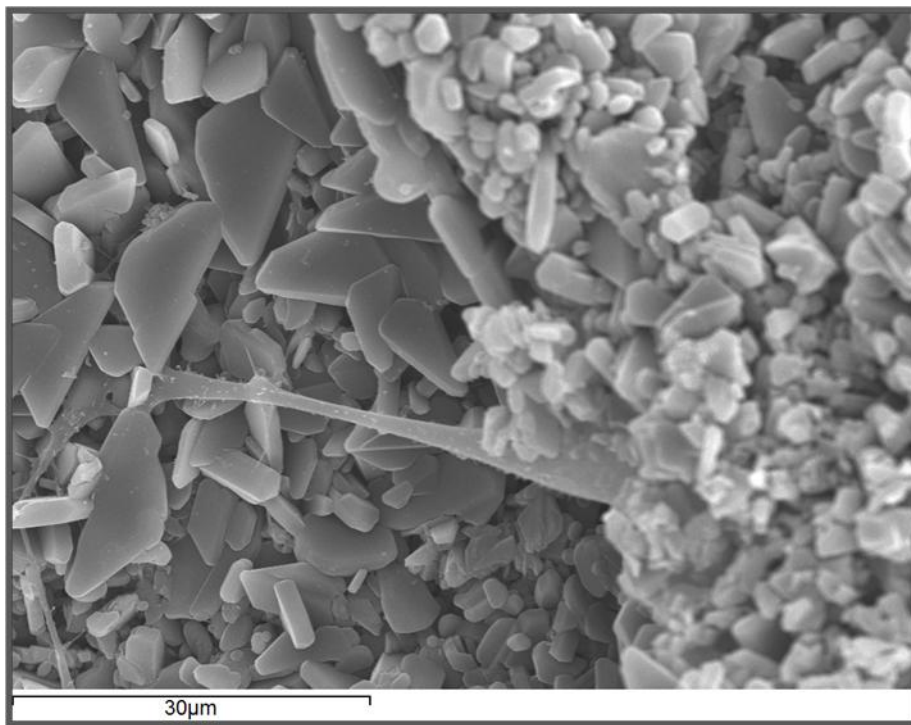


Figura 43A. SEM de CPC con 66.67% Mg-MCPM después de 3 días de cultivo.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

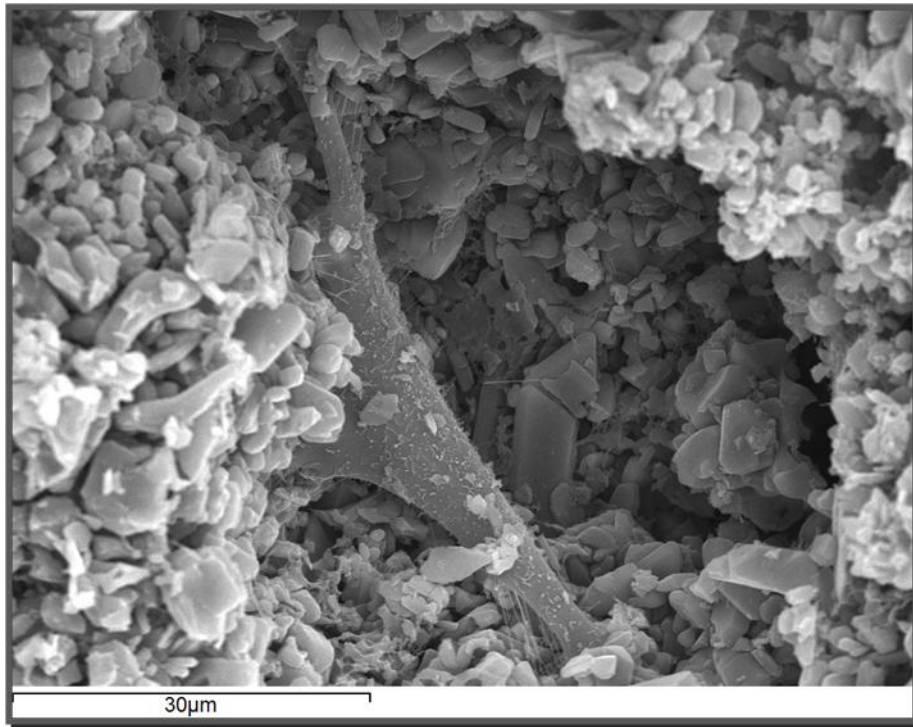


Figura 43B. SEM de CPC con 66.67% Mg-MCPM después de 3 días de cultivo.

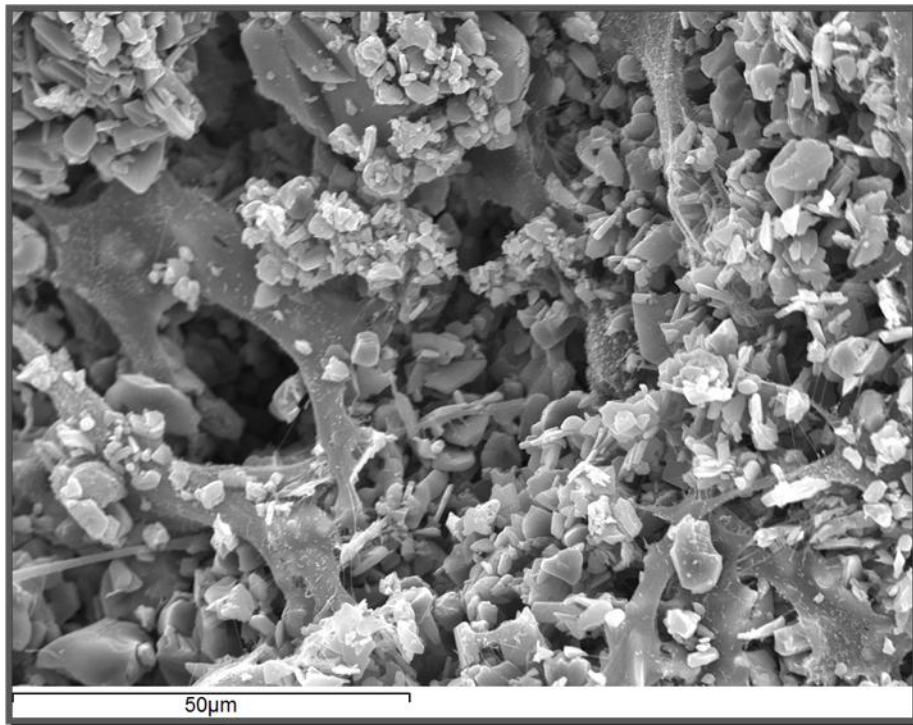


Figura 43C. SEM de CPC con 66.67% Mg-MCPM después de 5 días de cultivo.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

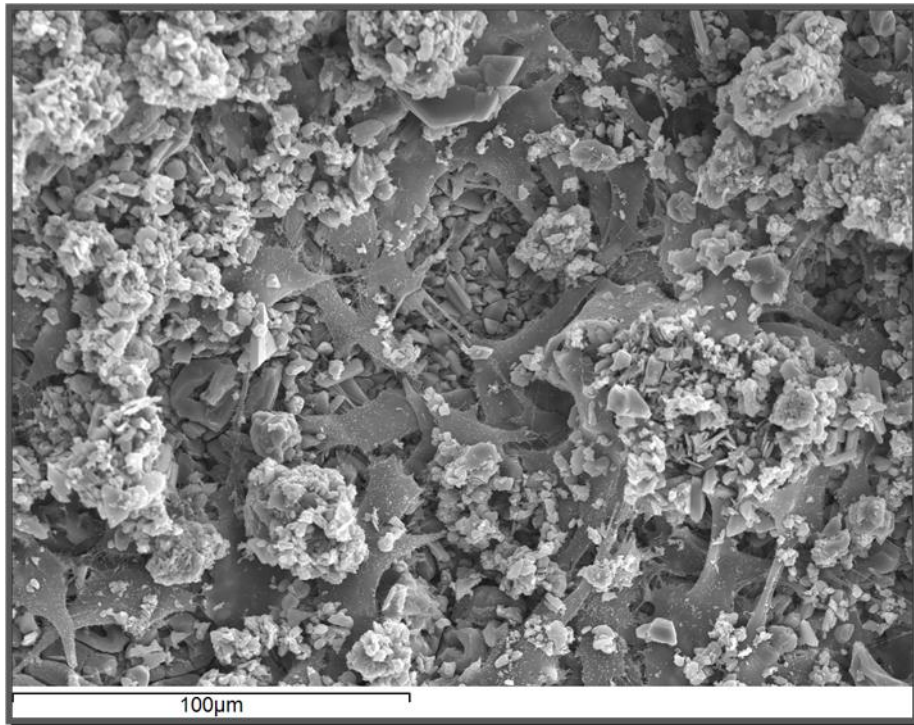


Figura 43D. SEM de CPC con 66.67% Mg-MCPM después de 7 días de cultivo.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

Cementos preparados según el método C: 100%Mg-TCP + Mg-MCPM

❖ Proliferación Celular:

El resultado de la proliferación de las células MG-63 sigue una tendencia similar a los cementos preparados según el método A. Se observó crecimiento celular en todas las muestras (Figura 44). En el primer recuento que se realizó al tercer día del cultivo, las diferencias entre los grupos eran pequeñas. Sin embargo, a partir del quinto día el número de células incrementó notablemente en las muestras preparadas con 6,67% Mg-MCPM, 26,67% Mg-MCPM y 66,67% Mg-MCPM. Además, se observó que el número de células en la muestra de β -TCP permaneció cercano al nivel del tercer día. Al séptimo día, el número de células aumentó en todas las muestras. Y al finalizar el ensayo (10 días), el cemento preparado con 6,67% Mg-MCPM mostró la proliferación más alta seguido del cemento preparado con 26,67% Mg-MCPM. Las diferencias encontradas fueron significativas ($p < 0,05$).

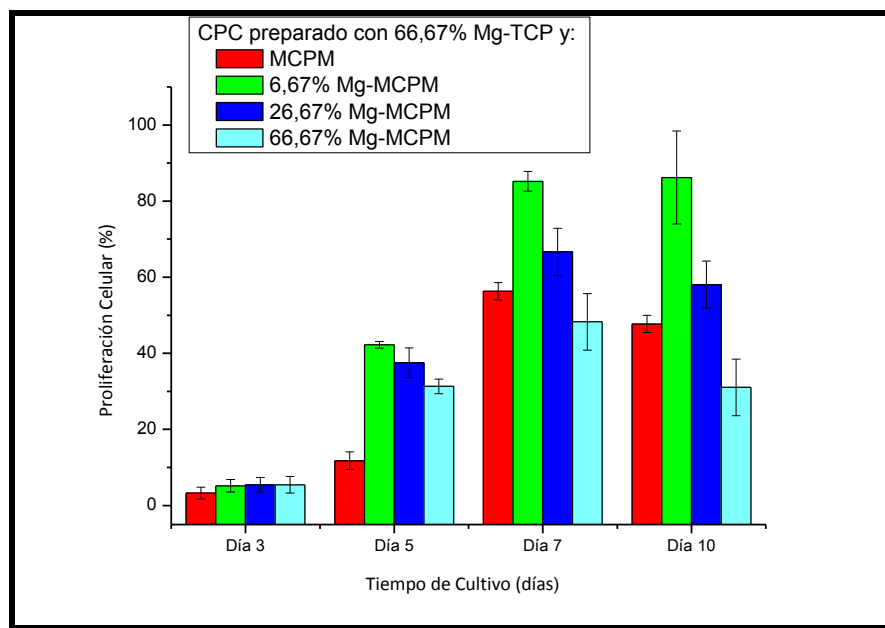


Figura 44. Proliferación celular sobre los cementos preparados según el método C.

El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) muestra que el tipo del material y el tiempo de cultivo afectan la proliferación celular de manera significativa (Tabla 12). Sin embargo, la interacción de ambos factores también son significativas indicando que estos factores no actúan de manera independiente.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

Tabla 12. Resultados del análisis estadístico (ANOVA de dos vías) de los datos de la proliferación celular sobre cementos preparados según el método C ($p < 0.05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P<0.05
Material	7099,81	3	2366,60	287,17	< 0,001
Tiempo	34655,14	3	11551,71	1401,73	< 0,001
Material * Tiempo	4656,38	9	517,37	62,78	< 0,001

❖ Microscopia Electrónica de Barrido:

El estudio de la morfología muestra que las células cultivadas se extendieron y se adaptaron bien a la superficie de todos los cemento (Figuras 45A, 45B, 45C y 45D). Después de 5 días de cultivo las células van proliferando y formando capas penetrando también en la superficie de cemento como se observa en las figuras 45B y 45C. A los 7 días de cultivo las células cubren toda la superficie como se puede observar en la figura 45D.



Figura 45A. SEM de CPC con 66,67% Mg-TCP + 6,67% Mg-MCPM después de 3 días de cultivo.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

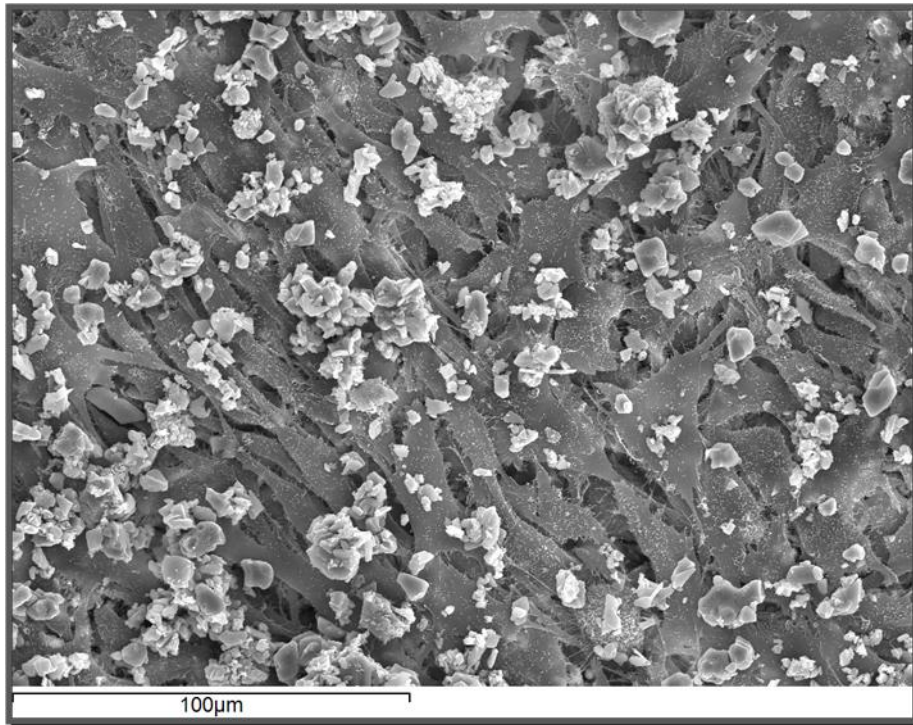


Figura 45B. SEM de CPC con 66,67% Mg-TCP + 6,67% Mg-MCPM después de 5 días de cultivo.

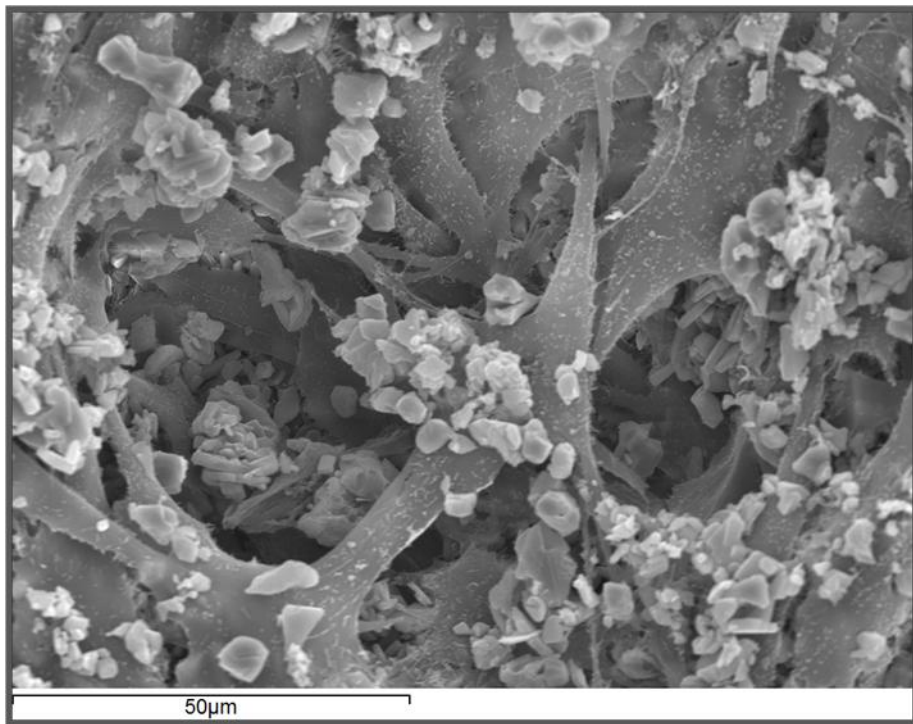


Figura 45C. SEM de CPC con 66,67% Mg-TCP + 26,67% Mg-MCPM después de 5 días de cultivo.

6.3. Resultados de Citocompatibilidad

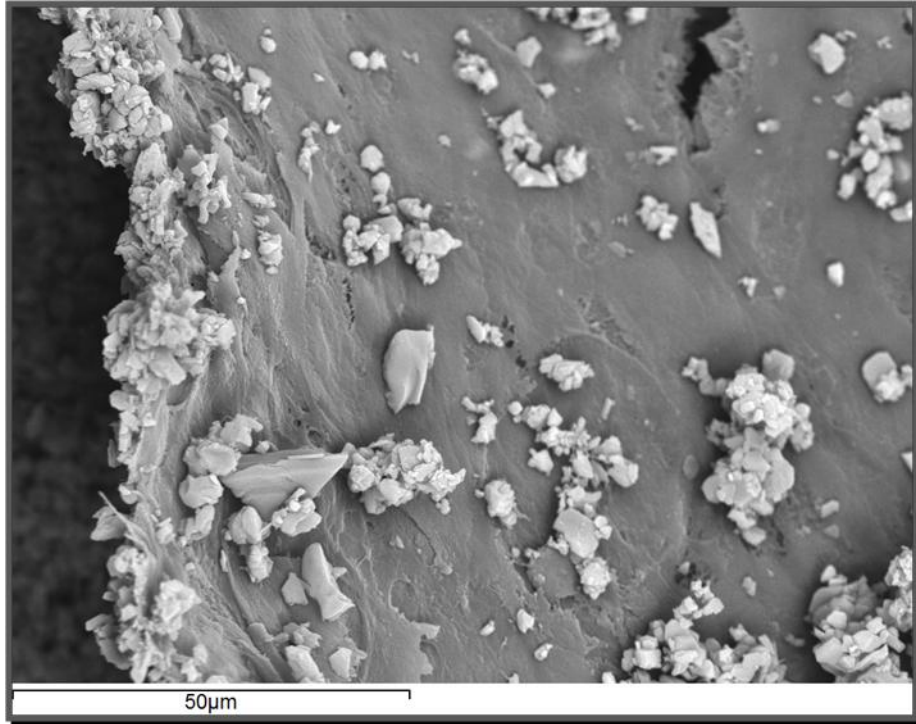


Figura 45D. SEM de CPC con 66,67% Mg-TCP + 6,67% Mg-MCPM después de 7 días de cultivo.

6.4. DISCUSIÓN DE CITOCOMPATIBILIDAD

6.4. Discusión de Citocompatibilidad

Los materiales basados en los fosfatos de calcio han sido y son sujeto de una extensa investigación para su uso como substitutos óseos. Poseen una alta biocompatibilidad, porque apenas provocan respuesta inflamatoria. Forman una unión directa con el tejido óseo. Esta afinidad con el tejido óseo los hace materiales prometedores para su uso en la fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos.

Debido a que los materiales desarrollados en este trabajo de investigación tienen como finalidad ser utilizados en aplicaciones de reparación y regeneración ósea, lo más indicado es utilizar células óseas para analizar la respuesta celular en estos materiales. Hemos elegido para estos ensayos la línea celular MG-63, que está formada por células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico y son las células encargadas de la formación de tejido óseo. Es una línea de células conocida y empleada comúnmente en la literatura científica para estudiar las interacciones de las células con el biomaterial [163, 164, 165, 166, 167].

Los estudios de proliferación proveen información respecto al comportamiento celular en relación a un material control, es decir, el hecho de que las células sobre un material proliferen más o menos que en el control, indica que el material afecta de alguna manera el comportamiento celular. Nuestros resultados muestran una mayor proliferación en los tres tipos de cementos de fosfatos cálcicos con magnesio presentados en comparación con los cementos sin magnesio. La respuesta celular a un biomaterial, tales como la proliferación y la diferenciación, no sólo depende de la morfología de su superficie sino también la composición química [168]. Debido a que la composición química juega un papel crucial en determinar el comportamiento celular, influye la cantidad de iones liberados por los biomateriales y la consiguiente interacción células – material [169]. Por lo tanto, nuestros resultados pueden ser debidos a que el magnesio juega un papel en la deposición y mineralización ósea [170]. Estudios previos han demostrado que los iones de disolución de productos que contienen Ca y Mg pueden estimular la proliferación y diferenciación de osteoblastos [171, 172, 173, 174]. Otra publicación hace referencia a que la liberación de iones de magnesio, producto de la corrosión de aleaciones de magnesio, no causa toxicidad local o sistémica, y que incluso puede tener efectos beneficiosos sobre la respuesta celular en las zonas donde se implantan [175]. Por otra parte, el magnesio añadido a cementos de fosfatos cálcicos

6.4. Discusión de Citocompatibilidad

mejora la adhesión de los osteoblastos, por lo que directamente estimula la proliferación de osteoblastos, e indirectamente influye en la formación de hueso nuevo ^[176, 177].

Lu et. al. ^[178] crearon un cemento de apatita con magnesio y encontraron al séptimo día de cultivo celular con la línea MG-63 que estos cementos promueven una mayor proliferación celular y sin signos negativos evidentes en la viabilidad celular al ser comparados con cementos de hidroxiapatita. Además de la proliferación, la capacidad de diferenciación de los osteoblastos en los biomateriales, indirectamente revela que los biomateriales son biocompatibles ^[179].

Se han presentado estudios con superficies de titanio bañadas en soluciones de fosfato cálcico sustituidos por diferentes iones (manganeso, estroncio y magnesio) y la misma línea celular empleada en este estudio (osteoblastos MG-63), sin presencia de citotoxicidad y con una adecuada diferenciación osteoblástica y mineralización de la superficie de titanio para los tres iones. Los valores más altos se consiguieron con el manganeso seguido del estroncio y magnesio ^[180].

El magnesio también aumenta la adhesión y proliferación de células estromales de médula ósea como ha sido demostrado en el estudio de cemento de fosfato de calcio-magnesio utilizado para elevación de seno en conejos cuando fue comparado en cemento de fosfato de calcio sin magnesio ^[136].

Otros estudio muestran que la superficie de los materiales influye en el comportamiento y la morfología de los osteoblastos cultivadas en su superficie ^[181, 182]. En nuestro estudio, los resultados de la microscopia electrónica de barrido revelaron que las células se extienden y están en contacto íntimo a la superficie de nuestros cementos durante los 10 días que duro el ensayo. Esto indica que los cementos no tienen efectos negativos en la morfología celular y viabilidad.

De forma general, una vez que las células han alcanzado la confluencia dejan de proliferar para entrar en la etapa de diferenciación. Hay que mencionar que la línea celular utilizada mostró un comportamiento en cierto modo anómalo, formando multicapas, es decir, después de llegar a confluencia y formar una monocapa

6.4. Discusión de Citocompatibilidad

continuaron proliferando formando más de una capa. Por esto se observa un aumento en la proliferación celular durante todo el período estudiado excepto los cementos preparados con un contenido de magnesio de 66.67% Mg-TCP.

6.5. RESULTADOS DE CEMENTO COMO VEHÍCULO TRANSPORTADOR DE MEDICAMENTOS

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Cementos preparados según el método A: Mg-TCP + MCPM:

❖ Estudio de adsorción-desorción de la vancomicina:

Los CPC dopados con Mg también fueron estudiados como vehículos para la liberación de medicamentos y fueron comparados con el cemento sin magnesio. En este método la vancomicina fue incorporada en los cementos por adsorción. La figura 46 muestra la cantidad del medicamento adsorbido por los cementos preparados con β -TCP, 26,67% Mg-TCP y 66,67% Mg-TCP, tras ser incubados en solución de vancomicina de 5 mg/ml. La cantidad de medicamento absorbido es similar en los tres casos.

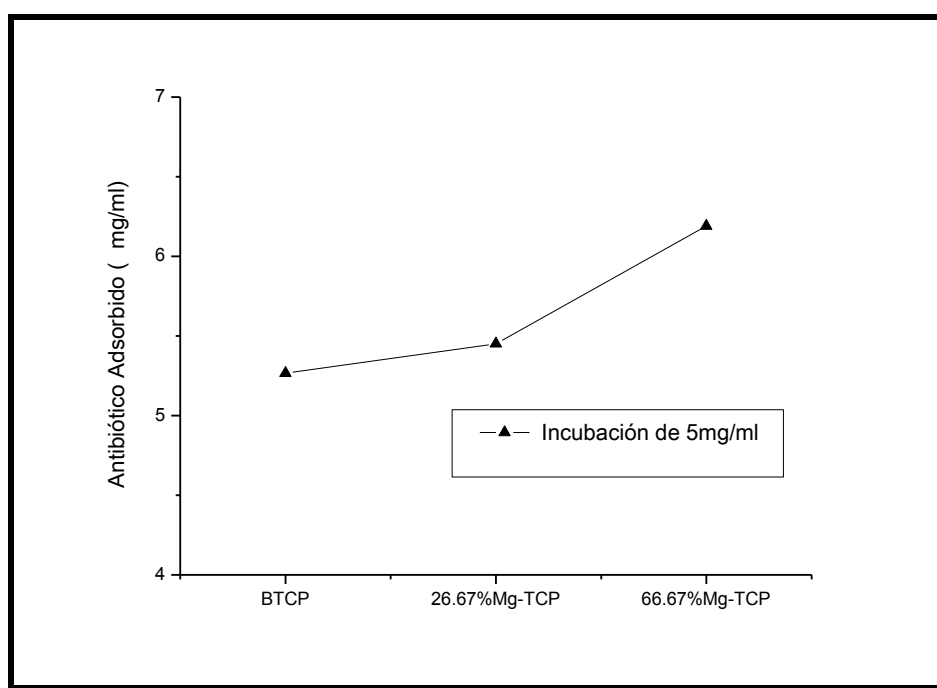


Figura 46. Efecto de la incorporación de iones de Mg^{2+} en CPC sobre la adsorción de vancomicina. Las muestras fueron incubadas en una solución de 5mg/ml.

Pequeñas diferencias aparecen también en el perfil de liberación de la vancomicina de los cementos dopados con magnesio. Las muestras de los tres cementos previamente incubadas en 5 mg/ml de vancomicina presentaron una liberación similar en las primeras horas. Después de 140 h de incubación en tampón fosfato (PBS) el 65% y el 80% del antibiótico fue liberado de los cemento preparados con β -TCP y 66.67% Mg-TCP, respectivamente (Figura 47).

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

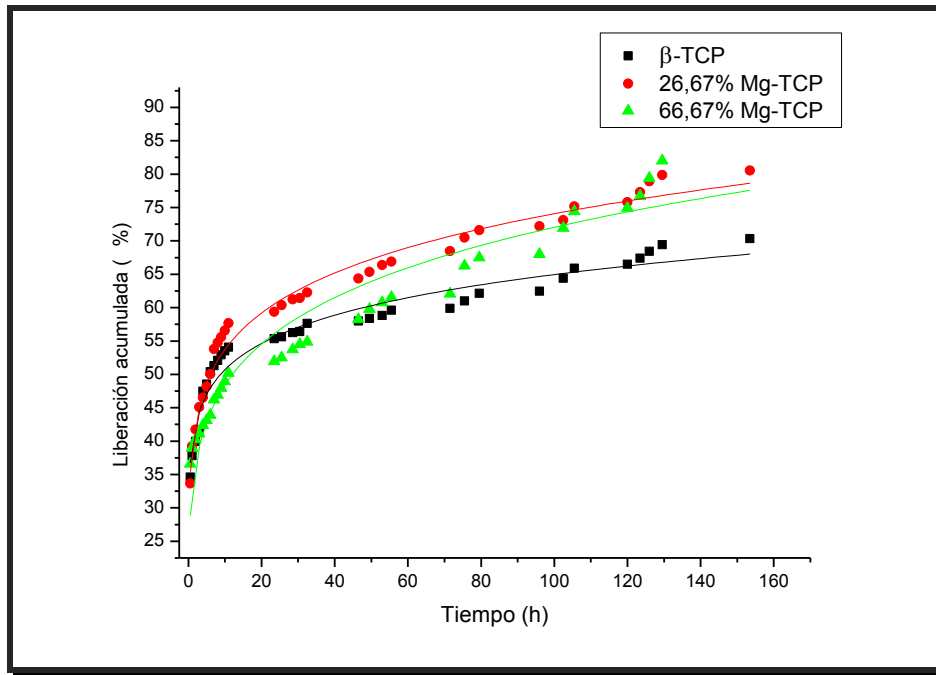


Figura 47. Liberación de vancomicina después que las muestras han sido incubadas en una solución de antibiótico de 5mg/ml.

Para determinar el mecanismo de la liberación de los medicamentos hemos utilizado el modelo de Peppas (Ec. (2)). Siempre y cuando se puede ajustar el perfil de la liberación hasta el 60% del total de la cantidad de antibiótico adsorbido.

$$M = k \cdot t^n \quad (2)$$

Donde: M = liberación de la droga acumulada en el tiempo
 t = tiempo
 n = exponente relacionado con la naturaleza del proceso
 k = constante relacionada con el coeficiente de difusión D

La tabla 13 muestra la correlación entre el mecanismo de liberación y la constante n en relación a la forma geométrica de la matriz. En este estudio la matriz utilizada tuvo forma de cilindro.

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Tabla 13. Mecanismo de liberación de la matriz dependiendo de su forma geométrica y del exponente n .

Exponente de liberación n			Mecanismo de liberación
plano	cilindro	esfera	
$n \leq 0,5$	$n \leq 0,45$	$n \leq 0,43$	Difusión
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anómalo
$n \geq 1,0$	$n \geq 0,89$	$n \geq 0,85$	Transporte caso II

Los resultados de la aplicación de la ley de Peppas indican que la liberación de vancomicina fue controlada por un mecanismo de difusión ($n \leq 0.45$) (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de los parámetros obtenidos por ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Peppas

CPC fabricado con	5mg/ml de Vancomicina		R^2
	k	n	
β -TCP	$38,99 \pm 0,6$	$0,097 \pm 0,004$	0,95908
26,67 % MgTCP	$38,57 \pm 0,8$	$0,14 \pm 0,008$	0,95701
66,67 % MgTCP	$29,46 \pm 0,5$	$0,15 \pm 0,006$	0,97604

❖ Fraguando el cemento con la vancomicina:

En este método la vancomicina se incorpora en la fase polvo del cemento en una relación de 2 g de vancomicina por cada 40 g del polvo del cemento. La figura 48 muestra el perfil de liberación del cemento preparado según el método A comparado con el cemento sin sustituir.

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

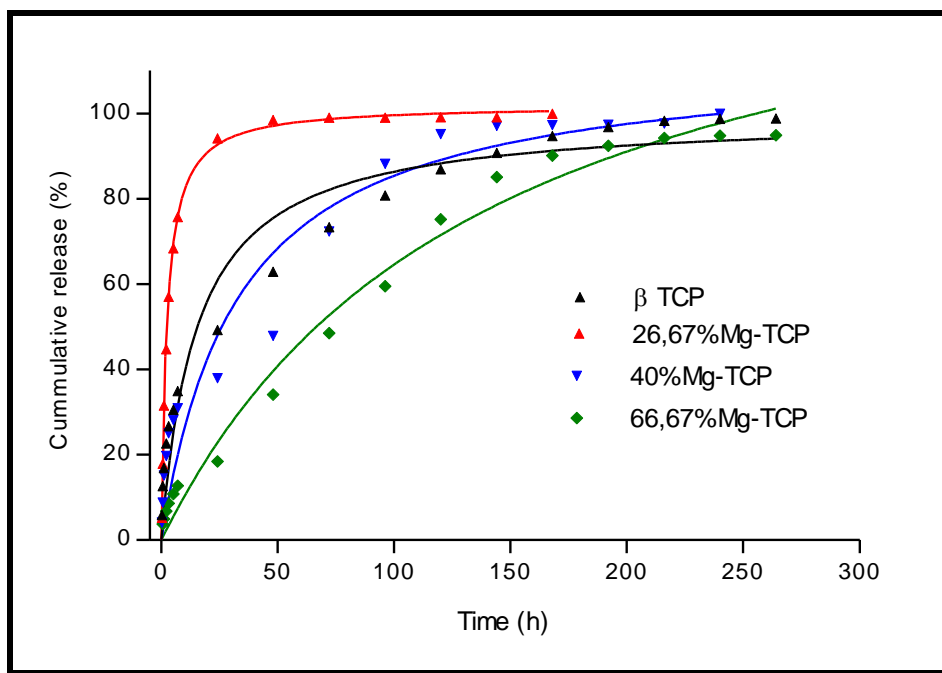


Figura 48. Liberación de vancomicina por los cementos preparados según el método A comparados con el cemento sin sustitución (β -TCP). Vancomicina incorporada en la fase polvo del cemento.

Se puede observar diferencias significativas en el perfil de la liberación del antibiótico de los 4 vehículos. El cemento control (sin sustitución de magnesio) libera el 50% del antibiótico en las primeras 24 horas y alcanza a liberar el 90% del antibiótico a las 144 horas. Por otro lado, el cemento preparado con 26,67% Mg-TCP presenta una liberación brusca de la vancomicina, llegando a liberar el 50% del antibiótico a las 3 horas. Sin embargo, al aumentar el contenido de magnesio el perfil de liberación va cambiando, como sucede con el cemento preparado con 40% Mg-TCP que libera el 50% de vancomicina en las primeras 50 horas y alcanza a liberar el 90% del antibiótico a las 96 horas del ensayo. El cemento preparado con 66,67% de Mg-TCP presenta una liberación más lineal, liberando el 50% del antibiótico en las primeras 72 horas y luego va liberando paulatinamente el antibiótico llegando a liberar el 90% a las 168 horas.

Para determinar la cinética de la liberación se empleó el modelo de Peppas (Ec. (2)), aplicable hasta el 60% de la liberación del total de vancomicina. Según los parámetros de ajuste de los datos experimentales sobre el mecanismo de liberación de la vancomicina por los cementos, determinamos que la liberación de la vancomicina por los cementos preparados con β -TCP y 40% Mg-TCP fue controlado por un mecanismo

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

de difusión ($n \leq 0,45$). Sin embargo, los datos de la liberación de vancomicina por los cementos preparados con 26,67% Mg-TCP y 66,67% Mg-TCP sugiere una liberación mediada por un transporte anómalo ($0,45 < n < 0,89$) (Tabla 15).

Tabla 15. Valores obtenidos tras la aplicación de la ley de Peppas en los cementos A

	2g vancomicina/40g polvo del cemento		
CPC fabricado con	k	n	R ²
β -TCP	17,15 \pm 0,8	0,34 \pm 0,01	0,98516
26,67 % MgTCP	28,40 \pm 2,6	0,58 \pm 0,07	0,95712
40 % MgTCP	15,47 \pm 1,4	0,29 \pm 0,03	0,93277
66,67 % MgTCP	3,74 \pm 0,8	0,64 \pm 0,05	0,97372

❖ ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA:

Después de analizar la cinética de liberación de la vancomicina adsorbida en los cementos, hay que averiguar si la vancomicina liberada mantiene su actividad antimicrobiana. Para ello, se colocaron los cementos sobre placas inoculadas con *Staphylococcus aureus* y se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas y después se incubaron a 37°C durante 24 horas. Además, se ha incubado en una placa un disco de papel impregnado con vancomicina (30 μ g) para comprobar la sensibilidad de la cepa.

En la figura 49A, observamos el crecimiento de la cepa en la placa inoculada que no contenía ningún cilindro de cemento. Además, se comprobó la sensibilidad de la cepa de *Staphylococcus aureus* por la formación de un halo de inhibición (Figura 49B) alrededor de un disco de vancomicina (30 μ g) situado en el centro de la placa Petri.



Figura 49A. Agar + S. Aureus

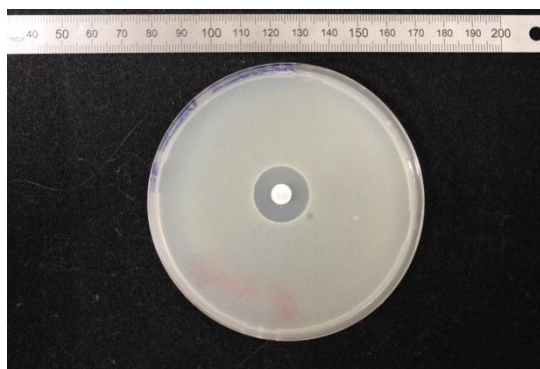


Figura 49B. Antibiograma

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los cementos cargados con vancomicina mediante adsorción, determinó que la cepa fue sensibilizada por los cementos que contenían vancomicina como se muestran en las figuras 49C, 49D, 49E, 49F, 49G y 49H. La sensibilización de la cepa se evidencia por la zona de inhibición de crecimiento de los *Staphylococcus aureus*.

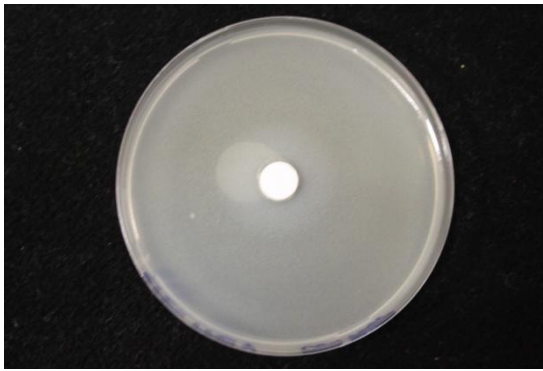


Figura 49C. β -TCP sin vancomicina

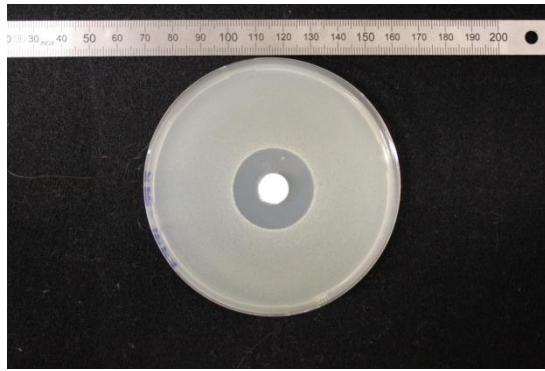


Figura 49D. β -TCP con vancomicina

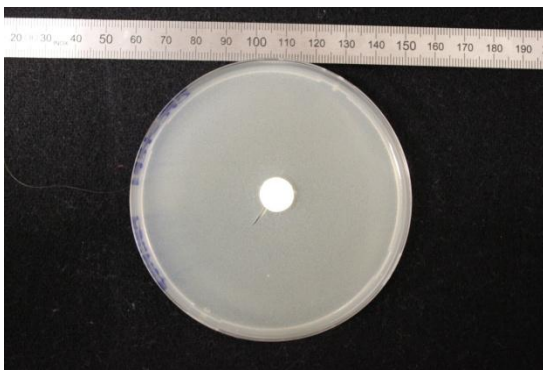


Figura 49E. 26.67% Mg-TCP
sin vancomicina

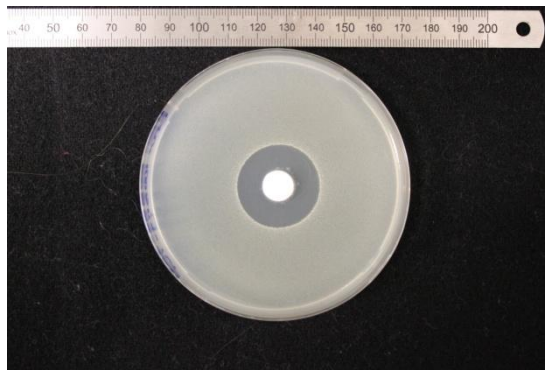


Figura 49F. 26.67% Mg-TCP
con vancomicina

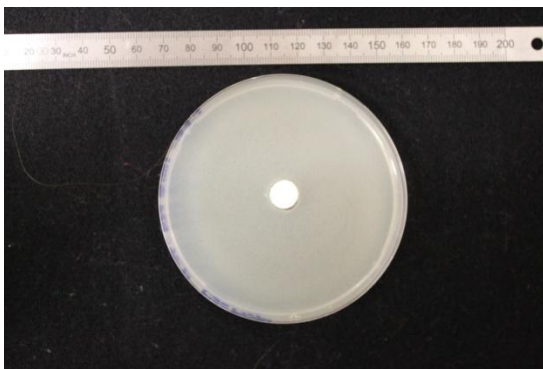


Figura 49G. 66.67% Mg-TCP
sin vancomicina

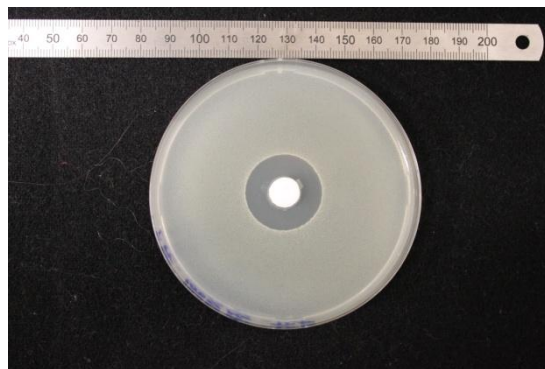


Figura 49H. 66.67% Mg-TCP
con vancomicina

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Para determinar si existían diferencias significativas entre todos los cementos analizados se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a los cilindros, los resultados se representan en la figura 50. El análisis estadístico muestra que las diferencias fueron significativas en el halo de inhibición producido por el cemento del 26,67% Mg-TCP cargado con vancomicina y los demás cementos.

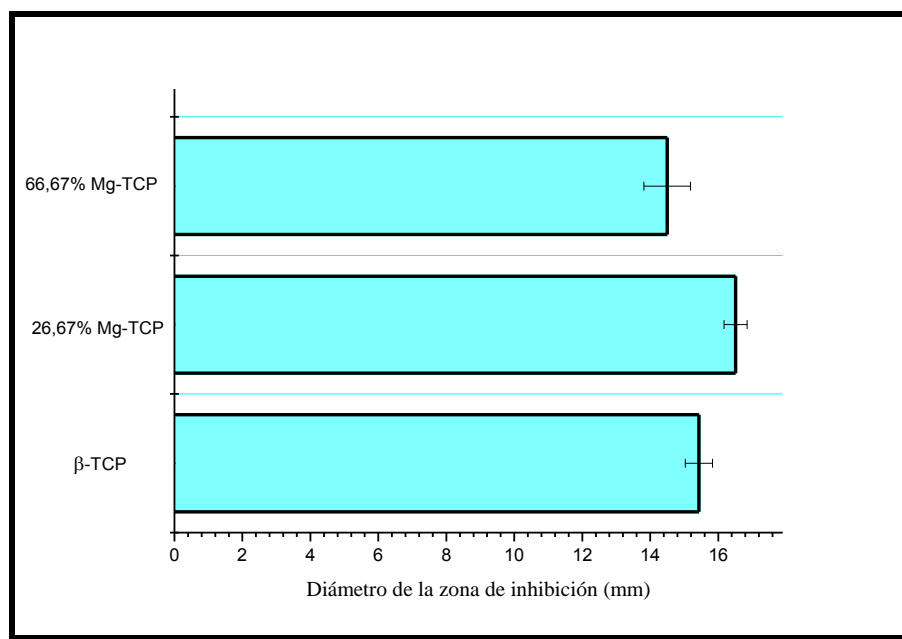


Figura 50. Actividad microbiana de la vacomicina liberada por los β -TCP, 26,66% Mg-TCP y 66,67% Mg-TCP.

El análisis estadístico (ANOVA de una vía) muestra que existe diferencia significativa entre los grupos estudiados (Tabla 16). Para determinar entre que cementos existen diferencias, empleamos el test post-hoc Tukey (Tabla 17).

Tabla 16. Resumen del análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P < 0,05
Inter-grupos	397,59	3	132,53	1338,91	SI
Intra-grupos	7,42	75	0,10		
Total	405,02	78			

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Tabla 17. Método de Tukey, entre que cementos existe diferencia significativa.

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
β -TCP -- 26,67%Mg-TCP	1,61633	SI
β -TCP -- 66,67%Mg-TCP	0,0081	NO
26,67%Mg-TCP -- 66,67%Mg-TCP	1,60824	SI

Por otro lado, también se determinó la actividad antimicrobiana de los cementos cargados con 2 g de vancomicina en la fase polvo del cemento por cada 40 g de la fase en polvo del cemento. Preparamos el cemento control (cemento sin sustituir) (Figura 51A) y el cemento de 26,67% de Mg-TCP para determinar la actividad antimicrobiana. Al finalizar el ensayo, se determinó que la cepa de *Staphylococcus aureus* fue sensibilizado con los cementos que contenían vancomicina (Figura 51B y 51D) en comparación con los cementos sin vancomicina (Figura 51A y 51C).

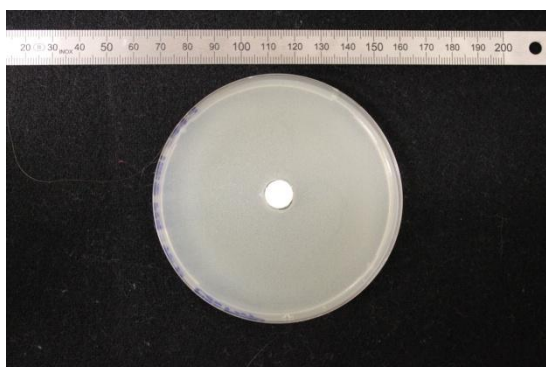


Figura 51A. β -TCP (B1) sin vancomicina

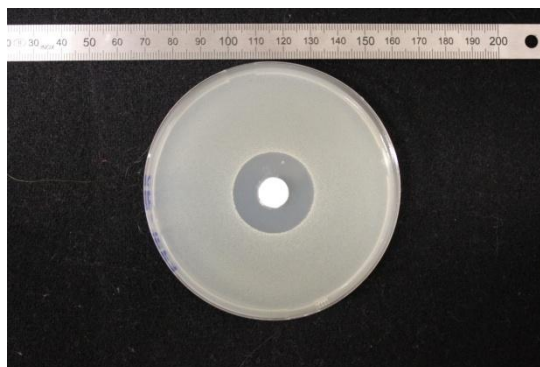


Figura 51B. β -TCP (B2) con vancomicina

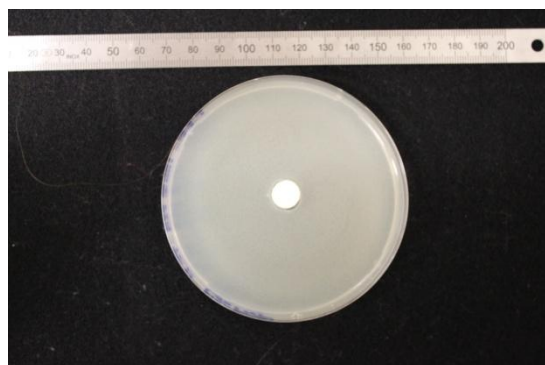


Figura 51C. 26.67% Mg-TCP (B1)
sin vancomicina

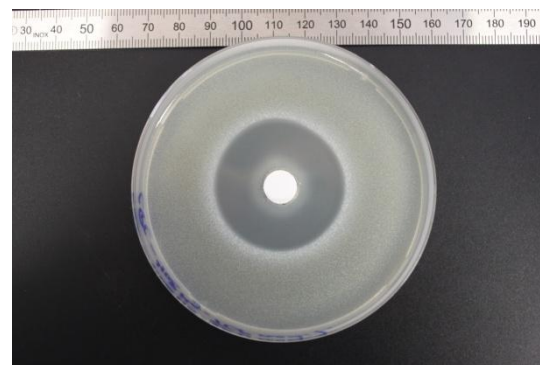


Figura 51D. 26.67% Mg-TCP (B2)
con vancomicina

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a los cilindros de cemento que se representan en la figura 52.

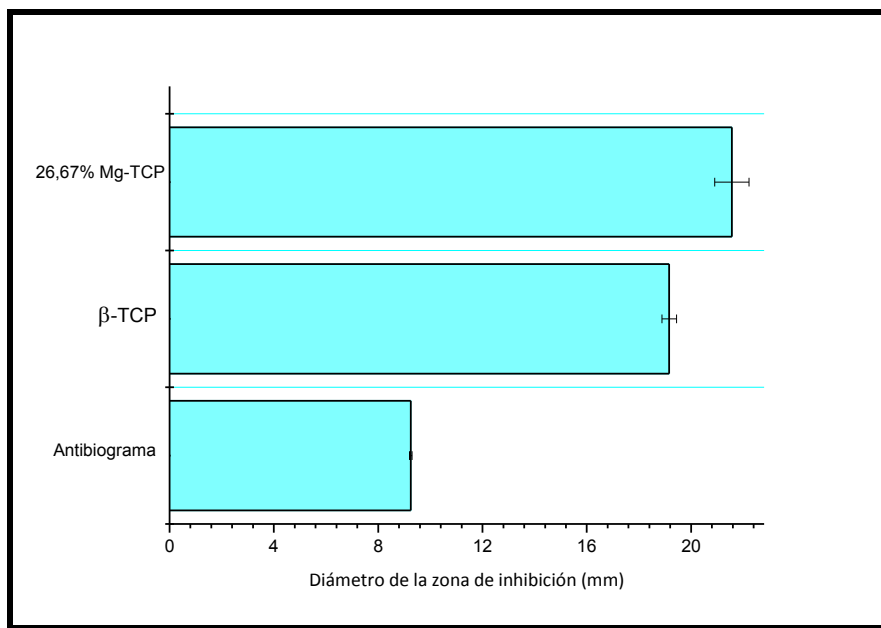


Figura 52. Actividad microbiana de la vancomicina liberada por el antibiograma cargado con 30 μ g de vancomicina, β -TCP y 26,66% Mg-TCP

El análisis estadístico (ANOVA de una vía) muestra que existe diferencia significativa entre los grupos estudiados (Tabla 18). Las diferencias fueron significativas para todos los grupos estudiados.

Tabla 18. Resumen del análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P < 0,05
Inter-grupos	200,85	2	100,42	487,47	SI
Intra-grupos	12,15	59	0,21		
Total	213,00	61			

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Cementos preparados según el método C: 66,67% Mg-TCP + Mg-MCPM:

❖ Adsorción-desorción de la vancomicina:

Para este ensayo preparamos muestras de cemento según el método MCPM, 26.67% Mg-MCPM y 66.67% Mg-MCPM e incorporamos 5 mg/ml de vancomicina para los experimentos de adsorción (Figura 53).

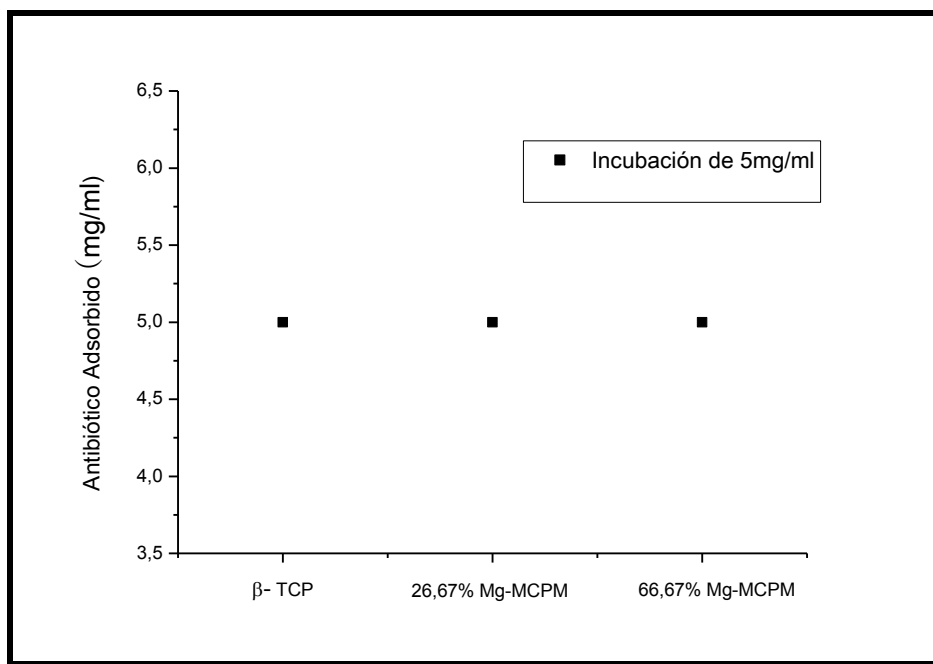


Figura 53. Antibiótico absorbido en muestras incubadas en una solución de 5mg/ml.

La figura 54, muestra el perfil de liberación de vancomicina, para las muestras de cementos incubadas en una solución de vancomicina de 5 mg/ml durante 24 horas. Se puede observar la brusca liberación de vancomicina por los cementos que contienen magnesio. Se libera el 60% del antibiótico en los primeros 15 minutos y el 90% después de 48 horas.

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

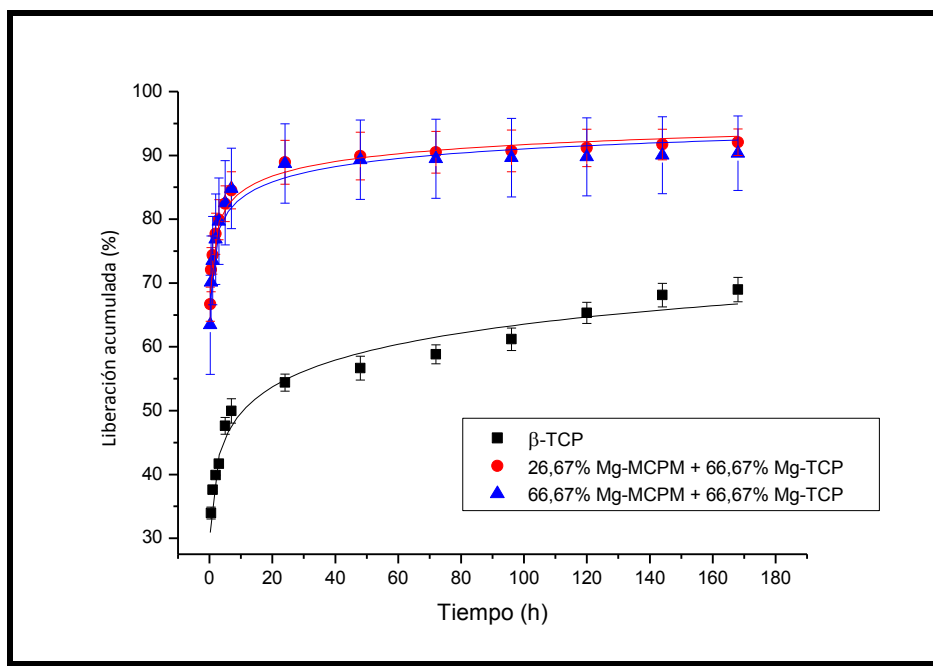


Figura 54. Liberación de vancomicina después que las muestras han sido incubadas en una solución antibiótica de 5mg/ml.

Los perfiles de liberación fueron ajustados con la ecuación de Peppas, y se encontró que el perfil de liberación de la vancomicina (5mg/ml) cargada en los cementos según el método C, se ajusta con un mecanismo de difusión (Tabla 19)

Tabla 19. Valores obtenidos tras la aplicación de la ley de Peppas en los cementos C

5mg/ml de Vancomicina			
CPC fabricado con	k	n	R ²
β-TCP	0,47 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,9764
26,67%Mg-MCPM + 66,67 % MgTCP	1,37 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,9862
66,67%Mg-MCPM + 66,67 % MgTCP	1,33 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,9538

Por otro lado, el otro método de incorporar el antibiótico es añadirlo en el polvo del cemento en una relación de 2 g de vancomicina por cada 40 g del polvo de cemento. La figura 55 muestra el perfil de liberación del cemento preparado según el método C y el del cemento sin sustituir.

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

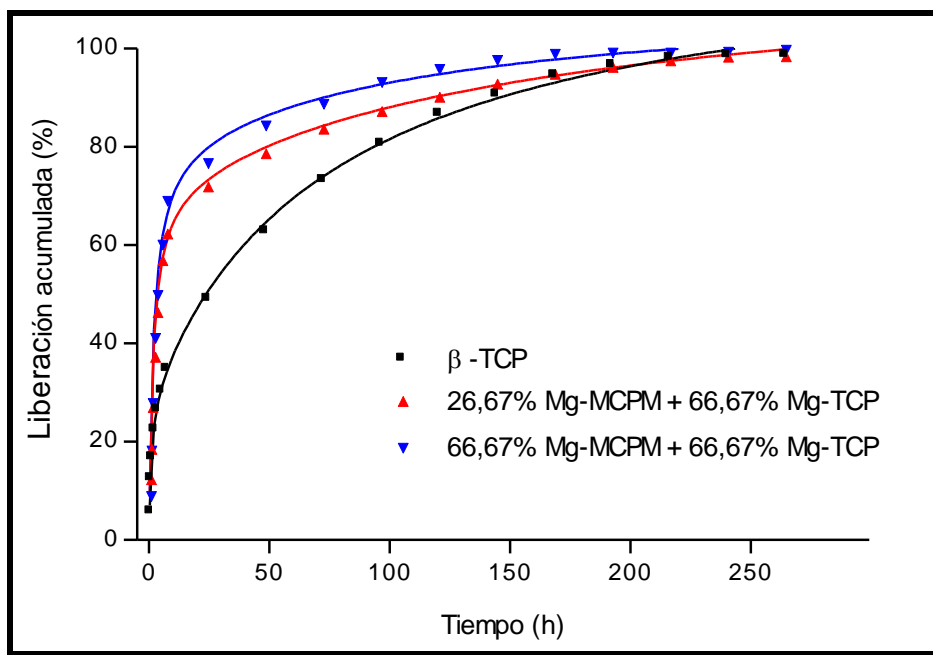


Figura 55. Liberación de vancomicina por los cementos C comparados con el cemento sin sustitución (β -TCP)

El cemento control (sin sustitución de magnesio) libera el 50% del antibiótico en las primeras 24 horas y alcanza a liberar el 90% del antibiótico a las 144 horas. Sin embargo al utilizar cementos de magnesio la liberación aumenta al aumentar la concentración de magnesio. En los cementos preparados con 26,67% Mg-MCPM presenta una liberación brusca de la vancomicina, llegando a liberar el 50% del antibiótico en las primeras 5 horas. Y el cemento preparado con 66,67% de Mg-MCPM presenta una liberación más brusca, liberando el 50% del antibiótico en las primeras 3 horas y media, llegando a liberar el 90% a las 72 horas.

Para determinar la cinética de liberación se empleó el modelo de Peppas (Ec.2), aplicable hasta el 60% de la liberación del total de vancomicina. Según los parámetros de ajuste de los datos experimentales sobre el mecanismo de liberación por los cementos, determinamos que la liberación de la vancomicina por los cementos preparados con β -TCP y 26,67% Mg-MCPM fue controlado por un mecanismo de difusión ($n \leq 0,45$). Sin embargo, los datos de la liberación de vancomicina por los cementos preparados con 66,67% Mg-TCP sugiere una liberación mediada por un transporte anómalo ($0,45 < n < 0,89$) (Tabla 20).

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Tabla 20. Valores obtenidos tras la aplicación de la ley de Peppas en los cementos C

2g vancomicina /40g polvo del cemento			
CPC fabricado con	k	n	R ²
β -TCP	17,15 \pm 0,86	0,34 \pm 0,02	0,9852
26,67%Mg-MCPM + 66,67 % MgTCP	27,07 \pm 0,91	0,45 \pm 0,02	0,9905
66,67%Mg-MCPM + 66,67 % MgTCP	29,08 \pm 0,99	0,53 \pm 0,03	0,9916

❖ ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA:

Luego de analizar la cinética de liberación de la vancomicina en los cementos según el método C, decidimos utilizar el método de incorporar 2 g de antibiótico en la fase polvo del cemento por cada 40 g del polvo del cemento para determinar su actividad antimicrobiana. La figura 55 muestra el perfil de liberación del cemento preparado según el método C y del cemento sin sustituir.

Se colocaron las pastillas sobre placas inoculadas con *Staphylococcus aureus* y se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas y después se incubaron a 37°C durante 24 horas. En las figuras 56A, 56B y 56C observamos que la cepa *Staphylococcus aureus* fue sensibilizada con los cementos C que contenían vancomicina.

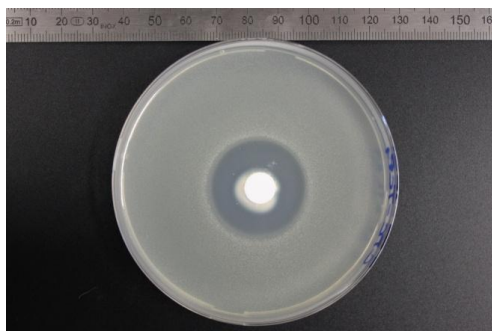


Figura 56A. β -TCP con vancomicina

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

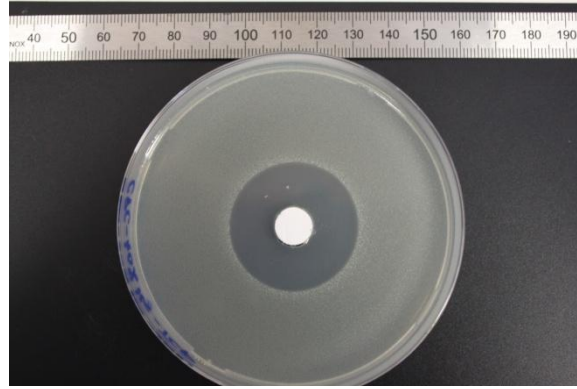


Figura 56B. 26.67% Mg-MCPM + 66,67% Mg-TCP con vancomicina

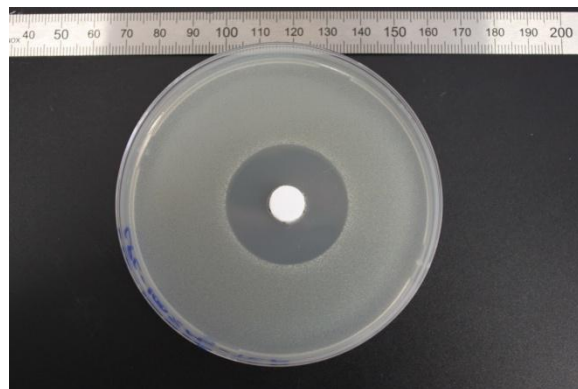


Figura 56C. 66.67% Mg-MCPM + 66,67% Mg-TCP con vancomicina

Se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a los cilindros de cemento que se representan en la figura 57.

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

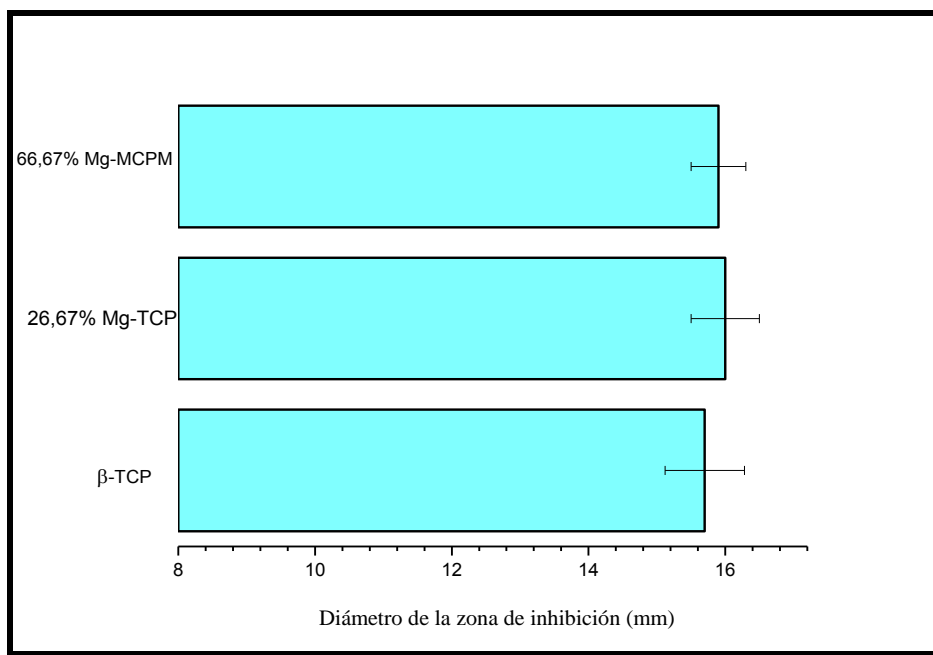


Figura 57 Actividad microbiana de la vancomicina liberada por los β -TCP, 26,66% Mg-TCP y 66,67% Mg-TCP.

El análisis estadístico (ANOVA de una vía) muestra que existe diferencia significativa entre los grupos estudiados (Tabla 21).

Tabla 21. Resumen del análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P < 0,05
Inter-grupos	408,51	3	136,17	541,03	SI
Intra-grupos	19,63	78	0,25		
Total	428,14	81			

Para determinar entre que cementos existen diferencias, empleamos el Método de Tukey (Tabla 22).

6.5. Resultados de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Tabla 22. Método de Tukey, entre que cementos existe diferencia significativa.

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
β -TCP -- 26,67%Mg-TCP	0,569	SI
β -TCP -- 66,67%Mg-TCP	0,61314	SI
26,67%Mg-TCP -- 66,67%Mg-TCP	0,04414	NO

Los resultados del método de Tukey muestran diferencias significativas entre los cementos preparados con β -TCP y 26,67% Mg-TCP; y β -TCP y 66,67% Mg-TCP; Sin embargo, no se encuentra diferencia significativa en el grupo conformado por 26,67%Mg-TCP y 66,67%Mg-TCP.

6.6. DISCUSIÓN DE CEMENTO COMO VEHÍCULO TRANSPORTADOR DE MEDICAMENTOS

6.6. Discusión de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

El interés sobre el desarrollo de sistemas para la liberación de fármacos es grande y por ello se han creado compuestos bioactivos a base de polímeros y materiales inorgánicos como los cementos de fosfatos cálcicos con el fin de obtener materiales implantables capaces de mejorar el crecimiento de hueso y al mismo tiempo poder liberar diferentes sustancias como proteínas, antibióticos, antiinflamatorios, etc. [183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190].

Una de las principales complicaciones de la cirugía de implantes sigue siendo las infecciones. Por esta razón la utilización de sistemas de distribución de antibióticos en los procedimientos quirúrgicos ofrece un enfoque terapéutico para el tratamiento de las infecciones y la posibilidad de minimizar el uso de antibióticos por vía sistémica [191, 192]. Los antibióticos cargados en los cementos, empleados en regeneración ósea deben ser considerados como un medio de defensa contra la contaminación directa en el momento de la cirugía o durante el periodo postoperatorio.

Hemos encontrado estudios recientes, que han demostrado la viabilidad de liberar un fármaco a partir de cementos de brushita en su aplicación como terapia periodontal [193, 194]. Antibióticos como la gentamicina, cefuroxima, vancomicina y tobramicina han sido los más comúnmente mezclados con el cemento óseo en los estudios a nivel mundial [195, 196, 197, 198, 199, 200]. En este estudio hemos elegido la vancomicina, que es un antibiótico del grupo de los glupopéptidos, de espectro limitado a los microorganismos gram positivos, está esencialmente indicada en infección severas por *Staphylococcus aureus* y presenta la ventaja de provocar escasas resistencias [201].

La base principal para el uso de cemento óseo cargado con antibiótico como método profiláctico para reducir la prevalencia de infecciones ha sido la experiencia clínica obtenida en las últimas décadas en combinación con los datos experimentales de varios estudios. En un experimento con perros, el uso de gentamicina cargada en un cemento óseo redujo significativamente la tasa de implante relacionados con infección en comparación con la que se asocia con el uso de cemento óseo sin antibiótico ($p < 0,05$) [202]. Este hallazgo se confirmó en un estudio en conejos utilizando cemento impregnado de tobramicina en comparación con cemento sin tobramicina [203, 204].

6.6. Discusión de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

En nuestro estudio la incorporación de vancomicina al cemento se realizó por adsorción y por incorporación directa a la fase polvo del cemento. Existen estudios donde se ha desarrollado y estudiado este tema con amplitud, sugiriéndose distintos métodos para la incorporación de sustancias a los cementos bien en su fase líquida como en la fase en polvo y aprovechando su porosidad ^[205, 206, 207, 208].

En general los cementos del método A han liberado un alto porcentaje de vancomicina en las primeras horas del estudio, llegando a liberar el 70% de la vancomicina en las primeras 7 horas, y sin embargo, el cemento sin magnesio mantiene una liberación del 60% en las primeras 50 horas. El cemento del método A preparado con 66,67% Mg-TCP al que se le incorporo vancomicina en la fase polvo del cemento presento una liberación paulatina, liberando el 33% de la vancomicina en las primeras 50 horas y el resto (94%) a las 264 horas del inicio del estudio. Existen estudios que reportan variaciones en el tiempo de liberación de sustancias añadidas a los cementos. Estos tiempos van desde días, semanas e incluso implantes que llevan años liberando la sustancia añadida, pero gran parte de estos estudios concluyen que para la mayoría de los antibióticos su liberación se produce en las primeras nueve semanas ^[209]. La liberación de antibióticos de los cementos óseos es un proceso complejo, porque incluye importantes variables, como: el tipo de antibiótico ^[210, 211], el tipo de cemento ^[212, 213, 214] y las condiciones de mezcla, ya que el antibiótico es liberado desde la superficie, grietas y huecos del cemento ^[215, 216]. En la mayoría de los antibióticos su liberación se produce en las primeras nueve semanas y los cementos de fosfatos cálcicos han sido identificados como sistemas potenciales para liberar medicamentos ^[217, 218].

La explicación que podemos dar a la liberación de vancomicina al ser incorporada en la fase líquido del cemento del método A, es que la liberación va de la mano con características del cemento como la porosidad. Así, el cemento preparado con 66,67% de Mg-TCP presenta una liberación más lenta que los demás cementos, y esto se puede explicar porque presenta un porcentaje de porosidad (27%) menor que los demás cementos. Así, como el preparado con β -TCP tiene 44% de porosidad y los preparados con 26,67% Mg-TCP y 6,67% Mg-TCP presentan 45% y 57% de porosidad respectivamente.

6.6. Discusión de Cemento Como Vehículo Transportador de Medicamentos

Los cementos según el método C, liberan más vancomina que el control cuando esta se incorpora por adsorción. Esto se explica, debido a que la vancomicina se incorpora en los cementos por adsorción y los cementos presentan menor porcentaje de porosidad (26,67% Mg-TCP (26%) y 66,67% Mg-TCP (28%) que los cementos sin sustitución (β -TCP tiene 44%), de esta forma la vancomicina es posible que sea adsorbida solo en la superficie de los cementos debido al menor porcentaje de poros que presenta y su liberación sea por ello más rápida que los cementos sin sustitución de magnesio.

Al estudiar la actividad antimicrobiana de los cementos cargados con y sin vancomicina sobre cultivos con la cepa *Staphylococcus aureus*, observamos en los cementos cargados con vancomicina un halo de inhibición. Este halo fue mayor en los cementos con magnesio. Podemos concluir que los cementos estudiados han demostrado ser eficaces portadores de vancomicina para ser liberados terapéuticamente. Y hemos demostrado también la inhibición bacteriana producida por la liberación de la vancomicina.

6.7. RESULTADOS DE ESTUDIO *IN VIVO*

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Aquellos cementos que demostraron mejor citocompatibilidad fueron seleccionados para el estudio *in vivo*. Los biomateriales fueron colocados en los defectos tal como se explica en el apartado 5.2.12. Todos los conejos que se intervinieron en este estudio sobrevivieron a la cirugía y su recuperación fue completa. A las 8 semanas se pudo observar una cicatrización normal de la piel en la zona operada en todos los animales (Figura 58).

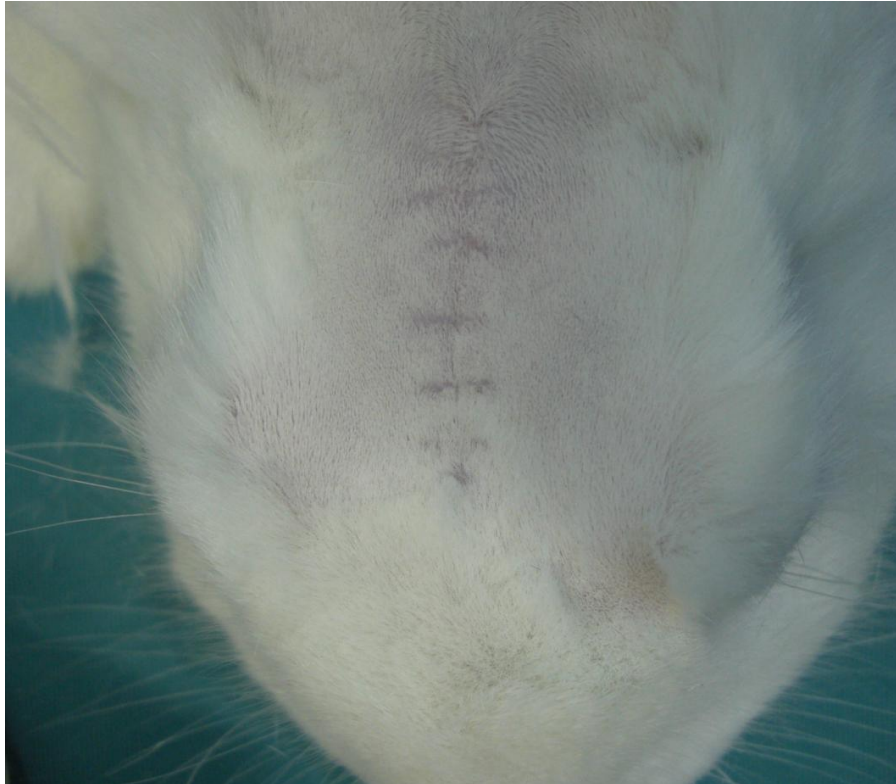


Figura 58. Cicatrización normal de la piel en la zona operada.

A. Evaluación macroscópica:

Después de ocho semanas desde la cirugía todos los cementos utilizados se incorporaron al hueso adyacente sin provocar ninguna reacción inflamatoria y se observó que había gránulos de cemento residual. Las muestras fueron extraídas con un margen de seguridad de 1 cm alrededor del defecto (Figura 59).

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

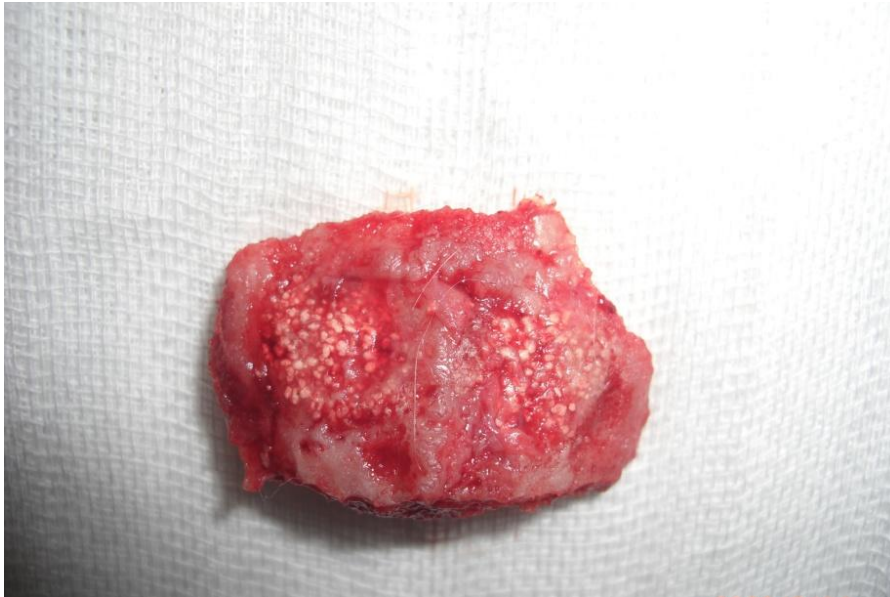


Figura 59. Tras 8 semanas de la cirugía se observa los gránulos residuales del cemento en el defecto óseo.

B. Evaluación histológica:

Los resultados demostraron que después de 8 semanas la reparación ósea espontánea no fue suficiente para promover la regeneración ósea completa en las cavidades sin ningún material incorporado como se puede observar en la figura 60. La reparación del defecto se llevó a cabo por tejido fibroso, sin núcleos de osificación y con mínima formación de tejido óseo. La ausencia de reparación ósea en todos los defectos sin material, indica que este modelo experimental es válido para nuestro estudio, por no poseer capacidad autorregenerativa. Por otro lado, se observó que la implantación del cemento preparado con β -TCP en el defecto óseo promovió la neoformación ósea (Figura 61), observándose ausencia de respuesta inflamatoria o presencia de macrófagos. En las zonas donde se observó neoformación ósea, se aprecia moderada cantidad de osteoide rodeado por un ribete de osteoblastos y, osteocitos que se habían incorporado al tejido óseo maduro. En este grupo se observó un porcentaje de hueso neoformado de un $10.52 \% \pm 1.84$ y $40,32\% \pm 6,55$ de cemento remanente.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

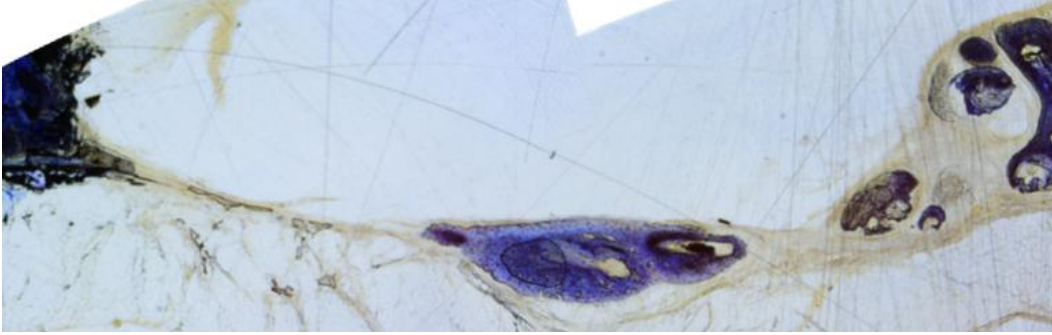


Figura 60. Defecto óseo sin ningún material que promueva la regeneración ósea tras 8 semanas (2x).

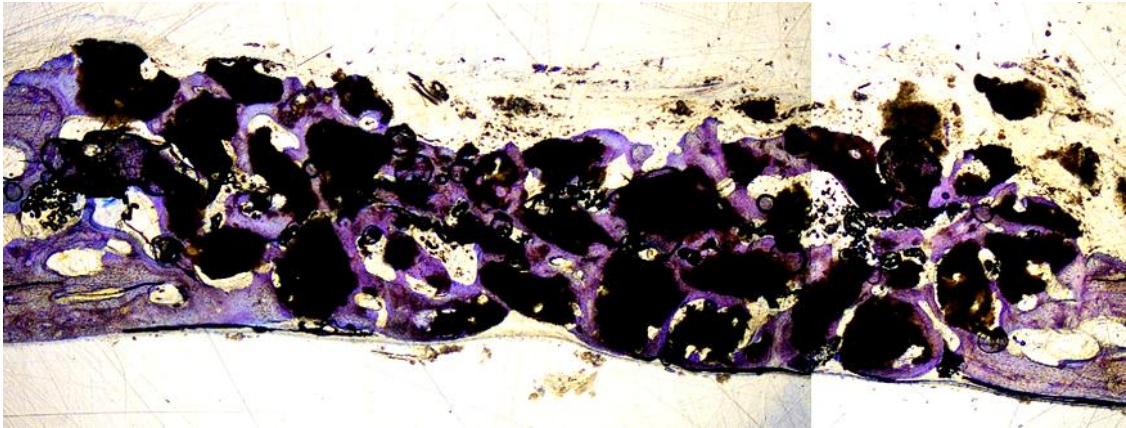


Figura 61. Corte histológico del defecto óseo con cemento preparado con β -TCP tras 8 semanas. Se observa los gránulos de cemento (marrón) rodeados por neoformación ósea (2x)

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Cementos preparados según el método A: Mg-TCP + MCPM:

❖ Evaluación Histológica:

Después de 8 semanas se puede observar neo-formación ósea rodeando los gránulos remanentes de cemento (Figura 62). Desarrollando un enlace directo con el tejido óseo circundante al defecto óseo, con ausencia de tejido fibroso entre ellos. El comportamiento biológico de los cementos ha resultado satisfactorio, dado que no se ha detectado presencia de signos inflamatorios.

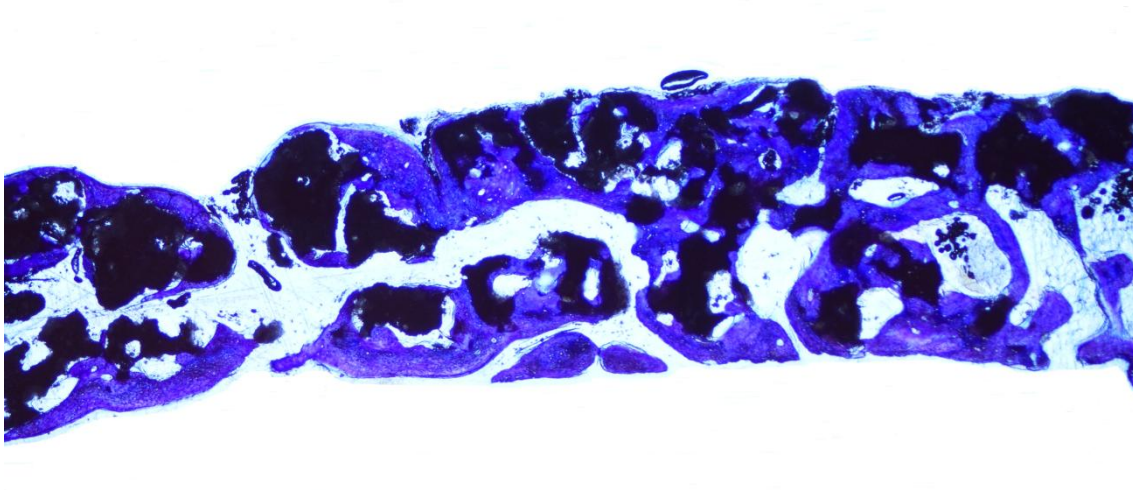


Figura 62. Corte histológico del cemento preparado con 6,67% Mg-TCP tras 8 semanas.

Se puede observar la neoformación ósea (azul) rodeando los gránulos de cemento (marrón oscuro) (2x)

Se observa claramente en las figuras 63, 64, 65 y 66 la presencia de los gránulos del cemento en el defecto con numerosos capilares sanguíneos invadiendo los gránulos. También se puede ver presencia de tejido óseo neofromado, en remodelación trabecular que penetra y rodea los numerosos gránulos del cemento. En los espacios creados dentro de los implante de cemento se distinguen puentes corticales que van sustituyendo los gránulos en la medida que estos se van degradando. En todas las muestras estudiadas persisten restos de los cementos óseos.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Es evidente la mayor reabsorción de los gránulos de cementos con magnesio al ser comparado con los cementos sin magnesio. Los osteoblastos forman una línea en la interfase entre el hueso y el gránulo del cemento de brushita depositando la matriz ósea no mineralizada, y que a posteriori se mineraliza, formando el hueso trabecular inmaduro.

En este grupo se observó un porcentaje de hueso neoformado de: $25,77 \pm 4,47$ para los cementos preparados con 6,67% Mg-TCP; $19,09 \pm 2,52$ de neoformación ósea en los cementos de 26,67 % Mg-TCP; $31,99 \pm 4,54$ de neoformación ósea en los cementos de 40% Mg-TCP y $25,44 \pm 4,31$ de neoformación ósea en los cementos de 66,67% Mg-TCP.

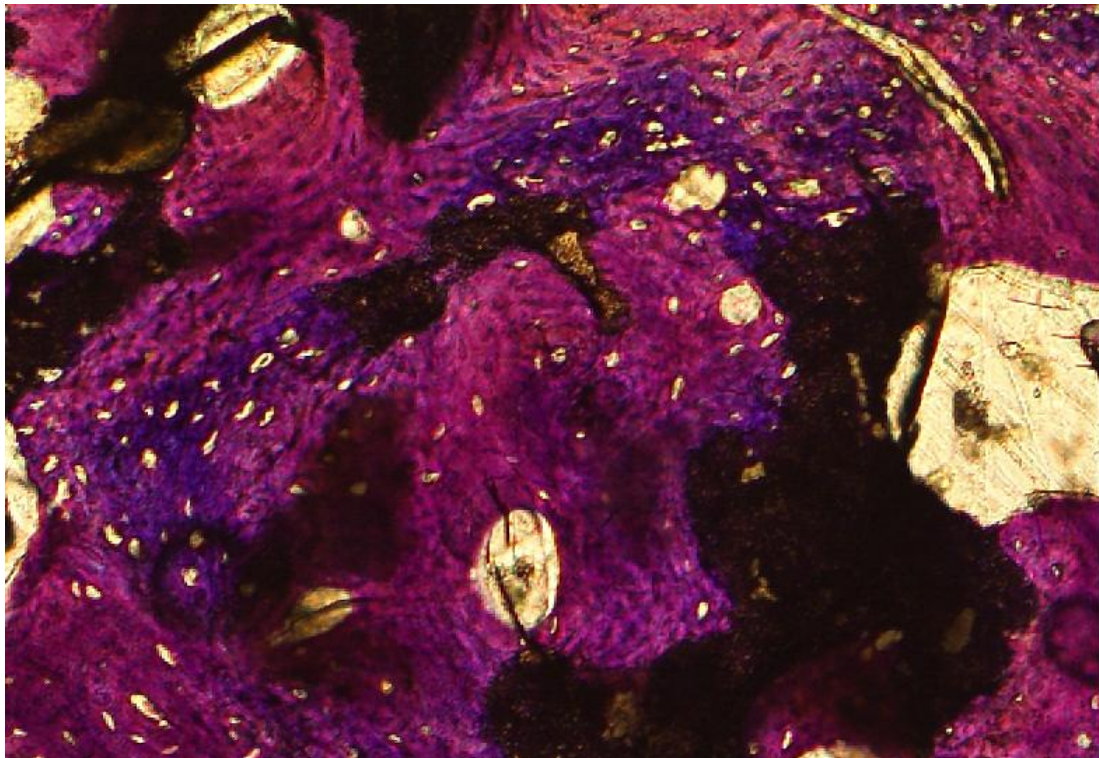


Figura 63. Neoformación ósea rodeando los gránulos remanentes del cemento preparado con 6,67% Mg-TCP (20x)

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

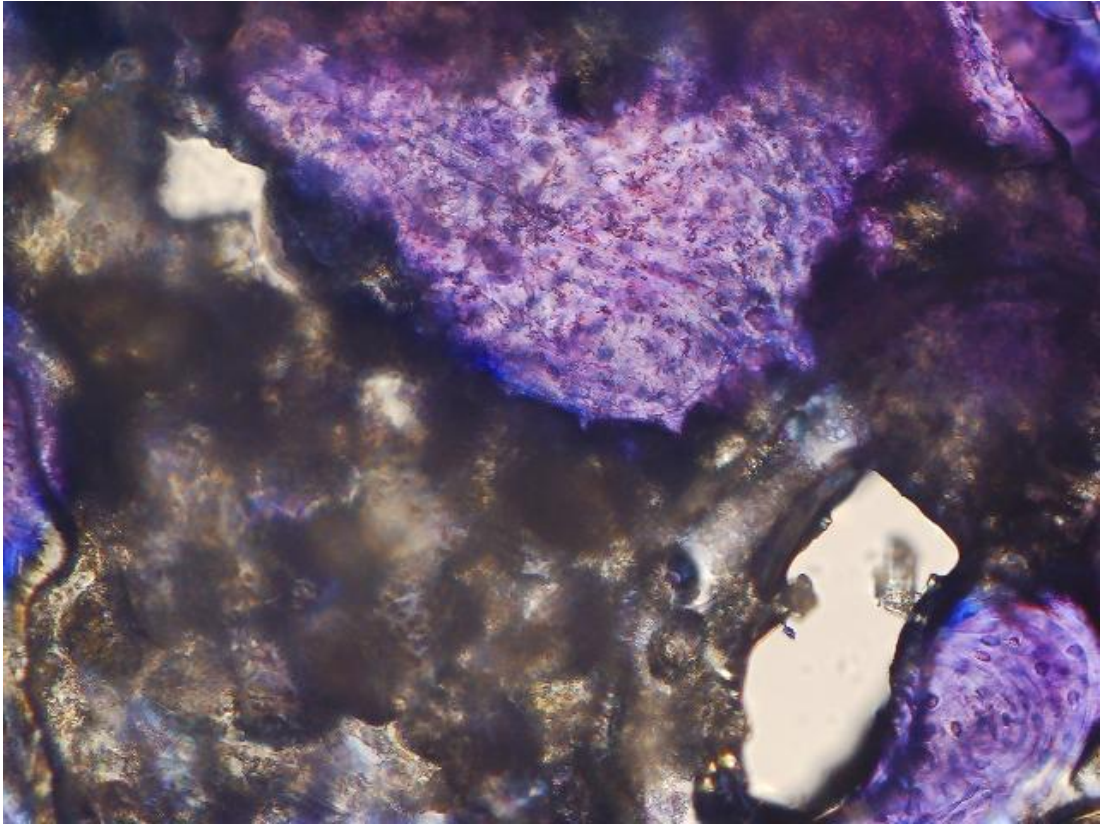


Figura 64. Gránulos remanentes en contacto directo con la neoformación ósea (20x)

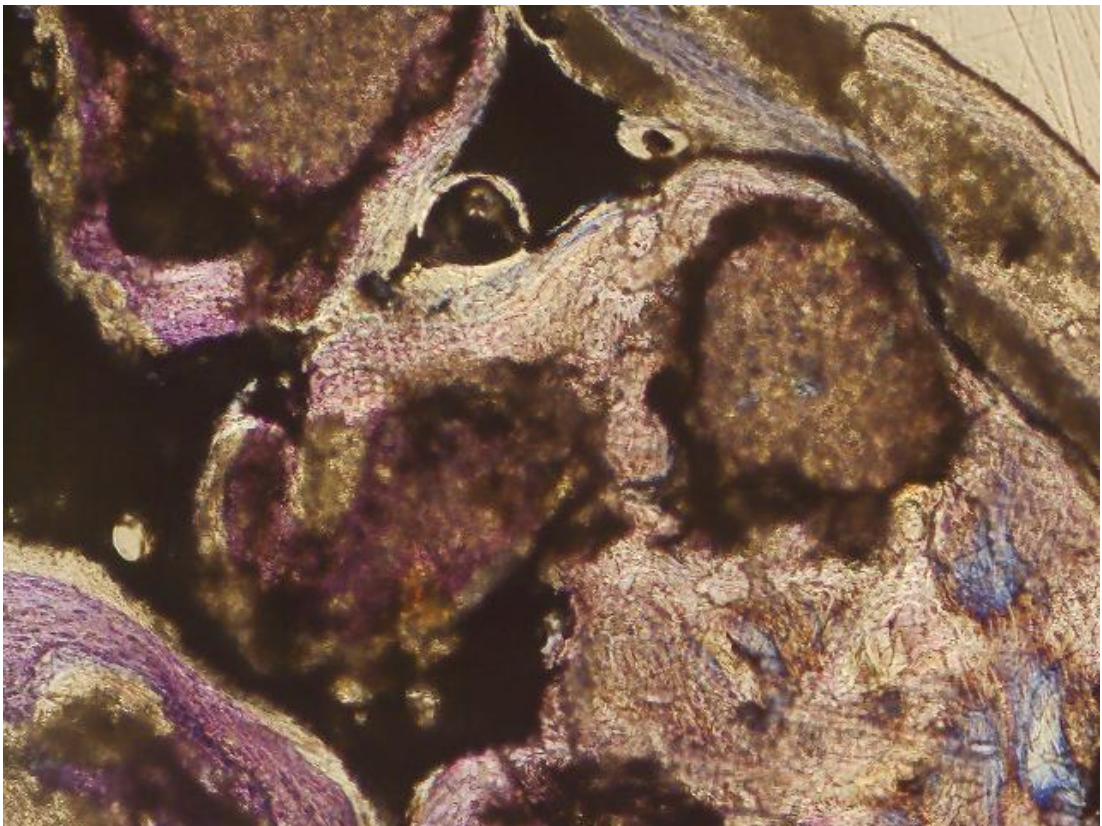


Figura 65. Trabéculas de hueso neoformado unidas unas con otras entre las partículas del biomaterial (10x)

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

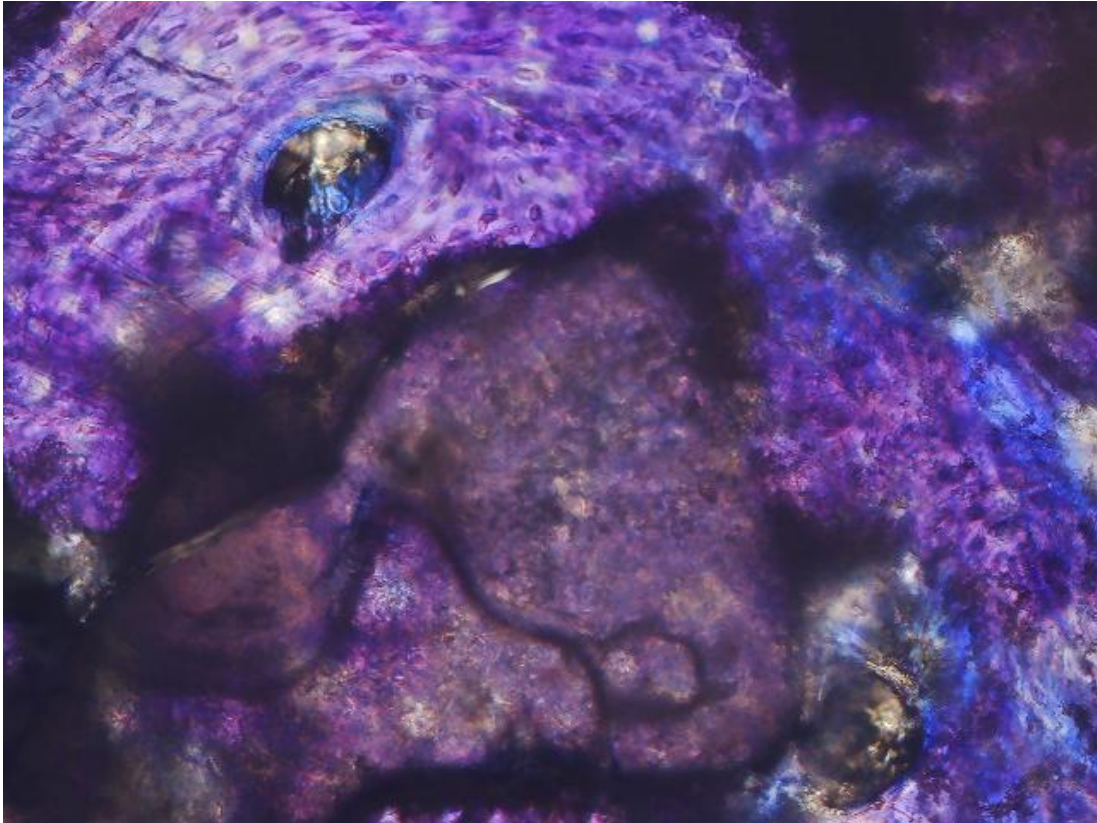


Figura 66. Lagunas osteocíticas rodeando los gránulos de cemento (20x)

❖ **Evaluación histomorfométrica:**

Para valorar cuantitativamente la fracción ósea que se había generado en las distintas cavidades según el material utilizado, se empleó el analizador de imágenes (NIS Elements versión 3.00) acoplado al microscopio óptico (Nikon Eclipse Ti) a una altura fija. Todas las valoraciones se realizaron en el laboratorio de regeneración tisular de la UCM.

Como puede observarse en la figura 64, la incorporación de iones de magnesio a los cementos de fosfatos cálcicos promueve mayor neo-formación ósea que el cemento sin sustitución.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

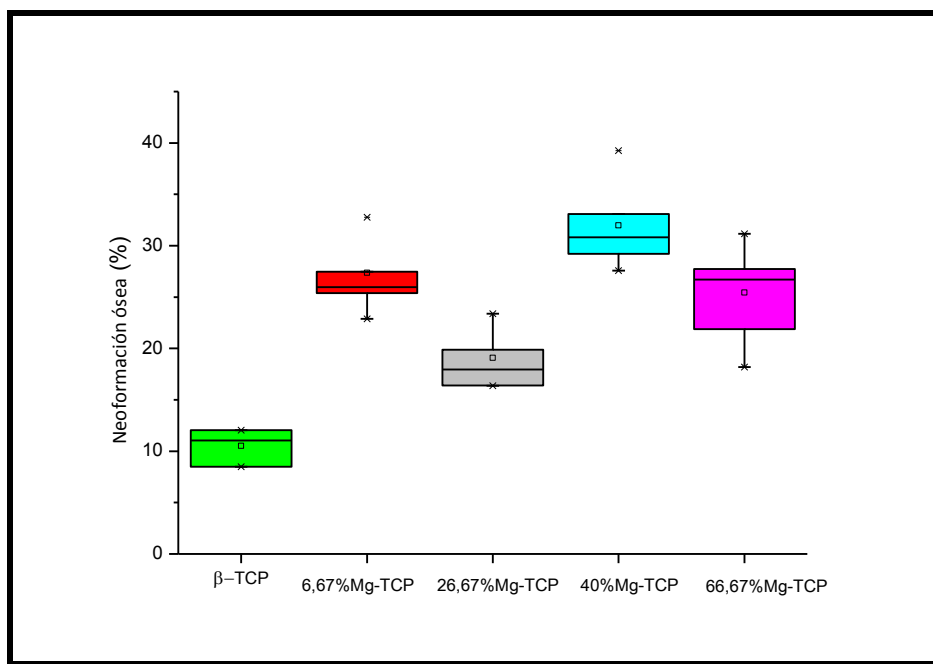


Figura 64. Porcentajes de neo-formación ósea del control y los cementos preparados según el método A.

Según, el análisis estadístico (ANOVA una vía) se encontraron que existen diferencias significativa entre los grupos ($p < 0,05$) como se muestra en la Tabla 23. Así, las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los cementos dopados con magnesio y el cemento control sin dopaje. Los cementos preparados con 6,67%, 40% y 66,67%Mg-TCP fueron significativamente mejores que el cemento preparado con 26,67%Mg-TCP.

Tabla 23. Resultados del análisis estadístico ANOVA una vía ($p < 0,05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P < 0,05
Inter-grupos	1163,72	4	290,93	22,43	2,96851E-8
Intra-grupos	350,17	27	12,97		
Total	1513,89	31			

Para determinar entre que cementos existen diferencias empleamos el Método de Tukey (Tabla 24).

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Tabla 24. Método de Tukey, las diferencias entre los distintos cementos.

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
6,67%Mg-TCP - β -TCP	16,83875	SI
26,67%Mg-TCP - β -TCP	8,5725	SI
26,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	-8,26625	SI
40%Mg-TCP - β -TCP	21,47	SI
40%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	4,63125	NO
40%Mg-TCP - 26,67%Mg-TCP	12,8975	SI
66,67%Mg-TCP - β -TCP	14,9175	SI
66,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	-1,92125	NO
66,67%Mg-TCP - 26,67%Mg-TCP	6,345	SI
66,67%Mg-TCP - 40%Mg-TCP	-6,5525	SI

Por el otro lado, los cementos preparados con 6,67% Mg-TCP, 40% Mg-TCP y 66,67% Mg-TCP presentan una reabsorción mayor que el cemento sin sustitución de magnesio (Figura 65).

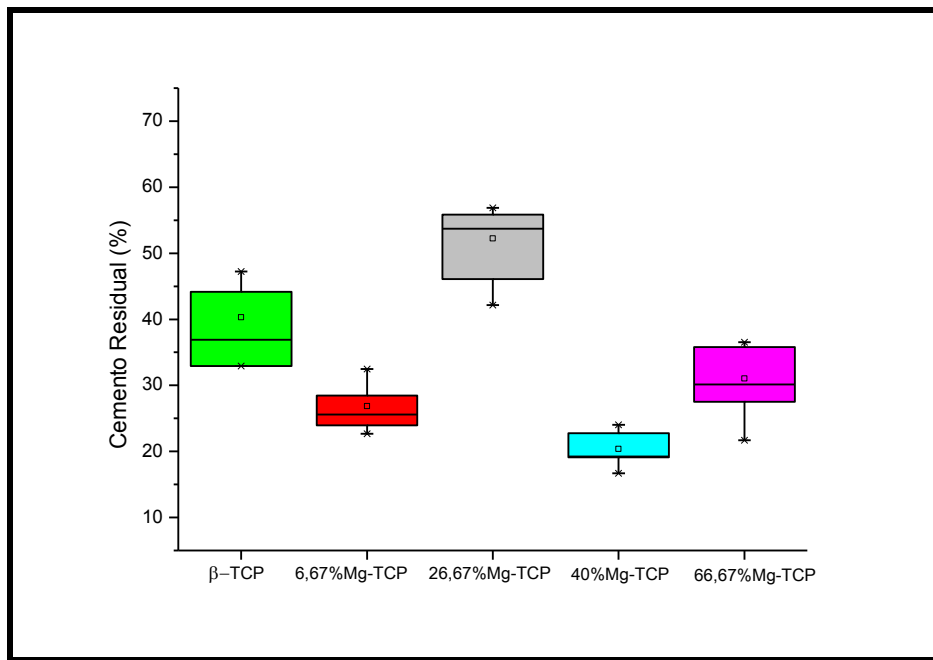


Figura 65. Porcentajes de cemento residual de los cementos preparados según el método A comparados con el cemento sin sustitución β -TCP.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Mientras, la degradabilidad menor fue para el cemento preparado con 26,67% Mg-TCP como se muestra en la figura 65. El análisis estadístico muestra que estas diferencias fueron significativas salvo en los casos de 6,67%Mg-TCP Vs 40%Mg-TCP, el 6.67%Mg-TCP Vs 66.67%Mg-TCP, y el 40%Mg-TCP Vs 66.67%Mg-TCP. Los resultados del análisis estadístico (ANOVA una vía) se muestran en la tabla 25. Y para determinar entre que cementos existen diferencias empleamos el Método de Tukey (Tabla 26).

Tabla 25. Resultados del análisis estadístico ANOVA una vía ($p < 0,05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P < 0,05
Inter-grupos	5392,55	4	1348,14	37,35	1,93214E-11
Intra-grupos	1119,05	31	36,10		
Total	6511,59	35			

Tabla 26. Diferencias entre el porcentaje de cemento residual entre los distintos cementos.

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
6,67%Mg-TCP - β -TCP	-14,54861	SI
26,67%Mg-TCP - β -TCP	12,95583	SI
26,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	27,50444	SI
40%Mg-TCP - β -TCP	-19,9515	SI
40%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	-5,40289	NO
40%Mg-TCP - 26,67%Mg-TCP	-32,90733	SI
66,67%Mg-TCP - β -TCP	-12,55861	SI
66,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	1,99	NO
66,67%Mg-TCP - 26,67%Mg-TCP	-25,51444	SI
66,67%Mg-TCP - 40%Mg-TCP	7,39289	NO

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Cementos preparados según método B: β -TCP + Mg-MCPM:

❖ Evaluación Histológica:

Después de 8 semanas se puede observar neo-formación ósea rodeando los gránulos remanentes del cemento (Figura 66). Al igual que en el cemento del método A se ha desarrollado un enlace directo con el tejido óseo circundante al defecto óseo, con ausencia de tejido fibroso entre ellos y sin presencia de signos inflamatorios. Sin embargo, se observan puentes óseos que comienzan a formarse, más espacios dentro de los implantes de cementos, y menor porcentaje de cemento remanente $25,08\% \pm 2,60$.

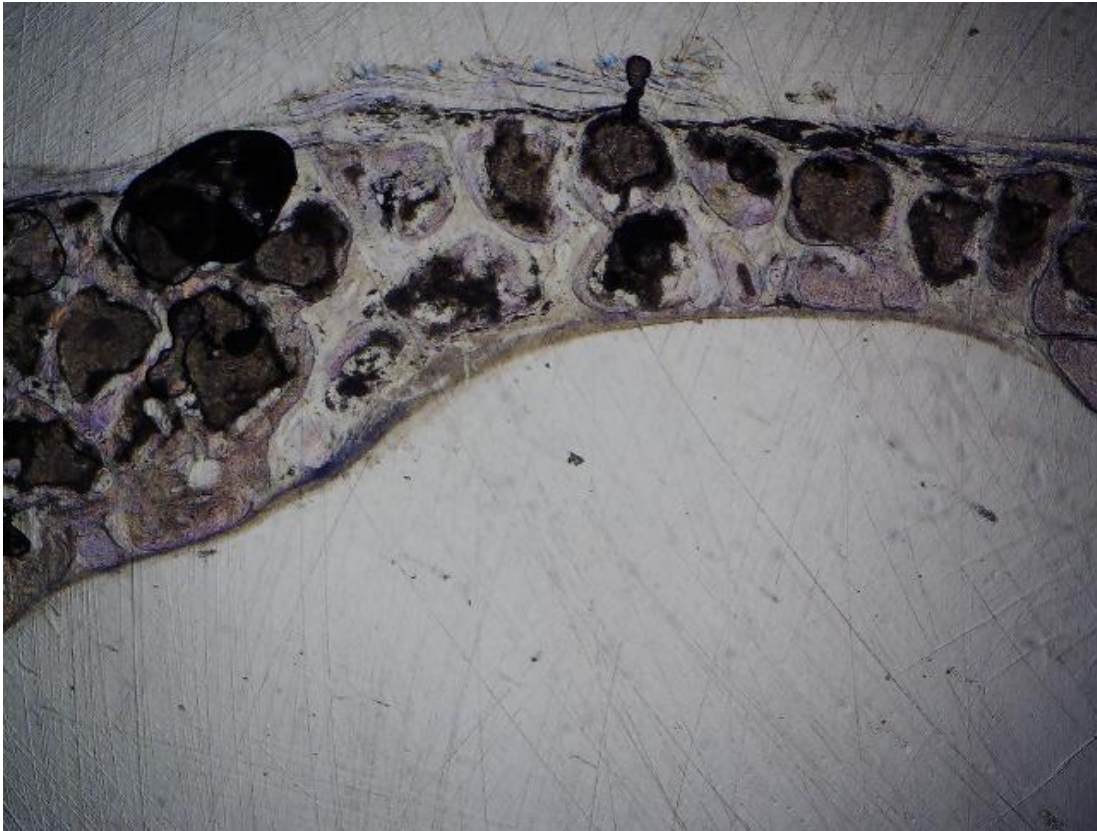


Figura 66. Corte histológico del cemento preparado con 66,67% Mg-MCPM tras 8 semanas. Se puede observar los gránulos del cemento (marrón) rodeado por la neoformación ósea (2x)

Este cemento presenta un comportamiento similar al cemento sin sustitución. En la figura 67 se puede observar trabéculas rodeando a los gránulos del cemento. En este caso el porcentaje de neoformación ósea fue de $14,09\% \pm 5,41$.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

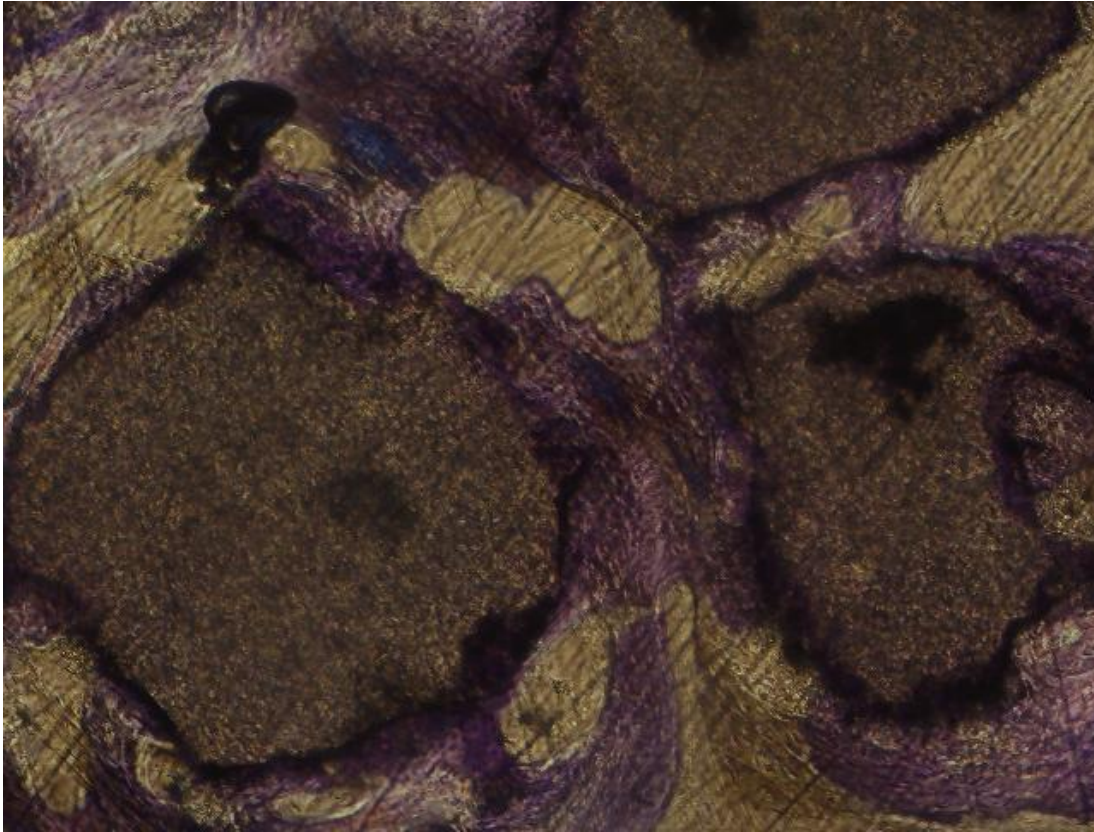


Figura 67. Neoformación ósea rodeando los gránulos de cemento (10x)

❖ Evaluación histomorfométrica:

El método empleado para la evaluación histomorfométrica fue el mismo en todos los cementos. Para determinar si existen diferencias significativas entre el cemento preparado con 66,67% MCPM y el control se realizó la prueba estadística t-Student, observándose que no hay diferencias significativas entre ambos ($p < 0,05$) como se muestra en la tabla 27.

Tabla 27. Resultados del análisis estadístico t- Student ($p < 0,05$).

T - Statistic	DF	P<0.05
-1,25883	2	0,335

En la figura 68, se observa que la incorporación de iones de magnesio al MCPM de los cementos de fosfatos cálcicos promueve similar neo-formación ósea ($14,09\% \pm 5,41$) que el cemento sin sustitución

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

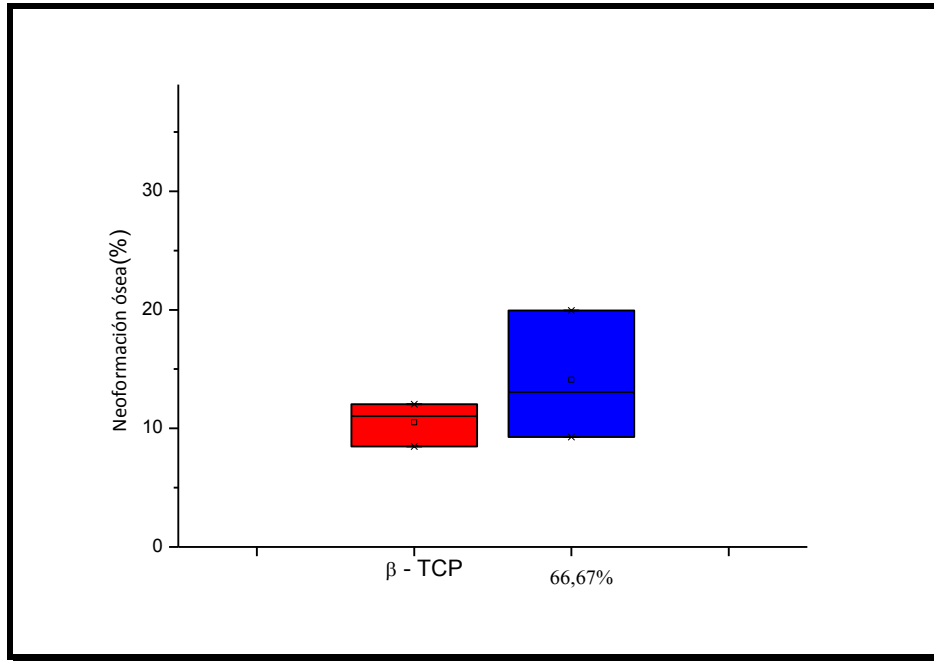


Figura 68. Porcentajes de neo-formación ósea del control y los cementos del método B.

Este nuevo método para la fabricación de cementos de fosfatos cálcicos con magnesio presenta una mayor reabsorción que los cementos sin sustitución, como puede observarse en la figura 69.

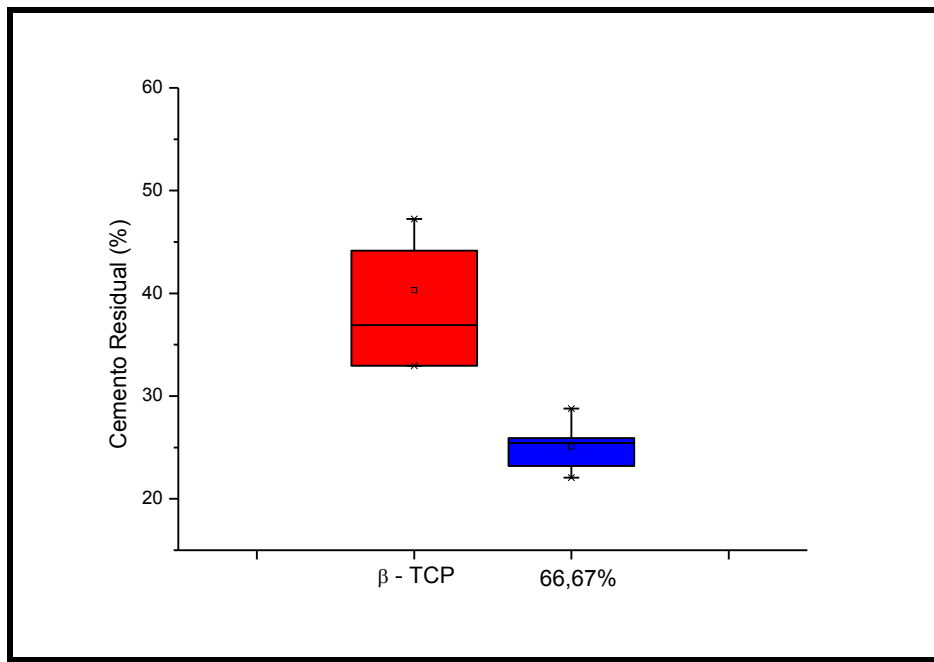


Figura 69. Porcentajes de cemento residual de los cementos del método B comparado con el cemento sin sustitución β -TCP.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Según, el análisis estadístico t- Student se encontraron que existen diferencias significativa entre los grupos ($p < 0,05$) de β -TCP y el cemento preparado con 66,67% de Mg-MCPM como se muestra en la tabla 28.

Tabla 28. Resultados del análisis estadístico t- Student ($p < 0,05$).

T - Statistic	DF	P<0.05
6,94	3	0,006

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Cementos preparados según el método C: 66,67% Mg-TCP + Mg-MCPM

❖ Evaluación Histológica:

Después de 8 semanas se puede observar neo-formación ósea rodeando los pocos gránulos remanentes de cemento que quedan (Figura 70). Al igual que los cementos de los métodos A y B se ha desarrollado un enlace directo con el tejido óseo circundante al defecto óseo, con ausencia de tejido fibroso entre ellos y sin presencia de signos inflamatorios. También se puede observar la formación de puentes óseos.



Figura 70. Corte histológico del cemento preparado con 66,67% MgTCP + 6,67% MCPM tras 8 semanas. Se puede observar los gránulos del cemento (marrón) rodeado por la neoformación ósea (2x)

Al analizar los cortes histológicos a mayor aumento, se observa el contacto directo entre el hueso neoformado y el cemento remanente como puede apreciarse en las figuras 71, 72 y 73.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

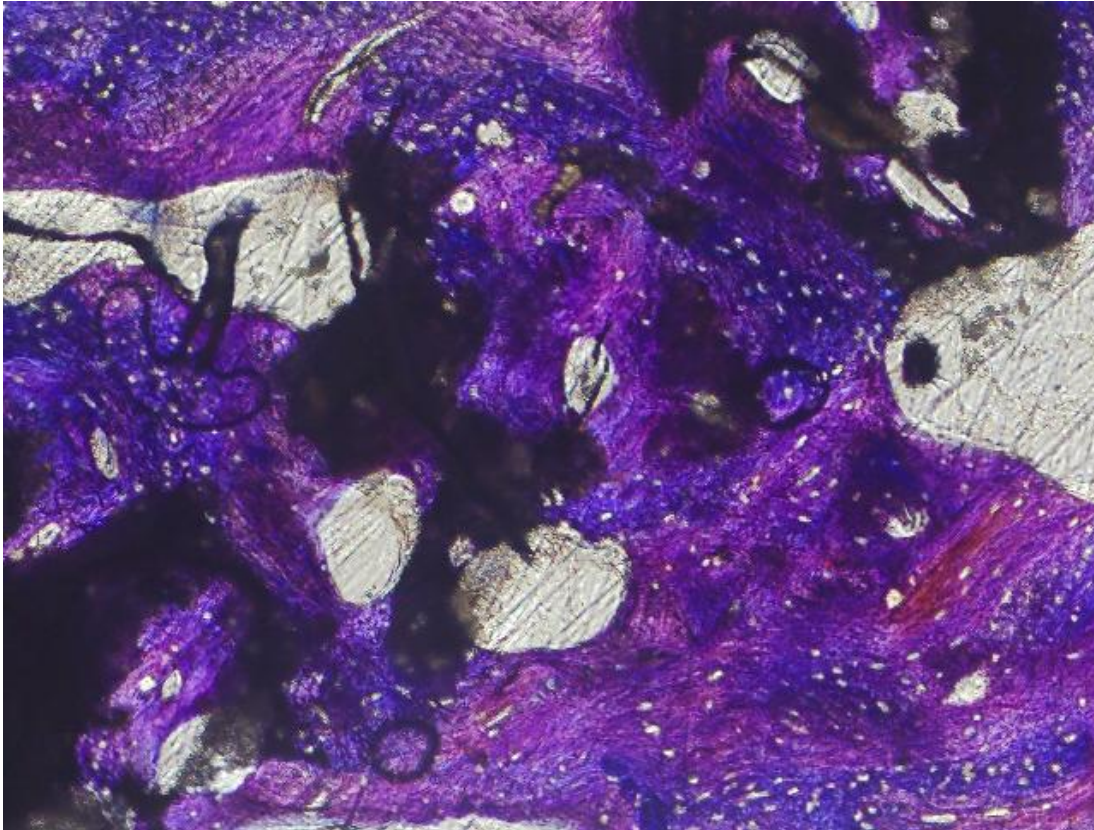


Figura 71. Neoformación ósea rodeando los gránulos de cemento (10x)

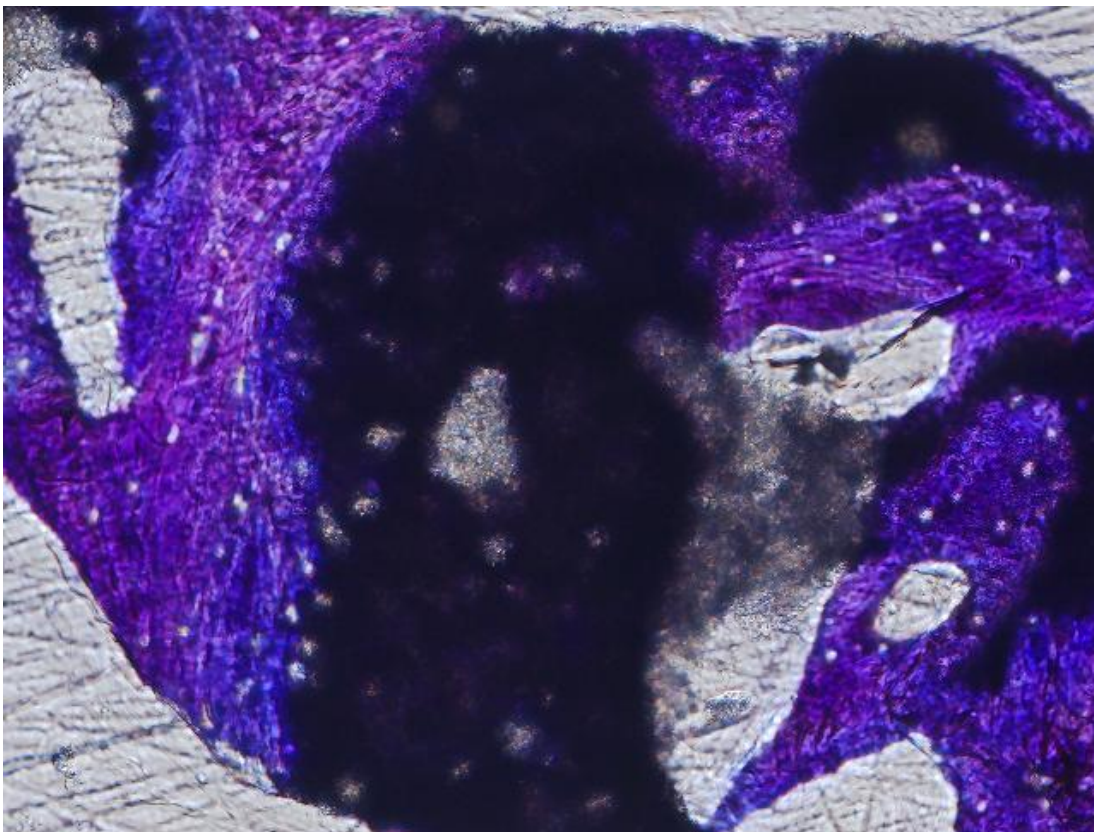


Figura 72. Contacto directo entre los gránulos y la neoformación ósea (10x)

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

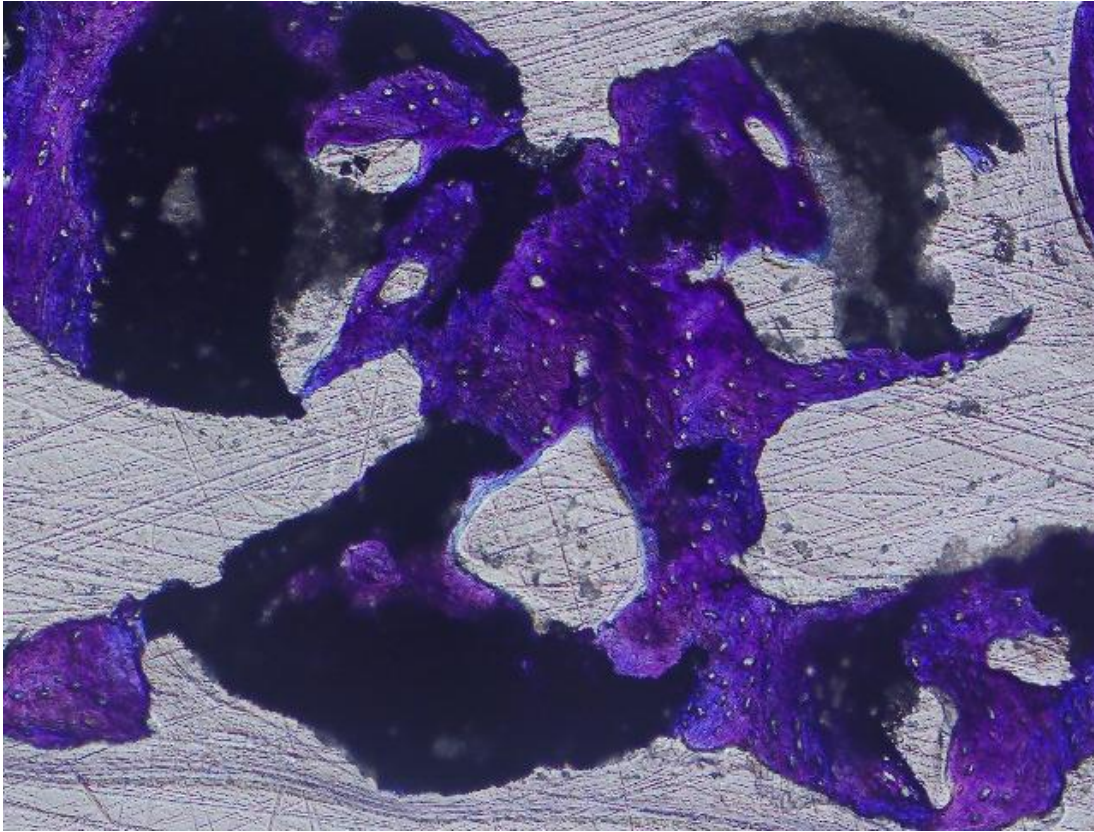


Figura 73. En este cemento se observó menos gránulos remanentes (10x)

❖ Evaluación histomorfométrica:

Según la evaluación histomorfométrica, la incorporación de iones de magnesio al los cementos de fosfatos cálcicos en el β -TCP y en el MCPM promueve similar neoformación ósea que el cemento sin sustitución a excepción del cemento preparado con 66,67% Mg-TCP + 6,67% Mg-MCPM que promueve mayor neoformación ósea, siendo de 24,94 % \pm 2,18 (Figura 74).

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

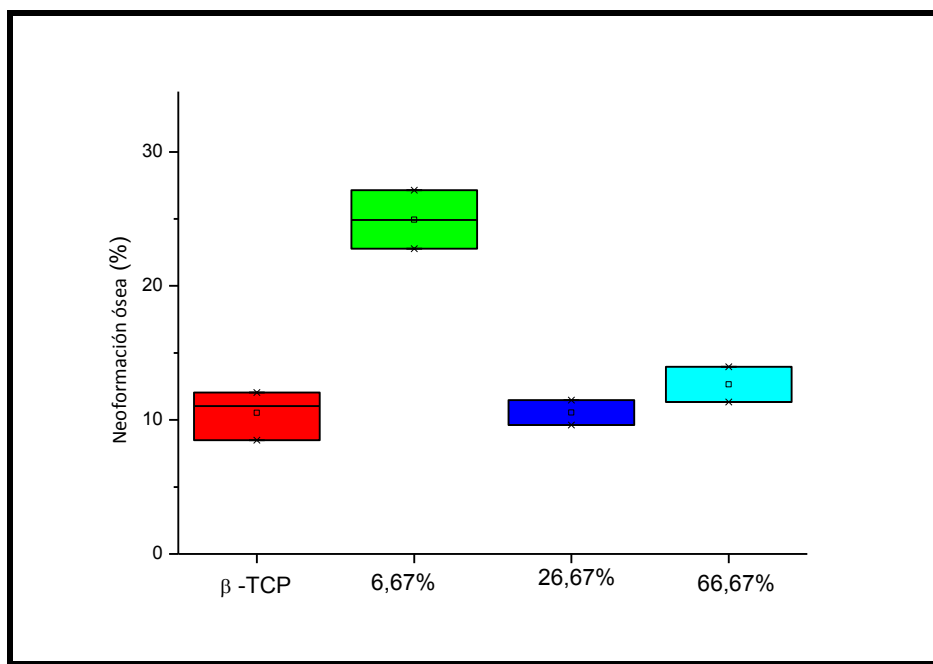


Figura 74. Porcentajes de la neoformación ósea de los cementos del método C comparados con el β -TCP

Según, el análisis estadístico (ANOVA una vía) se encontraron que existen diferencias significativa entre los grupos ($p < 0,05$) como se muestra en la tabla 29. El cemento preparado con 66,67% Mg-TCP + 6,67% Mg-MCPM fue significativamente mejor que los cemento preparado con β -TCP, 26,67%Mg-MCPM y 66,67%Mg-MCPM como podemos observar en la tabla 30.

Tabla 29. Resultados del análisis estadístico ANOVA una vía ($p < 0,05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P<0.05
Inter-grupos	406,43064	3	135,47688	37,86544	2,70966E-4
Intra-grupos	21,4671	6	3,57785		
Total	427,89774	9			

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Tabla 30. Método de Tukey, las diferencias entre los distintos cementos.

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
6,67%Mg-TCP - β -TCP	14,42155	SI
26,67%Mg-TCP - β -TCP	0,03296	NO
26,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	-14,38859	SI
66,67%Mg-TCP - β -TCP	2,13976	NO
66,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	-12,28179	SI
66,67%Mg-TCP - 26,67%Mg-TCP	2,1068	NO

Por otro lado, esta formulación de cemento presenta una mayor reabsorción que los cementos sin sustitución, presentando un porcentaje de reabsorción similar a los cementos preparados según el método B, como puede observarse en la figura 75.

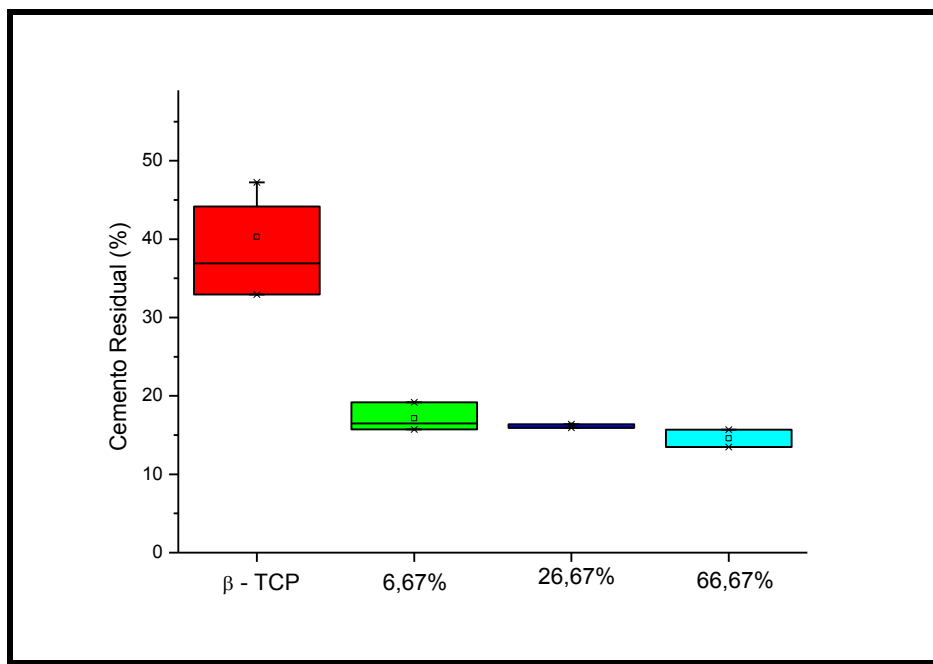


Figura 75. Porcentaje de cemento residual de los cementos preparados según el método C comparados con el β -TCP.

6.7. Resultados de Estudio *In Vivo*

Según, el análisis estadístico (ANOVA una vía) se encontraron que existen diferencias significativa entre los grupos ($p < 0,05$) como se muestra en la tabla 31. Todos los cementos preparados según el método C (6,67% Mg-MCPM, 26,67% Mg-MCPM y 66,67% Mg-MCPM) presentan una reabsorción mayor que el cemento sin sustitución de magnesio. Encontrándose diferencias significativas entre todos los cementos que contienen magnesio y el control, como puede observarse en la tabla 32.

Tabla 31. Resultados del análisis estadístico ANOVA una vía ($p < 0,05$).

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P<0.05
Inter-grupos	1497,36	3	499,12	25,34	3,91967E-4
Intra-grupos	137,91	7	19,70		
Total	1635,26	10			

Tabla 32. Diferencias entre los distintos cementos.

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
6,67%Mg-TCP - β -TCP	-23,18982	SI
26,67%Mg-TCP - β -TCP	-24,14792	SI
26,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	-0,9581	NO
66,67%Mg-TCP - β -TCP	-25,73498	SI
66,67%Mg-TCP - 6,67%Mg-TCP	-2,54516	NO
66,67%Mg-TCP - 26,67%Mg-TCP	-1,58705	NO

6.8. DISCUSIÓN DE ESTUDIO *IN VIVO*

6.8. Discusión de Estudio *In Vivo*

Como ya hemos mencionado aquí, la utilización de autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos es una posible solución a los problemas relacionados con la sustitución de tejido óseo. A pesar de que el uso de este tipo de injertos ha tenido resultados satisfactorios en algunos casos, éstos presentan ciertas limitaciones como la disponibilidad de material (hueso), problemas de tipo anatómico y el riesgo de transmisión de enfermedades entre otras. Debido a las numerosas restricciones que este tipo de injertos biológicos presenta, el desarrollo de materiales sintéticos y su utilización en ingeniería de tejidos se ha convertido en una de las opciones con más futuro. Este tipo de substitutos sintéticos deben ser creados especialmente para estimular la regeneración ósea y servir de soporte al tejido neo-formado.

El interés en estudiar materiales capaces de sustituir el tejido óseo ha aumentado en las profesiones que componen el área de la salud ^[219], principalmente en la odontología, donde la aparición de tratamientos reconstructivos como los implantes osteointegrados y una mayor concienciación de la importancia de la reconstrucción ósea en los pacientes sometidos a procedimientos mutiladores, ha llevado la necesidad de reponer tejido óseo perdido con mayor frecuencia que anteriormente ^[220]. En estas últimas décadas, los cementos basados en fosfatos de calcio han mostrado buenos resultados experimentales ^[221, 222, 223], por lo que ya se han reportado positivas experiencias clínicas preliminares ^[224, 225, 226].

El conejo fue elegido como animal de experimentación para este estudio *in vivo* porque según Frame ^[227] presenta una región adecuada con hueso cortical y esponjoso que permite la preparación de cavidades óseas de tamaño suficiente. Además, la calota craneal de los conejos es una excelente región para realizar estudios de substitutos óseos que serán utilizados en los maxilares, debido a la semejanza que existe entre los huesos craneales de los conejos y los maxilares de los humanos. Embriológicamente tienen el mismo origen, intramembranoso, morfológicamente, se encuentran formados por dos corticales separadas por hueso medular y fisiológicamente presentan el mismo patrón de reparación. Además, el conejo como animal de experimentación nos resulta adecuado porque el proceso de formación y remodelado óseo es tres veces más rápido que en los humanos ^[228]. A este periodo de remodelado óseo se denomina Sigma. En humanos el periodo sigma se presenta entre 6 y 9 meses, mientras que el periodo sigma del conejo

6.8. Discusión de Estudio *In Vivo*

es de 6 semanas ^[229, 230, 231]. Nosotros hemos seleccionado 8 semanas para este estudio, porque en este tiempo se produce la neo-formación y remodelado óseo en los conejos ^[232, 233]. En estudios de cuatro semanas o menos sólo es posible valorar la biocompatibilidad de los materiales y tiempos de estabulación mayores de doce semanas no aportan información distinta a la obtenida en 8 semanas ^[234,235]. Además, los conejos son animales empleados para experimentación por ser baratos, accesibles, fáciles de manejar y anestésiar.

Se ha determinado que el defecto óseo usado para experimentar materiales que promuevan la regeneración ósea ^[236, 237] no debe ser menor que el defecto de tamaño crítico. El tamaño del defecto crítico en calota de conejo es controvertido, mientras algunos autores consideran este tamaño de 15 mm ^[238], otros autores consideran el tamaño crítico entre 9 y 10 mm ^[239, 240, 241]. Nuestros resultados demuestran que después de 8 semanas la reparación ósea espontánea no fue suficiente para promover la regeneración ósea completa en las cavidades de 10 mm sin ningún material incorporado. Esto confirma los resultados de diversos autores que concuerdan que si el defecto no recibe un tratamiento específico, sino que se permite la regeneración espontánea éste no tendrá una completa reparación ósea ^[242, 243]. Con esto, la reparación ósea encontrada en las cavidades experimentales de este trabajo puede ser relacionada al relleno de las cavidades con los Cementos de Fosfatos Cálcidos fabricados en nuestro laboratorio.

De forma general, observamos a través del análisis histológico, que los materiales utilizados influenciaron positivamente en la neo-formación ósea de los defectos mejorándola en calidad y cantidad, cuando fueron comparadas con el grupo control (β -TCP). En todos los grupos experimentales la osteoconducción fue la vía responsable para la reparación.

Hemos determinado la presencia de continuidad histológica entre el cemento y el tejido óseo receptor, sin interfaz de tejido fibroso. El mecanismo de osteointegración de los cementos de fosfatos cálcicos denominado osteotransducción, es una particularidad de este grupo de materiales. En este caso el material implantado participa directamente en el proceso de sustitución ósea, siendo degradado activamente por los osteoclastos, mientras paralelamente se desarrolla la neoformación ósea ^[244, 245, 246, 247].

6.8. Discusión de Estudio *In Vivo*

También, encontramos la presencia de neoformación ósea progresiva, con la degradación de los gránulos de cemento, de tal manera que a las 8 semanas es posible encontrar cemento remanente rodeado por tejido óseo en remodelación. La remodelación que experimenta el hueso neoformado luego de la implantación del cemento de fosfato de calcio, está correlacionada con los ciclos de reabsorción y aposición ósea que caracterizan al hueso normal. Esto implica la existencia de una interfaz dinámica, denominada de coalescencia, donde se relacionan directamente los cristales de síntesis del material implantado con los cristales apatíticos biológicos que se van depositando en la matriz ósea ^[248, 249]. Estos resultados también son publicados por otros autores, como Wei y col ^[250] que realizaron estudios con fosfatos de magnesio porosos (78%) en defectos óseos femorales de conejos y determinaron que después de 2 meses de la implantación se observó tejido óseo neoformado seguido paralelamente por la degradación del material.

No hemos detectado manifestaciones inflamatorias ni complicaciones de infecciones postquirúrgicas en ningún conejo. Estos datos son semejantes a los resultados presentados por Yu y col ^[251] que estudiaron un cemento de fosfato magnésico como cemento adhesivo biodegradable para la consolidación de fracturas. Este estudio sugiere que el cemento de fosfato cálcico/magnesio es seguro para su aplicación y puede tener potenciales aplicaciones en la fijación de fracturas fisiológicas.

La medición histomorfométrica es de gran importancia, ya que es un indicador de la velocidad de reabsorción de los biomateriales. Corresponde al área que ocupan los restos de los cementos óseos implantados que permanecen sin ser degradados ^[252]. En este trabajo de investigación hemos encontrado una mayor reabsorción de los cementos de fosfatos de calcio-magnesio, esto indica que la adición de magnesio a los cementos de fosfatos cálcicos acelera la degradación de estos materiales. Similares resultados son publicados por Zeng y col ^[253] en donde estudiaron cementos de fosfatos de calcio-magnesio comparados con cementos de fosfatos cálcicos utilizados en elevaciones de senos maxilares, en este estudio también encontraron mayor neoformación ósea cuando se implantaron los cementos de fosfato de calcio-magnesio.

6.8. Discusión de Estudio *In Vivo*

El análisis histomorfométrico también es capaz de cuantificar la neoformación ósea. El análisis estadístico de las medidas histomorfométricas en relación al volumen de hueso neoformado en el interior de los defectos, reveló, a través del test de Tukey a un 5% de probabilidad, que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales cemento de los métodos A y C y el grupo control (β -TCP). Esto demuestra la importancia del relleno de los defectos con algún tipo sustituto para una reparación ósea con mayor cantidad y mejor calidad. Los cementos C presentan una neoformación ósea similar a los cementos sin sustitución.

En el ensayo *in vitro* con células osteoblasticas desarrollado en las páginas 117-131 observamos claramente que los cementos con magnesio promueven más la proliferación de estas células óseas, estos resultados se ve reflejado en el ensayo *in vivo* por la mayor neoformación ósea. Estos resultados son debido a la presencia de iones de magnesio. Los iones Mg^{2+} fueron descritos por mejorar la proliferación y diferenciación de células derivada de células óseas y por causar altos niveles de expresión en los receptores de integrina [254, 255, 256]. Además, observamos que estos cementos con magnesio presentan mayor reabsorción que los cementos sin sustitución, estos resultados también son debidos a la presencia de los iones de magnesio, porque en la literatura encontramos que este ion aumenta la actividad de reabsorción de los osteoclastos [257].

De los resultados obtenidos, concluimos que la propiedad biológica de estos cementos es su capacidad para establecer un enlace directo entre el biomaterial y el hueso, hecho que posibilita el proceso de regeneración ósea al ser empleados como sustitutos óseos. Esto se explica por la composición química de estos materiales que presentan una importante similitud con la fracción mineral del hueso y la adicción de magnesio que juega un papel importante.

Respecto de la aplicación clínica de estos biomateriales, las cerámicas de fosfatos de calcio formuladas como cementos óseos con magnesio parecen cumplir los requisitos para su próximo empleo médico rutinario, debido a que sus variadas propiedades y su versatilidad se ajustan a muchos de los requerimientos específicos de la cirugía en lo relativo a la sustitución ósea. Teniendo en consideración la ventaja que

6.8. Discusión de Estudio *In Vivo*

representa su similitud química con el hueso, hecho que permite esperar su eventual incorporación futura al arsenal biomédico disponible para la osteosustitución [258, 259].

Por lo tanto, podemos concluir que los cementos de fosfatos cálcicos con fosfatos de magnesio que utilizamos en este estudio promueven como hemos demostrado un mayor porcentaje de neo-formación ósea que los cementos sin fosfatos de magnesio. Además nos ha permitido comprobar las propiedades biológicas de los cementos de fosfatos de calcio, como materiales osteoconductivos, osteotransductivos, reabsorbibles, degradables, biocompatibles y osteointegrables.

7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones

- ❖ Hemos sintetizado y caracterizado nuevos cementos de fosfatos cálcicos en los que se han incorporado iones magnesio. Se demuestra que los nuevos cementos están formados por fosfato cálcico (brushita) y fosfato de magnesio (newberyite) y su proporción se puede controlar a través de la cantidad de magnesio que se utiliza en la síntesis.
- ❖ Los experimentos *in vitro* con las células osteoblásticas MG-63 han mostrado una fuerte influencia en la proliferación celular, la incorporación de iones magnesio en los cementos de fosfatos cálcicos. En los tres tipos de cementos fabricados, la proliferación celular fue mayor que en los cementos de fosfato de calcio sin incorporación de magnesio.
- ❖ Los cementos de fosfatos de calcio y magnesio han demostrado ser buenos portadores de vancomicina y pueden ser utilizados como vehículos para la liberación controlada de medicamentos, en aplicaciones preventivas o terapéuticas gracias a su actividad antimicrobiana.
- ❖ El uso de cementos de fosfatos cálcicos y fosfato de magnesio (método A y C) mejoran el proceso de regeneración ósea cuando se compara con los cementos de fosfato cálcico sin magnesio, observándose diferencias significativas. El cemento preparado según el método B presentó una regeneración ósea similar al cementos de fosfatos cálcicos sin megnesio.

8. Bibliografía

8. BIBLIOGRAFIA

8. Bibliografía

1. Singer AJ, Thode HC Jr. A review of the literature on octylcyanoacrylate tissue adhesive. *Am J Surg*. 2004;187(2):238–248.
2. Instituto Nacional de Estadística [Internet]. Madrid:2010 [Consulta el 9 de enero de 2010]. Disponible a <http://www.ine.es>.
3. Infante P, Gutierrez J, Torres D, Garcia A, Gonzales J. Bone cavity augmentation in maxilofacial surgery using autologous material. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2007;29,1:7-19.
4. LeGeros RZ, Chohayed A, Shulman A. Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials. *J Dental res* 1982;61:343.
5. Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate setting cement. *J Dental Res* 1983;62:672.
6. LeGeros RZ, Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphate. *Clin Orthop Relat Res* 2002;395:81-98.
7. Grover L, Gbureck U, Wright A, Barralet J. Cement formulations in the calcium phosphate H₂O-H₃PO₄-H₄P₂O₇. *J AM Ceram Soc* 2005;88(11):3096-3103.
8. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinsky K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, Matter S, Auer J, von Rechenberd B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004;25:1439-1451.
9. Bohner M, Theiss F, Apelt D, Hirsiger W, Houriet R, Rizzoli G, Gnos E, Frei C, Auer JA. von Rechenberg B. Compositional changes of a dicalcium phosphate dehydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 2003;24:3463-3474.
10. Alkhraisat HM, Tamimi Mariño F, Rueda C, Blanco Jerez L, López Cabarcos E. Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cements. *Acta Biomater*. 2008;4(3):664-670.
11. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Ripamonti A. Roveri N, Romanello M, Noris K, Moro L. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *J Inorg. Biochem* 1997;68:45-51.
12. Bertinetti L, Drouet C, Combes C, Rey C, Tampieri A, Coluccia S, Martra G. Surface characteristics of nanocrystalline apatites: effect of Mg surface enrichment on morphology, surface hydration species, and cationic environments. *Langmuir*. 2009;25(10):5647-5654.

8. Bibliografía

13. Julien M, Khairoun I, LeGeros RZ, Delplace S, Pilet P, Weiss P, Daculsi G, Bouler JM, Guicheux J. Physico-chemical-mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. *Biomaterials* 2007;28:956-965
14. Zofkova I, Kancheva RL. The relationship between magnesium and calciotropic hormones. *Magnesium Res* 1995;8:77-84.
15. Staats WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Sontoro SA. The membrana glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol* 1989;108:1917-1924.
16. Howlett CR, Evans MD, Wildish KL, Kelly JC, Fisher LR, Francis GW, Best DJ. The effect of ion implantation on cellular adhesion. *Clin Mater.* 1993;14(1):57-64.
17. Zreiqat H, Evans P, Howlett C. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *J Biomed Mater Res* 1999;44:389-396.
18. Zreiqat H, Howlett C, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002;62:175-184.
19. Ramaswamy Y, Haynes DR, Berger G, Gildenhaar R, Lucas H, Holding C, Zreiqat H. Bioceramics composition modulate resorption of human osteoclasts. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:1199-1205.
20. Tucker K, Kiel DP, Hannan MT, Felson DT. Magnesium intake is associated with bone mineral density in elderly woman. *J Bone Miner Res* 1995;10:S466.
21. Al-Ghamdi SMG, Cameron EC, Sutton RAL. Magnesium deficiency: pathophysiology and clinical overview. *Am J Kid Dis* 1994;24:737.
22. Holt C, van Kemenade MJJM, Harries JE, Nelson LS, Bailey RT, Hukins DWL, Hasnaian SS, De Bruyn PL. Preparation of amorphous calcium-magnesium phosphates at pH 7 and characterization by x-ray absorption and fourier transform infrared spectroscopy. *J Cryst Growth* 1988;92:239-252.
23. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev* 2008;108:4628-4669.

8. Bibliografía

24. Enderle R, Götz-Neunhoeffler F, Göbbles M, Müller FA, Greil P. Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of β -TCP ceramics examined by Rietveld refinement. *Biomaterials* 2005;26:3379-3384.
25. Li X, Ito A, Sogo Y, Wang X, LeGeros RZ. Solubility of Mg-containing β -tricalcium phosphate at 25 °C. *Acta Biomater* 2009;5:508-517.
26. Landi E, Logroscino G, Proietti L, Tampieri A, Sandri M, Sprio S. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:239-247.
27. Baron R. General Principles of bone biology. En: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 5ª ed. Washington. American society for bone and mineral research; 2003. 1-8.
28. Mendoza Patiño N. *Farmacología médica*. 1ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2008.
29. Eriksen EF, Vesterby A, Kassem M, Melsen R, Mosekilde L. Bone remodeling and bone structure. In Mundy GR, Martin TJ Eds. *Physiology and Pharmacology of Bone*. Berlin Springer-Verlag.1993;67-109.
30. González MJ, Olmos MJ. Introducción: fisiopatología del remodelado óseo. En: Nogués SJ. *Formadores de hueso*. 1ª ed. Barcelona. Doyma;2005. 13-25.
31. Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473:183–187.
32. Masi L, Brandi ML. Physiopathological basis of bone turnover. *Q J Nucl Med* 2001; 45: 2-6.
33. Harada, S. and Rodan, G. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423:349-355.
34. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.
35. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994; 55: 287-299.
36. Noble SB and Reeve J. Osteocyte function. Osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159: 7-13.

8. Bibliografía

37. Bonewald FL. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-238.
38. Boyle JW, Scott SW, Lacey LD. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-342.
39. Roodman DG. Osteoclast Differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991; 2(2):389-409.
40. Duong LT, Rodan AG. Regulation of osteoclast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2:95-104.
41. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-342.
42. Marini FH. *Fundamentals of Anatomy and Physiology.* 4^a ed. New Jersey: Prentice Hall College. 1998.
43. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología Básica.* 4^a ed. Barcelona: Masson; 1996.
44. Becerra J, Andrades JA, Santamaría JA, Cifuentes M, Guerado E. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin* 2001;116:23-34.
45. Gehron RP, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 483-487.
46. Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res* 1997; 48: 50-59.
47. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E151-157
48. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E47-51.
49. Yamashita H, Ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K. Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 1996;6:569-574.

8. Bibliografía

50. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355: 66-72.
51. Campisi P, Hamdy R, Lauzier D, Amako M, Rauch F, Lessard ML. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2003;1:201-208.
52. Fisher M, Meyer C, Garber G, Dealy C. Role of IGFBP2, IGF-I and IGF-II in regulating long bone growth. *Bone* 2005;37:741-750.
53. Linkhart T, Mohan S, Baylink D. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF β and BMP. *Bone* 1996;1:1S-12S.
54. Horner A, Bord S, Kemp P, Grainger D, Compston JE. Distribution of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) α chain mRNA, protein, and PDGF- α receptor in rapidly forming human bone. *Bone* 1996;4:353-362.
55. Guerado E, Díaz-Martín A, Arrabal MP, Cifuentes M, Andrades JA, Becerra J. Celulas madre e ingeniería tisular ósea. Bases celulares y perspectivas terapéuticas. *Rev Ortop Traumatol* 2003;47:362-374.
56. Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential for Engineering Bone. *Eur Cell Mater* 2008;2:100-114.
57. Marks SC, Hermey DC (1996) The Structure and Development of Bone. In: Principles of Bone Biology. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). Academic Press, SanDiego. pp. 3-24.
58. Garzón D, Roa M, Cortés C. En: Análisis por elementos finitos del proceso de regeneración ósea. 1ª ed. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2004.
59. Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10: 223-228.
60. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, Bouillon R, Carmeliet G. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 2002;111: 61-73.
61. Yang X, Karsenty G. Transcription Factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* 2002;7:340-345.
62. Kierszenbaun A. *Histología y Biología Celular*. 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2008.

8. Bibliografía

63. Compston JE. Sex Steroids and Bone. *Phys Rev* 2001;1:420-447.
64. Olmos M, Gonzáles M. Envejecimiento músculo-esquelético. En: Crespo D. Biogerontología. 1ª ed. Cantabria: Gráficas Calima;2006. P. 319-359.
65. Anitua E. Un enfoque biológico de la implantología. 1ª ed. Vitoria: Team Work; 2009.
66. Trueta J. The role of blood vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br* 1963; 45: 402.
67. Ross M, Pawlina W. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
68. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone Graft Mateirlas and Synthetic substitutes. *Radiol Clin N Am* 2006;44:451-461.
69. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM. Bone-graft substitutes: facts, fictions and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:98-103.
70. Zárate-Kalfópulos B, Reyes-Sánchez A. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Cirj* 2006;74:217-222.
71. Constantino PD, Freidman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am* 1997;27:1037-1073.
72. Whang PG, Wang JC. Bone graft substitutes for spinal fusión. *Spine J* 2003;3:155-165.
73. Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992;7(3):360-6.
74. Misch CM. Use of the mandibular ramus as a donor site for onlay bone grafting. *J Oral Implantol*. 2000;26(1):42-49.
75. Iizuka T, Smolka W, Hallermann W, Mericske-Stern R. Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous calvarial split bone grafts for dental rehabilitation. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(5):607-615
76. Dattilo DJ, Misch CM, Arena S. Interface analysis of hydroxyapatite-coated implants in a human vascularized iliac bone graft. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(4):405-409.

8. Bibliografía

77. Stevenson S. Biology of bone graft. *Orthop Clin North Am* 1999;30:543-552.
78. Estrada C, Paz AC, López LE. Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. *Revista de la EIA* 2003;5: 93-100.
79. Betts N, Fonseca R. Allogenic grafting of dentoalveolar clefts. *Oral Maxillofac Clinic North* 1991;3(3): 122.
80. Segur J, Suso S, García S, Combalía A, Ramón R. Bone allograft contamination in multiorgan and tissue donors. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998;118:156-158.
81. Berrey B, Lord C, Gebhardt M, Mankin H. Fractures in allografts. Frequency, treatment and end-results. *J Bone Joint Surg* 1990;72: 825-839.
82. Scarano A, Barros RR, Lezzi G, Piattelli A, Novaes AB Jr. Acellular dermal matrix graft for gingival augmentation: a preliminary clinical, histologic, and ultrastructural evaluation. *J Periodontol.* 2009; 80: 253-259.
83. Gapski R, Parks CA, Wang HL. Acellular dermal matrix for mucogingival surgery: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2005; 76: 1814-1822.
84. Kim YK, Kim SG, Lim SC, Lee HJ, Yun PY. A clinical study on bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(6):e6-e11.
85. Kim D, Camelo M, Schupbach P, Guzon U. Eficacia de la matriz ósea desmineralizada y partículas de hueso esponjoso para el aumento del seno maxilar. *Rev Int Odontol Restaur Period* 2009;13:406.415.
86. Finkemeier CG. Bone-Grafting and Bone-Graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:454-464.
87. Gholami GA, Najafi B, Mashhadiabbas F, Goetz W, Najafi S. Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: a randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Aug 18. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02288.
88. Ohayon L. Ridge enlargement using deproteinized bovine bone and a bioresorbable collagen membrane: a tomodensitometric, histologic, and histomorphometric analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011 Jun;31(3):237-45.
89. Navarro V. *Cirugía Oral*. 1ª ed. Madrid: Aran Ediciones; 2008.

8. Bibliografía

90. Delloye C, Cnockaert N, Cornu O. Bone Substitutes in 2003: An Overview. *Acta Orthop Belg* 2003;69(1):1-8.
91. Planell E, Gil M, Ginebra M. Biomateriales. En: Viladot V. Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor. 1ª ed. Barcelona: Springer-Verlag Iberica: 2000. p. 291-304.
92. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295:1014-1017.
93. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
94. Huebsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009;462:426-432.
95. Rodrigues J, Allais M, Edward P, Albergaria J. Estudio comparativo del uso de la matriz ósea desmineralizada de origen humana y de la poliuretana derivada del aceite de mamona sobre el proceso de regeneración ósea. Estudio histométrico en calota de conejo. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2007;29(4):250-259.
96. Brown T, LeMay E, Bursten B, Burdge J. Materiales modernos. En: Química: la ciencia central. 9ª ed. Mexico: Pearsoneducación; 2004. p. 450-483.
97. Diaz A. Metodología para el desarrollo de dispositivos médicos basados en el empleo de polímeros activos como sensores y actuadores. Madrid. Universidad Politécnica de Madrid. 2009.
98. Cordero A. Biomateriales. En: Ferrández P. Actualizaciones en Cirugía Ortopédica y traumatología. Barcelona. Masson;2003.3-16.
99. Dunstan E, Landon D, Whittingham-Jones P, Carrington R, Briggs T. Chromosomal aberrations in the peripheral blood of patients with metal-on-metal hip bearings. *J Bone Joint Surg Am* 2008;3:517-522.
100. Pandit H, Glyn-Jones S, McLardy-Smith P, Gundle R, Whitwell D, Gibbons C, Ostlere S, Athanasou N, Gil H, Murray D. Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;7:847-851.
101. Malviya A, Holland J. Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacing: 10-year Newcastle experience. *Acta Orthop Belg*. 2009;4:477-483.

8. Bibliografía

102. Bohner M, Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials*. 2005;26:1553-1563.
103. Bermúdez O: Formulación y propiedades mecánicas de cementos óseos a base de fosfatos de calcio. Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona. 1994.
104. Fernández E: Obtención y caracterización de nuevos cementos óseos de fosfatos de calcio en el sistema $\text{CaHPO}_4\text{-}\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona. 1996.
105. Ginebra MP: Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico- α para aplicaciones quirúrgicas. Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona. 1997.
106. Khairoun I: Optimization of the properties of calcium phosphate based cements. Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona. 1998.
107. Kenny SM, Buggy M: Bone cements and fillers: a review. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14: 923-938.
108. Ginebra MP, Fernández E, Boltong MG, Bermúdez O, Planell JA, Driessens FCM: Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clin Mat* 1994; 17: 99-104.
109. Driessens FCM, Boltong MG, Planell JA, Bermúdez O, Ginebra MP, Fernández E: A new apatitic calcium phosphate bone cement: preliminary results. *Bioceramics* 1993; 6: 469-473
110. Callister WD. Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. 1ª ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2002.
111. Tsapis N, Bennett D, Jackson B, Weitz DA, Edwards DA. Trojan particles: large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2002;99: 12001–12005.
112. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677–689.

8. Bibliografía

113. Wester PO. Magnesium. *Am J Clin Nutr* 1987;45:1305-1312.
114. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium: an update on physiological, clinical, and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta* 2000;294:1-26.
115. Seelig M. S. Mg deficiency in the pathogenesis of the disease: Early roots of cardiovascular, skeletal and renal abnormalities. Plenum Press New York, (1980): 488.
116. Aranda P, Planelis E, Llopis J. Magnesio. *Ars Pharmaceutica*. 2000; 41(1):91-100.
117. New SA, Bolton-Smith C, Grubb DA, Reid DM. Nutritional influences on bone mineral density: A cross-sectional study in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1831–1839.
118. Elisaf M, Milionis H, Siamopoulos K. Hypomagnesemic hypokalemia and hypocalcemia: Clinical and laboratory characteristics. *Mineral Electrolyte Metab* 1997;23:105-112.
119. Kawata T, Nagano N. The calcium receptor and magnesium metabolism. *Clin Calcium* 2005;15:43-50.
120. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A. Immunolocalization of RANKL is increased and OPG decreased during dietary magnesium deficiency in rat. *Nutr Metab* 2005;14:24-32
121. Ryder K, Shorr R, Bush A, Kritchevsky S, Harris T, Stone K, Cauley J, Tylavzky F. Magnesium intake from food and supplements is associated with bone mineral density in healthy older white subjects. *J Am Geriatr Soc* 2005;53(11):1875-1880.
122. Favus M, Bushinsky D, Lemann J. Regulation of calcium, magnesium, and phosphate metabolism. En: Favus MJ. *Primer on the metabolism bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 1ª ed. Washington DC. ASBMR; 2006. 76-83.
123. Schwartz R, Reddi AH. Influence of magnesium depletion on matrix-induced endochondral bone formation. *Calcif Tissue Int* 1979;29:15-20.

8. Bibliografía

124. Kim SR, Lee JH, Kim YT, Riu DH, Jung SJ, Lee YJ, Chung SC, Kim YH. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials* 2003;24(8):1389–1398.
125. Mayer I, Schlam R, Featherstone JD. Magnesium-containing carbonate apatites. *J Inorg Biochem.* 1997;66(1):1-6.
126. Ergun C, Webster TJ, Bizios R, Doremus RH. Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. I. Structure and microstructure. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(2):305-311.
127. Creedon A, Flynn A, Cashman K. The effect of moderately and severely restricted dietary magnesium intakes on bone composition and bone metabolism in the rat. *Br J Nutr.* 1999;82(1):63-71.
128. Kannan S, Lemos IAF, Rocha JHG, Ferreira JMF. Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *J Solid State Chem.* 2005;178:3190–196.
129. Lagier R, Baud CA. Magnesium whitlockite, a calcium phosphate crystal of special interest in pathology. *Pathol Res Pract.* 2003;199(5):329-335.
130. Rude RK. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J Bone Miner Res* 1998;13(4):749-758..
131. Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Voegel JC, Boivin G. Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1998 15;42(4):626-633.
132. Howlett C, Zreiqat H, O'dell R, Noorman J, Evans P, Dalton B, Mcfarland C, Steele J. The effect of magnesium ion implantation into alumina upon the adhesion of human bone derived cells. *J Material Sci Mater Med* 1994;5:715-722.
133. Ryu HS, Hong KS, Lee JK, Kim DJ, Lee JH, Chang BS, Lee DH, Lee CK, Chung SS. Magnesia-doped HA/beta-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. *Biomaterials.* 2004;25(3):393-401.
134. Schendel SA, Peuroi J. Magnesium-based bone cement and bone void filler: preliminary experimental studies. *J Craniofac Surg.* 2009;20(2):461-464.
135. Jia J, Zhou H, Wei J, Jiang X, Hua H, Chen F, Wei S, Shin JW, Liu C. Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. *J R Soc Interface.* 2010;7(49):1171-1180.

8. Bibliografía

136. Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, Shin JW, Liu C. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(6):1260-1269
137. Zeng D, Xia L, Zhang W, Huang H, Wei B, Huang Q, Wei J, Liu C, Jiang X. Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone with calcium-magnesium phosphate cement and bone marrow stromal cells in rabbits. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(7-8):870-881.
138. Davil Ball. Estado Sólido: Cristales. En: David Ball, Físicoquímica. 1ª ed. Mexico DF: Thomson; 2005. p. 731-764.
139. M.P. Ginebra, E. Fernández, E.A. P. De Maeyer, R.M.H. Verbeeck, M.G. Boltong, J. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell. "Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement". *J Dent Res* 1997;76(4):905-912.
140. Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement Paste by Vicat Needle, ASTM C191-92, Annual Book of ASTM Standards, vol. 04.01: Cement, Lime, Gypsum. Philadelphia: ASTM;1993:158-160.
141. Van Brakel J, Modry S, Svata M. Mercury porosimetry: state of art. *Powder Technology*, 1981;29(1):1-12.
142. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938;60: 309-319.
143. Billiau A, Edy V, Hubertine Heremans, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades J, and De Somer P. Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;12(1): 11-15.
144. Otsuka M, Matsuda Y, Yu D, Wong J, Fox JL, Higuchi WI: A novel skeletal drug delivery system for anti-bacterial drugs using self-setting hydroxyapatite cement. *Chem Pharm Bull* 1990; 38: 3500-35002.
145. Obadia L, Amador G, Daculsi G, Bouler Jm. Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin. *Biomaterials*. 2003;24(7):1265-1270.
146. Alberius P, Klinge B, Isaksson S. Management of craniotomy in young rabbits. *Lab Anim* 1989;23:70-72.

8. Bibliografía

147. Lode A, Wolf-Brandstetter C, Reinstorf A, Bernhardt A, König U, Pompe W, Gelinsky M . Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity. *J Biomed Mater Res* 2007;81:474-483
148. Kamegai A, Shimamura N, Naitou K, Nagahara K, Kanematsu N, Mori M. Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite as a delivery system. *Biomed Mater Eng* 1994;4:291-307.
149. Erli HJ, Ruger M, Ragoss C. The effect of surface modification of a porous TiO₂/perlite composite on the ingrowth of bone tissue in vivo. *Biomaterials* 2006;27:1270-1276.
150. Kumta PN, Sfeir C, Lee DH, Olton D, Choi D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomater* 2005;1:65-83.
151. Barralet J, Gbureck U, Habibovic P, Vorndran E, Gerard C, Doillon CJ. Angiogenesis in Calcium Phosphate Scaffolds by Inorganic Copper Ion Release. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(17):1601-1609.
152. Alkhraisat MH, Moseke C, Blanco L, Barralet JE, Lopez-Carbacos E, Gbureck U. Strontium modified biocements with zero order release kinetics. *Biomaterials* 2008;29:4691-4697.
153. Donghyun L, Charles S, Kumba PN. Novel *in-situ* synthesis and characterization of nanostructured magnesium substituted β -tricalcium phosphate (β -TCMP). *Mater Sci Eng C* 2009;29:69-77.
154. Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proc Instn Mech Engrs [H]* 1998;212:427-435.
155. Brown WE and Chow LC. A new calcium phosphate water-setting cement, *Cements Research Progress*. Ed. by PW Brown. Am. Ceram. Soc., Westerville, Ohio, 1986:351-379.
156. Chow LC, Takagi S, Constantino PD and Friedman CD. Self-setting calcium phosphate cements. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 1991; 179: 3-24.
157. Doi Y, Takezawa Y, Shibata S, Wakamatsu N, Kamemizu H, Goto T, Iijima M, Moriwaki Y, Uno K, Kubo F and Haeuchi Y. Self-setting apatite cement, I. Physicochemical properties. *J. Japan. Soc. Dent. Mater. Devices* 1987;6: 53-58.

8. Bibliografía

158. Lilley KJ, Gbureck U, Knowles JC, Farrar DF, Barralet JE. Cement from magnesium substituted hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16(5):455-460.
159. Sivakumar GR, Kalkura SN, Ramasamy P. Effect of magnesium on the crystallization and the microhardness of dicalcium phosphate dihydrate. *Mater Chem Phys* 1999;57:238-243.
160. Driessens FCM, de Maeyer EAP, Fernández E, Boltong MG, Berger G, Verbeeck RMH, Ginebra MP, Planell JA. Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite. En: *Bioceramics Vol. 9.* Kokubo T, Nakamura T, Miyaji F, eds., Pergamon, Otsu, 1996.
161. Mirtchi A, Lemaitre J, Terao N. Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate – monocalcium phosphate system. *Biomaterials* 1989;10:475-480.
162. Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H, Liu C. Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomater* 2008;4:1873-1884.
163. Barron M, Franklin L, Woodall J Jr, Wingerter S, Benghuzzi H, Tucci M. Comparison of osteoconductive materials on MG63 osteoblast cell function. *Biomed Sci Instrum.* 2007;43:248-253.
164. Ohno M, Kimoto K, Toyoda T, Kawata K, Arakawa H. Fluoride-treated Bioresorbable Synthetic Hydroxyapatite Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblastic MG-63 Cells. *J Oral Implantol* 2011;22.
165. Shapira L, Halabi A. Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(1):50-55.
166. Bächle M and Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation and differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG-63 cells. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:683-692.
167. Nishimoto SK, Nishimoto M, Park SW, Lee KM, Kim HS, Koh JT, Ong JL, Liu Y, Yang Y. The effect of titanium surface roughening on protein adsorption, cell attachment, and cell spreading. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23(4):675-680.

8. Bibliografía

168. Qu WJ, Zhong DB, Wu PF, Wang JF, Han B. Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. *J Bone Miner Metab.* 2008;26:328–334.
169. Allen J, Liu Y, Kim YL, Liu Y, Kim YL, Turzhitsky VM, et al. Spectroscopic translation of cell-material interactions. *Biomaterials.* 2007;28:162–174.
170. Cai YL, Zhang S, Zeng XT, Wang YS, Qian M, Weng WJ. Improvement of bioactivity with magnesium and fluorine ions incorporated hydroxyapatite coatings via sol-gel deposition on Ti6Al4V alloys. *Thin Solid Films* 2009; 517(17):5347–5351.
171. Sun HL, Wu CT, Dai KR, Chang J, Tang TT. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials* 2006;27(33):5651–5657.
172. Dietrich E, Oudadesse H, Lucas-Girot A, Mami M. In vitro bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium. *J Biomed Mater Res A.* 2009;88:1087–1096.
173. Qi GC, Zhang S, Khor KA, Lye SW, Zeng XT, Weng WJ, Liu CM, Venkatraman SS, Ma LL. Osteoblastic cell response on magnesium-incorporated apatite coatings. *Appl Surf Sci.* 2008; 255:304–307.
174. Feyerabend F, Witte F, Kammal M, Willumeit R. Unphysiologically high magnesium concentrations support chondrocyte proliferation and redifferentiation. *Tissue Eng.* 2006;12:3545–3556.
175. Witte F, Feyerabend F, Maier P, Fischer J, Stormer M, Blawert C, et al. Biodegradable magnesium-hydroxyapatite metal matrix composites. *Biomaterials.* 2007;28:2163–174.
176. Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Kubo T, Akagawa Y, and Uchida T. Action of FGMgCO3Ap-collagen composite in promoting bone formation. *Biomaterials* 2003;24(27):4913-4920..
177. Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., and Bizios, R. Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res* 2002;59(2):312-317.
178. Lu J, Wei J, Yan Y, Li H, Jia J, Wei S, Guo H, Xiao T, Liu C. Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with

8. Bibliografía

- degradability for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(3):607-615.
179. Bigi A, Bracci B, Cuisinier F, Elkaim R, Fini M, Mayer I, Mihailescu IN, Socol G, Sturba L, Torricelli P. Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials.* 2005;26:2381–2389.
180. Bracci B, Torricelli P, Panzavolta S, Boanini E, Giardino R, Bigi A. Effect of Mg(2+), Sr(2+), and Mn(2+) on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *J Inorg Biochem.* 2009 Dec;103(12):1666-1674.
181. Trimbach DC, Keller B, Bhat R, Zankovych S, Pohlmann R, Schroter S, Bossert J, Jandt KD. Enhanced osteoblast adhesion to epoxidefunctionalized surfaces. *Adv Funct Mater.* 2008;18:1723-1731.
182. Lee JY, Kang BS, Hicks B, Chancellor TF, Chu BH, Wang HT, et al. The control of cell adhesion and viability by zinc oxide nanorods. *Biomaterials.* 2008;29:3743–3749.
183. Ruhé PQ, Kroese-Deutman HC, Wolke JG, Spauwen PH, Jansen JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials.* 2004;25(11):2123-2132.
184. Ruhé PQ, Boerman OC, Russel FG, Mikos AG, Spauwen PH, Jansen JA. In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(10):919-927.
185. Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, Wada E, Katagiri Y. Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. *J Biomed Mater Res.* 1998;39(4):536-538.
186. Nicoll SB, Radin S, Santos EM, Tuan RS, Ducheyne P. In vitro release kinetics of biologically active transforming growth factor-beta 1 from a novel porous glass carrier. *Biomaterials* 1997;18(12):853-859.
187. Santos EM, Radin S, Ducheyne P. Sol-gel derived carrier for the controlled release of proteins. *Biomaterials* 1999;20(18):1695-1700.
188. Goodwin CJ, Braden M, Downes S, Marshall NJ. Investigation into the release of bioactive recombinant human growth hormone from normal and low-viscosity poly(methyl-methacrylate) bone cements. *J Biomed Mater Res.* 1997;34(1):47-55.

8. Bibliografía

189. Vallet-Regi M, Granado S, Arcos D, Gordo M, Cabanas MV, Ragel CV, Salinas AJ, Doadrio AL, San Roman J. Preparation, characterization, and in vitro release of ibuprofen from Al₂O₃/PLA/PMMA composites. *J Biomed Mater Res.* 1998;39(3):423-428.
190. Korteso P, Ahola M, Karlsson S, Kangasniemi I, Kiesvaara J, Yli-Urpo A. Sol-gel-processed sintered silica xerogel as a carrier in controlled drug delivery. *J Biomed Mater Res.* 1999;44(2):162-167.
191. Thomazeau H, Langlais F. Antibiotic release by tricalcic phosphate bone implantation. In vitro and in vivo pharmacokinetics of different galenic forms. *Chirurgie* 1997;121:663-666.
192. Cornell CN, Tyndall D, Waller S, Lane JM, Brause BD. Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic impregnated bone graft substitute. *J Orthop Res* 1993;11(5):619- 626.
193. Tamimi F, Torres J, Bettini R, Ruggera F, Rueda C, Lopez-Ponce M, Lopez-Cabarcos E. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:707–714.
194. Young AM, Ng PYJ, Gbureck U, Nazhat SN, Barralet JE, Hofmann MP. Characterization of chlorohexidine-releasing, fast setting, brushite bone cement. *Acta Biomater* 2008;4:1081–1088.
195. Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L. Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow-up of 92,675 operations performed 1978-1990. *Acta Orthop Scand.* 1993;64:497-506.
196. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand.* 2003;74:644-651.
197. Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, Otsuka M, Doi Y, Kitahashi T: A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mater Res* 1996; 33: 139-143.
198. Chiu FY, Chen CM, Lin CF, Lo WH. Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective, randomized study of three hundred and forty knees. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:759-762.

8. Bibliografía

199. Chiu FY, Lin CF, Chen CM, Lo WH, Chaung TY. Cefuroxime-impregnated cement at primary total knee arthroplasty in diabetes mellitus. A prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83:691-695.
200. McQueen M, Littlejohn A, Hughes SP. A comparison of systemic cefuroxime and cefuroxime loaded bone cement in the prevention of early infection after total joint replacement. *Int Orthop.* 1987;11:241-243.
201. Gay EC, Berini AL. *Tratado de cirugía bucal.* 2º ed. Madrid: ediciones Ergon S.A.;2003.
202. Petty W, Spanier S, Shuster JJ. Prevention of infection after total joint replacement. Experiments with a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70:536-539.
203. Nijhof MW, Dhert WJ, Fleer A, Vogely HC, Verbout AJ. Prophylaxis of implantrelated staphylococcal infections using tobramycin-containing bone cement. *J Biomed Mater Res.* 2000;52:754-761.
204. Nijhof MW, Stallmann HP, Vogely HC, Fleer A, Schouls LM, Dhert WJ, Verbout AJ. Prevention of infection with tobramycin-containing bone cement or systemic cefazolin in an animal model. *J Biomed Mater Res.* 2000;52:709-715
205. Alkhraisat M, Rueda C , Cabrejos-Azama J, Lucas-Aparicio J, Mariño FT, Torres J, Jerez LB, Gbureck U, Cabarcos EL. Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement. *Acta Biomater* 2010;6(4):1522-1528.
206. Bohner M, Lemaitre J, Merkle HP, Gander B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J Pharm Sci* 2000;89:1262–1270.
207. Bohner M, Lemaitre J, van Landuyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J Pharm Sci* 1997;86:565–572.
208. Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proc Instn Mech Engrs* 1998;212:427–435.
209. Sasaki S, Ishii Y: Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. *J Orthop Sci* 1999;4:361-369

8. Bibliografía

210. Lawson KJ, Marks KE, Brems J, Rehm S. Vancomycin vs tobramycin elution from polymethylmethacrylate: an in vitro study. *Orthopedics*. 1990;13:521-524.
211. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthroplasty*. 1996;11:939-944.
212. DeLuise M, Scott CP. Addition of hand-blended generic tobramycin in bone cement: effect on mechanical strength. *Orthopedics*. 2004;27:1289-1291.
213. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. *Acta Orthop Scand*. 2003;74:670-676.
214. Lewis G, Janna S, Bhattaram A. Influence of the method of blending an antibiotic powder with an acrylic bone cement powder on physical, mechanical, and thermal properties of the cured cement. *Biomaterials*. 2005;26:4317-4325.
215. Baker AS, Greenham LW. Release of gentamicin from acrylic bone cement. Elution and diffusion studies. *J Bone Joint Surg Am*. 1988;70:1551-1557.
216. Penner MJ, Duncan CP, Masri BA. The in vitro elution characteristics of antibiotic- loaded CMW and Palacos-R bone cements. *J Arthroplasty*. 1999;14:209-214.
217. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials* 2006;27:2171–2177.
218. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Controlled Release* 2006;113:102–110.
219. Ignácio H, Mazzer N, Barbieri CH, Chierici G. Estudos sobre a aplicabilidade médica da poliuretana derivada da mamona. *Res ortop* 1996;2:10-15.
220. Buckley M. Bone Substitutes, En: *Selected Readings in Oral and Maxillofacial Surgery*, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, 1994. V. 4
221. Hong YC, Wang JT, Hong CY, Brown WE, Chow LC: The periapical tissue reactions to calcium phosphate cement in the teeth of monkeys. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 485-498.
222. Munting E, Mirtchi AA, Lemaitre J: Bone repair of defects filled with phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *J Mater Sci Mater Med* 1993; 4: 337-344.

8. Bibliografía

223. Lu JX, About I, Stephan G, Van Landuyt P, Dejou J, Fiocchi M, Lemaitre J, Proust JP: Histological and biomechanical studies of two bone colonizable cements in rabbits. *Bone* 1999; 25: S41-S45.
224. Kenny SM, Buggy M. Bone cements and fillers: a review. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14: 923-938.
225. LeGeros RZ: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop* 2002; 395: 81-98.
226. Kopylov P, Jonsson K, Thorngren KG, Aspenberg P: Injectable calcium phosphate in the treatment of distal radial fractures. *J Hand Surg* 1996; 21: 768-771.
227. Frame JH. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980;38:176-180.
228. Roberts E. Bone Tissue Interface. *J Dental Educat* 1988;52:804-809.
229. Cornell CN. Regeneration of bone in critical defects. *J Orthop Trauma* 1999; 13: 523-4.
230. Burwell RG. Osteogenesis in cancellous bone graft: Considered in terms of cellular changes, basic mechanisms and the perspective of growth control and its possible aberrations. *Clin Orthop* 1965;40:35-40.
231. Friedlaender GE: Bone grafts: The basic science rationale of clinical applications. *J Bone Joint Surg* 1987; 69 A: 786-790.
232. Ruhé PQ, Kroese Deutman HC, Wolke JGC, Spauwen PHM, Jansen JA: Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* 2004; 2123-2132.
233. Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaitre J, Pasquier G, Flautre B: Resorption of, and bone formation from, new tricalcium phosphate monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996; 30: 193-200.
234. Constantz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, et al. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res* 1998; 43: 451-461.

8. Bibliografía

235. Kurashina K, Kurita H, Kotani A, Kobayashi S, Kyoshima K, Hirano M: Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an tricalcium phosphate dicalcium phosphate dibasic tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits. *Biomaterials* 1998; 19: 701-706.
236. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998;9(4):310-316.
237. Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogenic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(6):795-806
238. Vikjaer D, Blom s, Hjorting-Hansen E, Pinholt EM. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(1):59-66.
239. Torres J. Evaluación de la regeneración ósea mediante aplicación de PRP en un modelo experimental animal. DEA. 2002. U.C.M.
240. Schmitz J, Hollinger J. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular non junction. *Clin Orthop Rel Res* 1986;205:299-304.
241. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;2:237-243.
242. Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23:395-398.
243. Rabie AB, Lie Ken Jie RK. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralizar bone matrix. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25(4):311-318.
244. Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP: Osteotransductive bone cements. *Proc Instn Mech Engrs [H]* 1998; 212: 427-35
245. Jansen JA, De Ruijter JE, Schaeken HG, Van der Waerden JPCM, Planell JA, Driessens FCM: Evaluation of tricalciumphosphate / hydroxiapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. *J Mater Sci Mater Med* 1995; 6: 653-7

8. Bibliografía

246. Ooms EM, Wolke JG, Van de Heuvel MT, Jeschke B, Jansen JA: Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials* 2003; 24: 989-1000
247. Ooms EM, Wolke JG, Van der Waerden JP, Jansen JA: Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement. *J Biomed Mater Res* 2002; 61: 9-18.
248. Daculsi G, Dard M: Bone-calcium phosphate ceramic interface. *Osteosynthese Internat* 1994; 2: 153-156.
249. Klein CPAT, Driessen AA, De Groot K, Van den Hooff A: Biodegradation behaviour of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 1983; 17: 769-84.
250. Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, Shin JW, Liu C. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. 2010;31(6):1260-1269.
251. Yu Y, Wang J, Liu C, Zhang B, Chen H, Guo H, Zhong G, Qu W, Jiang S, Huang H. Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;76(2):496-504.
252. Castillo F, Suso S, Fernández de Retana P: Evaluación del potencial osteogénico de los polímeros bioabsorbibles derivados del ácido láctico utilizados como sustitutivos óseos. *Rev Ortop Traum* 2003; 47: 428-433.
253. Zeng D, Xia L, Zhang W, Huang H, Wei B, Huang Q, Wei J, Liu C Jiang X. Maxillary Sinus Floor Elevation Using a Tissue-Engineered Bone with Calcium-Magnesium Phosphate Cement and Bone Marrow Stromal Cells in Rabbits. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(7-8):870-881.
254. Howlett C, Zreiqat H, O'dell R, Noorman J, Evans P, Dalton B, Mcfarland C, Steele J. The effect of magnesium ion implantation into alumina upon the adhesion of human bone derived cells. *J Material Sci Mater Med* 1994;5:715-722.
255. Zreiqat H, Evans P, Howlett C. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *J Biomed Mater Res* 1999;44:389-396.
256. Zreiqat H, Howlett C, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic

8. Bibliografía

- cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002;62:175-184.
257. Ramaswamy Y, Haynes DR, Berger G, Gildenhaar R, Lucas H, Holding C, Zreiqat H. Bioceramics composition modulate resorption of human osteoclasts. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:1199-1205.
258. Larsson S, Bauer TW: Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin Orthop* 2002; 395: 23-32.
259. Kenny SM, Buggy M: Bone cements and fillers: a review. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14: 923-938.

8. Bibliografía
