



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

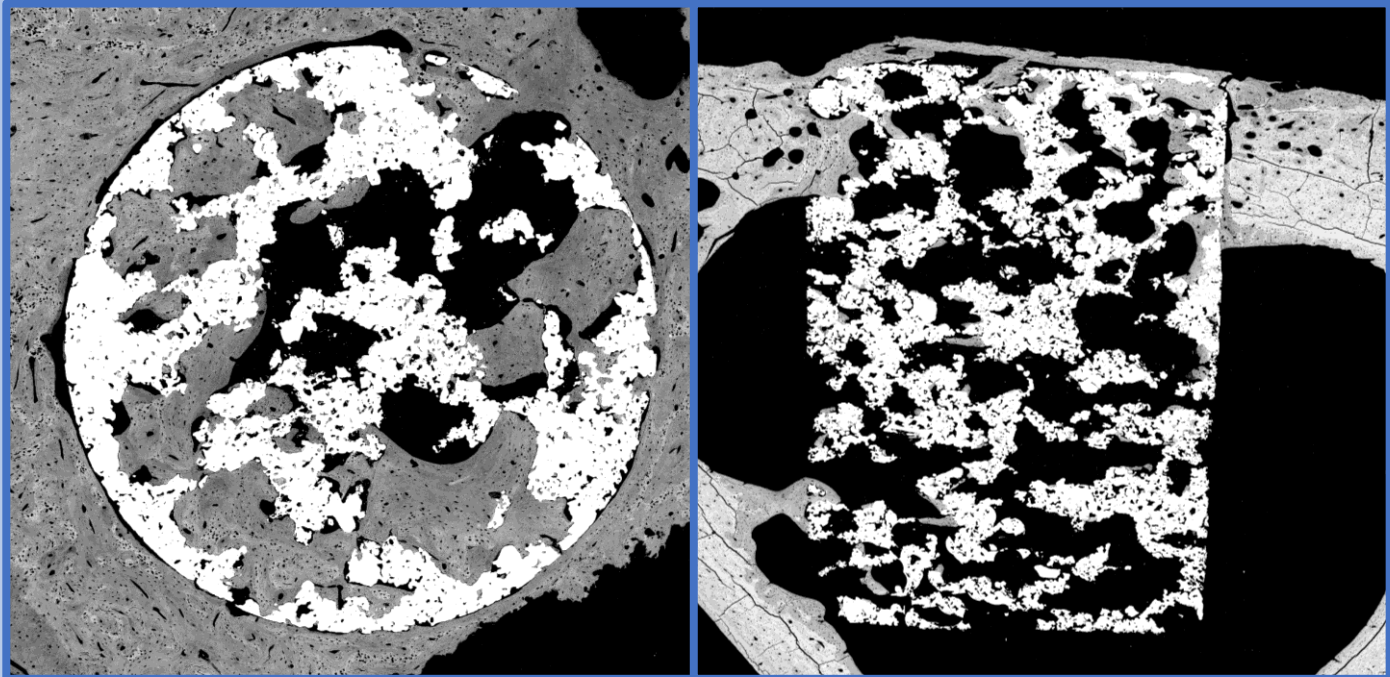
WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

EVALUACIÓN DE LA OSTEOINTEGRACIÓN Y OSTEOCONDUCCIÓN DE IMPLANTES DE TITANIO POROSO BIOACTIVOS:

VALORACIÓN CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE RETRODISPERSIÓN EN UN MODELO DE IMPLANTACIÓN ORTOTÓPICA EN CONEJOS

Autora: Katrin Steffanie Rappe

Director: Dr. Jordi Franch Serracanta



**EVALUACIÓN DE LA OSTEointegración Y
OSTEOCONDUCCIÓN DE IMPLANTES DE
TITANIO POROSO BIOACTIVOS:
*VALORACIÓN CON MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE RETRODISPERSIÓN EN UN
MODELO DE IMPLANTACIÓN ORTOTÓPICA EN
CONEJOS***

Autora: Katrin Steffanie Rappe

Director: Jordi Franch Serracanta

TESIS DOCTORAL
DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD ANIMAL
FACTULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA
NOVIEMBRE 2019

CERTIFICADO

Jordi Franch Serracanta, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICO QUE:

El trabajo de investigación titulado "*Evaluación de la osteointegración y osteoconducción de implantes de titanio poroso bioactivos: valoración con microscopía electrónica de retrodispersión en un modelo de implantación ortotópica en conejos*" realizado por la licenciada en Veterinaria Katrin Steffanie Rappe y dirigida por mí, reúne los requisitos científicos y formales necesarios para proceder a su defensa como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Bellaterra a 16 de septiembre del 2019.

Fdo. Jordi Franch Serracanta
Profesor Titular
Departamento de Medicina y Cirugía
Facultad de Veterinaria
Universidad Autónoma de Barcelona

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. Jordi Franch, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Gracias Jordi por ser como eres; director de tesis, mentor y sobre todo gran amigo. No solo me has acogido en el despacho con mucho cariño brindándome la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación sino que también me has abierto las puertas de tu casa y me has dejado formar parte de tu maravillosa familia. Te agradezco muchísimo también la formación clínica que me has dado y todo lo que me has enseñado durante estos últimos años. He aprendido muchísimo de ti y ahora estoy donde estoy gracias a ti. Gracias por tu paciencia, dedicación y cariño.

En segundo lugar quiero dar las gracias a:

- Albert Barba: Gracias por toda tu ayuda en los experimentales, por realizar los trabajos con tanta dedicación, constancia y de una forma tan ordenada como solo tú sabes hacerlo, por hacerme reír en los momentos difíciles y por cantar “la donna e mobile” en los ratos de estudio en el despacho. Gracias por ayudarme en tantas cosas y por hacerme saber que siempre puedo contar contigo para lo que haga falta.
- Mónica Ortiz: Me encantó trabajar contigo, Mónica. Te agradezco infinitamente todo lo que me has enseñado y la paciencia que has tenido conmigo. Me has brindado la oportunidad de sumergirme en un nuevo ámbito del cual no sabía absolutamente nada. Me acuerdo mucho de los buenos ratos que pasamos juntas en el laboratorio y sobre todo de tu alegría y buen humor constante que ni en los peores momentos desaparecía. Sin ti esta tesis no hubiera sido posible.
- A todo el resto del equipo de la UPC del Departamento de Ingeniería, en especial al Dr. Javier Gil, a la Dra. Meritxell Molmeneu, al Dr. Miquel Punset y al Dr. Carles Mas-Moruno. Me habéis acogido con mucho cariño y me he sentido muy a gusto con vosotros. Cada vez que iba, estábais pendientes de mi todo el rato, me habéis formado y me habéis enseñado muchas cosas nuevas, siempre con alegría y amabilidad. Gracias por toda vuestra ayuda, por introducirme en el mundo de los biomateriales y por el asesoramiento científico.
- A todo el equipo de la UB, en especial a la Dra. Cristina Manzanares y a Eva. Agradezco mucho toda la orientación científico-técnica y la colaboración en mi aprendizaje del proceso laboratorial en mi investigación. Gracias por tener la paciencia y enseñarme el funcionamiento de todas las máquinas y brindarme vuestros conocimientos.

También quiero dar las gracias de forma especial a mi pareja, Dani. Al amor, paciencia y apoyo emocional que me ha dado en todos estos años. Has sido el que más ha sufrido esta tesis doctoral y aun así siempre has estado a mi lado, animándome, apoyándome y ayudándome a ser mejor profesional y persona día a día. Sin ti no hubiera tenido la fuerza ni la constancia para poder terminar esta tesis. Gracias por aguantarme en mis días buenos y sobre todo en los malos, por animarme a seguir adelante día a día y por preocuparte tanto por mí y por mi futuro profesional. Siempre has estado ahí, escuchándome y dándome consejo e incluso dándome tu opinión sobre los péptidos y los biomateriales.

Gracias también a mi familia, a mi madre Ulli, a mi hermana Jana, a mi cuñada Eva y su marido Alfonso, por estar siempre ahí. Os agradezco de corazón este apoyo incondicional, el soporte emocional y el amor que me habéis dado. Siempre os he tenido cuando os he necesitado a pesar de la distancia que nos separa. Gracias por comprender y apoyarme con mis ambiciones profesionales.

Por último, quiero darle las gracias a mi padre. A pesar de que te fuiste, sé que siempre estás a mi lado y sé que estás muy orgulloso de mí. Tu fuiste el que siempre me empujó a dar lo máximo de mí, el que me enseñó que la educación es algo importante y el que me animó a hacer un doctorado. Sin ti, no hubiera llegado tan lejos. Gracias por hacer de mi la persona y profesional que soy hoy.

“Zum Schluß möchte ich meinem Papa danken: Obwohl du nicht mehr bei uns bist, weiß ich, dass du immer an meiner Seite bist und ich weiß auch, dass du sehr stolz auf mich bist. Du warst derjenige, der mich gelehrt, hat dass Bildung etwas Wichtiges ist und mir den Rat gab, mein Bestes zu geben und mich ebenfalls animiert hat einen Dokortitel zu machen. Ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen. Vielen Dank, dass du mir geholfen hast, so zu werden wie ich heute bin.“

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Antecedentes generales	7
2.2. Función del hueso	9
2.3. Composición del hueso	9
2.3.1. Fase inorgánica.....	9
2.3.2. Fase orgánica.....	10
2.3.3. Componente celular.....	11
2.4. Estructura del hueso	16
2.5. Biología del hueso	19
2.5.1. Osteogénesis.....	19
2.5.2. Remodelación ósea.....	21
2.6. Consolidación ósea	25
2.6.1. Consolidación directa.....	25
2.6.2. Consolidación indirecta.....	27
2.6.3. Fallos en la consolidación ósea.....	30
2.7. Biomateriales	31
2.7.1. Biocerámicas.....	34
2.7.2. Biomateriales poliméricos.....	34
2.7.3. Biomateriales metálicos.....	35
2.8. Implantes de titanio	39
2.8.1. Implantes de titanio poroso.....	42
3. HIPÓTESIS TRABAJO Y OBJETIVOS	51
3.1. Hipótesis trabajo	53
3.2. Objetivos	54
4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
4.1. Materiales	57
4.1.1. Autorización del procedimiento experimental.....	57

4.1.2. Animales.....	57
4.1.3. Materiales de implantación.....	60
4.2. Métodos.....	67
4.2.1. Fase preoperatoria.....	67
4.2.2. Fase quirúrgica.....	67
4.2.3. Distribución de los implantes.....	70
4.2.4. Método postoperatorio inmediato.....	70
4.2.5. Método postoperatorio de supervisión.....	71
4.2.6. Eutanasia.....	72
4.2.7. Preparación de las muestras.....	73
4.2.8. Obtención de imágenes de las muestras mediante MER.....	77
4.2.9. Método de evaluación cuantitativa de las imágenes de MER.....	78
4.2.10. Método de evaluación cualitativa de las imágenes Transversales.....	86
4.2.11. Método de evaluación cualitativa de las imágenes longitudinales.....	87
4.2.12. Análisis estadístico.....	88
5. RESULTADOS.....	89
5.1. Resultados clínicos.....	91
5.2. Resultados radiográficos.....	92
5.3. Resultados de la evaluación cuantitativa de las imágenes de MER.....	95
5.3.1. Grupo temporal 4 semanas.....	95
5.3.2. Grupo temporal 12 semanas.....	97
5.4. Resultados de la evaluación cualitativa de las imágenes transversales.....	101
5.4.1. Grupo temporal 4 semanas.....	101
5.4.2. Grupo temporal 12 semanas.....	106
5.5. Resultados del análisis cualitativo de la imágenes longitudinales.....	113
5.5.1. Grupo temporal 4 semanas.....	113
5.5.2. Grupo temporal 12 semanas.....	118
5.6. Resultados del análisis estadístico.....	122
6. DISCUSIÓN.....	123

6.1. Discusión de resultados clínicos y radiográficos.....	125
6.2. Discusión de los resultados del análisis de la estructura y propiedades mecánicas de los implantes porosos.....	127
6.2.1. Propiedades mecánicas de los implantes.....	127
6.2.2. Estructura de los implantes.....	128
6.3. Discusión sobre el tipo de corte y la elaboración del protocolo para la evaluación de las muestras.....	135
6.4. Discusión sobre los resultados obtenidos del análisis cuantitativo y cualitativo de las imágenes del MER de las muestras transversales.....	138
6.4.1. Grupos control.....	140
6.4.2. Grupos con tratamiento termoquímico.....	141
6.4.3. Grupo con tratamiento peptídico.....	146
6.5. Discusión sobre los resultados obtenidos del análisis cualitativo de las imágenes del MER de las muestras longitudinales.....	152
6.6. Discusión sobre los resultados obtenidos del análisis estadístico.....	153
7. <u>CONCLUSIONES</u>.....	155
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	159
9. <u>RESUMEN/ABSTRACT</u>.....	175
Resumen.....	177
Abstract.....	179

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la ciencia de los biomateriales aplicados a los sustitutos óseos se ha centrado en la búsqueda de nuevos implantes fabricados con materiales que presenten una estructura de microporos interconectados necesarios para el crecimiento óseo adecuado para asegurar la fijación del implante y que también presenten propiedades biomecánicas óptimas. El bioglass, fosfato de calcio, hidroxiapatita y otros, presentan una buena capacidad de biocompatibilidad y osteoconductividad debido a la unión directa al tejido óseo a través de una capa de apatita. Sin embargo, el problema de tales materiales se basa en sus pobres propiedades mecánicas que los hacen inadecuados para la aplicación clínica en condiciones de carga, como en fusiones intervertebrales en cirugías espinales. Por otra parte, el titanio poroso y sus aleaciones representan los materiales de elección en la mayoría de las aplicaciones de carga, como en odontología y ortopedia, por ejemplo, para implantes dentales, articulaciones artificiales e implantes intervertebrales y espinales. Múltiples estudios han demostrado que el titanio presenta buena biocompatibilidad, excelente resistencia a la corrosión y propiedades mecánicas perfectas para soportar mejor las condiciones de carga. El desarrollo de un titanio poroso sometido a tratamiento de superficie, permite mejorar significativamente la formación de un enlace entre el implante y el hueso circundante favoreciendo, a la vez, los fenómenos de osteoconducción y osteointegración.

Los andamios de titanio porosos pueden fabricarse mediante una gran variedad de procesos, como la fusión selectiva por láser, la metalurgia de polvos o la síntesis de combustión, entre otros. Así, el titanio poroso puede presentar una porosidad altamente interconectada que permite una mejor colonización de los implantes por parte de las células y los nutrientes, mejorando el crecimiento óseo, la osteointegración y la fijación del implante. Además, para potenciar las propiedades osteointegrativas, el titanio poroso se puede tratar con diferentes métodos para la activación de la superficie: proteína morfogénica ósea, tratamientos ácido-álcali, tratamientos químico-térmicos, injerto de moléculas de adhesivo celular derivadas de la matriz extracelular y otros. Hay muchos estudios sobre los tratamientos termoquímicos de las superficies de implantes de titanio poroso mostrando sus efectos positivos para potenciar la osteointegración y la osteoconducción. Asimismo, diferentes estudios han demostrado el

Introducción

potencial *in vitro* de tratamientos peptídicos de los biomateriales para favorecer la reparación ósea. Sin embargo, no hay estudios *in vivo* que demuestren que un determinado tratamiento peptídico usando una secuencia peptídica específica en implantes de titanio poroso fabricados por sinterización pueda estimular la osteointegración y la osteoconducción.

En consecuencia, en esta tesis doctoral se planteó un estudio experimental *in vivo* mediante la implantación ortotópica en tibias de conejos de implantes de titanio poroso bioactivos con tratamiento inorgánico, otros con un tratamiento orgánico y un grupo control negativo que no fue sometido a ningún tratamiento de superficie con el objetivo de evaluar las distintas respuestas osteointegrativas

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes generales

La necesidad de contar con biomateriales que aporten las características biológicas y mecánicas requeridas para un correcto funcionamiento del implante y una adecuada respuesta biológica del tejido circundante ha sido objetivo de estudio de una amplia gama de disciplinas médicas y veterinarias desde hace muchos siglos. Concretamente, en el caso de biomateriales para su aplicación en hueso, se ha buscado por un lado unas propiedades biomecánicas adecuadas y por otro la estimulación del crecimiento y consolidación del tejido óseo. Obviamente, es importante que los materiales presenten una óptima biocompatibilidad y propiedades de osteoconducción y osteointegración para conseguir una rápida fijación del implante sin provocar reacciones adversas ni rechazos. Los fosfatos de calcio, el bioglass y las cerámicas han demostrado ser biocompatibles y tener propiedades osteoconductoras a través de la formación de hidroxiapatita en sus superficies, pero en cambio son biomecánicamente insuficientes al no soportar las cargas.¹ Los metales lisos, como por ejemplo el titanio, soportan muy bien las cargas mecánicas y fuerzas de compresión y tensión, pero no permiten un buen contacto del tejido óseo neoforzado con el implante. Por eso, se desarrollaron implantes con titanio poroso, con una estructura con macro y microporos interconectados que permiten el crecimiento óseo hacia el interior del implante y su consecuente fijación además de aportar adecuadas propiedades mecánicas.² Hoy en día el titanio poroso y sus aleaciones son los más usados para aplicaciones clínicas en condiciones de carga, como por ejemplo en odontología o cirugías espinales.³ Asimismo, los implantes porosos muchas veces son sometidos a tratamientos de superficie para mejorar aún más la osteoconducción y osteointegración y así poder aumentar la fijación del implante en su localización. Estos tratamientos pueden ser termoquímicos, ácido-alcalinos o como novedad en este estudio, tratamiento con péptidos. Con ello se favorece la fijación del hueso a la superficie del implante y se facilita su entrada al interior de los macro y microporos de los implantes de titanio.

Un biomaterial ideal debería tener características que favorezcan la osteogénesis, la osteoinducción, la osteoconducción y la osteointegración. La osteogénesis es la neoformación directa del tejido óseo por acción de los osteoblastos. La osteoconducción es la capacidad que tiene un biomaterial para guiar el crecimiento óseo, proporcionar una red tridimensional sobre la que puedan avanzar tanto las células endoteliales responsables del desarrollo de la neovascularización como las células óseas responsables de la neoformación ósea. Por ello, los factores que influyen en la osteoconducción de un biomaterial son su porosidad, la interconexión entre los poros y la rugosidad de la superficie.⁴ La osteoinducción es la propiedad que presentan algunas sustancias o biomateriales para estimular la diferenciación celular y la proliferación de los osteoblastos a partir de células mesenquimatosas indiferenciadas. Resulta igualmente importante aclarar algunos conceptos que a menudo se confunden entre ellos cuando se trata de la interacción entre el hueso y un biomaterial. La osteointegración se define como la conexión directa, estructural y funcional entre el tejido óseo y la superficie y el interior de un implante sometido a carga, sin la formación de por medio de una membrana fibrosa.⁵ Es decir, el hueso que se forma en el interior o en la superficie de un implante interactúa celular y/o bioquímicamente con el implante estimulando la formación de hueso y fijando el implante. Los conceptos de crecimiento óseo en el interior (“bone ingrowth”) o en la superficie (“bone ongrowth”) de un implante no implican forzosamente que haya existido tal interacción fina, sino simplemente la mayor o menor presencia de hueso en esas zonas lo que, por otra parte, no significa que dicha neoformación ósea no pueda igualmente fijar sólidamente un implante.

Para entender mejor todos los conceptos relacionados con la presente tesis, se requiere llevar a cabo una breve revisión de la función, composición, estructura y biología del hueso.

2.2. Función del hueso

El tejido óseo en el cuerpo tiene funciones estructurales, protectoras y locomotoras además de jugar un papel importante en las funciones fisiológicas. Los huesos sirven de caja protectora de los órganos internos torácicos y proporcionan un soporte estructural para la locomoción. Igualmente, el sistema óseo participa en la función hematopoyética, en la regulación endocrina, en el equilibrio ácido-base, la homeostasis iónica y es reservorio de diversos minerales (sobre todo calcio y fósforo). Además, el hueso también actúa como reservorio para células madre mesenquimales y factores de crecimiento que son esenciales para varias funciones fisiológicas vitales como por ejemplo la regeneración ósea.

2.3. Composición del hueso

El hueso es un tejido conectivo mineralizado formado por 4 tipos de células especializadas (osteoclastos, osteoblastos, células de revestimiento óseo “*bone lining cells*” y osteocitos) rodeadas por una matriz ósea extracelular.⁶ Esta matriz está constituida por una fase inorgánica o mineral (70%) y una fase orgánica (30%). El componente celular supone aproximadamente el 2% de peso total del hueso.

2.3.1. Fase inorgánica

La fase inorgánica del hueso consiste predominantemente en iones de fosfato y calcio. También se encuentran pequeñas cantidades de carbonato (aproximadamente un 4%) y otros elementos como por ejemplo bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, zinc etc. Los iones de calcio y fosfato se unen para formar los llamados cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) a los cuales se les pueden unir diversos elementos de esta fase.⁷ A nivel estructural, la hidroxiapatita está presente en la matriz ósea como pequeños y alargados cristales orientados en la misma dirección que las fibrillas de colágeno o como una fase amorfa, granular, dependiendo del tipo de hueso. Son cristales sumamente pequeños que suelen tener entre 1,5nm hasta unos 4 nm de grosor en algunos tejidos óseos maduros y presentan una longitud variable de entre 30 a 45 nm.⁸ Otro componente importante de la fase inorgánica es el agua que constituye aproximadamente un 9% de esta fase.

2.3.2. Fase orgánica

La fase orgánica está compuesta mayoritariamente por proteínas colágenas (90%), sobre todo colágeno tipo I que está formado por tres cadenas de polipéptidos enrolladas como una triple hélice, una configuración muy resistente a la degradación proteolítica. También encontramos proteoglicanos (PG) y proteínas no-colágenas como por ejemplo osteocalcinas, osteonectina, osteopontina, fibronectina y sialoproteína ósea II, proteína ósea morfogénica (BMP) y otros factores de crecimiento. Algunas de estas proteínas son producidas por los osteoblastos y forman alrededor del 10% de la matriz orgánica.⁹

La osteocalcina es una proteína pequeña que constituye aproximadamente el 10% de las proteínas no-colágenas del hueso. Es sintetizada por los osteoblastos, una síntesis dependiente de vitamina K. Se cree que desempeña un papel en la regulación del metabolismo y es fundamental para la formación ósea. La osteocalcina está implicada en la mineralización del hueso y la homeostasis de los iones de calcio. Además, se sospecha que la osteocalcina puede modificar la actividad de los osteoblastos y osteoclastos.¹⁰

La osteonectina es una de las proteínas no-colágenas más abundantes en el hueso. Es una fosfoproteína que interactúa con el Ca^{2+} , colágeno tipo I y la hidroxiapatita y se localiza adyacente a los osteoblastos y osteocitos.¹¹ Parece ser que la osteonectina está implicada en el ciclo celular, en la interacción entre células y matriz, en la adhesión de iones y factores de crecimiento y en la modulación de la actividad enzimática.¹²

La osteopontina, como su nombre indica, tiene una función de “puente”. Se ha visto que ayuda en la fijación de muchos tipos celulares, incluidos los osteoclastos. La osteopontina se produce en etapas tardías de la maduración osteoblástica, correspondiente a estadios de la formación de la matriz justo antes de la mineralización.¹³

La fibronectina es una glicoproteína de unión celular sintetizada por células óseas. Se une a receptores proteicos de la membrana llamados integrinas. Esta proteína

coordina la migración, la interacción y la diferenciación de los precursores de los osteoblastos.¹⁴

La sialoproteína ósea constituye aproximadamente el 8% de todas las proteínas no-colágenas del hueso y es necesaria para la nucleación de la hidroxiapatita. Además, se ha visto que ayuda en la unión celular y puede iniciar la mineralización ósea. También se cree que la sialoproteína está implicada en la diferenciación y función de los osteoclastos.¹⁵

La proteína ósea morfogénica o en inglés "*bone morphogenetic protein*" (BMP) es un grupo de factores de crecimiento multifuncional conocidos también como citoquinas. A parte de sus numerosas funciones en todo el organismo, la BMP juega un papel importante en la formación del hueso y parece ser capaz de regular la proliferación, la diferenciación y la apoptosis en los osteocitos, osteoclastos y osteoblastos.^{16,17}

2.3.3. Componente celular

El tejido óseo contiene 4 tipos de células: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células de revestimiento óseo ("*bone lining cells*").

a) Osteoblastos

Los osteoblastos son células cuboidales que se localizan a lo largo de la superficie del hueso o que rodean áreas de osificación. Derivadas de las células madre mesenquimales, representan del 4 al 6% de todas las células óseas y son bien conocidas por su función de formación ósea.

Los osteoblastos son los encargados de la síntesis de la matriz osteoide. En primer lugar, depositan la matriz orgánica y luego la mineralizan. Los osteoblastos en un primer paso sintetizan colágeno y en menor medida proteínas especiales como p.ej. la osteonectina y la osteopontina. Luego, se produce la mineralización de esta matriz ósea. Para esta fase, se liberan unas vesículas desde la membrana apical del osteoblasto hacia la matriz neoformada donde aquellas se unen a proteoglicanos y a otros componentes orgánicos. Los proteoglicanos inmovilizan los iones de calcio que están almacenados en el interior de las vesículas. Cuando los osteoblastos secretan enzimas específicas que degradan los proteoglicanos, los iones de calcio son liberados

y atraviesan unos canales de calcio presentes en las vesículas. Por otro lado, se liberan iones de fósforo al interior de las vesículas debido a la liberación por parte de los osteoblastos de fosfatasa alcalina (ALP). Los iones de fósforo y los iones de calcio se unen en el interior de las vesículas y forman los cristales de hidroxiapatita. Cuando hay una sobresaturación de iones de calcio y de fósforo en el interior de las vesículas, éstas se rompen y se liberan los cristales de hidroxiapatita hacia la matriz subyacente (Figura 2.1.).

Los osteoblastos maduros, cuando entran en un estado de inactividad, pueden sufrir apoptosis o se pueden transformar en osteocitos o en células de revestimiento óseo (Figura 2.2.)¹⁸.

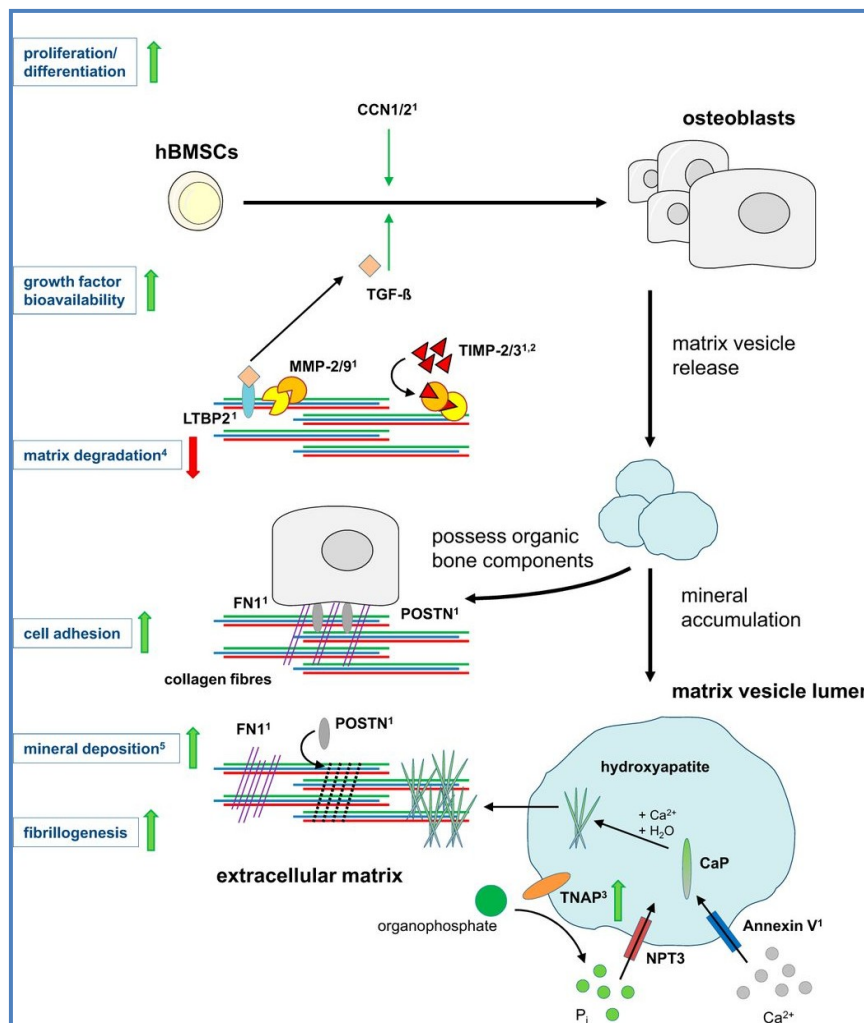


Figura 2. 1. Síntesis de la matriz ósea por parte de los osteoblastos.¹⁹

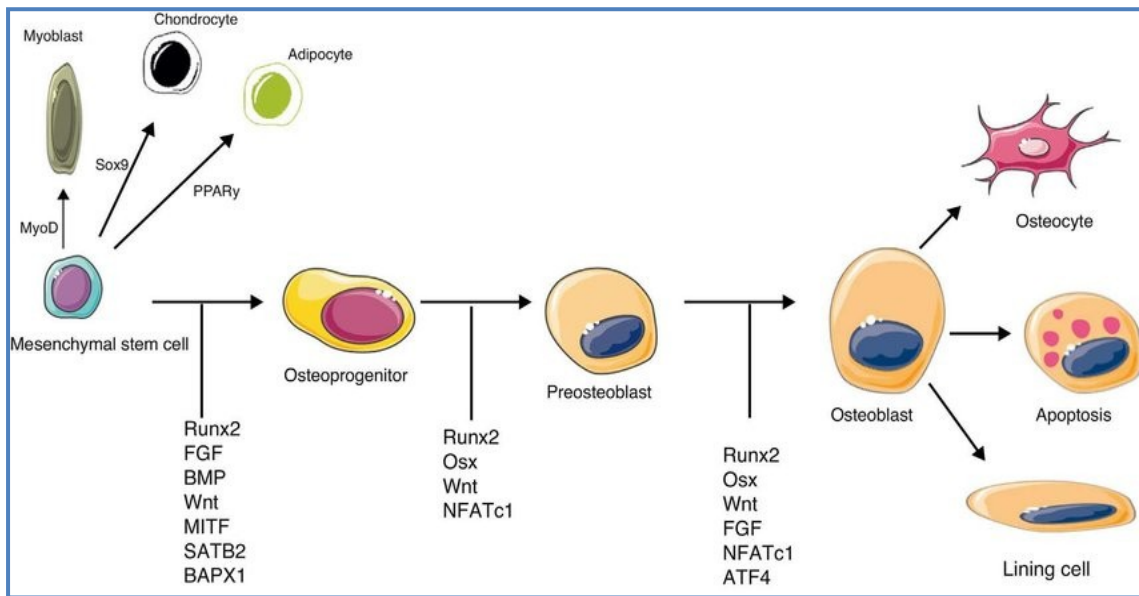


Figura 2. 2. Diferenciación osteoblástica.²⁰

b) Osteocitos

Los osteocitos constituyen entre el 90% y el 95% de todas las células óseas y son las células más abundantes y longevas²¹. Los osteocitos son células óseas maduras que derivan de los osteoblastos y no tienen capacidad de dividirse. Presentan una morfología ramificada y son más redondas cuando se encuentran en el hueso fibroreticular y más elongadas cuando forman parte del hueso lamelar. Los osteocitos se localizan dentro de lagunas rodeadas de la matriz ósea mineralizada y están interconectadas mediante unas extensiones citoplasmáticas llamadas filopodios que se extienden por los canalículos de la matriz. Las comunicaciones entre los filopodios de los osteocitos permiten un intercambio de pequeñas moléculas intercelulares, como por ejemplo óxido nítrico o prostaglandinas. Además, el sistema lacuno-canalicular de los osteocitos, está íntimamente relacionado con el aporte vascular para abastecer a los osteocitos con oxígeno y nutrientes.

Los osteocitos, menos activos que los osteoblastos, presentan un retículo endoplasmático y aparato de Golgi menos desarrollado. Su función principal es la de actuar como mecanosensores y convertir así los estímulos de carga mecánica en señales bioquímicas ayudando así a la adaptación del hueso a las fuerzas mecánicas a

las que está sometido.²² De esta forma, los osteocitos dirigen la remodelación ósea mediante la regulación de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos.

c) Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas diferenciadas de gran tamaño responsables de la reabsorción de la matriz ósea y del mantenimiento de la homeostasis del calcio. Se originan de células mononucleares del linaje de células madre hematopoyéticas. Durante la remodelación ósea, los osteoclastos se polarizan y se pueden observar 4 regiones distintas de la membrana celular: una zona de sellado, un borde rugoso ("*ruffled border*"), que está en contacto con la matriz ósea, una zona basolateral y otra con función secretora que no está en contacto con la matriz, pero sí con los fluidos extracelulares y con otras células²³.

La polarización del osteoclasto durante la reabsorción ósea produce la formación de un podosoma por parte del borde de sellado para la adhesión a la matriz. El borde rugoso es el responsable de la actividad de reabsorción del osteoclasto mediante la degradación de componentes orgánicos e inorgánicos. Se produce la acidificación de la laguna de reabsorción y se consigue la disolución de los cristales de hidroxiapatita. Una vez que se haya disuelto la fase mineral, la fase orgánica queda expuesta y es degradada por enzimas proteolíticas como p.ej. la cistein-proteasa, la metaloproteasa de matriz (MMP) o la proteasa de serina creando una cavidad de degradación llamada laguna de Howship (Figura 2.3.).

Los productos de degradación atraviesan el borde rugoso y son transportados hacia la zona de secreción de la membrana plasmática.

La reabsorción osteoclástica es controlada por tres hormonas reguladoras de calcio: la hormona paratiroidea y la 1,25-dihidroxivitamina D3, las cuales estimulan la reabsorción, y la calcitonina, la cual inhibe la reabsorción osteoclástica²⁴. Además, se ha visto que los osteoclastos no sólo sirven para la reabsorción ósea si no también influyen en la actividad de otras células como, por ejemplo, los osteoblastos.

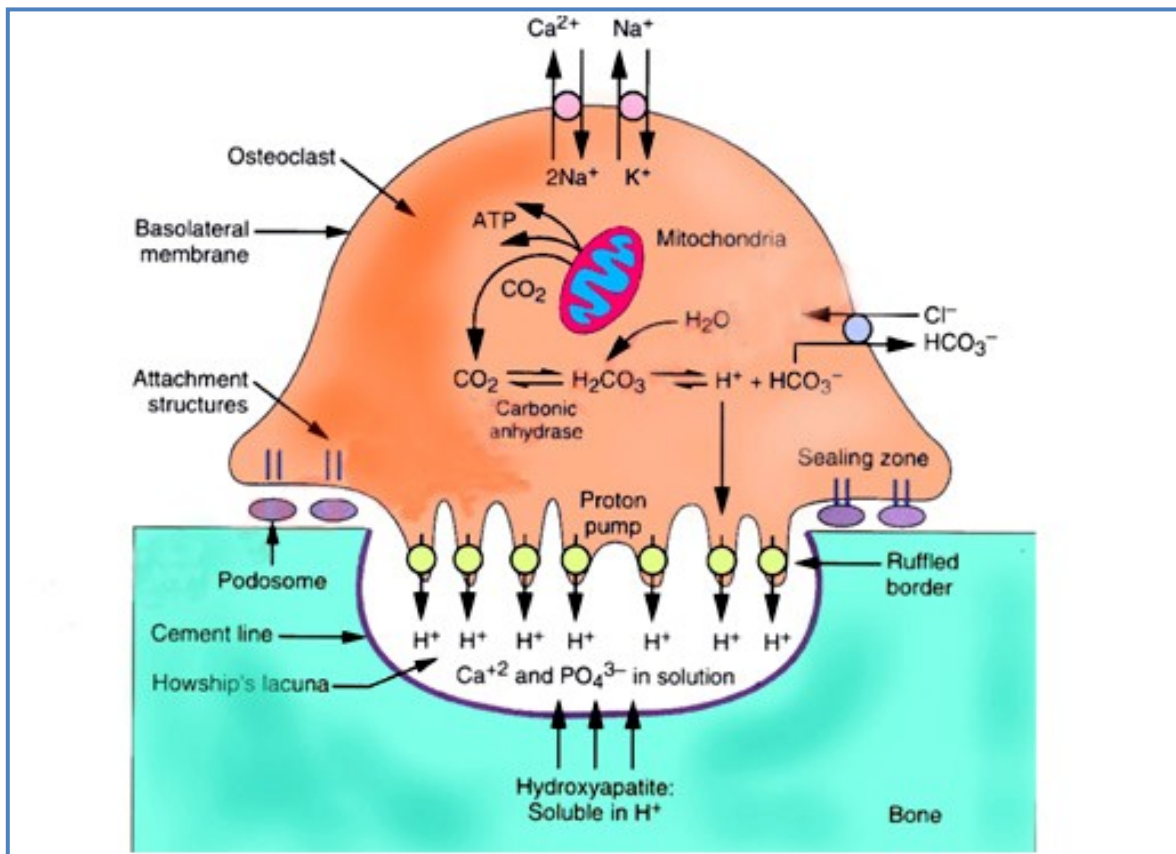


Figura 2. 3. Detalle de un osteoclasto. Fuente: <http://youngorthopod.blogspot.com/2017/04/osteoclast.html>

d) Células de revestimiento óseo

Las células de revestimiento óseo (*bone lining cells*) son células procedentes de los osteoblastos, localizadas en la superficie ósea, donde no se produce ni reabsorción ni formación ósea. Se podrían describir como osteoblastos inactivos, o sea, osteoblastos que han terminado su actividad de secreción de osteoide y que, a diferencia de los osteocitos, no quedan encerrados dentro de la matriz ósea calcificada (Figura 2.4.). A nivel fenotípico, las células de revestimiento óseo se diferencian de los osteoblastos por no expresar osteocalcina, pero en cambio, expresan una molécula de adhesión²⁵. Son células más alargadas, aplanadas y finas que los osteoblastos¹³.

Aunque la función de las células de revestimiento óseo no está perfectamente definida, se ha visto que previenen la interacción directa de los osteoclastos con la matriz ósea e intervienen en la diferenciación de los osteoclastos. Algunos estudios sugieren que las células de revestimiento óseo se pueden volver a transformar en osteoblastos activados²⁶.

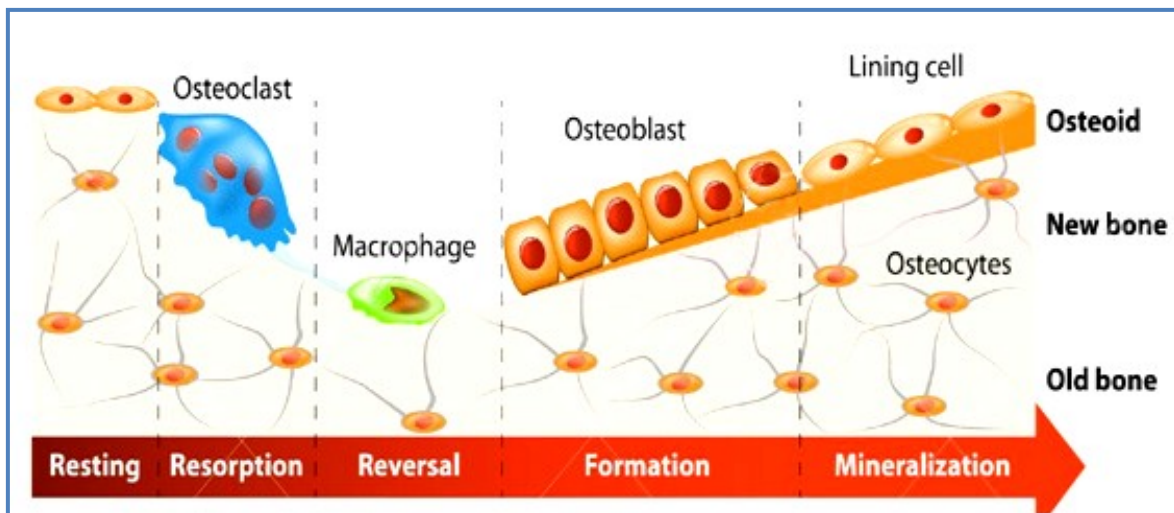


Figura 2. 4. Proceso de remodelación ósea, detalle de las células de revestimiento óseo. Fuente: desconocido

2.4. Estructura del hueso

El hueso está compuesto por un tejido conectivo mineralizado especial cuya unidad elemental son las fibrillas de colágeno mineralizadas. Estas fibrillas mineralizadas junto con agua y proteínas no colágenas organizadas en una compleja estructura jerárquica, son las responsables de las propiedades mecánicas del hueso. Weiner y Wagner describieron en 1998, 7 niveles jerárquicos de la estructura del hueso en un hueso lamelar⁸. En el 2014, Reznikov *et al.* le añadieron otros dos niveles, llegando a un total de nueve niveles jerárquicos en el hueso lamelar siendo menos en otros tipos óseos como por ejemplo el hueso fibroreticular²⁷. Dichos niveles se describieron tanto, desde un aspecto nanométrico como macroestructural.

A nivel molecular y de nanoestructura, encontramos los componentes estructurales de mayor tamaño: cristales de hidroxapatita, colágeno tipo I y agua y, en menor medida, otros tipos de colágeno, proteínas no colágenas y proteoglicanos. El colágeno tipo I se organiza en una estructura llamada tropocolágeno que está formado por 3 cadenas de polipéptidos formando una triple espiral o hélice. Estas moléculas de tropocolágeno se unen entre sí formando las llamadas fibrillas, las cuales tienen un diámetro de entre 80-120nm. En los huecos de estas fibrillas, posteriormente se insertan cristales de hidroxapatita y forman las fibrillas de colágeno mineralizadas. La resistencia del hueso se debe en parte a esta manera peculiar de estructuración

fibrilar de las moléculas de colágeno. Estas fibrillas a su vez se unen entre sí formando la llamada fibra de colágeno. El agua, otro componente fundamental, se une por un lado a la superficie de los cristales de hidroxapatita y también se distribuye entre las triples hélices de colágeno y de las fibras de colágeno. Las fibras de colágeno se van “empaquetando” entre sí hasta formar estructuras ya submicroscópicas, y en el caso del hueso lamelar, formar las llamadas lamelas. Estas lamelas se pueden agrupar de forma concéntrica alrededor de un canal central llamado canal Haversiano, el cual contiene un capilar y terminaciones nerviosas. Este canal tiene un diámetro de entre 30 y 40 micras y en los huesos largos suele ir paralelo al axis del hueso. En su conjunto, las lamelas concéntricas alrededor del canal forman la osteona o sistema Haversiano, la unidad funcional fundamental del hueso compacto. Las osteonas tienen un diámetro de aproximadamente 100 a 250 micrómetros²⁷.

A nivel macroscópico, podemos diferenciar entre hueso compacto o cortical y hueso trabecular o esponjoso. Todos los huesos presentan una capa externa de hueso compacto, cuyo grosor puede variar incluso en un mismo hueso, y una cantidad variable de hueso trabecular que suele rellenar la cavidad medular del hueso especialmente a nivel epifisario. Ambos tipos de hueso están formados por las lamelas y solo se diferencian en cuanto a la disposición de estas lamelas en cada uno. En el hueso compacto, las lamelas están dispuestas de forma cilíndrica formando los sistemas osteonales. En el hueso trabecular o esponjoso, las lamelas están dispuestas de forma longitudinal e interconectadas de forma irregular, formando lo que se conoce por trabécula, que tiene un grosor de unos 200 μm (Figura 2.5.)²⁷.

El hueso compacto constituye aproximadamente el 80% del total del esqueleto y forma la parte externa de los huesos. Es un tejido óseo denso, con una porosidad bastante baja respecto al hueso esponjoso, de aproximadamente 5 a 10%. Esta porosidad se compone fundamentalmente por los canales Haversianos, los canales de Volkmann y las cavidades de reabsorción. El tamaño de poro en el hueso cortical es de unas 10 a 300 micras. Además, es un tejido óseo poco activo a nivel metabólico²⁷. El hueso esponjoso constituye aproximadamente el 20% del esqueleto y se localiza dentro de la epífisis de los huesos largos, los cuerpos vertebrales, pelvis y huesos planos. En comparación con el hueso compacto, es un hueso metabólicamente muy

activo y mucho más poroso. En general, el hueso esponjoso tiene menos cantidad de componente mineral que el hueso compacto. Tiene una porosidad de entre un 75 y 95%. Los poros interconectados de este tipo de hueso, con un tamaño de entre 200 y 600 μm , están rellenos con médula ósea roja. Los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes y oxígeno entre la sangre y los osteocitos²⁷.

La estructura jerárquica confiere al hueso sus propiedades mecánicas. Los constituyentes orgánicos e inorgánicos actuando en conjunto confieren al hueso unas excepcionales propiedades viscoelásticas y resistencia a las fracturas. Se han visto grandes diferencias entre las propiedades mecánicas entre hueso cortical y hueso esponjoso. En el hueso cortical, las propiedades mecánicas dependen de la porosidad, el nivel de mineralización y la organización de la matriz sólida. Se trata de un hueso con una alta resistencia a fuerzas de torsión y flexión y su función es principalmente mecánica y protectora. Además, las propiedades mecánicas varían mucho entre un hueso y otro incluso entre diferentes zonas de un mismo hueso. Por el contrario, apenas se han descrito diferencias entre el componente esponjoso de distintos huesos²⁷.

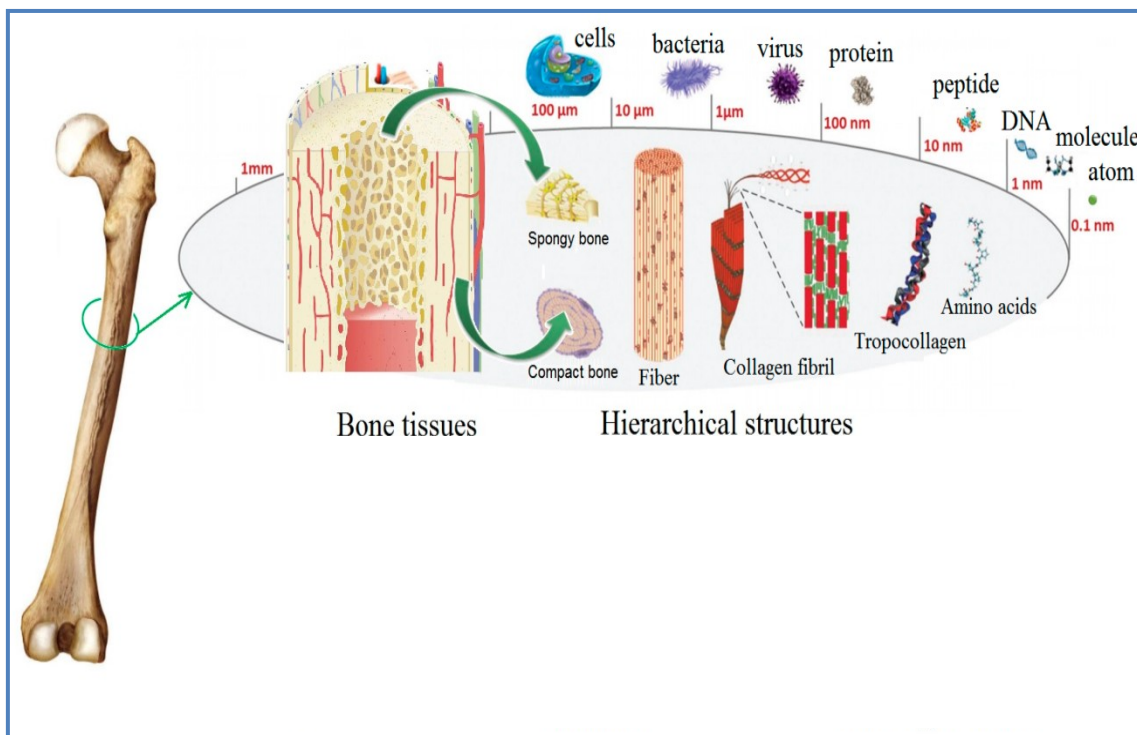


Figura 2. 5. Estructura jerárquica del hueso.²⁸

2.5. Biología del hueso

2.5.1. Osteogénesis

La osteogénesis es el proceso a través del cual se produce la formación de tejido óseo. Pueden diferenciarse dos procesos de formación ósea, la osificación intramembranosa y la osificación endocondral. Ambas implican la transformación de un tejido mesenquimal preexistente en tejido óseo, pero en la osificación intramembranosa esa transformación es directa y en cambio en la osificación endocondral las células mesenquimales se diferencian primero a cartílago y este cartílago, una vez calcificado es remodelado por hueso.

a) Osificación intramembranosa

La osificación intramembranosa da lugar a los huesos planos y consiste en una conversión directa de tejido mesenquimal indiferenciado a tejido óseo²⁹. El proceso comienza cuando células mesenquimales se empiezan a agregar y formar tejido mesenquimal aislado. Este agrupado de células mesenquimales se diferencia en osteoblastos. Los osteoblastos se agrupan y se forma un centro de osificación. Posteriormente empiezan a segregar osteoide, una matriz de proteoglicanos y colágeno tipo I el cual puede fijar calcio en forma de cristales de hidroxapatita. La unión del calcio al osteoide provoca que éste se endurezca y los osteoblastos que se quedan atrapados en el osteoide se transformen en osteocitos.

A medida que el resto de los osteoblastos continúan secretando el osteoide, éste se rodea de vasos sanguíneos y empiezan a formarse trabéculas de hueso inmaduro o fibroreticular (*woven bone*). El hueso fibroreticular sufre un proceso de remodelación ósea consistente en la substitución progresiva mediante ataque osteoclástico del hueso fibroreticular antiguo por hueso lamelar u osteonal nuevo gracias a la estimulación de la actividad osteoblástica constituyendo finalmente el hueso compacto o cortical definitivo. En ciertas circunstancias, el hueso lamelar u osteonal se puede llegar a formar directamente sin la fase intermedia de hueso fibroreticular³².

Durante este proceso se expresan diversos factores, entre ellos el factor de transcripción CBFA1, así como proteínas morfogénicas BMP2, BMP4 y BMP7. Se

sospecha que las proteínas morfogénicas óseas (BMP) ayudan a las células mesenquimales derivadas de la cresta neural a convertirse directamente en células óseas³⁰. Las BMPs activan el gen del factor de transcripción CBFA1 localizado en las células mesenquimales, siendo aquél el responsable del proceso de transformación de la célula mesenquimal en osteoblasto.

b) Osificación endocondral

La osificación endocondral consiste en la formación de tejido cartilaginoso a partir de un agregado de células mesenquimales y la posterior sustitución de este cartílago, una vez calcificado, por tejido óseo. La osificación endocondral da lugar a los huesos largos, que representan la mayor parte de los huesos del cuerpo. Dicho proceso comienza cuando las células madre mesenquimales de la cresta neural proliferan y se condensan, formando un molde de cartílago rodeado por el pericondrio, una fuente primaria de condroblastos. Dirigidas por los factores de transcripción Sox9 y Runx2, estas células se diferencian en condrocitos y comienzan a secretar componentes de la matriz extracelular ricos en agarosano y colágeno IIa1 (cartílago hialino). La expresión de Runx2 en una población específica de condrocitos genera una zona hipertrófica. Los condrocitos hipertróficos sintetizan colágeno X, promueven la mineralización directa del cartílago e inducen a las células pericondriales adyacentes a diferenciarse en osteoblastos, un paso clave en la formación de hueso endocondral³¹. Finalmente, y tras la actividad osteoclástica, los vasos sanguíneos que producen factor de crecimiento endotelial vascular y otros factores, invaden el molde de cartílago mineralizado permitiendo la migración de células precursoras de osteoblastos. Seguidamente, se produce la apoptosis de los condrocitos hipertróficos y los espacios resultantes son invadidos por los vasos sanguíneos neoformados, permitiendo la migración de osteoclastos y osteoblastos para comenzar a generar capas de matriz ósea.³¹

El lugar del molde cartilaginoso que se osifica primero (normalmente la diáfisis de hueso largo) es lo que se llama el **centro de osificación primaria**³². En los huesos largos, la osificación endocondral se propaga a lo largo de axis vertical del hueso en desarrollo, en ambas direcciones a partir del centro de osificación primaria. A medida que el hueso crece en longitud, se forman **centros de osificación secundarios** en los

extremos del hueso. Una vez formados los centros de osificación secundarios, se mantiene un área de cartílago entre el centro primario y el secundario. El centro de osificación secundario se convierte en la epífisis del hueso y el primario en la diáfisis. El cartílago que se mantiene entre ambos centros es la placa de crecimiento epifisaria.

2.5.2. Remodelación ósea

El hueso es sometido a remodelación constante a lo largo de su vida. Esto implica el equilibrio entre la reabsorción de hueso ya existente y la formación de hueso nuevo. Es un proceso clave durante el cual el hueso neoformado crece adaptándose a las necesidades mecánicas y a la actividad del individuo mientras que se mantiene un volumen óseo total constante, una integridad estructural y las funciones metabólicas. Además, la remodelación mantiene los niveles de calcio sérico en un rango fisiológico al liberar este mineral de la matriz ósea cuando es requerido.³³ Si no existiese esta remodelación, el hueso agotaría sus límites de tolerancia en muy poco tiempo. Se ha visto que hay una íntima relación entre los osteoblastos y osteoclastos y que uno puede activar al otro. Este balance entre la formación y reabsorción del hueso está controlado por muchos factores como p.ej. factores genéticos, vasculares, nutricionales, hormonales y mecánicos.

Está demostrado que se regenera completamente un 10% del hueso trabecular metabólicamente activo y un 3% del hueso cortical en un año³⁴. La remodelación es distinta en el hueso cortical que en el hueso esponjoso. En el hueso trabecular, la remodelación se produce en la superficie del hueso mientras que en el hueso cortical se lleva a cabo mediante los osteoclastos a través de la matriz ósea.

La remodelación requiere de la interacción de muchas células que responden a determinados estímulos mecánicos y que están regulados por diversas proteínas óseas y factores de crecimiento paracrinos y autocrinos. La reabsorción y la formación de tejido nuevo muchas veces se describe como procesos independientes, pero está demostrado que están íntimamente ligados el uno al otro por una estructura única y compleja llamada unidad multicelular básica (UMB)⁶. Esta unidad completamente desarrollada, está constituida por un grupo de osteoclastos seguidos

de un grupo de osteoblastos, un aporte vascular y tejido conectivo asociado. Una única UMB contiene osteoclastos multinucleados que van reabsorbiendo la matriz ósea en la parte delantera de la UMB y osteoblastos activos en la parte trasera que van formando el osteoide que posteriormente se mineraliza para formar nueva matriz ósea.

A medida que avanza la UMB, los osteoclastos que reabsorben van abriendo un espacio vacío en la matriz ósea llamada “cono de corte” o “*cutting cone*” mientras que los osteoblastos reducen el espacio vacío a medida que vayan creando hueso nuevo formando lo que se llama el “cono de cierre” o “*closing cone*”. La UMB es una estructura cilíndrica alargada que va excavando a través del hueso cortical, generalmente en dirección a lo largo del eje largo del hueso. Mide aproximadamente 2mm de longitud y 200µm de diámetro³³.

En el hueso esponjoso, la UMB se encuentra en la superficie y se cubre con un recubrimiento predominantemente de origen de células mesenquimales, con osteoclastos que reabsorben una gran cantidad del hueso. La superficie reabsorbida posteriormente es limpiada mediante las células de revestimiento y por macrófagos y luego precursores de osteoblastos se diferencian para rellenar el espacio que se ha reabsorbido (Figura 2.6.)³⁵. La actividad de reabsorción de la UMB en una persona adulta tarda aproximadamente 3 semanas y la respuesta de formación de hueso nuevo alrededor de 3-4 meses. El proceso es tal que se reemplaza alrededor de un 5 al 10 % de todo el esqueleto cada año.

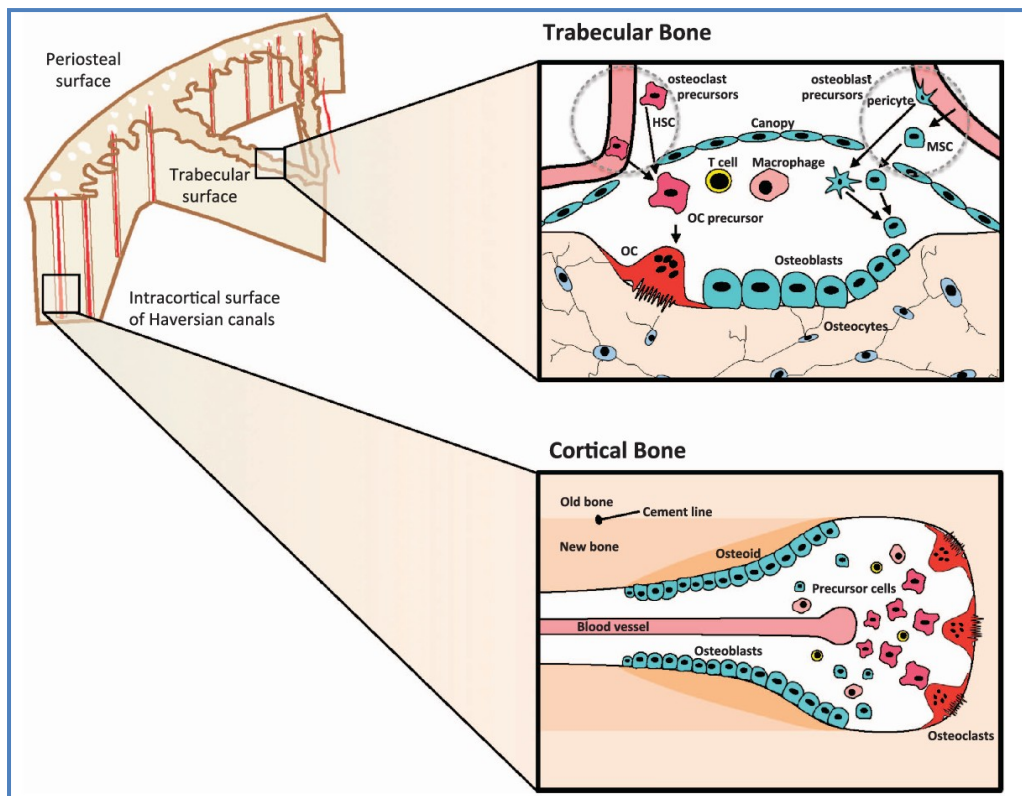


Figura 2. 6. Proceso de remodelación ósea en el hueso trabecular y en el hueso cortical.³⁵

El proceso de remodelación ósea se puede dividir en 6 fases: inactividad, activación, reabsorción, reversión, formación y mineralización.

a) Inactividad/activación

El hueso inactivo empieza el proceso de remodelación normalmente al ser activado por señales paracrinas como p.ej. la hormona paratiroidea (PTH) o por ejemplo por microfracturas o alteraciones en la carga mecánica. Las células de revestimiento óseo que son células inactivas, se activan por estas señales y se convierten en osteoblastos. Como consecuencia, las células de revestimiento aumentan la expresión de receptores RANKL en su superficie, que a su vez interactúan con receptores RANK expresados por las células pre-osteoclasticas. La interacción RANKL / RANK desencadena la fusión y diferenciación de pre-osteoclastos en osteoclastos multinucleados³⁶.

b) Reabsorción

Una vez que los osteoclastos se hayan diferenciado, se polarizan y se adhieren a la superficie del hueso y empiezan a reabsorber el tejido. Esta función se lleva a cabo en dos fases: la acidificación de la matriz ósea para disolver los componentes

inorgánicos y, en segundo lugar, la liberación de enzimas lisosomales, como por ejemplo Catepsina K y MMP, ambos a cargo de la degradación de los componentes orgánicos del hueso. Una vez que los osteoclastos han llevado a cabo su función, se produce su apoptosis, necesaria para evitar una excesiva reabsorción ósea³⁷.

c) Reversión

La fase de reversión no resulta del todo clara, pero se cree que en esta fase se produce la eliminación de detritus producidos durante la degradación de la matriz y se crea un entorno para acoplar la fase de reabsorción con la fase de formación ósea creando un entorno osteogénico propicio mediante la liberación de señales osteogénicas por parte de los osteoclastos³⁸.

d) Formación

En la zona previa de reabsorción se empiezan a acumular células madre que se diferencian en preosteoblastos y finalmente en osteoblastos maduros. Este proceso está controlado por factores de crecimiento, diversos complejos moleculares y hormonas (PTH). Los osteoblastos maduros, empiezan el proceso de formación de tejido óseo nuevo produciendo matriz orgánica en forma de osteoide³⁶.

e) Mineralización

La matriz ósea, formada por los osteoblastos e inicialmente no mineralizada (osteoide), se empieza a mineralizar con calcio y fósforo, transformándose en tejido óseo neoformado. Este proceso se produce pocos días después del depósito de osteoide³⁹. Una vez completado el depósito de hueso, dentro de la matriz ósea quedan atrapados algunos osteoblastos que se diferencian en osteocitos, mientras que otros se quedan en la superficie ósea cuando dejan de depositar osteoide y se convierten en células de revestimiento.

Tras haber revisado los procesos fisiológicos de formación y remodelación ósea, a continuación revisaremos cómo se produce el proceso de cicatrización de un hueso tras una fractura o la creación de un defecto óseo.

2.6. Consolidación ósea

La consolidación es un proceso único y complejo donde se produce osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis por parte de la acción de diversas células, citoquinas y factores de crecimiento. A diferencia de la mayoría de los tejidos que pasan por la formación de un tejido fibroso cicatricial, el resultado final del proceso de consolidación ósea es la regeneración completa de la anatomía del hueso y la recuperación de su función normal. Dependiendo del traumatismo inicial y dependiendo del microentorno tanto mecánico como biológico, la consolidación ósea se puede producir de forma directa o indirecta, siendo esta última la más frecuente⁴⁰.

2.6.1. Consolidación directa

La consolidación directa es poco común en un proceso natural de consolidación y básicamente consiste en la curación del hueso lesionado sin presencia de ningún otro tipo de tejido no óseo durante todo el proceso. Este tipo de consolidación resulta muy exigente en cuanto a las condiciones necesarias para que tenga lugar puesto que se precisa una reducción anatómica casi perfecta sin prácticamente espacio entre los extremos de los huesos fracturados, una vascularización óptima y una fijación interna muy rígida. Este tipo de consolidación se puede alcanzar tratando la fractura quirúrgicamente mediante una reducción abierta para asegurar una aposición perfecta de los fragmentos y una fijación interna muy estable. La consolidación ósea directa es una consolidación lenta que puede demorarse muchos meses hasta completar la consolidación y conseguir un hueso con las características anatómicas, estructurales y mecánicas que presentaba antes de la fractura.⁴⁰

La consolidación directa de las fracturas presenta dos variantes, la consolidación por contacto ("*contact healing*") o la consolidación con separación ("*gap healing*"). Ambos tipos igualmente contemplan la formación directa de una estructura biomecánicamente funcional y anatómicamente correcta, aunque la consolidación por contacto produce tejido lamelar directamente y en cambio la consolidación con separación produce primero una interfase de tejido óseo fibroreticular (Figura 2.7.).

a) *Consolidación por contacto*

Este tipo de consolidación ocurre cuando el espacio interfragmentario tiene un máximo de 0,01 mm y la tensión interfragmentaria máxima es de un 2%. Para ello tiene que existir una perfecta reducción anatómica con tensión de compresión en la zona de la fractura y un excelente aporte vascular. Bajo estas condiciones, los osteoclastos forman los conos cortantes al final de la osteona y atraviesan la línea de fractura generando cavidades longitudinales con una velocidad de 50-100µm al día. Estas cavidades se rellenan posteriormente con hueso neoformado por parte de los osteoblastos. Así se produce simultáneamente la unión ósea y la restitución de los sistemas harvesianos en la dirección del eje central del hueso, con lo que no hay formación de un callo perióstico sino directamente se forma hueso de tipo osteonal⁴⁰.

b) *Consolidación con separación*

Cuando además de una buena vascularización y de una reducción rígida, los extremos óseos no están en total contacto como en el caso anterior sino que existe una separación no mayor de 800µm a 1mm entre los extremos de la fractura, ésta consolida mediante la llamada consolidación con separación. En estos casos el extremo de la fractura primero se rellena con matriz osteoide elaborada por los osteoblastos cercanos, creando hueso fibroreticular (*woven bone*) el cual se orienta perpendicular al axis largo del hueso. Esta fase dura entre 3 a 8 semanas. En una segunda fase este tejido óseo inmaduro es sustituido por tejido lamelar osteonal por la acción de los *cutting cones* lo que asegura la recuperación de todas las propiedades anatómicas y biomecánicas de la zona ósea afectada ⁴⁰.

A pesar de que este proceso de osificación ocurre en dos fases consecutivas, no se considera una osificación indirecta ya que en todo momento las células participantes son de tipo óseo⁴¹.

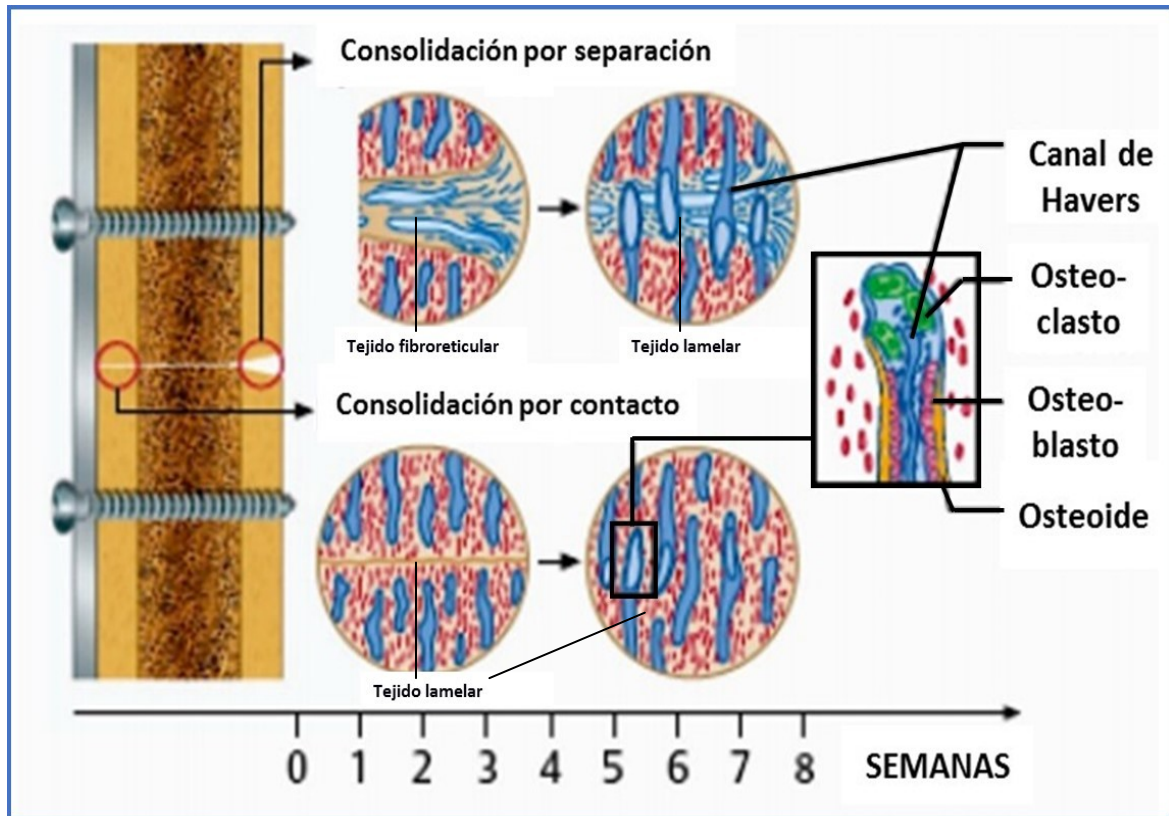


Figura 2.7. Consolidación directa: por contacto y por separación. Fuente: <https://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss1235.pdf>

2.6.2. Consolidación indirecta

La consolidación por osificación indirecta es la forma más frecuente de consolidación ósea puesto que sus requisitos microambientales son menos exigentes. Este proceso sigue el mecanismo de osificación endocondral y requiere una vascularización suficiente pero no óptima, una reducción de los fragmentos adecuada pero no anatómica y una fijación estable pero no rígida. Por lo tanto, se acepta un cierto grado de micro-movimiento en la zona de la fractura, pero también se sabe que demasiado movimiento y/o carga puede producir una consolidación retardada o incluso una no-unción. Este tipo de consolidación es frecuente en fracturas no operadas quirúrgicamente y en algunas soluciones quirúrgicas de las fracturas como por ejemplo en caso de fijadores externos, clavos intramedulares o fracturas conminutas tratadas con una placa. La osificación indirecta consiste en una reacción inflamatoria inicial, seguida de formación de tejido cartilaginoso o condroide y su posterior reemplazo por hueso fibroreticular y finalmente por hueso de tipo lamelar³³.

Hay 3 fases principales en este tipo de osificación: una fase inflamatoria, una fase de reparación y finalmente una fase de remodelación ósea (Figura 2.8.).

a) Fase inflamatoria

En el momento de producirse el traumatismo, se produce una interrupción del aporte vascular, tanto a nivel del hueso como en los tejidos blandos circundantes, la cual conlleva a una necrosis local y exudación de proteínas, líquidos y células sanguíneas.⁴² Estos procesos ayudan a la formación de un coágulo de sangre el cual a su vez inicia una respuesta inflamatoria reclutando células inflamatorias del sistema inmune necesarias para comenzar el proceso de curación. Al final se produce un reclutamiento y proliferación de células madres mesenquimales y osteoprogenitoras debido a la liberación de citoquinas con potencial osteogénico. Esta respuesta inflamatoria tiene lugar en las primeras 24 horas y dura hasta 7 días. El proceso termina cuando hay un coágulo maduro en los extremos de la fractura y en sus alrededores, formando un tejido de granulación rico en nuevos vasos sanguíneos procedentes inicialmente de los tejidos blandos perifracturarios, necesarios para la formación del callo⁴².

b) Fase de reparación

La fase más importante de la consolidación indirecta es la formación de un callo cartilaginoso o de tejido condroide en algunas circunstancias. A partir del tejido de granulación, se produce la formación endocondral en los extremos de la fractura y en su parte exterior en la zona del periostio. Estas zonas son biomecánicamente poco estables y el tejido cartilaginoso forma un callo cartilaginoso primario blando que ayuda a dar estabilidad a la fractura. Si este callo produce suficiente estabilidad, se calcificará aumentando así la estabilidad interfragmentaria de la fractura. En el caso que las condiciones de vascularización y estabilidad sean adecuadas, se puede desarrollar tejido condroide sobre el que se genera directamente un callo de tejido óseo fibroreticular y finalmente lamelar⁴³.

Aunque en zonas con unas condiciones microambientales ideales de vascularización y estabilidad como las inmediaciones de los extremos de los huesos fracturados, se pueden formar áreas directamente de hueso fibroreticular, en el centro del callo, se

genera neovascularización y migración de osteoclastos que degradan la matriz cartilaginosa calcificada dejando espacios vasculares que luego serán colonizados por osteoblastos, que son los que finalmente generaran la matriz ósea. A medida que se produce un callo más duro y el cartílago calcificado es reemplazado por hueso fibroreticular, el callo se vuelve más sólido y mecánicamente competente ⁴³. La generación de este callo es dependiente del reclutamiento de células madre mesenquimales del tejido blando circundante, de la cortical, del periostio y de la médula ósea igual que de la movilización de estas células a través del aporte vascular periférico⁴⁰. Además, el callo tiene diferentes tejidos en diferentes localizaciones de la zona de fractura dependiendo de las condiciones microambientales en cada área (factores biológicos y mecánicos). Por ejemplo, se ha descrito una proliferación de osteoprogenitores o células condroides en áreas con un aporte de oxígeno aumentado y baja tensión, ayudando a la formación temprana de tejido fibroreticular. En cambio, en zonas con un bajo aporte de oxígeno y una tensión aumentada, se produce tejido cartilaginoso debido a la diferenciación de los condrocitos y el proceso de osificación endocondral consecuente⁴⁴.

c) Fase de remodelación

En esta última fase el hueso se adapta a las condiciones de fuerza y carga a las que está sometido. El callo calcificado es una estructura rígida que aporta estabilidad biomecánica pero no concede todas las propiedades biomecánicas necesarias como presenta un hueso lamelar maduro. Para conseguir eso, se comienza una segunda fase de reabsorción para convertir en este caso el callo de tejido fibroreticular en hueso lamelar maduro con su cavidad medular.

En esta fase se produce un balance entre la reabsorción del callo mediante los osteoclastos y la deposición de tejido lamelar mediante los osteoblastos. Este proceso suele empezar a las 3-4 semanas de haberse producido el traumatismo, tanto en animales como en seres humanos, pero luego puede tardar varios años en completar esta fase y conseguir una estructura ósea completamente regenerada. Este proceso suele ser más rápido en animales más jóvenes⁴⁰.

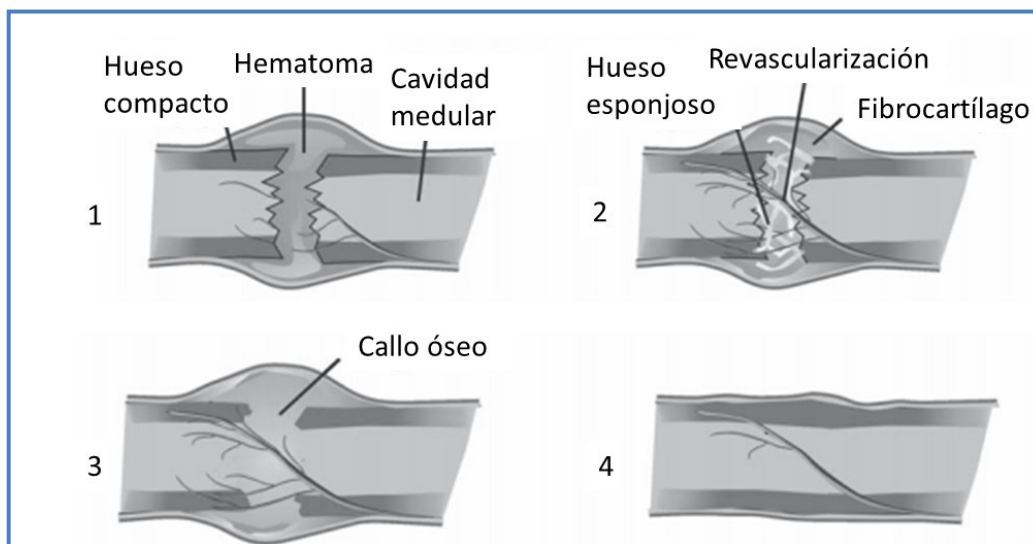


Figura 2. 8. Etapas de la consolidación ósea indirecta.⁴⁵

1) Fase inflamatoria con formación del hematoma.

2) Fase de reparación con la formación de un callo de fibrocartilago.

3) Fase de reparación con la formación de un callo óseo.

4) Fase de remodelación donde el tejido fibroreticular es sustituido por tejido lamelar y desaparece el callo

2.6.3. Fallos en la consolidación ósea

Cuando una fractura no tiene un ambiente biológico y/o mecánico adecuado, se pueden producir fallos en la consolidación. En medicina humana se considera que, si una fractura no está consolidada pasados los 4 meses, se puede hablar de una consolidación retardada. Si a los 6 meses no se ha producido una correcta consolidación ósea, se puede considerar una no-unió⁴⁶.

Hay dos tipos de no-uniones: la no-unió hipertrófica y la no-unió atrófica. Cuando un callo óseo no aporta suficiente estabilidad interfragmentaria, no se puede calcificar y en consecuencia la cascada de la consolidación ósea se ve interrumpida. Esto produce una no-unió hipertrófica la cual muchas veces se debe a una inadecuada fijación de la fractura y se puede solucionar con una inmovilización más rígida. Cuando la consolidación se ve afectada por un problema vascular o una causa metabólica, directamente no se forma ningún callo y se produce una no-unió atrófica (Figura 2.9.). También hay causas mecánicas en el desarrollo de no-uniones atróficas como por ejemplo fuerzas de compresión insuficientes o defectos óseos demasiado grandes para que se puedan unir los dos extremos de la fractura⁴⁶.

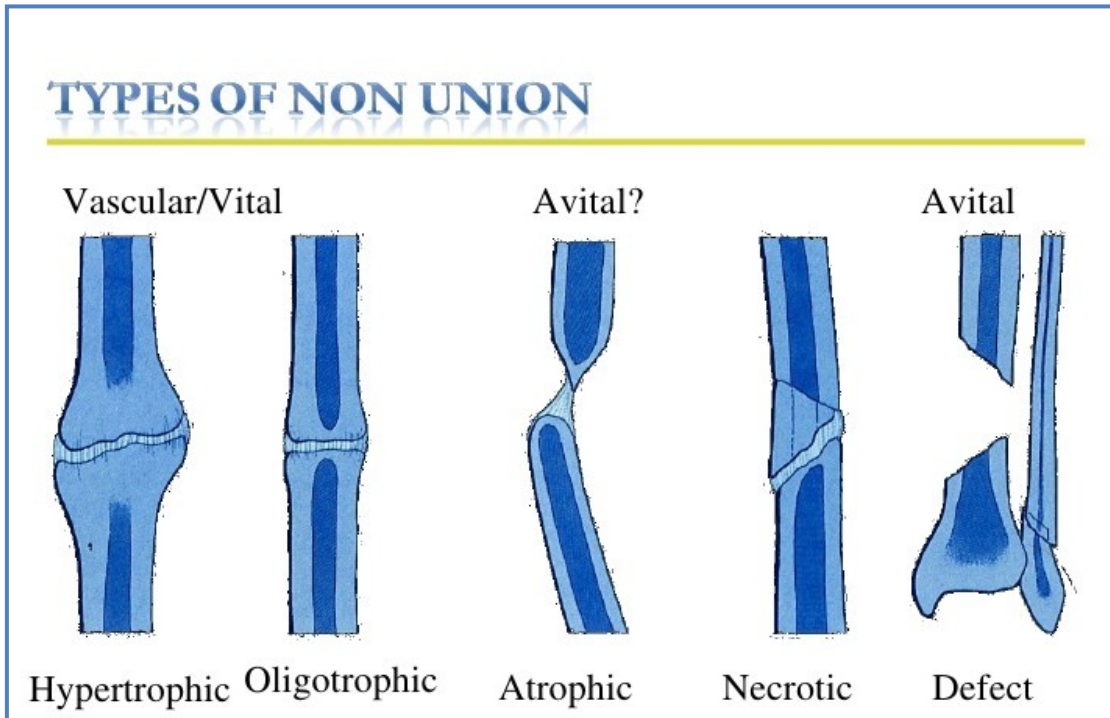


Figura 2. 9. Fallos en la consolidación ósea. Fuente: AOFundation

2.7. Biomateriales

La ciencia de los biomateriales es la rama de la ingeniería biomédica que se encarga del estudio de la síntesis, composición y evaluación de los materiales empleados para la fabricación de dispositivos que entran en contacto con los tejidos vivos. Un biomaterial es cualquier sustancia que ha sido diseñada para interactuar con los sistemas biológicos con un propósito médico, ya sea terapéutico o de diagnóstico.

La evolución de la civilización humana, sin duda, ha provocado el desarrollo de biomateriales, que involucran diferentes materiales, con el objetivo de extender y mejorar la calidad de la vida humana. La primera prótesis de la que se tiene constancia es una implantación realizada durante el Neolítico, hace unos 9 000 años. Este hallazgo tuvo lugar en el poblado de Fahid Suarda, en Argelia donde se encontró el cráneo de una mujer joven que presentaba un fragmento de falange de un dedo introducido en el alvéolo del segundo premolar superior derecho.⁴⁷ Además, hace ya más de mil años, el oro y el hierro se usaban para aplicaciones dentales, mientras que la plata en sus diferentes formas se usaba como agente antimicrobiano para prevenir la infección (Figura 2.10.)⁴⁷. Los mayas, por ejemplo, elaboraron dientes de nácar a

partir de conchas de mar sobre el año 600dC y aparentemente lograron lo que ahora se conoce por osteointegración al conseguir una integración perfecta en el hueso⁴⁸. También se pueden encontrar evidencias de diferentes tipos de procedimientos quirúrgicos durante las primeras etapas de la civilización.

Sin embargo, probablemente los desarrollos más significativos tuvieron lugar en el campo de los biomateriales en el siglo XX. Desde principios del siglo XX, las placas metálicas se han utilizado para estabilizar las fracturas de huesos largos con el objetivo de una curación más rápida y funcional. Debido a los reemplazos articulares y diferentes dispositivos cardiovasculares, se ha mejorado la calidad de vida de millones de personas. En este siglo, la ingeniería de tejidos y la regeneración de órganos son los principales temas científicos en el campo de la investigación biomaterial⁴⁹.



Figura 2. 10. Yacimiento de La Chêne, al norte de Francia correspondiente a una joven que murió en el año 250 a.C. Descubrieron entre otras cosas, 32 dientes, uno de ellos de metal.

Los biomateriales se pueden derivar de la naturaleza o sintetizar en el laboratorio utilizando una variedad de enfoques químicos que utilizan componentes metálicos, polímeros, cerámicas o materiales compuestos. Pueden tener una función pasiva, usándose solo como soporte o pueden tener una función más bioactiva como por ejemplo estimulando el crecimiento óseo. La capacidad de un biomaterial para inducir una respuesta fisiológica que apoye la función y el rendimiento del biomaterial se conoce como bioactividad. El concepto de bioactividad fue introducido por primera vez en el año 1970 por Hench *et al.* al descubrir un tipo de cristal (hoy en día llamado Bioglass® 45S5) que tenía la capacidad de unirse al tejido circundante

después de ser implantado⁵⁰. Más tarde, este concepto se extendió a otros materiales como vidrios bioactivos, cerámicas bioactivas o metales bioactivos y hoy en día este término se refiere a la capacidad de los materiales implantados para unirse adecuadamente al tejido circundante, ya sea en funciones osteoconductoras u osteoproducción. Los materiales de los implantes óseos a menudo están diseñados para promover el crecimiento óseo con lo cual es conveniente que los biomateriales tengan una buena biocompatibilidad junto con una buena resistencia y una baja tasa de corrosión. Hay biomateriales bioestables, es decir, que no se reabsorben con el tiempo y biomateriales biodegradables que tienen una funcionalidad adecuada durante un tiempo hasta que finalmente se reabsorben.

Inicialmente, los biomateriales de 1ª generación debían ser biocompatibles. A lo largo del tiempo, este concepto cambió con los biomateriales de segunda generación, biocompatibles y biofuncionales hasta llegar hoy en día a la tercera generación de biomateriales que son, a parte de biocompatibles y biofuncionales, bioactivos.

Como biocompatibilidad se entiende la propiedad de los materiales para ser biológicamente aceptables, es decir, aceptados por el organismo sin provocar rechazo, que no sean tóxicos y que sean inertes o químicamente estables. Los requerimientos para ser un biomaterial son complejos y estrictos y varían con las aplicaciones médicas específicas. Por ejemplo, un material biocompatible para las cirugías ortopédicas puede ser no apropiado para aplicaciones cardiovasculares debido a sus propiedades trombogénicas. Los biomateriales tienen que ser no-tóxicos y no causar ninguna reacción inflamatoria o alérgica en el cuerpo. No deberían ser ni citotóxicos, ni carcinogénicos, ni mutagénicos, ni alergénicos ni tampoco trombogénicos⁵¹.

La biofuncionalidad es la capacidad de un material para desempeñar la función para la que ha sido creado, teniendo determinadas propiedades mecánicas, densidad, peso y diseño adecuados. Además, tiene que presentar un adecuado impacto físico sobre los tejidos circundantes para poder ser biofuncional⁵¹.

La bioactividad es la integración con moléculas biológicas, regeneración del tejido y capacidad de responder a señales provenientes del medio induciendo una respuesta específica del tejido biológico circundante⁵².

Además, uno de los requerimientos de un implante es la habilidad de formar una unidad mecánica adecuadamente estable con el tejido circundante. Un implante inestable puede disminuir su funcionalidad o directamente no ser funcional o puede inducir una respuesta tisular excesiva además de poder producir malestar y dolor en el paciente. De ahí la importancia que los materiales para los implantes sean mecánicamente compatibles con las propiedades mecánicas del tejido que los recibe. Esta propiedad es conocida como compatibilidad mecánica.

En general, podemos distinguir tres grandes grupos de biomateriales: los cerámicos, los poliméricos y los metálicos.

2.7.1. Biocerámicas

Las biocerámicas son productos inorgánicos, no metálicos que se generan por un tratamiento térmico y posterior enfriamiento llamado sinterización⁵³. Se introdujeron en la década de los 70, cuando se comenzaban a detectar fracasos en los biomateriales utilizados hasta ese momento, como el acero, aleaciones de cobalto y polimetilmetacrilato. El fracaso se debía, entre otras razones, a la encapsulación de estos materiales, lo que hizo dirigir la mirada hacia las cerámicas, en un intento de buscar una buena osteointegración. Sin embargo, la fragilidad de las biocerámicas restringió, en gran medida, su campo de aplicación, seleccionando sólo funciones que no necesitaran elevadas prestaciones mecánicas. Las principales biocerámicas son alúmina, zirconio, fosfatos de calcio, hidroxiapatita, porcelanas y vidrios bioactivos. También existen los llamados *Composites*, que son materiales compuestos, conteniendo 2 o más materiales constituyentes diferentes o fases y los *Nanocomposites* que es un material multifase sólido donde una de las fases tiene una, dos o tres dimensiones de menos de 100 nm. Las principales aplicaciones de los implantes biocerámicos se centran en el campo de la traumatología, odontología y cirugía cráneoaraquídea⁵⁴.

2.7.2. Biomateriales poliméricos

En lo que respecta a los biomateriales poliméricos, existe una gran variedad de polímeros biocompatibles: los polímeros naturales, como por ejemplo la celulosa, glucosalina, etcétera, y polímeros sintéticos, como, por ejemplo, polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE), PVC, nylon, silicona, etcétera. El desarrollo de los biopolímeros en las aplicaciones incluye prótesis faciales, componentes de prótesis de oído así como otras aplicaciones para afecciones dentales, renales, hepáticas, pulmonares y para marcapasos. Asimismo, delgadas películas y capas de PVC se utilizan en bolsas de almacenamiento y empaquetamiento quirúrgico de sangre y otras soluciones; partes de esófago, segmentos de arterias, suturas biodegradables, componentes de implantes articulares en dedos, acetábulo de cadera y rodilla, entre otros⁵⁵.

2.7.3. Biomateriales metálicos

En la década de 1920, Reiner Erdle y Charles Orange, quienes unieron sus conocimientos de odontología y metalurgia respectivamente, desarrollaron la aleación Vitallium, que fue el primer biomaterial de aleación metálica con características mecánicas de biocompatibilidad y de resistencia a la corrosión, utilizables para aplicaciones en prótesis quirúrgicas. Esta aleación de cobalto fue el punto de partida para una serie de investigaciones multidisciplinarias en el desarrollo de nuevas aplicaciones ortopédicas, como clavos, tornillos y fijadores externos, además de varios tipos de implantes de reemplazo articular, como cadera, rodilla, hombro, codo, entre otras. Posteriormente, en la década de 1930 se desarrolló el acero inoxidable quirúrgico⁵⁶. Otras aleaciones que han tomado gran importancia para aplicaciones médicas para implantes quirúrgicos son las de base de titanio.

En la actualidad, para todas aquellas aplicaciones clínicas que requieran soportar carga se están utilizando mayoritariamente implantes metálicos. La principal ventaja de los biomateriales metálicos reside en su gran resistencia, además en su rigidez y dureza. Los metales son más adecuados para aplicaciones de carga en comparación con materiales cerámicos o polímeros debido a su combinación de alta resistencia

mecánica y resistencia a la fractura (Figura 2.11.). Como biomateriales, se utilizan principalmente para aplicaciones ortopédicas y dentales. Los materiales metálicos han sido indispensables en la cirugía ortopédica, desempeñando un papel importante en la mayoría de los dispositivos ortopédicos, incluidos los implantes temporales (placas óseas, tornillos y clavijas) y permanentes (reemplazos totales de articulaciones). Este tipo de biomaterial también ha encontrado amplias aplicaciones en endodoncia y ortodoncia para empastes de dientes, raíces y dentaduras postizas. Los metales se utilizan en odontología debido a su resistencia y durabilidad. También se utilizan para endoprótesis vasculares y para ingeniería y regeneración de tejidos⁵⁶.

Materiales	Módulo Elástico (Mpa)	Resistencia (Mpa)	Deformación Máxima (%)	Densidad (g/cm ³)
Polímeros				
Silicona	1-10	6-7	350-360	1.12-1.23
Nailon	2,800	76	90	1.14
UHMW polietileno	1,500	34	200-250	0.93-0.94
PMMA	60	60	1-3	1.10-1.23
Metales				
Aceros Inoxidable 316L	200,000	540-620	55-60	7.9
Co-Cr	230,000	900	60	9.2
Ti6Al4V	110,000	900	10	4.5
Cerámicas y carbones				
Al ₂ O ₃	363,000	490	<1	3.9
Carbón pirolítico	280,000	517	<1	1.5-2.0
Hidroxiapatita	120,000	150	<1	3.2
Tejidos				
Piel	0.34/38	7.6	60	1.0
Hueso(fémur)	17,200	121	1	2.0
Diente(dentina)	13,800	138	<1	1.9

Figura 2. 11. Propiedades mecánicas de los biomateriales

Sin embargo, los biomateriales metálicos también presentan una serie de inconvenientes que pueden generar problemas importantes debido a:

- la gran diferencia de propiedades mecánicas entre el implante artificial y el hueso natural, lo que da lugar a rupturas,
- la presencia de iones que, procediendo del implante artificial, pueden ser tóxicos o perjudiciales y son causa de dolor
- la imposibilidad de regenerar el hueso natural

Además, independientemente de la gran cantidad de metales y aleaciones metálicas disponibles y de su capacidad de procesamiento, sólo unos pocos son biocompatibles y pueden ser aplicados a largo plazo como material de implante. El diseño y la selección del metal más adecuado dependen de su aplicación médica específica. Los implantes y los dispositivos protésicos deben cumplir varios requisitos importantes para que puedan tener éxito durante su uso a largo plazo en el cuerpo sin rechazo ni fallos mínimos. Para obtener una adecuada funcionalidad y efectividad, los implantes metálicos deben presentar características tales como: **excelente biocompatibilidad, propiedades mecánicas adecuadas, alta resistencia a la corrosión, alta resistencia al desgaste** y en la medida de lo posible deberían favorecer la **integración ósea** (en el caso de implantes para tejido óseo)⁵⁶.

La corrosión se define como el deterioro de un material a consecuencia de un ataque electroquímico por su entorno. El entorno en el interior del cuerpo humano o del animal es física y químicamente diferente a las condiciones del ambiente externo. Como consecuencia, el metal que se comporta bien en contacto con el aire puede sufrir una corrosión severa en el interior del cuerpo. La resistencia a la corrosión determina la vida media del implante y su resultado a largo plazo. Además, hay que tener en cuenta que, a en distintas regiones del cuerpo, hay diferentes valores de pH y oxígeno con lo cual puede ocurrir que un mismo metal funcione adecuadamente en una parte del cuerpo pero puede sufrir corrosión en otra ya sea, por ejemplo, por oxidación o por erosión ácida ⁵⁷.

Un biomaterial metálico tiene que hacer frente a los requerimientos mecánicos del lugar de implantación. Las propiedades mecánicas de un biomaterial metálico incluyen normalmente el módulo de Young (módulo de elasticidad longitudinal), la resistencia a la tracción y la dureza. Una vez más y al igual que en la situación anterior, todo depende del lugar de implantación: p.ej. un implante metálico en la cadera tiene que soportar mucha más carga y sufre más estrés cíclico que por ejemplo, una prótesis facial parcial. Además, un implante que recibe una carga cíclica constante sufre mucho más, desde un punto de vista biomecánico, que un implante con una carga estática fija.

El desgaste es un problema inevitable en los biomateriales, sobre todo en los que se usan para prótesis articulares. A medida que pasa el tiempo, se van liberando partículas del implante los cuales son atacados por los macrófagos del sistema inmune y envueltos como un cuerpo extraño. Es un mecanismo de defensa natural del cuerpo, pero el problema es que las partículas metálicas tienden a destruir los macrófagos. Estos macrófagos muertos, liberan enzimas y metabolitos los cuales a su vez acidifican moderadamente su microentorno circundante. Este ambiente ácido contribuye a la erosión ósea periimplante lo que conduce finalmente a su desprendimiento prematuro y la pérdida de funcionalidad⁵⁷.

La osteointegración es la conexión directa, estructural y funcional entre el tejido óseo vivo y la superficie del implante. Si un implante es incapaz de unirse al hueso adyacente y al tejido blando, se formará un tejido fibrótico alrededor que promueve la pérdida de la estabilidad de la prótesis. Por ello, resulta totalmente fundamental que el implante presente una superficie adecuada para integrarse de forma adecuada con el tejido que lo rodea. Para esto hay que tener en cuenta la química de la superficie, la rugosidad y la topografía para favorecer una buena osteointegración⁵⁸.

De entre los diferentes tipos de implantes metálicos, vamos a revisar con mayor detalle los de titanio por tratarse de los implantes cuya biomodificación es objetivo de esta tesis doctoral.

2.8. Implantes de titanio

El titanio es un elemento químico de símbolo Ti y número atómico 22 que se sitúa en el grupo 4 de la tabla periódica de los elementos. Es un metal de transición de baja densidad y gran dureza y es muy resistente a la corrosión en estado puro, capaz de resistir el ataque de ácidos minerales fuertes como el sulfúrico y otros oxoácidos, de la mayoría de los ácidos orgánicos y de soluciones de cloro. Sin embargo, los ataques de ácidos concentrados sí producen una mayor corrosión⁵⁹.

El titanio presenta la mayor proporción de dureza-densidad de todos los elementos metálicos, siendo uno de los metales más fuertes, pero con una densidad menor que muchos otros materiales como por ejemplo el acero⁶⁰. El titanio es un metal fuerte, con una baja densidad y alta ductilidad. Tiene un punto de fusión relativamente alto, sobre los 1668 °C y es paramagnético y presenta baja conductividad eléctrica y térmica. Al igual que el aluminio y el magnesio, el titanio y sus aleaciones se oxidan cuando están expuestos al aire. El titanio reacciona con el oxígeno a temperaturas de 1200 °C en el aire y 610 °C en oxígeno puro, formando dióxido de titanio, aunque las reacciones de oxidación en contacto con el aire y agua son lentas, debido al fenómeno de pasivación que forma una capa de óxido que protege al resto del metal frente su propia oxidación. El titanio tiene una densidad un 60 % mayor que el aluminio, pero es el doble de fuerte que la aleación de aluminio más común. El módulo de elasticidad del titanio y sus aleaciones es aproximadamente la mitad que el del acero inoxidable y es superior en cuanto a fuerza específica que éste⁶¹.

El titanio puro, igual que muchos otros metales puede cristalizar en diversas estructuras de cristal; a aproximadamente 885°C, puede sufrir una transformación alotrópica y cambiar de su forma de cristal hexagonal compacto (*HCP - hexagonal close packed*) o fase α a una forma cúbica (*BCC- body-centered cubic*) o fase β . La existencia de estas dos distintas formas de estructuras de cristal es de suma importancia ya que son la base para la gran variedad de propiedades de las aleaciones de titanio⁵⁶.

El titanio puede formar aleaciones con el hierro, el aluminio, el vanadio y el molibdeno entre otros elementos, idóneas por sus propiedades de ligereza y resistencia para prótesis médicas e implantes ortopédicos entre otros. El principal efecto de los elementos de aleación en las aleaciones de titanio es la modificación de

la temperatura de transformación. De esta manera, los elementos de aleación se clasifican en:

α –estabilizadores, que elevan la temperatura de transformación, y

β –estabilizadores que hacen que descienda⁶².

Un 20 a 30 % del titanio usado hoy en día, es titanio puro. La elevada reactividad del titanio dificulta la obtención del metal puro por lo que en aplicaciones comerciales se trabaja con titanio denominado comercialmente puro, con diferentes niveles de impurezas en su composición. De este modo, el titanio comercialmente puro contiene entre 98.6 y 99.5% en peso de titanio. Hay 4 grados de titanio puro (Figura 2.12.):

- Grado 1: El titanio grado 1 es el titanio más blando y puro (99,8% Ti), con menor resistencia mecánica y mayor ductilidad. Nivel de oxígeno bajo.
- Grado 2: Es el titanio más utilizado. Presenta la mejor combinación de resistencia y ductilidad. Nivel de oxígeno estándar
- Grado 3: Titanio de alta resistencia, más fuerte y menos moldeable que el grado 1 y 2. Nivel de oxígeno medio. Muy usado para aplicaciones médicas.
- Grado 4: El titanio puro grado 4 cuenta con la resistencia más alta de todos los grados de titanio puro. Tiene una buena resistencia a la corrosión en una amplia variedad de entornos. Nivel de oxígeno alto. Se utiliza para instrumentos médicos⁶³.

Comercialmente, el titanio puro y la aleación Ti-6Al-4V son los metales más usados para aplicaciones biomédicas. El titanio puro se suele usar para marcapasos, bombas de infusión continua implantables, implantes dentales y maxilofaciales e implantes para cirugía espinal. En cambio, la aleación Ti-6Al-4V se suele usar mucho para cirugías ortopédicas: prótesis de rodilla, cadera y codo entre otras, material de osteosíntesis como tornillos, placas y agujas y también para el instrumental quirúrgico. En la actualidad, se han publicado estudios que relacionan la liberación de aluminio y vanadio con problemas de salud a largo plazo, como Alzheimer, otras neuropatías y osteomalacia así que se están desarrollando cada vez más aleaciones libres de vanadio⁶⁴.

Grado	Descripción
1	Titanio Puro - Nivel de Oxígeno Bajo
2	Titanio Puro - Nivel de Oxígeno Estándar
3	Titanio Puro - Nivel de Oxígeno Medio
4	Titanio Puro - Nivel de Oxígeno Alto
5	Aleación de Titanio - 6% Al - 4% V
6	Aleación de Titanio - 5% Al - 2.5% Sn
7	Titanio Puro más 0.12 % a 0.25 % Pd, Nivel de Oxígeno Estándar
9	Aleación de Titanio - 3% Al - 2.5% V
10	Aleación de Titanio - 11.5% Mo - 6% Zr - 4.5% Sn
11	Titanio Puro más 0.12 % a 0.25 % Pd, Nivel de Oxígeno Bajo
12	Aleación de Titanio - 0.3% Mo - 0.8% Ni
13	Aleación de Titanio - 0.5% Ni - 0.05% Ru, Nivel de Oxígeno Bajo
14	Aleación de Titanio - 0.5% Ni - 0.05% Ru, Nivel de Oxígeno Estándar
15	Aleación de Titanio - 0.5% Ni - 0.05% Ru, Nivel de Oxígeno Medio
16	Titanio Puro más 0.04 % a 0.08 % Pd, Nivel de Oxígeno Estándar,
17	Titanio Puro más 0.04 % a 0.08 % Pd, Nivel de Oxígeno Bajo
18	Aleación de Titanio - 3% Al - 2.5 % V más 0.04 % to 0.08 % Pd
19	Aleación de Titanio - 3% Al - 8% V - 6% Cr - 4% Zr - 4% Mo
20	Aleación de Titanio - 3% Al - 8% V - 6% Cr - 4% Zr - 4% Mo más 0.04% a 0.08% Pd
21	Aleación de Titanio - 15% Mo - 3% Al - 2.7% Nb - 0.25% Si
23	Aleación de Titanio - 6% Al - 4% V, Intersticial Extra Bajo
24	Aleación de Titanio - 6% Al - 4% V más 0.04 % a 0.08 % Pd
25	Aleación de Titanio - 6% Al - 4% V más 0.3% a 0.8% Ni y 0.04% a 0.08 % Pd
26	Titanio Puro más 0.08 a 0.14 % Ru, Nivel de Oxígeno Estándar
27	Titanio Puro más 0.08 a 0.14 % Ru, Nivel de Oxígeno Bajo
28	Aleación de Titanio - 3% Al - 2.5% V más 0.08-0.14 % Ru
29	Aleación de Titanio - 6% Al - 4% V, Intersticial Extra Bajo, más 0.08-0.14 % Ru
30	Aleación de Titanio - 0.3% Co - 0.05% Pd, Nivel de Oxígeno Estándar
31	Aleación de Titanio - 0.3% Co - 0.05% Pd, Nivel de Oxígeno Medio
32	Aleación de Titanio - 5% Al - 1% V - 1% Sn - 1% Zr - 0.8% Mo
33	Aleación de Titanio - 0.4% Ni - 0.015% Pd - 0.025% Ru - 0.15% Cr, Nivel de Oxígeno Estándar
34	Aleación de Titanio - 0.4% Ni - 0.015% Pd - 0.025% Ru - 0.15% Cr, Nivel de Oxígeno Medio
35	Aleación de Titanio - 4.5% Al - 2% Mo - 1.6% V - 0.5% Fe - 0.3% Si

Figura 2. 12. Lista de grados del titanio. Fuente: <http://www.smp.es/gradosti>

El titanio tiene múltiples aplicaciones médicas gracias a su biocompatibilidad, su bajo peso y su alta resistencia a la corrosión, incluyendo herramientas quirúrgicas e implantes médicos. La biocompatibilidad hace que el titanio cause pocas reacciones inflamatorias, hipersensibilidad o reacciones alérgicas cuando está en contacto con el tejido circundante. Además, estos implantes se benefician de la baja constante elástica que posee el titanio para asemejarse lo máximo posible a la de los huesos. Esto hace que sea un biomaterial muy adecuado para su uso en tejido óseo ya que las cargas se reparten de forma más equitativa entre el hueso y el implante, consiguiendo un

menor índice de degradación en los huesos y reduciendo la posibilidad de complicaciones médicas relacionadas con el propio implante⁵⁶. Otro punto muy importante es que el titanio es el único metal que tiene la capacidad de unirse con el hueso, sin que se forme una capsula fibrosa entre el metal y el hueso. Esta capacidad de unirse con el hueso ha sido estudiada ampliamente desde 1970 y en el 2004 se explicó el mecanismo biológico para esta conexión⁵⁶. Se observó que la clave para esta unión entre el implante y el hueso es la formación de hidroxapatita (HA) carbonatada que es la que facilita dicha unión. Se cree que el titanato que se forma en la superficie del titanio produce un intercambio de iones lo que provoca la formación del HA carbonatada. También intervienen las fibras de colágeno las cuales se insertan en la superficie del implante y refuerzan así la interfase⁵⁶.

2.8.1. Implantes de titanio poroso

Cuando se usan metales densos, como titanio macizo, hay una alta probabilidad de que los implantes con el tiempo se vayan aflojando debido a la diferencia significativa entre el módulo elástico del titanio y el del hueso (55-110GPa para el titanio *versus* 5-30GPa para el hueso). El implante pierde estabilidad, se forma una capa de tejido fibroso alrededor del implante, se interrumpe la osteointegración y se forma una respuesta inflamatoria. Una manera de prevenir los citados fenómenos es reduciendo el módulo elástico produciendo estructuras metálicas porosas. Se han llevado a cabo múltiples estudios destinados a conseguir implantes porosos con menos módulo de elasticidad, pero a la vez con suficiente fuerza mecánica para soportar las cargas del hueso⁶⁵. Estas estructuras porosas confieren varias ventajas relacionadas con la funcionalidad clínica del implante a largo plazo y además aportan también ventajas biológicas en la zona de implantación. Se ha visto que el módulo elástico y la fuerza de compresión disminuyen a medida que la porosidad aumenta. Disminuyendo el módulo elástico, se reduce la rigidez del implante con lo que se mejora el patrón de distribución de estrés mecánico y mejoran las condiciones para la remodelación ósea³.

Bobyn et al. en el año 1980 establecieron un tamaño de poro óptimo para asegurar una adecuada vascularización y crecimiento óseo en el interior del implante (*bone ingrowth*) en un rango de 100-400 μ m⁶⁶. Además, hay varios estudios que revelan que

un implante para tejido óseo debería tener una porosidad óptima entre 20 y 50%⁶⁷. La interconectividad de los poros también es un factor a tener en cuenta para la osteointegración en el implante. La conectividad entre los poros proporciona suficiente espacio para la vascularización y permite así el transporte de los nutrientes hacia los tejidos neoformados⁶⁷.

a) Técnicas de fabricación

Hay muchos métodos hoy en día para producir implantes de titanio poroso y controlar el tamaño, la morfología, la distribución y la proporción de la porosidad.

Entre los procesos de fabricación más empleados destacan:

- **Técnicas de sinterización:** la sinterización consiste en compactar a alta presión polvo metálico y luego realizar un tratamiento térmico. La temperatura utilizada para la sinterización está por debajo del punto de fusión del titanio. También hay técnicas de sinterización sin compactación previa, por reacción, utilizando un relleno temporal (*space holder*) y por expansión de gas argón⁶⁸.
- **“Slurry foaming” o técnica de espumación:** este método produce espumas de titanio con una porosidad alta y abierta. Se hace una espumación del material desde el estado líquido o temperaturas muy próximas para que se puedan alcanzar condiciones de fluidez que permitan formar una espuma del metal. Con este método se produce una dispersión de burbujas de gas en un líquido que posteriormente se solidifica⁶⁹.
- **“Casting” o técnicas de conformado:** hay muchas técnicas de conformado, pero en general cualquier técnica de “casting” parte de una suspensión estable y homogénea. Existe el conformado sin presión, o colaje en molde poroso que consolida las partículas de una suspensión por eliminación de líquido para la obtención de piezas porosas. Esto se consigue por filtración de líquido por la porosidad del molde en el que se cuela. Esta técnica permite conseguir piezas con mayor homogeneidad en la microestructura. Entre todas las técnicas de

conformado, el colado por gelificación (*gelcasting*) ha destacado como una de las rutas más atractivas para la fabricación de materiales con formas complejas a partir de suspensiones estables como los polvos metálicos. La gelificación es el procedimiento mediante el cual se espesan y estabilizan soluciones líquidas, emulsiones y suspensiones. Los agentes gelificantes se disuelven en la fase líquida y conforma una estructura interna que permite que el gel resultante tenga la apariencia de una sustancia sólida, a pesar de estar compuesto en lo fundamental por líquido. La compactación se debe a la “congelación” de la suspensión dentro de la estructura de un gel. Este gel se forma a partir del entrecruzamiento de polímeros, como la metilcelulosa, disueltos previamente⁷⁰.

- **“Selective laser melting” o fusión selectiva por láser (SLM):** esta técnica de fabricación hace posible producir piezas con formas complejas y trabajar el metal en muy poco tiempo. La tecnología de sinterización selectiva por láser produce prototipos en los que se sinteriza selectivamente el material en polvo por el láser al escanear la superficie de este. Se hace un escaneo inicial en 3D o mediante simulación directa con el ordenador y luego este modelo 3D se divide en capas de un cierto grosor. La computadora de control recibe información sobre cada capa y luego el láser produce la fusión de estas capas de una forma determinada para obtener los detalles del implante final. Los productos resultantes pueden tener formas geométricas complejas, con una distribución uniforme de la densidad y una estructura homogénea⁷¹.

Con estas técnicas se pueden obtener implantes de titanio poroso con una porosidad determinada con macro y microporos interconectados y un tamaño controlado.

b) *Tratamientos de bioactivación de la superficie de los implantes*

Los implantes de titanio poroso por sí solos han demostrado tener propiedades de osteoconducción y de osteointegración⁷². Aun así, hoy en día hay muchos tratamientos para bioactivar estos implantes y así acelerar y mejorar estas propiedades. La bioactivación suele producir una formación de cristales de apatita en la superficie de los implantes posibilitando así la unión directamente del implante con el tejido óseo⁷³.

Hay muchas técnicas descritas para la bioactivación de los metales. La más antigua fue el recubrimiento de los metales, incluido el titanio y sus aleaciones, con fosfatos de calcio, mediante pulverización de plasma (*plasma spraying*), pulverización catódica (*sputtering*), métodos biomiméticos o métodos de inmersión (*soaking*). El problema fue que esta capa superficial no era estable a largo plazo en un entorno con fluidos biológicos debido a la débil unión de esta capa con el metal o la inestabilidad de la capa en un entorno acuoso. Más tarde, para conferir una mayor capacidad de unión entre el tejido óseo y el titanio, se usó la incorporación de iones de calcio y/o fosfato a la superficie del implante mediante la implantación de iones, reacciones electroquímicas y tratamientos hidrotermales. Los implantes resultantes mostraron un mejor contacto con el hueso vivo. Sin embargo, estos tratamientos se realizaron en condiciones severas, como en un campo eléctrico o a una alta presión y por lo tanto requerían de aparatos especiales y generalmente de elevado coste^{74,75}. A raíz de ello, surgieron nuevos tratamientos más sencillos como por ejemplo los tratamientos de superficie con ácidos y/o soluciones alcalinas tan fácilmente aplicables como los tratamientos termoquímicos. Dichos tratamientos forman también una capa de hidroxiapatita en la superficie de los metales y tienen la capacidad de unirse fuertemente al tejido óseo vivo mediante esta capa de apatita. Los tratamientos ácido-alcalinos consisten en la inmersión de los implantes en una solución acuosa con una mezcla de HCl y H₂SO₄, a temperatura de unos 70° durante una hora. Posteriormente, se sumergen las muestras en una solución de NaOH a 70° durante 5 horas y finalmente se secan durante 24 horas a unos 40°. En general, en este tipo de proceso se usan temperaturas más bajas (<100°) que en los tratamientos termoquímicos⁷⁴. En los tratamientos termoquímicos, las muestras primero son sumergidas en una

solución de NaOH a 60° durante 24 horas y luego se lavan con agua destilada. Se dejan secar a 60° durante 24 horas o se sumergen en una solución de HCl a 40° durante 24 horas. Una vez secas, se calientan las muestras a una temperatura de unos 600° y se mantienen así durante 1 hora para posteriormente enfriarse a temperatura ambiente⁷⁶.

Hoy en día, también se ha logrado la adhesión a la superficie del titanio de células osteogénicas, células madre mesenquimales y BMP (*bone morphogenetic protein*) con diversos resultados⁷⁷. Asimismo, hay muchos estudios sobre tratamientos superficiales de implantes de titanio con proteínas o péptidos con afinidad por las integrinas expresadas por los osteoblastos que han demostrado mejorar la adhesión de los osteoblastos en estas superficies y mejorar la osteointegración de los implantes⁷⁸. Sin embargo, siempre existe el debate sobre cuál es el mejor enfoque biomimético para la funcionalidad de los biomateriales. El uso de proteínas nativas como p.ej. las fibronectinas o fragmentos de proteínas recombinantes de la matriz extracelular proporcionan epítomos que se involucran y activan de manera eficiente la respuesta celular⁷⁵. A pesar de ello, estos enfoques presentan limitaciones debido a la baja estabilidad de las proteínas frente a cambios de pH y temperatura, la degradación proteolítica, los riesgos de infección y la inmunogenicidad asociada a su uso, además de su alto coste de producción⁷⁵. Para solucionar estos problemas, se empezó a usar péptidos sintéticos cortos que usan sólo los aminoácidos requeridos para promover la adhesión celular. Estos son más estables a condiciones de esterilización, a altas temperaturas y cambios en el pH y se pueden caracterizar con más facilidad a parte de tener un bajo coste de producción. Sin embargo, estos péptidos individuales muchas veces no logran proporcionar el potencial biológico completo de una proteína y muestran perfiles de selectividad deficientes. Para eso, a menudo se combinan distintas secuencias bioactivas con múltiples efectos biológicos con estos péptidos sintéticos aprovechando así las propiedades de éstos y aumentando la funcionalidad en las superficies tratadas, siendo también más estables frente a las degradaciones enzimáticas⁷⁹ (Figura 2.13.).

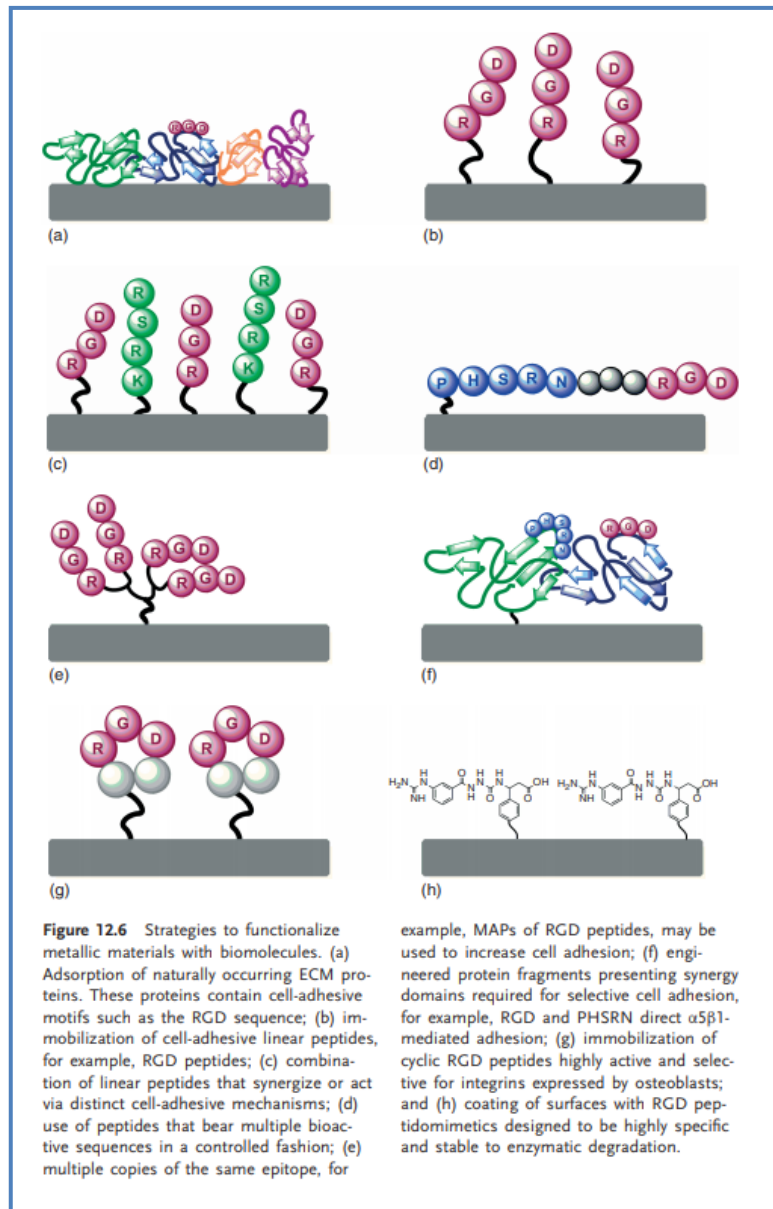


Figura 2.13. Estrategias de bioactivación de metales con biomoléculas ⁷⁵

Hay muchos tipos de péptidos que se pueden usar para el tratamiento superficial de los biomateriales. Los más usados son los péptidos derivados de la matriz extracelular (ECM)⁷⁹. En este grupo encontramos los PepGen P-15, los GFOGER, el DGEA o el RGD. La secuencia peptídica RGD es uno de los más usados hoy en día y uno de los más efectivos para estimular la adhesión celular sobre superficies sintéticas. Este péptido consta de 3 residuos de aminoácidos, ácido arginil-glicil-aspártico, y es capaz de unirse a una gran parte de las integrinas e interactuar con ellas. Las integrinas son un grupo de receptores de la membrana celular que ayudan en el contacto de las células con otras células vecinas o con la matriz extracelular. Las

integrinas juegan un papel importante tanto como moléculas de anclaje como en la embriogénesis, la diferenciación celular, la respuesta inmune, la cicatrización de heridas y la hemostasia. Se ha visto que aproximadamente la mitad de las integrinas existentes se pueden unir a moléculas de la matriz extracelular a través de secuencias de RDG. Es importante destacar que muchas de estas integrinas capaces de unirse a la secuencia RDG están presentes en los osteoblastos con lo cual resulta plausible el uso de estos péptidos RDG para ayudar a promover la adhesión de los osteoblastos y por tanto, la osteointegración⁷⁵. A parte de las integrinas, se identificaron sitios de adhesión celular mediante RDG en otras proteínas de la matriz extracelular incluyendo el fibrinógeno, el colágeno, la osteopontina o el factor de Willebrand y también en proteínas bacterianas y víricas e incluso en neurotoxinas de veneno de serpientes⁸⁰. Como parte de la señalización de la superficie celular, el péptido RGD puede mejorar la expresión de ALP, Runx2, osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) y BSP para asegurar la proliferación, diferenciación y mineralización de los osteoblastos⁷⁹.

Los métodos comúnmente utilizados para preparar biomateriales modificados con péptidos son varios. Este método de preparación de los biomateriales usados para la reparación ósea tratados con péptidos determina la manera en la que el péptido se une al material del sustrato y tiene un efecto significativo en la actividad osteogénica final del compuesto. Actualmente, los métodos de preparación comúnmente utilizados incluyen electrodeposición, inmovilización covalente, adsorción física y otros⁸¹.

La electrodeposición es un proceso electroquímico durante el cual se deposita una sustancia de una solución acuosa compuesta, una solución no acuosa o una sal fundida al biomaterial. Es necesario en este caso que tanto el polo negativo como el polo positivo sean inertes ya que los cationes de la solución deben introducirse en el cátodo⁸¹.

La inmovilización o inserción covalente generalmente requiere de reacciones químicas entre grupos funcionales de los materiales de sustrato y los aminoácidos o carbohidratos de los péptidos. En primer lugar, es necesario introducir algunos grupos funcionales específicos en los materiales del sustrato. Luego, los materiales de sustrato se sumergen en la solución peptídica con o sin tratamiento ultrasónico para

formar los enlaces covalentes entre los materiales de sustrato y los péptidos. Durante el proceso de este método de preparación, se pueden utilizar una variedad de técnicas diferentes para lograr los efectos anteriores, como por ejemplo el uso de enlaces epoxi, acoplamientos de silano, inmovilización asistida con polidopamina u otros^{82,83}.

La absorción física significa que las moléculas o los iones se atraen y se unen a la superficie de los sustratos en medios líquidos o gaseosos mediante la fuerza electrostática o la fuerza de Van der Waals. Usando este método para preparar materiales modificados con péptidos, se necesita preparar sustratos con alta energía superficial y luego sumergirlos en una solución sobresaturada de péptidos⁸⁴.

Hay numerosos estudios que indican que los biomateriales tratados con péptidos derivados de la ECM pueden mejorar significativamente las funciones deseadas de las células óseas *in vitro*. Se han hecho estudios en discos de hidroxiapatita, en hidrogeles, en membranas de silicona y en superficies de titanio^{85,86,87}. Además de los estudios *in vitro*, actualmente muchos investigadores han probado los biomateriales modificados con péptidos en animales mediante estudios *in vivo* para descubrir los potenciales en la reparación ósea de estos materiales tratados, proporcionando así datos más directos para sus posibles aplicaciones clínicas. Hay muchos estudios sobre fosfatos de calcio modificados con péptidos derivados de la matriz extracelular, algunos sobre colágeno tratado con péptidos y hay incluso un estudio sobre el uso de agujas de Kirschner de acero inoxidable tratadas con péptidos ECM^{88,89,90}. En cambio, solo hay un estudio del año 2005 que usa un recubrimiento peptídico con un RGD cíclico sobre implantes de una aleación de titanio poroso, mostrando resultados muy favorables en cuanto a la osteointegración en comparación con implantes control sin tratamiento peptídico⁹¹. Otro estudio de Kroese-Deuterman *et al.* del año 2005 evaluaba la neoformación ósea en implantes de titanio hechos con malla de fibra y cubiertos con un péptido RDG cíclico⁹².

Podemos afirmar que en la actualidad no existe ningún estudio que use implantes de titanio poroso fabricado mediante sinterización y bioactivado con un péptido lineal con espaciador.

En 2014, Mas-Moruno *et al.* presentaron una nueva plataforma divalente basada en péptidos RGD usando dos secuencias peptídicas distintas, dos espaciadores, una lisina y un grupo de anclaje para la bioactivación de implantes de titanio y mostraron *in*

vitro una buena adhesión, proliferación y diferenciación celular en la superficie de implantes de titanio poroso⁹³. Observaron que los espaciadores aumentan la accesibilidad para las células a unirse a estos péptidos lineales. Los esperanzadores resultados de Mas-Moruno se obtuvieron a partir de estudios *in vitro* no habiéndose realizado estudios posteriores *in vivo* que pudieran ratificados dichos resultados.

Por todo ello, la falta en la actualidad de evidencia científica sobre implantes de titanio poroso tratados con péptidos derivados de la matriz extracelular como los RGDs y su efecto en cuanto a la osteointegración y osteoconducción así como la ausencia de estudios *in vivo* utilizando la citada plataforma divalente de péptidos sobre implantes de titanio poroso para valorar sus propiedades en la regeneración ósea ha suscitado el interés científico del autor de esta tesis y ha propiciado su desarrollo científico.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Tal y como ha quedado reflejado en el anterior apartado, existen bastantes estudios sobre los tratamientos termoquímicos de las superficies de implantes de titanio poroso mostrando sus efectos positivos para potenciar la osteointegración y la osteoconducción. Asimismo, también se han descrito estudios demostrando el potencial *in vitro* de tratamientos peptídicos de los biomateriales para favorecer la reparación ósea. Sin embargo, no se reportan estudios *in vivo* que demuestren la posible sinergia de un material poroso con un péptido RGD ni que un determinado tratamiento peptídico usando una secuencia RGD específica y con un espaciador en implantes de titanio poroso fabricados por sinterización pueda estimular la osteointegración y la osteoconducción y tampoco existen estudios que comparen un tratamiento orgánico (peptídico) con uno inorgánico (termoquímico).

En consecuencia, esta tesis doctoral se planeó con la idea de llevar a cabo un estudio experimental *in vivo* que contemplara la implantación ortotópica en tibias de conejos de implantes de titanio poroso bioactivos con tratamiento termoquímico, otros con injerto de un nuevo tripéptido adhesivo celular y finalmente un grupo control negativo que no fuera sometido a ningún tratamiento de superficie.

3.1. Hipótesis de trabajo

Nuestras hipótesis a estudiar son las siguientes:

- ¿Los implantes de titanio poroso bioactivo con un recubrimiento peptídico presentan mayor actividad osteoconductiva y de osteointegración en los defectos creados en tibias de conejo respecto al grupo control?
- ¿Los implantes de titanio poroso bioactivo con un tratamiento químico-térmico de superficie presentan mayor actividad osteoconductiva y de osteointegración en los defectos creados en tibias de conejo respecto al grupo control?
- ¿Los implantes de titanio poroso bioactivo con un recubrimiento peptídico presentan mayor actividad osteoconductiva y de osteointegración en los defectos creados en tibias de conejo respecto el grupo con tratamiento químico-térmico?

- A nivel cualitativo, ¿se puede esperar una mayor madurez del tejido óseo neoformado en los implantes de titanio poroso bioactivo con un recubrimiento peptídico respecto a los del grupo control?
- A nivel cualitativo, ¿se puede esperar una mayor madurez del tejido óseo neoformado en los implantes de titanio poroso bioactivo con un tratamiento químico-térmico respecto a los del grupo control?
- A nivel cualitativo, ¿se puede esperar una mayor madurez del tejido óseo neoformado en los implantes de titanio poroso bioactivo con un recubrimiento peptídico respecto a los del grupo con tratamiento termoquímico?

Para poder responder las preguntas planteadas en la hipótesis, se definieron los siguientes objetivos:

3.2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue el de investigar si un tipo especial de implantes de titanio poroso modificados con tratamiento termoquímicos o con recubrimiento peptídico tipo RGD presentan una mayor capacidad osteoconductor y osteointegrativa en el hueso respecto al grupo control, si existen diferencias entre el tratamiento químico-térmico y el injerto de péptidos y si hay diferencias entre la madurez del tejido neoformado entre los tres grupos estudiados.

Para alcanzar este objetivo, se definieron los siguientes objetivos específicos:

- Creación, estandarización y aplicación de un método de evaluación cuantitativa de la cantidad de tejido óseo neoformado tanto en la superficie como en el interior de los implantes utilizados
- Creación, estandarización y aplicación de un método de evaluación cualitativa del tejido óseo neoformado tanto en la superficie como en el interior de los implantes utilizados
- Evaluación de la concordancia entre ambos métodos de evaluación para determinar si un tratamiento es superior al otro

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio consistió en la valoración de la osteoconducción y osteointegración de implantes de titanio poroso bioactivo evaluándolos mediante MER en un modelo de implantación ortotópica en conejos.

4.1. Materiales

4.1.1. Autorización del procedimiento experimental

Este estudio experimental fue aprobado por la Comisión de Ética y Experimentación Humana y Animal (CEEHA) de la Universidad Autónoma de Barcelona con referencia CEEHA-2016. Todos los procedimientos con animales realizados en este estudio cumplieron con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y la ISO 10993-2: 2006.

4.1.2. Animales

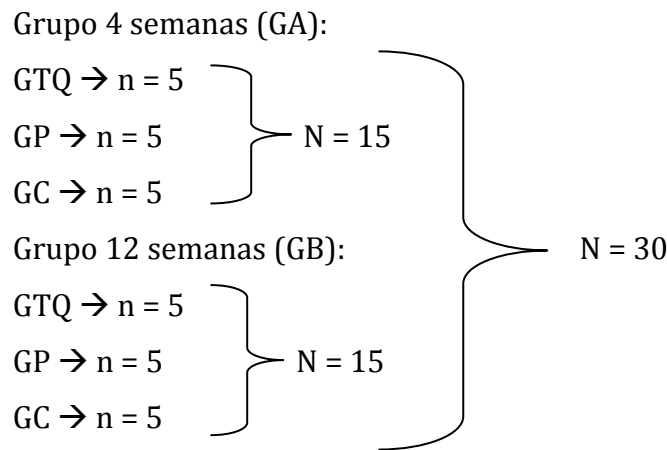
En este estudio experimental, se usaron 18 conejos adultos hembras y machos de raza Neozelandés blanco, cada uno con un peso entre 4,0 y 6,0kg, puesto que el conejo es el modelo animal más validado para este tipo de estudios. Los animales se recibieron una semana antes de realizar el proceso quirúrgico para su adecuada climatización a su nuevo entorno. A su llegada, se llevó a cabo una evaluación clínica general de todos los animales. Todos los animales estaban correctamente vacunados y desparasitados y carentes de cualquier proceso patológico. La exploración traumatológica resultó también carente de signos patológicos. Los animales se alojaron de forma individual con acceso a dieta estándar de gránulos y agua *ad libitum*.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos experimentales según el tratamiento aplicado al implante de titanio:

- 1.) Implantes porosos sometidos a tratamiento térmico-químico (GTQ)
- 2.) Implantes porosos sometidos a tratamiento con péptidos (GP)
- 3.) Implantes porosos sin tratamiento (grupo control) (GC)

Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos temporales: 4 (grupo A) y 12 semanas (grupo B).

Entonces se obtuvieron dos grupos temporales con 9 animales por grupo. En cada animal, se usó un único implante distinto en cada tibia realizando un solo defecto por cada extremidad.



Para el cálculo del tamaño muestral se consideraron las siguientes premisas: ⁹⁴

- 3 grupos de tratamiento: GC, GTQ y GP
- 2 grupos temporales: GA y GB
- Unidad experimental: defecto tibia conejo
- 2 defectos por animal (uno en cada tibia)
- Diseño experimental: Diseño factorial
- En el anexo C.4 de la *ISO 10993-6:2017*, se recomienda un mínimo de 3 animales y un mínimo de 10 muestras por cada grupo de tratamiento y periodo temporal.

Se utilizó la siguiente ecuación para el cálculo del tamaño significativo de la muestra:

$$E = N - T$$

$$10 < E < 20$$

E: grados de libertad del error → se considera que este valor debe encontrarse entre 10 y 20

N: grados de error del número total de defectos

T: grados de error del número de tratamientos

Se calculó el tamaño de muestra necesario para el primer grupo temporal (4 semanas) que es el mismo que para el segundo grupo temporal. Se hizo de manera independiente como si se tratara de dos procedimientos independientes.

Si utilizamos el número mínimo de animales recomendados por la ISO, que serían 3 conejos, a 2 defectos por conejo, se queda la siguiente ecuación:

$$E = 6 - 3 = 3 \rightarrow E \text{ sale menor de } 10 \text{ con lo cual el número es insuficiente.}$$

Si utilizásemos el número mínimo de 10 muestras por cada grupo de tratamiento, serían 30 defectos en total, con lo cual se necesitarían 15 conejos.

Aplicando la ecuación de recursos, se obtendrían los siguientes valores:

$$E = 30 - 3 = 27 \rightarrow E \text{ es mayor que } 20 \text{ con lo cual se sobrepasa el rango de } 10 < E < 20$$

En este estudio se decidió usar 9 animales, con lo que se tendría 18 defectos:

$$E = 18 - 3 = 15 \rightarrow E \text{ es mayor que } 10 \text{ y menos que } 20. \text{ Estamos en el rango adecuado.}$$

Así que se utilizaron 9 conejos para el grupo A y 9 conejos para el grupo B, es decir, un total de 18 conejos. Como a cada individuo se le practicaron dos defectos, uno en cada tibia, distribuyendo de forma aleatoria los grupos de tratamiento, pero evitando

de poner dos implantes iguales en el mismo animal, se obtuvieron 18 defectos, con 6 muestras por cada grupo de tratamiento.

Con este método de cálculo, se prioriza el bienestar animal mediante el concepto de las 3Rs. Este concepto lo formularon a comienzos de la década de los 60 dos biólogos ingleses, Russel y Burch, en su libro *“The Principle of Humane Experimental Technique”*^{95,A}.

Se usaron 5 muestras por grupo de tratamiento y grupo temporal cortando las muestras de forma transversal y una muestra por grupo de tratamiento y grupo temporal cortada de forma longitudinal. De este modo, en total se usaron 9 animales y se obtuvieron 18 muestras, por cada grupo temporal, 15 cortadas de forma transversal y 3 de forma longitudinal.

4.1.3. Materiales de implantación

En el estudio experimental se usaron 3 diferentes grupos de implantes:

- Implantes de titanio poroso bioactivados mediante un tratamiento químico-térmico (GTQ)
- Implantes de titanio poroso bioactivados mediante un tratamiento peptídico (GP)
- Implantes de titanio poroso no bioactivos (GC)

^A Las tres erres hacen referencia a **reemplazar**, **reducir** y **refinar**. Las **alternativas de reemplazo** recomiendan métodos que eviten o sustituyan el uso de animales de experimentación. Esto incluye tanto los reemplazos absolutos (es decir, sustituir animales por modelos informáticos), como los reemplazos relativos (es decir, sustituir vertebrados, por animales con una menor percepción del dolor, como algunos invertebrados). Las **alternativas de reducción** aluden a cualquier estrategia que tenga como resultado el uso de un menor número de animales para obtener datos suficientes que respondan a la cuestión investigada, o la maximización de la información obtenida por animal, para así limitar o evitar potencialmente el uso posterior de otros animales, sin comprometer el bienestar animal. Las **alternativas de refinamiento** hacen referencia a la modificación de la cría de animales o de los procedimientos para minimizar el dolor y la angustia, así como para mejorar el bienestar de los animales utilizados en la ciencia desde su nacimiento hasta su muerte.

a) Implantes de titanio poroso

Las muestras de titanio poroso se produjeron por sinterización usando partículas de NaCl como soportes espaciales obteniendo así andamios de titanio con macroporos y altamente interconectados.

Los implantes de titanio con una porosidad altamente interconectada fueron producidos a través de una ruta de pulvimetalurgia utilizando polvo de titanio puro grado 2 comercial con una media de tamaño del grano de alrededor de 80 μm , mezclado con cloruro sódico (NaCl) de aproximadamente 300 a 600 μm como soporte espacial, en una ratio de volumen de 65 a 35 %. La distribución del tamaño de partícula de los espaciadores se analizó mediante granulometría láser usando un analizador del tamaño de las partículas marca Beckman Coulter LS^B, observando una distribución normal del diámetro de las partículas del espaciador (valor medio de 496,4 μm \pm 119,7 μm de desviación estándar). Para homogenizar la muestra, se añadió etielenglicol (15% en peso) como aglutinante. La mezcla fue compactada de forma uniaxial en un molde de acero inoxidable a 100MPa y posteriormente fue prensada de forma isostática a 200MPa. La eliminación del aglutinante se llevó a cabo mediante pirólisis bajo aire atmosférico a 350°C y el espaciador se eliminó mediante varios baños con agua destilada hasta que se consiguió una conductividad estable con resultados similares a agua destilada.

Finalmente, se realizó la sinterización de las muestras porosas a 1350°C durante 2 horas en condiciones de alto vacío de aproximadamente 5×10^{-4} mbar. La caracterización del tamaño de los micro y macroporos y la evaluación de la porosidad interconectada, se realizó mediante porosimetría de mercurio, usando el equipo AutoPore IV 9500 V1.07^C. Se observó que mediante el proceso de sinterización se consiguió una porosidad interconectada media de un 53% con interconexiones de un diámetro medio de 210 μm y macroporos de entre 300 y 600 μm y microporos de entre 1 y 15 μm . Además, se detectó que la bioactivación de los implantes no modifica significativamente los valores de interconectividad del titanio. Se obtuvieron valores de un 57% de porosidad para los implantes de titanio tratados termoquímicamente y

^B Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA

^C AutoPore IV 9500 V1.07 MIP, Micrometrics, Norcross, GA, USA

un 56% de porosidad en el caso del titanio bioactivado con péptidos, mostrando que estadísticamente no hay diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control sin tratamiento superficial (Figura 4.1.).

Se ha podido comprobar en varios estudios que los implantes con una superficie con macro y microestructuras tienen un contacto con el hueso mayor que los implantes con una superficie lisa, con lo cual se consigue una mayor retención mecánica^{96,97}. Por eso, todos los implantes fueron creados de tal forma que tuvieron también macro y microrugosidades en la superficie externa del implante, conseguido mediante la sinterización y los mismos separadores espaciales. La rugosidad de la superficie fue medida con un rugosímetro de contacto 2D^D y posteriormente se calculó la media aritmética de la profundidad de las porosidades (Ra – *arithmetic average of peak-valley height*) y el número de depresiones en una distancia determinada (Pc – *number of falling flanks in a given distance*) mediante un software especial^E conforme con los estándares internacionales ISO4287:1997. La microrugosidad de la superficie conseguida mediante el proceso de sinterización con espaciadores era alrededor de 1µm. Los tratamientos de bioactivación no afectaron a la microrugosidad (Figura 4.1.).

Implantes porosos	P (µm)	I (%)	Ra (µm)
Grupo control	210 ± 9	57 ± 3	1,1 ± 0,1
Grupo termoquímico	208 ± 10	57 ± 2	1,1 ± 0,2
Grupo peptídico	210 ± 8	56 ± 3	1,3 ± 0,4

Figura 4.1. Características de los implantes de titanio poroso de los distintos grupos de tratamiento. P es la media del tamaño de los poros, I es la interconectividad de la porosidad y Ra es la rugosidad de la superficie⁹⁶.

Los implantes usados para la implantación ortotópica tuvieron un diámetro de 3,5mm y una longitud de 6mm. Las propiedades mecánicas se evaluaron usando tests de compresión y fatiga mediante MTS Bionix 370^F de acuerdo con el estándar propuesto por la ISO 13314:2011.

^D Surf test SV500, Mitutoyo, Neuss, Alemania

^E Surfpack™ v3.00, Mitutoyo, Japón

^F MTS, Eden Prairie, MN, USA

Los implantes de titanio poroso mostraron propiedades mecánicas adecuadas y un módulo de Young (E) cercano al del hueso esponjoso (Figura 4.2.). El test de compresión para el material de los implantes indicó una fuerza de rendimiento (σ_0) de unos 105MPa con una fuerza máxima (σ_{max}) de 170MPa y una deformación del material (ϵ) hasta fracturarse de un 30%. Se observó que las propiedades mecánicas de los implantes tratados termoquímicamente y los implantes con adhesión peptídica eran algo superiores al grupo control, pero en cambio la deformación era levemente menor.

El test de fatiga (σ_f) para los implantes de titanio poroso usados en este estudio, mostraron que el límite de fatiga a 10^8 ciclos es de unos 15MPa de media. No se observan diferencias significativas entre los valores obtenidos para los distintos grupos de tratamiento. Los resultados de las propiedades mecánicas de los implantes se resumen en la figura 4.2.

Implantes porosos	E (GPa)	σ_0 (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ (%)	σ_f (MPa)
Grupo control	0,61 ± 0,22	105,20 ± 10,8	170 ± 20,06	30,9 ± 4,6	16,4 ± 3,0
Grupo termoquímico	0,66 ± 0,12	116,2 ± 9,7	177 ± 15,22	27,0 ± 4,6	15,4 ± 3,2
Grupo peptídico	0,63 ± 0,24	101,1 ± 9,8	165 ± 22,16	25,1 ± 4,6	13,5 ± 2,7
Hueso esponjoso	0,55 ± 0,48	15,2 ± 8,0	25,0 ± 8,1	7,1 ± 3,0	

Figura 4.2. Propiedades mecánicas de los implantes porosos sometidos a test de compresión y test de fatiga. E es el módulo de Young, σ_0 es la fuerza de rendimiento, σ_{max} es la fuerza máxima, ϵ es la deformación axial y σ_f es el límite de fatiga a 10^8 ciclos. Los resultados se compararon con los del hueso esponjoso⁹⁶.

La caracterización biológica *in vitro* se evaluó haciendo un cultivo de células osteoblásticas SaoS-2^G en un medio de McCoy (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2mM de glutamina, 20nM de buffer HEPES, penicilina/streptomina (50U/ml y 50 μ g/ml respectivamente) y 1mM de piruvato sódico^H. Se colocaron los implantes porosos en una placa con 48 pocillos y se cubrieron con las células SaoS-2 y se dejaron en incubación para 21 días. Se analizó la proliferación y la colonización celular mediante M.E.R. a las 4 y 24 horas después de la

^G ATCC HTB 85, Manassas, VA, USA

^H Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

siembra de las células y luego al día 7, 14 y 21. Para eso se fijaron las células sobre los implantes. Una vez fijadas, las muestras fueron deshidratadas con gradientes de etanol y posteriormente se terminó el proceso de deshidratación con hexametildisilazano (HDMS). Se observó una adecuada proliferación celular en todos los diferentes implantes porosos. Para evaluar la colonización celular en el interior del titanio poroso, se hicieron cortes transversales del material para cada tiempo de evaluación. Al principio del proceso de incubación de las células (4 y 24 horas) sólo se pudieron observar células en la superficie de los implantes, sin penetración al interior de los poros. En cambio, después de 7 días del cultivo celular, las células comenzaron a ocupar los poros internos del implante, infiltrándose todavía más hacia el interior a los 14 días. A los 21 días, se puede observar una ocupación casi total de las células del interior de los implantes (Figura 4.3.)

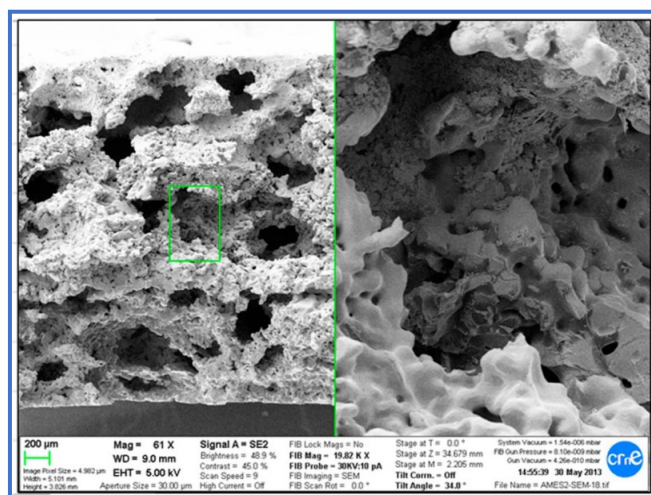


Figura 4.3. Proliferación de las células osteoblásticas; imagen obtenida con el MER mostrando la colonización celular del interior de los poros de uno de los implantes bioactivos

La citotoxicidad fue valorada mediante exposición indirecta siguiendo el estándar de la ISO 10992-5. El porcentaje de células supervivientes fue calculado de la siguiente forma:⁹⁷

$$\% \text{ células supervivientes} = \left[\frac{(\text{valor experimental} - \text{control negativo})}{(\text{control positivo} - \text{control negativo})} \right] \times 100$$

No se observaron efectos de citotoxicidad cuando las muestras fueron analizadas mediante la medición de la actividad de la lactato-deshidrogenasa (LDH) de las

células osteoblásticas Saos-2. La tasa de supervivencia de las células era cercana al 100%.

b) Bioactivación de la superficie mediante tratamiento termoquímico

Para la activación termoquímica, las muestras se sumergieron en NaOH 5 M a 60 ° C durante 24 horas y posteriormente fueron secadas a 60 ° C durante 24 horas y finalmente se aplicó un calentamiento a 600 ° C durante 1 hora^{98,99}. El tratamiento termoquímico promueve la formación de cristales de hidroxiapatita en la superficie del implante, que estimulan la formación de hueso nuevo y la osteointegración. En concreto, este método crea una capa de titanato de sodio sobre la superficie del implante la cual promueve la formación de una capa de cristales de hidroxiapatita mediante un intercambio iónico¹⁰⁰.

Los implantes fueron evaluados mediante microscopia electrónica de retrodispersión (M.E.R.) y un espectroscopio de dispersión de energía de rayos X (EDS) para visualizar e identificar los cristales de hidroxiapatita en las superficies tratadas.

c) Bioactivación de la superficie mediante tratamiento peptídico

La bioactivación con péptidos se logró mediante un injerto covalente de un péptido de adhesión celular RGD. Este péptido comprende la secuencia Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) para la unión celular y tres unidades de ácido 6-aminohexanoico y ácido 3-mercaptopropiónico como fracción de anclaje-espaciador¹⁰¹. La unión de los péptidos se realizó mediante silanización. Finalmente, las superficies se limpiaron y se produjo la pasivación con 65% de HNO₃ durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras se enjuagaron en agua destilada, etanol y acetona, y se secaron bajo gas nitrógeno. A continuación, las muestras se sumergieron en 2% de 3-aminopropilo-trietoxisilano (APTES) en tolueno anhídrico y se silanizaron durante 1 hora a 70°C en una atmósfera de nitrógeno. Después de este tratamiento, se usó ultrasonificación durante 5 minutos para eliminar los silanos no covalentemente unidos además de realizar copiosos lavados en agua y disolventes orgánicos y hacer un endurecimiento de los silanos a 120 °C durante 5 min. Para garantizar una unión quimioselectiva del péptido a través de su grupo de unión de superficie, la capa de

silano fue modificada adicionalmente por una reacción con 2 mg/ml de ácido 3-maleimidopropiónico N-dimetilformamida éster durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras silanizadas se recubrieron con una solución de péptido RGD a 200 μM en tampón fosfato salino (PBS) (pH 6,5) durante la noche a temperatura ambiente. Las superficies de control sólo fueron tratadas con el tampón fosfato salino. Después de la conjugación de péptidos, las muestras se lavaron con PBS, se esterilizaron con 70% (v/v) de EtOH durante 20 min y fueron sometidas a secado. Se muestra un resumen del proceso de obtención de los implantes bioactivos en la figura 4.4.

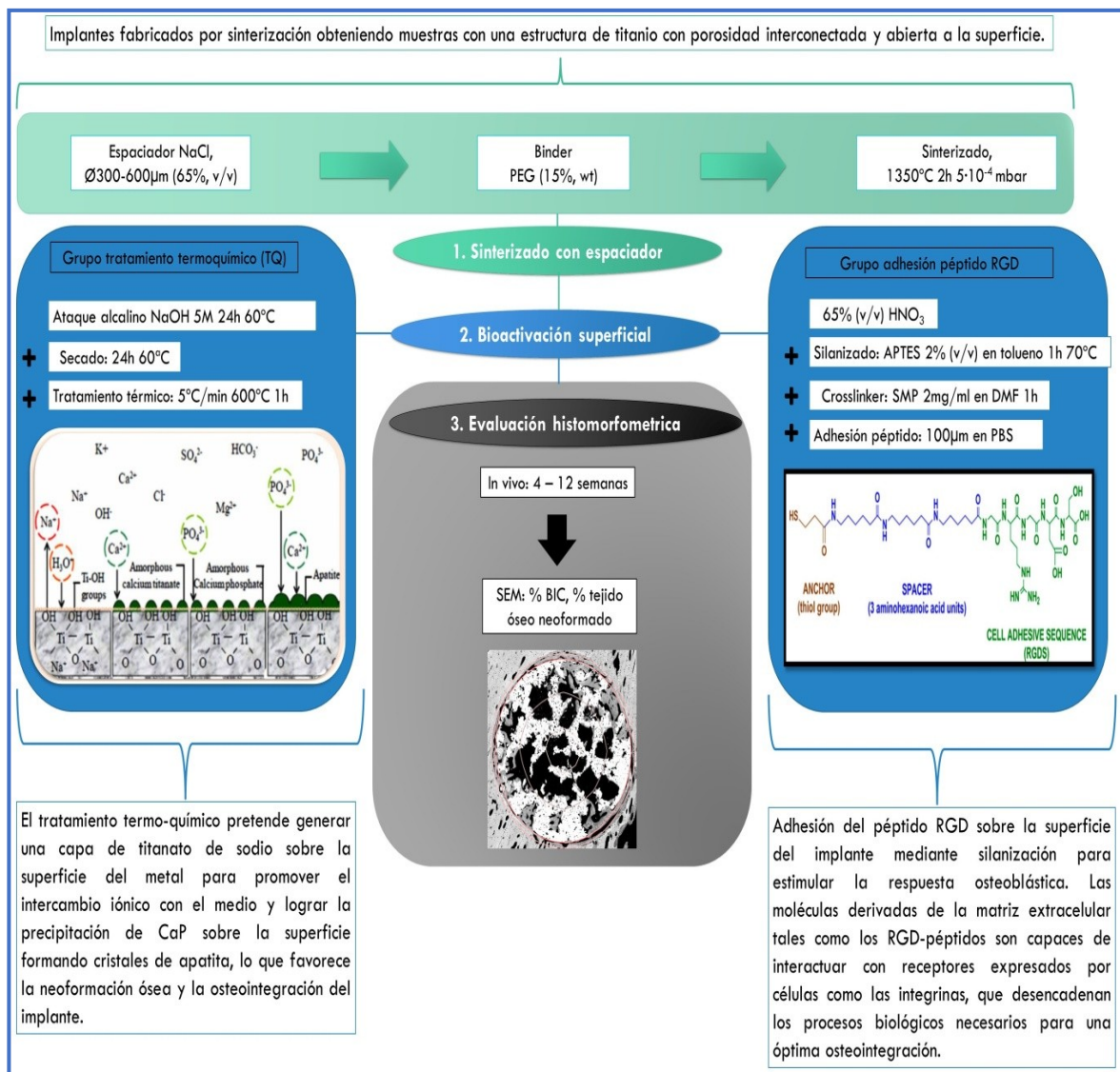


Figura 4. 4. Resumen del proceso de fabricación de los implantes

4.2. **Métodos**

4.2.1. Fase preoperatoria

Una vez recibidos los animales, se mantuvieron en las instalaciones del servicio de las granjas de la UAB en una sala específica y aislada. Fueron estabulados en jaulas individuales con acceso a una dieta de pellets estándar y agua *ad libitum*. Durante el período de adaptación de una semana, los animales fueron evaluados a diario haciendo un examen físico completo para ratificar su estado de salud. Además, se realizó un estudio radiológico de cada animal haciendo proyecciones craneocaudales y mediolaterales de ambas tibias para descartar cualquier patología ósea y para tener imágenes de referencia para las posteriores evaluaciones radiográficas.

4.2.2. Fase quirúrgica

El día de la cirugía experimental, los animales fueron premedicados mediante administración subcutánea de Buprenorfina, Midazolam y Medetomidina. Las dosis se indican en la figura 4.6. Tras un período de aproximadamente 10 minutos post-inyección, se les puso un catéter intravenoso flexible de 23G en la vena marginal de la oreja para administrar fluidoterapia con suero Ringer-Lactato y para su inducción anestésica mediante Alfaxolona (Figura 4.5.).



Figura 4.5. Inserción de un catéter intravenoso en la vena marginal de la oreja del conejo

Una vez inducidos, se mantiene la anestesia con gas Isoflurano y oxígeno mediante una mascarilla (Figura 4.7.).

Para evitar la contaminación del campo quirúrgico, se depiló la zona de las extremidades posteriores, desde la zona tarsal hasta la cadera. Con los animales colocados en decúbito dorsal, se preparó el campo quirúrgico de forma aséptica desinfectando con Clorhexidina al 1% y alcohol. La región de la rodilla se cubrió con paños quirúrgicos estériles fijándolos con grapas alrededor de la zona a incidir. Posteriormente se practicó una incisión cutánea de aproximadamente 1 cm con una hoja de bisturí del número 11 en el aspecto medial y proximal de la tibia. Tras disecar la fascia subcutánea, se expuso la cortical ósea y se practicó un defecto monocortical centrado cráneocaudalmente y a la altura de la tuberosidad tibial usando una broca de 2,5mm (Figura 4.8. A y B). A continuación, se usó una broca de 3,5mm con el fin de ensanchar este mismo defecto para poder colocar a presión los implantes previamente esterilizados (Figura 4.8. C, D y E). En cada tibia se creó un único defecto y se colocó un implante diferente por cada defecto creado. La fascia se suturó mediante un patrón de sutura simple continuo usando una sutura sintética monofilamento absorbible del 3/0. Para la piel se optó por una sutura simple continua con material sintético reabsorbible del 3/0 (Figura 4.8. F). Tras la colocación de los implantes y la sutura de la incisión quirúrgica, se llevó a cabo en todos los animales y todavía bajo los efectos de la anestesia general, un control radiográfico (proyecciones craneocaudal y mediolateral) de la zona intervenida. Los parámetros radiológicos usados para todos los estudios fueron de 50kv 10mAs y distancia focal de 100cm.

Fármaco	Acción	Dosis	Vía
Buprenorfina	Analgésico	0,03mg/kg	SC
Midazolam	Tranquilizante	0,5mg/kg	SC
Medetomidina	Sedante	0,05mg/kg	SC

Figura 4.6. Fármacos usados en la preanestesia

Fármaco	Acción	Dosis	Vía
Alfaxolona	Inductor	1mg/kg	IV
Isoflurano	Anestésico	2%	Inhalatoria
Oxígeno		2l/min	Inhalatoria

Figura 4.7. Fármacos usados en la anestesia

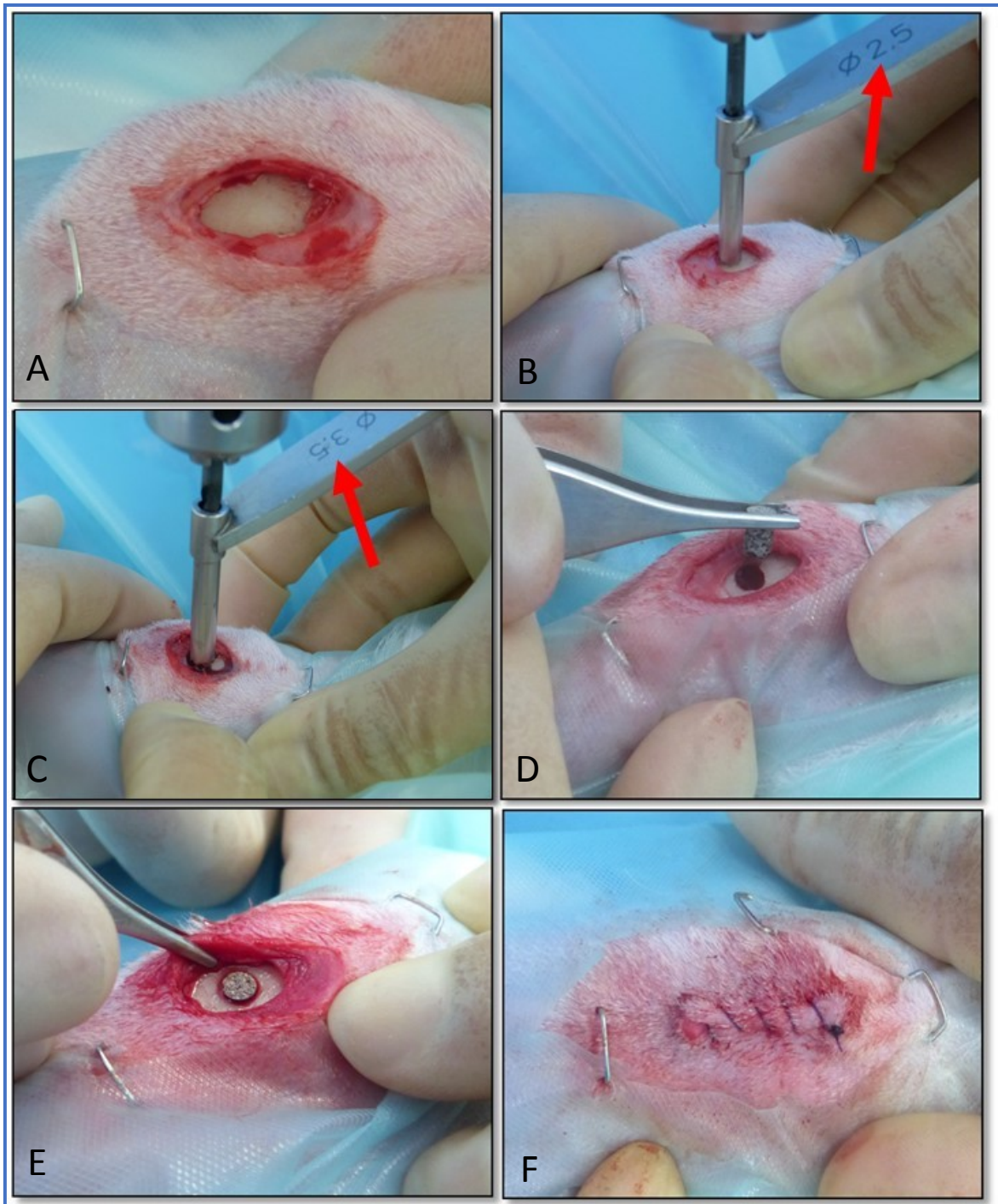


Figura 4.8. Secuencia de imágenes del método de implantación.

A → Exposición de la cortical ósea tras diseccionar la piel y la fascia de la zona medial de la tuberosidad tibial.

B → Creación de un defecto haciendo un “pre-drilling” con la broca del 2,5mm.

C → Ampliación del defecto con la broca de 3,5mm.

D → Implantación a presión del implante de titanio poroso.

E → Detalle del implante una vez ajustado en su posición final.

F → Sutura continua simple de la piel.

4.2.3. Distribución de los implantes

Tal y como se explicó en el apartado de materiales, se formaron 2 grupos temporales de 9 animales cada uno en función de los tiempos de supervivencia (4 y 12 semanas). Se intervinieron ambas tibias de cada animal, realizando un solo defecto monocortical en cada. El protocolo de distribución de los diferentes grupos de materiales se describe en la figura 4.9.:

4 semanas	Número conejo	Tibia derecha	Tibia izquierda	12 semanas	Número conejo	Tibia derecha	Tibia izquierda
	1	GC	GTQ		10	GC	GTQ
	2	GP	GC		11	GP	GC
	3	GTQ	GP		12	GTQ	GP
	4	GTQ	GC		13	GTQ	GC
	5	GC	GP		14	GC	GP
	6	GP	GTQ		15	GP	GTQ
	7	GC	GTQ		16	GC	GTQ
	8	GP	GC		17	GP	GC
	9	GTQ	GP		18	GTQ	GP

Figura 4.9. Distribución de los implantes del grupo temporal A y B. Muestras para corte longitudinal destacadas en amarillo

4.2.4. Método postoperatorio inmediato

Todas las intervenciones ocurrieron sin ninguna incidencia. Todos los animales se recuperaron bien de la cirugía y anestesia. Inmediatamente después de la recuperación de la anestesia, los animales fueron alimentados con papilla de pienso mezclado con agua. Además, se les inyectó vía subcutáneo, antibioterapia, analgesia y antiinflamatorios además de protectores gástricos tal y como se refleja en la figura 4.10.

Fármaco	Acción	Dosis	Vía
Buprenorfina	Analgésico	0,03mg/kg	SC
Meloxicam	Antiinflamatorio	0,2mg/kg	SC
Marbofloxacino	Antibiótico	5mg/kg	SC
Ranitidina	Antiácido	2mg/kg	SC
Metoclopramida	Regulador intestinal	0,5mg/kg	SC

Figura 4.10. Fármacos postquirúrgicos inmediatos

Pasadas unas horas de la cirugía, los conejos fueron devueltos a sus instalaciones, estabulándolos de forma individual, con pienso tipo pallets y agua *ad libitum*.

4.2.5. Método postoperatorio de supervisión

Los primeros 10 días después de la cirugía, los animales fueron tratados con la siguiente medicación mostrada en la figura 4.11.:

Fármaco	Dosis	Vía	Frecuencia	Duración
Meloxicam	0,2mg/kg	SC	Cada 12 horas	10 días
Marbofloxacino	5mg/kg	SC	Cada 24 horas	10 días
Ranitidina	2mg/kg	SC	Cada 12 horas	5 días
Metoclopramida	0,5mg/kg	SC	Cada 8 horas	5 días

Figura 4.11. Fármacos postquirúrgicos en estabulación

Se elaboró un protocolo de supervisión de los conejos vigilando a diario su peso, condición corporal, consumo de alimento y agua, heces y orina, movilidad y el estado de las heridas quirúrgicas. Para eso se elaboró la siguiente ficha de evaluación mostrada en la figura 4.12.:

DÍA 1							
CONEJO	1	2	3	4	5	6	7
Estado general							
Peso							
Condición corporal							
Consumo comida							
Consumo agua							
Consumo cecotrofos							
Heces y orina							
Movilidad							
Estado herida							
Inflamación							
Infección							
Dolor							
Meloxicam							
Marbofloxacino							
Ranitidina							
Metoclopramida							

Figura 4.12. Ficha de supervisión

A los parámetros de consumo de comida, agua y cecotrofos y a los parámetros de movilidad, cojera, inflamación, infección, dolor y estado de la herida se le asignaron valores del 0 al 3. De este modo, 0 representaba la ausencia, 1 la presencia leve, 2 presencia moderada y 3 presencia destacada. Como concepto de estado de herida se consideró la posible dehiscencia de los puntos quirúrgicos, como inflamación la posible aparición de tumefacción o edema (permanencia de la huella digital tras la presión), infección como la presencia de exudado purulento a través de la herida quirúrgica y dolor como la retirada de la extremidad o malestar a la presión de la zona de la herida.

Los animales fueron evaluados por el investigador 3 veces al día durante 10 días, rellenando cada vez la ficha de supervisión, excepto el apartado del peso y condición general los cuales se evaluaron sólo una vez por semana. Pasados 10 días, se retiraron los puntos de las heridas de todos los animales. A partir de este día, los animales fueron supervisados 2 veces al día por el cuidador de las instalaciones y controlados dos veces por semana por el investigador, rellenando en este caso la ficha de supervisión.

4.2.6. Eutanasia

Los animales del primer grupo temporal fueron eutanasiados a las 4 semanas post-cirugía. El protocolo farmacológico usado en la eutanasia se especifica en la figura 4.13. Para realizar la eutanasia según la normativa de bienestar animal de la American Veterinary Medical Association (AVMA), los animales fueron premedicados mediante inyección subcutánea con Midazolam y Medetomidina para facilitar su manejo y la posterior cateterización. La eutanasia se realizó mediante una aplicación endovenosa de pentobarbital sódico.

Una vez eutanasiados, se procedió a eliminar el tejido blando que rodea las tibias dejándolas totalmente disecadas manteniendo especial cuidado en la manipulación de las zonas intervenidas. Posteriormente, se efectuaron radiografías laterales y antero-posteriores de las piezas anatómicas individualizadas.

Se repitió el mismo protocolo de eutanasia para el segundo grupo temporal a las 12 semanas después de la intervención quirúrgica.

Fármaco	Acción	Dosis	Vía
Midazolam	Tranquilizante	0,5 mg/kg	Subcutáneo
Medetomidina	Sedante	0,05 mg/kg	Subcutáneo
Pentobarbital sódico	Eutanásico	200 mg/kg	Intravenoso

Figura 4.13. Fármacos usados en la eutanasia

4.2.7. Preparación de las muestras

En la figura 4.14. se muestra un resumen de la preparación de las muestras. Las tibias fueron identificadas y guardadas individualmente en una solución de formaldehído tamponado al 10% durante 3 semanas. Después de la fijación, se cortaron las muestras óseas con una sierra de diamante¹ para obtener piezas más pequeñas (Figura 4.15. A y B). Se obtuvieron de cada grupo temporal 15 secciones transversales de aproximadamente 10 mm de grosor las cuales contenían el implante y el tejido óseo del alrededor. Del mismo grupo temporal, las 3 muestras restantes se cortaron de forma longitudinal, cortando justo por el centro del implante, obteniendo así dos mitades iguales de la muestra con el implante de titanio poroso. Las piezas obtenidas fueron fijadas de nuevo en solución de formaldehído para asegurar la fijación ósea. Se almacenaron de forma individual en botes de orina con 25 ml de formaldehído, a temperatura ambiente y en agitación constante a 50rpm hasta el inicio del proceso. Las muestras fueron etiquetadas e identificadas con un papel en el interior del bote con impresión láser. Transcurridas 48 horas, las muestras se lavaron con abundante agua de grifo durante 15 minutos a flujo constante dentro de un recipiente con orificio de salida. Después del lavado se inició el proceso de deshidratación mediante inmersión en soluciones de etanol crecientes (Figura 4.15. C). El primer día se sumergieron las muestras en una concentración de 30% de etanol puro con un 70% de agua destilada. Cada 3 días se cambiaron las muestras a concentraciones crecientes: 50% de etanol, 70% de etanol, 96% de etanol hasta llegar al 100% de etanol, dejando las muestras luego con agitación constante de 50rpm.

¹ Exakt 310 CL, Exact Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Alemania

Una vez finalizado el proceso de la deshidratación, se empezó el proceso de infiltración en resina que consistía en sustituir gradualmente el etanol por resina. Como resina se usó el metil-metacrilato^J. Cada 3 días se aumentaba gradualmente el porcentaje de resina: 30, 50, 70 y 100% v/v de resina y se dejaba las muestras en agitación constante a 50rpm. Una vez alcanzado el 100% de solución del metil-metacrilato, las muestras fueron guardadas bajo condiciones de vacío durante 48 horas para facilitar la penetración de la resina dentro del tejido óseo (Figura 4.15. D). A continuación, se inició el proceso de polimerización mediante un fotopolimerizador con luz controlada^K (Histolux, Kulzer-Heraus, Alemania), con una exposición de luz blanca durante 12 horas y 4 horas de exposición a luz ultravioleta (Figura 4.15. F y G). Las muestras se colocaron en unos moldes de plástico pegándolas al suelo del molde y rellenando el mismo con Technovit 7200, evitando la formación de burbujas. Para mantener las muestras identificadas, se incluyeron los papeles identificativos en la resina, colocándolos en un lateral (Figura 4.15. E). Con este proceso, se obtuvieron bloques de resina rígidos conteniendo las muestras óseas con el implante (figura 4.15. H).

	Procedimiento	Tiempo	Agitación 50rpm
1.	Fijación de las muestras recortadas en formaldehido	48 horas	Sí
2.	Lavado con agua de grifo	15 minutos	No
3.	Baño en etanol al 30%	3 días	Sí
4.	Baño en etanol al 50%	3 días	Sí
5.	Baño en etanol al 70%	3 días	Sí
6.	Baño en etanol al 96%	3 días	Sí
7.	Baño en etanol al 100%	3 días	Sí
8.	Baño en etanol al 100%	3 días	Sí
9.	Infiltración en resina al 30%	3 días	Sí
10.	Infiltración en resina al 50%	3 días	Sí
11.	Infiltración en resina al 70%	3 días	Sí
12.	Infiltración en resina al 100%	3 días	Sí
13.	Almacenamiento en vacío	48 horas	No
14.	Fotopolimerización	16 horas	No

Figura 4.14. Resumen del procesamiento de las muestras

^J Technovit 7200, Kulzer-Heraus GmbH, Wehrheim, Alemania

^K Histolux, Kulzer-Heraus GmbH, Wehrheim, Alemania

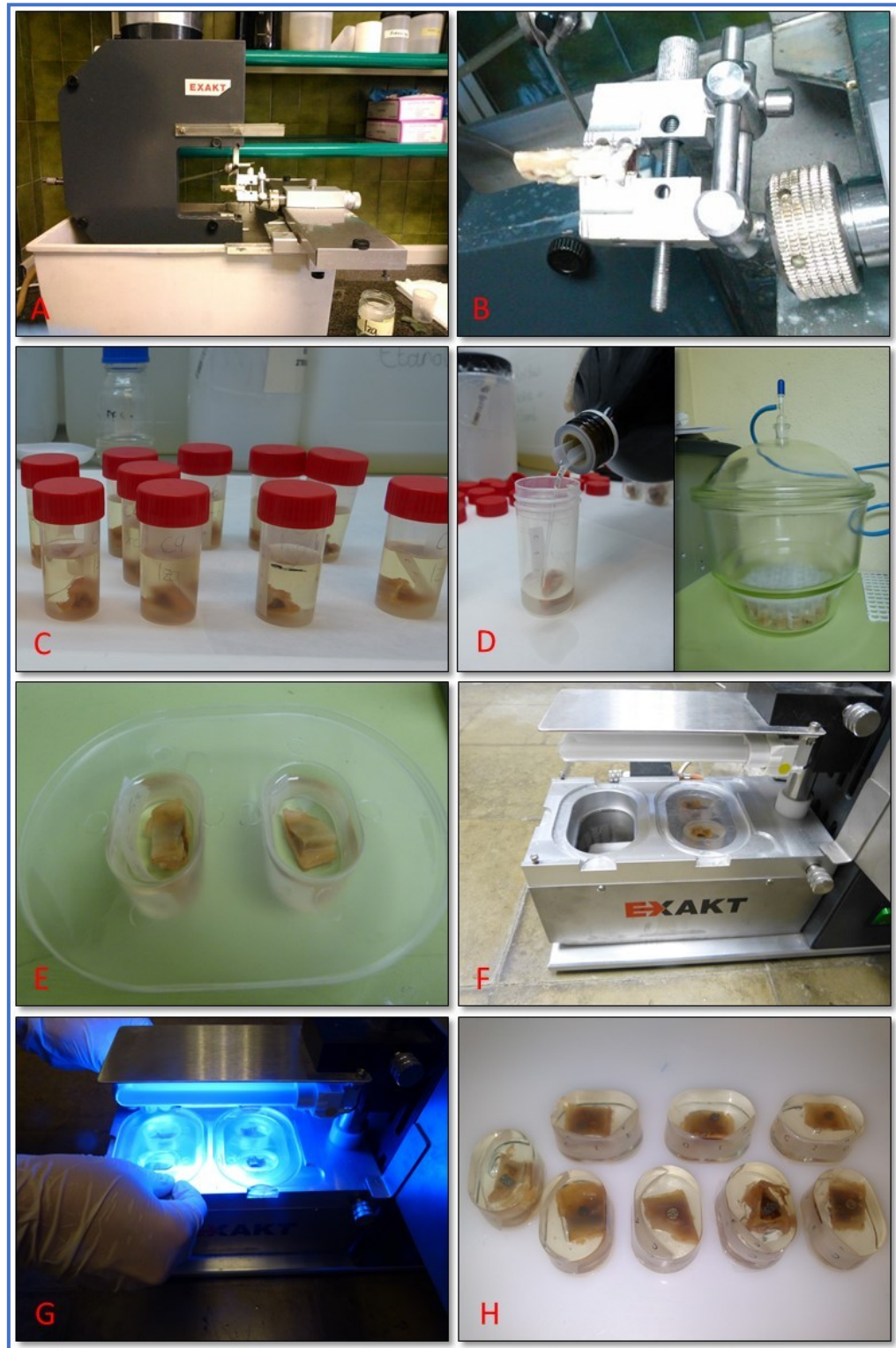


Figura 4.15. Resumen del procesamiento de las muestras

A → Detalle de la sierra de diamante

B → Corte de una de las muestras mediante la sierra de diamante

C → Deshidratación de las muestras

D → Inclusión en resina de metacrilato y proceso de vacío de las muestras

E → Detalle de las muestras en molde de plástico relleno con resina listas para la polimerización

F → Imagen de la fotopolimerizador

G → Imagen de la fotopolimerizador con luz ultravioleta

H → muestras polimerizadas, incluidas en un bloque rígido de resina

Treinta de las 36 muestras fueron preparadas para obtener una imagen transversal. Para ello, las muestras se pegaron a un portaobjetos de plástico y se cortaron con una sierra de diamante la resina sobrante en la parte más proximal del bloque de resina y luego fueron pulidos usando una maquina pulidora metalográfica^L utilizando discos de papel abrasivos de carburo de silicio de grano creciente pasando por 600, 1200, 2400 y 4000 G (Figura 4.16. A y B). Primero se pulieron con el papel abrasivo grueso (600G) con máximo peso hasta llegar al borde del implante de titanio. Después, se utilizaron los siguientes discos en forma consecutiva, poniéndoles menos peso y usando menos tiempo de pulido hasta obtener un pulido tipo espejo sin ningunas irregularidades en la superficie de la muestra (Figura 4.16. C y D).

Las 6 muestras restantes se usaron para cortarlas de forma longitudinal. Para ello, con una sierra de diamante, se cortaron por la mitad, obteniendo así dos mitades iguales. Luego se pulieron de la misma forma que las muestras anteriores.

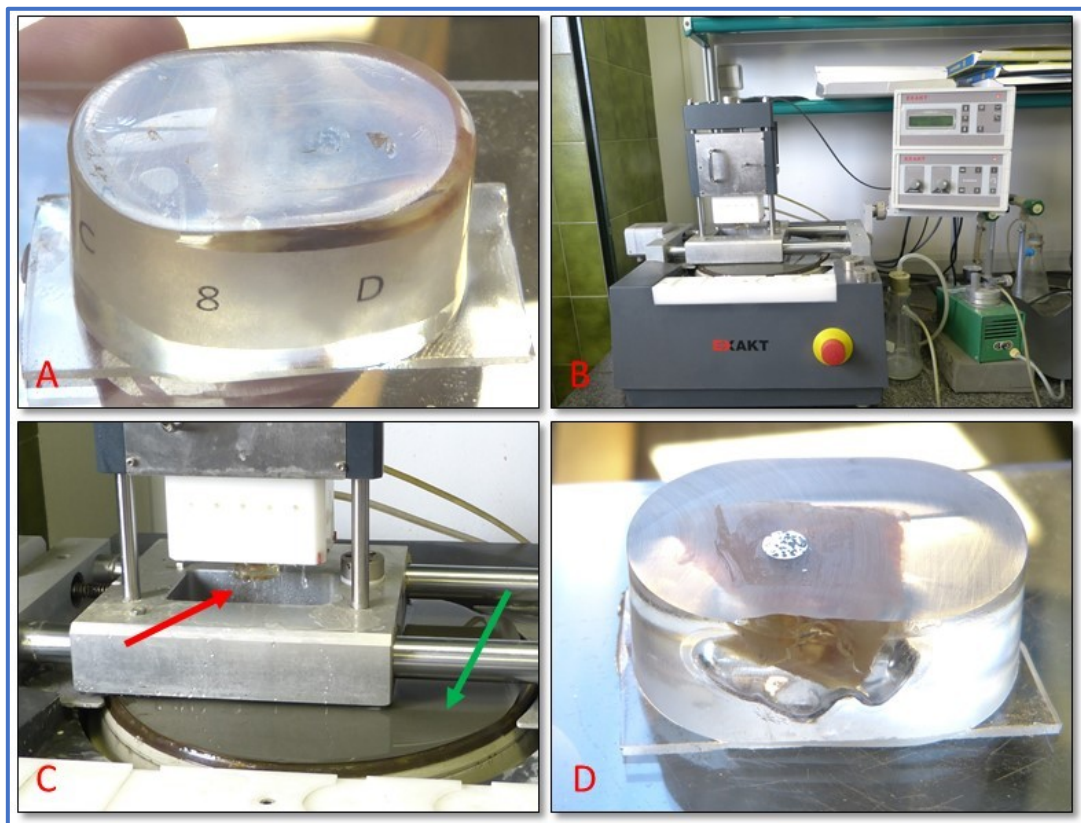


Figura 4.16. Proceso de pulido de las muestras.

A → Muestra antes de pulir

B → Maquina pulidora

C → Muestra (flecha roja) durante el proceso de pulido. La flecha verde muestra el papel abrasivo.

D → Muestra después de pulir (pulido tipo espejo).

^L Exakt-400CS, Exact Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Alemania

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

Las muestras previamente pulidas fueron recubiertas con carbono y se les colocó una banda de plata para mejorar la conductividad de la muestra y por lo tanto la calidad de la imagen (Figura 4.17). Su observación se realizó de forma individual bajo el microscopio electrónico de barrido equipado con un detector de electrones retrodispersados, usando una resolución de hasta 1,1 nm. Se usó un escaneo secuencial de las superficies pulidas para obtener la evaluación. Las imágenes de M.E.R. adquiridas, se unieron usando el programa de ImageJ^M para crear una sola imagen de alta resolución y calidad incluso a muchos aumentos.



Figura 4.17. Imagen de una de las muestras pulidas, recubierta con carbón y su banda de plata.

^M ImageJ, NIH, Maryland, USA

4.2.9. Método de evaluación cuantitativa de las imágenes de M.E.R.

Las imágenes obtenidas mediante el M.E.R. de las muestras cortadas de forma transversal fueron analizadas mediante Photoshop^N y ImageJ para poder calcular el hueso neoformado en el área exterior, el contacto hueso-implante (*BIC: Bone Implant Contact*), el hueso neoformado en diversas regiones de interés en el interior del implante (*ROI: Región of Interest*) y el total de hueso nuevo que creció hacia el interior del implante (*Total ingrowth*). Como concepto para describir el hueso neoformado en el exterior del implante se creó el *bone on-growth*. Este concepto se usó para cuantificar la formación de nuevo tejido óseo alrededor del implante, considerando 0,1mm debido a que siempre hay una pérdida de tejido alrededor del implante o por necrosis térmica al taladrar o por el mismo movimiento de la broca y por la misma isquemia vascular que ocurre durante la implantación. El parámetro *BIC* se usó para cuantificar el porcentaje de tejido óseo que está en íntimo contacto con el perímetro externo del implante. Como no hay ningún artículo científico publicado al respecto, creamos nuestro propio protocolo de evaluación de las muestras: En la primera fase del análisis, mediante Photoshop, se creó un círculo alrededor del implante, adaptándolo a su diámetro externo. Debido a que los implantes tenían un diámetro de 3,5mm, el radio del implante fue 1,75mm.

Este radio se dividió entre 3 para crear así las 3 regiones de interés (*ROI*) en el implante: externo (*ROI1*), medio (*ROI2*) y centro (*ROI3*) (Figura 4.18.). Los cálculos realizados se especifican a continuación:

^N Photoshop, Adobe System, Dublin, Irlanda

Área:

$$A = \pi r^2 = \pi (3,5/2)^2 = 9,62 \text{ mm}^2$$

$$A1 = A2 = A3 = 3,21 \text{ mm}^2$$

Radio:

$$R1 = 3,5/2 = 1,75 \text{ mm}$$

ROIs:

$$1,75/3 = 0,58 \text{ mm}$$

Pixels:

$$1 \text{ mm} = 1701,8 \text{ pixels}$$

$$0,1 \text{ mm} = 170 \text{ pixels}$$

$$0,58 \text{ mm} = 992 \text{ pixels}$$

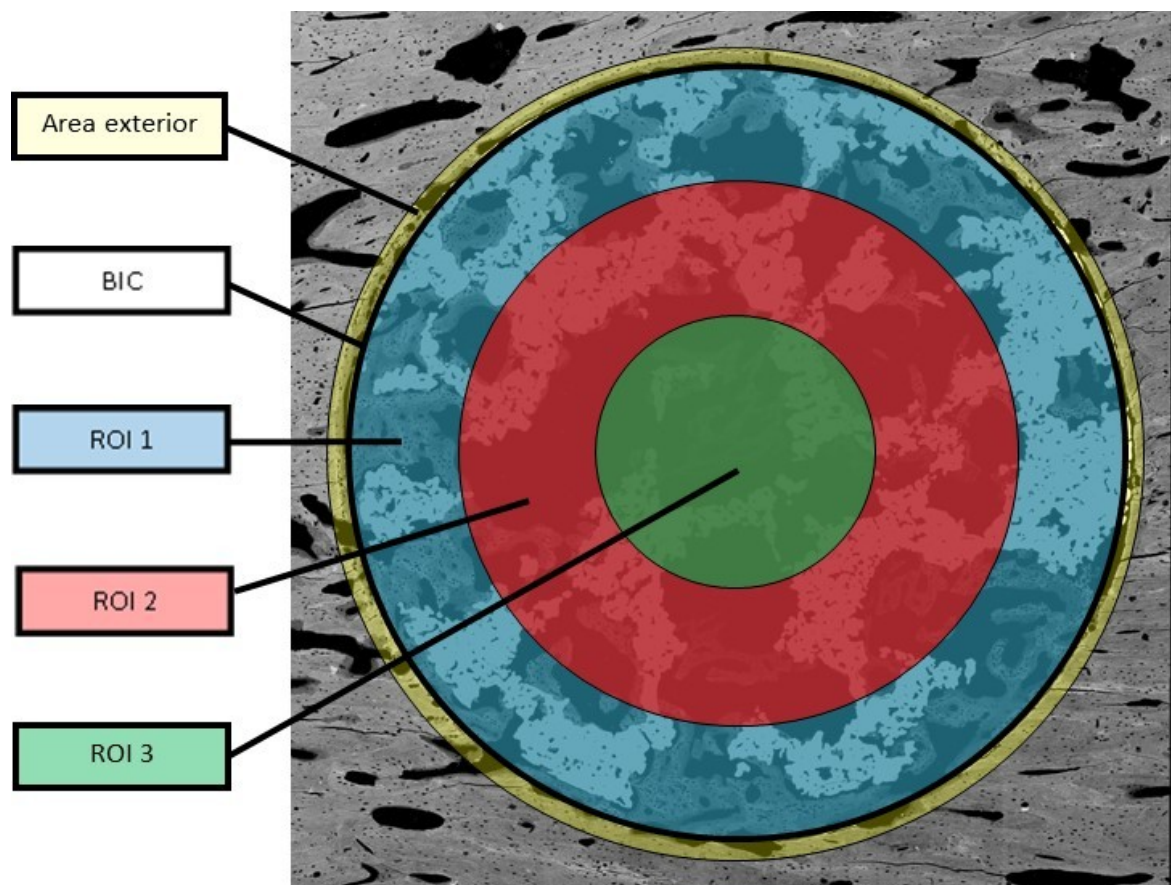
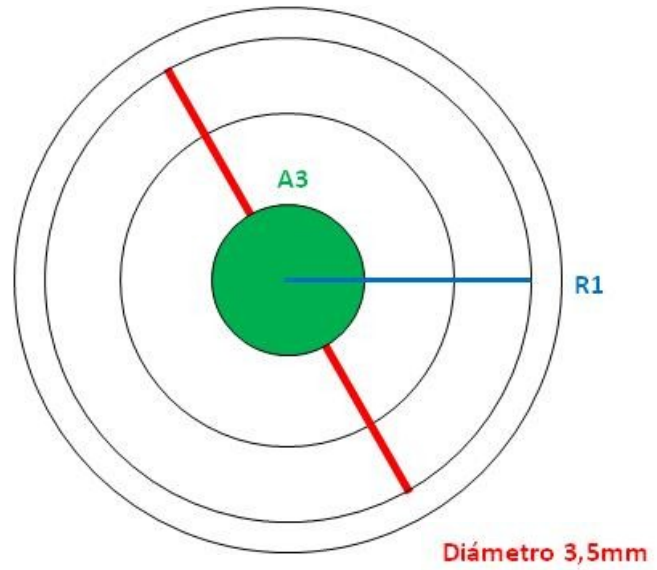


Figura 4. 18. Imagen representativa de las diferentes áreas a analizar

Este proceso de creación de las circunferencias se automatizó para poder hacer exactamente el mismo procedimiento en todas las muestras.

Una vez obtenidos todos los contornos circulares, se guardaron las imágenes en formato tif.

A continuación, se usó el programa ImageJ para seguir con el análisis cuantitativo de las muestras. Este programa se utilizó para cuantificar el crecimiento del hueso en el interior de los poros de los implantes midiendo la cantidad de hueso neoformado en el interior de cada *ROI*, teniendo en cuenta el espacio disponible para este crecimiento en los poros interconectados del titanio. También se midió el crecimiento óseo en el área exterior del implante (*bone on-growth*).

Para analizar las imágenes con los contornos previamente elaborados, se marcaron los diferentes círculos y cada área entre ellos. Con el programa se obtuvo una escala de rojos. Se marcó primero el titanio en rojo y se convirtieron las imágenes a blanco y negro marcando así el titanio del implante en negro (Figura 4.19.).

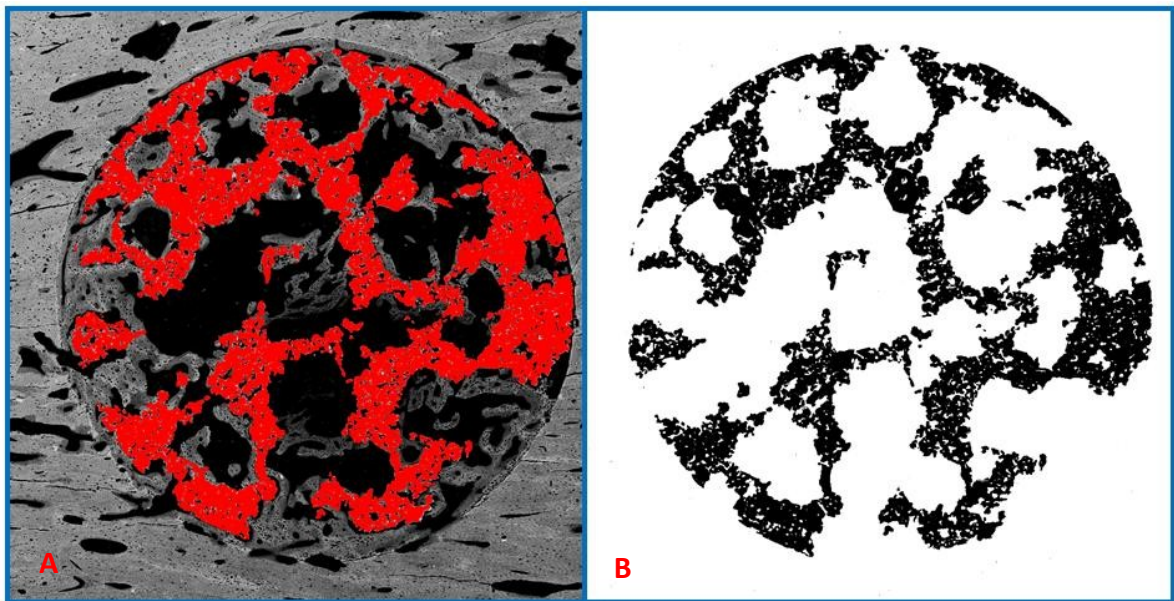


Figura 4.19. A → Imagen de la obtención de una escala de rojos con el programa ImageJ
B → Imagen de la conversión a blanco y negro. El titanio en este caso está reflejado en negro

Luego se repitió el proceso marcando en este caso el hueso neoformado en rojo y luego convirtiéndolo a negro. Una vez establecidas las zonas de evaluación, se obtuvieron las consecuentes mediciones. La medición que hace el ImageJ es una media de grises. El negro tiene un valor de 0 y el blanco un valor de 255. Ponemos un ejemplo para calcular el titanio presente en una muestra:

Titanio				
Exterior	3461486	253	0	255
ROI1	16118811	161	0	255
ROI2	8843447	167	0	255
ROI3	1625408	145	0	255

Se consideró que para obtener los porcentajes de la cantidad de titanio en cada región el 0 (negro) sería un 0% y el 255 (blanco) correspondería al 100%. Para calcular por ejemplo el porcentaje de titanio presente en la *ROI1* se usó el valor de 161 que significa que de 255 hay un 161 de blanco marcado en esta área. Se hizo una simple regla de tres:

$$\begin{array}{l}
 255 - 100\% \\
 161 - x \\
 x - 63,14\%
 \end{array}$$

Eso nos indica que hay un 63,14% de blancos en el área del *ROI1* con lo cual podemos deducir que hay un 36,86% de negro en la misma área, lo que significa el porcentaje de titanio.

El mismo tipo de cálculo se aplicó para todas las *ROIs*, para el área externa, el *BIC* y para calcular el *total ingrowth*.

Se hicieron los mismos cálculos para el hueso además de que siempre se midió también el porcentaje de espacio vacío (ni hueso ni titanio) tanto para el *bone on-growth* como para el *bone in-growth* y los *ROIs*. Además, para los *ROIs* y el hueso neoformado total en el interior del implante, se calculó el espacio disponible para la formación de hueso y se añadió el concepto de hueso real. El espacio disponible se consideró aquellas zonas en el interior del implante donde no había titanio y el hueso real la cantidad de hueso ocupando este espacio disponible. Para el cálculo del *BIC*, se

tomó en consideración el perímetro externo del implante. Se calculó qué cantidad de hueso estaba en contacto con el implante.

Ponemos el siguiente ejemplo:

Muestra C1D (control):

Titanio					
	1	3461486	253	0	255
	2	16118811	161	0	255
	3	8843447	167	0	255
	4	1625408	145	0	255

Hueso					
	1	3461486	56	0	255
	2	16118811	176	0	255
	3	8843447	197	0	255
	4	1625408	187	0	255

Para calcular el titanio en el área exterior (*bone on-growth*) se hicieron los siguientes cálculos:

$$100 - (253 * 100/255) = 0,84$$

Titanio					
	1	3461486	253	0	255
	2	16118811	161	0	255
	3	8843447	167	0	255
	4	1625408	145	0	255

Esto significa que en el área exterior hay un 0,84% de titanio (fragmentos, restos del implante, etc.).

Se hizo lo mismo para calcular la cantidad de hueso en el área exterior:

$$100 - (56 * 100/255) = 78,21$$

Resulta que hay un 78,21% de hueso en el área del *on-growth*.

Después se calculó el espacio vacío en el área exterior:

$$100 - 0,84 - 78,21 = 20,95$$

Con esto, observamos que en todo el espacio exterior del implante (*bone on-growth*) hay un 20,95% de espacio vacío (ni hueso ni titanio), un 78,21% de hueso neoformado y un 0,84% de titanio.

Para calcular la cantidad de hueso que está en contacto con el implante (*BIC*) se hicieron los siguientes cálculos:

Hueso				
1	23144	119	0	255

$$100 - (119 * 100 / 255) = 53,47 \%$$

Ese resultado indica que hay un 54% de hueso en contacto con el perímetro exterior del implante.

Después se calculaban los *ROIs*.

Para calcular el titanio existente en el *ROI* externo se aplicó la siguiente fórmula:

$$100 - (161 * 100 / 255) = 36,93$$

Titanio					
1	3461486	253	0	255	
2	16118811	161	0	255	
3	8843447	167	0	255	
4	1625408	145	0	255	

Significa que en el área del *ROI1* hay un 36,93% de titanio.

Luego se calculó el porcentaje de hueso en el interior de la primera área del implante:

$$100 - (176 * 100/255) = 30,94$$

Hueso					
1	3461486	56	0	255	
2	16118811	176	0	255	
3	8843447	197	0	255	
4	1625408	187	0	255	

Hay 30,94% de hueso en el interior del ROI1.

A continuación, se calcula el espacio vacío que hay en el ROI1:

$$100 - 36,93 - 30,94 = 32,12$$

	% Ti	% Hueso	% espacio	% espacio disponible	%Hueso real
EXTERIOR	0,841961	78,21176	20,94627		
EXTERNO	36,93059	30,94314	32,12627	63,06941	49,06204
MEDIO	34,36078	22,78706	42,85216	65,63922	34,71562
CENTRO	42,97686	26,85686	30,16627	57,02314	47,09819

Eso significa que hay una 32,12% de espacio vacío.

La cantidad de hueso obtenida en este caso no es real. Se calculó el hueso en toda el área del ROI1, pero se debe tener en cuenta que hay una parte del área ocupada por titanio donde no puede crecer hueso. Entonces para calcular el hueso real, primero hay que calcular el espacio disponible para el crecimiento óseo, es decir, cuánto espacio hay en el interior del implante en el área determinada que no esté ocupado por titanio. Para eso se hizo la siguiente resta:

$$100 - 36,93 = 63,07$$

Significa que en el interior del *ROI1* hay un 63,07% de espacio disponible para el *ingrowth* del hueso. A partir de este dato, se pudo calcular el hueso real, es decir, la cantidad de hueso que ocupó este espacio disponible dentro del área determinada.

$$(30,94 * 100) / 63,07 = 49,06$$

	% Ti	% Hueso	% espacio	% espacio disponible	%Hueso real
EXTERIOR	0,841961	78,21176	20,94627		
EXTERNO	36,93059	30,94314	32,12627	63,06941	49,06204
MEDIO	34,36078	22,78706	42,85216	65,63922	34,71562
CENTRO	42,97686	26,85686	30,16627	57,02314	47,09819

Así que tenemos un 49,06% de hueso neoformado en el espacio disponible del implante en el *ROI1*.

Los mismos cálculos se realizaron para los demás *ROIs* (medio y centro). Una vez obtenidos todos los resultados, se calculó el “*total bone ingrowth*” o hueso neoformado total en el interior del implante teniendo en cuenta el espacio disponible para su crecimiento:

$$(49,06 + 34,72 + 47,10) / 3 = 43,63$$

Eso indica que hay un 43,63 % del espacio disponible ocupado por hueso neoformado.

Para asegurar una estricta objetividad durante la evaluación, los análisis fueron llevados a cabo de forma ciega y randomizada sin ningún orden específico.

4.2.10. Método de evaluación cualitativa de las imágenes transversales

Para el análisis cualitativo de las muestras cortadas transversalmente, se realizó una observación directa de las imágenes obtenidas del MER. Se evaluó de forma subjetiva el tejido neoformado en el área exterior del implante y en su interior, para todos los grupos de implantes y para ambos grupos temporales. Las imágenes fueron observadas por 3 investigadores independientes. Primero fueron evaluadas a tamaño real, obteniendo una vista global de la muestra y a continuación se observó cada imagen a diferentes aumentos para ver los detalles. Gracias al escaneo secuencial que se realizó a la hora de obtener las imágenes, éstas presentan una buena calidad a altos aumentos mostrando así detalles precisos incluso de los microporos de los implantes. También se imprimieron las imágenes a tamaño A3 para poder comparar los implantes del mismo grupo y los diferentes grupos de tratamiento entre ellos (Figura 4.20.)

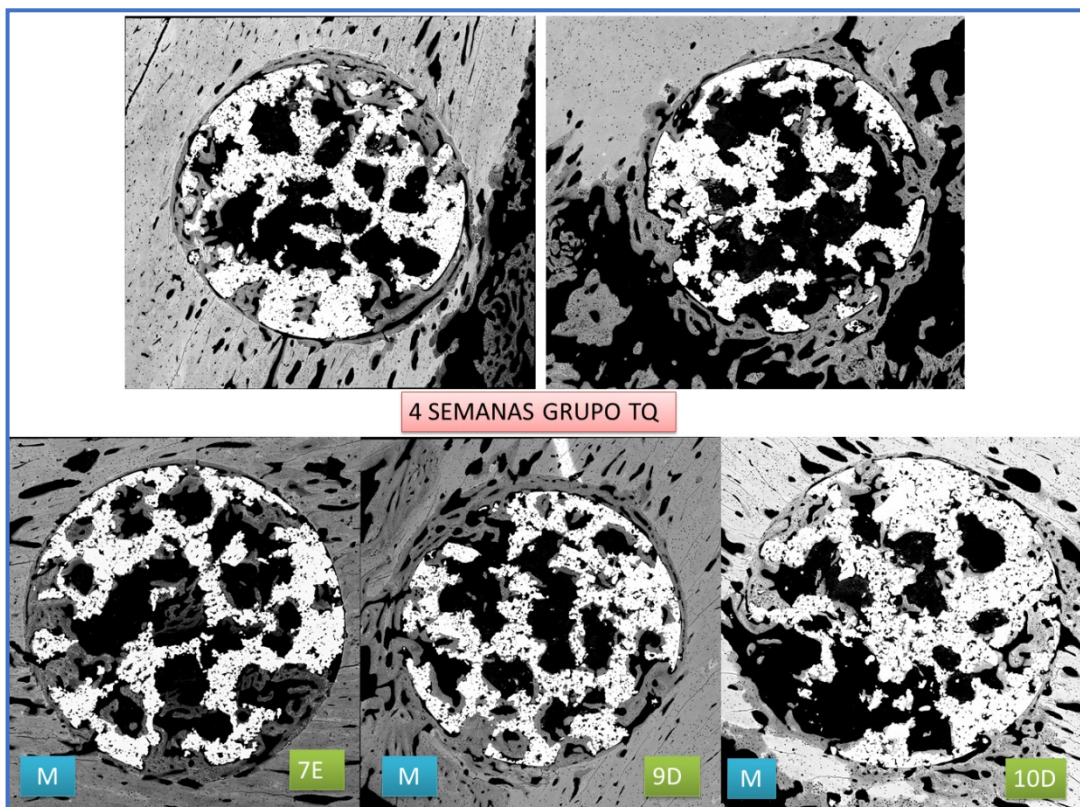


Figura 4.20. Detalle de las imágenes de cada grupo impresas a A3

Al ser un implante bastante rígido, se espera ver una osificación primaria mediante tejido fibroreticular y tejido lamelar y no se espera ver ni tejido cartilaginoso calcificado ni tejido condroide.⁴⁰ La identificación de dichos tejidos se hizo basándose en el artículo de referencia para la identificación de tejidos calcificados mediante MER⁴³.

Se definieron los siguientes parámetros:

- Calidad y madurez del tejido óseo neoformado en el área exterior
- Calidad y madurez del tejido neoformado al contactar con el implante (BIC)
- Calidad y madurez del tejido en el interior del implante
- Forma de entrar del tejido neoformado al interior del implante
- Contacto del tejido óseo neoformado con el titanio en el interior del implante
- Relleno de los microporos en el interior del implante
- Valoración subjetiva del avance del tejido óseo hacia el centro del implante
- Presencia de tejido necrótico u otro tipo de tejido que no sea ni tejido fibroreticular ni tejido lamelar

4.2.11. Método de evaluación cualitativa de las imágenes longitudinales

Seis de las muestras obtenidas, 3 de cada grupo temporal, se usaron para hacer un corte longitudinal justo por el centro del implante. Estas muestras se usaron para hacer un análisis cualitativo de forma subjetiva. Se evaluó el tipo de tejido óseo neoformado en las distintas zonas, se observó su procedencia (periostio, cortical y/o endostio) y si se comprobó la existencia de diferencias en los diferentes grupos de tratamiento. No se volvió a hacer un análisis cuantitativo con estas muestras ya que para esto se tenían las imágenes transversales que eran las más representativas para realizar un análisis cuantitativo.

4.2.12. Análisis estadístico

Los resultados histomorfométricos obtenidos en la evaluación cuantitativa de los diferentes grupos de tratamiento se presentan como valores medios \pm error estándar de la media. Todos los datos obtenidos (variable dependiente) eran cuantitativos, seguían una distribución normal según las pruebas de Anderson-Darling y Kolmogorov-Smirnov y mostraron homocedasticidad (igualdad de varianzas) según las pruebas de Levene y Barralet, cumpliendo así los tres requisitos indispensables para aplicar un test paramétrico para el análisis estadístico. Las comparaciones estadísticas entre los tres grupos de tratamiento dentro de cada período temporal se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey en el software GraphPad Prism^o. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

^o GraphPad Software Inc., La Jolla, CA

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en este estudio, diferenciándolos en resultados clínicos, radiográficos, de la evaluación cuantitativa de las imágenes de M.E.R, de la evaluación cualitativa de las imágenes y del análisis estadístico.

5.1. Resultados clínicos

La cirugía de los animales se llevó a cabo sin ninguna incidencia destacable. La posición en decúbito dorsal de los animales permitió abordar rápidamente las dos zonas subepifisarias tibiales reduciendo el tiempo quirúrgico y por lo tanto, el riesgo anestésico. Los implantes de titanio se adaptaron perfectamente a los defectos óseos creados confirmando la efectividad del método quirúrgico diseñado. Se logró un adecuado *press-fit* con el diámetro de brocas seleccionado. Tras la intervención quirúrgica, los animales se recuperaron sin incidencias de la anestesia y rápidamente recuperaron la consciencia. El protocolo analgésico mantuvo a los animales tranquilos durante las horas inmediatas a la cirugía. La valoración clínica de los pacientes en los sucesivos días tras la intervención quirúrgica fue totalmente favorable destacando simplemente un leve descenso los primeros dos días de la ingesta de comida y agua, aunque no se observaron variaciones en el peso ni en la condición general de los animales. La recuperación de la movilidad de las extremidades posteriores se produjo a las pocas horas tras la cirugía. La cicatrización de las heridas quirúrgicas fue favorable excepto en un conejo del primer grupo temporal el cual padecía una mínima dehiscencia de la herida quirúrgica al desprenderse un punto de sutura. No se observaron signos ni de infección ni inflamación ni dolor. El animal con leve dehiscencia presentó igualmente una cicatrización normal sin ninguna evidencia de infección ni inflamación pero mostrando un leve dolor a la palpación de la zona. Al final del estudio, ninguno de los grupos temporales mostró ninguna alteración en los parámetros de la ficha de supervisión, ni signos de atrofia muscular ni problemas de movilidad en las

extremidades posteriores, ni se observaron tampoco cambios relevantes en el peso o en la condición corporal.

5.2. Resultados radiográficos

La valoración radiográfica preoperatoria no evidenció ninguna patología ósea en ninguno de los animales. La valoración postoperatoria inmediata mostró que todos los defectos se habían practicado en una localización correcta, en la zona proximal de la cara medial de la tibia y caudalmente a la cresta tibial, Todos los implantes fueron colocados en su localización correcta y en la orientación adecuada. Únicamente en uno de los defectos de un animal, el implante no quedó perfectamente enrasado y sobresalía muy levemente de la superficie perióstica. Radiográficamente no se pudo distinguir el tipo de implante que llevaba cada animal ya que los distintos tratamientos de superficie de los implantes no reflejan diferenciación radiográfica. En todas las radiografías se observa claramente el implante metálico al ser este mucho más radiopaco que el resto del hueso (Figura 5.1.).

La valoración radiográfica postoperatoria de un mes mostró que todos los implantes se mantuvieron correctamente en su posición adecuada (Figura 5.2.). No se observaron cambios radiológicos importantes, ni osteólisis ni reacción perióstica ni cambios de la radioopacidad de los implantes. Tampoco se vieron diferencias comparando las radiografías posquirúrgicas inmediatas con las radiografías de 1 mes. Al ser un implante muy pequeño con macro y microporosidades, radiográficamente no se pueden observar signos de osteointegración.

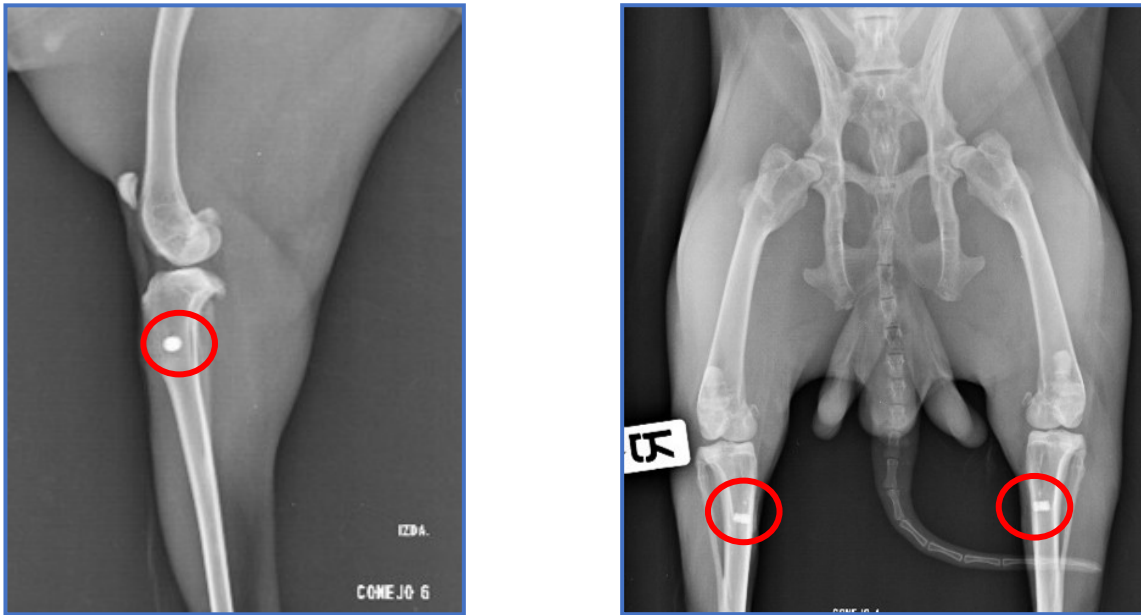


Figura 5. 1. Radiografías látero-lateral y ventro-dorsal postquirúrgicas inmediatas. Círculos: implantes de titanio poroso

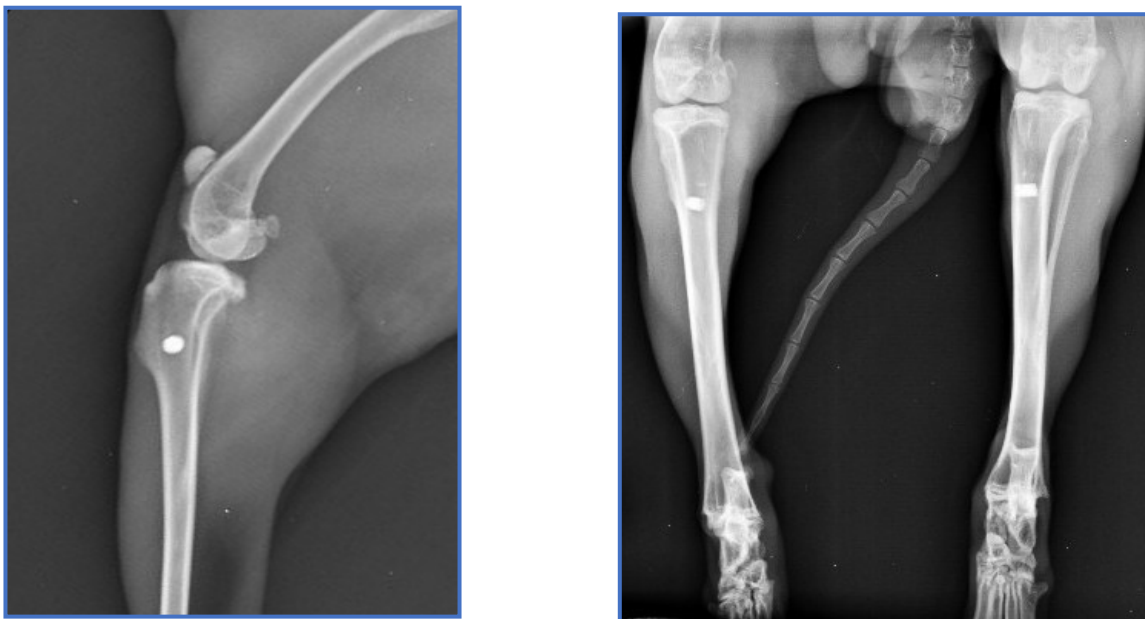


Figura 5. 2. Radiografías látero-lateral y ventro-dorsal 1 mes postquirúrgicas de los mismos animales que en la figura 5.1.

En el grupo temporal B, se pudieron observar resultados similares a los del grupo A. Después de la valoración de las radiografías a las 12 semanas, se mostró que todos los implantes se mantuvieron en su posición correcta, sin indicios de aflojamiento o migración del implante. Tampoco hubo signos de osteólisis ni reacción perióstica alrededor de los implantes. Igual que en el caso de las imágenes a las 4 semanas, en

las radiografías de los implantes a las 12 semanas postcirugía, tampoco se pudo observar signos de osteointegración debido al tamaño de los implantes.

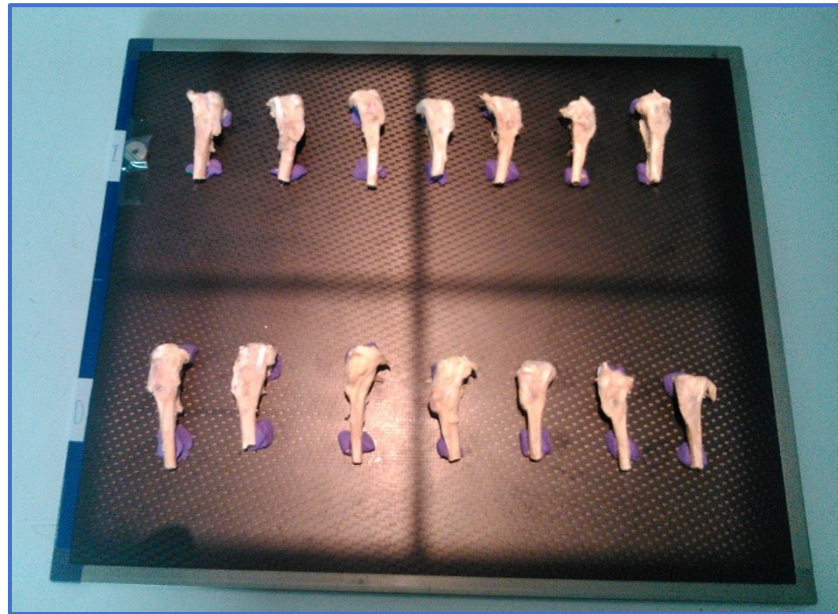


Figura 5. 3. Preparación para radiografiar las tibias diseccionadas, grupo temporal B

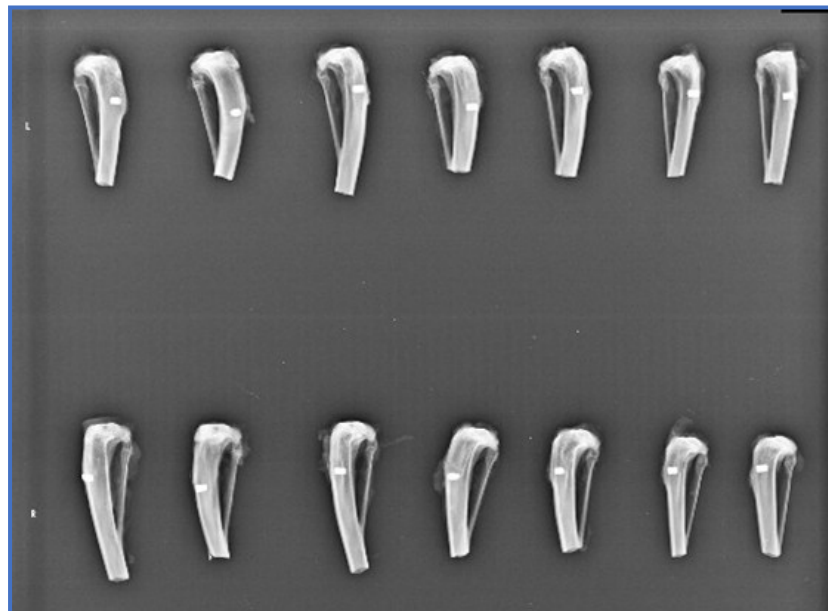


Figura 5. 4. Imagen radiográfica de las tibias diseccionadas del grupo temporal B

5.3. Resultados de la evaluación cuantitativa de las imágenes de M.E.R.

Los resultados obtenidos de la evaluación cuantitativa fueron los siguientes:

5.3.1. Grupo temporal 4 semanas

Del primer grupo temporal, se obtuvieron 15 muestras en total, 5 del grupo control, 5 del grupo termoquímico y 5 del grupo peptídico. Los resultados obtenidos para cada grupo en las diferentes áreas se muestran en la figura 5.8.

	GP	GTQ	GC
Area exterior	68,54% (4,40)	64,45% (4,48)	63,64% (7,06)
BIC	58,07% (3,60)	56,87% (3,70)	49,24% (10,78)
“Total ingrowth”	21,49% (3,67)	18,05% (2,00)	13,48% (3,47)
ROI1 (externo)	39,55% (3,75)	34,84% (3,85)	28,18% (7,21)
ROI2 (medio)	16,73% (5,34)	13,96% (2,06)	8,34% (2,58)
ROI3 (centro)	8,78% (3,98)	6,59% (0,62)	6,33% (1,47)

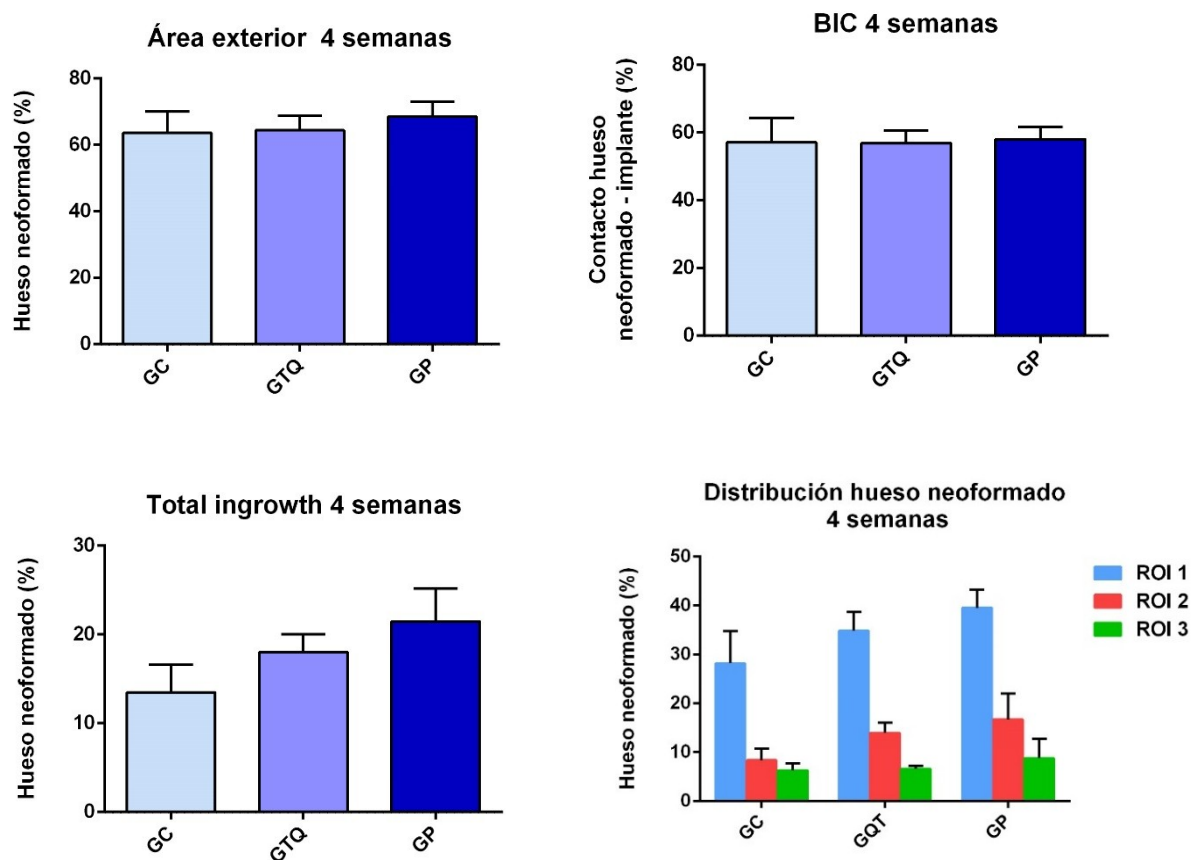
Figura 5.8. Evaluación cuantitativa mediante MER. de las muestras del grupo temporal de 4 semanas

Los resultados se mostraron como porcentaje de hueso neoformado en las áreas evaluadas, junto con su error estándar de la media (*SEM*).

En el primer grupo temporal, después de 4 semanas de implantación, la observación con el M.E.R. mostró que todos los tipos de implantes tuvieron neoformación ósea en el interior de los poros. En general, los implantes tratados con péptidos obtuvieron resultados superiores, tanto para las mediciones en el área exterior como para el interior del implante. Se observó un *ingrowth* superior hacia el interior del implante, un *on-growth* y un *BIC* superiores en el caso de las muestras con tratamiento peptídico en comparación con los implantes tratados termoquímicamente y también con los implantes del grupo control. Igualmente, las muestras del grupo GTQ mostraron resultados superiores a los del grupo de implantes porosos sin tratamiento superficial. Las muestras del grupo GP mostraron los valores más altos para el *BIC* (58,07%) y el valor más alto para la neoformación ósea en el área externa (68,54%) es decir, el mejor valor de *bone on-growth*. Los implantes sometidos a tratamiento termoquímico obtuvieron un valor del *BIC* de un 56,87% y un valor de

64,45% para el hueso neoformado en el perímetro exterior. El grupo control presentó un valor de *BIC* de 49,24% y 63,64% de hueso neoformado en el área exterior. Respecto a los valores de las *ROIs*, la tendencia fue la misma: los implantes sin tratamiento correspondieron a las muestras con valores más bajos, con un *total ingrowth* de 13,48% respecto al 18,05% del grupo GTQ o el 21,49% del grupo con tratamiento peptídico. Los implantes del grupo GP fueron las muestras con resultados superiores para todas las *ROIs*, obteniendo un 39,55% de hueso en el *ROI1*, un 16,73% de hueso en el *ROI2* y un 8,78% de hueso en el *ROI3*. Los implantes con tratamiento térmico-químico consiguieron los siguientes valores: *ROI1* 34,84%, *ROI2* 13,96% y *ROI3* 6,59%. Los implantes no tratados obtuvieron unos resultados inferiores para cada uno de las *ROIs*: *ROI1* 28,18%, *ROI2* 8,34% y *ROI3* 6,33%. Así, se obtuvieron de nuevo resultados superiores para los implantes porosos tratados con péptidos dejando en segundo lugar al grupo con tratamiento térmico-químico.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos mediante representaciones graficas:



5.3.2. Grupo temporal 12 semanas

En el segundo grupo temporal, se obtuvieron un total de 15 muestras transversales, 5 muestras del grupo control, 5 muestras del GTQ y 5 muestras del grupo peptídico. Los resultados obtenidos para cada grupo en las diferentes áreas se muestran en la figura 5.9. Los resultados se mostraron como porcentaje de tejido óseo neoformado en las áreas evaluadas junto con su error estándar de la media (SEM).

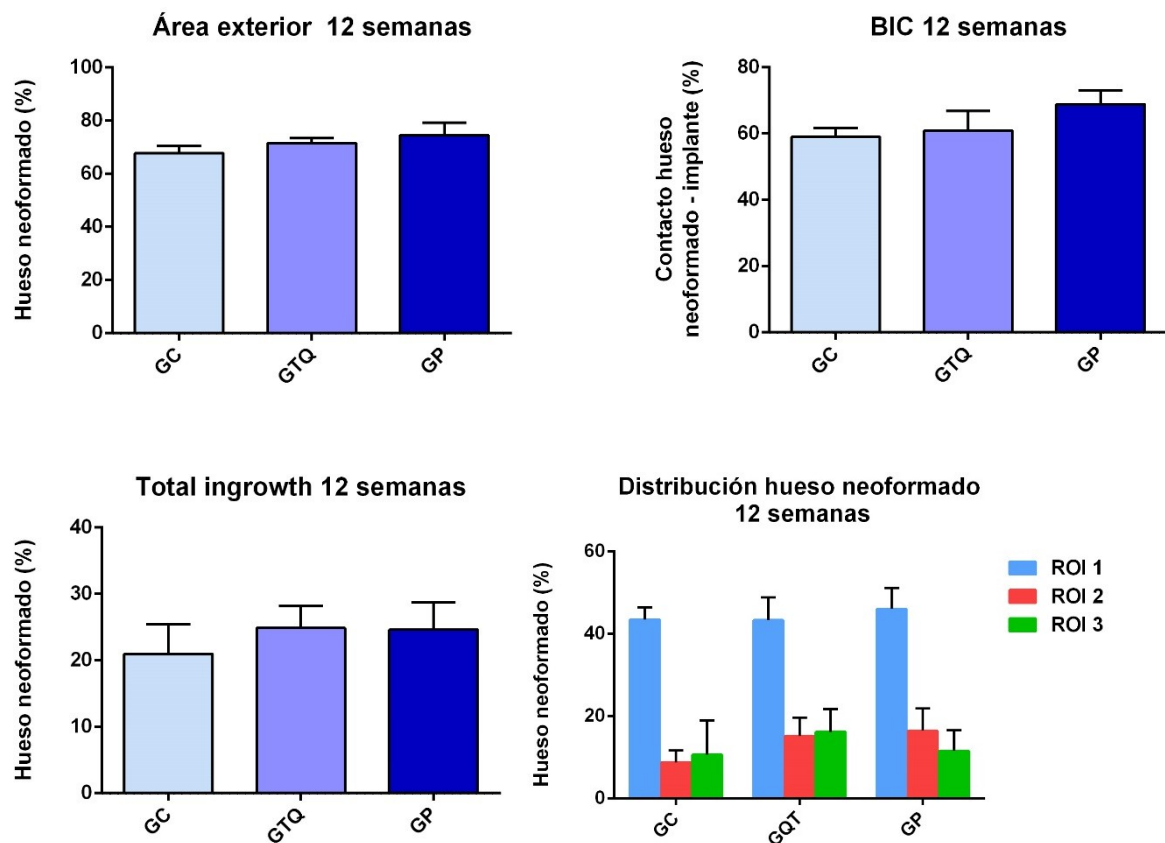
	GP	GTQ	GC
Area exterior	74,55% (4,71)	71,60% (1,93)	67,79% (2,77)
BIC	68,93% (4,13)	60,91% (5,93)	59,05% (2,66)
“Total ingrowth”	24,66% (4,11)	24,87% (3,39)	20,94% (4,48)
ROI1 (externo)	46,03% (5,10)	43,31% (5,58)	43,47% (3,03)
ROI2 (medio)	16,41% (5,39)	15,14% (4,49)	8,75% (2,85)
ROI3 (centro)	11,53% (5,04)	16,16% (5,62)	10,61% (8,35)

Figura 5.9. Resultados a las 12 semanas

Después de 12 semanas de implantación, se pudo observar que las muestras mostraron la misma tendencia que en el primer grupo temporal. Los implantes tratados con péptidos mostraron valores superiores para la cuantificación en el área exterior. Los resultados del grupo GP mostraron un 74,55% de hueso neoformado en el área exterior y un 68,93% de tejido óseo en contacto con el perímetro externo del implante (*BIC*). En el área interior se observó más variabilidad respecto a los diversos grupos: en cuanto a hueso real total en el interior del implante se observó que las muestras con el tratamiento termoquímico mostraron valores levemente por encima de los obtenidos para el grupo peptídico. Así se observó para el grupo TQ un total de 24,87% de tejido óseo neoformado en la totalidad del interior del implante respecto al 24,66% para el grupo peptídico. Comparando las diferentes *ROIs*, se observó unos valores de *ROI1* 46,03%, *ROI2* 16,41% y *ROI3* 11,53% para el grupo con tratamiento peptídico y unos valores de *ROI1* 43,31%, *ROI2* 15,14% y *ROI3* de 16,16% para el GTQ. Se obtuvieron resultados superiores para la *ROI* externa y *ROI* media en el GP pero en cambio se vieron resultados más altos para la *ROI* centro en el caso del grupo

con tratamiento químico-térmico, el cual incluso superó el valor obtenido para este mismo grupo en la ROI2.

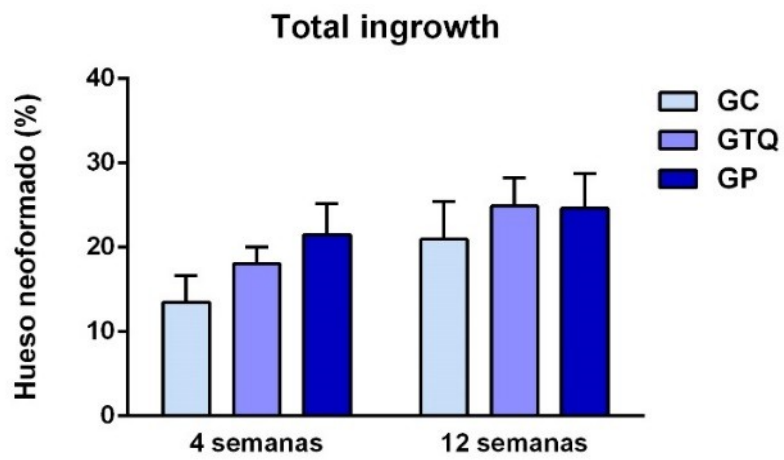
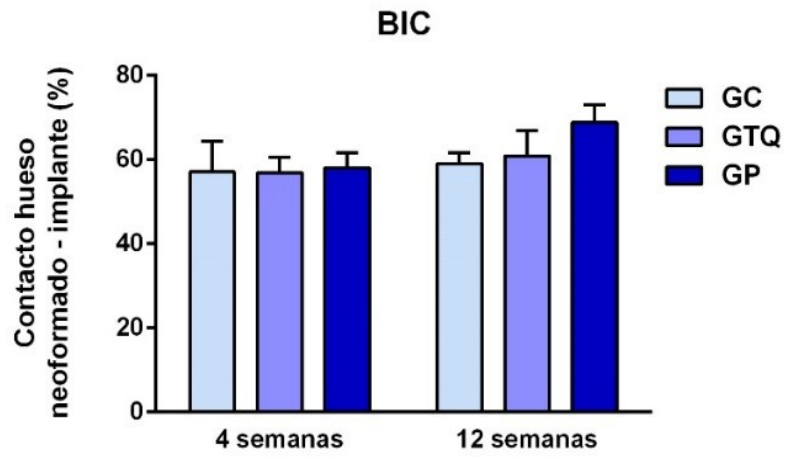
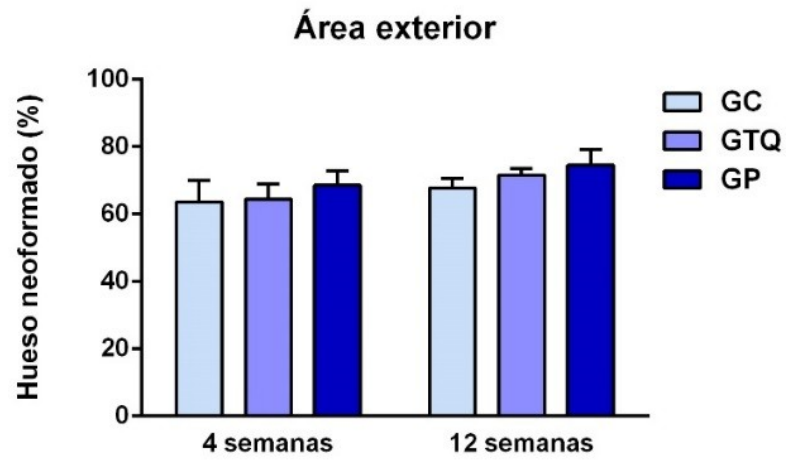
En cuanto a los resultados obtenidos para el grupo termoquímico, se observó que fueron levemente más altos que los obtenidos en el grupo control para todos los parámetros analizados, excepto para la ROI externa donde el valor del porcentaje de hueso neoformado del grupo GTQ es mínimamente inferior al valor del grupo control (43,31% respecto a 43,47%). Igualmente, comprobando el total de tejido óseo neoformado en el interior del implante se observó un valor de 24,87% para el grupo de los implantes con tratamiento termoquímico respecto a un 20,94% para el caso del grupo control. En el área exterior los valores obtenidos fueron los siguiente: 71,60% de hueso neoformado en el área exterior para el grupo GTQ y un 67,79% de tejido óseo en el área exterior del grupo de los implantes sin tratamiento de superficie. El BIC para el grupo termoquímico fue de un 60,91% respecto a un 59,05% del grupo control. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el grupo B mediante representaciones graficas:



Comparando un grupo temporal con el otro, se observó que en general los valores para todos los parámetros para los 3 grupos experimentales habían aumentado en el segundo grupo temporal respecto al primer grupo temporal. La única anomalía que se pudo observar fue que en el grupo B, la *ROI2* del grupo peptídico había bajado muy levemente respecto al grupo A, pasando de un 16,73% a las 4 semanas a un 16,41% a las 12 semanas. En el caso del grupo control se observó que el aumento de tejido neoformado en la *ROI2* del grupo temporal A respecto al B era muy leve, pasando sólo de un 8,34% a las 4 semanas a un 8,75% a las 12 semanas. Donde se notó un cambio muy grande entre un grupo temporal y el otro, fue en la *ROI* centro del GTQ donde se pasó de un 6,59% de tejido neoformado a las 4 semanas a un 16,16% de tejido óseo neoformado a las 12 semanas. En general, se pudo concretar que hay un claro aumento generalizado de tejido óseo neoformado de un grupo temporal a otro. Los valores comparativos entre el GA y el GB se pueden observar en la figura 5.10.

		Grupo 4 semanas	Grupo 12 semanas
GP	Área exterior	68,54% (4,40)	74,55% (4,71)
	BIC	58,07% (3,60)	68,93% (4,16)
	“Total ingrowth”	21,49% (3,67)	24,66% (4,11)
GTQ	Área exterior	64,45% (4,48)	71,60% (1,93)
	BIC	56,87% (3,70)	60,91% (5,93)
	“Total ingrowth”	18,05% (2,00)	24,87% (3,39)
GC	Área exterior	63,64% (7,06)	67,79% (2,77)
	BIC	49,24% (10,78)	59,05% (2,66)
	“Total ingrowth”	13,48% (3,47)	20,94% (4,48)

Figura 5.10. Resultados comparativos entre el GA y el GB indicando el porcentaje de hueso neoformado con su error estándar de la media



5.4. Resultados de la evaluación cualitativa de las imágenes transversales

Las imágenes obtenidas mediante MER fueron observadas por 3 investigadores expertos de forma independiente, primero a pocos aumentos para posibilitar una visión panorámica completa y posteriormente a mayores aumentos para observar e identificar adecuadamente los tejidos óseos neoformados.

5.4.1. Grupo temporal 4 semanas

Se analizaron las imágenes obtenidas por MER de las muestras del grupo A.

a) Grupo control

En este grupo, a primera vista se pudo observar una gran diferencia entre las distintas muestras. Hubo muestras con presencia moderada de tejido óseo neoformado en su interior así como una muestra sin presencia ninguna de tejido óseo neoformado (Figura 5.11.).

En el área exterior se apreció una buena cantidad de tejido óseo neoformado, llegando a contactar de forma parcial con el exterior del implante.

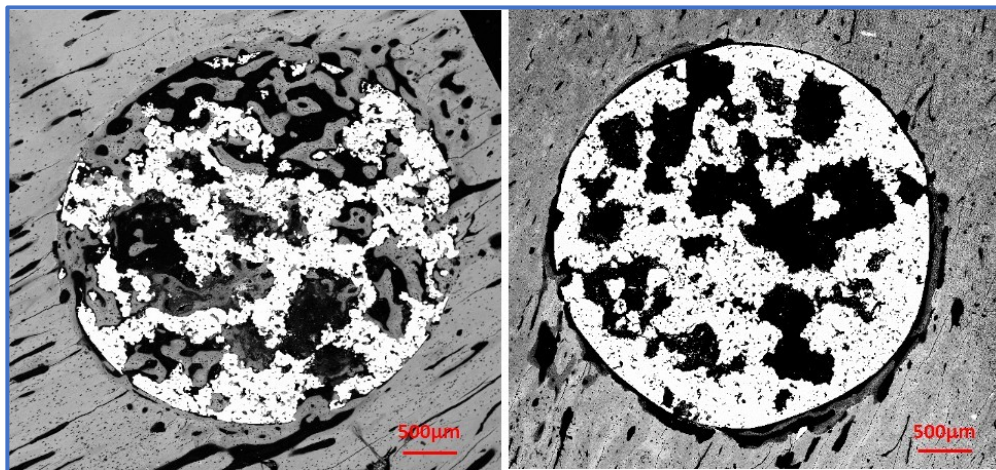


Figura 5.11. Imágenes de dos muestras del grupo A, grupo control. Se puede observar la diferencia de crecimiento de tejido neoformado entre una muestra y la otra.

Algunas muestras presentaban un buen *in-growth* de tejido óseo, llegando incluso al centro del implante y hubo muestras donde el tejido neoformado se quedaba más en la periferia sin penetrar hasta el centro del implante. En general, hubo poco tejido neoformado llegando hasta el centro del implante. A mayores aumentos en la zona exterior se apreció que una leve prevalencia de tejido lamelar con zonas de tejido

fibroreticular normalmente circundado por tejido lamelar. En el interior del implante, se observaron ambos tipos de tejido, en las zonas más externas con prevalencia de tejido lamelar y a medida que el tejido avanzaba hacia el centro del implante era predominantemente tejido óseo fibroreticular. En 2 de las muestras se pudo observar la presencia de osteonas en el interior del implante (zona ROI2) (Figura 5.12.).

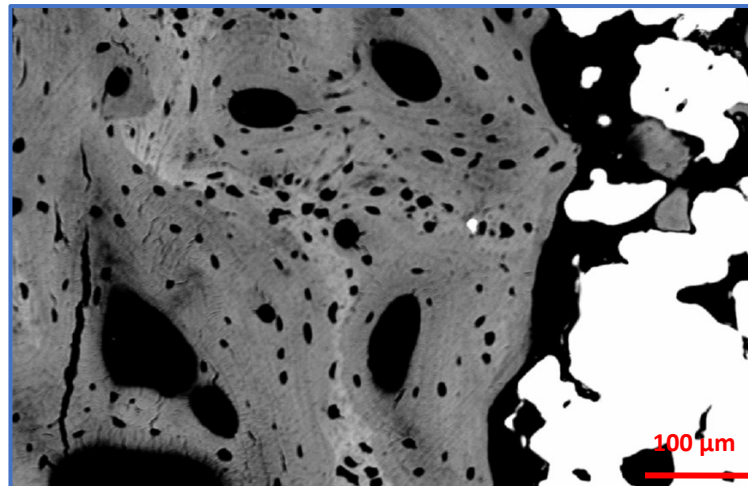


Figura 5.12. Imagen detallada de una muestra del grupo A control mostrando una zona con osteonas

Se apreció crecimiento del tejido neoformado en el interior de los microporos aproximadamente en un 30%. También hubo en general un buen contacto del tejido con el metal en el interior de los implantes, llegando a contactar por completo en algunas de las zonas y habiendo contacto parcial en otras. Una peculiaridad que se encontró observando las muestras con detalle, fue la presencia de tejido necrótico localizado en dos de las muestras estudiadas (Figura 5.13.)

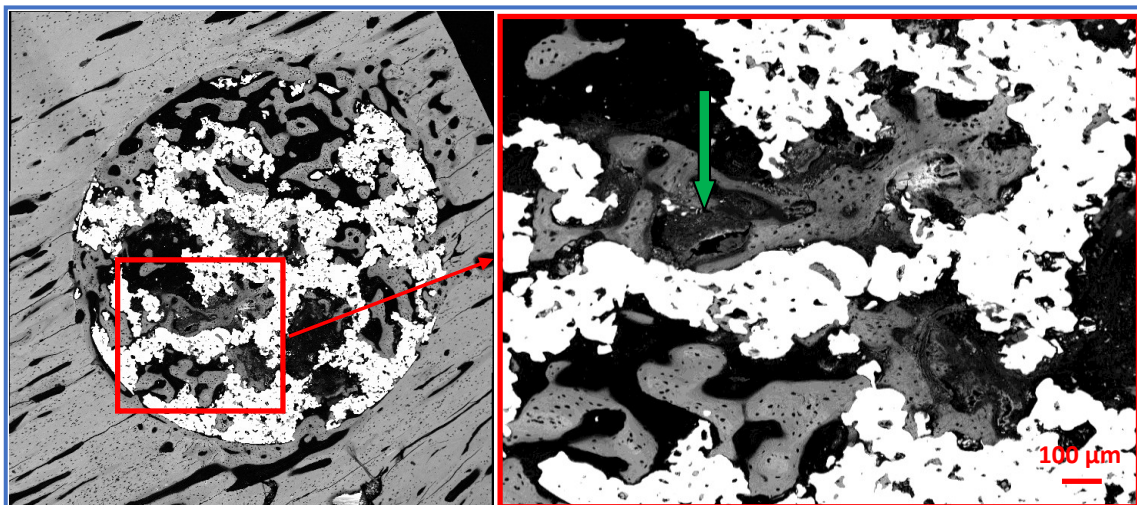


Figura 5.13. A → Implante del grupo A control. B → Detalle aumentado donde se observa la presencia de tejido necrótico en el interior (flecha verde). También se aprecia el contacto parcial del tejido neoformado con el implante y el relleno de muchos de los microporos.

b) Grupo con tratamiento termoquímico

Observando este grupo de implantes a pocos aumentos, se pudo apreciar un buen crecimiento de tejido neoformado de forma general. Se observó tejido óseo nuevo en el área exterior, en el interior de los implantes y un buen contacto hueso-implante en el exterior (BIC). Se apreció más cantidad de hueso en la periferia del implante y menos en el centro, es decir, hubo una buena propagación del tejido hacia el centro del implante, pero en poca cantidad. En el área exterior se notó una predominancia de tejido lamelar, incluso se observaron algunas osteonas. El tejido parecía ser algo más maduro que en el grupo control, observando menos presencia de tejido fibroreticular.

En el interior del implante se observó mucha cantidad de tejido lamelar, rodeando en algunas zonas el tejido fibroreticular. A medida que el tejido llegaba al centro del implante, se hacía cada vez más inmaduro, apreciándose muy poco tejido lamelar en el centro y prevaleciendo tejido fibroreticular en la zona más profunda de las muestras. Destacó el íntimo contacto del tejido óseo neoformado con el titanio en el interior de los implantes y el superior relleno de los microporos (aproximadamente un 40%) (Figura 5.14).

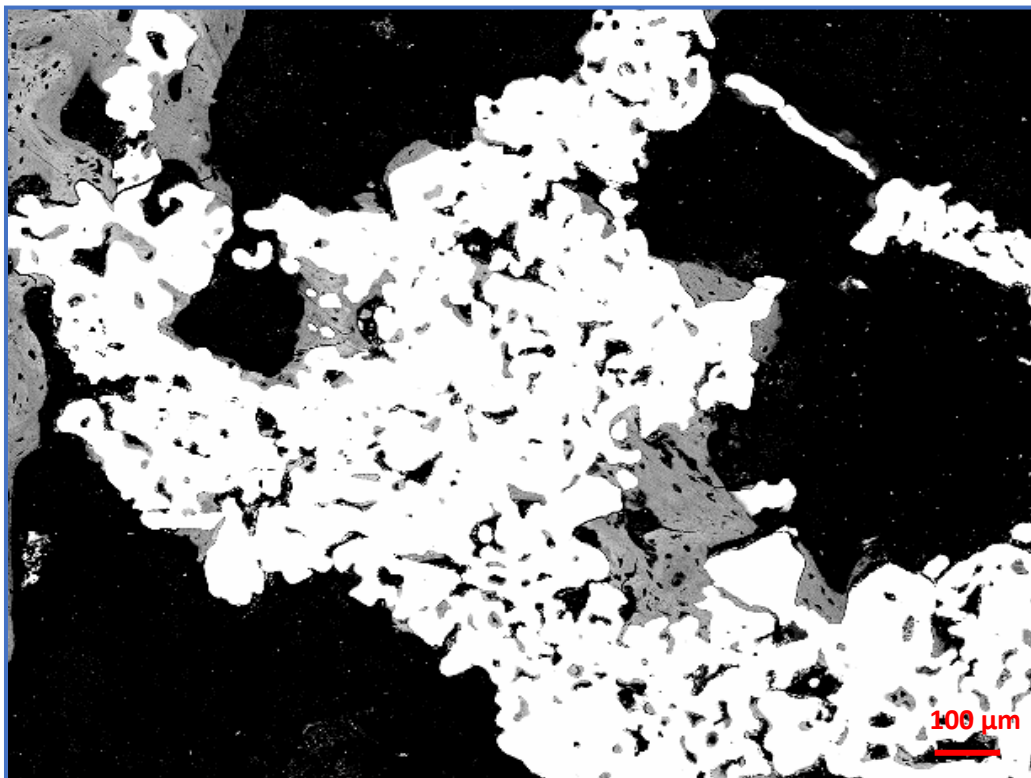


Figura 5.14. Detalle de la zona de la ROI 3 de uno de los implantes. Se aprecia el íntimo contacto en muchas regiones del hueso neoformado con el metal y el relleno de los microporos.

c) Grupo con tratamiento peptídico

En este grupo de implantes, observándolos a pocos aumentos se apreció en general gran cantidad de tejido óseo neoformado, tanto en la zona exterior como en el interior. Además, este tejido penetró hasta el centro del implante en la mayoría de las muestras. A simple vista, la cantidad total de tejido neoformado parecía ser superior comparado con la de los otros grupos.

La madurez del tejido observada es buena, destacando una gran superioridad de tejido lamelar en la zona exterior de los implantes, con varias zonas de osteonas. Hacia el interior de la muestra, prevalece también el tejido lamelar, en general, algo más maduro que en los otros grupos, haciéndose menos maduro llegando hacia el centro de los implantes. En los centros se observó tejido fibroreticular, pero también presencia de tejido lamelar en varias de las muestras, además de la presencia de algunas osteonas. Hubo un adecuado contacto del hueso con el implante en la periferia.

En cambio, en el interior de los implantes se apreció un contacto del hueso neoformado con el metal muy inferior en comparación con los otros grupos de implantes. El tejido apenas contactó con el titanio y, excepto en una de las muestras, hay muy poca penetración hacia el interior de los microporos. Hay una buena propagación del tejido neoformado hacia el interior del implante, pero evitando en su camino hacia el centro el metal en casi todas las zonas (Figura 5.15. y Figura 5.16.).

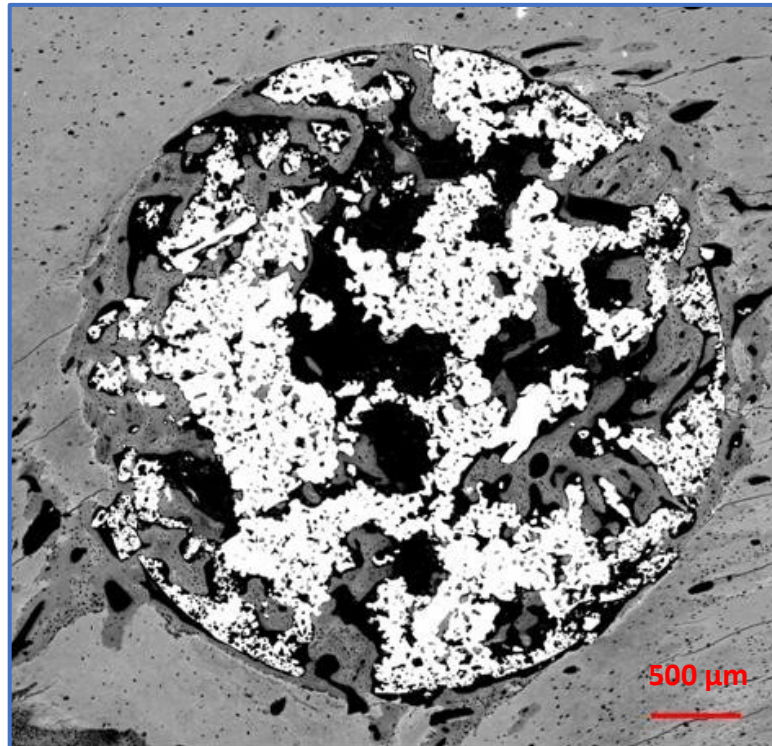


Figura 5.15. Imagen de MER de un implante del grupo A con tratamiento peptídico. Se puede apreciar el buen "in-growth" del hueso y la moderada cantidad de tejido neoformado. Además, se observa un escaso contacto del hueso con el implante, no llegando a contactar con éste en muchas zonas.

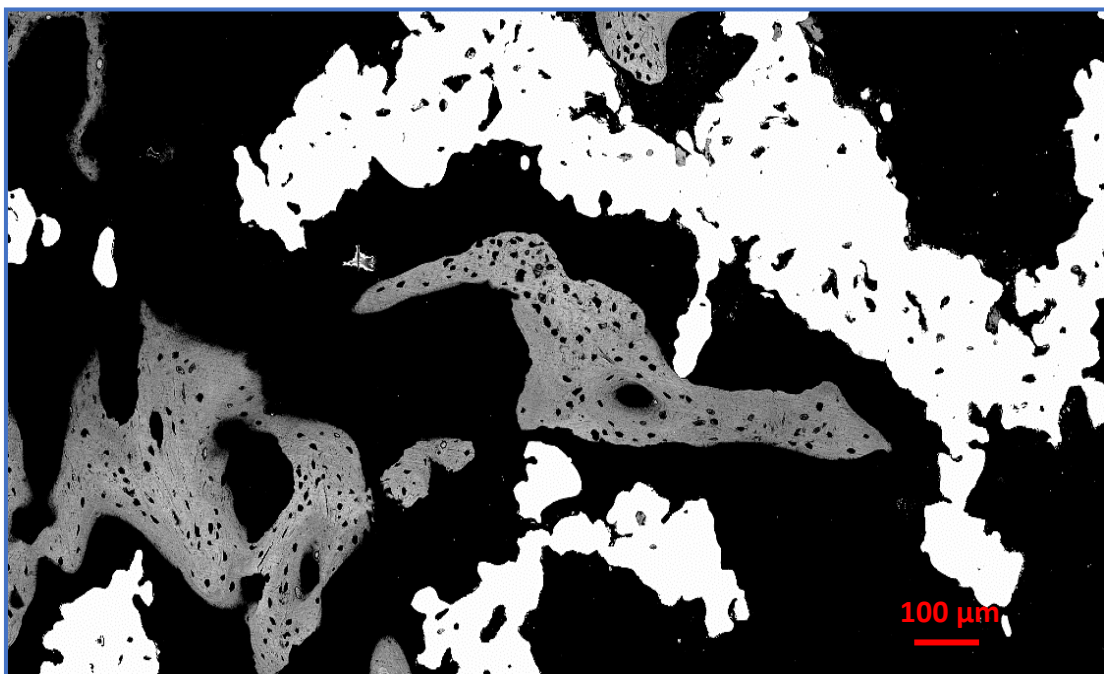


Figura 5.16. Imagen ampliada de la zona centro de un implante del grupo A con tratamiento peptídico. Se puede apreciar el contacto parcial del hueso neoformado con el titanio y el inadecuado relleno de los microporos.

5.4.2. Grupo temporal 12 semanas

Se analizaron de forma cualitativa las imágenes obtenidas por MER de las muestras del grupo B.

a) Grupo control

En este grupo, a simple vista se pudo observar de nuevo una gran diferencia entre las distintas muestras. Se vieron muestras con presencia moderada de tejido óseo neoformado en su interior igual que otras que presentaban muy poca cantidad de tejido óseo neoformado (Figura 5.17).

En general, se observó algo más de tejido neoformado que en el grupo temporal A, sobretodo en la periferia de los implantes, con un adecuado *BIC*. En cambio, en el centro de los implantes no se pudo observar gran cantidad de tejido óseo; sólo en 2 muestras el tejido llegaba hasta el centro del implante. Lo mismo ocurre con las zonas de la *ROI2* donde se pudo apreciar poca cantidad de hueso en la mayoría de los implantes.

El tejido óseo neoformado observado fue un tejido bastante maduro, en su gran mayoría tejido lamelar. En al área exterior se pudo apreciar mayoritariamente tejido lamelar con muy pocas zonas de tejido fibroreticular. También se observaron alguna osteonas aisladas. Hacia el interior de los implantes, se encontró también hueso maduro, prevaleciendo con diferencia el tejido lamelar con algunas osteonas, quedando solo poca cantidad de tejido fibroreticular. Hubo escasa cantidad de tejido neoformado en general en el interior de los implantes pero en cambio era un tejido óseo suficientemente maduro. El contacto del hueso con el metal era adecuado en todas las muestras. Se observó un íntimo contacto del tejido con el titanio y además se pudo apreciar un relleno de los microporos en aproximadamente un 60% (Figura 5.18., 5.19. y 5.20.).

En comparación con el mismo grupo de tratamiento en el grupo temporal A, se apreció un tejido óseo mucho más maduro y en mayor cantidad. Visualmente, no se vio gran diferencia en cuanto a la cantidad en la *ROI2* entre un grupo temporal y otro pero parecía haber algo más de tejido en la *ROI3* en el grupo temporal B. Hay más

muestras del grupo temporal B donde el hueso neoformado llega al centro del implante que en el grupo temporal de las 4 semanas. En cuanto al contacto del tejido neoformado con los poros internos, parece haber más zonas de contacto íntimo en el segundo grupo temporal *versus* el primero además de un superior relleno de los microporos.

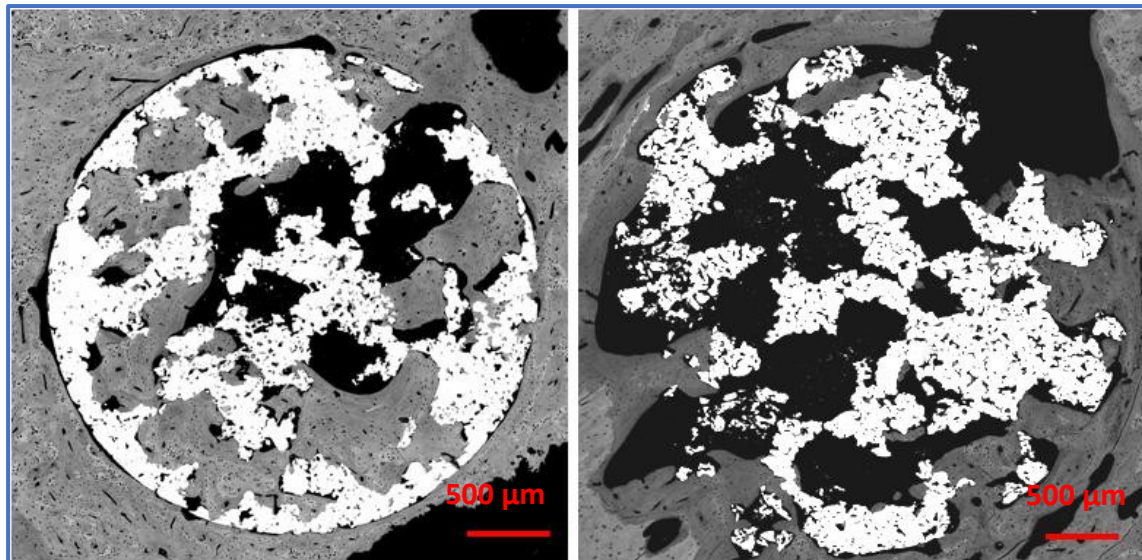


Figura 5.17. Dos imágenes obtenidas con el MER de dos implantes distintos del grupo B control. Se puede observar la diferencia de la cantidad de tejido óseo neoformado entre una muestra y otra.

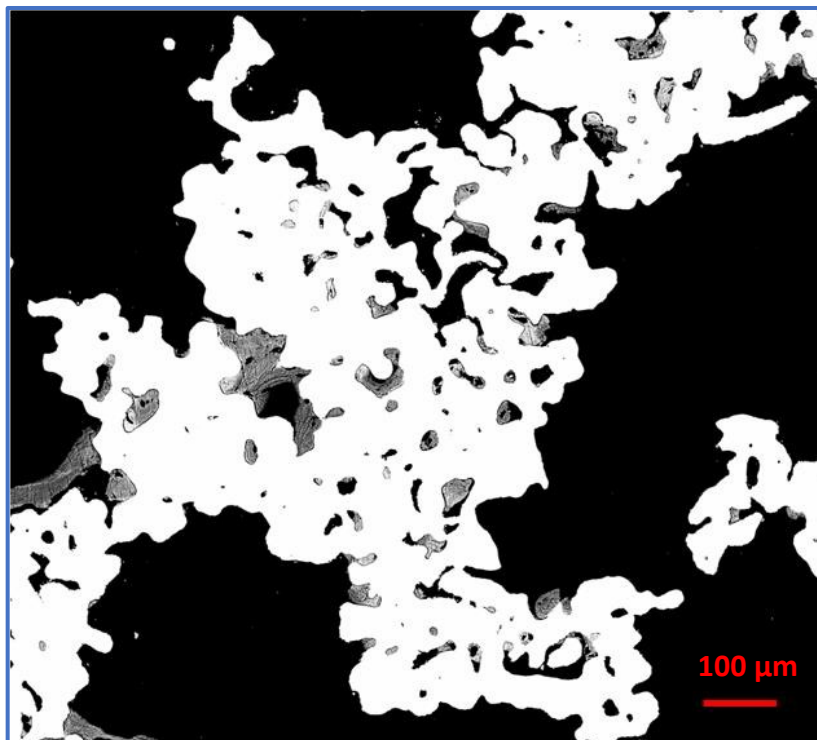


Figura 5.18. Detalle de la zona centro de uno de los implantes grupo B control

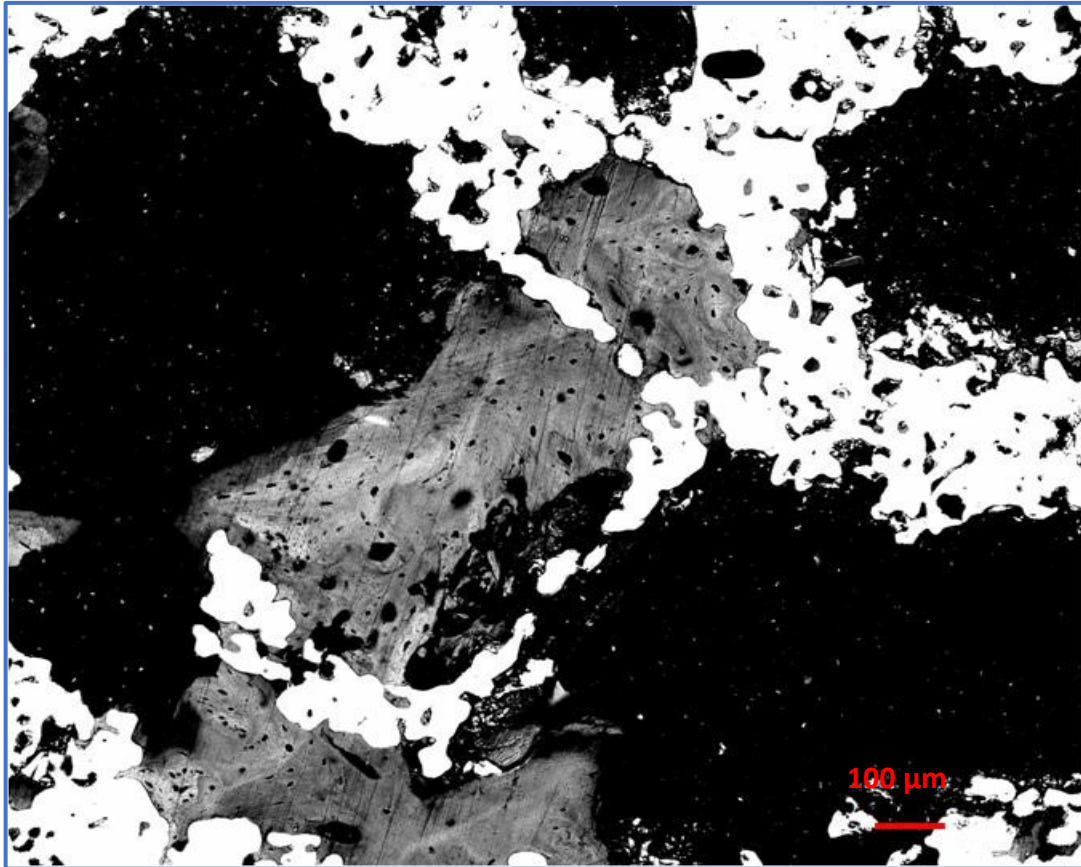


Figura 5.19. Detalle de la ROI3 de una de la muestras del grupo B control

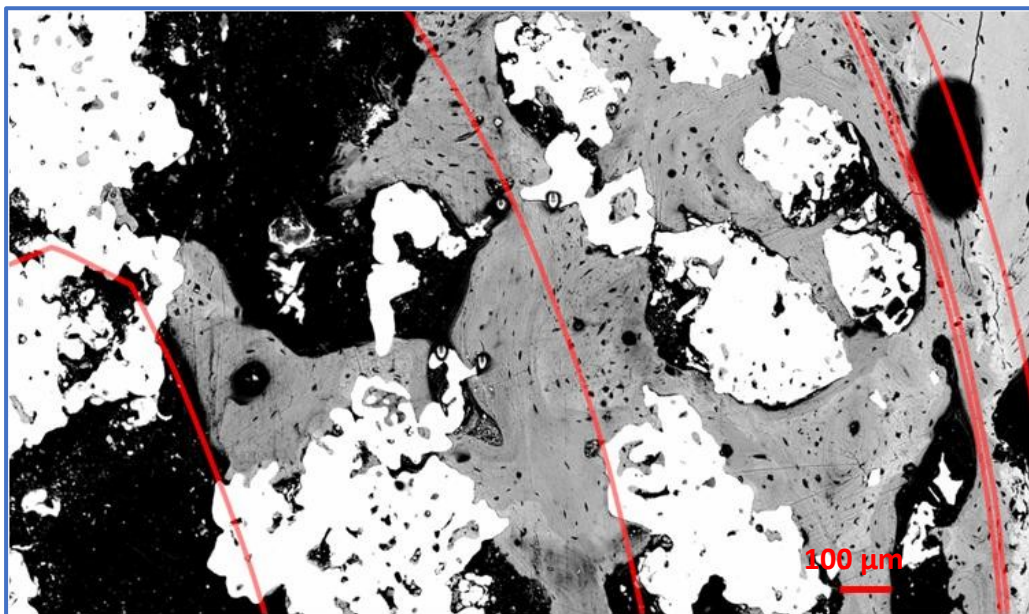


Figura 5.20. Detalle de las diferentes ROIs y zona exterior (de izquierda a derecha) de una de las muestras del grupo B control

b) Grupo termoquímico

Igual que en el grupo control, en el grupo con tratamiento termoquímico, observando las imágenes a pocos aumentos, se pudo observar una gran diferencia entre las distintas muestras a nivel de la cantidad de tejido óseo neoformado. Hubo una muestra casi completamente rellena con tejido óseo y otras dos con muy poco hueso en el interior del implante (Figura 5.21.).

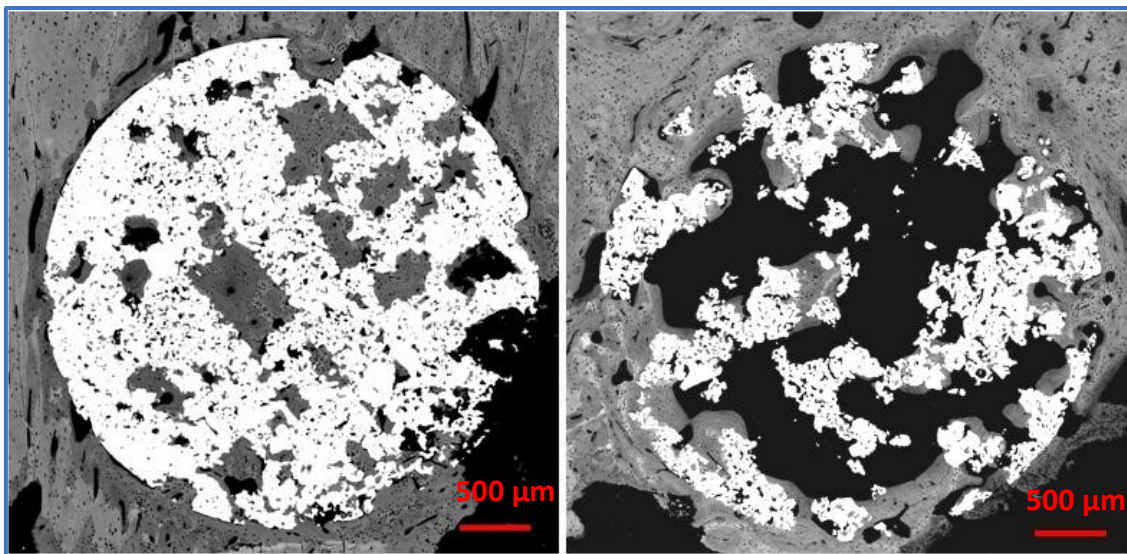


Figura 5.21. Imágenes del MER de dos de los implantes del grupo temporal B con tratamiento termoquímico. Se aprecia la diferencia de la cantidad de hueso neoformado entre una muestra y la otra.

Aun así, en todas las muestras se pudo apreciar un crecimiento del tejido hasta el centro del implante, es decir, todos los implantes mostraron tejido óseo neoformado en la ROI3. En el área exterior se encontró gran cantidad de tejido neoformado, más que en el grupo temporal A GTQ. El tejido neoformado mostraba gran madurez. Tanto en el área exterior como en el interior del implante predominaba tejido lamelar en su gran mayoría con presencia de algunas osteonas. Se apreciaron muy pocas zonas con tejido fibroreticular. Incluso en el centro de los implantes, se observó mayoritariamente tejido lamelar con formación de osteonas en algunas zonas (Figura 5.22.). El contacto hueso-implante fue muy bueno, tanto en el exterior como en el interior del implante. Se observó un contacto íntimo en la mayoría de las muestras del hueso neoformado con el titanio de los macroporos y también con los microporos, llegando a rellenar estos casi por completo. Además parecía que el tejido aprovechaba el titanio poroso para propagarse hacia el interior del implante (Figura 5.23.).

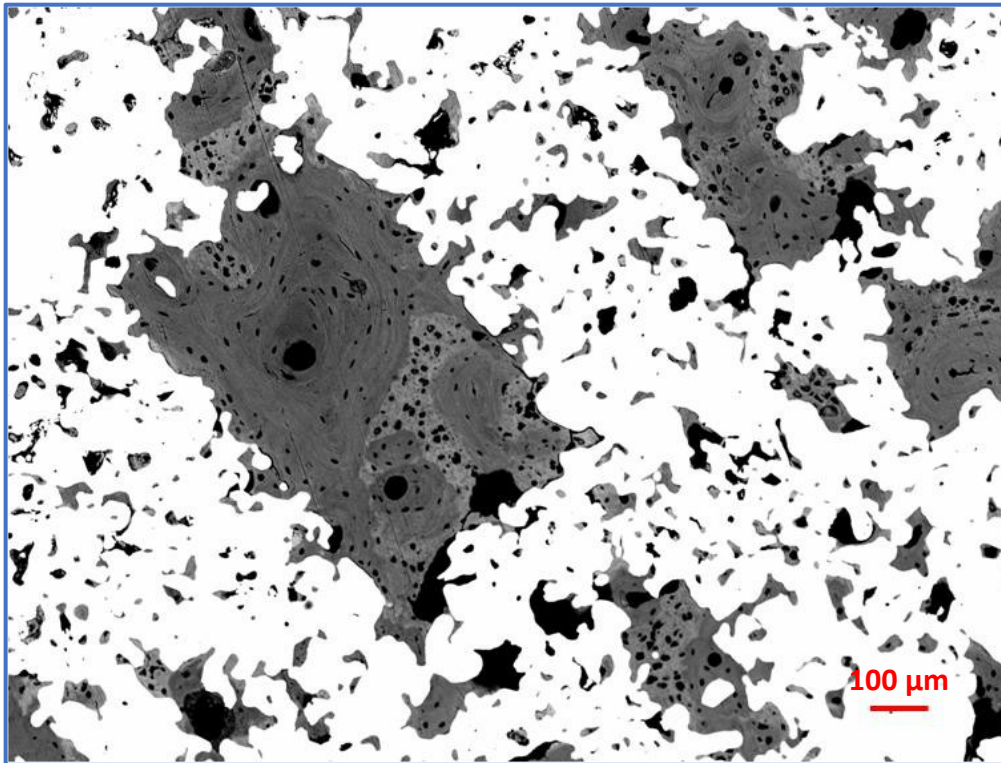


Figura 5.22. Detalle de uno de los implantes del grupo temporal B con tratamiento termoquímico. Se puede observar la madurez del tejido neoformado con presencia de osteonas en el interior del implante (zona ROI2-ROI3)

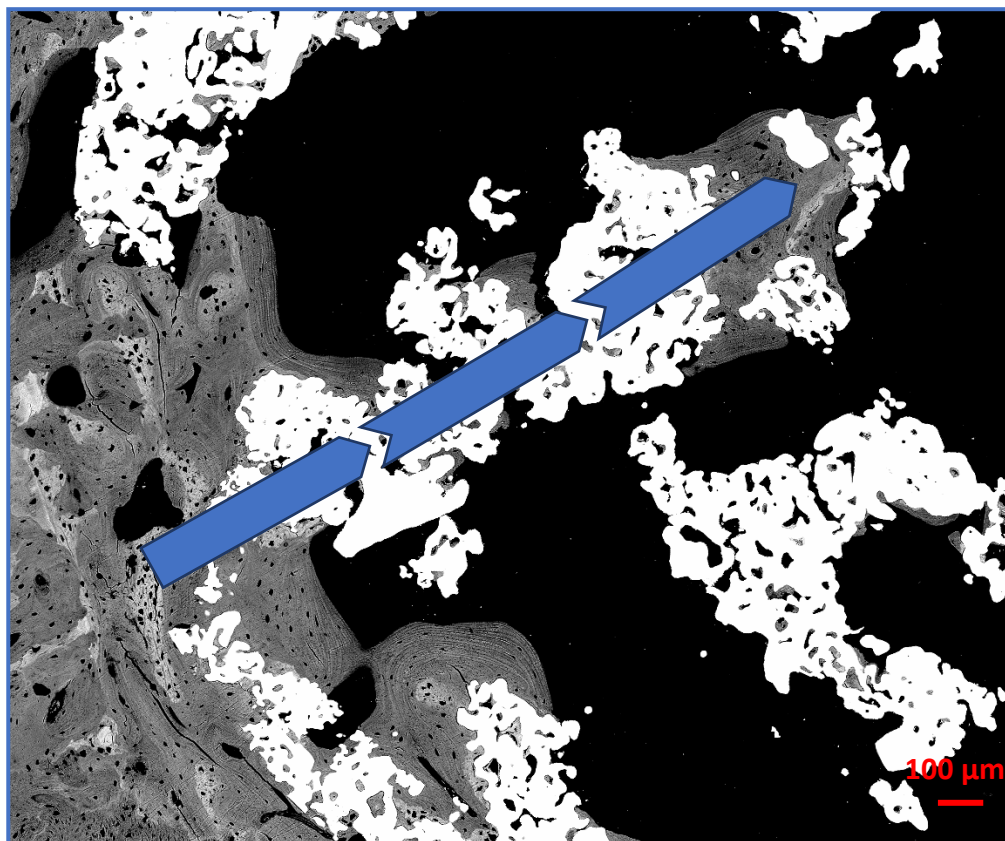


Figura 5.23. Detalle de una zona de un implante del GB GTQ. La flecha indica la propagación del tejido óseo neoformado desde el exterior (zona izquierda) hacia el interior del implante (zona derecha) aprovechando el titanio.

En comparación con el grupo temporal de las 4 semanas, se pudo observar una propagación del tejido neoformado hasta el centro del implante en todas las muestras y un tejido óseo mucho más maduro, tanto en el área exterior como en el interior del implante. Además se apreció más cantidad de tejido en general y sobretodo en el centro del implante comparando con el grupo A con el mismo tratamiento.

Comparando este grupo de tratamiento con el grupo control, se apreció una leve superioridad en cuanto a la madurez del tejido. En general, hubo menos tejido fibroreticular tanto en el área exterior como en el interior del implante en comparación con el GC de las 12 semanas. Además mostró un íntimo contacto hueso-implante en más zonas que en el grupo control.

c) Grupo con tratamiento peptídico

En comparación con todos los demás grupos, en el grupo peptídico la cantidad de hueso neoformado en las distintas muestras fue bastante homogénea. En global, en todas las muestras hubo tejido neoformado hasta el centro del implante, aunque en poca cantidad en 3 de las 5 muestras. Se apreció sobretodo mucho tejido en la periferia del implante (*ROI1*) y en el área exterior. Se observó un contacto hueso-implante en la periferia del implante muy íntimo y a lo largo de casi toda la circunferencia de los implantes. El tejido era un tejido óseo muy maduro, en todas las zonas, con prevalencia de tejido lamelar con algunas osteonas y muy poca presencia de zonas con tejido fibroreticular. Incluso en el centro de los implantes, el tejido presente era tejido lamelar (Figura 5.24.).

El contacto del hueso nuevo con el metal mejoró en comparación con el grupo temporal A pero aún así, en general, se observó sólo un contacto parcial (Figura 5.25.). Se apreciaron zonas con un contacto hueso-implante íntimo pero también habían muchas zonas donde el tejido neoformado evitaba el contacto con el titanio de lo macroporos. Asimismo, igual que en el grupo temporal A control, hubo muy poca penetración del tejido óseo en los microporos de los implantes (Figura 5.24.).

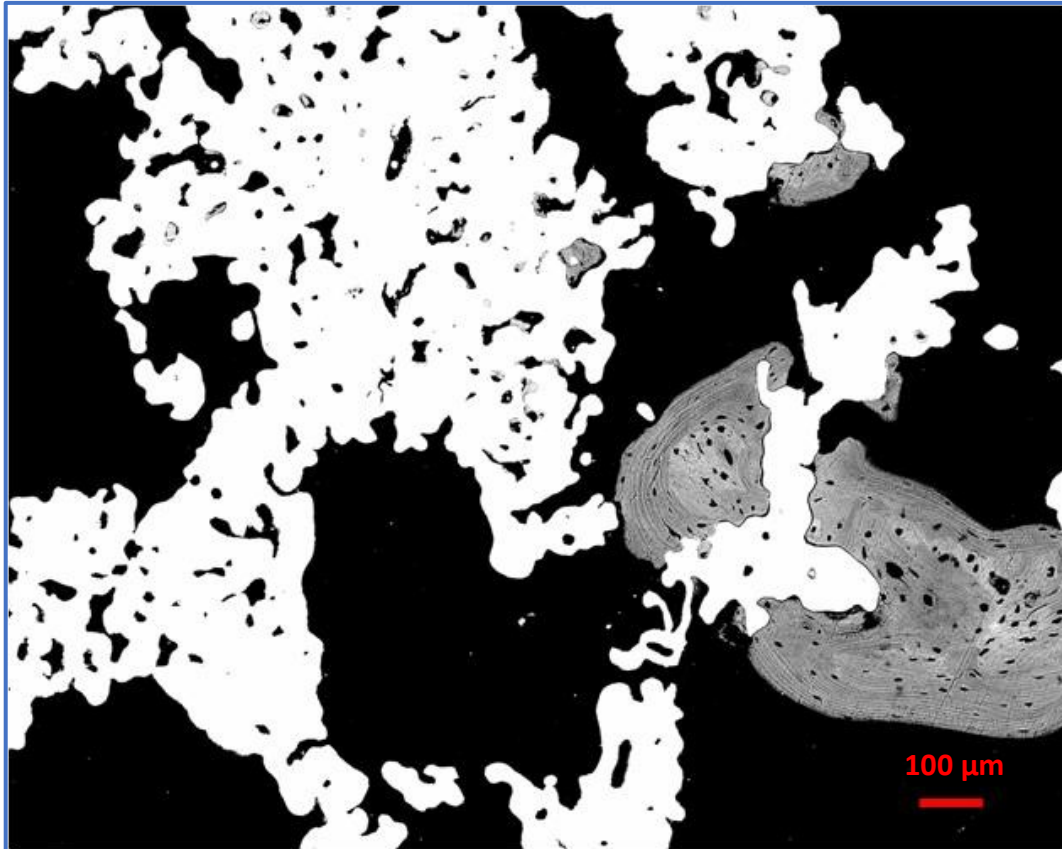


Figura 5.24. Detalle de uno de los implantes del grupo B peptídico. Se aprecia el tejido lamelar y fibroreticular en el centro del implante (zona ROI2-ROI3) y el escaso relleno de lo microporos.

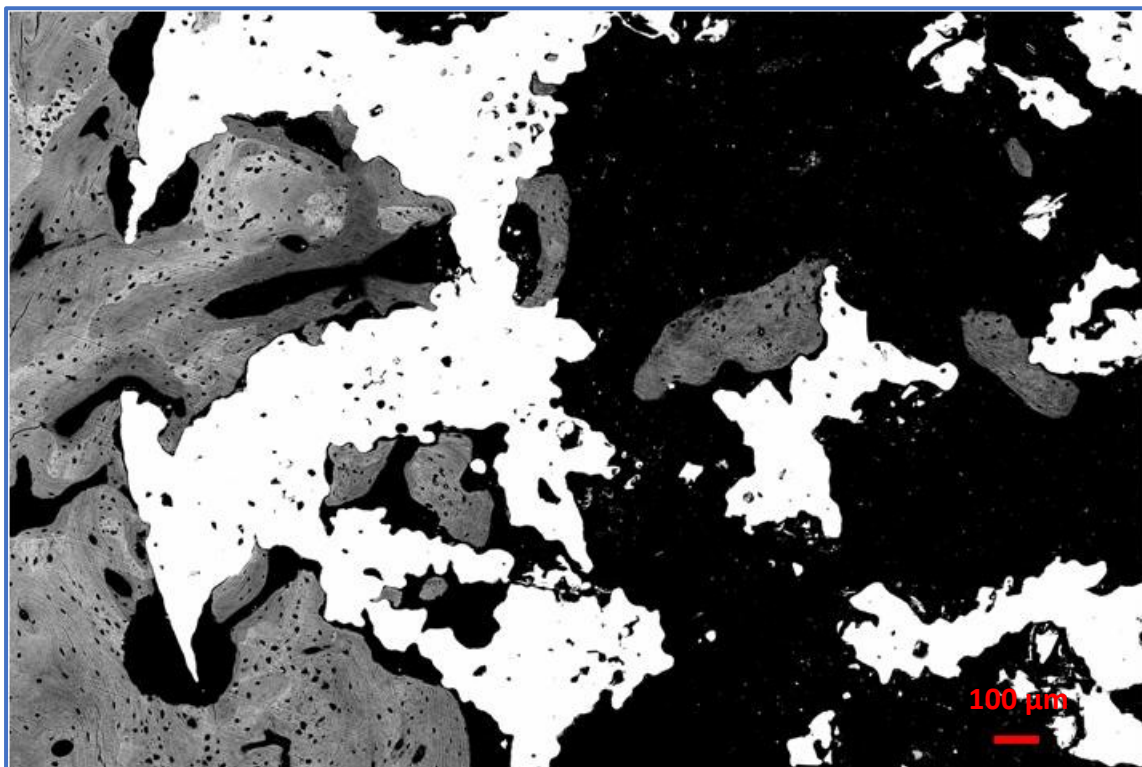


Figura 5.25. Detalle de uno de los implantes del grupo peptídico a las 12 semanas. Se aprecia el contacto parcial del hueso neoformado con el implante.

5.5. Resultados del análisis cualitativo de la imágenes longitudinales

5.5.1. Grupo temporal 4 semanas

a) Grupo control

Al realizar el análisis de las imágenes cortadas de forma longitudinal del grupo control se pudo apreciar que la gran mayoría del tejido neoformado procedía de la cortical. En dos de las tres muestras se observó algo de crecimiento a través del endostio y a través del periostio. En todas las muestras se localizó tejido óseo neoformado hasta el centro del implante, aunque en poca cantidad.

El tejido en el área exterior era tejido lamelar rodeando tejido fibroreticular y a medida que crecía hacia el interior del implante, se hacía más inmaduro, habiendo una cantidad superior de tejido fibroreticular en el interior de los implantes. En el área exterior en algunas muestras se observaron algunas osteonas aisladas mientras que en el interior de los implantes no se pudo encontrar ninguna. Se apreció relleno de los microporos, en aproximadamente un 40% y contacto parcial leve del hueso neoformado con el titanio (Figura 5.26).

Los resultados encontrados son muy similares a lo observado en las imágenes transversales del mismo grupo donde también se observó una madurez del tejido similar, un contacto parcial del hueso con el implante y un relleno aceptable de los microporos. En el grupo control de las imágenes longitudinales, todas las muestras mostraron tejido óseo neoformado hasta el centro del implante en cambio no se observó lo mismo en el mismo grupo observando las imágenes transversales.

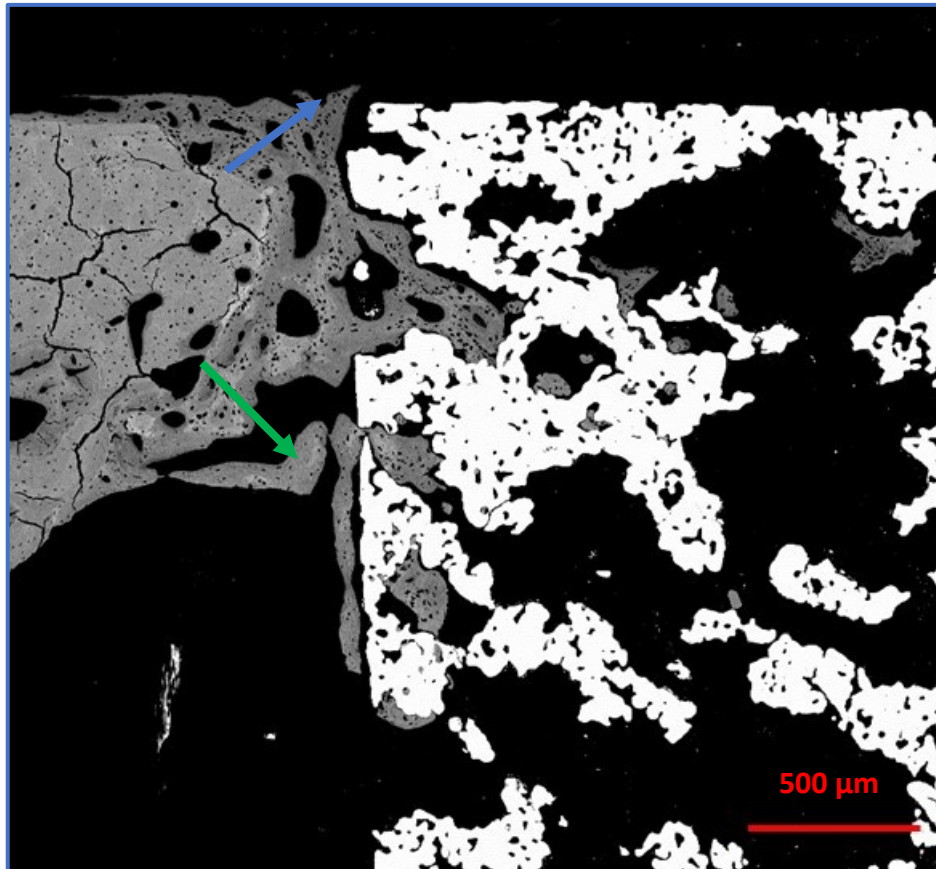


Figura 5.26. Detalle de una corte longitudinal de un implante del grupo A control. Se aprecia una parte del crecimiento óseo procedente del endostio (flecha verde) y del periostio (flecha azul), el bajo contacto del tejido neoformado con el implante y el relleno parcial de los microporos

b) Grupo con tratamiento termoquímico

En este grupo de implantes con tratamiento termoquímico, se observó un crecimiento del tejido neoformado hasta el interior del implante en todas las muestras. Igual que en el grupo control, este tejido neoformado que llegaba hasta el centro era escaso. Igualmente, se apreció que la gran mayoría del tejido óseo provenía de la cortical y una pequeña cantidad desde el endostio y en dos de las tres muestras pareció haber algo de tejido óseo neoformado proveniente del periostio (Figura 5.27.). Una de las imágenes mostró incluso un crecimiento de tejido neoformado procedente del periostio cubriendo completamente la parte exterior del implante (Figura 5.28.)

En general, el tejido óseo neoformado era un tejido bastante maduro. En el área exterior predominaba el tejido lamelar, con menos cantidad de tejido fibroreticular que en el grupo control. También se pudieron observar algunas osteonas. En el centro

del implante, el hueso también pareció ser algo más maduro que en el grupo control, predominando de nuevo el tejido lamelar pero casi siempre rodeando alguna pequeña zona de tejido fibroreticular. Llamaba la atención, el íntimo contacto del hueso neoformado con el implante sobretodo en el interior de las muestras y el gran relleno de los microporos, igual que lo observado en las muestras del mismo grupo con corte transversal (Figura 5.29.).

Los resultados observados en este grupo son muy similares a los obtenidos del análisis cualitativo de las imágenes transversales. En ambos se encontró un crecimiento del tejido óseo hasta el centro con tejido bastante maduro y predominando el íntimo contacto del hueso con el titanio en todo momento.

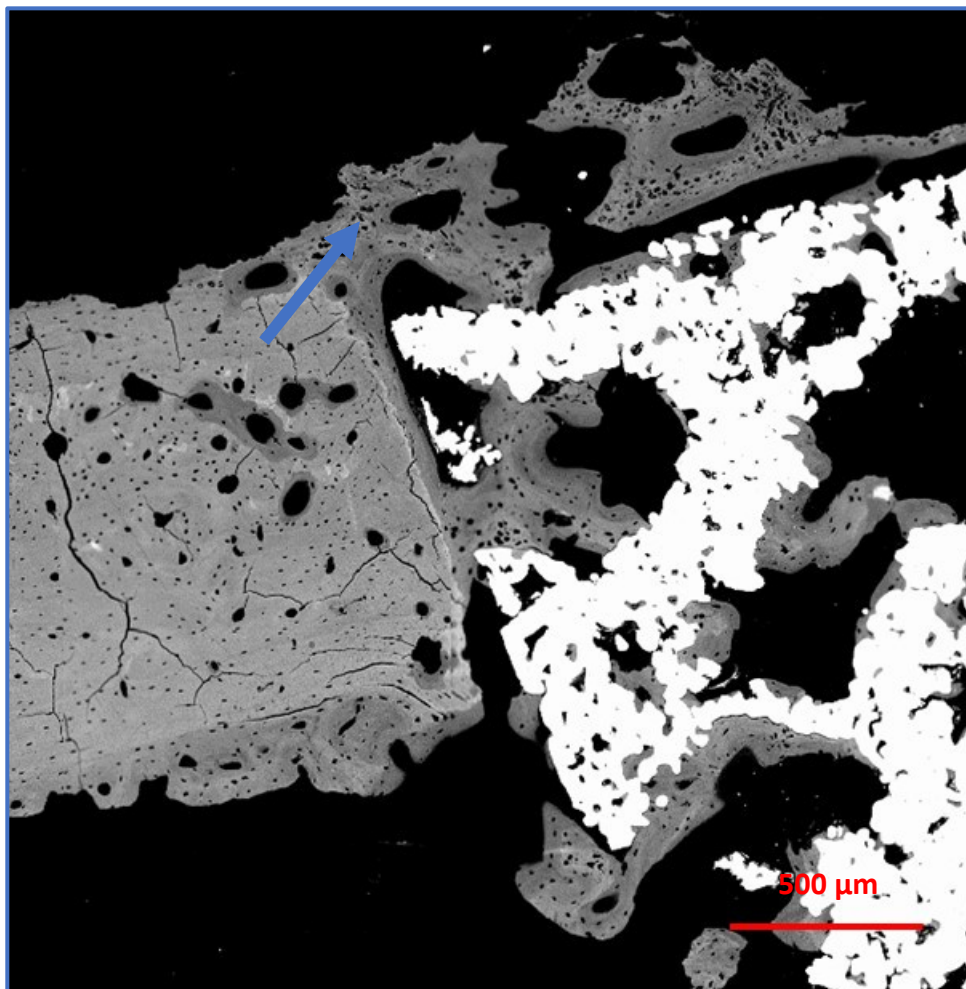


Figura 5.27. Detalle de un implante del grupo A con tratamiento TQ, corte longitudinal. Se puede apreciar la procedencia desde el periostio de una parte del tejido óseo neoformado (flecha azul)

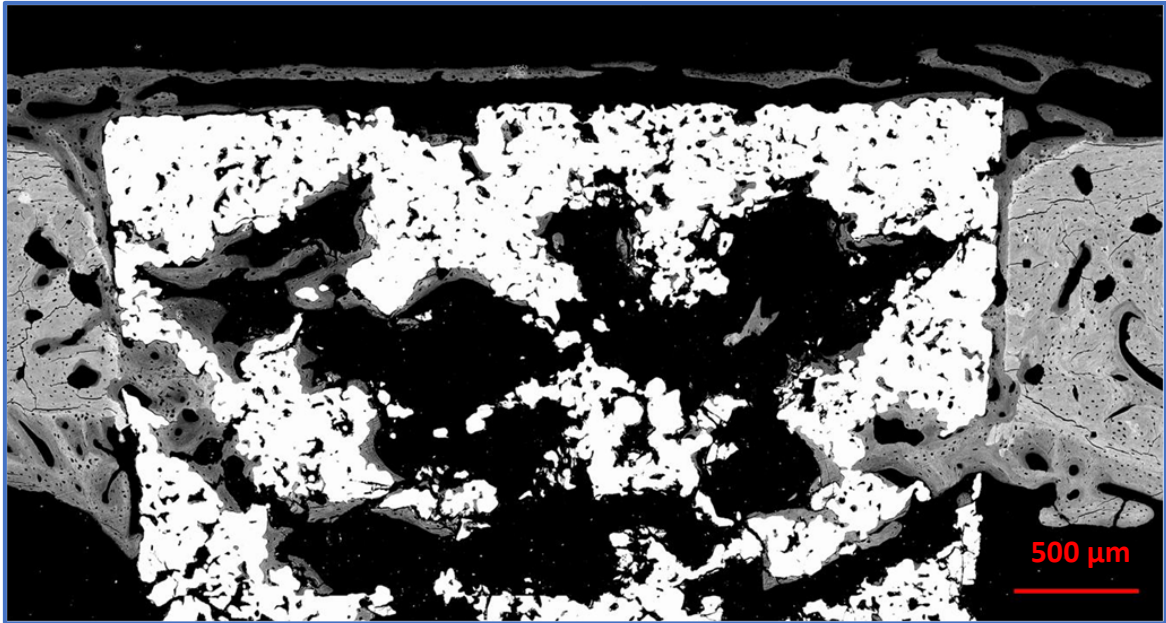


Figura 5.28. Una de las imágenes de corte longitudinal del grupo termoquímico. Se puede observar el recubrimiento del implante con tejido neoformado procedente del periostio.

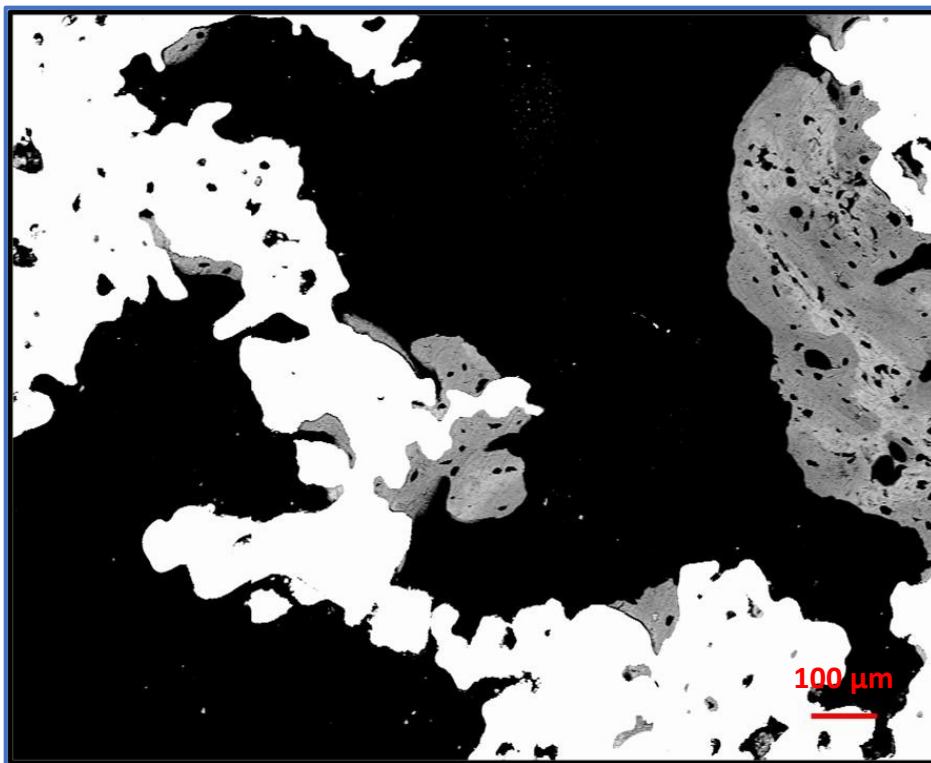


Figura 5.29. Detalle de un implante del grupo A con tratamiento TQ, corte longitudinal. Se puede observar el íntimo contacto del tejido óseo neoformado con el titanio.

c) Grupo con tratamiento peptídico

Las imágenes de las muestras del grupo temporal A con tratamiento peptídico mostraron crecimiento de tejido neoforado hasta el centro en las tres muestras. Se visualizó poca cantidad de tejido pero era un tejido muy maduro con presencia de tejido lamelar incluso en el centro de los implantes. En el área exterior también se observó tejido lamelar, con muy poca presencia de tejido fibroreticular. En comparación con los otros dos grupos, parecía ser el grupo con el tejido neoforado más maduro. Asimismo, se pudo apreciar crecimiento desde la cortical del hueso, pero también una pequeña parte desde el endostio y incluso el periostio. Igual que en las imágenes transversales, se observó aquí también un mal contacto del hueso neoforado con el metal y poco relleno de los microporos (Figura 5.30.).

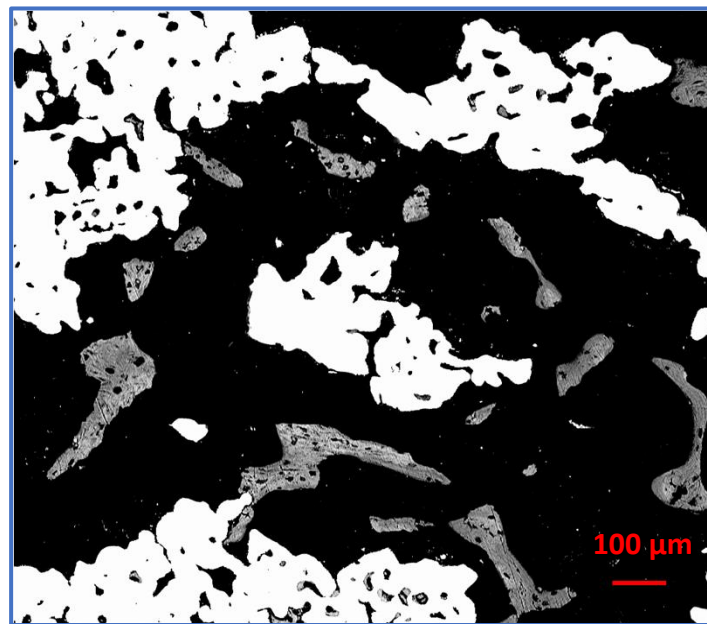


Figura 5.30. Detalle de una de las imágenes longitudinales del grupo A peptídico. Se puede apreciar la madurez del tejido en el centro del implante, el escaso contacto del tejido neoforado con el titanio y el limitado relleno de los microporos.

En comparación con los resultados obtenidos del análisis de las imágenes transversales de este mismo grupo, se observó que fueron muy parecidos. En ambos destacó la madurez del tejido neoforado pero en cambio se volvió a evidenciar la carencia de un buen contacto del hueso neoforado con el metal.

En general, todas las muestras de todos los grupos eran mucho más homogéneas que las cortadas transversalmente ya que todos los grupos mostraron más o menos la misma cantidad de hueso neoformado.

5.5.2. Grupo temporal 12 semanas

a) Grupo control

En el segundo grupo temporal, las imágenes obtenidas de las muestras mostraron resultados muy heterogéneos. En una de las muestras el tejido óseo neoformado apenas llegó hasta el centro del implante y en cambio en otra muestra se pudo observar un gran relleno del implante con tejido neoformado. En este caso, el tejido llegó al centro del implante desde ambas corticales rellenando en su mayoría la parte proximal de las muestras (Figura 5.31.). En general, prevaleció el tejido procedente de las corticales aunque hubo algo de crecimiento a través del endostio. No se observó tejido óseo neoformado procedente del periostio. El tejido observado fue un tejido maduro, con prevalencia de tejido lamelar sobre todo en las zonas exteriores, llegando a haber más presencia de tejido fibroreticular a medida que el hueso neoformado llegaba al centro del implante (Figura 5.32.). El contacto del hueso con el implante en el área exterior fue bueno igual que en el interior del implante, donde se apreció mayoritariamente un contacto íntimo del tejido con el metal y rellenando gran cantidad de los microporos.

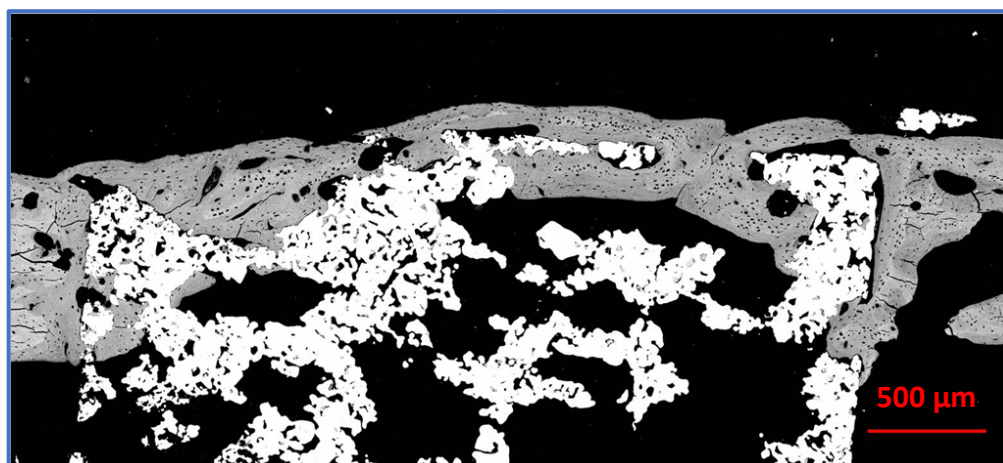


Figura 5.31. Una de las muestras del grupo B control. Se puede apreciar el crecimiento del tejido óseo a los largo de todo el borde proximal del implante.

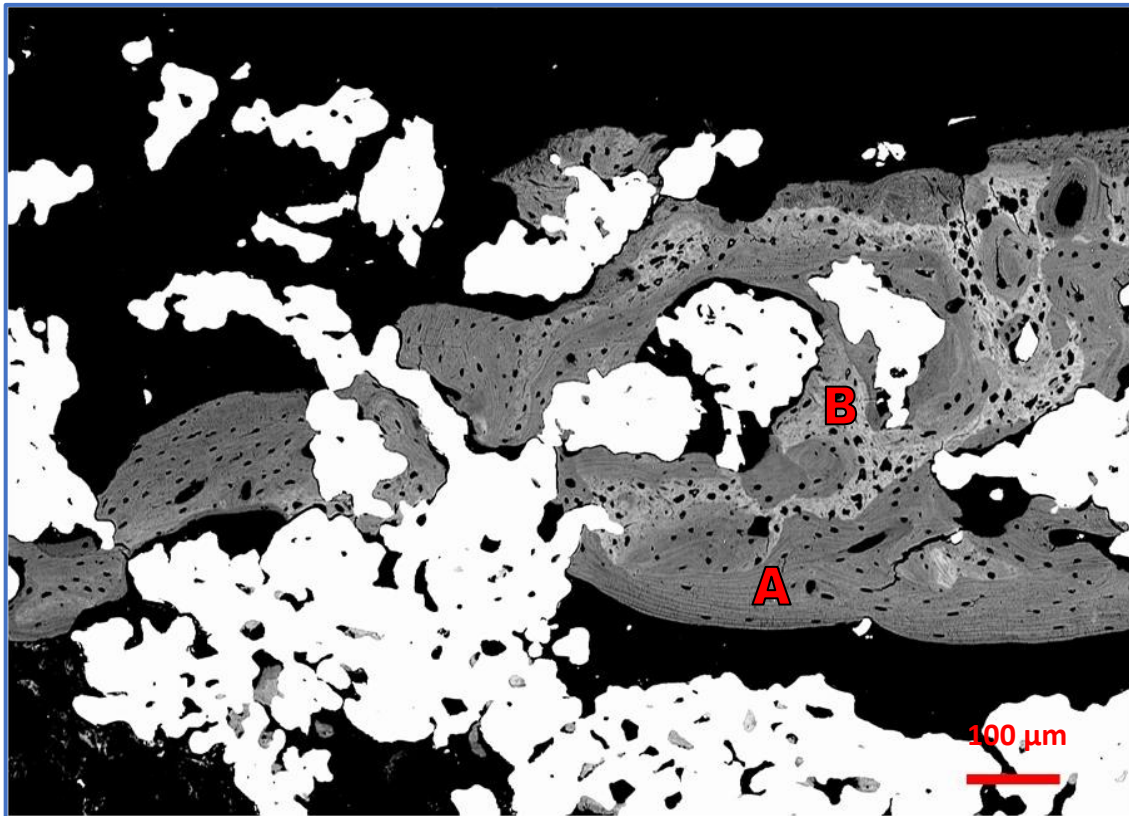


Figura 5.32. Detalle de una de las imágenes del grupo B control. Se aprecia la madurez del tejido óseo neoformado en el centro del implante. Predomina el tejido lamelar (A) pero también se observa tejido fibroreticular (B).

En comparación con las imágenes transversales, las muestras volvieron a ser poco homogéneas mostrando variabilidad en la cantidad del tejido. Aun así, el tejido óseo presente en ambos tipos de cortes era muy similar, prevaleciendo el tejido lamelar pero quedando presencia de tejido fibroreticular.

b) Grupo con tratamiento termoquímico

Analizando las imágenes longitudinales del grupo B termoquímico, en general se observó que el crecimiento del tejido óseo procedía tanto de la cortical, como también parcialmente del endostio y también del periostio (Figura 5.33.). Se observó poca cantidad de tejido óseo en el interior de los implantes, pero en todas las muestras éste llegaba hasta el centro, igual que lo observado en el mismo grupo a las 4 semanas. En cambio, era un tejido muy maduro, presentándose con superioridad el tejido lamelar, tanto en las áreas exteriores como en el interior de los implantes quedando muy poco tejido fibroreticular. Además se observó gran cantidad de osteonas.

Destacó de nuevo el contacto íntimo del tejido neoformado con el metal, sobretodo en el interior de los implantes. Parecía ser de nuevo que el tejido neoformado aprovecha el metal para propagarse hacia el interior.

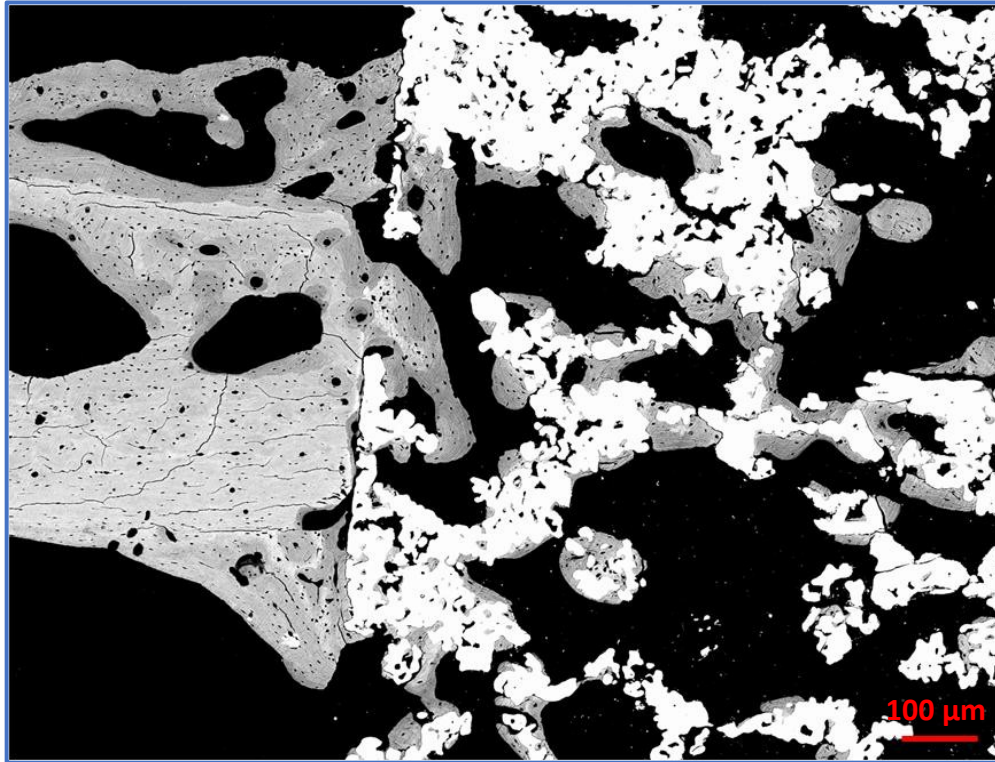


Figura 5.33. Detalle de uno de los implantes del grupo B TQ. Se puede observar por un lado el crecimiento del tejido óseo proveniente de la cortical, del endostio y del periostio. Además, se aprecia el íntimo contacto del hueso neoformado con el implante.

En comparación con el grupo B control, el tejido era algo más maduro y había mejor contacto del hueso con el implante y más relleno de los microporos. Además, en este grupo sí que se pudo observar algo de crecimiento desde el periostio a diferencia con el grupo control, lo que también ya se había visto en algunas imágenes del grupo A TQ.

c) Tratamiento peptídico

En las imágenes longitudinales del grupo peptídico, se observó una gran variedad entre las distintas muestras. En general se observó poca cantidad de tejido neoformado, pero éste llegaba hasta el centro de los implantes en todas las muestras.

En dos muestras este crecimiento procedía únicamente de las corticales óseas y en cambio en una de ellas se pudo apreciar un leve crecimiento proveniente del endostio y del periostio. Destacó la alta madurez del tejido neoformado, siendo en su gran mayoría tejido lamelar. No se observó casi ninguna zona con tejido fibroreticular, ni siguiera en lo más profundo del implante. Por el contrario y como ya se observó en las imágenes cortadas de forma transversal y en el grupo A de las imágenes longitudinales, se apreció un mal contacto del hueso neoformado con los macro y microporos de los implantes. Hubo muy pocas zonas donde se pudo detectar un contacto íntimo del hueso con el metal y sólo se encontró un relleno parcial de los microporos. En muchas zonas parecía que el tejido óseo neoformado intentaba evitar el contacto con el metal (Figura 5.34.).

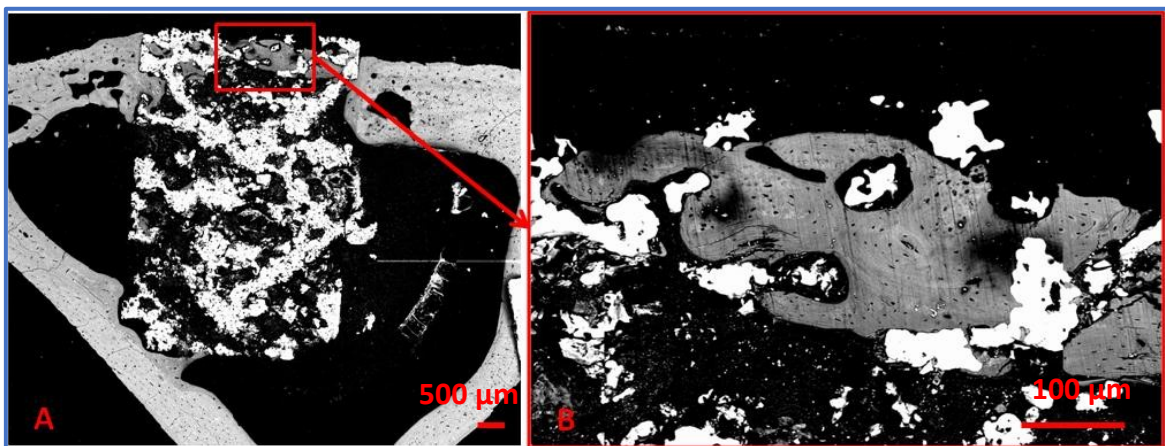


Figura 5.34. A → Muestra de una imagen longitudinal del grupo peptídico. B → Detalle aumentado. Se puede apreciar la gran madurez del tejido neoformado pero el escaso contacto del hueso con el metal en el interior del implante

5.6. Resultados del análisis estadístico

Después de la aplicación el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para comparar los tres grupos de tratamiento entre ellos dentro de cada periodo temporal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo. Todos los valores obtenidos tuvieron un p-valor > de 0,05 con lo cual no se pudo demostrar significancia estadística, ni en el primero grupo temporal ni en el segundo grupo temporal. No se observó ninguna diferencia significativa ni a nivel del área exterior, ni de los *BICs*, ni a nivel del hueso neoformado total ni tampoco comparando los distintos *ROIs* entre ellos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 1. Resultados estadísticos del área exterior a las 4 semanas

ÁREA EXTERIOR (4 SEMANAS)		
Grupos Tratamiento	Significancia	P-valor
GC vs. GTQ	No	0,9233
GC vs. GP	No	0,5628
GTQ vs. GP	No	0,5328

Tabla 2. Resultados estadísticos del área exterior a las 12 semanas

ÁREA EXTERIOR (12 SEMANAS)		
Grupos Tratamiento	Significancia	P-valor
GC vs. GTQ	No	0,2913
GC vs. GP	No	0,2508
GTQ vs. GP	No	0,5782

Tabla 3. Resultados estadísticos del "total ingrowth" a las 4 semanas

TOTAL INGROWTH (4 SEMANAS)		
Grupos Tratamiento	Significancia	P-valor
GC vs. GTQ	No	0,2759
GC vs. GP	No	0,1308
GTQ vs. GP	No	0,4337

Tabla 4. Resultados estadísticos del "total ingrowth" a las 12 semanas

TOTAL INGROWTH (12 SEMANAS)		
Grupos Tratamiento	Significancia	P-valor
GC vs. GTQ	No	0,5043
GC vs. GP	No	0,558
GTQ vs. GP	No	0,969

Tabla 5. Resultados estadísticos del "BIC" a las 4

BIC (4 SEMANAS)		
Grupos Tratamiento	Significancia	P-valor
GC vs. GTQ	No	0,9774
GC vs. GP	No	0,9084
GTQ vs. GP	No	0,8224

Tabla 6. Resultados estadísticos del "BIC" a las 12 semanas

BIC (12 SEMANAS)		
Grupos Tratamiento	Significancia	P-valor
GC vs. GTQ	No	0,7818
GC vs. GP	No	0,079
GTQ vs. GP	No	0,2995

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En este capítulo se procederá a desarrollar la discusión de los resultados obtenidos en los diferentes apartados del presente estudio experimental.

6.1. Discusión de resultados clínicos y radiográficos

En cuanto a la recuperación clínica de los animales cabe destacar que todos los pacientes se recuperaron favorablemente tras la intervención quirúrgica lo que confirma la eficacia del protocolo anestésico, quirúrgico y de manejo desarrollado en este estudio. Ello resulta de especial relevancia si se tiene en cuenta que los conejos son una especie muy sensible al estrés y de elevada dificultad de manejo anestésico. La técnica quirúrgica y la posterior recuperación además del manejo de los animales no significó una afectación en la condición general de los animales participantes en este estudio. El estado general de todos los animales fue bueno a lo largo de todo el periodo postquirúrgico, manteniendo su condición corporal, el peso y otros parámetros biológicos. Tampoco se apreciaron signos de infección o inflamación severos de las extremidades operadas ni ninguna otra reacción tisular anómala ni problemas vinculados a la locomoción (dificultad de incorporación, pataleo, cojeras, etc.). El protocolo utilizado ayudó a la rápida recuperación de los animales y a la buena cicatrización de las heridas quirúrgicas. La buena recuperación de los animales y la falta de aparición de complicaciones postquirúrgicas garantizó por lo tanto una correcta respuesta orgánica frente a la implantación de las muestras durante todo el periodo postquirúrgico y, por tanto, una optimización y fiabilidad de los resultados microscópicos obtenidos.

La ausencia de infección a lo largo del periodo postoperatorio se ratificó igualmente a nivel post-mortem durante la extracción de los segmentos tibiales que contenían las muestras implantadas. Todos los implantes se mostraron sólidamente anclados al defecto óseo original, sin presentar signos de migración ni en ese momento ni a lo largo del estudio. Este aspecto resulta clave para la fiabilidad de la evaluación ultraestructural de la respuesta biológica de los implantes y por tanto para el

desarrollo de la tesis. El óptimo anclaje de los implantes observado macroscópicamente tanto en el grupo temporal A como en el B confirma que el protocolo de selección de los diámetros de broca para la realización de los defectos óseos era el adecuado, tanto como para asegura un adecuado “*press-fit*” del implante *in situ* como para evitar fenómenos de osteólisis térmica responsables de osteonecrosis demorada en la interfase hueso – implante que hubiesen podido fácilmente llevar al desprendimiento a medio plazo de los implantes y por tanto, a largo plazo al fracaso del estudio experimental.

En este sentido, los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con los publicados en un estudio similar en los que se llevaron a cabo implantaciones ortotópicas de muestras de titanio poroso bioactivo en fémures de conejos. En este estudio, los autores tras practicar un defecto de 6mm en ambos cóndilos femorales y en un total de 16 animales, no apreciaron reacciones adversas, ni inflamación ni infección en la zona de implantación además de observar buena fijación y estabilidad de los implantes dentro del hueso⁷². Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio ya que los animales usados no mostraron en ningún momento signos de infección, ni inflamación y a nivel postmortem se demostró una buena fijación del implante dentro del defecto creado. Al trabajar con tibias, los defectos creados en nuestro estudio fueron más pequeños que los del estudio de Takemoto *et al.* que hicieron la implantación en cóndilos femorales con lo cual disponían de más espacio⁷².

A nivel radiográfico, los implantes fueron fácilmente identificables y por tanto, se pudo comprobar que mantenían la posición inicial de implantación, sin desprendimiento parcial ni migración. Asimismo, tampoco se observaron otros signos radiográficos indicativos de complicación tales como osteólisis, reacción perióstica hipertrófica, o cambios en la radiolucidez periimplante. Estos resultados concuerdan con el hecho de que está ampliamente demostrado que el titanio poroso presenta excelente biocompatibilidad, alta resistencia a la corrosión y ninguna citotoxicidad¹⁰². Aunque la realización de una exploración radiográfica en este tipo de estudios es una práctica muy poco referenciada en la bibliografía de estudios similares, a nuestro entender resulta de gran utilidad puesto que permite comprobar de manera no invasiva la correcta evolución del estudio y la detección prematura de complicaciones

severas que pueden poner en peligro los resultados experimentales y por tanto, nos permite, como investigadores, la posibilidad de tomar las medidas correctoras necesarias a tiempo⁹¹.

6.2. Discusión de los resultados del análisis de la estructura y propiedades mecánicas de los implantes porosos

En este estudio se elaboraron implantes con una porosidad interconectada media de un 53% con una interconexión de un diámetro medio de 210 μ m, macroporos de entre 300 y 600 μ m y microporos de entre 1 y 15 μ m, con una superficie externa rugosa. Los implantes presentaron un módulo de Young de 0,63GPa de media y una fuerza de rendimiento de unos 105MPa.

6.2.1. Propiedades mecánicas de los implantes

El titanio y sus aleaciones se utilizan ampliamente para diversos implantes en los campos ortopédicos y dentales, debido a su buena biocompatibilidad y alta resistencia mecánica. Sin embargo, sus módulos elásticos son más altos que los del hueso vivo y, por lo tanto, pueden inducir la resorción ósea debido a la protección contra el estrés (*stress protection* o *stress shielding*) siguiendo las pautas de mineralización ósea en función de las fuerzas de carga descritas en la Ley de Wolff^A. Para eso, se fabrican implantes con poros interconectados con lo que su módulo elástico disminuye al nivel del hueso esponjoso (alrededor de 0,55GPa), como los implantes usados en este estudio¹⁰³. Distintos estudios han demostrado que una buena adaptación mecánica puede evitar una tensión interósea extremadamente baja

^A La ley de Wolff, desarrollada por el anatomista y cirujano alemán Julius Wolff (1836–1902) en el siglo XIX establece que: “Cada cambio en la forma y función del hueso o de su función sola es seguido por ciertos cambios definidos en su arquitectura interna y una alteración igualmente definida en su conformación externa de acuerdo con las leyes matemáticas”. Esta ley establece que el hueso de una persona o animal sano se adaptará a las cargas bajo las cuales es sometido. Si aumenta la carga en un hueso en particular, el hueso se remodelará con el tiempo para hacerse más fuerte y resistir ese tipo de carga. La arquitectura interna de las trabéculas sufre cambios adaptativos, seguidos de cambios secundarios en la porción cortical externa del hueso y como resultado se vuelve más grueso. También sucede lo contrario: si la carga en un hueso disminuye, el hueso se volverá menos denso y más débil debido a la falta del estímulo requerido para la remodelación continua. Esta reducción en la densidad ósea (osteopenia) se conoce como protección contra el estrés. Si un hueso no recibe su estrés mecánico habitual, aquél se puede desmineralizar y perder densidad ósea¹⁰³.

y así evitar la reabsorción ósea desde el implante hasta el hueso cortical¹⁰⁴. Además, se ha visto que una adecuada adaptación mecánica del implante promueve el crecimiento óseo hacia su interior y mejora la fuerza de unión entre el tejido óseo y el implante¹⁰⁵.

En nuestro estudio, se pudo observar que las propiedades mecánicas (σ_0 y σ_{max}) de los implantes porosos de titanio con tratamientos termoquímico y peptídico aumentaron ligeramente, mientras que la deformación del material hasta fracturarse disminuyó. Este fenómeno se atribuye a la incorporación de oxígeno en la estructura que produce estas pequeñas variaciones. Estos valores son más altos que para las estructuras porosas de aleaciones de titanio con níquel (NiTi) o tántalo (Ta) y otros biomateriales altamente interconectados. Las diferencias se asocian principalmente a la naturaleza de los materiales, así como al método de procesamiento. El proceso de fabricación del tántalo poroso usa la deposición o infiltración de vapor químico (CVD/CVI) para crear unos implantes de metal poroso. Los cilindros de NiTi poroso son producidos por síntesis auto-propagante de alta temperatura¹⁰¹.

El test de fatiga (σ_f) para los implantes de titanio poroso usados en este estudio, mostró que el límite de fatiga a 10^8 ciclos es de unos 15MPa de media. En este caso, tampoco se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para los distintos grupos de tratamiento. Se apreció que las propiedades de fatiga del titanio poroso estudiado presentaron un límite de fatiga a 10^8 ciclos más alto que los valores medios para el NiTi poroso (7,5MPa) y para el tántalo poroso (13,2MPa). Estos resultados demuestran que las propiedades mecánicas de los implantes de este estudio son adecuadas para sus aplicaciones biomédicas.

6.2.2. Estructura de los implantes

Los implantes utilizados en nuestro estudio fueron fabricados mediante sinterización, usando unos espaciadores de NaCl. Estos espaciadores son fácilmente eliminados con lavados con agua destilada al ser solubles en líquidos. Resulta evidente que los espaciadores se distribuyen en el metal de forma randomizada con lo cual no es posible definir una localización ni tamaño exacto de los poros. Además, la distribución de los poros no es sistemática ni planificada. Se ha visto en varios estudios que el método de la fusión selectiva mediante láser es un método para producir poros de un

determinado tamaño y en una localización exacta¹⁰⁶. Al ser un método de producción por capas, basado en un diseño computarizado, permite la producción de estructuras simples o complejas, es decir, permite la producción de implantes de titanio hechos a medida con una estructura exacta y una distribución y tamaño de poros determinada^{106,107}. Por otra parte, hay que tener presente que se trata de un método de producción con un coste económico elevado ya que precisa de un equipo complejo (computadores, software, maquinaria de producción, etc.) para producir los implantes metálicos porosos. Por todo ello, en el presente estudio se optó por la fabricación de los implantes mediante sinterización con espaciadores puesto que además, tal y como se refleja en la tabla 5.1. de los resultados, el tamaño del poro obtenido mediante este método tampoco sufre grandes variaciones.

a) Porosidad interconectada

La porosidad interconectada obtenida en este estudio fue de un 53%. Algunos investigadores han observado que el porcentaje de poros adecuados para muestras de titanio poroso debe encontrarse entre un 25 y un 66%^{108,109}. Takemoto *et al.* en el año 2005 sugirieron que el Ti poroso con un 40% de porosidad podría ser una alternativa válida para su uso clínico⁷². Sin embargo, en otro estudio, los investigadores utilizaron implantes con un 5 y 80% de porosidad demostrando también neoformación ósea en ambos casos¹¹⁰. La alta porosidad facilita el transporte de fluidos corporales, beneficia la propagación de las células al interior del implante y promueve la proliferación de tejido óseo, ya que aumenta el área de contacto; sin embargo, el equilibrio entre la tasa de porosidad y las propiedades mecánicas del material es un factor absolutamente clave y por tanto debe ser mantenido¹¹¹. Finalmente se puede concluir que la microtopografía ideal para implantes porosos comerciales permanece un tanto indeterminada y evidentemente va a depender totalmente de la finalidad clínica en la que se va a aplicar.

b) Diámetro de interconexión y diámetro de los poros

El diámetro de interconexión entre los macroporos obtenido para los implantes de este estudio fueron de 210 μ m de media y el diámetro de poro fue entre 300 a 600 μ m de promedio. La porosidad y la interconexión entre los poros de los implantes es

importante ya que les confiere unas óptimas propiedades mecánicas y además mejora las actuaciones biológicas⁶⁶. La porosidad mejora la estabilidad y la fijación de los implantes y la interconexión aporta unos túneles en el interior de los implantes para que el tejido óseo y las células puedan crecer hacia el interior y permite la creación de neovascularización, con lo que se potencia el proceso de osteointegración y osteoconducción⁶⁸. Con respecto al tamaño óptimo de los poros todavía en la actualidad existe cierta controversia, aunque revisando la bibliografía, la mayoría de los artículos mencionan como óptimos unos macroporos de entre 100 y 400 μm . Bobynd *et al.* en el año 1980 definieron que, para implantes porosos hechos a base de polvos de metal, el tamaño de poro óptimo es de entre 100 y 400 μm ⁶⁶. Esto fue comprobado por otros artículos científicos a lo largo de los últimos años^{3,112}.

Sin embargo, Taniguchi *et al.* en un artículo del año 2016 obtuvieron mejores resultados para implantes con poros más grandes que los mencionados por Bobynd *et al.*¹¹³. Taniguchi *et al.* probaron implantes con macroporos de unas 600 μm comparándolos con otros de 300 μm y 900 μm y observaron que los implantes con macroporos de 600 μm mostraron mejor fijación del hueso con el implante y más cantidad de hueso neoformado en el interior que los otros implantes¹¹³. Sin embargo, todos los implantes porosos usados en el estudio de Taniguchi *et al.* tenían una arquitectura poco controlada y una amplia distribución de los poros con lo cual resulta difícil discernir el verdadero efecto del tamaño de poros de dicho estudio. Por otro lado, Itälä *et al.* en el año 2006 mostraron un buen crecimiento óseo en tamaños de poros que oscilaban entre 50 y 125 μm utilizando implantes de titanio delgados perforados con el uso de un láser sin ningún tratamiento de superficie específico¹¹⁴. Xue *et al.* en el año 2007, mostró que se producen fenómenos tales como el aumento de la unión celular, la diferenciación celular o el aumento de la expresión de fosfatasa alcalina cuando se usan muestras de titanio porosas con poros mayores de 200 μm ¹¹⁵. Resulta muy interesante destacar que estos autores observaron que los osteoblastos responden de manera diferente según el tamaño de poro. En poros de menos de 100 μm , las células se propagan directamente sobre el poro por filopodia, mientras que en los poros de más de 200 μm , los osteoblastos no se extienden sobre el poro sino que se produce su crecimiento dentro de los poros¹¹⁵. En una extensa revisión bibliográfica, Karageorgiou *et al.* en el año 2005 consideraron que el tamaño mínimo

de poro debería ser de 100 μm debido al tamaño celular y las características de la migración y el transporte celular¹¹⁶. Sin embargo, los poros de 300 μm se consideraban ideales, ya que facilitaban la progresión de células endoteliales y por tanto la formación de capilares. Dichos autores también correlacionaron estos datos con el tamaño de los canales de Havers de aproximadamente 100-200 μm de diámetro. En este sentido, los autores demostraron que los poros pequeños podían favorecer la hipoxia, lo que podía dar lugar a la formación de tejido cartilaginoso, mientras que los poros grandes mejor vascularizados permiten la osteogénesis directa. Los autores concluyeron su estudio recomendando el desarrollo de tecnologías que pueden producir un gradiente de tamaños de poro, lo que da como resultado una interfaz mejorada de implante con el hueso¹¹⁶. Frosch *et al.* en el año 2002 demostraron en su estudio que los osteoblastos en cultivos fueron capaces de cubrir distancias de 600 μm de diámetro para poblar un poro en una muestra de titanio, formando puentes celulares¹¹⁷. En poros de 300 μm de diámetro, una sola célula fue capaz de crear extensiones de lado a lado mediante filopodia. La capacidad de celularizar rápidamente un poro es inversamente proporcional a la diferenciación celular. Una vez unidas a la pared del poro, las células comienzan su diferenciación, aumentando la expresión de moléculas como la osteocalcina, la osteopontina, la fibronectina, el colágeno I y III¹¹⁷.

Resulta pues evidente que existe una elevada heterogeneidad en la bibliografía actual en cuanto a los resultados relacionados con la optimización del tamaño de poro. Quizá, una razón para justificar estos datos tan dispares podría ser que muchos de los resultados de los diferentes estudios sólo se obtuvieron a partir de un tamaño de poro promedio y no se tomó en consideración la interconectividad de los poros. La interconectividad de los poros, o sea, el canal de comunicación entre un macroporo y otro, es un factor crítico. Si tenemos macroporos de un diámetro adecuado pero no hay una buena interconexión entre ellos, no habrá neoformación de tejido óseo en su interior. La interconexión de los poros tiene que permitir el paso tanto del hueso neoformado como de la vascularización para que este tejido se mantenga en unas condiciones óptimas. Por todo ello, en el presente estudio se optó por la fabricación de implantes porosos con interconexión entre los macroporos de unos 210 μm de media. Para nosotros es más importante hablar de interconexión entre poros que

propiamente del diámetro del poro. En general, es difícil digitalizar o evaluar la interconectividad de poros, porque los poros y sus interconexiones conforman una compleja red 3D de estructuras en forma de andamio. Todas las redes pueden afectar el crecimiento óseo o la diferenciación de tejidos en cada poro. Sin embargo, debido a que el crecimiento del tejido invade la red desde la periferia del implante hasta el centro, las características de las rutas desde la superficie externa son muy importantes. Si hay una buena interconexión entre poros pero no hay una buena conexión con la periferia, no habrá un adecuado crecimiento óseo. Asimismo, estudios previos con tubos de aluminio o implantes de titanio, revelaron que cuando más largas sean las interconexiones, peor penetra el tejido óseo^{72,118}. También se considera importante el diámetro de la interconexión: Otsuki *et al.* en el año 2006, en su estudio con conejos en defectos en cóndilos femorales observaron que interconexiones de menos de 52µm, dificultan la neoformación y la maduración ósea dentro de los implantes de titanio poroso, encontrando que cuando más estrecho era la interconexión, menos maduro era el tejido y menos cantidad de hueso se hallaba en los poros¹¹⁹. Dichos autores concluyeron que las interconexiones deberían tener un diámetro mínimo de 52µm para asegurar un buen *ingrowth* del tejido¹¹⁹. Lu *et al.* en el año 1999 obtuvieron unos resultados parecidos, postulando la importancia de las interconexiones para el crecimiento óseo y demostrando en su estudio que las interconexiones de más de 50µm eran favorables para la neoformación ósea y su mineralización¹²⁰. Así podemos observar que las interconexiones estrechas entre poros inhiben la diferenciación del tejido en el interior de los poros. La vascularización es un factor clave para la neoformación ósea y las interconexiones estrechas pueden inhibir el avance adecuado de esta y ralentizar o incluso parar así la etapa temprana de diferenciación de los tejidos óseos en los poros. Por último, se ha visto que es importante la cantidad o el número de interconexiones entre los poros, incluso más que el tamaño. En el interior del implante, al llenarse de tejido neoformado, hay un intercambio constante de fluidos, tanto entrada como salida del ellos. Si solo hay una única conexión, esta podría no ser suficiente para lograr un buen intercambio y asegurar así una rápida propagación y maduración del tejido óseo¹¹⁹. En nuestro estudio, se tuvieron en cuenta dichas dimensiones en la elaboración de los implantes de manera que el efecto que el tratamiento de superficie pudiera tener en

la osificación partiese de unas condiciones estructurales del titanio óptimas en cuanto a poros e interconexiones.

c) Superficie externa

Al tratarse de implantes porosos, las superficies externas de los implantes mostraron macro y microrugosidad. La interacción del biomaterial con el tejido y la consolidación ósea dependen mucho de las características químicas y topográficas de la superficie de las muestras. Los tratamientos de superficie para conseguir macro y microrugosidad mejoran la proliferación, la adhesión y la integración de las células óseas¹²¹. Los estudios que examinan la utilidad de la rugosidad de las superficies de los implantes muestran que las diferencias en la topografía de la superficie, incluida la rugosidad, afectan la adsorción de la fibronectina y la albúmina *in vitro* además de mostrar crecimiento de fibroblastos y células similares a los osteoblastos en cultivos^{122,123}. En implantes sólidos, se pueden realizar tratamientos con chorro de arena o similares, para producir una microrugosidad y conseguir así una adhesión más fuerte de los osteoblastos, relacionada en parte con la expresión alterada de la integrina, con la mayor densidad de contacto focal y el reorganizado citoesqueleto de las células en la superficie rugosa¹²⁴. También se ha observado que las células cultivadas en superficies de titanio rugosas muestran una proliferación reducida y una diferenciación aumentada. Asimismo, las superficies rugosas de los implantes metálicos aumentan la respuesta de los osteoblastos a las hormonas y los factores de crecimiento, incluida la 1,25-dihidroxitamina D3, 17 β -estradiol y la proteína morfogenética ósea (BMP)^{125,126}. Además, en las superficies rugosas de Ti, los osteoblastos generan un microentorno osteogénico para regular la remodelación ósea, representado por la liberación de factores locales para promover la diferenciación de los osteoblastos e inhibir la activación de los osteoclastos. Estos resultados coinciden con estudios clínicos en animales que muestran que los implantes de titanio con mayor rugosidad mejoran el contacto hueso-implante y que hay una mayor tasa de éxito en la integración de implantes con la superficie tratada que con los implantes lisos mecanizados^{127,128}. En el estudio de esta tesis doctoral, los implantes debido a su forma de producción ya presentaron macro y microrugosidades en la superficie. No hizo falta ningún tratamiento adicional como por ejemplo con chorro de arena o aluminio como se suele hacer en superficies lisas.

De hecho, podría resultar contraproducente ya que se ha visto que las partículas usados para tales tratamientos, en el caso de implantes porosos, pueden quedarse impactados en la superficie del implante y crear así efectos no deseados¹²⁹. Por lo tanto, los implantes usados en nuestro estudio ya presentaron una macro y microporosidad óptima para estimular la adhesión y proliferación celular. En un capítulo de libro publicado en el año 2012, Reis de Vasconcellos *et al.* presentaron un estudio *in vivo* en el que llevaron a cabo la implantación ortotópica de diferentes tipos de implantes en tibias de conejos¹¹¹. En dicho estudio, los autores utilizaron implantes porosos fabricados mediante sinterización con macro y microporos en su periferia y en el interior y otros implantes con una superficie rugosa pero sin macro y microporos externos. Los resultados a las 4 y 8 semanas mostraron osteointegración en ambos grupos sin diferencia a nivel cualitativo del tejido óseo neoformado pero sí que observaron más cantidad de tejido óseo nuevo en los implantes con la superficie porosa, con resultados estadísticamente significativos. Los autores atribuyeron esa diferencia a la o área de contacto disponible con el tejido óseo circundante en las muestras porosas y a mejores condiciones osteoconductoras de estos implantes¹¹¹.

d) Caracterización *in vitro*

En la caracterización *in vitro* de nuestro estudio, se observó una adecuada proliferación celular en todos los diferentes implantes porosos con una ocupación casi total de las células en el interior de los implantes a los 21 días. Gracias a los diferentes tiempos de observación nos aseguramos de que la adhesión de las células fue estable en el tiempo. Postiglione *et al.* en el año 2003 hicieron una comparación del comportamiento de células SaOS-2 en diferentes superficies de titanio¹³⁰. Dichos autores concluyeron que existe una correlación inversa entre la proliferación y la diferenciación celular en las distintas superficies del titanio. Las células SaOS-2 proliferaron mejor en superficies lisas, mientras que las superficies rugosas promovían su diferenciación hacia un fenotipo osteoblástico. Esto surge de que las superficies rugosas pueden favorecer un mejor resultado biológico en implantes de titanio ya que parecen inducir la diferenciación hacia fenotipos osteoblásticos, mejorando así la curación ósea y el mantenimiento a largo plazo de la osteointegración.

6.3. Discusión sobre el tipo de corte y la elaboración del protocolo para la evaluación de las muestras

Aunque en la mayor parte de los estudios similares al nuestro las muestras se visualizan con un único plano de corte, en nuestro estudio consideramos interesante procesar laboratorialmente las muestras en dos diferentes planos. Un grupo mayoritario de muestras se procesó siguiendo cortes transversales con respecto al implante, y otro grupo más pequeño se procesó siguiendo cortes longitudinales a lo largo del eje mayor de los implantes. El principal objetivo de este doble planteamiento de cortes es el de obtener la máxima información de los implantes procesados de manera que se obtengan datos relevantes que se complementen entre ellos y que por tanto, aporten una información más completa de la respuesta ósea que tiene lugar en el interior de los implantes. De esta manera, consideramos que con los cortes transversales se logra llevar a cabo una mejor valoración cuantitativa de la osteointegración y de la osteoconducción ya que se puede apreciar la penetración del tejido neoformado en las zonas más internas del implante. En cambio, con las muestras cortadas de forma longitudinal se puede hacer una mejor evaluación cualitativa y valorar con más detalle la procedencia topográfica del tejido óseo (periostio, cortical, endostio) y su patrón de propagación hacia el interior del implante. En muchos artículos científicos publicados con planteamientos similares al nuestro, se realiza únicamente el análisis mediante un corte longitudinal de las muestras, sobre todo si se usan implantes no porosos. En estos casos se pretende ver únicamente el contacto del hueso con el implante en todo el grosor de la cortical¹³¹. En cambio, con las muestras porosas, aparte de valorar el *BIC*, se pretende también visualizar el *bone ingrowth* del tejido, de qué forma crece el tejido óseo hacia el interior del implante. Takemoto *et al.* en el año 2005 y Taniguchi *et al.* en el año 2016 hicieron estudios similares al nuestro y ambos optaron por un corte transversal de las muestras al realizar un análisis cuantitativo^{72,113}. Takemoto *et al.* evaluaron la profundidad del *bone ingrowth*, su área y el índice de afinidad (similar al *BIC*) y Taniguchi *et al.* evaluaron mediante microtomografía computarizada (micro-CT) y MER la penetración del tejido óseo neoformado hacia el interior del implante, mediante un análisis cuantitativo y también realizaron con las mismas muestras una evaluación cualitativa evaluando el tipo de tejido óseo presente en cada grupo

temporal^{72,113}. En cambio, estudios únicamente cualitativos como por ejemplo el presentado por Reis de Vasconcellos *et al.* en el año 2008 optaron por hacer un corte longitudinal de las muestras para valorar únicamente la calidad y la madurez del tejido neoformado¹³². Cuatro años más tarde, el mismo grupo de autores amplió su estudio haciendo también un análisis cuantitativo de las mismas imágenes longitudinales obtenidos en el año 2008¹¹¹. En el presente estudio, evaluamos las muestras transversales tanto de forma cuantitativa como cualitativa y obtuvimos unas muestras longitudinales para hacer otra evaluación cualitativa algo distinta.

La microscopía electrónica de retrodispersión (MER) y la porosimetría de intrusión de mercurio se han utilizado comúnmente para demostrar la morfología y la arquitectura de los poros¹¹⁹.

El MER proporciona imágenes de alta resolución y altamente detalladas de la topografía tridimensional de la superficie. Sin embargo, el MER se limita a hacer mediciones bidimensionales en campos de visión relativamente pequeños. En consecuencia, puede ser difícil imaginar o evaluar la estructura del implante en conjunto en toda su perspectiva. Para solucionar este problema, en el presente estudio diseñamos un protocolo de escaneo secuencial de las superficies de las muestras de los implantes para posteriormente fusionar aproximadamente 150 imágenes obtenidas con el MER mediante el software ImageJ. De esta manera se obtuvo una única imagen del implante por completo con una resolución muy alta y de muy buena calidad.

Por otra parte, la porosimetría de intrusión de mercurio proporciona información sobre la porosidad, la distribución del tamaño de poro y el área de superficie interna de una muestra completa, pero no puede detectar poros aislados en la muestra y tiene dificultades potenciales para el análisis de poros profundos conectados por interconexiones estrechas en estructuras porosas complejas.

En general, la información obtenida de las técnicas de porosimetría y MER es insuficiente para la evaluación precisa de la interconexión entre poros de muestras de titanio poroso. La visualización simultánea tridimensional del implante sólo es posible mediante la microtomografía computarizada de alta resolución (micro-CT).

Con ello se consigue un escaneado y reconstrucción 3D de la muestra y su potencial segregación por componentes (implante, hueso neoformado, huecos, etc.).

Ho *et al.* en el año 2006 revisaron las características y aplicaciones de la micro-CT al compararla con otras técnicas¹³³. Debido a que los datos obtenidos por la micro-CT pueden representarse fácilmente en formatos 2D y 3D a alta resolución, el crecimiento óseo en los implantes se puede medir cuantitativamente segregando el tejido óseo de los andamios de titanio¹³⁴. Además, se puede realizar fácilmente el análisis estructural 3D de implantes completos, como por ejemplo la interconexión entre poros.

Sin embargo, con los equipos actuales, las imágenes de micro-CT no aportan ni mucho menos la resolución necesaria para discernir e identificar con precisión el tejido óseo neoformado en el interior del implante. Aunque en nuestro estudio desafortunadamente no pudimos disponer de un micro-CT para la evaluación tridimensional, ésta se puede de alguna manera extrapolar a partir de la evaluación en capas de las imágenes de MER.

Partiendo pues de las imágenes de alta resolución de MER, en nuestro estudio desarrollamos un método innovador que permitía la evaluación automatizada de las imágenes. De este modo, se definieron digital y automatizadamente distintas áreas en los implantes las cuales se analizaron posteriormente usando el programa ImageJ para poder calcular la cantidad de hueso disponible en cada área de interés y en la zona de la interfase hueso-implante. Hoy en día, no hay ningún artículo científico disponible con un protocolo detallado de evaluación de implantes de titanio poroso. Los únicos autores que describieron someramente su forma de analizar las muestras porosas fueron Takemoto *et al.* en el año 2005⁷². Estos autores citaron el uso de Photoshop y ImageJ para determinar el *bone ingrowth area rate* y el *bone affinity index*. Dividieron sus cilindros de 6mm de diámetro en 10 capas concéntricas (0 el más externo y 10 en más céntrico) para realizar los cálculos. Basándonos en la información publicada en el estudio de Takemoto *et al.* nosotros diseñamos un método automatizado de génesis de las distintas áreas de interés, aunque con sólo 3 ROIs hacia el interior del implante (puesto que nuestros implantes presentaban un diámetro de 3,5mm). Asimismo, creamos el concepto de área exterior para definir el tejido óseo neoformado en la parte externa del implante y también evaluamos el BIC

(contacto hueso-implante) para poder valorar la fijación del implante por parte del hueso neoformado periféricamente.

6.4. Discusión sobre los resultados obtenidos del análisis cuantitativo y cualitativo de las imágenes del MER de las muestras transversales

En las muestras del primero grupo temporal (4 semanas) se pudo observar que todos los implantes de todos los grupos tuvieron neoformación ósea en el interior de las muestras, en mayor o menor medida. Solo había una muestra del grupo control que apenas mostró crecimiento de tejido óseo hacia el interior del implante. En general, se detectó que las muestras tratadas con péptidos obtuvieron resultados superiores para todas las mediciones, es decir, tanto para el *bone on-growth* como para el *bone in-growth*. En segundo lugar, quedaron las muestras con tratamiento termoquímico, mostrando resultados levemente inferiores al grupo peptídico pero superiores al grupo control.

En cuanto al análisis cualitativo, de nuevo se pudo observar que las muestras del grupo peptídico mostraron un *bone in-growth* más profundo, llegando en muchas muestras hasta el centro de los implantes y encima mostrando tejido más maduro que los otros grupos. A las 4 semanas ya se pudo observar parte de tejido lamelar en muchas zonas, incluso en lo más profundo de algunas zonas de los implantes. Los implantes con tratamiento termoquímico mostraron también un tejido algo más maduro que el grupo control, pero menos que el grupo peptídico, pero en cambio la adhesión del hueso neoformado al metal era muy superior en este segundo grupo. Se observó un contacto del tejido óseo neoformado en el interior de los poros muy escaso con el titanio en el grupo con tratamiento peptídico, incluso inferior al grupo control.

En el segundo grupo temporal, 12 semanas, se pudo observar que las muestras mostraron una tendencia similar a las del primer grupo temporal. Los implantes tratados con péptidos mostraron valores superiores para la cuantificación en el área exterior respecto al grupo con tratamiento termoquímico y respecto al grupo control mostrando resultados superiores tanto en el área externo como para el *BIC*. En el área interno, se observó más variabilidad entre los diversos grupos: se vio que para el

hueso real total en el interior del implante las muestras con el tratamiento termoquímico mostraron valores levemente por encima de los obtenidos para el grupo peptídico. Comparando las diferentes *ROIs*, se obtuvieron resultados superiores para la *ROI* externa y *ROI* media en el GP, pero en cambio se vieron resultados más altos para la *ROI* centro en el caso del grupo con tratamiento termoquímico, el cual incluso superó el valor obtenido para este mismo grupo en la *ROI*2. En todo caso, los grupos con tratamiento superficial mostraron valores superiores al grupo control, excepto para la *ROI* externa donde el valor del porcentaje de hueso neoformado del grupo GTQ es mínimamente inferior al valor del grupo control.

A nivel cualitativo, en general se observó un aumento de la cantidad y madurez del tejido neoformado en las muestras del grupo B respecto al grupo A. Todas las muestras mostraron tejido neoformado en más o menos cantidad. En las muestras con tratamiento termoquímico se vio más tejido neoformado hasta el centro de los implantes en comparación con el grupo control además de apreciar un tejido más maduro hacia el interior de los implantes, con gran presencia de tejido lamelar y algunas zonas con osteonas bien definidas. Lo mismo ocurrió con los implantes del grupo peptídico los cuales en general mostraron una madurez del tejido neoformado superior a los otros dos grupos.

Evaluando los resultados para llevar a cabo la presente discusión, llamó la atención que de nuevo se observó la presencia de mucho tejido neoformado y muy maduro del grupo peptídico pero en cambio este mostraba un pésimo contacto con la superficie de los macro y microporos en el interior de los implantes. En cambio, igual que en el primero grupo temporal, el GTQ mostró un contacto muy íntimo del tejido óseo con el metal, incluso aprovechando este para propagarse hacia el interior de las muestras.

En ambos grupos temporales se observó una ligera superioridad en cuanto a cantidad y calidad del tejido óseo neoformado en los grupos con tratamiento peptídico. Se observó más cantidad de tejido en general en los dos grupos peptídicos y también se mostró un tejido más maduro en este grupo, tanto a las 4 semanas como a las 12. En cambio preocupa este escaso contacto del tejido neoformado en el interior de los macro y microporos. Casi se puede decir que el tejido neoformado de las muestras

con tratamiento peptídico intenta evitar el contacto con el metal, propagándose sobre todo por zonas del implante donde menos metal hay presente. Esto podría hacernos pensar que al no estar unido el tejido neoformado al implante, este no recibe suficiente carga mecánica con lo cual actúa la Ley de Wolff y ese tejido óseo neoformado con el tiempo se podría desmineralizar y desaparecer, causando una inestabilidad en el implante. Por otro lado, el grupo con tratamiento termoquímico mostró un íntimo contacto del hueso neoformado con el metal, estando casi completamente adherido a él en el segundo grupo temporal. El tejido neoformado del GTQ se une íntimamente con las superficies de los macroporos e incluso penetra en su gran mayoría dentro de los microporos. A diferencia del grupo peptídico, parece aprovechar el metal para propagarse hacia el interior del implante.

6.4.1. Grupos control

Está demostrado en muchos artículos científicos, tanto mediante estudios *in vitro* como *in vivo*, que el titanio poroso de por sí, sin tratamiento alguno, tiene propiedades osteoconductoras y osteointegrativas^{3,69,103,106}. Reis de Vasconcellos *et al.* en el año 2010 hicieron un estudio *in vivo* implantando cilindros de titanio poroso no bioactivos con una porosidad de un 37% y macroporos interconectados, de 3mm de diámetro, en tibias de conejos¹³². A las 4 semanas, los autores empezaron a observar osteointegración con crecimiento de tejido óseo neoformado hacia el interior del implante, A ese tiempo, sólo observaron tejido óseo fibroreticular en el interior de los poros más pequeños. A las 8 semanas post-implantación observaron neoformación ósea hasta el centro de los implantes con tejido lamelar rellenando tanto los poros grandes como los pequeños demostrando así la buena osteoconducción y osteointegración de los implantes porosos no bioactivos¹³². En nuestro estudio podemos observar resultados similares, obteniendo un buen *in-growth* del tejido óseo neoformado hacia el interior de los implantes a las 4 semanas. A diferencia del estudio de Reis de Vasconcellos *et al.*, nosotros pudimos observar a las 4 semanas, la presencia de tejido fibroreticular pero también de tejido lamelar en algunas zonas de las muestras del grupo control, tanto en los micro como en los macroporos. A las 8 semanas, nuestros resultados son muy similares a los obtenidos por Reis de

Vasconcellos *et al.*, mostrando un buen crecimiento del tejido óseo neoformado hacia el interior del implante, con presencia mayoritaria de tejido lamelar.

6.4.2. Grupos con tratamiento termoquímico

Realmente existen muchos artículos científicos sobre los tratamientos termoquímicos de superficies de titanio poroso³. El tratamiento termoquímico es un proceso económico y simple de realizar. Asimismo, al sumergirse el implante en una solución de NaOH ésta se extiende por todas las estructuras irregulares del implante consiguiendo así una superficie bioactiva homogénea, tanto en la zona exterior del implante como en los poros más internos. Además, el tratamiento termoquímico no reduce el espacio de poro disponible para el crecimiento del tejido óseo ya que sólo produce cambios diminutos en la superficie de los poros, reduciéndolos como máximo en 1 μm ¹³⁵. Lo que sucede con el tratamiento termoquímico es que se produce una fina capa de titanato de sodio en las superficies, formando así una capa de apatita densa y uniforme en contacto con el fluido corporal, con concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano. Así, los implantes tratados de forma termoquímica se unen al hueso vivo a través de esta capa de apatita proporcionando no sólo la fuerte unión de la capa de apatita al tejido óseo, sino también un gradiente uniforme de transferencia de tensión del hueso a los implantes¹³⁶. Hay muchos estudios *in vitro* que se realizaron durante las últimas décadas y que demostraron esta formación de una capa de apatita en la superficie de los implantes^{136,137,138}. Asimismo, Feng KC *et al.* en el año 2007 mostraron en un estudio *in vitro* la importancia de combinar el tratamiento químico con el térmico ya que observaron que un tratamiento alcalino por sí solo no causaba ningún cambio detectable en la superficie de implantes de aleaciones de titanio¹³⁹. En cambio, son muy usados también los tratamientos ácidos-alcalinos con los cuales se consiguen unos resultados similares a los observados con los tratamientos termoquímicos, formándose una capa de apatita en la superficie del titanio.⁷⁵

En cuanto a los estudios *in vivo*, hay varios autores que mostraron el efecto osteoinductor de muestras de titanio poroso bioactivas mediante tratamiento termoquímico al ser implantados de forma ectópica en los músculos dorsales de

perros Beagles^{76,140}. Fujibayashi *et al.* en el 2004 observaron hueso neoformado en el interior de los implantes bioactivos después de una implantación ectópica durante 12 meses¹⁴⁰. Zhao C *et al.* en el 2010 mostraron la formación de tejido óseo neoformado en el interior de los implantes con tratamiento termoquímico al cabo de 5 meses de su implantación en el músculo demostrando así de nuevo el efecto osteoinductor del titanio poroso bioactivado mediante tratamiento termoquímico⁷⁶. Por tanto, resulta predecible que nuestros resultados coincidan con los de los citados estudios. En nuestras series, pudimos apreciar un crecimiento de tejido óseo neoformado superior en los implantes del GTQ respecto a los del GC y además se visualizó un tejido más maduro y un íntimo contacto del hueso con el implante lo cual se puede atribuir a esta distribución tan homogénea del tratamiento, recubriendo todos los macro y microporos de las muestras. Asimismo, se obtuvieron valores superiores en cuanto al *BIC* para el grupo con tratamiento termoquímico que en el grupo control.

Takemoto *et al.* en el año 2005 obtuvieron resultados muy parecidos⁷². Dichos autores llevaron a cabo una implantación ortotópica en cóndilos femorales de conejos, estudiando la osteoconducción de implantes de titanio poroso sin tratar e implantes de titanio poroso tratados de forma termoquímica con unos grupos temporales de 2, 4, 8 y 16 semanas. A nivel cualitativo, a las 4 semanas ambos grupos mostraron hueso neoformado incluso llegando en alguna zona hasta al centro de los implantes, mostrando tejido fibroreticular inmaduro en ambos casos. En las capas más externas de sus muestras, los autores visualizaron tejido lamelar, tanto en el grupo GTQ como en el grupo control. A las 16 semanas, observaron la presencia mayoritaria de tejido óseo lamelar, incluso llegando hasta el centro de los implantes en el grupo con el tratamiento termoquímico. En cambio, en el grupo control vieron una regresión del tejido óseo neoformado quedando sólo una pequeña cantidad en los poros más pequeños. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral son muy similares a los reflejados por Takemoto *et al.* De este modo en nuestro estudio, a las 4 semanas y tanto en el grupo TQ como en el grupo control, también observamos mayoritariamente tejido óseo fibroreticular sobre todo en el centro de los implantes, con algo de presencia de tejido lamelar. De manera similar, a las 12 semanas pudimos encontrar en su gran mayoría tejido lamelar tanto en el interior como en el exterior de los implantes con tratamiento termoquímico. Sin embargo, nuestros resultados

defieren de los obtenidos para Takemoto *et al.* en el caso del GC de 12 semanas puesto que en nuestros implantes, no se observa en ningún momento una disminución del tejido neoformado y en general el tejido se presenta con más madurez y en más cantidad que a las 4 semanas.

A nivel cuantitativo, Takemoto *et al.* presentaron valores superiores para el *BIC* y para el *bone ingrowth* en el grupo con tratamiento TQ⁷². A las 4 semanas, dichos autores observaron un *BIC* del 16,7% en el GTQ *versus* un 12,7% en el GC y un hueso real neoformado del 12,3% en el grupo con tratamiento termoquímico respecto a un 13,1% para el grupo control. Los valores obtenidos para las 16 semanas en el estudio de Takemoto *et al.* fueron de un 19,1 % de *BIC* para el grupo termoquímico respecto a un 7,8% para el grupo control. En cuanto al hueso real neoformado en el interior de los implantes, dichos autores obtuvieron los siguientes valores: 20,6% para el grupo TQ *versus* un 8,7% para el grupo sin tratamiento.

Los valores obtenidos en el estudio de Takemoto *et al.* para el *bone ingrowth*, tanto a las 4 como a las 12 semanas para el grupo con tratamiento termoquímico, son muy parecidos a los observados en nuestro estudio. A las 4 semanas estos autores obtuvieron un *bone ingrowth* del 12,3% para el grupo TQ. En nuestro estudio, obtuvimos un valor levemente más alto, concretamente de un 18,05%. Lo mismo ocurre con los resultados del grupo control a las 4 semanas: en el estudio de Takemoto *et al.* consiguieron un *bone ingrowth* del 13,1% para el GC y en nuestro estudio un 13,48%. A las 16 semanas, Takemoto *et al.* observaron unos valores del 20,6% para el hueso real neoformado en el interior del implante para el grupo con tratamiento termoquímico. En esta tesis doctoral obtuvimos un valor del 24,87% a las 12 semanas. Por tanto, nuestros valores siguen la tendencia de los de Takemoto *et al.*, pero con valores específicos mejores sin tener en cuenta además que nuestro estudio se llevó a cabo con tiempos postoperatorios más cortos. Por otra parte, para el grupo control a mayor tiempo, nuestros resultados defieren bastante de los obtenidos en el estudio de Takemoto *et al.* puesto que observaron un *bone ingrowth* del grupo sin tratamiento a las 16 semanas de sólo un 8,7%. Esto significa una disminución bastante severa respecto al grupo control a las 4 semanas. En nuestro estudio, pudimos observar una tendencia creciente para todos los grupos a tiempos más prolongados: el *bone ingrowth* de nuestro grupo control a las 12 semanas mostraba un

valor del 20,94% (moderadamente más alto que el valor obtenido por Takemoto *et al.* a las 16 semanas.) Los valores obtenidos por dichos autores para el *BIC* son muy inferiores a los obtenidos en esta tesis doctoral para ambos grupos temporales y también observamos algunas diferencias a nivel del hueso real neoformado. Teniendo en cuenta además que en el citado estudio, los implantes se colocaron en el cóndilo femoral, área de mayor potencial de respuesta biológica que la epífisis tibial proximal utilizada en nuestro estudio. Las citadas diferencias pueden ser debidas al diámetro y a la interconexión de poros que obtuvieron dichos autores y a la porosidad total del implante. Takemoto *et al.* fabricaron sus implantes mediante una técnica de pulverización resultando en unos implantes con una porosidad del 40%, unos poros de entre 300 y 500 μm de diámetro y una interconexión entre los poros de una media de 89 μm (10 a 170 μm)⁷². En nuestro estudio, se elaboraron implantes con una porosidad interconectada media de un 57% con una interconexión de un diámetro medio de 210 μm , macroporos de entre 300 y 600 μm y microporos de entre 1 y 15 μm , con una superficie externa rugosa. Esta porosidad, el diámetro de interconexión entre poros obtenidos y la rugosidad de la superficie podrían favorecer la osteointegración en nuestras muestras y proporcionar así mejores resultados que los obtenidos por Takemoto *et al.*

A nivel estadístico, dichos autores no obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos a las 4 semanas de estudio. En resumen, los resultados del estudio de Takemoto *et al.* a las 4 semanas, son muy similares a los obtenidos en nuestro estudio, con la diferencia que nosotros detectamos valores levemente superiores para el grupo TQ y además un tejido óseo algo más maduro. Sin embargo, y a pesar de nuestros mejores resultados, éstos no reflejaron diferencias estadísticamente significativas como tampoco las pudieron observar los autores del citado artículo. En cambio, en los resultados obtenidos para el análisis a mayor tiempo, nuestros resultados defieren algo de los obtenidos por Takemoto *et al.*: en su estudio del 2005, ellos observaron poca cantidad de hueso neoformado para el grupo control a las 8 y 16 semanas y en cambio había más tejido óseo nuevo en el interior de los implantes para el grupo TQ, observando en este mismo grupo un tejido óseo mucho más maduro, llegando el hueso lamelar hasta el centro de los implantes a las 16 semanas. Dichos autores observaron una disminución de la afinidad del hueso por el implante

en el grupo control a partir de las 4 semanas. Las diferencias entre los dos grupos obtenidos a las 16 semanas eran incluso estadísticamente significativas. En nuestro estudio no pudimos observar una disminución del tejido óseo neoformado a las 12 semanas en el grupo control, aunque sí que apreciamos de nuevo la tendencia ya observada a las 4 semanas de valores superiores para el grupo con tratamiento termoquímico respecto al grupo control además de mostrar un tejido lamelar muy maduro llegando hasta el centro del implante coincidiendo con lo observado por Takemoto *et al.*⁷²

En el año 2012, Reis de Vasconcellos *et al.* publicaron diversos estudios realizados con implantes de titanio¹¹¹. En uno de ellos, hicieron una implantación ortotópica en tibias de conejos de implantes de titanio poroso bioactivados con un tratamiento termoquímico *versus* un grupo control sin tratamiento. Dichos autores llevaron a cabo una valoración cuantitativa a los 15, 30 y 45 días post-implantación. Desgraciadamente los resultados mostrados no son descritos con mucho detalle aunque comentan que en todos los grupos temporales obtuvieron más cantidad total de tejido óseo neoformado para las muestras con tratamiento termoquímico. De este modo, en el citado estudio se reflejaron simplemente los porcentajes de 37,45% para el GTQ *versus* un 32,26% para el GC en su análisis a los 15 días y un 37,91% respecto a un 37,13% en su valoración a los 30 días. El problema es que los autores sólo mencionan la presencia de tejido óseo neoformado pero sin especificar si se encontraba en el área externo o si es el *total ingrowth* o incluso una media de ambos con lo cual no podemos comparar con detalle nuestros resultados con los obtenidos en el estudio mencionado. De igual manera, tampoco especificaron si los resultados fueron estadísticamente significativos o no¹¹¹.

Tras una revisión exhaustiva de la bibliografía, no pudimos detectar ningún artículo científico en el que se describa con detalle la información respecto al íntimo contacto o no del hueso con las superficies de los macro y microporos en el interior de los implantes con lo cual no pudimos comparar tampoco nuestros resultados con los de otros estudios.

6.4.3. Grupo con tratamiento peptídico

El objetivo de la bioactivación con péptidos es el de inmovilizar las secuencias peptídicas a las superficies de los implantes para inducir una respuesta celular específica, es decir, para controlar la interfase tejido-implante mediante los componentes orgánicos del hueso. Esto se consigue mediante un grupo de receptores celulares llamados integrinas que están involucradas en la adhesión celular a proteínas de la matriz extracelular. Las integrinas interactúan con secuencias cortas de aminoácidos, en particular, con la secuencia Arg-Gli-Asp (RDG) que ha sido identificada como mediador para la adhesión celular a proteínas plasmáticas y de la matriz extracelular. De las 24 integrinas conocidas, 8 subtipos reconocen y se unen a la secuencia RDG. De estos 8, tres están presentes en los osteoblastos por lo cual se usan estas secuencias para promover la adhesión de los osteoblastos a los implantes y mejorar así la osteointegración⁷⁵.

De este modo, los péptidos adheridos a las superficies de los implantes han demostrado mejorar la interacción celular con los biomateriales¹⁴¹. Los primeros estudios dedicados a estudiar el efecto de los péptidos adheridos a las superficies para unir osteoblastos empezaron a mediados de los noventa. Dee *et al.* en el año 1996 proporcionaron ejemplos de efectos de RDGs inmovilizados en vidrio aminado sobre los osteoblastos¹⁴². A partir de aquí surgieron varios estudios similares como el realizado por Reznia *et al.* en el año 1999 basado en un estudio dirigido a la identificación de las subunidades de las integrinas responsables de la adhesión inicial de células osteoblásticas unidas a una superficie de cuarzo con grupos aminos a través de un péptido RDG¹⁴³. Entre los primeros ejemplos de inmovilización de péptidos en titanio, está el estudio de Xiao *et al.* en el año 1997¹⁴⁴. Estos autores investigaron la unión de un péptido RDG (RGDC-Arg-Gli-Asp-Cis) a superficies de titanio funcionalizadas con 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) mostrando su correcta adhesión mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)¹⁴⁴.

Les siguieron varios otros estudios *in vitro* a lo largo de los años, usando diferentes secuencias de RDG sobre varias superficies de titanio^{145,146}. Porte-Durrieu *et al.* en el año 2004 realizaron un interesante estudio multidisciplinar comparando diferentes ensamblajes peptídicos: dos péptidos RGD con una conformación diferente unidos a la superficie de una aleación de titanio, un péptido RGD lineal y otro péptido RGD

cíclico. Los autores evaluaron la adhesión de células osteoprogenitoras aisladas de la médula ósea humana a las superficies entre 1 y 24 h y mostraron una mejor adhesión significativa de las células sobre las superficies tratadas respecto a muestras no tratadas y mejores resultados para el péptido cíclico sobre el lineal para datos a las 24h¹⁴⁷.

En el año 2009, Pallu *et al.* publicaron un estudio *in vitro* e *in vivo* del uso de un péptido DfKRG cíclico cubriendo una aleación de titanio con hidroxiapatita¹⁴⁸. dicho estudio demostró una buena adhesión celular a la hora y a las 24 horas de sumergir los implantes tratados peptídicamente. Para el estudio *in vivo* realizaron una implantación ortotópica en cóndilos femorales de conejos de cilindros de una aleación de titanio con hidroxiapatita sin tratamiento peptídico (Ti-HA), otros con tratamiento peptídico (Ti-HA-RGD) y un tercer grupo con tratamiento peptídico y células osteoprogenitoras de conejos (Ti-HA-RGD-ROP). Al cabo de 2 semanas observaron que el grupo con tratamiento peptídico obtuvo los valores más altos para el *BIC* y los más bajos en cuanto a formación de tejido fibroso respecto a los otros dos grupos. Aun así concluyeron que el tratamiento peptídico no mejora ni la adhesión ni la regeneración ósea ya que no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos¹⁴⁸.

En el año 2014, Mas-Moruno *et al.* presentaron un estudio *in vitro* de una nueva plataforma divalente basada en péptidos para su uso en biomateriales⁹³. En un capítulo de libro escrito por el mismo autor un año antes, se menciona que el uso de péptidos lineales cortos tiene una serie de limitaciones que muchas veces generan unos resultados pobres en estudios *in vivo*⁷⁵. El autor también concluye que los péptidos lineales se cortan fácilmente por la proteasas séricas con lo cual su uso *in vivo* está limitado. Además, los péptidos lineales RGD presentan una gran cantidad de conformaciones en una solución y esta flexibilidad está asociada con una pobre selectividad. Por ejemplo, son útiles para promover la unión de células pero no distinguen entre tipos celulares distintos. Por lo tanto, estos péptidos no son óptimos cuando se desea la adhesión de un determinado tipo celular sobre otros. Además destacan que los péptidos individuales a menudo no resumen la misma actividad biológica que muestra una proteína nativa ya que pierden un dominio de sinergia necesario para la actividad o no pueden adoptar la estructura secundaria requerida

para interactuar con un receptor de proteína. Como conclusión, el autor que propone una serie de estrategias utilizadas para solventar estas limitaciones como son las de usar mezclas de péptidos, unidades múltiples de péptidos, de usar fragmentos recombinantes de proteínas, usar péptidos cíclicos en vez de lineales o usar peptidomiméticos⁷⁵. De ahí, en el año 2014, Mas-Moruno *et al.* crearon una nueva plataforma consistente en dos unidades peptídicas, RGD y PHSRN, una secuencia que se encontró en la fibronectina que produce un efecto sinérgico en unión con el RDG^{93,149}. Estas dos secuencias peptídicas se unieron a dos unidades de espaciadores unidos a una lisina y está unida a un grupo anclaje. Los espaciadores y el anclaje hacen que la secuencia peptídica sea mucho más accesible para las células y menos susceptible a degradaciones enzimáticas. Para el estudio *in vitro*, cubrieron discos de titanio lisos con esta plataforma divalente de péptidos. Como control, usaron discos de titanio sin tratamiento, discos de titanio cubiertos con un péptido lineal RGD y un control positivo de discos de titanio cubiertos con fibronectina. Los autores observaron que a las 4 horas de haber sumergido las muestras en cultivo celular, los implantes tratados con RDG sólo presentaron los mejores resultados en cuanto a adhesión celular seguido de los implantes con la plataforma divalente. También observaron efectos muy positivos sobre la extensión de las células notando un aumento significativo del área de las células con las muestras tratadas con el péptido lineal y sobre todo con las muestras con la plataforma divalente. Después de 3 días de incubación, los autores apreciaron una mayor tasa de proliferación celular para las superficies tratadas con el RDG lineal y con la plataforma mostrando la misma tendencia para el análisis a los 14 días. Además, tanto los implantes tratados con la plataforma divalente como aquellas con tratamiento peptídico simple mostraron un aumento significativo de la actividad ALP en comparación con el grupo control⁹³. Este estudio *in vitro* fue la base para realizar nuestro estudio *in vivo*.

El primer estudio *in vivo* realizado con péptidos fue en el año 1999, realizado por Ferris *et al.*¹⁵⁰. El estudio fue diseñado para evaluar la calidad y la cantidad de tejido óseo neoformado en varillas de titanio lisas cubiertas con oro y una secuencia de RDG implantadas en fémures de ratas. Su análisis histomorfométrico mostró que los implantes modificados con péptido RDG mostraron más cantidad de tejido óseo alrededor del implante tanto a las 2 como a las 4 semanas de la implantación al igual

que unas propiedades mecánicas superiores a las muestras control¹⁵⁰. Sin embargo, otro estudio *in vivo* en el año 2002 realizado por Schliephake *et al.* no pudo demostrar ningún beneficio de un recubrimiento peptídico para implantes de una aleación de titanio lisos implantados en el hueso mandibular de perros¹⁵¹. Los autores sólo pudieron generar una evidencia muy débil en el sentido que este recubrimiento podría aumentar la neoformación ósea peri-implante en el hueso alveolar. En el año 2005, se realizó el primer estudio usando recubrimiento peptídico en titanio poroso, concretamente en mallas de fibras de titanio cubiertas por un péptido RDG cíclico conteniendo un anclaje de fosfonato¹⁵². Los autores llevaron a cabo una implantación de estas mallas en el cráneo de conejos y lo compararon con otras mallas sin tratamiento peptídico. Los resultados de este estudio mostraron un aumento significativo de la neoformación ósea y el *bone ingrowth* para las muestras con tratamiento peptídico tanto a las 4 semanas como a las 8 post-implantación. En el mismo año, Elmengaard *et al.* realizaron otro estudio con implantes de titanio poroso tratados con un RGDfK cíclico y se implantaron en la zona proximal de tibias de perros durante 4 semanas¹⁵³. Los autores observaron un aumento significativo de hueso neoformado en el área exterior y hacia el interior de los implantes en comparación con implantes no bioactivos y una reducción de tejido fibroso alrededor de los implantes con tratamiento peptídico. Más recientemente en el año 2017, Wang *et al.* hicieron un estudio con un péptido cíclico (RGDfK) en implantes porosos de tantalato¹⁵⁴. En este estudio, se aplicaron implantes cilíndricos en radios de conejos creando unos defectos críticos. Los autores valoraron la osteointegración a las 4, 8 y 16 semanas. Histológicamente describieron un aumento gradual de hueso neoformado en los distintos grupos temporales, con un crecimiento desde la periferia del implante hacia los poros internos. A nivel cualitativo solo mencionaron que el hueso neoformado en el grupo con tratamiento peptídico era mejor. En su análisis con micro-CT observaron más volumen de hueso neoformado para el grupo peptídico versus el grupo control (sin bioactivación)¹⁵⁴.

Como se puede observar, hay muy pocos estudios publicados para valorar *in vivo* la osteoconducción y la osteointegración de implantes de titanio poroso con tratamiento peptídico. Tras una exhaustiva revisión bibliográfica, no pudimos encontrar ningún estudio similar al nuestro realizado, con lo que es realmente difícil hacer una correcta

comparación de los datos obtenidos con otros artículos científicos pero por otra parte, ello aporta un valor absolutamente innovador a la presente tesis puesto que presenta los primeros resultados con el uso de un tratamiento peptídico usando un péptido RGD lineal con la presencia de espaciadores y una unidad de anclaje selectiva en un estudio *in vivo*. En nuestro estudio podemos ratificar el buen funcionamiento de los tratamientos bioactivos con péptidos en cuanto a adhesión y proliferación celular y también en cuanto a regeneración ósea. Desgraciadamente, ningún estudio revisado da detalles sobre cantidad de hueso neoformado, profundidad del *ingrowth* o calidad del tejido en diferentes grupos temporales tal como hicimos nosotros en este estudio. Tampoco se encuentra referencia alguna al hallazgo observado en nuestro estudio relacionado con la ausencia de una íntima adherencia del tejido óseo neoformado a los macro y microporos internos de los implantes. Lo que nosotros podemos concluir es que en general tanto a nivel cuantitativo como a nivel cualitativo obtuvimos los mejores resultados para las muestras tratadas con el péptido pero en este grupo se vio un claro rechazo de un íntimo contacto hueso-implante en el interior de las muestras. Nuestra hipótesis al respecto es que, los péptidos en el interior del implante al no estar en contacto ni con células ni con sangre ni otros componentes biológicos, se van degradando progresivamente. En cambio, los péptidos de la superficie puesto que están en contacto desde el primer instante de la implantación con el tejido óseo, con la sangre y demás componentes vivos, se mantienen intactos y realizan sus correspondientes funciones activadoras tal y como se ha visto en los estudios *in vitro*. Superficialmente, los péptidos activados biológicamente estimulan al tejido óseo a crecer y a penetrar en el interior de los macro y microporos pero en profundidad, al estar degradado el recubrimiento peptídico, no logra adherirse de forma íntima a la superficie metálica en el interior de los implantes. Esta falta de adherencia justificaría el buen *BIC* en el área externa del implante y la gran madurez y cantidad de tejido neoformado al ser estimulado en la periferia de las muestras con tratamiento peptídico y justificaría el escaso contacto del hueso neoformado en el interior del implante. En cambio, en la caracterización *in vitro*, se produciría una adecuada proliferación celular en todos los diferentes implantes porosos con una ocupación casi total de las células en el interior de los implantes a los 21 días. Este comportamiento se podría justificar con el hecho

de que en este caso, los implantes están totalmente sumergidos en un líquido, el cual también es capaz de penetrar en el interior de los implantes. En este caso, los péptidos están en contacto con las células y el suero desde un principio, factor que ayuda a que no se degraden. Para una valoración más detallada de este hecho, se planteará en un futuro hacer un análisis histológico de las muestras.

En general, los péptidos son susceptibles a degradación enzimática por parte de las proteasas, sobre todo los péptidos lineales al presentar una naturaleza más inestable. Un péptido lineal soluble es degradado de manera muy rápida, sin embargo, anclado a la superficie, hay un impedimento estérico para las enzimas y por tanto la degradación es más lenta. *A priori*, se podría esperar que el péptido en la cara exterior se degradaría más rápidamente que el de la cara interior ya que este se encuentra más expuesto al medio pero en este caso hay una adhesión celular rápida en el área exterior al estar en contacto con el tejido óseo con lo cual la zona queda protegida más rápidamente, mientras que el péptido en el interior no está protegido. Además, la unión del péptido a unos espaciadores y a una unidad de anclaje selectiva aumenta la accesibilidad a éste por parte de las células. También hay que asumir que no tenemos la misma cantidad de péptidos RGD en todo el implante ya que la silanización, el método que nos permite la unión del péptido al metal será más eficiente en el área exterior y en la superficie del implante que en su interior.

Otro aspecto a tener en cuenta es que si el péptido en el interior de los implantes se degrada o se libera de su anclaje, este péptido soluble actuará como un antagonista e interaccionará con las integrinas de los osteoblastos bloqueando su unión al metal. Este hecho podría explicar también por qué el tejido óseo neoformado en el interior del implante no se adhiere de forma correcta al titanio.

Si comparamos los dos mecanismos de bioactivación, se puede observar que los dos parecen estimular en cierta medida la osteointegración, aunque no se pudo demostrar con diferencias estadísticamente significativas. Los mecanismos de acción de un tratamiento inorgánico como el tratamiento termoquímico respecto a uno orgánico como el tratamiento peptídico es muy diferente. El tratamiento inorgánico promueve la nucleación de cristales de apatita. De algún modo, esto se traduce en una formación de hueso “directa”, es decir, sobre el implante precipita la parte mineral del hueso directamente. Esto va asociado a un crecimiento óseo desde el implante hacia

fuera. En el caso de los péptidos, el RGD estimula las integrinas lo cual promueve la adhesión, mecanotransducción y finalmente la diferenciación y mineralización. Por lo tanto, podríamos considerar que se trata de un mecanismo más indirecto.

6.5. Discusión sobre los resultados obtenidos del análisis cualitativo de las imágenes del MER de las muestras longitudinales

En los resultados del análisis cualitativo de las imágenes longitudinales se pudo observar que en el grupo temporal de las 4 semanas, las muestras fueron más homogéneas que las cortadas transversalmente. La tendencia fue la misma que en las muestras transversales del grupo A: en general, se observó tejido neoformado más maduro en el grupo de implantes con tratamiento peptídico, además de observarse un crecimiento hasta el centro del implante en todas las muestras. En cambio, otra vez se apreció el escaso contacto del hueso con el implante en el interior de las muestras a diferencia del área exterior donde se vio un buen *BIC*. Igualmente, parece haber una leve superioridad de la madurez del tejido neoformado de las muestras del grupo termoquímico respecto a las del grupo control. Cabe destacar en estas muestras la visualización de la procedencia del tejido neoformado. En el grupo A, se apreció que en el caso de las muestras del grupo control, el crecimiento procedía casi exclusivamente de la cortical. En cambio, en el grupo TQ y el GP se observó un crecimiento sobre todo de las corticales pero también hubo crecimiento desde el periostio y el endostio.

En el grupo temporal B, vuelven a verse muestras bastante heterogéneas, especialmente en el grupo control y en el GP. Se aprecia en general una mayor madurez del tejido óseo neoformado respecto al grupo A, igual que ya se observó con las muestras transversales. Asimismo, se notó de nuevo un tejido óseo más maduro en las muestras con tratamiento peptídico, predominantemente con tejido lamelar y presencia de osteonas. En cambio, las muestras GP volvieron a mostrar un comportamiento similar al grupo temporal A observándose un escaso contacto del hueso neoformado en el interior de los implantes con el metal. Destacó, igual que en las muestras transversales, el íntimo contacto del tejido óseo con la superficie de los macroporos en las muestras con tratamiento termoquímico. Respecto a la

procedencia del crecimiento del tejido neoformado, se apreció que este procedía predominantemente de las corticales en el caso de las muestras del grupo control, con leve crecimiento en este caso desde el periostio (a diferencia del grupo temporal A). Para las muestras del GTQ y GP se observó un crecimiento tanto desde las corticales como también desde el endostio y el periostio, aunque más sutilmente en las muestras con tratamiento peptídico.

Revisando la bibliografía, no se encontró ni un artículo que haga mención a la procedencia del tejido neoformado, es decir, si es un crecimiento desde las corticales o más pronunciado desde el periostio o el endostio. Nosotros opinamos que es detalle importante ya que nos puede indicar una mejor o peor fijación del implante. Si sólo tenemos un crecimiento del tejido óseo hacia el interior de los implantes procedente del periostio y/o el endostio, podemos deducir que el implante no se fija de la misma forma como lo haría con un crecimiento procedente de las corticales, puesto que sería necesario un gran puente perióstico y endóstico para estabilizar mínimamente al implante, pudiendo, dichos puentes, interferir determinantemente con el objetivo clínico del implante.

6.6. Discusión sobre los resultados obtenidos del análisis estadístico

Después de la aplicación el análisis estadístico para comparar los tres grupos de tratamiento entre ellos dentro de cada periodo temporal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo. Todos los valores obtenidos tuvieron un p-valor > de 0,05 con lo cual no se pudo demostrar significancia estadística, ni en el primero grupo temporal ni en el segundo grupo temporal. Sin embargo, y a pesar de no resultar con significación estadística, el mayor crecimiento óseo, *BIC* y *bone ingrowth* del grupo peptídico observado en nuestro estudio, puede hacernos pensar que con un tamaño de muestra mucho mayor, las diferencias observadas podrían manifestar muy probablemente resultados estadísticamente significativos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

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

Primera: Desde un punto de vista cuantitativo, la bioactivación de los implantes de titanio mediante el innovador tratamiento peptídico utilizado en este estudio no produjo, a pesar de los mejores resultados observados, diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta osteoregenerativa *in vivo* en comparación con la del grupo control.

Segunda: Desde un punto de vista cuantitativo, la bioactivación de los implantes de titanio mediante el tratamiento termoquímico clásico no produjo, a pesar de los mejores resultados observados, diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta osteoregenerativa *in vivo* en comparación con la del grupo control.

Tercera: Desde un punto de vista cuantitativo, la bioactivación de los implantes de titanio mediante el innovador tratamiento peptídico utilizado en este estudio no produjo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta osteoregenerativa *in vivo* en comparación con la del grupo de tratamiento termoquímico clásico.

Cuarta: Desde un punto de vista cualitativo, la bioactivación de los implantes de titanio mediante el innovador tratamiento peptídico utilizado en este estudio generó una respuesta osteoregenerativa con una mayor cantidad y madurez del tejido óseo neoformado en comparación con las del grupo térmico-químico y control. Sin embargo, esa mayor neoformación ósea no iba acompañada de una mayor adhesión al titanio en el interior del implante.

Quinta: Desde un punto de vista cualitativo, la bioactivación de los implantes de titanio mediante el tratamiento termoquímico clásico generó una respuesta osteoregenerativa con mayor cantidad y madurez del tejido óseo neoformado que la del grupo control.

Sexta: Tanto el protocolo de inserción quirúrgica de implantes de titanio en hueso para la valoración de su osteointegración como el protocolo de medición histomorfométrica digital de la evolución de la osteoconducción y osteointegración de dichos implantes, desarrollados ambos protocolos de manera innovadora en este estudio, se han mostrado efectivos, objetivos y extrapolables, pudiéndose considerar como estándar de evaluación en estudios con objetivos similares.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhao X, Courtney JM, Qian H. *Bioactive Materials in Medicine: Design and applications*. First edition. Woodhead Publishing; 2011.
2. Khodaei M, Fathi M, Meratian M *et al*. The effect of porosity on the mechanical properties of porous titanium scaffolds: Comparative study on experimental and analytical values. *Materials Research Express* 2018; 5(5): 055401.
3. Palka K, Pokrowiecki R. Porous Titanium Implants: A Review. *Advanced Engineering Materials* 2018; 20: 1700648
4. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg.* 1996, 35(5):413-417.
5. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001; 10(2):96-101.
6. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E *et al*. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:421746
7. Wopenka B, Pasteris JD. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering* 2005; 25(2):131-143.
8. Weiner S, Wagner HD. The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annual Review of Materials Science* 1998; 28:271-298.
9. Henriksen K, Sørensen MG, Nielsen RH *et al*. Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(1):58-66.
10. Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N Engl J Med.* 1980; 302(26):1460-1466.
11. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW *et al*. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981; 26(1):99-105.
12. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest.* 2001;107(9):1049-1054.

13. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. Principles of bone biology. Third edition. Elsevier; 2008.
14. Al-Qtaitat AI, Aldalaen SM. A Review of Non-Collagenous Proteins; their Role in Bone. American Journal of Life Sciences 2014; 2(6):351-355.
15. Glorieux FH, Pettifor JM, Jüppner H. Pediatric Bone: Biology and diseases. Second edition. Elsevier; 2012.
16. Tsumaki N, Yoshikawa H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. Cytokine Growth Factor Rev. 2005; 16(3):279-85.
17. Okamoto M, Murai J, Yoshikawa HJ *et al.* Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. Bone Miner Res. 2006; 21(7):1022-1033.
18. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T *et al.* Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. J Bone Miner Res. 1998, 13(5):793-802.
19. Schmidt JR, Kliemt S, Preissler C *et al.* Osteoblast-released Matrix Vesicles, Regulation of Activity and Composition by Sulfated and Non-sulfated Glycosaminoglycans. Mol Cell Proteomics. 2016;15(2):558-572.
20. Arboleya L, Castañeda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. Reumatol Clin. 2013; 9(5):303-315.
21. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. Dev Dyn. 2006; 235(1):176-190.
22. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. Osteoporos Int. 2010; 21(9):1457-1469
23. Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41(3):446-450.
24. Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. Matrix Biol. 2000; 19(2):107-120.
25. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ *et al.* Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Third edition. Elsevier; 2013.

26. Matic I, Matthews BG, Wang X *et al.* Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells*. 2016; 34(12):2930-2942.
27. Reznikov N, Shahar R, Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater*. 2014; 10(9):3815-3826.
28. Chen X, Fan H, Deng X *et al.* Scaffold Structural Microenvironmental Cues to Guide Tissue Regeneration in Bone Tissue Applications. *Nanomaterials* 2018; 8(11):960.
29. OpenStax. Anatomy and physiology. OpenStax CNX; 2016.
30. Hall BK. The Embryonic Development of Bone. Sigma Xi, The Scientific Research Society. 1988; 76(2):174-181.
31. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L *et al.* Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(1):46-62.
32. Khurana JS, Safadi FF. Bone Structure, Development and Bone Biology. First edition. Springer; 2009.
33. Walsh JS. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery* 2015; 33(1):1-6.
34. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*. 1995; 332(5):305-311.
35. Sims NA, Martin J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*. 2014; 3: 481.
36. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010; 285(33):25103-8.
37. Rucci N. Molecular biology of bone remodeling. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2008; 5(1): 49-56.
38. Delaisse JM. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep*. 2014; 3: 561-569.

39. Boivin G, Farlay D, Bala Y *et al.* Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. *Osteoporos Int.* 2009; 20(6):1023-1026.
40. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42(6):551-555.
41. Harwood PJ, Ferguson DO. An update on fracture healing and non-union. *Orthopaedics and trauma* 2015; 29(4):223-280.
42. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT *et al.* Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res.* 2008; 87(2):107-118.
43. Franch J, Gracia F, Camón J *et al.* Backscattered Electron Imaging of the Calcified Tissues Present in Bone Healing. *Vet Comp Orthop Traumatol* 1998; 11(02): 105-111.
44. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A *et al.* Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep.* 2017; 6: 87–100.
45. Lieberman JR, Friedlaender GE. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications.* Humana Press, 2005.
46. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D *et al.* Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone.* 2015; 70:93-101.
47. Bidez MW. Transmisión de fuerzas en implantes odontológicos. *J Oral Implant* 2002; 18:264-74
48. Anjard RJ. Mayan dental wonders. *Oral Implantol.* 1981;9(3):423-426.
49. Zivic F, Affatato S, Trajanovic M *et al.* *Biomaterials in Clinical Practice: Advances in Clinical Research and Medical Devices.* Springer; 2018.
50. Hench LL. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Mater. in Medicine* 2006; 17(11):967-978.
51. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29(20):2941-2953.
52. Rehman M, Madni A, Webster TJ. The era of biofunctional biomaterials in orthopedics: what does the future hold? *Expert Rev Med Devices* 2018; 15(3):193-204.

53. Dorozhkin SV. A novel, environmentally friendly process for the fabrication of calcium phosphate bioceramics. *Inorganic Materials* 2008; 44(2):207-210.
54. LeGeros RZ, LeGeros JP. Calcium Phosphate Bioceramics: Past, Present and Future. *Key Engineering Mater.* 2003; 240(242):3-10.
55. Love BJ. *Biomaterials: A Systems Approach to Engineering Concepts*. Chapter 9. Polymeric Biomaterials. O'Reilly; 2017.
56. Chen Q, Thouas GA. Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering R Reports* 2015; 87:1-57.
57. Sumita M, Hanawa T. Failure processes in biometallic materials. *Bioengineering* 2003; 9:131-167.
58. Nasab MB, Hassan MR, Sahari BB. Metallic Biomaterials of Knee and Hip- A Review. *Trends Biomater. Artif. Organs* 2010; 24(2):69-82.
59. Casillas N, Charlebois S, Smyrl WH *et al.* Pitting Corrosion of Titanium. *J Electrochemical Soc* 1994; 141(3):37.
60. Donachie MJ. *Titanium: A Technical Guide*. Second edition. ASM International; 2000.
61. Veiga C, Davim JP, Loureiro AJR. Properties and applications of titanium alloys: A brief review. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2012; 32:14-34.
62. Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mater Sci Eng C* 1998; 243(1):231-236.
63. Leyens C, Peters M. *Titanium and Titanium Alloys: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH; 2006.
64. Kim KT, Eo MY, Nguyen TH *et al.* General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent.* 2019; 5:10-22.
65. Mullen L, Stamp RC, Fox P *et al.* Selective laser melting: a unit cell approach for the manufacture of porous, titanium, bone in-growth constructs, suitable for orthopedic applications. II. Randomized structures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 92(1):178-188.
66. Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU *et al.* The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1980; 150:263-270.

67. Chen XB, Li YC, Hodgson PD *et al.* The importance of particle size in porous titanium and nonporous counterparts for surface energy and its impact on apatite formation. *Acta Biomaterialia* 2009; 5(6):2290-2302.
68. Oh IH, Nomura N, Masahashi N, *et al.* Mechanical properties of porous titanium compacts prepared by powder sintering. *Scripta Materialia* 2003; 49(12):1197-1202.
69. Banhart J. Manufacturing routes for metallic foams. *JOM* 2012; 52(12):22-27.
70. Li Y, Guo Z, Hao J *et al.* Porosity and mechanical properties of porous titanium fabricated by gelcasting. *Rare Metals* 2008; 27(3):282-286.
71. Agapovichev AV, Kokareva VV, Smelov VG *et al.* Selective laser melting of titanium alloy: investigation of mechanical properties and microstructure. *IOP Conference Series: Mater Sci Eng C* 2016; 156(1): 012031.
72. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M *et al.* Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials* 2005; 26(30):6014-6023.
73. Isaac J, Loty S, Hamdan AS *et al.* In Vitro Bone Formation on Bioactive Titanium. *Key Engineering Materials* 2008; 361: 939-942.
74. Kokubo T, Yamaguchi S. Bioactive Ti Metal and its Alloys Prepared by Chemical Treatments: State-of-the-Art and Future Trends. *Advanced Engineering Materials* 2010; 12(11):579-591.
75. Taubert A, Mano JF, Rodríguez-Cabello JC. *Biomaterials Surface Science. Chapter 12: Bioactive Ceramic and Metallic Surfaces for Bone Engineering.* Wiley-VCH; 2013.
76. Zhao C, Zhu X, Liang K *et al.* Osteoinduction of porous titanium: a comparative study between acid-alkali and chemical-thermal treatments. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 95(2):387-396.
77. Haimov H, Yosupov N, Pinchasov G *et al.* Bone Morphogenetic Protein Coating on Titanium Implant Surface: A Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res.* 2017; 8(2): e1.
78. Shekaran A, García AJ. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 96(1):261-272.

79. Wang C, Liu Y, Fan Y *et al.* The use of bioactive peptides to modify materials for bone tissue repair. *Reg Biomaterials* 2017; 4(3):191–206.
80. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; 24(24):4385-4415.
81. Oya K, Tanaka Y, Saito H *et al.* Calcification by MC3T3-E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG. *Biomaterials* 2009; 30(7):1281– 1286.
82. Kim MJ, Lee B, Yang K *et al.* BMP-2 peptide-functionalized nanopatterned substrates for enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2013; 34(30):7236–7246.
83. Seo HS, Ko YM, Shim JW *et al.* Characterization of bioactive RGD peptide immobilized onto poly (acrylic acid) thin films by plasma polymerization. *Appl Surf Sci* 2010; 257(2):596–602.
84. Wojtowicz AM, Shekaran A, Oest ME *et al.* Coating of biomaterial scaffolds with the collagen-derived peptide GFOGER for bone defect repair. *Biomaterials* 2010; 31(9):2574–2582.
85. Hennessy KM, Pollot BE, Clem WC *et al.* The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* 2009; 30(10):1898–1909.
86. Stile RA, Healy KE. Thermo-responsive peptide-modified hydrogels for tissue regeneration. *Biomacromolecules* 2001; 2(1):185– 194.
87. Reyes CD, Petrie TA, Burns KL *et al.* Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials* 2007; 28(21):3228– 3235.
88. Lindley EM, Guerra FA, Krauser JT *et al.* Small peptide (P-15) bone substitute efficacy in a rabbit cancellous bone model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 94(2):463– 468.
89. Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y *et al.* Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. *Biomaterials* 2009; 30(27):4676–86.

90. Bitschnau A, Alt V, Böhner F *et al.* Comparison of new bone formation, implant integration, and biocompatibility between RGD-hydroxyapatite and pure hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses-an experimental study in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 88(1):66–74.
91. Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K. In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants. *Biomaterials* 2005; 26(17):3521-3526.
92. Kroese-Deutman HC, van den Dolder J, Spauwen PH *et al.* Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. *Tissue Eng.* 2005; 11(11-12):1867-75.
93. Mas-Moruno C, Fraioli R, Albericio F *et al.* Novel peptide-based platform for the dual presentation of biologically active peptide motifs on biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014; 6(9):6525-6536.
94. Mead R. The design of experiments statistical principles for practical applications. Second edition. Cambridge University Press; 1990.
95. Russel WMS, Burch RL. The principles of human experimental technique. Methuen London; 1959.
96. Caparrós C, Ortiz-Hernandez M, Molmeneu M *et al.* Bioactive macroporous titanium implants highly interconnected. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27(10):151.
97. Jäger M, Böge C, Janissen R *et al.* Osteoblastic potency of bone marrow cells cultivated on functionalized biomaterials with cyclic RGD-peptide. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101(10):2905-2914.
98. Kokubo T, Yamaguchi S. Novel Bioactive Titanate Layers Formed on Ti Metal and Its Alloys by Chemical Treatments. *Materials.* 2010; 3(1): 48–63.
99. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T *et al.* Spontaneous Formation of Bone Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. *J Am Ceram Soc* 2005; 79(4):1127-1129.
100. Takedama H, Kim HM, Kokubo T *et al.* TEM-EDX study of mechanism of bonelike apatite formation on bioactive titanium metal in simulated body fluid. *J Biomed Mater Res.* 2001; 57(3):441-448.

101. Ortiz-Hernandez M, Rappe KS, Molmeneu M *et al.* Two Different Strategies to Enhance Osseointegration in Porous Titanium: Inorganic Thermo-Chemical Treatment Versus Organic Coating by Peptide Adsorption. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(9):2574.
102. Brunette DM, Tengvall P, Textor M *et al.* Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications. Springer; 2001.
103. Frost HM. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. *Angle Orthod.* 1994, 64(3):175-88.
104. Huiskes R, Weinans H, Van Rietbergen B. The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials. *Clin Orthop Relat Res* 1992, 274:124-134.
105. Dabrowski B, Swieszkowski W, Godlinski D *et al.* Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2010, 95(1):53-61.
106. de Wild M, Schumacher R, Mayer K *et al.* Bone regeneration by the osteoconductivity of porous titanium implants manufactured by selective laser melting: a histological and micro computed tomography study in the rabbit. *Tissue Eng Part A.* 2013 ;19(23-24):2645-2654.
107. Pattanayak DK, Fukuda A, Matsushita T *et al.* Bioactive Ti metal analogous to human cancellous bone: Fabrication by selective laser melting and chemical treatments. *Acta Biomater.* 2011 ;7(3):1398-1406.
108. Liu YL, Schoenaers J, Groot K *et al.* Bone healing in porous implants: a histological and histometrical comparative study on sheep. *J mat. sci mat. med.* 2000, 11: 711-717.
109. Kujala S, Ryhänen J, Danilov A *et al.* Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute. *Biomaterials* 2003, 24: 4691-4697.
110. Wen CE, Yamada Y, Shimojima K *et al.* Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. *J Mater Sci Mat Med* 2002, 13: 397-401.

111. Hudak R. Biomedical Engineering – Technical Applications in Medicine. Chapter 2: Porous Titanium by Powder Metallurgy for Biomedical Application: Characterization, Cell Cytotoxicity and in vivo Tests of Osseointegration. IntechOpen; 2012.
112. Mediaswanti K, Wen C, Ivanova IP *et al.* A review on bioactive porous metallic biomaterials. *J Biomim Biomater Tissue Eng.* 2013; 18(1):104.
113. Taniguchi N, Fujibayashi S, Takemoto M *et al.* Effect of pore size on bone ingrowth into porous titanium implants fabricated by additive manufacturing: An in vivo experiment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 59:690-701.
114. Itälä AI, Ylänen HO, Ekholm C *et al.* Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58(6):679-683.
115. Xue W, Krishna BV, Bandyopadhyay A *et al.* Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. *Acta biomater.* 2007, 3: 1007-1018.
116. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005, 26: 5474-5491.
117. Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH *et al.* Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. *Cell Tis Org* 2002, 170: 214-227.
118. Pabbruwe MB, Standard OC, Sorrell CC *et al.* Bone formation within alumina tubes: effect of calcium, manganese, and chromium dopants. *Biomaterials* 2004; 25:4901–4910.
119. Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S *et al.* Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials.* 2006; 27(35):5892-900.
120. Lu JX, Flautre B, Anselme K *et al.* Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 1999; 10:111–120.

121. Zhao G, Raines AL, Wieland M *et al.* Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*. 2007; 28(18):2821-2829.
122. Francois P, Vaudaux P, Taborelli M *et al.* Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium, II: adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8:217-225.
123. Harris LG, Patterson LM, Bacon C *et al.* Assessment of the cytocompatibility of different coated titanium surfaces to fibroblasts and osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2005; 73:12-20.
124. Raz P, Lohmann CH, Turner J *et al.* 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ regulation of integrin expression is substrate dependent. *J Biomed Mater Res A* 2004; 71:217-225.
125. Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K *et al.* Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α ,25-(OH) $_2$ D-3. *J Biomed Mater Res* 1998; 39:77-85.
126. Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL *et al.* Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent* 1997; 6:19-24.
127. Buser D, Schenk RK, Steinemann S *et al.* Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991; 25(7):889-902.
128. Khang W, Feldman S, Hawley CE *et al.* A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol* 2001; 72:1384-90.
129. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P *et al.* Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007; 23(7):844-854.
130. Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L *et al.* Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J Dent Res*. 2003; 82(9):692-696.

131. Abron A, Hopfensperger M, Thompson J *et al.* Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosthet Dent.* 2001; 85(1):40-46.
132. Reis de Vasconcellos LM, Varella de Oliveira M, Graça M *et al.* Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. *Mater Research* 2008; 11(3):275-280.
133. Ho ST, Hutmacher DW. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials* 2006; 27(8):1362–1376.
134. Jones AC, Milthorpe B, Averdunk H *et al.* Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via microcomputed tomography imaging. *Biomaterials* 2004; 25(20):4947–4954.
135. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T *et al.* Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment. *J Biomed Mater Res* 1999, 45:100-107.
136. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T *et al.* Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med.* 1997; 8(6):341-347.
137. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T *et al.* Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res.* 1996; 32(3):409-417.
138. Lee BH, Do Kim Y, Shin JH *et al.* Surface modification by alkali and heat treatments in titanium alloys. *J Biomed Mater Res.* 2002; 61(3):466-473.
139. Feng KC, Wu EY, Pan YN *et al.* Effects of Chemical and Heat Treatments on Surface Characteristics and Biocompatibility of Titanium-Niobium Alloys. *Materials transactions* 2007; 48(11):2978-2985.
140. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM *et al.* Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 2004; 25(3):443-450.
141. Morra M. Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *Eur Cell Mater.* 2006; 24(12):1-15.

142. Dee KC, Rueger DC, Andersen TT *et al.* Conditions which promote mineralization at the bone-implant interface: a model in vitro study. *Biomaterials* 1996; 17(2):209-215.
143. Rezania A, Healy KE. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *J Orthop Res* 1999; 17(4): 615-623.
144. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8(12): 867-872
145. De Giglio E, Sabbatini L, Colucci S *et al.* Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on RDG-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000; 11(10):1073-1083.
146. Zreiqat H, Akin FA, Howlett CR *et al.* Differentiation of human bone-derived cells grown on GRGDSP-peptide bound titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(1):105-113.
147. Porte-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S *et al.* Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials* 2004; 25(19):4837-4846.
148. Pallu S, Fricain JC, Bareille R *et al.* Cyclo-DfKRG peptide modulates in vitro and in vivo behavior of human osteoprogenitor cells on titanium alloys. *Acta Biomater.* 2009; 5(9):3581-3592.
149. Feng Y, Mrksich M. The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism. *Biochemistry* 2004; 43(50):15811-1521.
150. Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM *et al.* RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* 1999; 20:2323-2331.
151. Schliephake H, Scharnweber D, Dard M *et al.* Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest: an experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13(3):312-319

152. Kroese-Deutman HC, Van Den Dolder J, Spauwen PHM *et al.* Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. *Tissue Eng* 2005; 11(12):1867-1875.
153. Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K. In vivo effects of RGD-coated titanium implants inserted in two bone-gap models. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 75(2):249-255.
154. Wang H, Li Q, Wang Q *et al.* Enhanced repair of segmental bone defects in rabbit radius by porous tantalum scaffolds modified with the RDG peptide. *J Mater Sci Mater Med* 2017; 28(3):50-60.

9. RESUMEN/ABSTRACT

9. RESUMEN

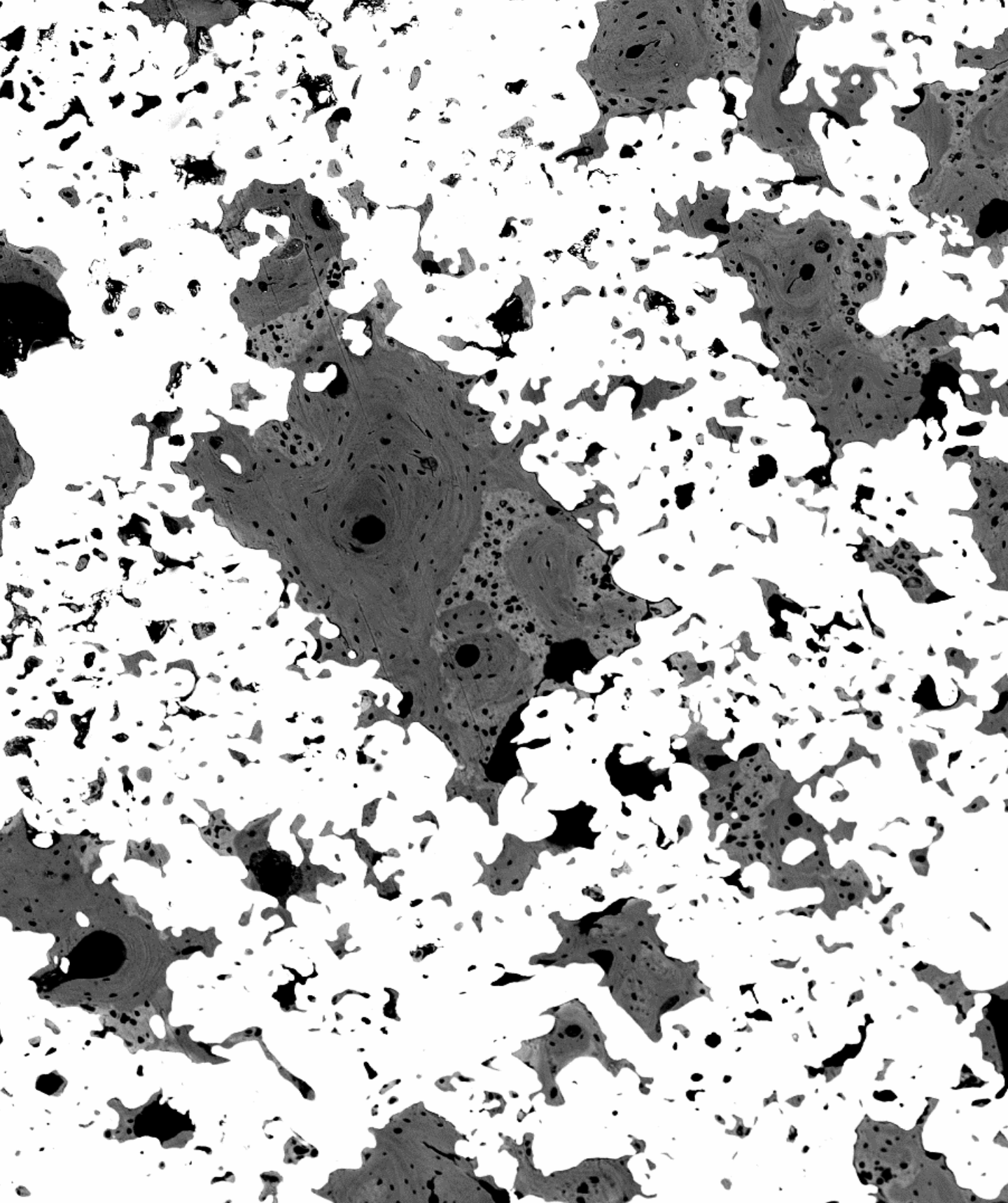
En los últimos años, la ciencia de los biomateriales aplicada a los sustitutos óseos se ha centrado en la investigación de nuevos implantes elaborados con materiales que, además de presentar una estructura de poros interconectados esencial para un adecuado crecimiento óseo que asegure el anclaje del implante, presenten también unas óptimas propiedades biomecánicas. Los estudios más recientes se centran en el desarrollo de implantes a base de metales porosos bioactivos, como el titanio, que presentan buenas propiedades mecánicas al soportar adecuadamente las condiciones de carga. Diversos estudios han demostrado que el titanio presenta una buena biocompatibilidad y una alta resistencia a la corrosión, además de unas excelentes propiedades mecánicas, convirtiéndolo, por tanto, en el metal de elección para los implantes. Con el objetivo de estimular la osteointegración, estos implantes de titanio porosos se pueden someter a diversos procesos fisicoquímicos, entre ellos los tratamientos termoquímicos o los tratamientos peptídicos. El tratamiento de los implantes de titanio con un recubrimiento peptídico es una opción extremadamente novedosa basada en el hecho que determinados péptidos fijados a la superficie del titanio pueden mimetizar la parte orgánica del hueso y mejorar así la neoformación ósea en la superficie del implante, mejorando su osteointegración y, finalmente, asegurando un mejor y más prematuro anclaje del implante sobre el hueso. El interés y demanda creciente de la aplicación de implantes de titanio tanto en odontología como en traumatología humana y veterinaria, así como la falta de estudios clínicos comparativos acerca de la respuesta biológica del hueso a los implantes de titanio tratados con los métodos descritos anteriormente, justifica la necesidad de explorar esta línea de investigación y llevar a cabo estudios experimentales que confirman los resultados preliminares obtenidos *in vitro*.

En esta tesis doctoral se llevó a cabo un estudio experimental *in vivo* mediante la implantación de cilindros de titanio poroso bioactivos en tibias de conejos. Para ello, se elaboraron implantes de titanio poroso de elevada interconexión mediante sinterización en polvo con diferentes diámetros de poro y una interconectividad abierta. Posteriormente, algunos implantes fueron sometidos a tratamientos bioactivos, creando así 3 grupos de tratamiento: termoquímico, peptídico o sin tratamiento bioactivador. Para la implantación ortotópica se intervinieron 18 conejos neozelandeses blancos adultos a los cuales se les practicó un defecto de 3,5mm en la zona medial de la tuberosidad tibial de cada extremidad y se les insertó de forma aleatoria un implante distinto. La evolución de la osteointegración y osteoconducción de los implantes fue evaluada de manera clínica, radiográfica y mediante microscopía electrónica de retrodispersión (MER) con un sistema cuantitativo y cualitativo, en dos bloques de tiempo de 4 y 12 semanas respectivamente. Los resultados demostraron que a nivel cuantitativo la bioactivación de los implantes de titanio mediante el innovador tratamiento peptídico utilizado no produjo, a pesar de los mejores resultados observados, diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta osteoregenerativa *in vivo* en comparación con la del grupo control y la del grupo termoquímico. En cambio, desde un punto de vista cualitativo, la bioactivación de los implantes de titanio mediante el nuevo tratamiento peptídico utilizado en este estudio generó una respuesta osteoregenerativa con una mayor cantidad y madurez del tejido óseo neoformado en comparación con las del grupo térmico-químico y control, sin embargo, en la zona más interna del implante, la citada mayor neoformación ósea no mostraba contacto íntimo con el metal.

9. ABSTRACT

In recent years, the science of biomaterials and the search for bone substitutes has focused on the investigation of new implants made from materials that not only provide optimal biomechanical properties, but also present an interconnected pore structure, which greatly ensures the integration of the implant, essential for adequate bone growth. The most recent studies focus on the development of implants based on bioactive porous metals, such as titanium, which present valuable mechanical properties as they adequately withstand loading conditions. Moreover, several studies have shown that titanium presents good biocompatibility, high resistance to corrosion and excellent mechanical properties, therefore making it the metal of choice for musculoskeletal implants. In order to stimulate osteointegration, these porous titanium implants can undergo various physicochemical processes, including thermochemical or peptide treatments. The treatment of titanium implants with a peptide coating is an extremely novel option based on the theory that certain peptides attached to the surface of the titanium can mimic the organic component of the bone and thus improve bone neoformation on the surface of the implant, consequently improving its osteointegration and finally, ensuring a better and faster incipient anchorage of the implant on the bone surface. The growing interest and demand for the application of titanium implants in both human and veterinary orthopedics and dentistry, as well as the lack of comparative clinical studies regarding the biological response of bone to titanium implants treated with the methods described above, justifies the need to explore this line of research and carry out experimental studies that confirm the preliminary results obtained *in vitro*.

In this doctoral thesis an *in vivo* experimental study was carried out through the implantation of bioactive porous titanium cylinders in the tibiae of rabbits. Briefly, porous titanium implants of high interconnection were prepared by powder sintering with different pore diameters and an open interconnectivity. Subsequently, some implants underwent surface bioactivation, thus creating 3 implant surface treatment groups: thermochemical implant surface treatment, peptide implant surface treatment and a group with no implant bioactivating treatment. For orthotopic implantation, 18 adult white New Zealand rabbits were intervened, a 3.5 mm defect was created in the medial aspect of the tibial tuberosity of each limb and different implants were press-fitted into the bony defects, according to randomly assigned and previously described implant treatment groups. The evolution of the osteointegration and osteoconduction of the implants was evaluated clinically, radiographically and by backscattered scanning electron microscopy (BS-SEM) with a quantitative and qualitative system, in two-time cohorts of 4 and 12 weeks respectively. On the one hand, despite having observed improvements, from a quantitative point of view, the bioactivation of titanium implants with peptide treatment showed no statistically significant differences regarding the osteoregenerative response *in vivo*, in comparison to the one of the control and the thermochemical group. On the other hand, from a qualitative point of view, the bioactivation of titanium implants through the new peptide treatment used in this study generated an osteoregenerative response with a higher quantity and maturity degree of newformed bone compared to those of the thermal-chemical and control groups. However, in the innermost area of the implant, the aforementioned bone neoformation consistently lacked intimate attachment to the metal surface.



Rappe KS. Assessment of osteointegration and osteoconduction of bioactive porous titanium implants: determination by means of BS-SEM in an orthotopic implantation model in rabbits. PhD Thesis. 2019