



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias de la Salud

**Estudio morfológico predictivo mediante
microTomografía Computarizada del hueso y
biomateriales implantados en un modelo animal.**

Andrés Parrilla Almansa

Directores:

Dr. D. Luis Meseguer Olmo
Dra. Dña. Piedad Nieves De Aza Moya
Dr. D. Francisco Martínez Martínez

Murcia, 1 de octubre de 2018



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias de la Salud

**Estudio morfológico predictivo mediante
microTomografía Computarizada del hueso y
biomateriales implantados en un modelo animal.**

Andrés Parrilla Almansa

Directores:

Dr. D. Luis Meseguer Olmo
Dra. Dña. Piedad Nieves De Aza Moya
Dr. D. Francisco Martínez Martínez

Murcia, 1 de octubre de 2018

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por aguantarme y permitir robarle todo el tiempo, ilusión y atención que he dedicado en la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis por el gran apoyo ofrecido: al Dr. Luis Meseguer por saber dirigir a un inexperto y maduro doctorando. A la Dra. Piedad de Aza por su inestimable ayuda personal, sus enseñanzas académicas y su gran información sobre los biomateriales, y al Dr. Paco Martínez porque su amistad y aprecio me llevó a involucrarme en este trabajo sin ser yo consciente del extremo esfuerzo que me iba a suponer. Siempre he estado dedicado a la actividad asistencial y el mundo de la investigación lo tenía ciertamente abandonado. A todos ellos mi gratitud porque me han introducido en el campo de la investigación, en el que ahora me gustaría participar más intensamente. Este trabajo doctoral ha permitido que aflore en mí una nueva ilusión investigadora.

A Juan José Piñero y David por la paciencia que han tenido conmigo y el gran esfuerzo que han hecho por darle a mis inquietudes anatómicas y datos matemáticos del microTC, un tratamiento estadístico que ha hecho que los resultados obtenidos hayan superado con creces mis expectativas. El gran trabajo de colaboración que hemos tenido y que ha terminado en que sus conocimientos matemáticos y mis criterios anatómicos con el microTC, hayan generado unas ilusiones y unas inquietudes que se han visto reflejados en una gran concordancia de datos y hayan abierto camino para nuevas colaboraciones en este campo de la imagen analógica y digital, de la discusión maquina/hombre.

A Nuria y a todo su equipo por permitirme usar el equipo de microTomografía Computarizada de su laboratorio de experimentación animal y por su inestimable ayuda en el procesado conjunto de las imágenes.

Al Dr. José Luis Calvo que me ha transmitido toda su energía dándome el apoyo, la ayuda y sobre todo la esperanza de poder dedicarme pronto al estudio de la aplicación clínica de los biomateriales en el campo de la odontología.

A Carlos Alberto González Bermúdez, mi alumno y maestro a la vez. Él ha sido mi gran apoyo final en la elaboración de esta tesis. Su gran colaboración intelectual e informática ha permitido darle forma digital a este sin fin de hojas, consiguiendo hacer que al final sean un conjunto entendible y organizado.

A Carlos Martínez por su gran apoyo en la realización de los estudios anatomopatológicos y su gran colaboración, lo que ha permitido que las observaciones histomorfométricas hayan coincidido con las presunciones anatómicas morfológicas y los datos matemáticos obtenidos con el microTC. La verdad final anatomopatológica ha dado la razón al matemático y consecuentemente a mi previsión de datos.

Agradecer al destino que me haya permitido trabajar con todas las personas implicadas en este trabajo y con las que he tenido una relación humana llena de calor y amistad, lo que me ha supuesto un enriquecimiento personal, humano y científico. Espero que esta tesis sea mi puerta de entrada en el campo de la investigación. El principio de nuevos proyectos investigadores que ilusionen el resto de mi vida científica.

Y finalmente agradecer a todas aquellas personas que sin yo saberlo también me han ayudado en esta época de mi vida.

A MI PADRE,

Que buscó el camino que me ha conducido hasta
aquí,
En su memoria y agradecimiento por su esfuerzo,
Y para compensarle el tiempo que no le dediqué.
Para él y por mí, para cumplir una antigua promesa.

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	13
ABSTRACT & KEYWORDS	17
1. INTRODUCCIÓN	23
2. ANTECEDENTES	33
2.1 TÉCNICAS DE IMAGEN.	33
2.2 HUESO	41
2.2.1 Características	41
2.3 BIOMATERIALES	44
2.3.1 Clasificación biomateriales	45
2.3.2 Biocerámicas	45
2.4 MODELOS ANIMALES	49
3. HIPÓTESIS	55
4. OBJETIVOS	55
5. MATERIAL Y MÉTODOS	59
5.1 MATERIAL	59
5.1.1 Biomaterial	59
5.1.2 Animales de Experimentación	61
5.1.3 Equipos	62
5.2 MÉTODOS	63
5.2.1 Planificación.	63
5.2.2 Método anestésico y quirúrgico	64
5.2.3 Técnica mamografía.	68
5.2.4. Protocolo adquisición microTOMOGRFÍA COMPUTARIZADA	69
5.2.5 Análisis de imágenes	70
5.2.6 Análisis anatomopatológico	85
6. RESULTADOS	93
6.1 RESULTADOS CON LA TECNICA MAMOGRAFICA	93
6.2 RESULTADOS CON LA MICRO-TOMOGRFÍA COMPUTARIZADA	95
6.3. RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LOS VALORES DE LOS ROI DEL MICROTC	104
6.3.1.- Resultados de los ROI cilíndrico de 4 X 4 mm: Estudio de la evolución de la reabsorción de los implantes.	104
6.3.2. - Resultados de los ROI cúbicos de 10 x 10 x 10 mm: Estudio de la evolución de la dispersión de los granos de cerámica dentro del biomaterial en el tiempo de evolución de los implantes:	115

6.3.3.- Resultados de los ROI cilíndricos de 3 x 3 mm _____	118
Este procedimiento nos ha permitido el estudio de la cortical normal en todas las muestras. Sirve para testar el modelo de estudio y confirmar que la cortical normal no sufre cambios después de llevarse a cabo la implantación del biomaterial (figura 58). _____	
6.4. RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS E HISTOMORFOMETRICOS.	119
6.4.1 Correlación morfológica entre los resultados del microTC y la anatomía patológica _____	119
6.4.2 Correlacion entre las imágenes del microTC y las secciones histologicas de cada muestra dopada y no dopada con MOD correspondiente a los diferentes periodos del estudio _____	121
6.4.3 Estudio anatomopatológico _____	122
6.4.4. Estudio evolutivo y comparativo _____	123
7. DISCUSIÓN _____	131
7.1 INTERPRETACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LOS ROI _s _____	133
7.2 INTERPRETACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO E HISTOMORFOMETRICO _____	138
7.3 TRASLACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES AL ENTORNO CLINICO _____	141
7.4 DEFINICION DE LAS UNIDADES DE MEDIDA CON EL TC _____	142
7.5 DIFICULTADES OBTENIDAS EN EL ESTUDIO DEL MATERIAL IMPLANTADO. _____	144
7.6 CALIDAD DE LAS IMÁGENES DEL MICROTCTC _____	145
7.7 VALIDACION DE LAS IMAGENES DEL TC _____	147
7.8 FUTURO PREDECIBLE. _____	148
8. CONCLUSIONES. _____	153
9. BIBLIOGRAFÍA _____	157

SIGLAS Y ABREVIATURAS

TC : tomografía computarizada.

HAp : hidroxiapatita.

MSC : células madre mesenquimales.

BMP : proteínas morfogenicas de hueso.

FBP . retroproyección filtrada.

RI: reconstrucción iterativa

MO: microscopio óptico.

MET : microscopio electrónico de transmisión.

MEB : microscopio electrónico de barrido.

ROI : (Return on Investment) la parte localizada de la imagen definida por el operador que tiene interés particular en un momento dado.

HE : hematoxilina-eosina.

MOD : matriz ósea desmineralizada

mTC : micro-Tomografía Computarizada

AP : anatomopatologicos

FBP (Filtered Back Projection) o programa de retroproyección filtrada

UH : unidades Hounsfield

A-S : Nurse's A phase-silicocarnotita

MOD : matriz ósea desmineralizada

RESUMEN

Las técnicas de imagen y particularmente la microtomografía computarizada (microTC) están contribuyendo a la investigación científica, no solo en el campo médico asistencial y experimental, sino en campos como la geología, la industria, la arquitectura y la historia del arte. La tomografía computarizada (TC) ofrece el mejor método radiográfico para el análisis morfológico y cualitativo de huesos y estructuras sólidas. La TC se basa en la medición del coeficiente de atenuación del haz de rayos X al atravesar cada sección o voxel del material a estudiar, obteniendo unos datos crudos (Raw Data) o datos sin procesar, que tras su procesamiento mediante programas de reconstrucción filtrada o iterativa se obtiene una imagen pixelada que puede ser interpretada por el especialista.

Se intenta, como hipótesis de trabajo, demostrar la utilidad del microTC en el estudio de la evolución biológica de un biomaterial implantado en la tuberosidad tibial anterior de 15 conejos como modelo preclínico. El biomaterial implantado, fosfato tricálcico sintetizado previamente ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) [TCP] y silicato dicálcico (Ca_2SiO_4) [C2S] se utilizaron como materias primas. El 60% de los andamios (dopados) sumergido en un gel de matriz ósea desmineralizada (gel de DBM) y el 40% restante de los gránulos no se trataron (no dopados). Los animales fueron asignados aleatoriamente en tres grupos ($n = 5$ cada uno) en correspondencia con tres períodos de estudio definidos (1, 3 y 5 meses), respectivamente. El objetivo del estudio es hacer un análisis comparativo de las imágenes del microTC con un análisis estadístico descriptivo y un análisis matemático de los datos brutos. Y todo ello con un posterior análisis histomorfométrico para dilucidar objetivamente el comportamiento osteogénico observado después de la siembra de andamios de biomateriales porosos en las tibias.

A las quince muestras obtenidas tras el sacrificio de los animales y a dos muestras de biomaterial sin implantar se les realizó estudio con microTC. Todas las imágenes fueron descritas previamente por dos radiólogos experimentados basados en un análisis visual doble ciego que se centró en los siguientes ítems: (1) pérdida de homogeneidad del material implantado con respecto al preimplantado; (2) pérdida de nitidez del contorno del implante en relación con el tejido periférico; (3) presencia de trabeculaciones óseas neoformadas dentro del biomaterial implantado; (4) dispersión de biomaterial en el tejido periférico; (5) trabeculaciones neoformadas entre la superficie del implante y el hueso cortical adyacente.

Para procesar matemáticamente los datos crudos obtenidos del microTC se seleccionaron tres regiones de interés (ROI): (1) ROI cilíndrico de 4x4 mm para evaluar

la reabsorción, degradación o integración del biomaterial implantado; (2) ROI cúbico de 10x10x10 mm que incluía el biomaterial y el tejido óseo adyacente y que permitía evaluar la dispersión experimentada por fragmentos de biomateriales dentro del hueso huésped periférico; (3) ROI cilíndrico de 3x3 mm localizado en la cortical alejada del injerto para determinar la evolución espontánea del hueso cortical inalterado, como medida de control y criterio de análisis. Este tratamiento matemático (análisis de regresión lineal y estudio de coordenadas cilíndricas) permite analizar la evolución temporal de los coeficientes de atenuación estandarizados en unidades Hounsfield (UH) de cada uno de los voxel estudiados del biomaterial y del hueso huésped.

Para el estudio histológico e histomorfométrico las muestras se seccionaron perpendicularmente al eje longitudinal de la tibia con una sierra circular eléctrica. Se fijaron trozos de 3-4 mm de espesor en formalina y posteriormente fueron descalcificadas. El análisis histológico e histomorfométrico se realizó en secciones teñidas con hematoxilina-eosina de 4 μm de grosor. Se calculó la superficie total del área implantada (TIS) y se analizaron 4 componentes identificables: (1) material implantado no absorbido, (2) tejido óseo neoformado, (3) tejido conectivo y (4) material harinoso y basófilo, ubicado entre los componentes 1 y 2, denominado 'material no identificable'.

Del análisis visual de las imágenes del microTC a los 1, 3 y 5 meses de la cirugía se observó una desintegración y desorganización progresiva de la morfología inicial del implante, más evidente y temprana en la periferia que en la porción central (desde un bloque cilíndrico compacto hasta una masa porosa y fragmentada), así como neoformación de tejido óseo. También se apreció una dispersión o fragmentación del andamio permitiendo la neoformación del hueso trabecular tanto dentro del material implantado como a su alrededor y en contacto con la cortical huésped. El análisis estadístico descriptivo de las imágenes de micro-TC no pudo distinguir las diferencias entre el comportamiento de los implantes dopados y los no dopados durante el período de estudio.

Solo el estudio matemático de los Data Raw pudo detectar diferencias significativas en los valores promedio de UH del andamio entre ambos tipos de materiales. Los andamios pre-implantados mostraron un coeficiente de atenuación promedio de 1.13 ± 0.18 HU, después de 3 meses de la cirugía, el coeficiente de atenuación disminuyó a valores promedio de 0.99 ± 0.23 HU (andamios dopados) y 0.86 ± 0.25 HU (andamios no dopados). Los coeficientes de atenuación a 5 meses alcanzaron valores mínimos de $0,86 \pm 0,32$ HU (andamios dopados) y $0,66 \pm 0,33$ HU (andamios no dopados). Como puede deducirse de estos resultados, los implantes dopados mostraron una disminución más gradual de los valores promedio de HU que

los implantes no dopados. También se demostró con el estudio de los Data Raw que existía una dispersión de los granos de cerámica y que no existieron cambios estadísticos significativos en el hueso cortical tibial normal.

Solo el análisis matemático de los Raw Data pudo detectar diferencias significativas en los valores promedio de HU de andamio en el estudio entre ambos tipos de materiales. Resultando una disminución más gradual de UH en los materiales que no dopados.

El presente estudio muestra la necesidad de combinar los estudios de imágenes radiológicas y el análisis matemático de los Raw Data para realizar un adecuado análisis in vivo del andamiaje óseo implantado y su evolución. Como los resultados obtenidos parecen ser similares a los anatomopatológicos, el análisis matemático de los datos brutos de TC permitiría llevar a cabo estudios in vivo de larga duración sin necesidad de sacrificio de animales.

PALABRAS CLAVE

Micro-CT

Datos crudos o Raw Data.

Demineralized bone matrix

Bone regeneration

Histomorfometria.

Silicato dicalcico

Fosfato tricalcico

ROI

ABSTRACT

Imaging techniques, specially computerized microtomography (mCT) are significantly contributing to biomedicine, not only in the field of healthcare and clinical research, but also in others such as geology, industry, architecture and even in art history. Computer Tomography (CT) offers the best radiographic method for morphological and qualitative analysis of bone and solid structures. This technique is based on the measurement of the x-ray attenuation coefficient through each section or voxel of tested material, and obtaining the so called raw. Then, these results are processed through reconstruction programmes, either filtered or iterative, to obtain a pixelated image that will be interpreted latter by the specialist.

The aim of the study is to determine the possible role of a global imaging analysis, which includes imaging descriptive analysis, mCT raw data mathematical analysis, and histomorphometrical analysis in order to objectively elucidate the osteogenic behaviour observed after seeding porous biomaterial scaffolds in tibias from New Zealand rabbits as preclinical model. Porous scaffolds were produced by partial sintering method. Briefly, previously synthesized tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) [TCP] and dicalcium silicate (Ca_2SiO_4) [C2S] were used as raw materials. 60% of scaffolds (labeled in the study as 'doped') were immersed in Demineralized Bone Matrix Gel (DBM-gel) and the remaining 40% of pellets were untreated (labeled as 'no doped').

Fifteen samples of treated animals and two samples of biomaterial were used in the study. Images were pre-described by two-experienced radiologist (A and B), based on a double blind visual analysis. In order to homogenize image description, the visual analysis was centered on the following items: (1) lost of homogeneity of implanted material with respect to the pre-implanted one; (2) lost of implant contour sharpness in relation to the peripheral tissue; (3) presence of neoformed bone trabeculations inside the implanted biomaterial; (4) dispersion of biomaterial in the peripheral tissue; (5) neoformed trabeculations between implant surface and adjacent cortical bone.

With respect with the selection and mathematical study of raw data, three regions of interest (ROIs) were selected by consensus, according to the following criteria: (1) implanted biomaterial (4x4 mm cylindrical ROI) to evaluate implant reabsorption, degradation or integration by bone tissue; (2) implanted biomaterial and peripheral corticomedullar bone (10x10x10 mm cubical ROI) to assess the dispersion undergone by biomaterial fragments within the peripheral host bone; and (3) surgically unaltered cortical bone distanced from the implanted area (3x3 mm cylindrical ROI) to determine the spontaneous evolution of unaltered cortical bone, as control

measurement and yardstick of analysis. This mathematical treatment make possible to analyze the time evolution of variability in voxel standardized attenuation coefficients (HU), as well as to quantify how much biomaterial had dispersed within the peripheral host bone.

Samples were cross-sectioned perpendicular to the longitudinal axis of tibia with an electric circular saw (Figure 4.a). Pieces of 3-4 mm thickness were fixed in formalin for 48h and then decalcified. Histological and histomorphometrical analysis was performed in hematoxylin-eosin stained sections of 4 μm thicknesses. Total implanted area surface (TIS) was calculated, and 4 identifiable components were analyzed: (1) Flourey and acidophilic material, identified as 'non-absorbed implanted material'; (2) 'neoformed bone tissue'; (3) 'connective tissue'; (4) flourey and basophilic material, located between components 1 and 2, named 'unidentifiable material'.

Del análisis visual de las imágenes del microTC a los 1, 3 y 5 meses de la cirugía se observó una desintegración y desorganización progresiva de la morfología inicial del implante, más evidente y temprana en la periferia que en la porción central (desde un bloque cilíndrico compacto hasta una masa porosa y fragmentada), así como neoformación de tejido óseo.

According to the final report, when 1, 3 and 5 months 3D mCT images were visually compared, a progressive disintegration and disorganization of initial implant morphology (from a compact cylindrical block to a fragmented and porous mass) as well as a neoformation of bone tissue were described. These findings were more noticeable and earlier detected at the periphery than at the central portion of implanted material. Consensual description analysis of mCT and 3D mCT images was not able to distinguish differences between the behaviour of doped and no-doped implants across the study period.

Only through mathematical analysis of the raw data, a significant difference in scaffold HU average values between both types of materials was observed. Pre-implanted scaffolds showed an average attenuation coefficient of 1.13 ± 0.18 HU, After 3 months after surgery, the attenuation coefficient decreased to average values of 0.99 ± 0.23 HU (doped scaffolds) and 0.86 ± 0.25 HU (no-doped scaffolds). 5 months attenuation coefficients reached minimum values of 0.86 ± 0.32 HU (dopped scaffolds) and 0.66 ± 0.33 HU (no-doped scaffolds). As can be deduced from this results, doped implants showed a more gradual decrease of average HU values than no-doped implants, resulting in significant differences ($p < 0.05$) between both groups average values.

The present study shows the necessity of combining both, radiological imaging studies and mathematical analysis of CT raw data to perform an adequate in-vivo analysis of implanted bone scaffold and its evolution after surgery. As the obtained results seems to be similar to the anatomopathological ones, mathematical analysis of CT raw data would allow to conduct long time duration in-vivo studies, without the need of animal sacrifice, and the subsequent reduction in variability.

KEYWORDS

Micro Computerized Tomography (mCT)

Raw Data (RD)

Demineralized Bone Matrix (DBM)

Bone regeneration

Histomorphometry

Dicalcium silicate

Tricalcium phosphate

Region Of Interest (ROI)

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es el principal componente del cuerpo humano, supone un depósito de calcio, fosfato y otros iones; es soporte de la musculatura y de otros tejidos, así como el alojamiento de la medula ósea hematopoyética, por lo que está en continuo proceso de renovación, es un tejido dinámico. Debido a su dureza y resistencia sirve de protección a los órganos vitales (cráneo, caja torácica, etc.). Los huesos presentan una cortical compacta y una medular con sus trabéculas óseas y revestidas de tejido hematopoyético y graso, y todo ello en continuo proceso de cambio. El periostio y endostio que envuelven la cortical está en continua actividad durante toda la vida del organismo (Figura 1) (Sachot *et al.*, 2014).

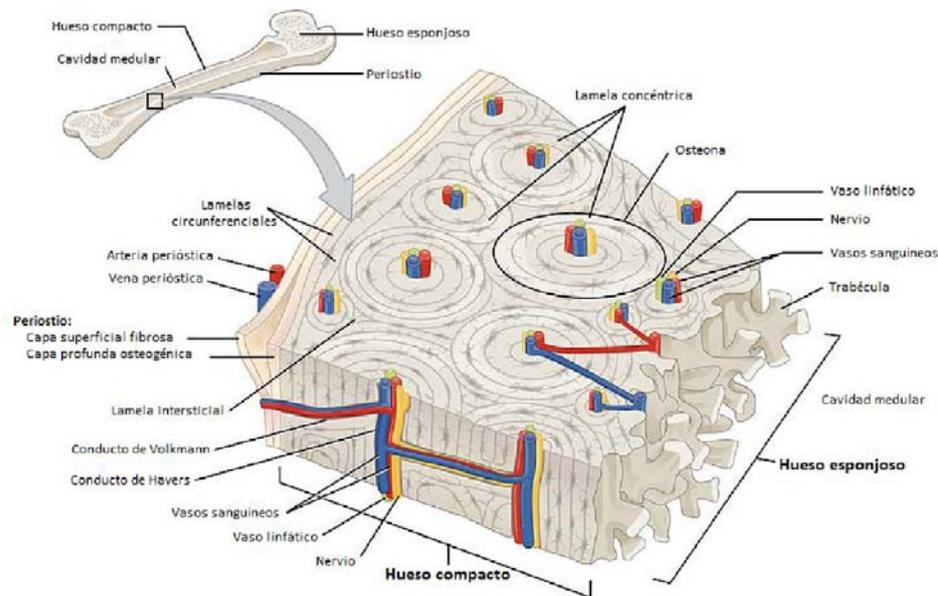


Figura 1: Esquema de la microestructura del hueso secundario o laminar. Ilustración extraída de Anatomy & Physiology. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

El hueso, por sí mismo, tiene un potencial considerable para la reparación y la regeneración en caso de defecto óseo. Un proceso clave en la osteogénesis es la vascularización, la cual se observa en la transición de preosteoblastos a osteoblastos durante el desarrollo y la curación de una fractura o defecto óseo espontáneo o provocado (Cao *et al.*, 2014). Ante una lesión, los osteoblastos rodeados de su matriz

mineralizada se convierten en osteocitos. Esta formación ósea temprana es menos organizada. El hueso compacto se forma por engrosamiento de las trabéculas hasta que desaparecen los espacios que rodean los vasos sanguíneos típicos del hueso esponjoso. Las fibras de colágeno se vuelven más ordenadas, finaliza el engrosamiento trabecular en el hueso esponjoso y el tejido conjuntivo se transforma en el periostio. Las fuerzas de tensión y deformación conducen a los osteoclastos a la remodelación y la formación de hueso maduro, identificado por la organización de los sistemas de Havers, que son las unidades funcionales del hueso. La formación de hueso maduro continúa con la síntesis de osteona cortical y los componentes de la médula ósea. Los osteoblastos superficiales se transforman en células de aspecto fibroblástico que persisten como elementos osteoprogenitores en reposo ubicados en el endostio o el periostio pudiéndose transformar de vuelta en osteoblastos si es necesario (Marsell y Einhorn, 2011; Percival *et al.*, 2013).

Un área de investigación profundamente activa en la actualidad, es la implantación de injertos óseos, naturales o biomateriales sintéticos, capaces de rellenar defectos óseos y conseguir una completa regeneración del tejido óseo (Guo *et al.*, 2012).

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinar, que requiere del apoyo de diferentes ramas de la ciencia como es la medicina, ingeniería de los materiales, bioquímica o biología molecular, además del estudio matemático de las imágenes obtenidas mediante anatomía patológica y Tomografía Computarizada (TC). Éste último, ocupa el objetivo principal del presente proyecto de investigación.

La primera definición de biomaterial se estableció en una Conferencia de la Sociedad Europea de Biomateriales en Chester (Reino Unido) en 1986, considerando como tal a aquel material no vivo usado como dispositivo médico y cuya finalidad es interactuar con un sistema biológico (Williams *et al.*, 1987). Esta definición se fue desarrollando con el paso del tiempo hasta llegar a una mucho más amplia, surgida del consenso de especialistas en 1991, también en Chester. Desde entonces se considera como biomaterial a *“cualquier material diseñado para actuar en concordancia con sistemas biológicos, con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo”* (Williams *et al.*, 1992). La definición más reciente de biomaterial es la proporcionada por Williams (2009): *“Un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada para, bien sola o bien como parte de un sistema complejo, ser usada en procedimientos diagnósticos o terapéuticos, en medicina humana o veterinaria, mediante el control de su interacción con componentes del organismo vivo”*.

Estos Biomateriales, entendidos como *“materiales diseñados para cumplir una función biológica específica cuando se implantan en un organismo vivo, sin producir rechazo en*

el huésped", constituyen en la actualidad, un campo muy relevante de investigación y desarrollo, a lo que contribuye la gran variedad de materiales empleados, sus innumerables usos, su gran interés económico, y lo más importante, su enorme incidencia social, a través de la mejora de la salud de la población.

En el caso de la bioingeniería ósea, los biomateriales pueden constituir una alternativa a la utilización de autoinjertos y aloinjertos, debiendo poseer propiedades mecánicas similares al hueso, además de no ir asociado a una respuesta inmunitaria en el momento de su integración en los medios biológicos. Estos biomateriales son capaces de mejorar la capacidad de regeneración del tejido óseo, así como de favorecer la formación de tejido nuevo cuando esta capacidad se ve afectada (por ejemplo, falta de vascularización, infecciones, inestabilidad mecánica, o pérdida de tejido) (Burg *et al.*, 2000; Bose *et al.*, 2012; Winkler *et al.*, 2018). Para todo ello, la eficiencia de un biomaterial que se considere sustituto óseo debe ser evaluado a través de los resultados preclínicos (*in-vitro* e *in-vivo*) y clínicos, a medio y largo plazo, con el fin de poder definir las indicaciones precisas para cada material (Bose *et al.*, 2012).

El sustituto óseo ideal debería ser biocompatible, osteogénico, bioabsorbible, capaz de proporcionar soporte estructural y de vehiculizar otras sustancias, fácilmente utilizable en clínica, así como con una adecuada proporción o relación coste-beneficio. Por otra parte, sería deseable que, en determinadas aplicaciones, una o varias de dichas características predominasen sobre otras en función de la necesidad del caso a tratar (Fremap, 2003; Bose *et al.*, 2012).

Los mecanismos de actuación de los materiales injertados sobre el tejido óseo se resumen en tres tipos: inducción, conducción e integración (Albrektsson y Johansson, 2001). Un modelo experimental válido para el estudio de la regeneración ósea se basa en la resección de un segmento óseo diafisario, suficiente para impedir la reparación espontánea natural. Este modelo, conocido como "*critical size defect*", fue descrito por Schmitz y Hollinger (2002), y lo definieron como "*la herida intraósea más pequeña que no se curaría mediante la formación natural del hueso durante la vida del individuo*". Mediante la aplicación de dicha técnica, es posible valorar la capacidad osteorregenerativa de los biomateriales que componen el implante. A lo largo de la historia se han utilizado diferentes elementos como material osteorregenerador de interposición. Así, la utilización de composiciones empleando cementos óseos, hidroxiapatita (HAp) y factores de crecimiento puede ser de gran valor experimental. Ante una pérdida ósea como consecuencia de un accidente de alta energía, una resección tumoral o una infección, hoy día se plantean diferentes posibilidades de reconstrucción (Winkler *et al.*, 2018). Cada técnica presenta sus ventajas e inconvenientes, así el uso de autoinjertos tiene un menor índice de rechazo y un mayor poder de incorporación; sin embargo,

tiene una escasez de procedencia donante y está penalizado por una morbilidad quirúrgica. El aloinjerto se puede obtener a través de bancos de tejidos, generalmente procedentes de donantes multiorgánicos en mayor cantidad, pero tiene el inconveniente de un mayor índice de rechazo e infección y una menor incorporación en el defecto o lecho receptor (Giannoudis *et al.*, 2005).

La biología de los injertos óseos, y por tanto de sus sustitutos, se puede estudiar a partir de la comprensión de los procesos que tienen lugar durante la formación del hueso y que en resumen corresponde a la ontogénesis, mineralización y reparación del tejido óseo. Para la regeneración ósea se precisa de la combinación de tres elementos fundamentales como son (Sipe, 2002):

1. Biomateriales o sistemas de andamiajes que proporcionen las condiciones óptimas para el crecimiento vascular y celular. Los fosfatos cálcicos en general y la Hap en particular, ya sean densos o porosos en forma de andamios como materiales de soporte deben, a la vez, impedir la entrada de tejidos blandos a la zona de regeneración ósea y debe absorberse lentamente mientras esta se produce, con una velocidad de biodegradación controlada que se ajuste a la de reparación del defecto óseo. Se ha demostrado que las partículas de Hap son poco bioreabsorbibles (Fernández, 2014), si bien hay otros fosfatos cálcicos cuya velocidad de bioreabsorción se acercan más a la velocidad de formación de hueso nuevo, estableciéndose un equilibrio a lo largo del tiempo, entre los procesos de neoformación ósea y reabsorción del material (creeping substitution). Estas estructuras tridimensionales porosas deben ser de fácil preparación, con una resistencia mecánica suficiente semejante al lugar del defecto a reparar y con propiedad osteoconductora que permitan ser colonizadas por el tejido óseo neoformado. El diseño de su superficie ha de permitir un comportamiento similar al de la matriz extracelular. Además, las propiedades de estos materiales pueden verse mejoradas mediante moléculas bioactivas que estimulen el proceso regenerativo.
2. Células madre mesenquimales (MSC) procedentes de la medula ósea, el periostio, los pericitos y las MSC circulantes.
3. Factores de crecimiento osteogénico o proteínas morfogénicas de hueso (BMP) y cartílago que contribuyen a la migración y diferenciación de células madre mesenquimales. Estas proteínas osteoinductoras requieren de un material portador que sirva como sistema de liberación o carrier y como andamio para el crecimiento celular (Dodde *et al.*, 2000; Lanza *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 1992). En la tabla 1 se han recopilado las BMP descritas en la actualidad.

Tabla 1. Familia de las Proteínas Morfógenas del Hueso (BMP).

BMP	Función principal descrita
BMP-2	Osteoinductiva, diferenciación osteoblástica, apoptosis
BMP-3	más abundante en hueso, inhibe osteogénesis
BMP-4	Osteoinductiva, desarrollo de pulmón y ojo
BMP-5	Condrogénesis
BMP-6	Diferenciación osteoblástica, condrogénesis
BMP-7	Osteoinductiva, desarrollo de riñón y ojo
BMP-8	Osteoinductiva
BMP-9	Sistema nervioso y reticuloendotelial hepático, hepatogénesis
BMP-10	Desarrollo cardíaco
BMP-11	Tejido neuronal y mesodérmico
BMP-12	Induce formación tejido tendón-iliaco
BMP-13	Induce formación tendón y ligamento
BMP-14	Condrogénesis, mejora reparación tendón y formación de hueso
BMP-15	Modifica la actividad de hormona folículo estimulante

Todos los implantes deben presentar tres características principales. Se dice que el sustituto óseo ideal debe tener tres propiedades para que se considere óptimo para influir de modo favorable en el proceso de regeneración ósea, debe ser ((Hench y Clark, 1970; Albrektsson y Johansson, 2001):

- 1.- **OSTEOGENICO:** formación y desarrollo de hueso. Esta característica la proporcionan los elementos celulares, tanto indiferenciados del mesénquima (células precursoras osteogénicas) como diferenciados (osteoblastos) incluidos en el injerto, que son capaces de sobrevivir al trasplante y sintetizar hueso nuevo en la zona receptora.
- 2.- **OSTEOINDUCTIVO:** estimulación de la osteogénesis o formación de hueso en áreas donde no se forma normalmente. Es el fenómeno por el que una sustancia de origen proteico es capaz de inducir el reclutamiento de células madre mesenquimales y la diferenciación de las mismas en osteoblastos encargados de la formación de tejido óseo.
- 3.- **OSTEOCONDUCTIVO:** capacidad de ciertos materiales de formar una matriz a través de la cual se puede depositar nuevo hueso. Es el proceso por el cual el tejido óseo neoformado crece de modo centrípeta desde la superficie del material y coloniza de modo progresivo el interior de este, comportándose como una estructura porosa en 3D pasiva que facilita este crecimiento. El mecanismo se basa en una infiltración centrípeta vascular, y más tarde celular, del material desde el tejido óseo adyacente (lecho receptor).

El termino osteogénesis hace referencia a la formación de hueso sin precisar su origen celular (Hench y Clark, 1970; Stevenson *et al.*, 1994; Ñíguez, 2016). Cuando se forma nuevo hueso sobre un injerto o en sus inmediaciones, su origen puede radicar en el propio injerto a partir de células que sobreviven al trasplante y son capaces de formar hueso (Bauer y Muschler, 2000; Cook y Rueger, 1996), o bien originarse a partir de células del lecho huésped (Shah, 2016).

La osteoinducción es el proceso de reclutamiento de células de tipo mesenquimal procedentes del lecho receptor, o trasplantadas al mismo, que se diferencian hacia células formadoras de cartílago o hueso. Este proceso esta mediado por la liberación de factores desde el injerto o desde el material implantado (Stevenson *et al.*, 1994; Cook y Rueger, 1996; Tomford, y Mankin, 1999; Bauer y Muschler, 2000; Gil-Albarova *et al.*, 2003; Guadilla, 2010 Shah, 2016). La osteoinducción de los injertos mineralizados se considera mínima, excepto en las células que sobreviven al trasplante y producen factores osteoinductores. Por el contrario, la capacidad osteoinductora de la matriz ósea desmineralizada es mucho más notable, y tanto más si procede de donantes jóvenes (Stevenson *et al.*, 1994; Cook y Rueger, 1996; López-López *et al.*, 2009). La matriz ósea contiene algunas proteínas morfogenéticas, factor transformador β del crecimiento, factores insulina de crecimiento tipo I y II, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos, factores de crecimientos derivados de plaquetas, interleucinas, factores estimuladores de colonias de granulocito, así como factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (Goldring y Goldring, 1996; Mundy, 1996; Gil-Albarova *et al.*, 2003). Todos ellos ejercen su influencia sobre el tejido inmaduro e inducen la transformación de células mesenquimales en células formadoras de hueso. Como requisito esencial, el proceso de osteoinducción necesita que el lecho receptor del injerto goce de un buen trofismo, a diferencia de la osteogénesis del injerto que puede darse con independencia de este (Stevenson *et al.*, 1994).

El termino osteoconducción hace referencia al proceso tridimensional de colonización y crecimiento de brotes capilares, tejido fibrovascular y células osteoprogenitoras desde el lecho receptor, utilizando a su vez el injerto a modo de un andamio para la formación de nuevo hueso (Stevenson *et al.*, 1994; Cook y Rueger, 1996; Cornell, 1999; Tomford, y Mankin, 1999; Bauer y Muschler, 2000; Gil-Albarova *et al.*, 2003; Guadilla, 2010). En el caso de injertos de hueso esponjoso, la osteoconducción puede acompañarse del proceso de formación activa de hueso, o bien ocurrir de forma pasiva, sin la participación del injerto, en el caso de hueso cortical (Stevenson *et al.*, 1994). El proceso de osteoconducción sigue un patrón espacial, que viene determinado por: la estructura del implante o injerto sobre el que ocurre, el aporte vascular de los

tejidos circundantes, el comportamiento mecánico del implante o injerto, y de las estructuras que lo envuelven (Stevenson *et al.*, 1994; Bauer y Muschler, 2000; Gil-Albarova *et al.*, 2003).

El tipo de hueso utilizado para realizar el defecto óseo puede tener un origen mesenquimal, como es el caso de la bóveda craneal (An *et al.*, 2012; Gomes, 2012; Nappe y Baltodano, 2013) o la mandíbula, o de origen endocranal como ocurre con el fémur (Soffer *et al.*, 2006), la tibia (Calvo-Guirado, *et al.*, 2012), el humero, el cúbito y el radio. De todos ellos, la cara interna de la tibia ha demostrado ser un modelo reproducible y fiable para la medición cualitativa (radiológica e histológica) y cuantitativa (microTC e histomorfométricas) de la osteointegración de biomateriales, siempre que se lleve cabo de una forma estandarizada (Manzanares, 2014).

En cuanto a los biomateriales a implantar ha quedado demostrado la influencia del silicio en el crecimiento del hueso (Jugdaohsingh *et al.*, 2007). La adicción de silicato a los fosfatos de calcio promueve la osteogénesis y mejora el comportamiento del material *in vivo* (An *et al.*, 2012). Por otro lado, los ensayos realizados por Hench y col en la década de los 70, han permitido afirmar que aquellos biomateriales con contenido en CaO y SiO₂ muestran un importante nivel de bioactividad y poseen la capacidad de adherirse tanto al hueso como a tejidos blandos, al mismo tiempo que promueve el proceso de osteogénesis y mejora el comportamiento del material *in vivo*. En la actualidad, los materiales, biocompatibles y osteoinductores, más usados en la fabricación de implantes osteoarticulares o de relleno de cavidades resultantes de lesiones en el hueso, son metales y cerámicas de elevada dureza. La HAp densa sintética es un biomaterial de implante duro que ha sido empleado sistemáticamente por ser muy similar al constituyente inorgánico del hueso (LeGeros, 2002). Los biomateriales metálicos como el titanio y sus aleaciones, se utilizan en aquellas aplicaciones clínicas que requieren soportar carga, por sus elevadas propiedades mecánicas y por su resistencia a la corrosión en el organismo humano (Giavaresia *et al.*, 2004) dado que se utilizan siempre pasivados.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 TÉCNICAS DE IMAGEN.

2.1.1 TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

Las primeras aproximaciones a la TC pueden ligarse al procedimiento de tomosíntesis analógica, que existe desde 1920 (Gehrke y Wirth, 2005; Levakhina, 2013). Sus raíces se encuentran en el descubrimiento de los rayos-X en 1895, por Wilhelm Conrad Röntgen, quien logró obtener la primera visión de la composición interna de un objeto. En 1917, Radón describió de forma matemática la reconstrucción de un objeto desde sus proyecciones. A partir de dichos eventos, la exploración mediante TC se ha convertido en uno de los métodos de diagnóstico por imagen más utilizado (Lewitt *et al.*, 2003; Buzug, 2007).

La TC no solo se usa en la medicina asistencial y experimental, tomando especial importancia el uso de equipos de Micro-TC, sino en campos como la geología, la arquitectura, la historia del arte, etc. donde permite llevar a cabo el estudio de momias egipcias, cuadros, retablos, etc. así como estudios de ingeniería eléctrica y de materiales. En los últimos años, se han desarrollado trabajos de investigación que se enfocan en incluir la técnica de TC en ciencia de los materiales, geología e industria (Hench y Clark, 1970; Mayo *et al.*, 2002; Cong, W. y Wang, G., 2011; Cho, 2012; Cragolini, 2012).

La figura 2 muestra tres ejemplos de tomografía computarizada: A) una imagen cardíaca (Chong, J. y Essue, J., 2008) la reconstrucción de los poros de un trozo de granito (Lima, 2009) y C) el modelo tridimensional obtenido del escaneo de un microchip. Estas imágenes corresponden a resultados de investigaciones en medicina, geología e industria, respectivamente.

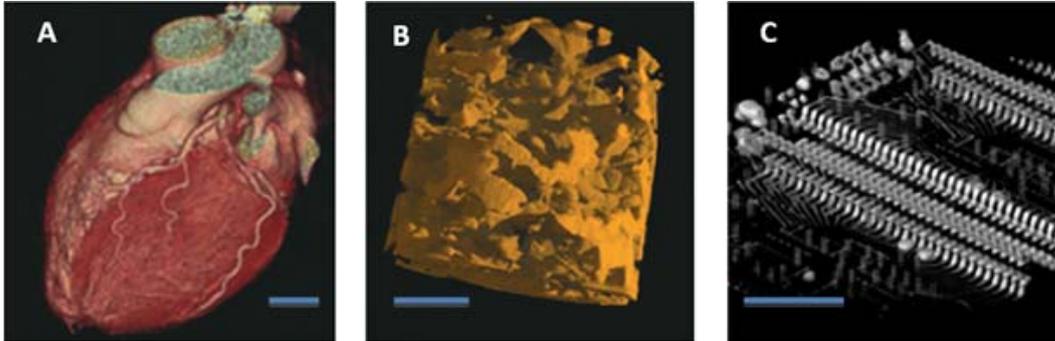


Figura 2. Modelo tridimensional de tomografía. (Seminario sobre TC de la Universidad de Gante UGCT, 2015). A: imagen de TC cardiaco; B: imagen de los poros de un núcleo de granito, y C: imagen de un microchip. (Magnificación: Barra 1 mm)

El método tradicional de TC, conocido como TC de transmisión (*transmission CT*), se basa en la obtención de la atenuación de los rayos al traspasar un objeto (Zaragoza, 1992; Stewart, 1993; González, 1996; Bushong, 1998; Hofer, 2001; Iturbe, 2001; UGCT, 2015). En la figura 3 se puede observar un esquema de su funcionamiento, El tubo de rayos X emite un haz que atraviesa el material a estudio sufriendo un proceso de ABSORCIÓN que impresiona unos detectores y que después de ser procesados nos permitirán obtener una imagen (pixel) de la unidad de volumen (voxel) del material estudiado.

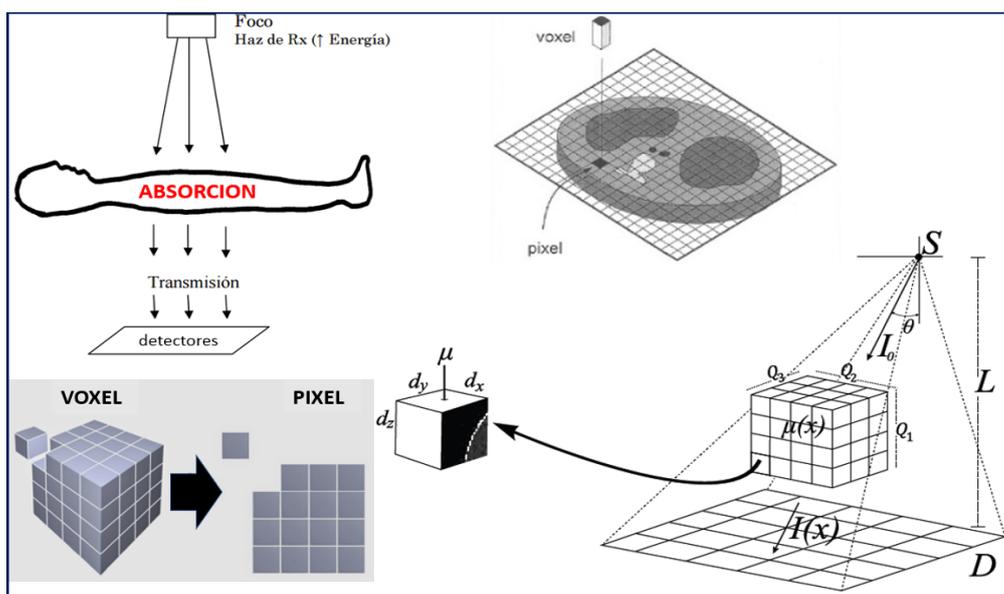


Figura 3. Esquema de escaneo de CT de transmisión.

El haz de rayos X al atravesar el objeto que se estudia sufre un proceso de absorción, que va a depender del: número atómico de la sustancia y que corresponde al número de protones o electrones de los átomos que forman esa sustancia; del espesor del objeto a estudiar y que ha de recorrer la radiación para atravesarlo, y de la densidad del objeto o peso de la sustancia por unidad de volumen. En la práctica, la absorción y la atenuación son conceptos idénticos a la hora de interpretar la densidad de la imagen radiológica en TC. El objeto a estudio se descompone en voxeles, de los que se obtienen unos datos llamados datos crudos o DATARAW. Todos los datos de los voxeles van a ser procesados matemáticamente, según las diferentes leyes de reconstrucción matemática (retroproyección filtrada, iterativa, etc.), para poder presentarnos imágenes pixeladas del objeto que se ha estudiado con el TC o micro TC. Estas imágenes son las que se consideran resultado final del estudio con TC, pero, ya introducimos el concepto de que provienen de unos datos crudos o DATARAW, que son el origen de toda la imagen, porque es el resultado inicial del proceso físico del TC (Hatcher, 2010).

Para obtener una imagen a partir de los datos recogidos en un equipo de TC, es necesario hacer uso de un programa de reconstrucción basado en un determinado algoritmo (Herman, 2009). La calidad de las imágenes obtenidas depende en gran medida del tipo de algoritmo empleado. Por otro lado, el tiempo que tardan estos programas en reconstruir una imagen también viene dado por el método empleado. Los algoritmos de reconstrucción de imagen principales existentes se pueden clasificar en dos grandes grupos según muestra la figura 4: Métodos directos de Fourier, analíticos (FBP o retroproyección filtrada); y los métodos iterativos, estadísticos. Estos últimos producen resultados superiores en comparación con los métodos de retroproyección filtrada reduciendo los artefactos y el ruido (mejor relación señal-ruido) (Natterer y Wübbelin, 2001). Existen, por tanto, métodos analíticos e iterativos para realizar esta tarea. Los métodos analíticos comprenden herramientas matemáticas propias del análisis de Fourier como el teorema de proyecciones y la convolución; entre estos se encuentran la retroproyección y la retroproyección filtrada (FBP). Los métodos iterativos incluyen el método algebraico y los métodos estadísticos (Thorsten, 2010) (Figura 5).

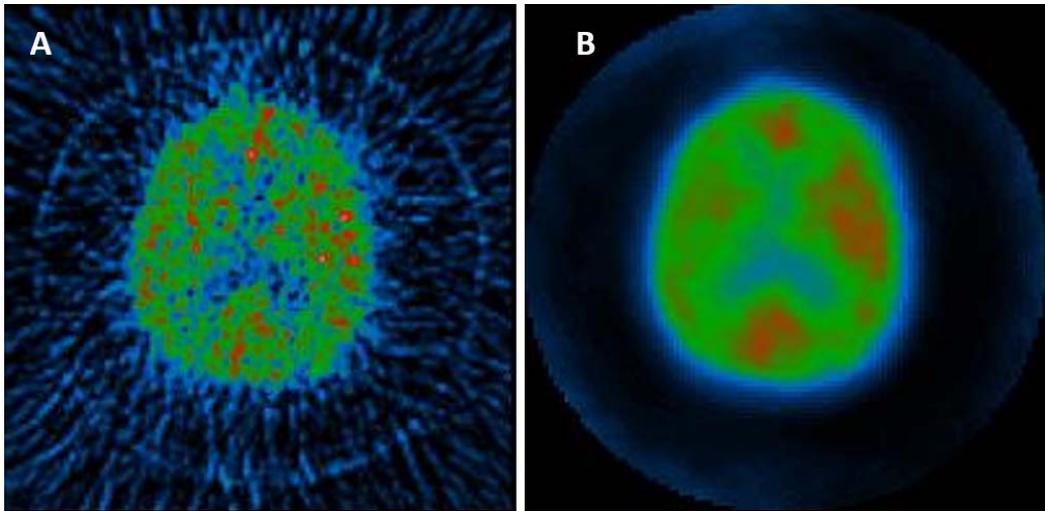


Figura 4. (A) Métodos directos de Fourier, analíticos (retroproyección filtrada, FBP) y (B) métodos iterativos, estadísticos (OSEM, ISRA, WLS)

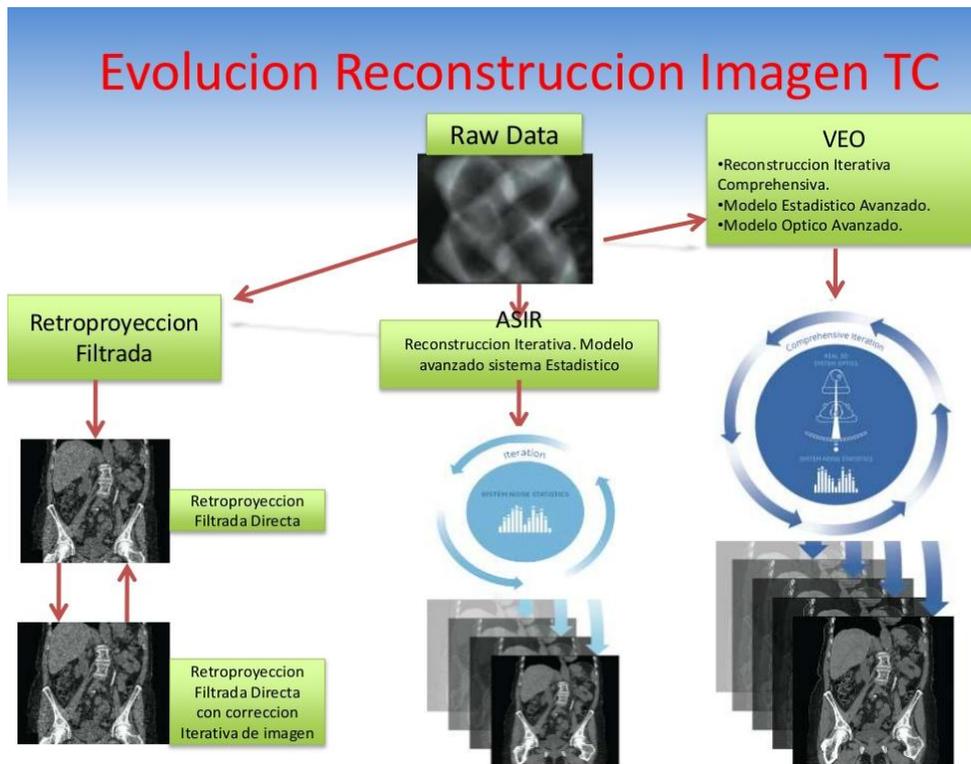


Figura 5. Esquema evolutivo de la reconstrucción de la imagen en TC.

Las técnicas de reconstrucción iterativa reciben diferentes nombres según las casas comerciales, tal y como se especifica en la tabla 2.

Tabla 2: Denominación del Sistema iterativo de reconstrucción según las diferentes casas comerciales.

IRIS	Iterative Reconstruction in Image Space (Siemens Medical Solutions)
AIDR 3D	Adaptative Iterative Dose Reduction (Toshiba Medical System)
ASIR	Adaptative Statistical Iterative Reconstruction (GE Healthcare)
iDose4	Philips Healthcare
SAFIRE	Sinogram Affirmed Iterative Reconstruction (Siemens Medical Solutions)
MBIR	Model-Based Iterative Reconstruction (GE Healthcare)

El deterioro de la calidad de imagen después de un número determinado de iteraciones, es un fenómeno bien conocido en la reconstrucción iterativa, siendo el segundo punto principal que resolver durante la implementación y aplicación de estos métodos. La regularización Bayesiana o las aproximaciones con post filtrados se están convirtiendo hoy en día, en los métodos de elección para controlar el ruido en las imágenes reconstruidas. La visión bayesiana es la elección a priori de la función aproximadora (Alenius y Ruotsalainen, 1997).

En estudios recientes realizados en el Servicio de Radiodiagnóstico y Radio física del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, se ha demostrado que se puede reducir la dosis en un 45%, aumentando el ruido y manteniendo la capacidad diagnóstica (Parrilla, 2016), tal como aparece en la figura 6.

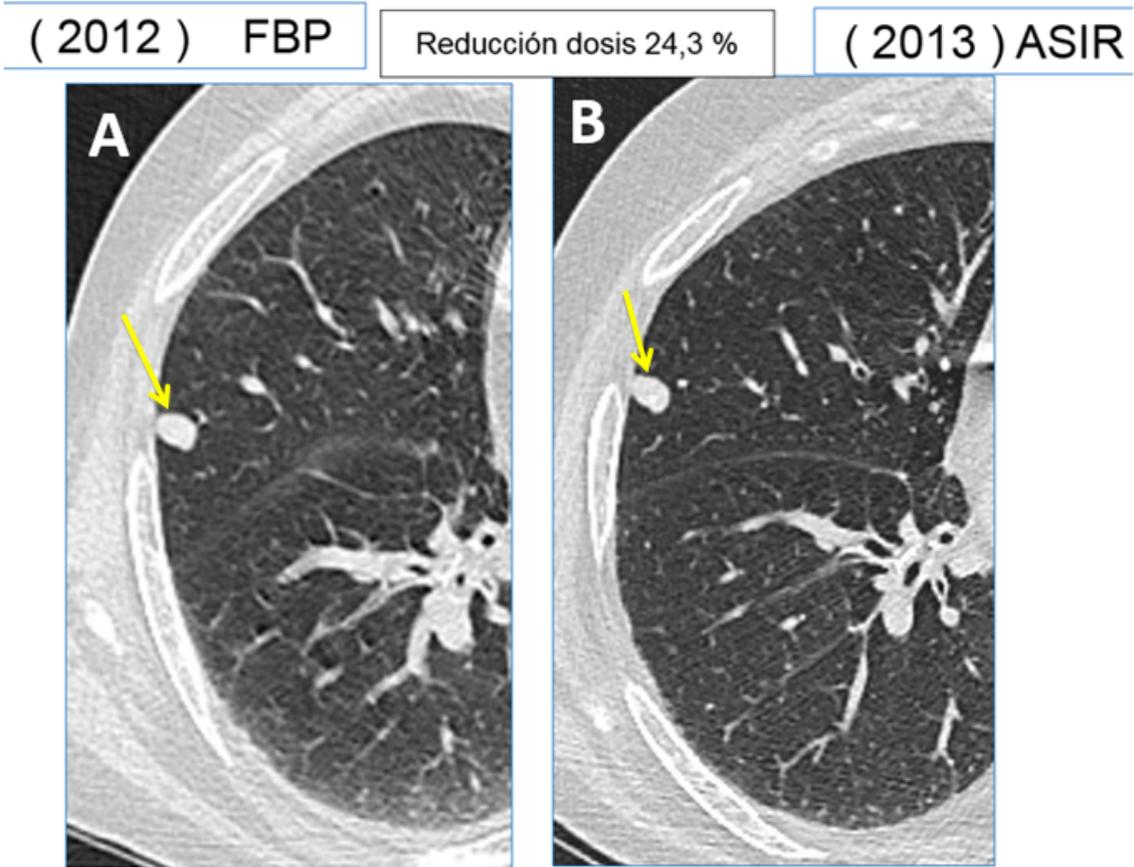


Figura 6. Imagen de CT con distinto protocolo de reconstrucción (FBP en A y reconstrucción iterativa en B). Se demuestra como disminuyendo la radiación aumenta la relación señal/ruido pero se conserva la capacidad diagnóstica del detalle anatómico de la imagen (nódulo pulmonar subpleural, flechas amarillas).

Hasta la fecha son numerosos los estudios en los que han valorado la remodelación ósea de un biomaterial implantado de una manera visual, es decir, a través de las imágenes obtenidas del estudio con Radiografía simple, mamografía de alta resolución y micro TC (Feldkamp *et al.*, 1989; Hildebrand y Ruesegger, 1997; Atwood *et al.*, 2004; Ho y Hutmacher, 2006; Ding *et al.*, 2008; Thorsten, 2010; Mate-Sánchez *et al.*, 2012; Calvo-Guirado *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014). La revisión bibliográfica efectuada pone de manifiesto que se han hecho múltiples intentos de estudio *in-vivo*, en animales de experimentación, de implantes de biomateriales en defectos óseos provocados, mediante microTC. Para el estudio de la evolución de la pieza ósea y del biomaterial, se han empleado diversos aparatos de TC junto a diversas técnicas de procesado, obteniendo imágenes en secciones axiales y en 3D. Un ejemplo

es el del estudio publicado por Quiang *et al.*, (2011), que emplea el Synchrotron para el estudio tridimensional de implantes en tibia de conejo. Synchrotron permite obtener imágenes de alta definición, tal y como se aprecian en la figura 7.

Sin embargo, no se han encontrado antecedentes bibliográficos del estudio matemático de los datos crudos o DATARAW del TC enfocados a la valoración de su utilidad en capacidad diagnóstica predictiva y sobre todo, objetiva, ya que procede de un análisis matemático. El estudio anatomopatológico correlacionado con dicho análisis matemático, permitiría validar este método de estudio matemático-radiológico, Este es el motivo principal que ha impulsado la realización del presente trabajo.

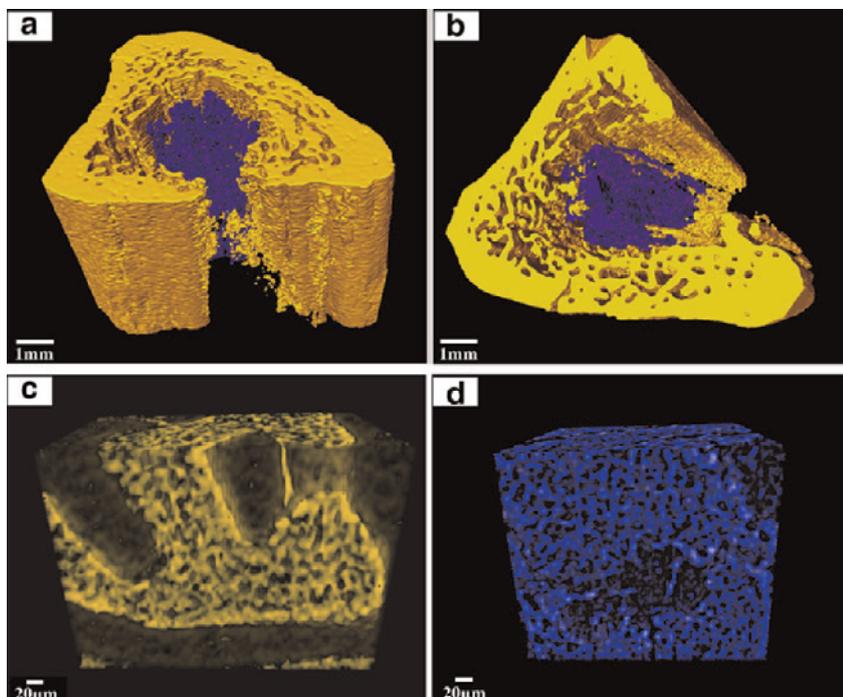


Figura 7. (a) Reconstrucción 3D de defecto de tibia con implante de vidrio cargada con teicoplanina; (b) Sección transversal de la misma tibia; (c) Imagen de alta resolución del hueso trabecular; (d) Imagen de alta resolución del injerto de vidrio convertido. Área amarilla, hueso; área azul, injerto de vidrio. Disponible en www.liebertonline.com/tea

En el presente trabajo, se ha empleado un microTC con técnica convencional para obtener un estudio de imagen del tejido implantado biomaterial y del tejido óseo. Puede ser menos sofisticado pero se aproxima mucho más a la aplicación clínica del estudio de los implantes, siendo el objetivo a perseguir el poder pasar de la fase clínica experimental animal a la fase asistencial de la clínica diaria con la única diferencia de

pasar de un microTC con espesor de corte en micras a un CT convencional clínico con espesor de corte en milímetros. Las imágenes que se obtienen se pueden apreciar en la figura 8, siendo comparables a las obtenidas con el Synchrotron.

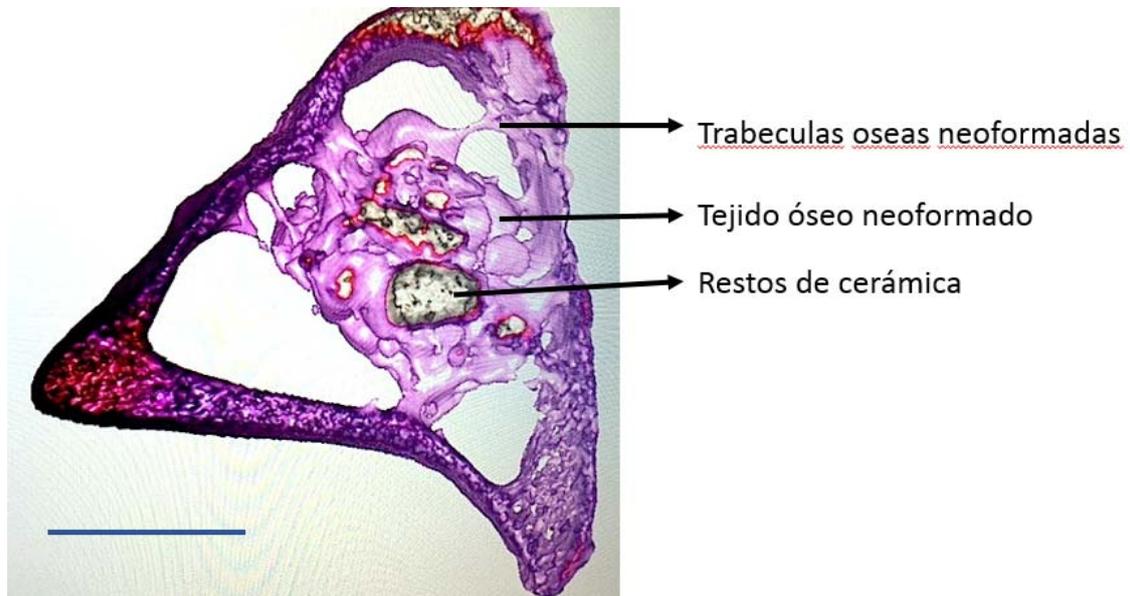


Figura 8: Imagen 3D con microTC experimental utilizado en este trabajo. (Barra: 3 mm)

2.1.2 TÉCNICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

Los estudios histológicos de hueso, habitualmente se realizan mediante la observación de secciones finas de tejido por Microscopía Óptica (MO) o Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (Coathup *et al.*, 1999; Huang, 2005; Porter, 2005). La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) brinda imágenes superiores a las del microscopio óptico por su mejor resolución y mayor profundidad de foco y constituye una buena alternativa cuando se dificulta la técnica preparativa para MET.

Con técnicas histológicas, se pueden diferenciar los diversos linajes celulares que aparecen en el tejido óseo, pudiéndose observar los osteoclastos asociados a las zonas de reabsorción (trabéculas u osteonas en fase de reabsorción), osteoblastos asociadas al

osteoide o en fase quiescente (células de revestimiento), osteocitos y su relación con el sistema canalicular y otros fenotipos celulares (fibroblastos y condroblastos principalmente) (Weinans, 1992; Weinans, 1993).

En el caso del estudio clínico y experimental del desarrollo, remodelado y reparación del tejido óseo, la histomorfometría es una técnica ampliamente utilizada (Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2002). La nomenclatura y abreviaturas en histomorfometría ósea se realizan siguiendo las recomendaciones de la American Society for Bone and Mineral Research (1987). Los estudios histomorfométricos tridimensionales se basan en la estereología, aunque hay que considerar que la mayoría de las fórmulas estereológicas que se aplican al hueso, requieren que la estructura tenga una distribución isotrópica, es decir que exista una disposición homogénea de los elementos que componen la muestra (Van Rietbergen *et al.*, 1993). Esta disposición isotrópica ha sido aceptada con un mínimo error para las biopsias obtenidas de la cresta iliaca, pero no está totalmente aceptada para cualquier tipo de hueso, considerando el carácter general anisotrópico del tejido óseo (Van Rietbergen *et al.*, 1995). Para lograr datos tridimensionales más precisos de una estructura isotrópica se aplica el principio de Cavalieri por el cual se obtiene el volumen total de una estructura a partir de cortes paralelos seriados. Una vez que se conoce el volumen total se puede saber la fracción del mismo que corresponde con cada corte. Este procedimiento requiere un tamaño muestral adecuado que va a depender de la estructura biológica a estudiar, y una recogida de las muestras de estudio de manera sistémica o al azar. La recogida de datos tridimensionales de una estructura anisotrópica obliga también a un tamaño muestral adecuado y a la realización de cortes en diferentes orientaciones (no seriados paralelos) (Van Rietbergen *et al.*, 1999).

2.2 HUESO

2.2.1 Características

El hueso es un tejido especializado, cuya composición, organización y dinámica le permiten aportar una función mecánica de sostén y participar en la homeostasis mineral. Está formado por una matriz mineralizada que incluye distintos tipos celulares, lo que le confiere una gran dureza y resistencia. Las fuerzas que actúan sobre el tejido óseo modifican permanentemente su forma, de tal manera que la presión

condiciona su reabsorción y la tensión da lugar a la neoformación ósea (Sachot *et al.*, 2014). El hueso posee una resistencia a la tensión similar a la del hierro, pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible (Whalen *et al.*, 1988). Además, sirve de suministrador de calcio, fósforo y otros iones. La fase inorgánica o mineral representa entre un 60 y un 70% en peso del tejido óseo; contiene además entre un 5 y un 8% de agua y el resto está constituido por la matriz orgánica compuesta en un 90% por colágeno y un 5-8% por otras proteínas (Matthew y Frame, 1998). Hay distintos tipos de tejidos óseos, dependiendo de la madurez del hueso y de su estructura macroscópica. Los huesos del esqueleto presentan formas y tamaños diferentes, pero su estructura macroscópica es común, presentando dos partes diferenciadas (Figura 8).

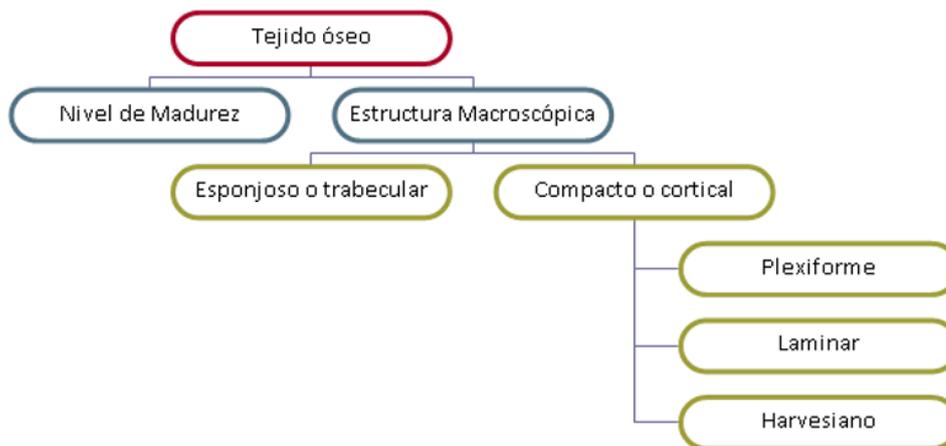


Figura 8. Esquema de distintos tipos de tejido óseo.

Según la estructura macroscópica del hueso se puede hablar de (Fernández-Villán *et al.*, 2015):

- **Hueso compacto (cortical)**, aparece en la zona más externa (80% del volumen total de hueso, forma una capa densa protectora alrededor de todos los huesos. Está formado por una serie de capas cilíndricas superpuestas. Los vasos sanguíneos y nervios lo atraviesan a través de los canales Harvesianos, rodeados por lamelas donde se encuentran los osteocitos que están embebidos en la matriz ósea mineralizada.
- **Hueso trabecular (esponjoso)**, se sitúa debajo de la capa compacta y tiene forma de malla con una porosidad interconectada de entre un 50 y un 90% (20% del volumen total de hueso) (De Aza *et al.*, 2001). En su interior se alberga la

cavidad medular central. Los huesos largos (por ejemplo, el fémur) tienen una diáfisis (caña) y una epífisis (cabeza) unidas por la zona de crecimiento del hueso o metáfisis.

Según el grado de madurez, el tejido óseo se clasifica en:

- **Hueso Fibrilar**, está considerado como un hueso inmaduro o primitivo y normalmente se encuentra en los embriones y recién nacidos.
- **Hueso laminar**, se comienza a formar un mes después del nacimiento y las fibras de colágeno están organizadas y orientadas, confiriéndole propiedades anisotrópicas; su comportamiento mecánico depende de la orientación de las fuerzas aplicadas, teniendo la mayor resistencia en dirección paralela al eje longitudinal de las fibras de colágeno.

Las propiedades físicas y fisicoquímicas de las sustancias orgánicas e inorgánicas que forman el hueso juegan un papel considerable en su funcionamiento (Rho *et al.*, 1998). En la Tabla 3 se recogen algunas de las principales propiedades mecánicas de los huesos.

Tabla 3. Propiedades mecánicas del hueso

	Longitudinal	Transversal
Resistencia a la tracción (MPa)	78 - 151	51 - 56
Resistencia a compresión (MPa)	131 - 224	106 - 133
Módulo de Young (GPa)	17 - 20	6 - 13
Resistencia a cizalladura (MPa)		53 - 70
Módulo a cizalladura (GPa)		3.3

En base a ello, se puede deducir que, un material candidato para el reemplazo de hueso debe ser: resistente a la corrosión en el ambiente fisiológico, biocompatible, bioadherente (crecimiento de hueso en contacto), biofuncional (propiedades mecánicas adecuadas, especialmente, resistencia a fatiga y módulo de Young cercano al del hueso), conformable y disponible (Kusakabe *et al.*, 2004). Es indispensable además, una interacción positiva o, al menos, que no sea nociva para el tejido circundante y, por tanto, para el resto del organismo, permitiendo de esta manera que el material sea biocompatible.

2.3 BIOMATERIALES

Los biomateriales utilizados en biomedicina, debido a su gran variedad en cuanto a composición y estructura permiten ser aplicados como sustitutos en un gran parte del cuerpo humano tanto de tejido blando como en tejido duro, como por ejemplo, válvulas cardíacas, articulaciones dañadas, lentes oculares, implantes dentales, fabricación de aparatos y dispositivos médicos, e incluso, transporte de células y liberación de fármacos o proteínas activas (Wnek y Bowlin, 2008). Es posible que en el futuro, se ensanche aún más su campo con la nanotecnología y la fabricación de "biochips" (Sahoo *et al.*, 2007). Pero el éxito final de cualquiera de estas aplicaciones depende de la interacción entre los sistemas biológicos receptores y los materiales sintéticos, semisintéticos o naturales empleados.

Lógicamente existen fenómenos interactivos entre el biomaterial y el tejido receptor del implante (Morais *et al.*, 2010), así por ejemplo tiene lugar reacciones inflamatorias en sus diversas modalidades. Las modificaciones del proceso reparador local, la susceptibilidad aumentada a la infección y la eventual aparición de tumores. Así mismo existen fenómenos de carcinogenesis, la sensibilización y alergia a ciertas alteraciones metabólicas. En todas se entrelazan las acciones del tejido sobre el implante y las del implante sobre el tejido, estando implicados mecanismos biológicos como la degradación enzimática y la respuesta celular, la absorción de sustancias, la presencia de calcificaciones y físicos como el desgaste y la particulación, la fatiga, la corrosión y la transmisión de los esfuerzos mecánicos en el rango adecuado de magnitudes.

La serie de acontecimientos que sobrevienen tras la interrupción de la continuidad tisular en el procedimiento operatorio correspondiente son: la agresión quirúrgica, la respuesta inflamatoria aguda local, la fase de inflamación crónica con reacción a cuerpo extraño y la encapsulación fibrosa (Anderson *et al.*, 1988). Apenas transcurrido un segundo después de la introducción de un biomaterial, es posible detectar la presencia de proteínas absorbidas en su superficie. Algunos minutos después se ha formado una monocapa que lo recubre casi totalmente, solamente las proteínas solubles presentes en el plasma y el exudado peritoneal presentan una tendencia a depositarse sobre las superficies formando un denso conglomerado. Las proteínas insolubles como la colágena pueden superponerse en partículas al material implantado por la actividad sintética de las células que más tarde se adherirán gracias al anclaje propiciado por esta primera capa proteica (Tabata *et al.*, 2017).

2.3.1 CLASIFICACION DE BIOMATERIALES.

En la naturaleza existen numerosos biomateriales que se pueden utilizar para sustitución de tejidos. Suelen estar compuestos tanto de fases orgánicas como inorgánicas, adoptando formas organizadas y estructuras de diversos aspectos. Los materiales son sustancias puras o combinaciones de éstas, clasificadas en función de su origen en naturales o biológicos y sintéticos o artificiales (Figura 9). Constituyen un conjunto o parte de un sistema y pueden aumentar o reemplazar a algún tejido, órgano o función del organismo (Davies, 2007). Los biomateriales deben cumplir con las condiciones de partida de ser biocompatibles, bioreabsorbible, osteoconductores (Guo *et al.*, 2012), osteoinductores, estructuralmente similar al hueso, fácil de usar y coste-efectivo. A su vez, tienen que aportar las prestaciones específicas que requiera la aplicación a que vayan destinados. Cumpliendo esos parámetros se han comercializado una gran cantidad de productos disponibles para sus distintas aplicaciones en el campo de la cirugía ortopédica, neurocirugía, y cirugía oral y maxilofacial (Parida *et al.*, 2012).

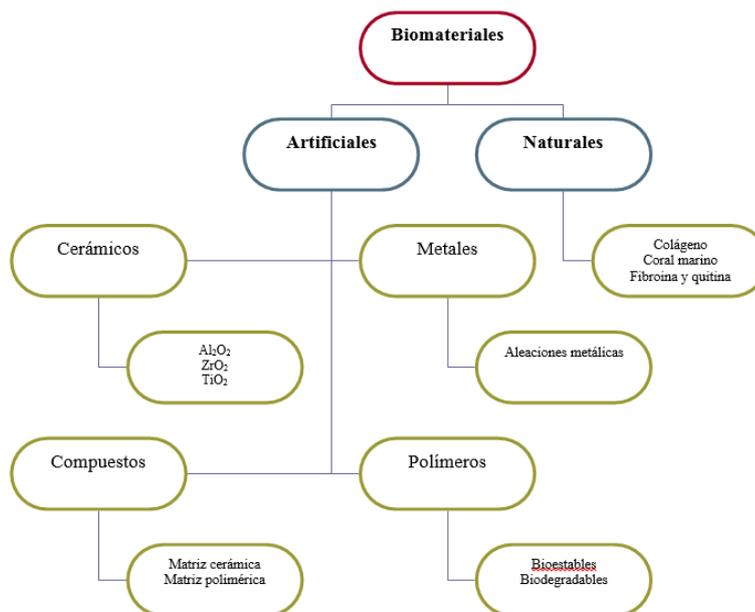


Figura 9. Clasificación de los biomateriales en función de su naturaleza.

Los biomateriales también se pueden clasificar según la reacción que provocan en el tejido con el que están en contacto. En la Tabla 4 se resumen los distintos tipos de respuestas:

Tabla 4: Tipo de respuesta del tejido al implante.

Tipo de material implantado	Respuesta
Material tóxico	El tejido circundante se muere
Material no-tóxico y biologicamente inactivo (casi inerte)	Formación de un tejido fibroso de espesor variable alrededor del implante
Material no-tóxico y biológicamente activo (bioactivo)	Formación de un enlace interfacial tejido-implante
Material no-tóxico y se disuelve (reabsorbible)	El tejido circundante reemplaza al implante progresivamente

2.3.2 MATERIALES CERAMICOS: BIOCERAMICAS.

Las cerámicas con aplicaciones médicas tienen un interesante campo de investigación y desarrollo en la obtención de biomateriales para la fabricación y/o fijación de implantes. Los materiales cerámicos que se utilizan en cirugía reconstructiva se pueden clasificar en dos grandes grupos: **bioinertes** y **bioactivos**.

Las cerámicas **bioinertes** tienen una influencia nula o muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean, y sus principales representantes son la alumina (alfa- Al_2O_3) y la circonita (ZrO_2). Las cerámicas **bioactivas** pueden interactuar con los tejidos óseos vivos. Ciertas composiciones de cerámicas, vidrios (Williams *et al.*, 1987) y vitrocerámicas poseen esta propiedad, como por ejemplo los fosfatos cálcicos entre los que cabe destacar la HAp y el fosfato tricálcico la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico ensayados tanto en forma densa como porosa.

Las biocerámicas de fosfato cálcico podrían ser biomateriales ideales, ya que poseen una buena biocompatibilidad y oseointegración y a su vez son los materiales más parecidos al componente mineral del hueso. Sin embargo, en la actualidad la utilización de cerámicas para aplicaciones que deban soportar cargas todavía está lejos, y la razón principal es que son rígidas y quebradizas, características nada favorables para fabricar huesos.

El campo de los materiales cerámicos abarca a sólidos cristalinos y amorfos, que a su vez pueden poseer carácter inerte, bioactivo o reabsorbible. El fenómeno de la

bioactividad es un ejemplo más de la reactividad química del material cerámico con el entorno en el que se encuentra (en ensayos *in vitro*, la solución elegida, y en ensayos *in vivo*, los fluidos fisiológicos). Como cualquier especie, las cerámicas reaccionan químicamente con su entorno. Las primeras cerámicas que fueron utilizadas en aplicaciones médicas, la alúmina y la zircona son dos prototipos de cerámicas conocidas como inertes, razón fundamental por lo que fueron elegidas para su utilización en implantes. A estas cerámicas las caracteriza una cinética de reacción muy lenta, tanto que puede considerárselas como cerámicas “casi inertes”. Pero naturalmente otras cerámicas tienen cinéticas de reacción más rápida, e incluso muy rápidas. Este es el caso de las cerámicas bioactivas, que, en contacto con los fluidos fisiológicos, reaccionan químicamente para producir el componente inorgánico mineral de hueso (carboxiapatita) que es incorporado a la vida biológica del organismo formando finalmente hueso neoformado. Son muchos los factores (químicos, bioquímicos, biológicos...) que inciden en la reactividad del implante en el organismo y que de forma importante contribuyen en la cinética de reacción (Chan y Mooney, 2008).

La utilización de cerámicas de fosfatos cálcicos para la (Guo *et al.*, 2012) reconstrucción ósea se basa en su semejanza estructural con la fase mineral del hueso. A pesar de la alta fragilidad de los materiales cerámicos, algunos de ellos poseen propiedades físicas y químicas ideales para conseguir su objetivo, ya que no presentan oxidación ni corrosión en el medio biológico y poseen una gran dureza que los hace muy resistentes a la fricción y el desgaste (Wang X. *et al.*, 2009; Wu C. *et al.*, 2010).

Las biocerámicas se introducen en una época (década de los 70) en la que comenzaban a detectarse fracasos en los biomateriales utilizados hasta ese momento (acero, aleaciones de cobalto, polimetilmetacrilato, etc.). En ortopedia, las cerámicas han sido utilizadas en diferentes aplicaciones como las prótesis articulares en forma de piezas de cerámica densas. Es el caso de la alúmina y la zircona, cerámicas basadas en óxidos metálicos y que no tienen ninguna semejanza con la fase mineral del hueso, son consideradas inertes y muy resistentes al desgaste. Otras aplicaciones de las cerámicas incluyen los cementos óseos para el relleno de pequeños defectos, los materiales reabsorbibles para la estimulación de la regeneración ósea y los recubrimientos de implantes metálicos con cerámicas bioactivas como los fosfatos cálcico, entre otras (Figura 10).



Figura 10. Ejemplos de implantes, prótesis y rellenos cerámicos.

De acuerdo con las características de la adhesión de las biocerámicas, se describen cuatro tipos de fijación al tejido óseo que se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5.- Tipos y clasificación de adhesión biocerámica-tejido.

Tipo de Adhesión	Descripción	Ejemplo
Fijación morfológica	Las cerámicas densas no porosas, casi inertes, se adhieren por crecimiento del hueso en las irregularidades superficiales, por cementación del implante en el tejido o por ajuste a presión dentro del defecto (press-fit)	Al_2O_3 (mono y policristina)
Fijación biológica	En los implantes inertes y porosos el hueso crece en la porosidad de modo centrípeto y la adhesión es de tipo metálica	Al_2O_3 (policristina) y metales porosos recubiertos con hidroxiapatito
Fijación bioactiva	Las cerámicas, vidrios y vitrocerámicas densas, no porosas y reactivas superficialmente se adhieren por enlace químico con el hueso	Vidrios y vitrocerámicas bioactivas e hidroxiapatita
Fijación sustitutiva	Las cerámicas degradables, tanto densas como no-porosas, están diseñados para ser lentamente reemplazadas por el hueso	Sulfato de calcio, fosfato tricálcico, sales calcio-fosfato

Durante las últimas dos décadas se ha intensificado la investigación en cerámicas basadas en fosfato cálcico dopadas con silicio (Si–CaP), debido a la capacidad del silicio para influir en la formación de hueso, mejorando la osteogénesis, como explicó en su trabajo E. Carlisle quien demostró que el silicio se encuentra localizado en las zonas de crecimiento activo de los huesos (Carlisle, 1974), mejorando la tasa de reabsorción y la dureza del mismo (Chevalier y Gremillard, 2009). Por otra parte, la carencia de silicio afecta a la tasa de calcificación de los huesos, y puede ser un factor importante en los trastornos caracterizados por un desequilibrio entre la formación y reabsorción ósea (Carlisle, 1972; Schwarz y Milne, 1972; Carlisle, 1980; Vallet-Regi y Ruiz Hernández, 2011). Es por estas excelentes características de bioactividad y biocompatibilidad que estos biomateriales se han convertido en candidatos prometedores para la reparación y sustitución ósea. Otra característica de estos biomateriales, es el no tener que ser implantados de forma prefabricada, siendo ésta una ventaja sobre las biocerámicas convencionales, haciéndolos objeto de estudio para los nuevos implantes óseos (Best *et al.*, 2008; Chevalier y Gremillard, 2008; Vallet-Regi y Ruiz-Hernández, 2011). Sin embargo, se conoce la dificultad de preparar materiales cristalinos basados en Si–CaP, lo que aumenta la complejidad de la investigación de estos materiales, siendo uno de los principales problemas en las cerámicas basadas en Si–CaP que no pueden mantener estructuras cristalinas monofásicas estables cuando se añade más de un 8% de Si (Ioky, 2010; Lugo *et al.*, 2015).

2.4 MODELOS ANIMALES

2.4.1 Características

Los modelos animales se utilizan para entender “lo que sucede” o el comportamiento *in vivo* y elaborar hipótesis para más tarde aplicarlas en ensayos humanos con suficiente seguridad y eficacia (Morand *et al.*, 2011).

En el campo de los biomateriales, antes de determinar si un nuevo material es biocompatible y posee estabilidad mecánica para su uso clínico *in vivo*, hay que valorar su citocompatibilidad en las pruebas *in vitro* (Richards RG *et al.*, 2001). Se acepta que la prueba *in vitro* se utiliza principalmente como una primera etapa para evitar el uso innecesario de animales en el ensayo de materiales citológicamente inapropiados (Pearce *et al.*, 2007).

En principio, los estudios en cultivos celulares intentan darnos una idea de la morfología celular, adhesión, migración, proliferación y diferenciación en las superficies de los implantes (Lemons, 2004). A pesar de que los análisis de resultados de los cultivos celulares *in vitro* han demostrado ser útiles para la evaluación inicial de la biología de biomateriales, los resultados obtenidos todavía no pueden ser totalmente correlacionados con el rendimiento *in vivo* (Groth *et al.*, 1995).

Además, las respuestas celulares, tales como la citotoxicidad debido a la presencia de iones metálicos, pueden variar entre líneas celulares (Wataha *et al.*, 1994). En pruebas *in vitro*, la evaluación de la toxicidad, por ejemplo, está limitada por la corta vida de las células cultivadas (Pizzoferrato *et al.*, 1994).

Los cultivos celulares de ninguna manera reproducen la dinámica del hueso vivo en la superficie del implante (Coelho *et al.*, 2009), por lo tanto, los ensayos preclínicos basados en modelos animales y subsiguientes ensayos clínicos (Groth *et al.*, 1995) se muestran como la opción más fiable en la actualidad para testar un biomaterial.

Los animales más utilizados para la investigación con implantes dentales son ratas, conejos, ovejas, perros, cerdos y primates no humanos. Entre los factores considerados para determinar qué modelo animal es el más apropiado para un protocolo de investigación destacan, en particular, aquellos que guarden similitud con los seres humanos, respecto a la zona de experimentación, bajo condiciones fisiológicas y patológicas, así como la disponibilidad de un gran número de especímenes.

Otras consideraciones incluyen la aceptación de la sociedad, el coste, disponibilidad, edad, tamaño (la colocación de implantes múltiples para la comparación), la tolerancia a la cirugía y el cautiverio, la vivienda y la protección de animales.

Debido a su relativo bajo coste, facilidad de manejo, y un número sustancial de los datos publicados anteriormente, el modelo de conejo ha sido el más utilizado para los estudios de la interfase hueso-implante (Hernández, 2006).

El conejo es utilizado fundamentalmente en la producción de antisueros; farmacología, toxicología, teratogenicidad y reproducción. Se utiliza en aproximadamente el 35% de los estudios de investigación musculoesqueléticos (Neyt *et al.*, 1998).

Sin embargo, los huesos de conejo comúnmente utilizados, tales como la tibia y el fémur son de los modelos menos similares en comparación con los humanos. Las macroestructuras óseas son significativamente diferentes (sobre todo cuando se

compara la cantidad de hueso trabecular del hueso alveolar de humanos con huesos largos de conejo); también la micro-estructura, y la cinética (Coelho *et al.*, 2009).

El conejo tiene, en comparación con otras especies (primates y algunos roedores), el recambio óseo más acelerado (Eggl *et al.*, 1988; Gilsanz *et al.*, 1988; Newman *et al.*, 1995; Wiltfang *et al.*, 2002; Castañeda *et al.*, 2006). Esto puede hacer que sea difícil extrapolar los resultados de estudios realizados en conejos sobre la probabilidad de una respuesta clínica humana (Pearce *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la extrapolación de los resultados obtenidos en estudios en conejos en relación con los seres humanos es un reto y debe ser realizado cuidadosamente (Vallet-Regi y Ruiz-Hernández, 2011). No obstante, se utilizan comúnmente para el estudio de materiales de implante antes de la prueba en un modelo de animal más grande (Pearce *et al.*, 2007).

Entre las ventajas de usar este modelo animal encontramos, además de su facilidad de manejo y tamaño, que alcanza la madurez esquelética alrededor de los 6 meses de edad, tras la madurez sexual (Lemons, 2004).

Entre sus mayores inconvenientes destaca su tamaño limitado por cuanto al tamaño y al número de implantes según el estándar internacional para la evaluación biológica de dispositivos médicos con un máximo de 6 implantes (3 pruebas y 3 implantes de control) por conejo (norma internacional ISO 10993-6, 1994), siendo la mitad del número máximo de implantes recomendadas para ovejas, perros, cabras y cerdos (Pearce *et al.*, 2007).

El ratón

El ratón se usó en Europa, por primera vez, en el siglo XVI (Morand y Hesperidin, 2011). Es el modelo animal más conocido y utilizado en la mayor parte de las experiencias *in vivo* de biología y medicina, para conocer la reacción de un organismo mamífero frente a una agresión, una intoxicación o una infección experimental (parasitaria, bacteriana o vírica); reacciones o trastornos inmunológicos, oncología, teratología y embriología (Coelho *et al.*, 2009).

El ratón presenta algunas ventajas sobre otros animales experimentales: ciclo reproductivo muy corto con tamaño de camadas grandes; posibilidad de manipular información genética nueva dentro de la célula y transmitirla a la línea germinal; animal pequeño, manejable, resistente, bien caracterizado en cuanto a su biología; relativamente barato; mantenimiento sencillo. El ratón se puede manipular en línea germinal y es posible inactivar genes de modo dirigido para lograr modelos de enfermedades humanas, sobre todo las que afectan al sistema inmune y al desarrollo

embrionario, también para el estudio del cáncer y enfermedades tan frecuentes como la diabetes (Rodríguez, 2007).

El Perro

El segundo modelo más utilizado en la investigación de implantes dentales es el modelo canino (Vallet-Regi y Ruiz-Hernández, 2011), que se utiliza mucho en el sector dental y musculoesquelético, Asimismo, los macacos y los perros parecen ser los modelos de elección de los estudios preclínicos de la enfermedad periodontal y los procesos dentales, por ejemplo, en los molares, asociados a la pérdida de masa ósea, ya que son similares al de los humanos a nivel estructural, fisiológico y anatómico (Bagy *et al.*, 2011).

El hecho que los perros pueden formar parte activa en los protocolos de recuperación es una de las ventajas más destacadas. Su condición de animales de compañía es el punto más controvertido desde el punto de vista ético en la investigación médica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS

La hipótesis de trabajo consiste en demostrar que el microTC tiene capacidad diagnóstica suficiente para valorar el comportamiento de un biomaterial implantado de forma interósea mediante un defecto óseo experimental practicado en tibias de conejo NZ.

Demostrar que mediante el estudio matemático de los valores de los voxeles (DATARAW) correspondiente al estudio con microTC del biomaterial implantado en el hueso huésped, se puede realizar, no solo un estudio analógico de la imagen ósea y del biomaterial, sino una valoración predictiva comparable al resultado final observado mediante técnicas histológicas. Con estos valores matemáticos se puede obtener una información que sobrepase al clásico estudio visual de la propia imagen del microTC realizado por el facultativo especialista en diagnóstico por la imagen.

En resumen, la hipótesis general es Intentar responder a la pregunta: ¿hasta cuánto el microTC puede aproximarse a predecir cuáles van a ser los hallazgos histológicos en la respuesta biológica del material estudiado después de su implantación interósea?, lo que equivale a valorar la capacidad predictiva diagnóstica e histológica que tiene el microTC.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es establecer un modelo predictivo mediante el estudio con micro TC de la respuesta biológica del hueso huésped a la cerámica bifásica Nurse's A phase-silicocarnotita (A-S) (Williams, 2009) bajo dos presentaciones: pura (A-S) y dopada o suplementada con matriz ósea desmineralizada (MOD) (A-S-MOD) implantada en tibia de conejo NZ. Para conseguir estos objetivos. Se utilizaron técnicas de diagnóstico por la imagen obtenidas con micro-TC y mediante métodos anatomopatológicos (AP): morfológico e histomorfométrico.

Para alcanzar dicho propósito nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el comportamiento del biomaterial después de su implantación en sus dos presentaciones: A-S y A-S-MOD mediante técnicas de micro-TC a lo largo

de los periodos de estudio establecido y determinando las posibles diferencias entre ellos.

2. Establecer un modelo matemático que permita estudiar los valores de absorción de la radiación en los diferentes voxels, y su evolución en el tiempo de estudio.
3. Estudiar mediante técnicas histológicas la respuesta biológica del hueso huésped después de la implantación del biomaterial en sus dos presentaciones (A-S y A-S-MOD) en los diferentes periodos de estudio establecidos.
4. Correlacionar los resultados de visualización de imagen del micro-TC con los resultados del estudio matemático de la imagen y con los obtenidos en el estudio anatomopatológico para valorar su correlación y veracidad de los hallazgos.

De los objetivos planteados se intentará predecir el grado de acercamiento a los hallazgos anatomopatológicos existente con el estudio del hueso mediante micro-TC y la realidad anatómica de la pieza estudiada histológicamente a nivel microscópico. De estos resultados, tanto de sus imágenes analógicas como de sus datos digitales, dependerá el grado de validación del estudio con micro-TC,

MATERIAL Y MÉTODOS

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 BIOMATERIAL.

Se trata de un compuesto bifásico de Nurse's A phase-silicocarnotita (A-S) dentro del sistema fosfato tricálcico silicato dicálcico (Ros-Tárrega *et al.*, 2016). Dada la demostrada relevancia del Silicio en el desarrollo y regeneración ósea (Jugdaohsingh, 2007), en el presente trabajo se ha escogido un silicato dicálcico (C₂S). Por su bioactividad, biocompatibilidad, osteoconductividad y osteoinductividad, se trata de un biomaterial ampliamente utilizado en la industria biotecnológica para el desarrollo de biomateriales implantables, (componente de cementos óseos y cementos dentales en el campo de la regeneración ósea). La adicción de silicato a los fosfatos de calcio promueve la osteogénesis y mejora el comportamiento del material (Hench y Clark, 1970, Hench, 1991; An *et al.*, 2012).

Las materias primas empleadas para la fabricación del material con el que se realizó el implante fueron fosfato α -tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) y γ -silicato dicálcico (Ca₂SiO₄). Se preparó una mezcla con un 45 wt% de C₂S y un 55 wt% de TCP correspondiente al campo primario de cristalización de Nurse's A phase-silicocarnotita. Dicha mezcla se sometió a un tratamiento térmico de 1525 °C durante 12 horas, con una velocidad de calentamiento de 8,3 °C/min, seguido de un enfriamiento lento hasta temperatura ambiente mediante apagado del horno

El material ha sido obtenido y caracterizado previamente en el Laboratorio de Biomateriales de Universidad Miguel Hernández. Detalles sobre la caracterización y comportamiento *in vitro* del compuesto obtenido se pueden encontrar en publicaciones anteriores del grupo (Martínez *et al.*, 2012; Velásquez *et al.*, 2013; Lugo *et al.*, 2015; Ros-Tárrega *et al.*, 2016).

Para el desarrollo del presente trabajo, se llevaron a cabo dos tipos de implantes:

1. Compuesto bifásico de Nurse's A phase-silicocarnotita (A-S)
2. Compuesto bifásico de Nurse's A phase-silicocarnotita dopado (A-S- MOD)

El implante de A-S puro se preparó a partir de polvo del material A-S previamente sintetizado (Ros-Tárrega *et al.*, 2016; Ros-Tárrega *et al.*, 2016). El material fue molido en un molino de atrición usando bolas de zirconia y óxido de itrio de 1 mm de diámetro en medio alcohólico (alcohol isopropílico), durante un tiempo. Se realizó una mezcla del polvo molido consistente en un 10 % de polvo de 2 micras con un 90%

de polvo de fracción gruesa de 2- 0.8 mm añadiéndole al 100% de la muestra un 10% en peso de PVA como aglutinante. Se calentó después a 1170 °C con lo que se produce una sintetización parcial de los granos, se elimina el aglutinante y al ser parcial la sintetización se unen los distintos granos un poco en la superficie y se mantiene los poros de distinto tamaño.

El implante de A-S-MOD se fabricó a partir del A-S puro al que se le recubrió en toda su superficie, después de su esterilización, con matriz ósea desmineralizada (Activagen® Bioimplant, Barcelona. España) en el momento de su implantación interósea.

Una vez sintetizados, los implantes se cortaron en forma de cilindros de 6 mm de longitud y 4.5 mm de diámetro (Figura 11), se eliminaron los restos de su superficie mediante chorro de aire a presión, y seguidamente fueron lavados en una solución tamponada de PBS, con un posterior secado en estufa a 37 °C durante 24 horas.

Por último, las piezas se envasaron de forma individualizada para su esterilización mediante plasma de gas peróxido de hidrógeno a baja temperatura (Sterrad® 100S, Norderstedt, Alemania). En la figura 11 se puede apreciar el aspecto macroscópico final de los implantes.



Figura 11: Aspecto macroscópico de los cilindros del compuesto. Nurse's A phase-silicocarnotita

5.1.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo del estudio se utilizaron 15 conejos Albinos adultos, de la raza Nueva Zelanda (figura 12), con un peso inicial comprendido entre 3.500 y 4.000 gramos, de 28-32 semanas de edad para asegurar el cierre fisario (esqueléticamente maduros) (Zaleske *et al.*, 1982; Rivas y Saphiro 2002). Se han utilizado animales de ambos sexos, ya que no se han descrito diferencias en cuanto a metabolismo óseo (Rodríguez, 2007).



Figura 12. Conejo Albino de la raza Nueva Zelanda empleado en el estudio.

Para su adaptación y climatización al alojamiento, 1 semana antes de la cirugía, los animales fueron alojados en jaulas individuales y en su manejo se siguieron las normales establecidas por la Unión Europea para la protección de animales utilizados en experimentación (EU/63/2010) en el Servicio de Animales de Laboratorio del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia (REGAES 300305440012). Las condiciones ambientales se mantuvieron de manera constante a lo largo de todo el estudio con fotoperiodo programado en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, iluminación de 350 lux/m². Temperatura estable entre 22-24°C, humedad constante entre 55% ± 10% y con acceso *ad libitum* al agua y comida comercial estándar para conejos (Panlab[®], Barcelona). Cada animal fue identificado mediante una etiqueta numerada adhesiva en la oreja y que coincidía con el número rotulado en su jaula.

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal del centro registrado donde se llevó a cabo la experimentación animal, y en todos los procedimientos se respetó la normativa sobre la protección de los animales

utilizados para experimentación y otros fines científicos incluido docencia (RD 53/2013), obteniendo la autorización por parte de la Autoridad Competente con el número de Proyecto A13150102.

5.1.3 EQUIPOS

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

- **EQUIPO DE MAMOGRAFIA:** Mamógrafo LORAD selenia (Hologic) Madrid. España. Figura 13.



Figura 13: Mamógrafo LORAD selenia (Hologic)

- **EQUIPO DE MICROTCT :**Escáner multimodal SPECT/CT Albira II ARS (GEM-IMAGING SA; Oncovisión), Valencia. España. Figura 14

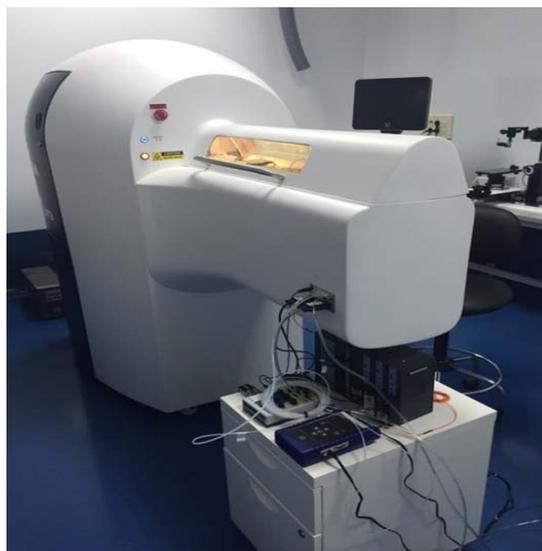


Figura 14. SPECT CT Albira II ARS

- **EQUIPOS DE ANATOMIA PATOLOGICA.** Procesador histológico multifunción por microondas (Milestone KOS Histostation, Milestone, Bergamo, Italia). Micrótopo de rotación Shandon Finesse 325 (Thermo). Para realizar el análisis morfométrico, se utilizó un microscopio óptico de campo claro Zeiss Axio Scope A.1 (Carl Zeiss, Jenna, Alemania), equipado con un sistema de cámara digital (AxioCam Ic3, Carl Zeiss) de la Plataforma de Patología del Instituto Murciano de Investigación Biomédica (IMIB-Arrixaca). Para toma de imágenes a bajo aumento (0.57x), se usó un microscopio Leica Z6 Apo (Leica Microsystems, Barcelona, Spain), equipado con una cámara digital Leica CDC500 y software de adquisición de imagen (Leica Application Suite), perteneciente al Servicio de Análisis de Imagen del Servicio de Apoyo a la Investigación SAI de la Universidad de Murcia.

5.2 METODOS

5.2.1 PLANIFICACION

Para llevar a cabo este estudio los animales fueron distribuidos de modo aleatorio (aleatorización simple) en tres grupos de evolución (Grupo I, Grupo II y Grupo III) correspondientes a cada uno de los periodos de estudio establecidos (1, 3 y 5 meses, respectivamente). Cada grupo estaba constituido por cinco animales (n=5) de modo que:

- Grupo I (n=5): Animales implantados durante 1 mes.
- Grupo II (n=5): Animales implantados durante 3 meses.
- Grupo III (n=5): Animales implantados durante 5 meses.

Todos los animales utilizados en el estudio sobrevivieron hasta el momento del sacrificio, no observándose en ellos complicaciones locales o sistémicas en el periodo postoperatorio relacionadas con la cirugía que pudieran ser motivo de su exclusión del estudio.

Finalizado cada uno de los periodos de estudio citados, los animales fueron sacrificados para extraerles los 2/3 proximales de las tibias que contenían el implante y el orificio control.

A todas las piezas extraídas, y una vez desprovistas de partes blandas adheridas, se les realizó en primer lugar el estudio radiológico mediante un mamógrafo de alta definición y magnificación de la muestra. Posteriormente se le realizó microtomografía computerizada (micro-TC) con la intención de conseguir una mejor definición de las imágenes y reconstrucciones multiplanales y en 3D y seguidamente proceder al estudio matemático de los valores de cada voxel de la pieza anatómica.

5.2.2. METODO ANESTÉSICO Y QUIRÚRGICO

Todos los procedimientos se realizaron en un quirófano convencional para pequeños animales y bajo rigurosas normas de asepsia. Basándonos en los procedimientos anestésicos aplicados en similares estudios realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación (Neyt *et al.*, 1998; Hernández, 2006), se aplicó un protocolo consiguiendo mínima toxicidad hepática o renal, fácil eliminación, alto margen de seguridad y mínimos efectos secundarios. El protocolo establecido consistió en las siguientes fases:

PREMEDICACIÓN

- **Sulfato de Atropina** (0.3 mg/kg por vía intramuscular.): se emplea para reducir la secreción excesiva de las vías respiratorias altas, la motilidad intestinal y la bradicardia producidas por ciertos agentes anestésicos. No obstante, es preciso tener en cuenta que un 30% de estos roedores son portadores de una seroatropinasa que reduce los efectos de la atropina.
- **Hidrocloruro de clorpromacina** (10 mg/kg por vía intramuscular): su uso permite reducir la dosis de agentes anestésicos, sobre todo barbitúricos, proporcionando una buena relajación muscular y reduciendo la ansiedad del animal. Con esta premedicación conseguimos un efecto sedante a los 10-15 minutos de su administración.
- **Profilaxis antibiótica:** Enrofloxacina (15 ml/kg por vía intramuscular), administrada en monodosis 30 minutos antes de la intervención.

Una vez premedicado el animal, se procedió a rasurar las patas traseras a intervenir, en una zona comprendida entre el tercio proximal y el tercio distal de la extremidad.

INDUCCIÓN ANESTÉSICA

- **Clorhidrato de Ketamina** (50 mg/kg por vía intramuscular): se trata de un hipnótico de acción rápida y un potente analgésico, de escasa acción como relajante muscular que se potencia con la clorpromacina. No produce depresión respiratoria, no tiene efectos acumulativos y presenta un buen margen de dosificación. Se consigue una acción anestésica suficiente para la cirugía a los 15-20 minutos de su administración.

MANTENIMIENTO

- **Clorhidrato de Ketamina** (20 mg/kg por vía intramuscular): administración a demanda ante el menor signo de agitación del animal.

MÉTODO QUIRÚRGICO

Se seleccionó como área idónea para alojar el implante el nivel metafisario proximal de la tibia, de modo que todo el volumen del implante queda rodeado de tejido óseo después de su implantación. Para evitar variaciones del lugar para llevar a cabo el defecto óseo y unificar la zona anatómica de implantación, se tomó como referencia anatómica la tuberosidad tibial anterior (Figura 15).

Se eligió un abordaje anteromedial para acceder a la zona metafisaria de la tibia por ser poco traumático, evitando de este modo pérdidas sanguíneas y descensos importantes de la volemia que pudiesen derivar en la formación de grandes hematomas, con posibilidad de infección local y, en el peor de los casos, en la muerte del animal. La asepsia del campo quirúrgico se consiguió aplicando povidona yodada al 10%. A continuación se aisló la zona mediante un paño fenestrado estéril, dejando expuesta únicamente el área a intervenir

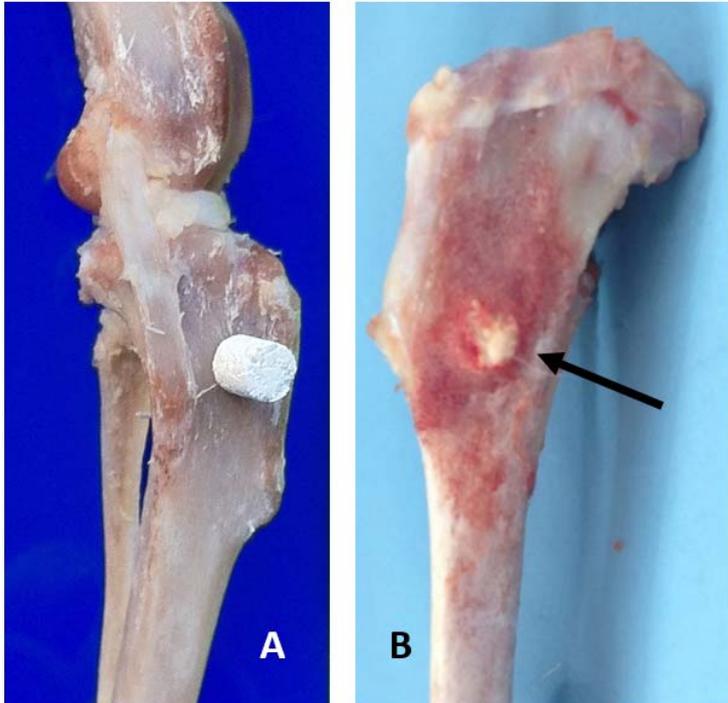


Figura 15: (A) esquema de la implantacion. (B) Imagen macroscopica representativa del resultado final tras el sacrificio del animal. La flecha indica el area implanada.

El tamaño de los defectos en tibias para individuos de alrededor de 3 Kg de peso ronda los 5 mm de diámetro, ya que presentan mayor dificultad para su cierre espontaneo, pudiendo demostrarse el potencial regenerativo del biomaterial a estudio (Li, 2015). La superficie ósea se abordó mediante una incisión cutánea directa de unos 20 mm, tomando como referencias anatómicas la rótula y los relieves anterior y posterior de la tibia proximal (Figura 15). Seguidamente se realizó una desperiostización cuidadosa hasta exponer el área para realizar el defecto óseo. A continuación, con ayuda de un punzón de 2 mm de diámetro, procedimos a marcar el punto de entrada de las brocas para realizar el defecto. Utilizando brocas sucesivas de 3.2 mm y 4.5 mm de diámetro montadas en un mango en T, se perforó la cortical medial sin llegar a lesionar la cortical lateral, creando de esta forma un defecto óseo contenido que facilitó la estabilidad del material implantado en el lecho receptor. Se utilizó una broca de 4,5 mm por su accesibilidad, dado su empleo en Traumatología y Cirugía Ortopédica. Solo se atravesó una cortical debido a que una de las mayores complicaciones de este tipo de cirugía en conejos, es la fractura del hueso perforado, lo que puede derivar en la muerte del animal debido a un embolismo graso o a una estasis intestinal secundario (Mapara, 2012).

Una vez conseguido el lecho apropiado se realizó un lavado abundante con suero fisiológico, procurando eliminar las partículas óseas producidas durante la perforación del hueso. Posteriormente, el defecto óseo se rellenó con el implante (Figura 16). A continuación, la zona intervenida se lavó repetidas veces con solución salina y se procedió a realizar un cierre cuidadoso de la herida siguiendo los planos anatómicos, comenzando con el periostio con puntos sueltos de Coated Vicryl® 3/0, y por último del plano cutáneo con sutura continua con Vicryl rapide® 3/0. Finalmente, tras el lavado de la herida, se volvió a aplicar el antiséptico povidona yodada y un apósito plástico en aerosol del tipo Nobecutan®.

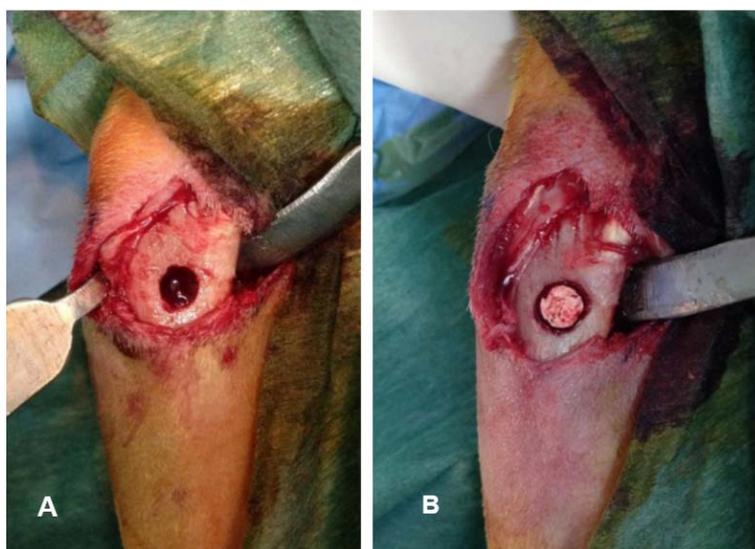


Figura 16: A: realización del defecto óseo. B: introducción del biomaterial.

REVERSIÓN O DESPERTAR

Tras finalizar la cirugía, los animales se depositaron en sus respectivas jaulas, evitando manipulaciones intempestivas en las primeras horas tras la intervención. Esta fase se realizaba de forma suave y espontánea, sin precisar medicación adicional.

No se apreciaron complicaciones ni efectos tóxicos, consiguiendo un despertar suave y progresivo de los animales.

ANALGESIA POSTOPERATORIA

El control del dolor postoperatorio se realizó mediante la administración de:

- **Hidrocloruro de mepivacaína (1%):** 5 mg/kg inyectada localmente tras el cierre de la herida quirúrgica.

- **Hidrocloruro de buprenorfina:** 0,3 mg/kg por vía intramuscular antes de la cirugía y durante los tres días posteriores.

EUTANASIA. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Una vez finalizados los distintos periodos de estudio (1, 3 y 5 meses), se procedió al protocolo de eutanasia de los animales mediante administración intracardiaca de una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg) Dolethal® (Lab. Vetoquinal. Cedex. Francia), previa sedación profunda con Ketamina 50 mg/k. Tras comprobar la muerte del animal, se realizaron abordajes quirúrgicos ampliados en tibias de la misma forma que los realizados para la implantación de los materiales. A continuación, se desprendieron las partes blandas adheridas a la superficie de la metáfisis proximal, y se extrajo el segmento tibial mediante una osteotomía transversal perpendicular al eje longitudinal utilizando una minisierra oscilante (Figura 17).



Figura 17: sierra oscilante de corte de la pieza anatómica.

5.2.3 APLICACIÓN DE TECNICA MAMOGRAFICA.

Con el intento de obtener imágenes radiográficas simples con la máxima calidad diagnóstica (Castaneda *et al.*, 2006), se utilizó un mamógrafo digital con capacidad de hacer tomo síntesis. Se les realizaron exposiciones radiográficas tanto a las piezas de tibias con biomaterial implantado como a las secciones que posteriormente se obtuvieron de unos 3-4 mm de espesor realizados mecánicamente con minisierra eléctrica. Las imágenes radiológicas se obtuvieron en proyecciones ortogonales estándar (anteroposterior y lateral) mediante técnica de 36 Kv y 70 mAs, con foco fino y

exposimetría automática y que posteriormente fueron magnificadas. Así mismo se realizó tomo-síntesis automática obteniéndose unas 15 imágenes de cada pieza. En todas las imágenes obtenidas se valoró lo que podía aportar el estudio radiológico simple al seguimiento evolutivo del biomaterial después de su implantación en el hueso huésped.

5.2.4. PROTOCOLO DE ADQUISICIÓN MEDIANTE microTOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

Equipo de TC Experimental y microTC

Las tibias implantadas fueron analizadas mediante un escáner multimodal SPECT/CT Albira II ARS perteneciente a la Universidad de Murcia. Los parámetros de adquisición fueron 45 Kv, 0,2 mA, voxel de 0.05 mm. Los cortes de adquisición fueron axiales de 0,05 mm de espesor y de cada pieza se obtuvieron de 800 a 1000 imágenes a través de un detector digital flat panel 2400 x 2400 pixels y un FOV de 70 x 70 mm. En el momento de la adquisición de las imágenes se colocaron todas las piezas en la misma posición y a continuación se les realizó el mismo estudio protocolizado de técnica radiológica para TC (figura 18)

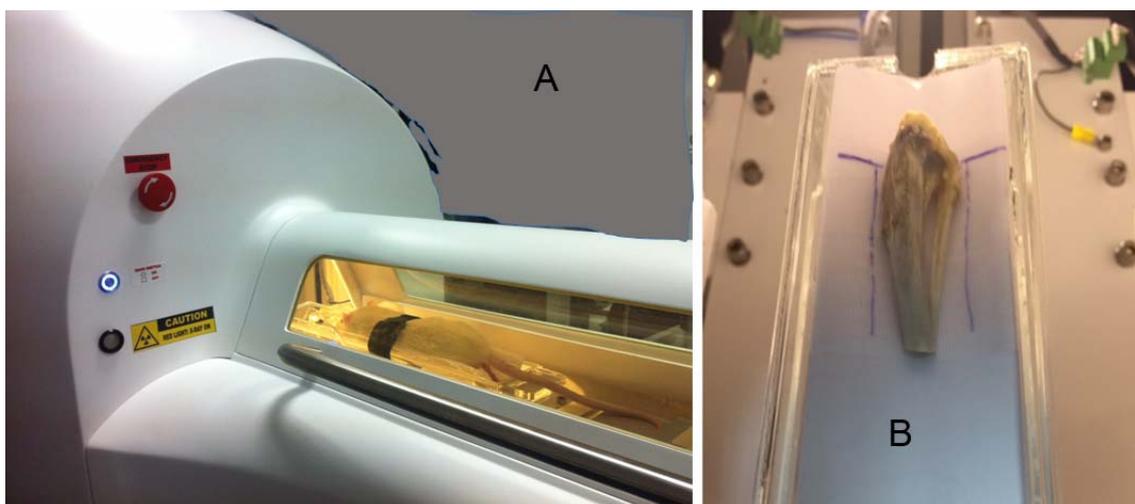


Figura 18: A: Imagen general del microTC utilizado en el estudio. B: imagen del posicionamiento de la tibia reseca en la bandeja del microTC

Con el microTC se estudiaron los cilindros de los materiales implantados (A-S y A-S-MOD) valorando su capacidad de absorción del haz de rayos X en función de su contenido en material cerámico (reabsorción y remodelación de esta) y buscando la formación de tejido óseo en la superficie y entre los gránulos que componen el biomaterial y entre éste y la cortical huésped.

5.2.5. ANALISIS DE LAS IMÁGENES DEL microTC MEDIANTE ESTADISTICA DESCRIPTIVA Y ANALISIS MATEMATICO.

En esta sección y con objeto de explicar las imágenes de las distintas técnicas se utilizan fotos del hueso huésped y de los biomateriales antes y después de ser implantados. Esto se hace con la única intención de explicar las técnicas, pero sin querer intentar dar ningún tipo de información sobre los resultados de los experimentos llevados a cabo.

5.2.5.1. ANALISIS DE LAS IMÁGENES

A modo de ensayo preliminar para plantear el método radiológico, las imágenes adquiridas con el microTC fueron reconstruidas en los tres planos del espacio mediante un algoritmo FBP (Filtered Back Projection) o programa de retroproyección filtrada, y se sometieron a una reconstrucción avanzada mediante el programa de análisis de imagen Amide (AMIDE, UCLA University, LA, USA), y a una reconstrucción en 3D mediante el programa de análisis de imagen Volview (Kitware Inc).

Como la interpretación de las imágenes es operador dependiente, todas las imágenes fueron analizadas, primero de forma independiente y luego conjuntamente por dos personas por separado, expertas en interpretación y procesado de las imágenes del microTC en 3D. Se realizó un análisis descriptivo, no cuantitativo, de la imagen dado que el objetivo no es hacer un estudio analítico-comparativo sino un estudio visual, más próximo a la práctica clínica diaria y siendo nuestro objetivo el utilizar el microTC experimental como método de estudio previo para futuros estudios con un TC clínico asistencial convencional.

Al mismo tiempo se averiguó qué cantidad de información no somos capaces de analizar visualmente y en cambio está contenida en el procesado matemático de los valores crudos o primarios o DATARAW que en definitiva son los que darán lugar a la imagen visual definitiva o final del microTC. O sea, qué cantidad de información contenida en los DATARAW no es posible analizar visualmente y en cambio sí que es procesable matemáticamente.

Previamente a la realización del estudio definitivo se obtuvieron imágenes del microTC, en las que, en primer lugar, se comprobó la calidad de las imágenes basándonos en la anatomía normal ya conocida. De esta manera se consiguió la selección del mejor método de estudio de imagen y reformateo. Se consiguió obtener el llamado "patrón trabecular normal". Consistió en centrar la atención en la epífisis y en la metafisis de la muestra de tibia y observar con qué calidad de imagen identificábamos la mayor nitidez la línea metafisaria y las trabéculas adyacentes epifisarias y metafisarias. Esta región anatómica es bien conocida y común a todo tejido óseo por lo que puede ser testada con bastante fiabilidad a la hora de correlacionar la imagen obtenida con el microTC con la imagen observada en la anatomía patológica. Una vez aplicado el procedimiento anteriormente mencionado se obtuvo la imagen que se muestra en la figura 19 y que se considera aporta suficiente calidad interpretativa diagnóstica anatómica ósea. En ella se identifica con suficiente nitidez y calidad anatómica la línea irregular translúcida metafisaria, así como las trabéculas óseas epifisarias y metafisarias adyacentes de mayor densidad radiológica.

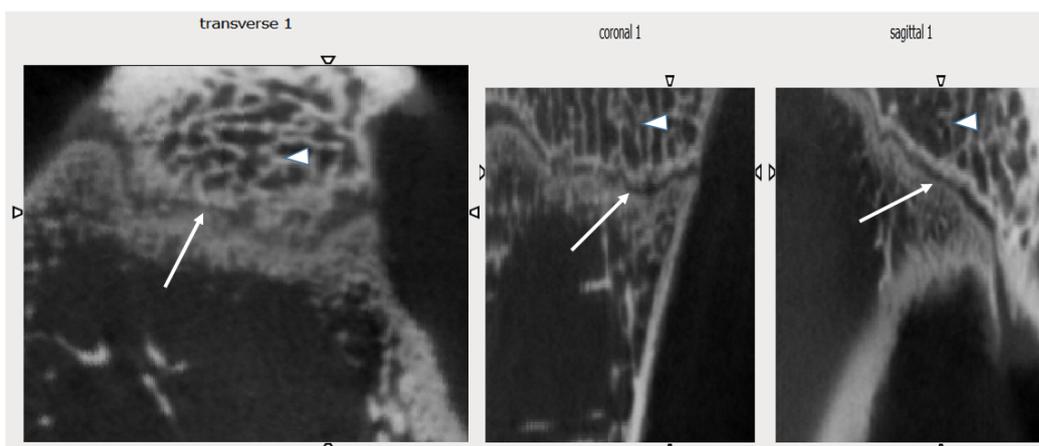


Figura 19. Imagen de trabéculas (cabezas de flecha) y línea metafisarias tibial (flechas) en los tres planos del espacio (cortes coronal, axial o trasversal y sagital).

Este patrón de reformateo nos permitió validar el programa Amide. Identificando lo que es la morfología normal del patrón óseo trabecular y metafisario cuando se estudia con microTC. Las imágenes de microTC se obtienen después de ser sometidas a un programa de reformateo o filtro de reconstrucción que equivale a la función matemática usada para la circunvolución de los perfiles de atenuación antes de la reconstrucción de la imagen de TC (SERAM: Glosario de términos más usados en TC. Última actualización 20 de julio 2014)

De igual modo y antes de seleccionar el método de reconstrucción 3D en nuestro estudio se eligió un patrón definido y predeterminado patrón trabecular, al que se le asignó unos valores en la escala de colorimetría, asignando un color rosáceo al patrón trabecular y a la cortical y al biomaterial un color blanco-amarillento (figura 20).

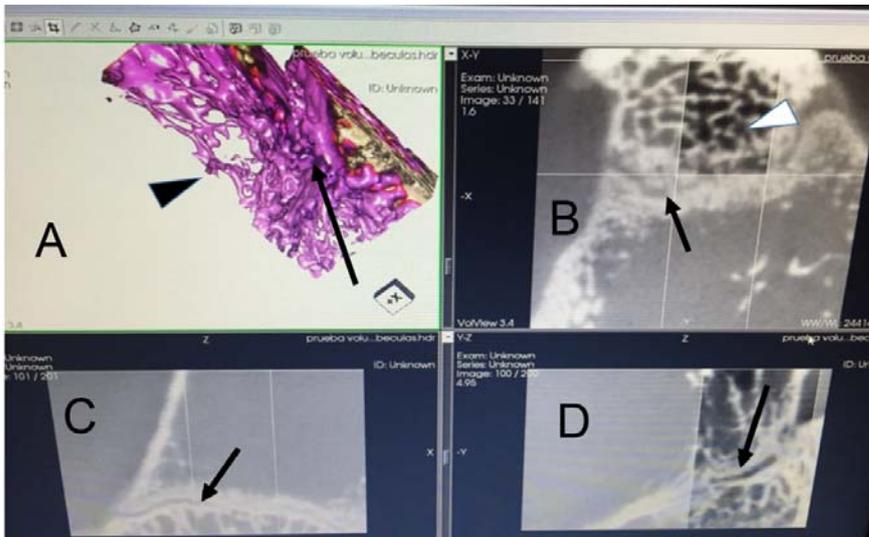


Figura 20. Imagen de trabéculas óseas (cabeza de flecha negra y blanca) y línea metafisaria (flechas negras) en 3 D (A) y en los tres planos del espacio, axial (B), sagital (C) y coronal (D).

En cada corte se analizaron los cambios morfológicos que existieron en los materiales cerámicos, tanto A-S como A-S-MOD, a lo largo del tiempo estudiado. En concreto se protocolizó el cambio morfológico prestando especial atención a los siguientes aspectos:

1. Cambios en la morfología del biomaterial antes y después de su implantación. Valorando la pérdida en la homogeneidad del biomaterial a lo largo del tiempo de estudio y comparándola siempre con su morfología antes de la implantación. Si hubiese pérdida de homogeneidad del biomaterial a lo largo del tiempo indicaría que ha sufrido un proceso de integración en el hueso huésped y remodelación;

2. Pérdida de su contorno periférico. El biomaterial presenta antes de ser implantado un contorno liso inicial en contacto con la cavidad medular antes de ser implantado;
3. Determinar la presencia de trabéculas óseas dentro del biomaterial;
4. Dispersión que pueda sufrir los granos del biomaterial dentro de la cavidad medular, y
5. Aparición en la periferia de la zona implantada de trabéculas óseas formando "puentes" entre el biomaterial y la cortical ósea adyacente.

5.2.5.2. ANALISIS ESTADISTICO DESCRIPTIVO

Continuando con la misma sistemática para facilitar la explicación del método aplicado para llevar a cabo el análisis estadístico descriptivo se utilizó una imagen axial del microTC, calculándose el valor numérico en unidades Hounsfield (UH) de los voxeles contenidos en cada una de las tres líneas que se trazaron: superior, media e inferior. Estas tres líneas intentan hacer un estudio analítico promedio de toda la pieza del biomaterial, incluyendo la medular adyacente al biomaterial y la cortical normal que existe en el lado contralateral al de la inserción del biomaterial alejada de cualquier insulto quirúrgico. El análisis gráfico de las U.H. se corresponde a la zona de cortical normal (X) de la figura 21, la medular tibial (Y) y el biomaterial (Z). Cada una de estas tres líneas trazadas a mano alzada y libremente tenía como objetivo el atravesar el biomaterial implantado, ya fuera dopado o no, y la cortical normal como muestra la figura 21. Esto se repitió en cada una de las piezas del estudio con el intento de hacer un proceso interpretativo desde el punto de vista estadístico, utilizándose la media aritmética de las tres líneas.

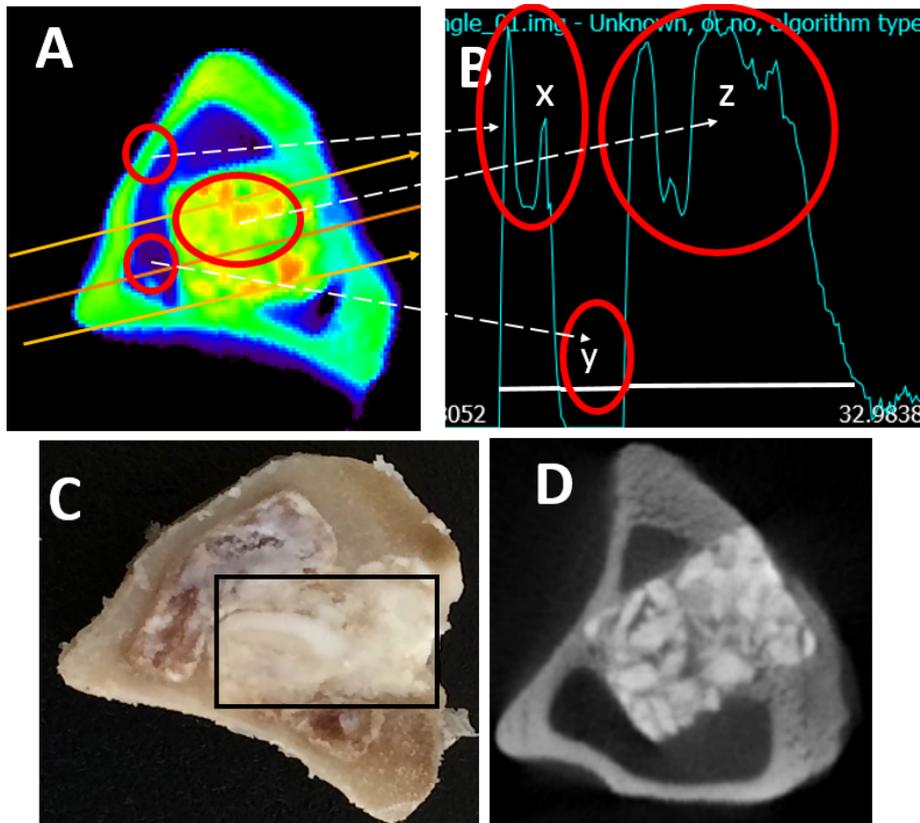


Figura 21 : A: Corte axial de microTC de la tibia con el biomaterial implantado y coloreado despues de aplicar el programa Amide a cada una de las piezas del estudio. Observe en la imagen C: imagen macroscopica de la seccionsea que incluye el biomaterial implantado y remarcado con un rectangulo negro. Y con la imagen D: corte de microTC visualizado, como habitualmente se hace, en tonos blanco y negro, donde se aprecia la tibia y el biomaterial implantado poroso donde el color blanco corresponde a los granos de distinto tamaño de la ceramica y el color oscuro a los poros. Esta imagen D es previa a la imagen A la cual corresponde a la misma imagen D reprocesada y coloreada con el programa Amide. En la figura A se realizan aleatoriamente tres lineas virtuales de corte, cuyos valores en U.H se someten a una media aritmetica que se traslada a una grafica (B). En esta grafica se identifican tres zonas delimitadas por circulos rojos y con flechas se establece la correspondencia entre la figura A y B: La zona “x” (corresponde al valor de la cortical normal); La zona “y” (corresponde al valor de la medular y por eso presenta U.H. tan bajos, y la zona “z” (corresponde al valor del biomaterial implantado en la tibia) y presenta valores altos correspondientes a los granos de ceramica.

Este estudio analítico estadístico interpretativo fue realizado a cada imagen de microTC correspondiente al biomaterial sin implantar y a cada muestra implantada a los 1, 3 y 5 meses, sin hacer diferenciación entre muestras dopadas y no dopadas. Se obtuvieron las graficas de las figuras 22 y 23 que representan las graficas obtenidas después de transportar a una tabla Excel los valores de las quince muestras y los dos biomateriales.

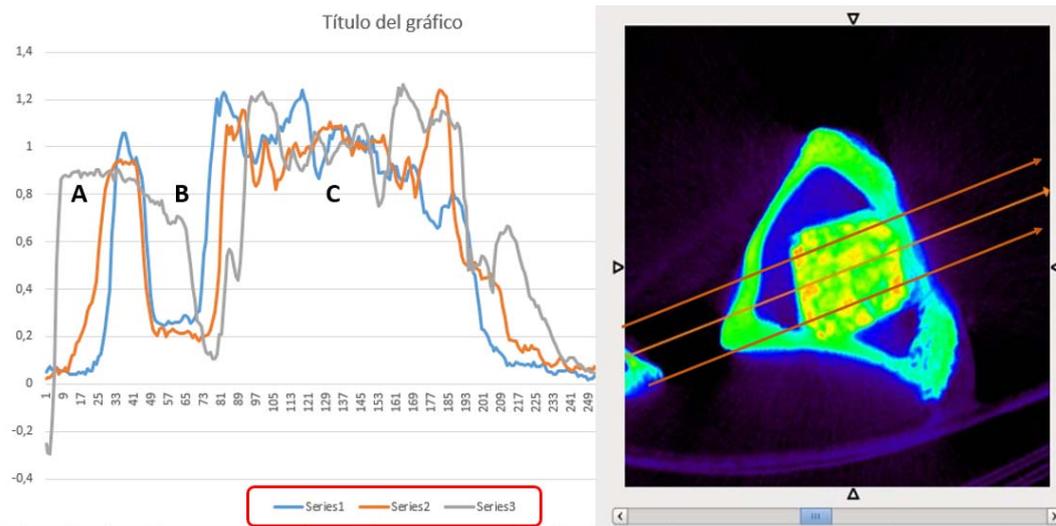


Figura 22: La imagen de la izqda. representa la gráfica Excel correspondiente a las tres líneas (azul, naranja y gris) de estudio trazadas sobre el corte axial del biomaterial dopado implantado 1 mes (imagen de la derecha) y que vienen definidas como series 1, 2 y 3 (rectángulo rojo inferior). Sobre la gráfica se ilustran con letras: (X) la zona que corresponde a la cortical normal o contralateral al lugar del implante del biomaterial, (Y) corresponde a la zona medular y por eso tienen sus pixeles valores bajos, y (Z) con unidades altas corresponden a los valores del biomaterial.

En la figura 23 se representan todas las gráficas superpuestas de todos los resultados de cada una de las muestras, dopadas y no dopadas, con su correspondencia entre las graficas y el nivel anatómico de corte efectuado con el microTC. Obsérvese que las graficas del biomaterial sin implantar sobresalen del resto de las gráficas (asterisco en la figura 23).

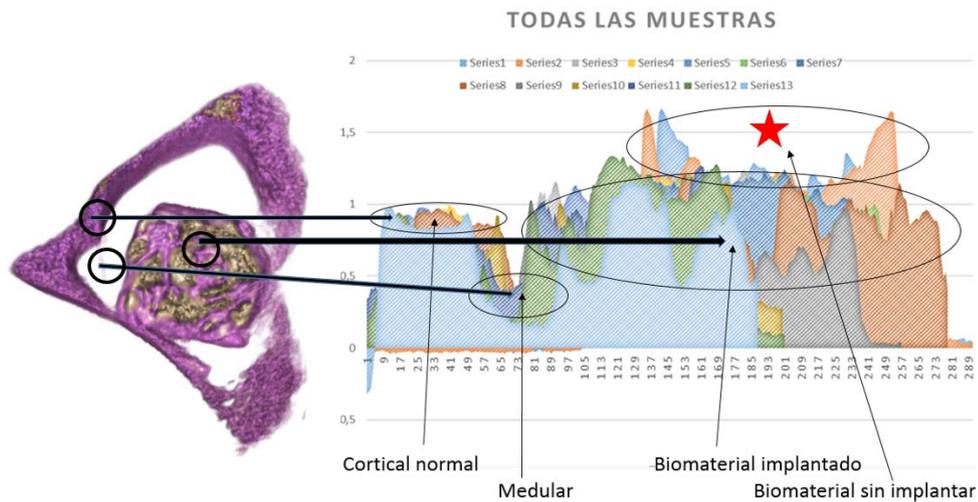


Figura 23: Gráfica del análisis estadístico interpretativo de todas las piezas dopadas y no dopadas y del biomaterial antes y después del implante, donde se aprecia la cortical normal, medular y del biomaterial implantado. El biomaterial sin implantar presenta valores en UH muy altos y corresponde a la grafica marcada con un circulo con asterisco en su interior.

Todos estos valores estadísticos fueron analizados conjuntamente y también de manera paralela se interpretaron los valores de los DATARAW mediante procedimientos matemáticos que se describen a continuación.

5.2.5.3. ANALISIS ESTADISTICO MATEMATICO. Selección y estudio matemático de los DATARAW

En este apartado los datos crudos, previos a su procesado para la obtención de la imagen de TC. Datos procedentes del microTC o DATARAW representan el valor de absorción en cada zona o voxel de la pieza. Se pretende que los resultados matemáticos confirmen y prueben la hipótesis de que el estudio digital de la imagen de microTC es similar a los hallazgos también digital o histomorfológico de la misma pieza estudiada y en el mismo nivel anatómico. Los resultados obtenidos mediante este modo validaran la utilidad predictiva del TC tal y como se ha planteado en la hipótesis (Figura 24).

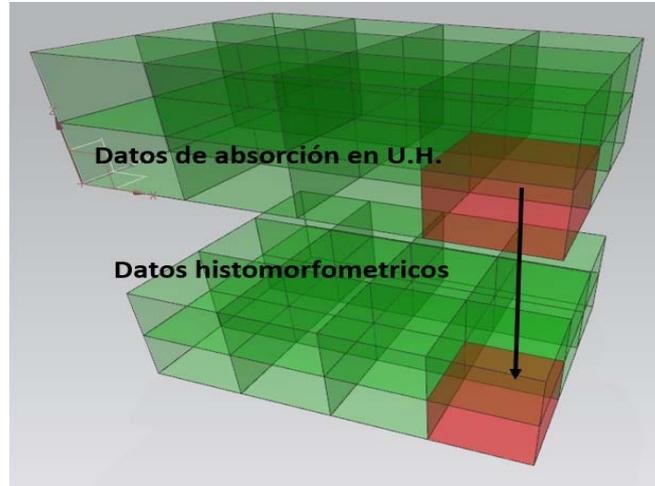


Figura 24: Esquema de correlación entre los datos de absorción del microTC medidos en U.H. y los datos de laboratorio del estudio histomorfométrico.

En este apartado los datos del microTC fueron exportados a un formato numérico y posteriormente analizado mediante el programa estadístico R, versión 3.2.3. (<https://cran.r-project.org/doc/manuals/r-release/R-intro.pdf>) El estudio se ha realizado en coordenadas cilíndricas, como muestra la figura 25, sistema que a priori se ajusta más a la geometría del problema y donde es más fácil expresar todos los valores numéricos del cilindro correspondiente al biomaterial. Se ha ajustado el modelo en las coordenadas cilíndricas (con ángulos en radianes) con interacciones y se ha vuelto a ejecutar eliminando los términos no significativos, para que no afecten al resultado.



Figura 25: A: Fotografía en dos proyecciones de la pieza del biomaterial (visión lateral oblicua y craneocaudal). B: esquema matemático de estudio de los valores de los píxeles obtenidos con el microTC. "r" representa el valor de cada voxel respecto al eje central "X" anteroposterior o longitudinal de la pieza.

Todos los valores RAW fueron procesados matemáticamente mediante un análisis de regresión lineal de los datos, 14153 puntos, de todas las piezas simultáneamente para intentar detectar relaciones significativas entre el valor de absorptividad en diferentes zonas de la pieza y la localización de esa zona, la activación de la pieza y el tiempo. También se incluyeron los términos de interacción entre las diferentes variables. Se aceptaron como resultados estadísticamente significativos cuando el valor de $p < 0.05$.

Basándonos en el concepto de ROI, definido como la parte localizada de la imagen seleccionada por el operador que tiene interés particular en un momento dado. Así se define según el glosario el glosario de términos más usados en tomografía computadorizada y publicada por la SERAM (Sociedad Española de Radiología Médica).

Para el estudio matemático de los DATARAW se seleccionaron a mano alzada y en cada una de las muestras del estudio y en las dos piezas de biomaterial sin implantar, 3 volúmenes de interés o áreas cilíndricas o cúbicas (ROI: Return on Investment) en los que se midió el coeficiente de atenuación en Tomografía Computarizada o absorción de cada uno de los voxels constituyentes del área de interés seleccionada. Cada área de estudio tiene un determinado constituyente de voxels que depende del volumen elegido.

Se eligieron y definieron tres tipos de ROI. Su descripción y objetivos perseguidos con cada uno de ellos fue el siguiente:

1. **ROI cilíndrico situado a mano alzada dentro del biomaterial.** Se delimito manualmente (mediante un procedimiento gráfico) la zona de interés de la imagen del microTC (figura 26), una zona cilíndrica de tamaño 5 mm de longitud x 4 mm de diámetro en el interior del biomaterial antes del implante y un cilindro de 4 x 4 mm en el biomaterial ya implantado en la tibia del animal. En este apartado se buscan datos que representen la evolución de **reabsorción** del biomaterial implantado basado en las unidades Hounsfield que resultan de la medición de todos los voxels contenidos en los 17 ROIs diferentes: 15 permanecieron implantados durante diferentes periodos de tiempo (1, 3 y 5 meses) y otras 2 muestras de material antes de ser implantado, que son los que se utilizan como control. Se dispondrá por tanto de los datos del microTC realizado a 17 ROIs. En resumen, con estos datos se pretende valorar la **reabsorción**, o sea la desestructuración, degradación o integración del biomaterial en el tejido óseo implantado (Figura 26). Se estudiarán los cambios

de homogeneidad que se produzcan en el biomaterial antes de implantar y durante el tiempo de estudio del biomaterial implantado, lo que será indicativo de que éste ha sufrido un proceso de cambio en su forma, y podrá significar que ha existido un proceso de integración en el hueso huésped con una remodelación en la forma primitiva que presentaba antes del implante.

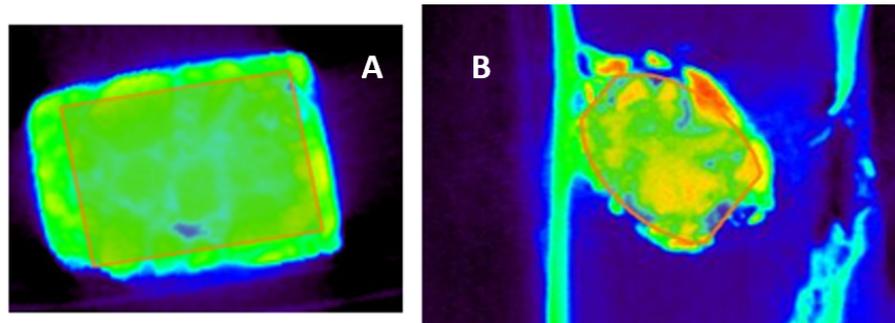


Figura 26: A: Imagen representativa de los ROI (cubo delimitado por la línea roja) de 5 x 4 mm en uno de los biomateriales previo a su implantación. B: Imagen representativa del ROI también delimitado por la línea roja, de 4 x 4 mm del biomaterial después de tres meses de ser implantado. Obsérvese el cambio morfología acontecido en el material. No se diferencia muestras dopadas de no dopadas.

Para interpretar los resultados de estos ROIs hemos de tener en cuenta que el biomaterial tiene una forma cilíndrica y se debe someter a un estudio de coordenadas cilíndrica y para ello debe conocerse el significado de los valores “X”, “r” y “phi” (figura 27). En la figura 25, 26, 27 y 28 se aprecia que el biomaterial cuya forma es cilíndrica se subdivide en muchísimos voxel para poder ser estudiado por el microTC. Cada voxel o punto del biomaterial viene posicionado en el espacio por tres coordenadas cilíndricas (X, r, phi) igual a las coordenadas geométricas (x,y,z) con las que estamos más familiarizados.

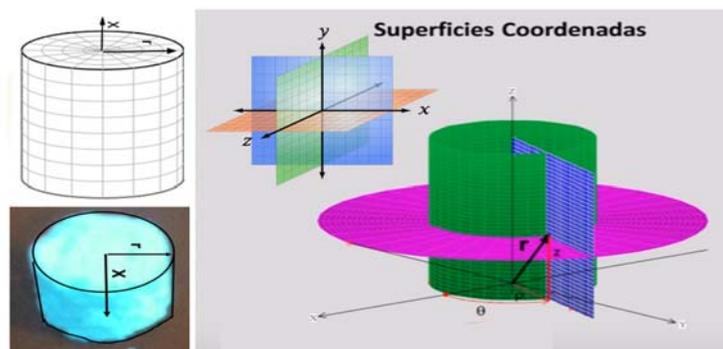


Figura 27: representación gráfica del biomaterial con una morfología cilíndrica. Los tres ejes correspondientes a las coordenadas (verde, violeta y rosa) delimitados por los tres ejes (verde, azul y naranja)

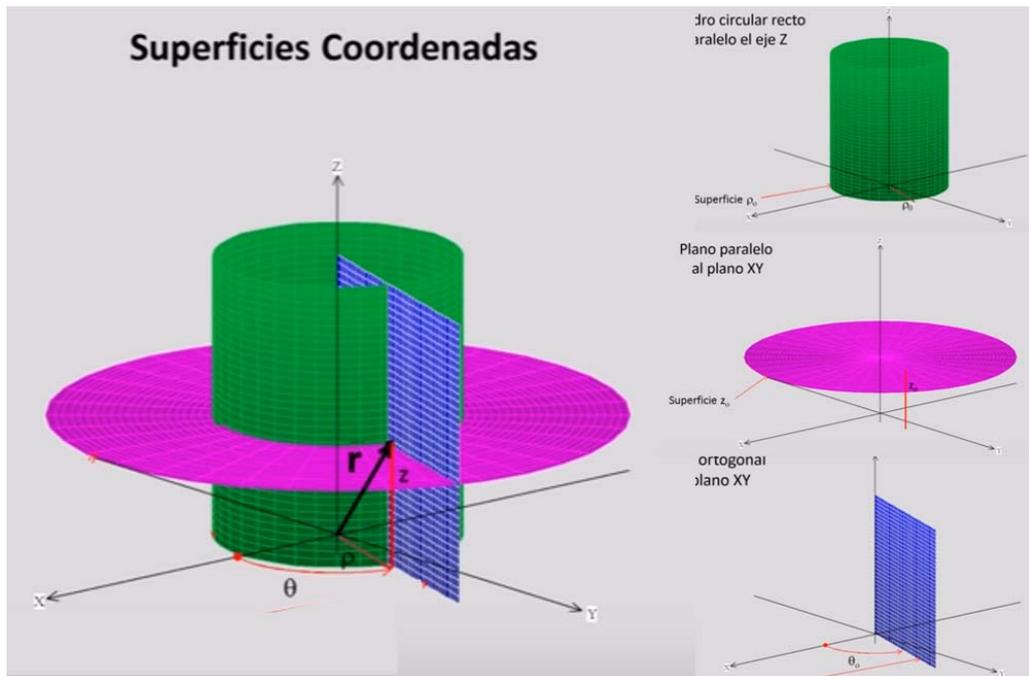


Figura 28: esquema representativo de los ejes X (verde), r (rosa) y ϕ (violeta) correspondiente a las coordenadas cilíndricas del biomaterial.

En las coordenadas cilíndricas (figura 28) el eje X (color verde) corresponde a la posición de cada voxel del biomaterial a lo largo del eje longitudinal de la pieza. El eje r (color rosa) corresponde a la distancia de cada voxel al eje central X, y el eje ϕ (color violeta) corresponde al Angulo que ocupa cada voxel respecto a los ejes X y r.

En la siguiente representación gráfica (figuras 29, 30 y 31) se puede imaginar cómo se constituiría o se formaría progresivamente el cilindro del biomaterial en cada plano o eje de coordenadas cilíndricas.

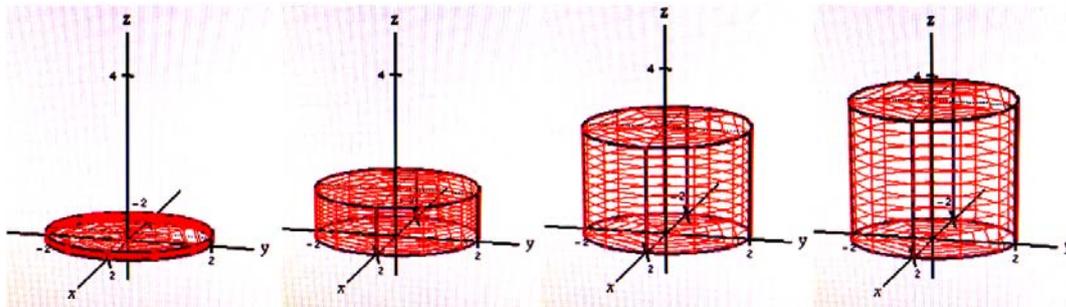


Figura 29: Representación gráfica de como se irian almacenando los voxel en el plano X, de izqda a dcha, de menor capas a mayor capas.

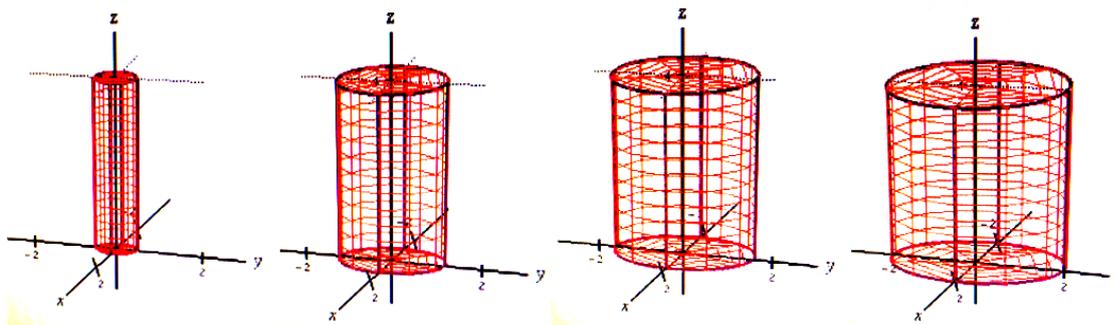


Figura 30: Representación grafica de cómo se irian almacenando o constituyendo los voxeles en el plano r, seria la distancia del voxeles al centro del eje X del biomaterial. Conforme aumenta el radio o distancia al eje X el voxel se situa mas periféricamente en la pieza del biomaterial.

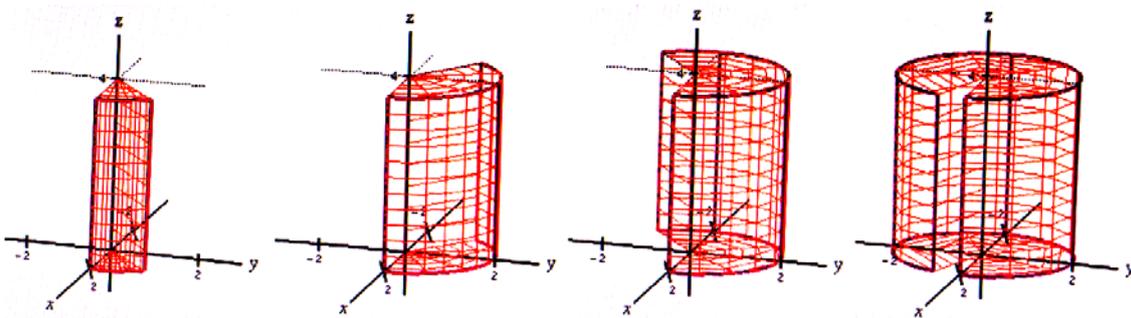


Figura 31: Representación grafica del valor “phy” de cada voxel situado en la pieza. Va a depender de su orientación en los planos X y r, o sea van a estar situados a una distancia determinada del eje X y en un ángulo determinado del plano r.

Con este estudio de coordenadas cilíndricas se puede entender el posicionamiento de cada voxel dentro de la pieza y sumándoles las variables del tiempo de evolución de la pieza implantada y de si ha sido dopada con MOD o no, se pueden hacer un estudio matemático de los valores DATARAW obtenidos o conseguidos del estudio mediante microTC de la pieza anatómica.

- ROI cubico de 10 x 10 x 10 mm trazado para que envuelva a todo el biomaterial y tejido corticomedular circundante y con el propósito de valorar la **dispersión** o **emigración** que sufren los gránulos que conforman el material cerámico dentro del propio hueso huésped a lo largo del estudio (Figura 32). La dispersión del biomaterial en tejido periférico se analizó, por tanto, seleccionando ROI cúbicos (10x10x10 mm) y una ventana > +1,10 HU. Como puede verse en la Figura 32. La dispersión se manifestaría como la pérdida del contorno compacto y uniforme periférico inicial del biomaterial (figura 26-A), siendo sustituido por una forma de contorno más irregular (Figura 26-B) y aumentando su porosidad. En resumen, en este apartado se evaluó el grado de **desestructuración** o pérdida de homogeneidad que sufre el biomaterial, tanto en su porción central como en su periferia. Se valora lo que equivaldría a lo que podemos definir como “efecto estallido” que experimentan todos los granos de cerámica del biomaterial a lo largo del tiempo del estudio.

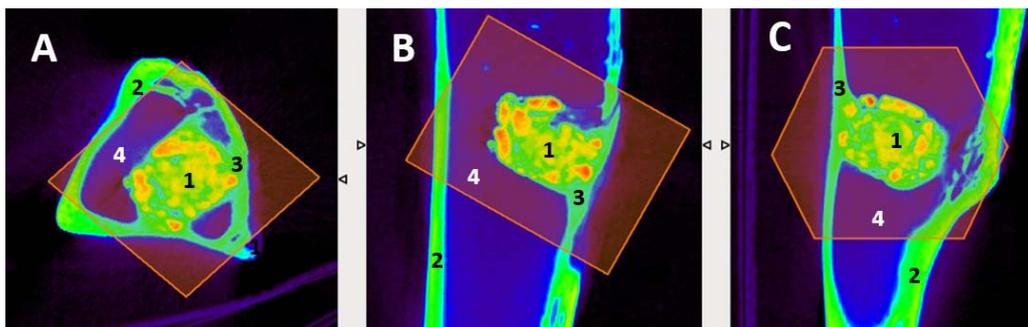


Figura 32 : ROI de 10 x 10 x 10 mm abarcando el biomaterial (1), la cortical sana (2), la cortical adyacente al injerto del biomaterial (3) y la cavidad medular de la tibia del conejo (4). Corte axial (a), sagital (B) y coronal (C).

3. ROI cilíndrico de 3 x 3 mm proyectados sobre la **cortical normal** alejada del material implantado y por tanto de cualquier agresión quirúrgica. Su objetivo fue determinar cuál es la evolución espontánea de la cortical normal del animal y que nos va a servir de control de todo el procedimiento de análisis (figura 33) ya que se estudiará si la cortical normal sufre cambios morfológicos a lo largo del tiempo del estudio. De todos los valores obtenidos hemos preseleccionado sólo los voxeles con Valor ≥ 0.5 , ya que igualmente se obtenían un número elevado de voxeles (177.876 como se observa en la figura 34) de los que solo consideramos de interés los valores correspondientes al tejido óseo cortical. Una vez calculado el valor medio de la absorptividad de cada muestra ajustamos un modelo de regresión lineal para estudiar la evolución que sufre cada muestra a lo largo del tiempo de estudio.

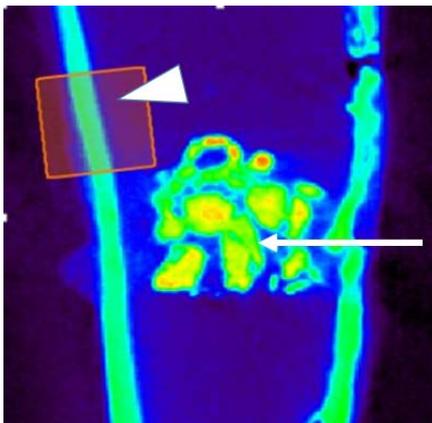


Figura 33 : ROI cilíndrico de 3 x 3 mm (cabeza de flecha blanca) situado en la cortical ósea alejada del defecto óseo llevado a cabo para la introducción del biomaterial (flecha blanca).

La figura 34 muestra, como intento aclaratorio, un resumen global de los tres ROIs descritos aplicados a una pieza cualquiera de todas las piezas estudiadas en los diferentes tiempos y tanto dopadas como no dopadas. Así mismo se explica la obtención de los valores absolutos (mediana, principal, variabilidad, desviación estándar, valor mínimo, valor máximo, tamaño en mm³, fracción de voxeles y número de voxeles), así como los valores totales RAW para su estudio matemático. Por tanto, de cada ROI se obtuvieron unos valores estadísticos predictivos y unos DATARAW.

Los voxeles estudiados en cada ROI fue de 420.410 en el primer ROI elíptico de 4 x 4 mm; de 8.146.024 voxeles en el segundo ROI cubico de 10 x 10 x 10 mm, y de 177.876 voxeles en el tercer ROI elíptico de 3 x 3 mm. De la cantidad tan enorme de datos que se obtuvieron de los ROIs cúbicos de 10 x 10 x 10 mm (8.146.024 voxeles) se hizo un estudio de preselección de datos para poder hacerlo practicable. Para ello se han preseleccionado solo los datos correspondientes a los voxeles con valor ≥ 1.100 unidades Hounsfield porque tan solo pretendemos centrar la atención en los granos del material cerámico compacto y valorar su disgregación o dispersión en la medular del hueso huésped donde ha sido alojado y este material cerámico tiene un valor

siempre superior a 1.100 unidades. Se han desechado los valores de la cortical, de la medular y del tejido de baja densidad o atenuación existente dentro del biomaterial.

Con estos voxeles seleccionados hemos calculado el “centro de masa” de toda la pieza, y la distancia media de los voxeles a ese centro de masa, ponderando proporcionalmente a la densidad de cada voxel. Ello nos permite cuantificar cuánto se ha dispersado la cerámica implantada en el hueso huésped. También hemos estimado su dispersión calculando la desviación típica ponderando del mismo modo. Se midió la “Distancia media” de los voxeles más densos para valorar su dispersión o movilidad dentro del hueso.

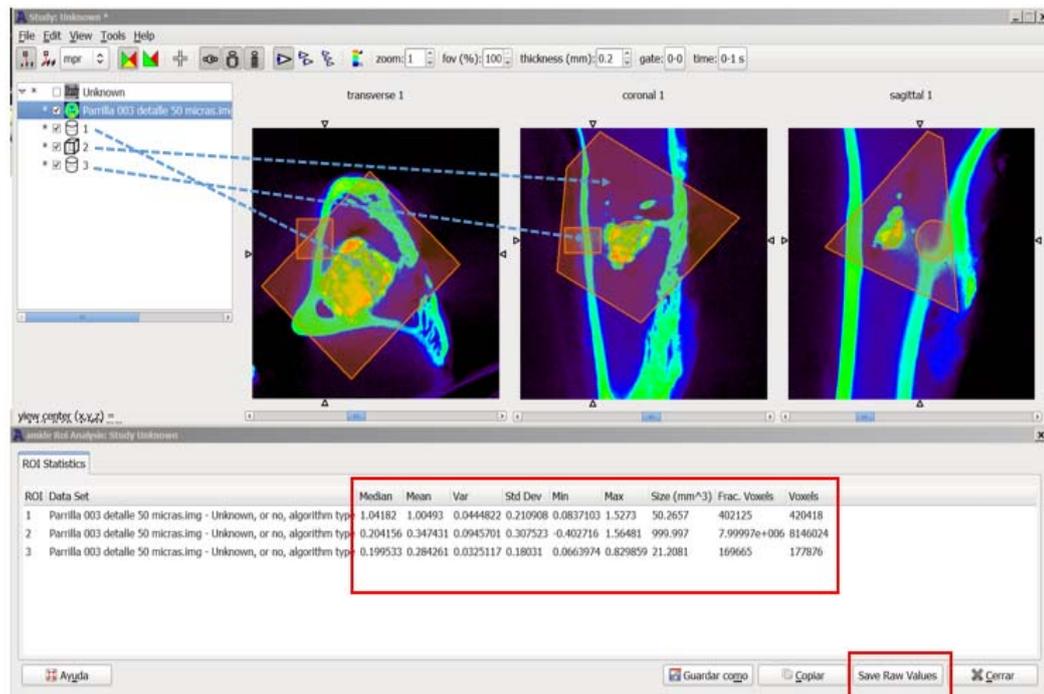


Figura 34. Imagen en la que se observan los tres ROIs (1 cilindrico intramaterial, 2 cubico abarcando toda la zona a estudiar y 3 cilindrico a nivel de la cortical normal), de cada ROI se obtendrán unos datos estadísticos (rectángulo rojo central) que se trasladarán a una tabla excel para su estudio y unos valores RAW (recuadro inferolateral rojo: Save Raw Values), que serán procesados matemáticamente en el departamento de bioestadística de la UCAM.

5.2.6 MÉTODO ANATOMOPATOLÓGICO

5.2.6.1. CORTES MACROSCOPICOS DE LAS PIEZAS OSEAS. FIJACION Y PROCESADO.

Una vez diseccionadas y extraídas las tibias y desprovistas de partes blandas, fueron sumergidas en formol tamponizado en una proporción de 1:10 (u/v). Seguidamente se realizaron secciones óseas perpendiculares al eje mayor de la diáfisis de las tibias mediante una mini-sierra circular eléctrica a baja revolución obteniéndose bloques de unos 3-4 mm de espesor, tal y como se muestra en las figuras 17 y 35. Los bloques obtenidos fueron clasificados según estuviesen: (1) implantados con el material únicamente (A-S); (2) implantados con material dopado con M.O.D. (A-S-MOD).

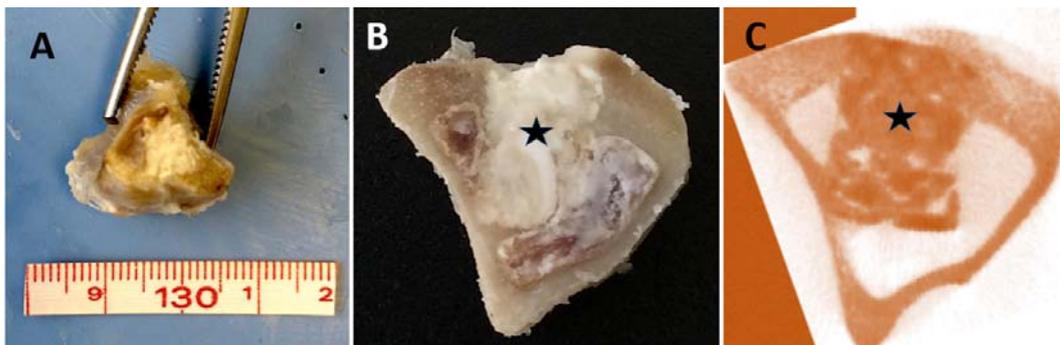


Figura 35: A: Imagen macroscópica representativa de una sección de corte de la tibia de 3 mm de espesor. B: imagen ampliada para visualizar mejor la diferencia entre la cortical ósea, la cavidad medular y el biomaterial que corresponde a la estructura blanquecina (*). C: corte de microTC con el biomaterial incluido (asterisco)

Estas secciones fueron fijadas en formol neutro tamponado al 4 % a pH 7.0 (Panreac Química, Barcelona, España) durante un período de mínimo de 48 horas. Previo a su procesado e inclusión en parafina, las muestras fueron sometidas a un protocolo de descalcificación usando una solución comercial basada en ácido fórmico al 26 % y citrato sódico 8% (TBD-2, Thermo Scientific®, Madrid, España). Para ello las muestras se sumergieron en un volumen de solución de descalcificadora con una proporción 1:20 (20 volúmenes de solución por volumen de muestra) durante 5-6 días, de acuerdo a las recomendaciones realizadas por el fabricante. Transcurrido ese tiempo, se descartó la solución, se comprobó el grado de descalcificación de las

muestras y se sustituyó por solución nueva manteniendo las secciones a temperatura ambiente hasta la completa descalcificación de las mismas.

Una vez descalcificadas las secciones óseas fueron lavadas en agua corriente y aclaradas en agua destilada, seguidamente fueron sumergidas en alcohol de 96º y posteriormente en alcohol absoluto durante 1 hora respectivamente a temperatura ambiente para proceder a su deshidratación. De modo breve, el procesado se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Lavado de los casetes que contienen la sección ósea descalcificada en agua corriente: 20 minutos.
2. Enjuague en agua destilada.
3. Inmersión de los casetes en etanol 96º (Technisolv®, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Francia), durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Inmersión de los casetes en etanol absoluto (Technisolv ®) durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Colocación de los casetes en el soporte. Inmersión del soporte en un baño especial con etanol absoluto (Technisolv®) resistente al microondas. Tratamiento de las muestras por microondas a 55ºC durante 25 minutos.
6. Inmersión del soporte con los casetes en un baño especial con 2-propanol puro (Panreac®) resistente al microondas. Tratamiento de las muestras por microondas a 55ºC durante 55 minutos.
7. Inmersión del soporte con los casetes en un baño especial con parafina líquida (Shandon Histowaxt®, Thermo Scientific., Madrid, España) resistente al microondas. Tratamiento de las muestras por microondas a 70ºC durante 1 hora y 15 minutos.

Tras la inclusión en parafina de las muestras, se procedió a la elaboración de los bloques de parafina. Así, tras el enfriado previo de los bloques en placa fría (Thermo Histostar ®, Thermo), se realizaron secciones de 3 micrometros utilizando un micrótopo de rotación Shandon Finesse 325 (Thermo®). Las secciones se depositaron sobre la superficie del agua de un baño maría calentado a 40º- 45º C (Kunz Instruments®, Nynasham, Suecia) para favorecer el estirado de las mismas, recogiénolos posteriormente en portaobjetos con carga electrostática (Superfrost®, Waldemar Knittel, Braunschweig, Alemania). Por último, los cortes se introdujeron en una estufa a 60º durante 1 hora, y almacenados hasta el momento de su tinción con Hematoxilina-eosina (H-E).

Una vez teñidas las secciones se observaron con fotomicroscopio Leica DM5000B con cámara digital (Leyca microsystems® Barcelona, España).

5.2.6.2.- ANALISIS HISTOPATOLOGICO

Para el análisis histopatológico de las secciones óseas, estas fueron teñidas con Hematoxilina-eosina (HE), de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1- Desparafinado en sustituto de xileno (Thermo®) (2 x 7 min).
- 2- Rehidratación de los cortes usando concentraciones decrecientes de etanol:
 - Etanol absoluto (2 X 5 min).
 - Etanol 96% (5 min).
 - Etanol 70% (5 min).
- 3- Lavado en agua corriente (5 min).
- 4- Enjuague en agua destilada y contraste con Hematoxilina acidificada de Harris (Thermo®) (5 min).
- 5- Lavado en agua corriente (5 min).
- 6- Deshidratación de las muestras en etanol 70° (5 min).
- 7- Contraste con Eosina alcohólica (Thermo®) (3 min).
- 8- Lavado rápido en agua corriente (10 seg).
- 9- Deshidratación en etanol en concentración creciente:
 - Etanol 96° (2 x 20 seg).
 - Etanol absoluto (2 x 5 min).
- 10- Aclarado en sustituto de xileno (Thermo®) (2 x 5 min).
- 11- Montaje en medio no acuoso (Neo-Mount; Merck®, Madrid, España).

5.2.6.3.- ANALISIS MORFOMETRICO

El análisis morfométrico se realizó igualmente a partir de secciones descalcificadas y teñidas con H-E (Figura 36):

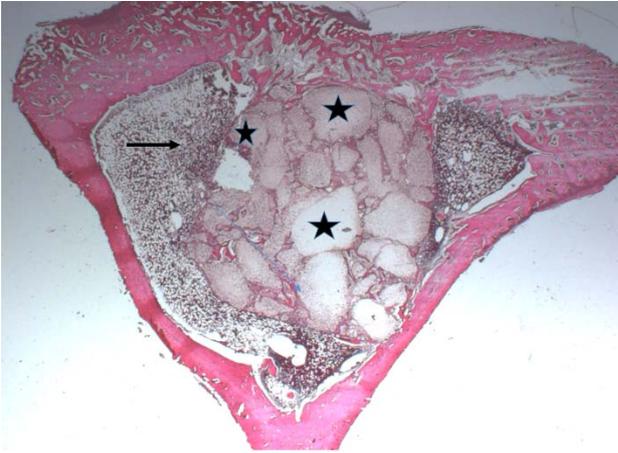


Figura 36: Sección histológica que incluye material implantado (asteriscos) dentro de la cavidad medular (flecha) y teñida con Hematoxilina-eosina. Magnificación: 5,7 X

Posteriormente se realizó el estudio (Figura 37):

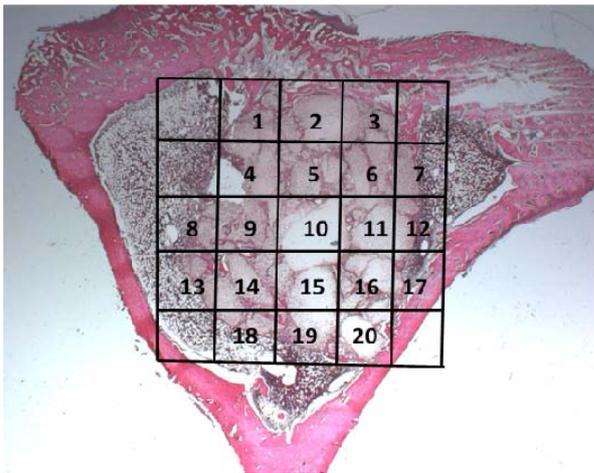


Figura 37: Sección histológica en donde se detallan las áreas seleccionadas para el análisis histomorfométrico (H-E, 5,7 X)

De cada imagen a 50X (Figura 38) se calculó la superficie total del implante presente en la imagen. Posteriormente, se calculó la superficie de cuatro elementos identificables dentro del implante.

- Material acidófilo (color rojo en la tinción de H-E), de aspecto “harinoso”, identificado como implante no absorbido (Figura 38,1)
- Tejido morfológicamente compatible con tejido óseo neoformado (Figura 38,2).
- Tejido morfológicamente compatible con tejido conectivo (Figura 38,3).
- Material basófilo (color azul intenso en la tinción de hematoxilina-eosina), de aspecto “harinoso”, localizado en acúmulos densos en el límite entre el material no absorbido y el tejido óseo neoformado, denominado como “material especial” (Figura 38,4).

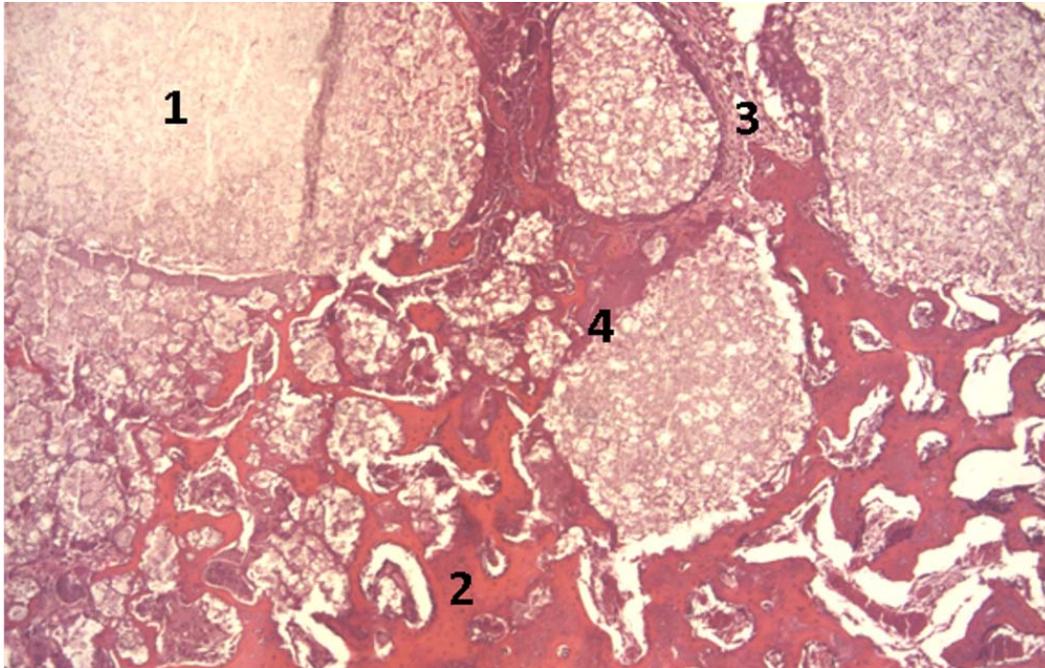


Figura 38: Imagen representativa de una sección histológica en donde destaca: (1) Implante no absorbido; (2) tejido óseo neoformado; (3) tejido conectivo, y (4) material especial no identificado. (H-E, 50 X).

Para calcular la superficie de los elementos 2, 3 y 4 se delimitó de forma manual la superficie de cada uno de ellos mediante un software informático de captura y procesado de imágenes (AxioVision Rel. 4.8®, Zeiss, Paris) de la Plataforma de Patología del Instituto Murciano de Investigación Biomédica de la Arrixaca (IMIB-Arrixaca). Para calcular la superficie de elemento identificado como implante no reabsorbido, se utilizó la siguiente fórmula:

$$1 = \text{Superficie total de implante de la imagen} - (2+3+4).$$

Para poder determinar las superficies de cada componente con la máxima precisión posible, el análisis morfométrico se repitió a 3 niveles diferentes de cada muestra, desbastando previamente el bloque de parafina 300 micrómetros entre cada nivel.

Método estadístico: Para observar diferencias estadísticamente significativas de las variaciones de cada uno de los componentes del implante analizados en función del grupo y del tiempo, se realizó un análisis no paramétrico de dos muestras independientes (Mann-Whitney test) con un nivel de significación del 95% de confianza ($p < 0.05$).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 RESULTADOS CON LA TÉCNICA MAMOGRÁFICA

Las figuras 39 y 40 muestran los resultados de hacerles un estudio mamográfico o estudio radiológico simple de la más alta resolución a todas las muestras. En la figura 34 se observan las piezas de tibia antes de ser seccionadas y tomando como referencia el periodo de 1, 3 y 5 meses y en la figura 35 el estudio radiográfico mediante mamografía de las secciones obtenidas de las mismas muestras anteriores.

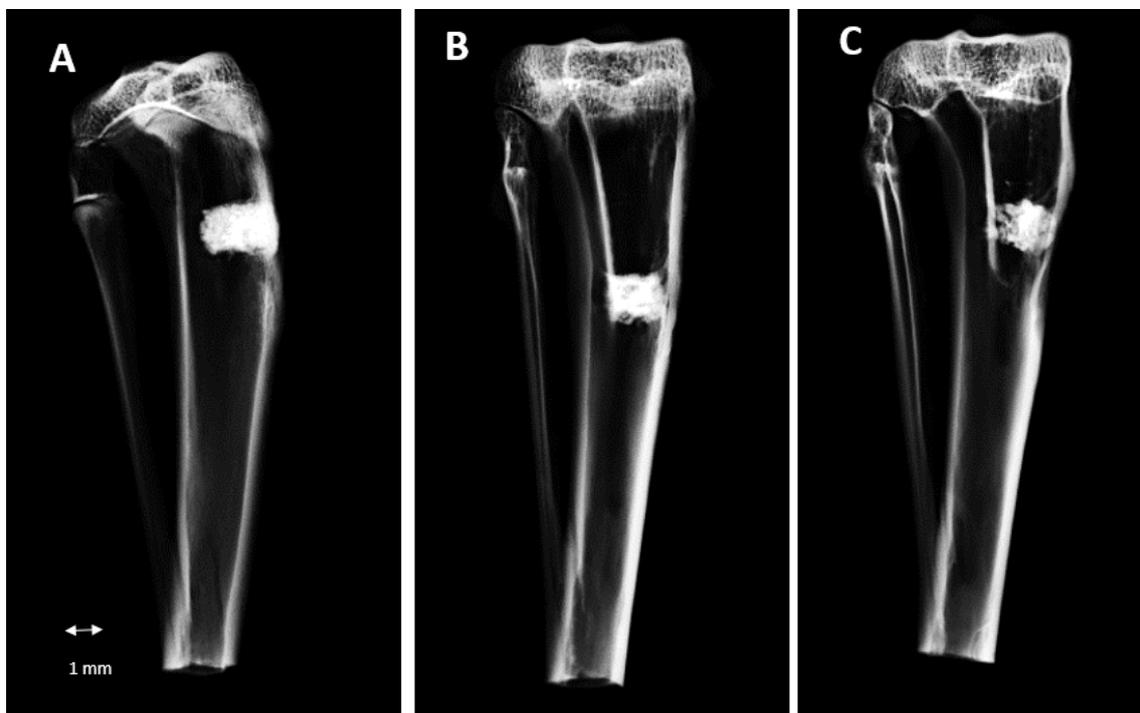


Figura 39. Imagen mamográfica representativa en proyección anteroposterior de la muestra del biomaterial implantado sin diferenciar dopado y no dopado y al periodo de 1 mes (A), 3 meses (B) y 5 meses (C). En ellas se puede observar un cambio en la morfología del biomaterial.

Al primer mes (figura 39 A) de la implantación se observaba el material de una forma geométrica rectangular, de bordes lisos y de densidad radiológica bastante homogénea y muy superior su densidad a la de la cortical ósea de la tibia.

Al tercer mes, (figura 39 B) lo más destacable radiológicamente es que el biomaterial ha experimentado una disminución de su volumen y una mayor heterogeneidad en su densidad, con trayectos radiolúcidos en su interior. Los

márgenes periféricos del biomaterial se han hecho irregulares y se insinúa la aparición de trayectos óseos densos.

Al quinto mes, (figura 39 C), destaca un cambio total en la morfología geométrica del material adquiriendo un aspecto más redondeado y con acentuada irregularidad de su contorno y una densidad radiológica sensiblemente inferior a los estadios precedentes. Existe un intento de trabeculación entre el biomaterial y la cortical tibial.

En los cortes axiales (figura 40) también se puede apreciar cambio en la morfología del material con el paso del tiempo, asociado a pérdida del aspecto denso uniforme como consecuencia de la reabsorción del material.

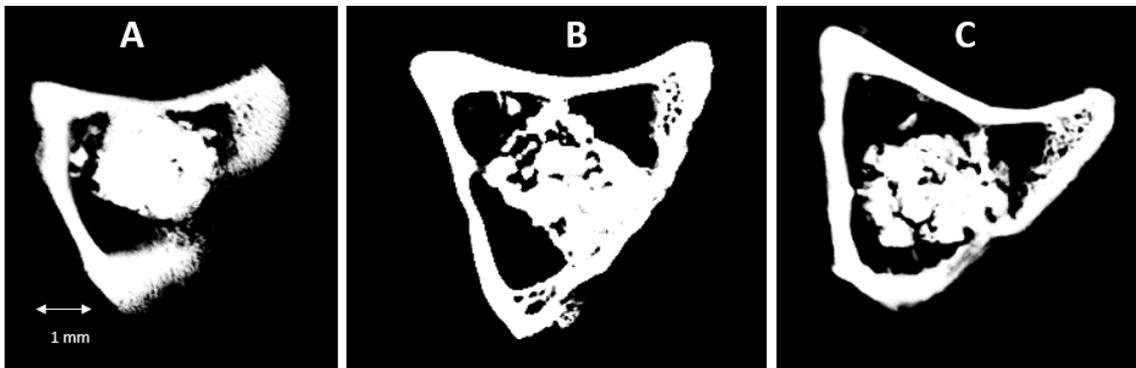


Figura 40. Imagen representativa de la obtención con técnica mamografía de la imagen de los cortes axiales del biomaterial y correspondientes a los periodos de 1 mes (A), 3 meses (B) y 5 meses (C).

A un mes de la implantación del biomaterial no se pueden ver los pequeños poros que existen en su interior. En los dos últimos periodos, a los 3 y 5 meses, con frecuencia los granos que integran los biomateriales ya se pueden observar e individualizar, consiguiéndose ver una línea radiotransparente o radiolúcida tanto en el interior como en los márgenes del biomaterial. (Figura 40 B y C).

Los resultados obtenidos con esta técnica son meramente descriptivos y de una calidad y precisión inferior a la que se verá que proporciona el microTC por lo que son meramente de registro fotográfico ya que no aportaban más información de interés que la que proporciona el microTC. Debido a esto no se procedió a su estudio matemático descartándose la técnica como de utilidad para alcanzar los objetivos propuestos.

6.2 RESULTADOS CON LA MICRO-TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

6.2.1. INTERPRETACION DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS EN EL PLANO AXIAL Y REFORMATEADAS AUTOMATICAMENTE EN LOS PLANOS SAGITAL Y CORONAL

En la figura 41 se muestran los cortes de microTC de 50 micras seleccionados como representativos del biomaterial sin implantar y de cada periodo de tiempo (1, 3 y 5 meses postimplantación) y sin diferenciar muestras dopadas de no dopadas. Son visualizados en escala de grises, que es la forma habitual de presentación de las imágenes obtenidas y reprocesadas por el TC, en este caso microTC. Figura 41a corresponde al biomaterial sin implantar y las figuras 41 b, c y d al biomaterial implantado al primer, tercer y quinto mes respectivamente.

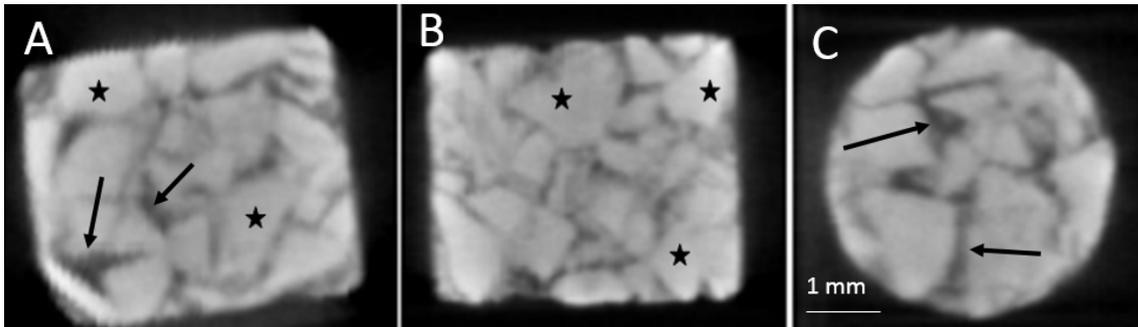


Figura 41 a : Biomaterial sin implantar. Aspecto escanografico del cilindro del material previo a su implantacion en cortes axial (A), sagital (B) y coronal (C). Observe la distribucion de los granos hiperdensos del material que lo integran y de su morfologia irregular y de tamaño variable (asterisco), al mismo tiempo destacar en las imágenes unas líneas irregulares hipodensas radiotransparentes que corresponden a poros y trayectos de apariencia desorganizada (flechas) como consecuencia del proceso de síntesis aplicado para obtener el material.

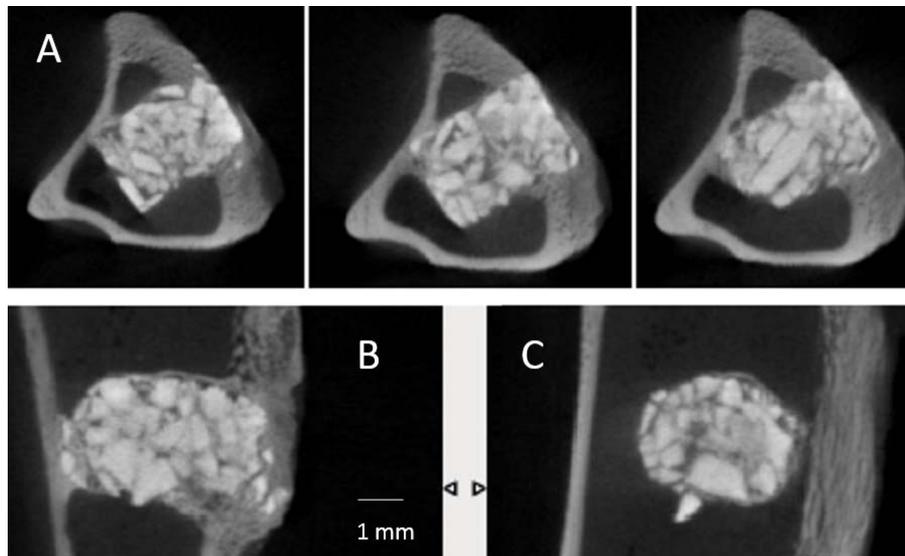


Figura 41 b : MUESTRA 1 MES POSTIMPLANTE. Imagen microTC de las secciones axiales (A), coronal (B) y sagital (C) realizadas a una muestra correspondiente al mes de la implantacion y sin diferenciar dopada de no dopada. Se aprecia que los granos de ceramica hiperdensos y las lineas hipodensas o radiotransparentes son similares a las visualizadas en la figura 36 a correspondientes al biomaterial antes de su implantacion.

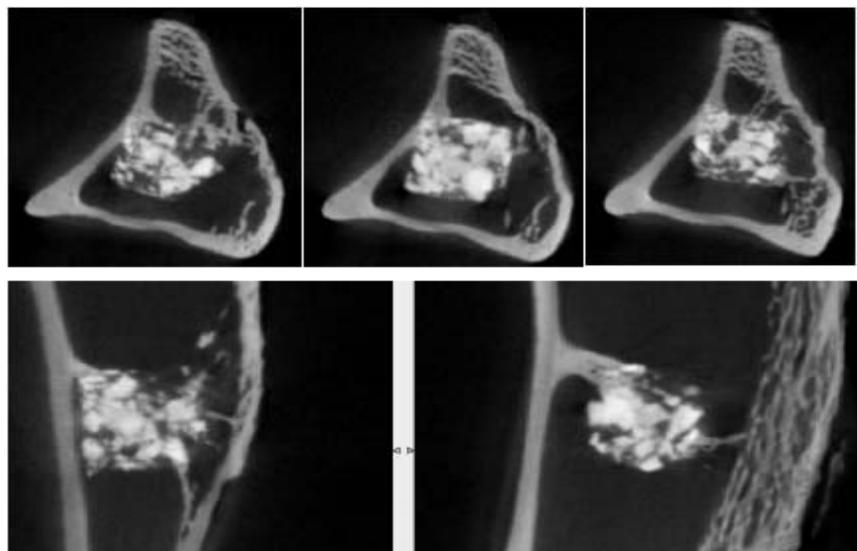


Figura 41 c: MUESTRA 3 MESES POSTIMPLANTE. Arriba (A) los cortes axiales del microTC y abajo (B) reconstruccion en el plano coronal y (C) en el plano sagital. Se puede observar como los granos del biomaterial estan mas dispersos y las lineas radiotransparentes intramaterial son de mayor tamaño (flechas). Asi mismo el biomaterial ha perdido su forma nitida rectangular y se ha hecho mas irregular y heterogeneo. Tambien se puede apreciar algun trayecto trabecular entre el biomaterial y la cortical osea del huesped.

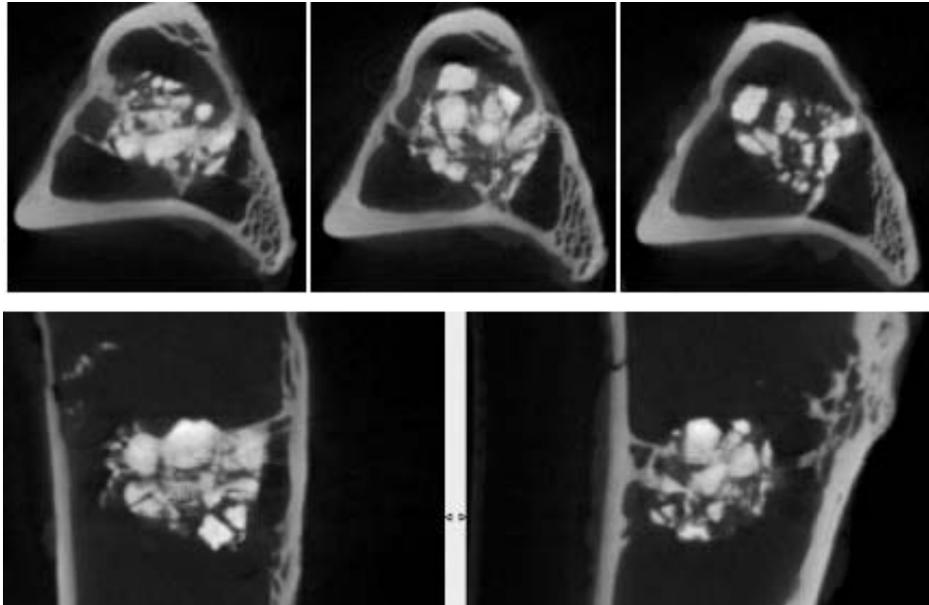


Figura 41 d: MUESTRA 5 MESES POSTIMPLANTE. Arriba (A) los cortes axiales del microTC y abajo (B) reconstrucción en el plano coronal y (C) en el plano sagital. Se aprecia que aumenta el espacio hipodenso intramaterial (flecha) así como la formación de trabéculas (asteriscos) localizadas en la cavidad medular ocupando el espacio entre el biomaterial y la cortical tibial, lo que indica formación de trabéculas nuevas.

Ante la visualización e interpretación radiológica de estas imágenes correspondientes al biomaterial y a cada periodo de tiempo del estudio, se concluye en la siguiente descripción: *“En las imágenes se aprecia que el biomaterial, antes de implantar y a lo largo del periodo de estudio sufre un importante proceso de reabsorción con disminución de los granos de elevada densidad radiológica correspondientes al biomaterial y existiendo un mayor espacio libre de densidad radiológica menor entre ellos delimitándolos”*, como después se demostrara con el estudio matemático de los datos RAW que aporta el TC. *“Así mismo no solo disminuyen los granos de biocerámica sino que también sufren un proceso de disgregación y dispersión. Es de notar también como entre el biomaterial y la cortical adyacente se interponen unos trayectos trabeculares neofromados de densidad similar a la cortical ósea o trabecular que se hacen presentes tanto en los cortes axiales como en las reconstrucciones con 3D. Dando la impresión de que el biomaterial es invadido por material hipotenso o de densidad similar a “partes blandas” y que aparecen trabéculas óseas entre el biomaterial y la cortical ósea adyacente”*.

Los cortes anatómicos obtenidos con el microTC primeramente fueron estudiados en escala de grises. Posteriormente utilizando diferentes ventanas de color ofrecidas por el programa Amide se obtuvieron diferentes formas de visualización en diferentes colores de los mismos cortes obtenidos (Figura 42).

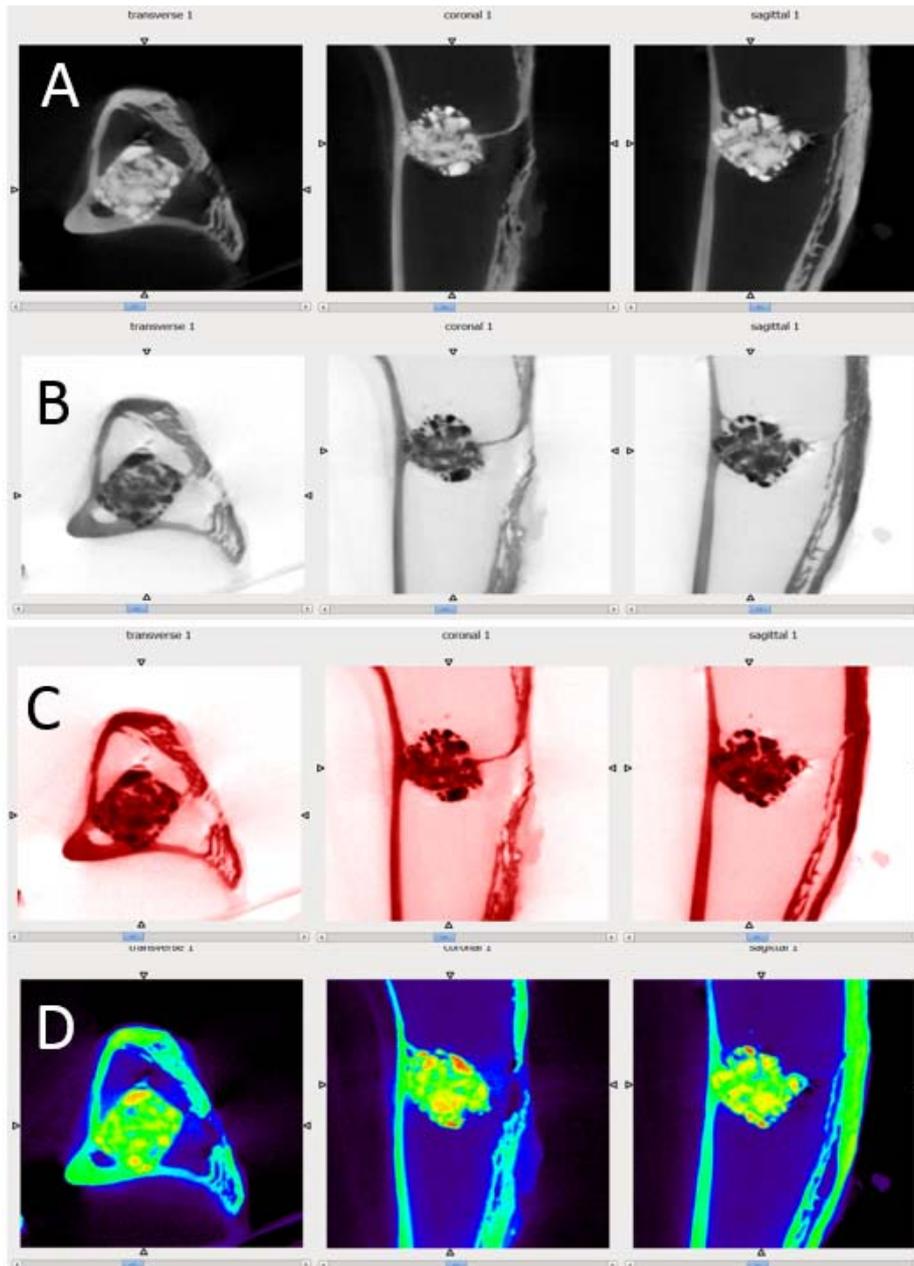


Figura 42: En las filas superiores A y B las mismas imágenes axiales o transversales, coronales y sagitales obtenidas con el microTC y reprocesadas en un principio en escala de grises (blanco-negro e invertido). Posteriormente en la fila C se presentan las misma imágenes pero usando un color ofertado por el programa Amide donde se intenta emular a la tinción con Hematoxilina-

eosina. En la fila D el resultado final después de ensillar con todas las escalas de colores ofertadas por el programa Amide y seleccionando estos niveles de color por ser considerados los más representativos de los diferentes tejidos que constituyen el estudio del biomaterial y de la tibia en la que se implanta.

Según las diferentes capacidades de absorción que presentan al haz de rayos X del microTC a los diferentes componentes del biomaterial y de la tibia en que se implantan, resultan unas Unidades Hounsfield que pueden ser representadas en escala de grises, como hasta ahora se han visto, o en escala de colores como se presentan en la figura 43. El biomaterial implantado evoluciona durante el tiempo y cambia de Unidades Hounsfield y por tanto de color en función del tejido que se genere dentro del biomaterial y entre éste y la cortical adyacente. Todo ello debe ser posteriormente corroborado con el estudio histológico.

En la figura 43 se hace una interpretación descriptiva del valor de los tejidos en Unidades Hounsfield y el color aceptado después de procesar las imágenes con el programa Amide

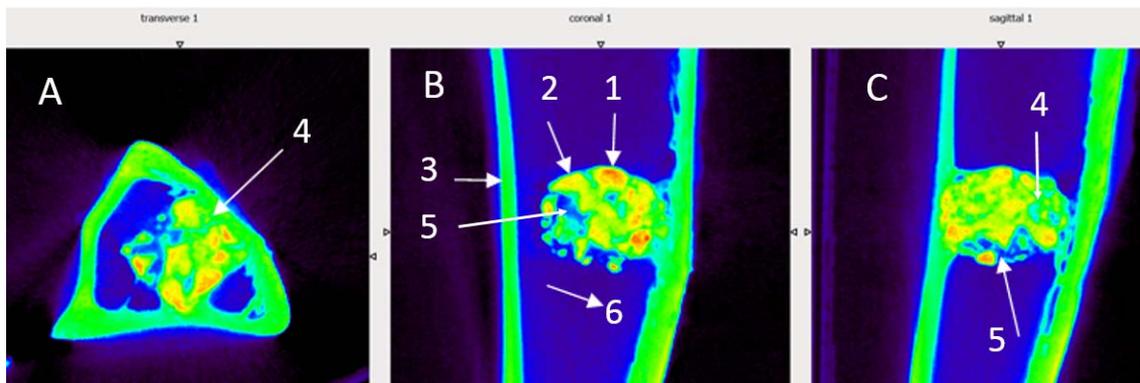


Figura 43: Correlación de los valores Hounsfield de la estructura ósea y el biomaterial implantado sin hacer diferenciación entre dopado y no dopado. Las imágenes axiales (A), coronales (B) y sagitales (C) presentan unas flechas y números cuya explicación se encuentra en el texto.

1. Flecha tejido naranja: 1.300 unidades y corresponde a granos del biomaterial.
2. Flecha tejido amarillo: 1.200 unidades y corresponde al biomaterial reabsorbido parcialmente.
3. Flecha tejido verde de la cortical ósea: 1.000 unidades y corresponde a hueso cortical normal

4. Flecha tejido verde dentro del biomaterial: 800 unidades y corresponde al biomaterial reabsorbido o material en donde se encuentran dispersos los granos de cerámica.
5. Flecha tejido azul intramaterial: 400 unidades y corresponde al tejido de reemplazamiento del biomaterial, que será estudiado anatomopatológicamente y se supone que pudiera corresponder a tejido óseo, conectivo, fibroso, etc. Será motivo de discusión en su apartado correspondiente.
6. Flecha tejido azul extramaterial: 250 unidades y corresponde a la cavidad medular ocupada por médula ósea hematopoyética.

Si comparamos, a modo de ejemplo, las imágenes obtenidas con la técnica mamográfica (Figura 44) con las imágenes obtenidas con el microTC (figuras 41) reformateadas en los tres planos del espacio y en 3D, se aprecia que las diferencias en calidad y detalle de imagen en favor del microTC son muy significativas, lo que inutiliza la técnica mamográfica utilizada en estudios anteriores (Castaneda, 2006).

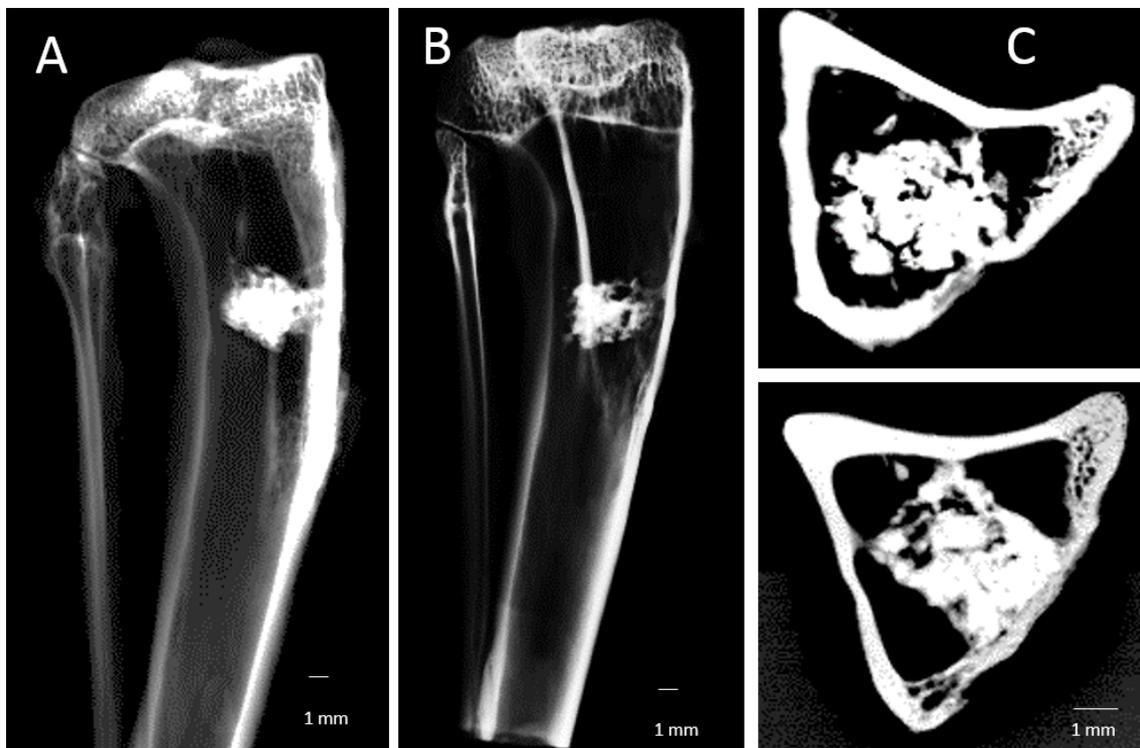


Figura 44. Mamografía mediante tomosíntesis automática (A) y magnificada (B) de la pieza completa conteniendo uno de los biomateriales e imágenes de las secciones (C).

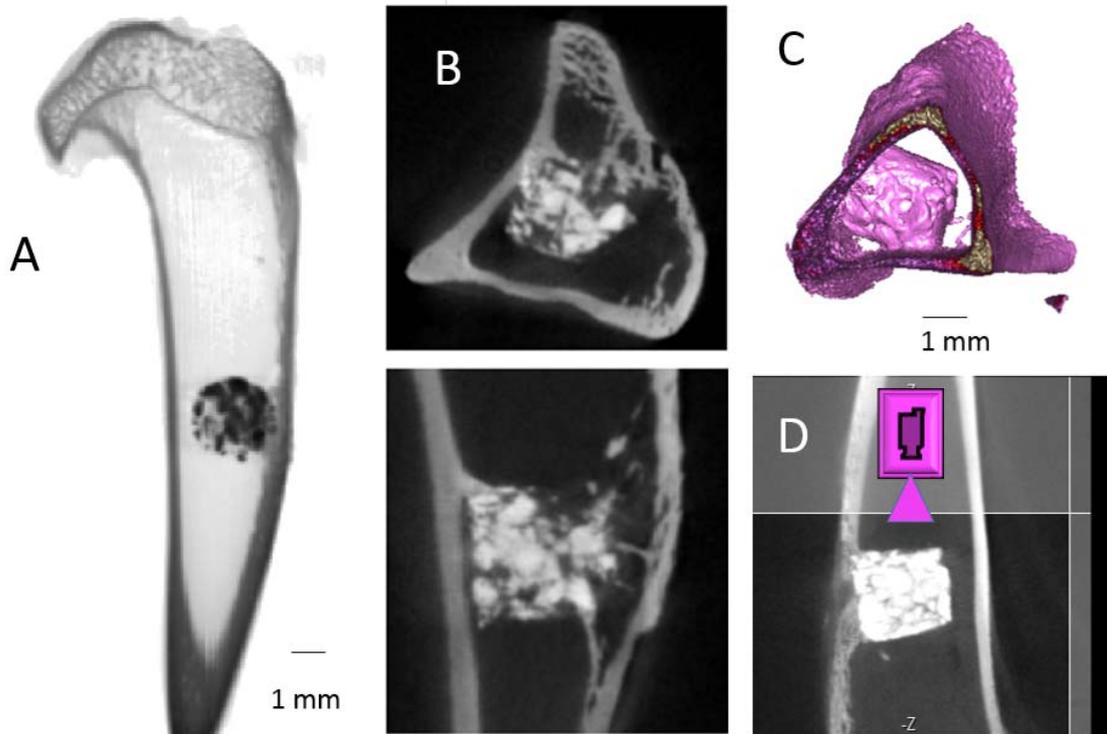


Figura 45: Imágenes obtenidas con microTC reformateadas en el plano coronal (A), obsérvese la buena identificación anatómica de la epífisis tibial, la metáfisis y la cortical con el implante intramedular del biomaterial, (B) cortes axial y coronal al nivel tibial donde se encuentra alojado el biomaterial. (C) imagen en 3D de la tibia y el biomaterial obtenida desde un plano de visión descrito en la imagen D. (D) Imagen reformateada en el plano sagital donde se ha colocado mediante una herramienta del programa Volview una cámara virtual (icono coloreado en rosa) en una localización seleccionada a mano alzada y de nuestro interés como se muestra en la figura (D) y obteniéndose la imagen en 3D (C) que permiten ver el biomaterial dentro de la cavidad medular en 3D y objetivándose no solo el biomaterial sino la cortical tibial

La visualización en 3D de las imágenes obtenidas con el microTC en el plano axial se procederá a su interpretación y descripción en el siguiente apartado

6.2.2. ANALISIS E INTERPRETACION EN 3D DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS CON EL MICROTCT EN PLANO AXIAL Y REPROCESADAS CON EL PROGRAMA VOLVIEW.

En el análisis con el programa Volview de las imágenes adquiridas en el plano axial con el microTC. Se obtuvieron un total de unas 800 a 1000 imágenes

correspondientes a cada uno de los cortes axiales realizados a cada una de las muestras de estudio sin diferenciar en ningún momento entre dopadas y no dopadas.

Los cortes axiales fueron reprocesados haciéndose reconstrucciones en 3D mediante el programa Volview (figuras 45, 46, 47 y 48). La pieza anatómica tibial completa se estudió desde la epífisis hasta la diáfisis incluyendo con mayor interés la zona de implantación del material.

En la figura 46 se aprecian los cortes finos de 50 micras obtenidos siempre en el plano axial y los cortes reformateados y visualizados en los planos coronal y sagital. Sobre estos se trazó a mano alzada la selección de la muestra de la pieza que quisimos representar en 3D. Todo ello realizado con el programa Volview, seleccionando de forma manual el nivel y grosor del corte a reformatear y reconstruir, teniendo en cuenta el grado de inclinación y rotación de la imagen en 3D.

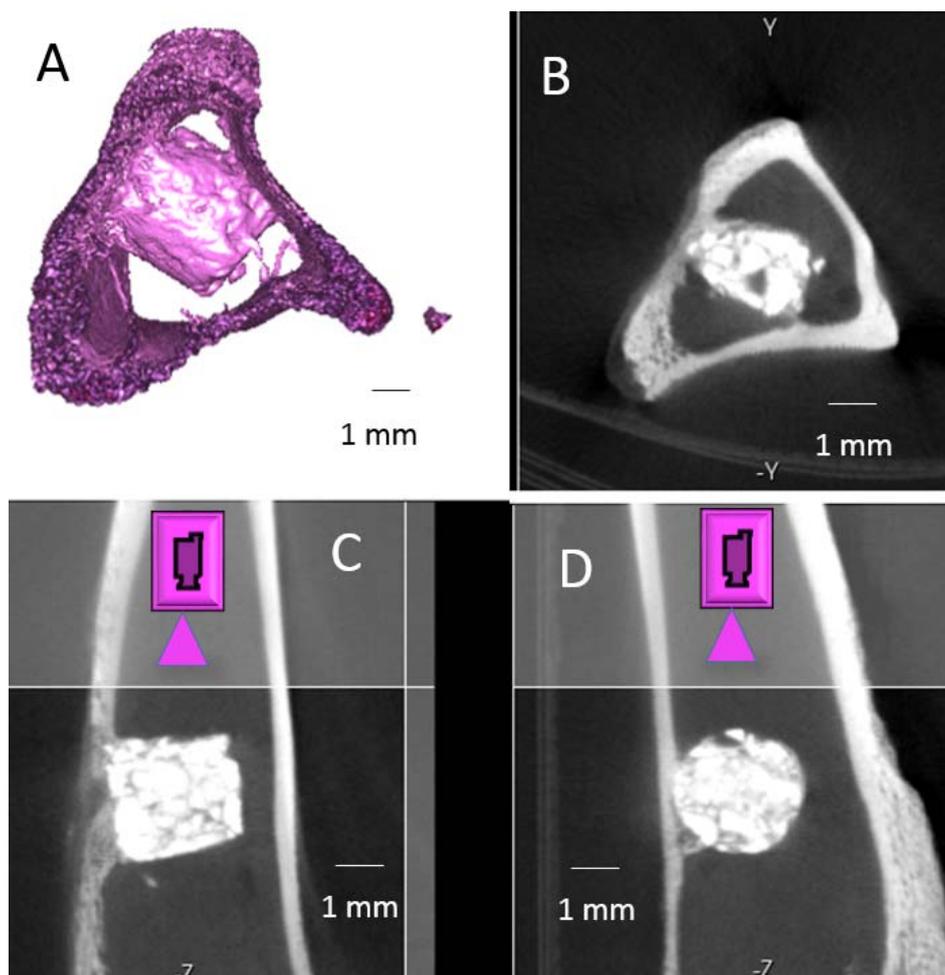


Figura 46: Reprocesado de la imagen en 3D (A) a partir de los cortes axiales B y reformateados en los tres ejes del espacio, sagital (C) y coronal (D). La imagen en 3D de la figura A corresponde a la visualización del biomaterial dentro de la medular tibial visualizado desde la cámara virtual representada con icono de color rosa en las imágenes C y D. En este caso la muestra ejemplo correspondía al periodo de 1 mes postimplantación y sin diferenciar dopado de no dopado.

Mediante esta reconstrucción se puede observar el biomaterial situado en la cavidad medular desde una perspectiva de visión intramedular epifisaria y diafisaria (figura 47 B) según se coloquen a mano alzada las cámaras virtuales de visualización. El programa permite técnicamente recortar la imagen por el nivel que se desee tal como se muestra en las figuras 45 y 46 (zonas semitransparentes de las imágenes C y D, donde está colocada manualmente la cámara virtual. Esto nos permite reconstruir un mayor o menor volumen de la pieza anatómica tibial.

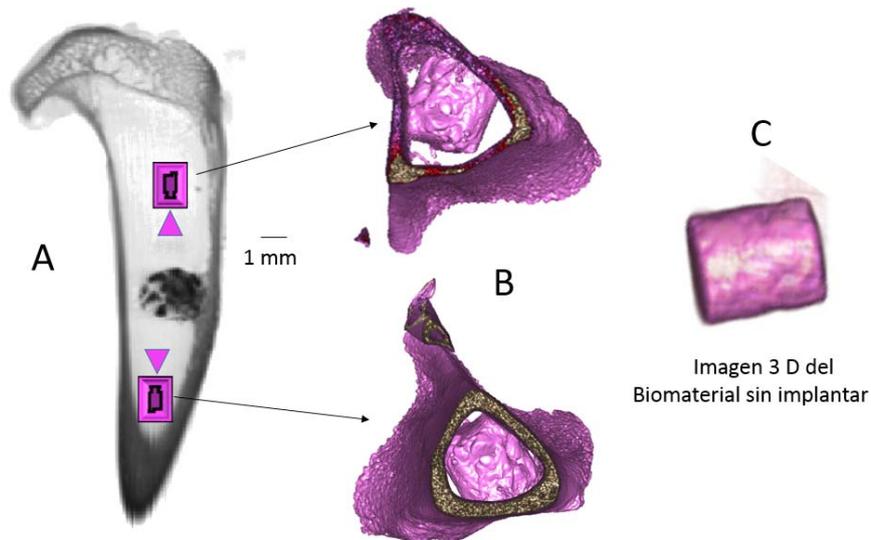


Figura 47: Vista 3D (B) desde la epífisis y la diáfisis tibial según se hayan colocado selectivamente y de manera manual las cámaras virtuales de visualización (A). En las imágenes B se presenta el mismo biomaterial pero visto desde la epífisis y desde la diáfisis tibial. Se puede observar el biomaterial implantado en la tuberosidad tibial anterior. En este caso se ha seleccionado y procesado la muestra del estudio correspondiente al primer mes del implante y donde el taco de biomaterial presenta una composición compacta, casi sin cambios morfológicos respecto al biomaterial antes del implante (C).

Con el estudio de las imágenes obtenidas mediante las reconstrucciones en 3D se aprecia, por los dos inter-observadores, la diferencia existente en la morfología del cilindro de biomaterial entre el primer mes y a los 5 meses postimplante (figura 48). Es de destacar la gran desestructuración por reabsorción que sufre el biomaterial en el transcurso del tiempo y la formación de trabéculas óseas no solo dentro del biomaterial sino también entre el biomaterial y la cortical normal del hueso huésped.

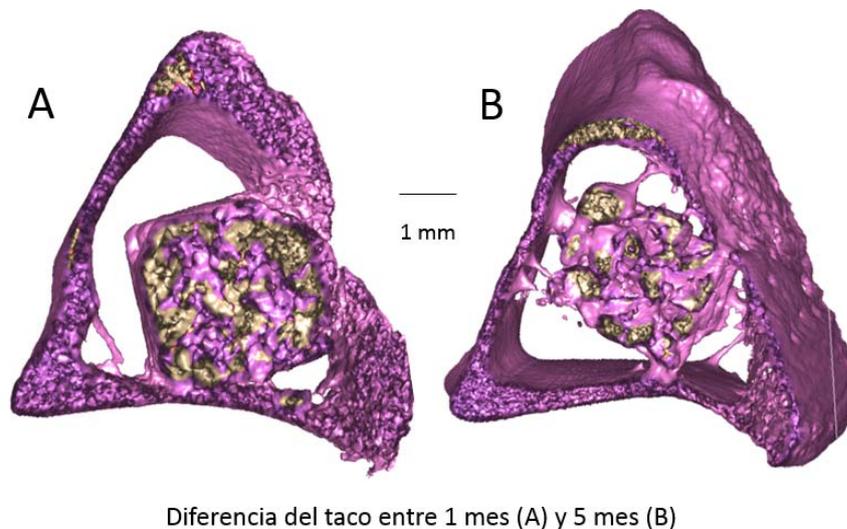


Figura 48: Imágenes en 3D de las muestras al primer (A) y quinto mes (B). Se aprecia la diferencia evolutiva en la morfología del biomaterial a lo largo del tiempo del implante. En color rosado se aprecia la cortical tibial, los grumos de biomaterial y las trabéculas neoformadas entre el biomaterial y la cortical tibial y en amarillo-marrón se aprecia el tejido de reabsorción del biomaterial pendiente de tipificar en el estudio histológico.

6.3. RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LOS VALORES DE LOS ROI DEL MICROTCT

6.3.1.- Resultados de los ROI cilíndrico de 4 X 4 mm: Estudio de la evolución de la reabsorción de los implantes.

Se dispondrá de los datos del microTCT realizado a 17 ROIs (dos al biomaterial sin implantar y quince a las muestras correspondientes al primer, tercer y quinto mes del implante. (Figura x). Con estos datos se pretende valorar la **reabsorción**, o sea la

desestructuración, degradación o integración del biomaterial en el tejido óseo implantado.

Del estudio de todos los datos contenidos en estos ROIS que corresponden a aproximadamente 420.418 voxeles (dato obtenido de la figura 29) se obtuvieron los valores representados en la tabla 6 donde aparecen los resultados obtenidos y subrayado en amarillo los resultados estadísticamente significativos ($p < 0.005$). Estos resultados fueron obtenidos por el departamento de estadística de la Universidad Católica de Murcia.

TABLA 6: Resultados del estudio de los ROIs de 4 x 4 mm (medición de la absortividad del biomaterial): Obtención de datos donde se exponen las variables a estudiar en la fila de la izqda. (r: distancia de la cerámica al eje central del biomaterial; t: tiempo; act: pieza activada) y los resultados estadísticamente significativos se subrayan en amarillo, tanto considerados aislados como asociados entre ellos.

```
lm(formula = Value ~ (phi + r + X + t + act)^2, data = datos)
```

	<u>Estimación</u>	<u>Std.Error</u>	t-value	p-Valor	
(Intercept)	1.086208	0.00713	152.26	< 2e-16	
phi	0.001208	0.00159	0.76	0.448	(1)
r	0.013098	0.00455	2.88	<u>0.004</u>	(7)
X	-0.003039	0.00227	-1.33	0.182	(3)
t	<u>-0.066526</u>	0.00247	-26.84	<u>< 2e-16</u>	(5)
act	<u>0.079848</u>	0.01152	6.93	<u>4.4e-12</u>	(7)
<u>phi:t</u>	-0.004645	0.00059	-7.87	<u>3.9e-15</u>	(2)
<u>phi:act</u>	0.012323	0.00212	5.81	<u>6.5e-09</u>	
<u>r:t</u>	<u>-0.017638</u>	0.00135	-13.03	<u>< 2e-16</u>	
X:t	0.003619	0.00084	4.29	<u>1.8e-05</u>	(4)
X:act	0.012246	0.00303	4.04	<u>5.4e-05</u>	
t:act	<u>0.011024</u>	0.00256	4.30	<u>1.7e-05</u>	(6)

Residual standard error: 0.182 on 14141 degrees of freedom					
Multiple R-squared: 0.285, Adjusted R-squared: 0.285					
F-statistic: 513 on 11 and 14141 DF, p-value: <2e-16					

Del análisis de estos datos se deduce que realmente existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0.005$) entre la **absorción y el tiempo** (referencia 5 de la tabla), de modo que conforme transcurre el tiempo disminuye el valor de la cerámica lo que significa que se produce un aumento de la reabsorción del material, **afectando menos a las piezas dopadas con MOD (líneas azules en la tabla) que a las no dopadas (líneas rojas)**. Tal como se muestra en la gráfica de la figura 49 y las observaciones 6 y 7 de la tabla 6. Se trata de una relación estadísticamente significativa en cuanto a que las piezas dopadas se reabsorben peor a las piezas no dopadas. Este dato no era lo predecible de antemano, pero queda manifiestamente demostrado con el estudio matemático de los DATARAW. Además este resultado paso desapercibido durante la observación visual de las imágenes del microTC.

Este hallazgo matemático-estadístico causo verdadero impacto porque hasta este momento no se había hecho distinción entre muestras dopadas y no dopadas debido a que en el estudio y resultados de las imágenes de microTC ninguno de los dos observadores fue capaces de detectar diferencia ni se esperaba que hubiera diferencias significativas morfológicas entre unas muestras y otras. Este hallazgo supero a lo esperado, ya que en un principio las muestras fueron dopadas para aumentar su reabsorción y ser más efectivas en sus objetivos finales a las no dopadas.

Una vez advertidos del resultado obtenido por el matemático se hizo retrospectivamente una nueva valoración de las imágenes del microTC sin conseguir visualizar diferencias en la imagen de TC de las muestras dopadas y no dopadas. De aquí que en ningún momento en las imágenes hasta ahora visualizadas se hace distinción de muestras dopadas o no dopadas porque ha sido imposible detectar cambios morfológicos.

Este resultado, hallado casualmente lo consideramos muy enriquecedor para este trabajo y revelador de la importancia del estudio de los DATARAW, por lo que debiera ser motivo de nuevos estudios centrados en esta diferencia de muestras dopadas y no dopadas.

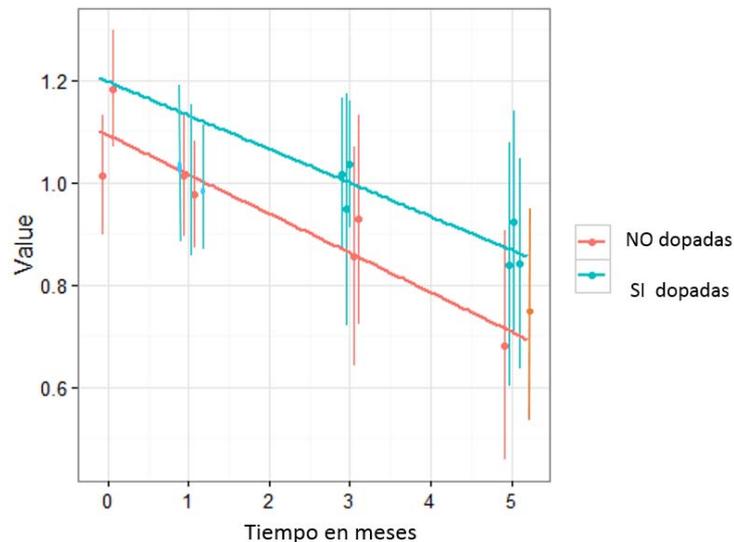


Figura 49: Las barras rojas corresponden al biomaterial no dopado (A-S) y las azules al dopado (A-S-MOD). Cada punto representa la media de absorción de cada pieza, y las barras representan la variabilidad dentro de cada pieza.

En la figura 49 la tendencia de la gráfica o línea descendente indica los cambios de reabsorción que los biomateriales sufren a lo largo del tiempo de implantación y que interpretamos como un proceso de reabsorción progresivo. Tiempo 0 corresponde al biomaterial antes de su implantación y a los 1, 3 y 5 meses postimplante. Cada punto de cada barra representa la media de reabsorción a diferentes distancias del eje de cada pieza. En rojo se sitúan las piezas no dopadas (A-S) y en azul las dopadas (A-S-MOD). Así mismo en cada barra correspondiente a cada muestra se observa que a medida que pasa el tiempo estas barras aumentan de tamaño, se ensanchan e incrementan su longitud, esto denota o evidencia que existe un aumento de la variabilidad de los datos de los voxels en el interior del biomaterial correspondiente a cada muestra durante el periodo de estudio. El biomaterial se hace cada vez más heterogéneo conforme transcurre el tiempo implantado en la tibia. Este hallazgo sí que fue totalmente perceptible en el estudio analógico de las imágenes (figura 41) y en la interpretación estadística descriptiva que se representara en la figura 51.

Para ser concreto, los andamios pre-implantados mostraron un coeficiente de atenuación promedio de 1.13 ± 0.18 HU. Después de 3 meses después de la cirugía, el coeficiente de atenuación disminuyó a valores promedio de 0.99 ± 0.23 HU (andamios dopados) y 0.86 ± 0.25 HU (no dopados) andamios). Los coeficientes de atenuación a 5 meses alcanzaron valores mínimos de $0,86 \pm 0,32$ HU (andamios doblados) y $0,66 \pm 0,33$

HU (plumíferos no dopados). Como puede deducirse de estos resultados, los implantes dopados (Activagen®) mostraron una disminución más gradual de los valores promedio de HU que los implantes no dopados, lo que resultó en diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores promedio de ambos grupos.

Volviendo a la tabla 6 se siguen analizando resultados obtenidos. Respecto al **ángulo Phi**, dicho ángulo es el que indica la posición de cada punto, de cada voxel, dentro de la pieza. El origen de ese ángulo se ha tomado arbitrariamente pero igual en todas las piezas. Este alcanza un valor de 0,448 por lo que no es estadísticamente significativo. El resultado que se obtiene da a entender que la reabsorción que sufre el biomaterial, ya sea dopado o no dopado, no se ve influenciado por ese ángulo phi pero en cambio observamos que sí que se ven influenciadas la distancia r al eje central de la pieza y la situación X de cada pixel a lo largo de la pieza. Esto explica que, aunque el Angulo phi no tenga valor estadístico sí que tiene valor matemático y puede testar y validar los resultados obtenidos en los ejes " r " y " X ".

Existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0.005$) entre la reabsorción y la distancia r , al eje de la pieza o centro de la misma (referencia 5 de la tabla 6). El material implantado dopado y no dopado, tiene o sufre más reabsorción cerca de los bordes, y conforme transcurre el tiempo la reabsorción aumenta, especialmente en los bordes, es decir, el biomaterial se reabsorbe de manera centrípeta. Este detalle tampoco pudo ser constatado en el estudio radiológico de las imágenes del microTC ya que no fue posible verificar visualmente esta observación, figura 41.

En cuanto a las diferencias que existen entre los voxel o unidades de material contenidos a lo largo del eje longitudinal de la pieza o eje X (figura 50), interpretándose por 0 mm cuando está en contacto con la cortical y por 4 mm cuando está en la parte profunda o central. Esta distancia desde 0 hasta 4 mm ha sido dividida para su estudio en 15 subintervalos y cada barra, cajita o rectángulo representa uno de esos subintervalos, todos del mismo tamaño y empezando en el cero o superficial hasta el 4 que corresponde a la parte más profunda o intramedular del biomaterial. Cada barra representa todos los voxeles de todas las piezas estudiados en ese punto del eje X . Se ve que, en la periferia, o sea en el 0 y 4 mm las "cajitas" son más largas lo que indica una mayor variabilidad o irregularidad de la muestra, pero su mediana siempre oscila alrededor de 0. Esto quiere decir, que en los bordes de la pieza (cortical-medular) existe mayor reabsorción de la misma pero sin diferencias significativas entre ambos bordes, el cortical y el medular. (Referencia 3 y 4 de la tabla 6).

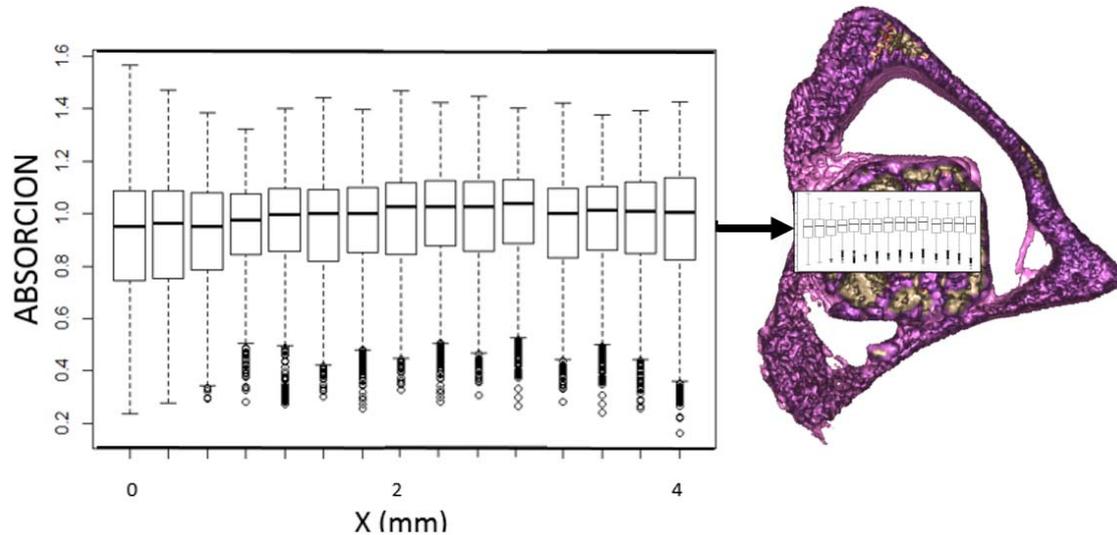


Figura 50: Gráfico donde se representa en el eje de ordenadas los valores de reabsorción o de las piezas y en el eje de abscisas los diferentes valores de reabsorción del biomaterial a lo largo del eje X. Se interpreta por 0 mm cuando está en contacto con la cortical y por 4 mm cuando está en la parte profunda o central. Esta distancia desde 0 hasta 4 mm ha sido dividida en 15 subintervalos y cada barra, cajita o rectángulo contiene todos los voxels de todas las piezas estudiados en ese punto del eje X.

Como ya se vio en la figura 49 (amplitud de las barras correspondientes a cada muestra que indica la variabilidad de todos los datos contenidos en cada barra), la evolución de la variabilidad de los datos en relación con el tiempo de implantación también queda plasmada en la gráfica obtenida de la interpretación estadística mediante diagrama de barras correspondiente a los diferentes materiales en los 3 periodos de estudio establecidos. En ellos se aprecia que conforme pasa el tiempo estas barras aumentan su longitud, lo que significa que existe un aumento de la variabilidad de la muestra o de los datos de los voxels de dentro del biomaterial a lo largo del tiempo de estudio. El biomaterial se hace cada vez más heterogéneo conforme transcurre el tiempo implantado en el hueso huésped. Este hallazgo sí que es totalmente perceptible en el estudio analógico de las imágenes de la figura 41.

Se puede concluir afirmando como se explica en la figura 51 que el proceso de reabsorción es más importante en los márgenes de la muestra que en el centro. Lo que equivale a decir que la porosidad de la muestra aumenta en su periferia. También se puede concluir que la reabsorción de la muestra es mayor en sus extremos cortical u

medular que en el centro del biomaterial según su eje X, pero sin diferencias significativas entre ambos extremos (p 0,182, tabla 6)

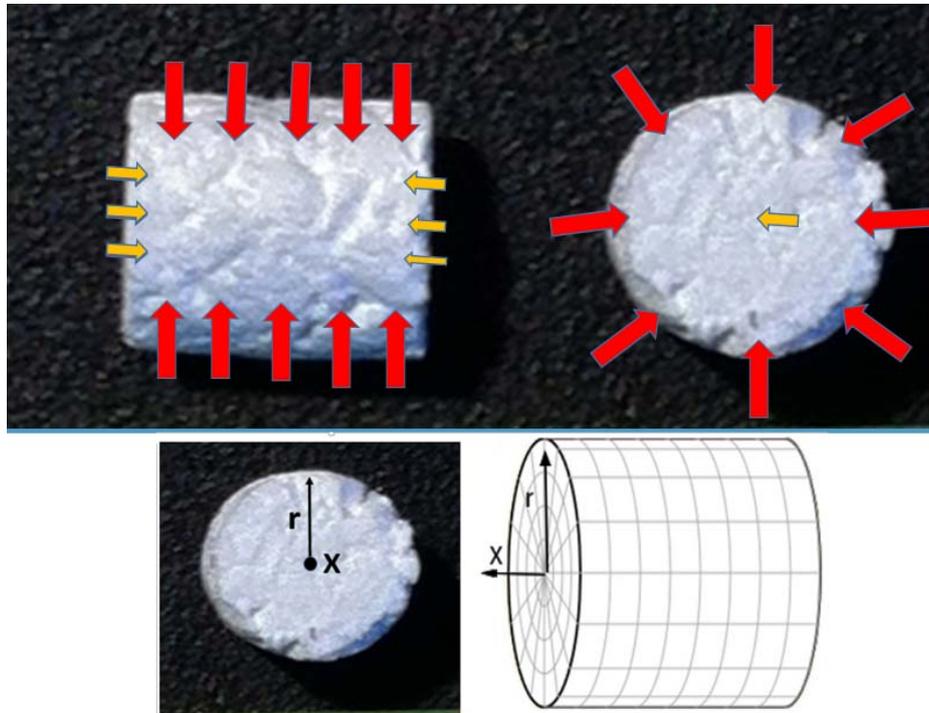


Figura 51: El biomaterial es reabsorbido en mayor cantidad (flechas rojas grandes) en sus bordes, según el eje r de la pieza, que en sus extremos según el eje X de la pieza (flechas amarillas pequeñas).

La evolución de la variabilidad de los datos en relación con el tiempo de implantación también queda plasmada en la gráfica obtenida de la interpretación estadística median diagrama de barras a partir de los datos absolutos aportados por cada ROI (Figura 52).

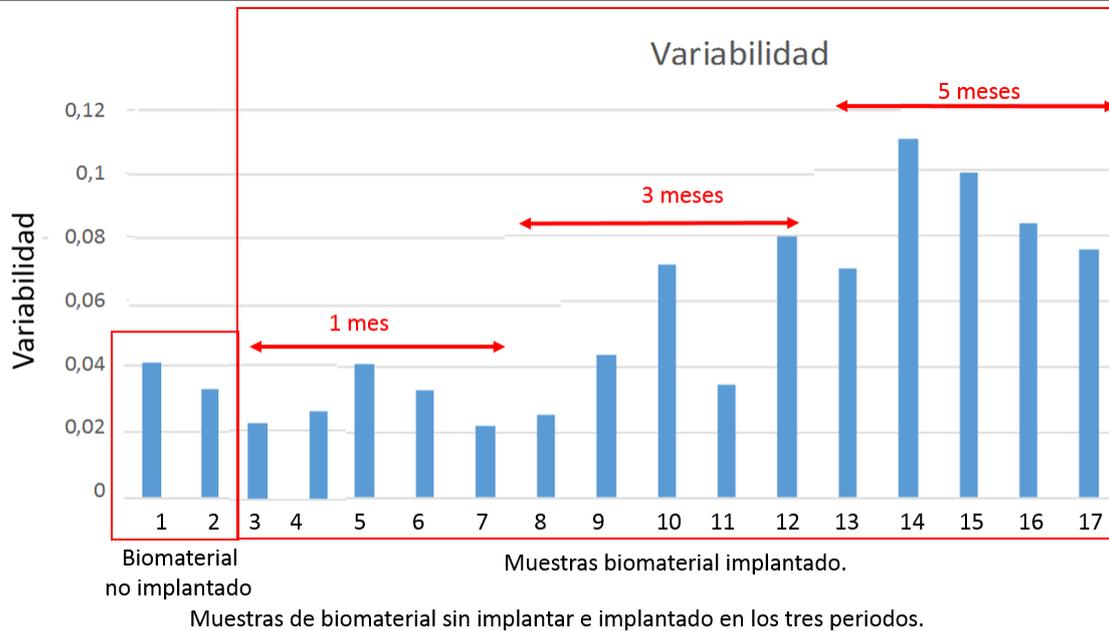


Figura 52. Variabilidad de las muestras tanto dopadas como no dopadas tomando como base la variabilidad del biomaterial sin implantar representado por las dos primeras barras, se representan en la figura la variabilidad del biomaterial después de ser implantado a 1, 3 y 5 meses.

Se puede observar en la figura 52 como hay un gran aumento de la variabilidad a los 3 y 5 meses de la implantación, en comparación con los resultados al mes de implantar. Lo que se interpretará como un mecanismo de mayor uniformidad del biomaterial que pudiera ser secundario a un proceso de invasión del hueso huésped hacia el biomaterial implantado.

Siguiendo con la interpretación estadística aplicada se verán los resultados obtenidos no solo en cuanto a la variabilidad de las muestras sino también en la interpretación de sus valores máximos y mínimos, como después se verá.

Siguiendo con los resultados de la variabilidad del biomaterial durante el tiempo de estudio se ve como el biomaterial sin implantar y sin dopar, muestras 1 y 2, presentan su propia variabilidad interna relacionada con su composición química y el método de fabricación. La variabilidad del biomaterial ha sido estudiada mediante los cortes de microTC hechos a las dos muestras de biomaterial sin implantar y estudiando los valores en unidades Hounsfield de los voxels contenidos en las tres líneas trazadas a mano alzada y que se contemplan en la figura 53.

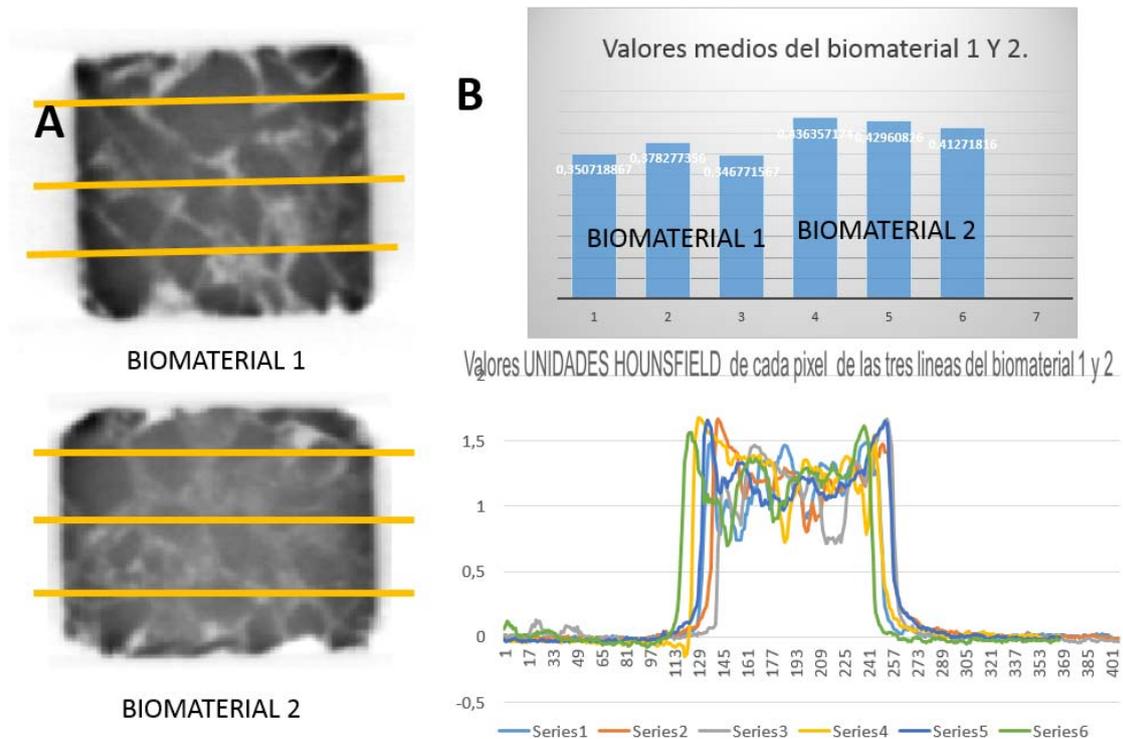


Figura 53: A: corte de microTC del biomaterial 1 y 2 antes de la implantación. Sobre este corte de microTC se trazan con el programa Amide 3 líneas (líneas amarillas) de estudio en cada biomaterial. B: estudio comparativo de las dos piezas de biomaterial mediante columnas azules correspondientes a cada línea de cada biomaterial y abajo la grafica Excel de los valores de cada uno de los voxeles contenidos en cada una de las seis líneas (unidades Hounsfield en el eje de ordenadas y los voxeles en el eje de abscisas).

Estas líneas de corte a cada biomaterial presentan unos picos máximos de aproximadamente 1.641 unidades Hounsfield y unos mínimos de 813 unidades, asociado a una variabilidad o heterogeneidad de la muestra que queda reflejada en la tabla de columnas azules. La media del biomaterial oscila por las 1.200 unidades.

En el biomaterial implantado la muestra es menos densa (baja el valor máximo) y más variable que antes de implantar. El biomaterial exhibe una gran heterogeneidad después de ser implantado en el hueso huésped donde soporta el proceso de reabsorción, colonización y dispersión o disgregación del biomaterial durante el

periodo de estudio del mismo. Todos estos datos estadísticos matemáticos avalan el resultado del informe analógico de las imágenes de la figura 41.

Con relación a la interpretación estadística de los valores mínimos y máximos del biomaterial sus resultados se muestran en la figura 54. El biomaterial después de ser implantado sufre un descenso generalizado y mantenido de sus unidades Hounsfield (eje de ordenadas), tanto máximas como mínimas, siendo en las mínimas un descenso progresivo en el tiempo implantado hasta estabilizarse y en los máximos el descenso inicial se mantiene a lo largo del periodo de tiempo. El estudio de estos datos pone de manifiesto que a medida que aumenta el tiempo de implantación se produce un descenso de los picos máximos que son los valores que corresponden a los gránulos de cerámica que se estabiliza en el tiempo debido a que los gránulos componen la estructura del biomaterial que queda sin reabsorber y permanece en el interior del implante. También se observa que los valores mínimos del biomaterial descienden, pero de manera más irregular. Estos valores mínimos corresponden al tejido óseo neoformado, trabecular, conectivo fibroblástico y a una “amalgama” de tejido en suspensión resultante de la degradación y reabsorción del material y que en el transcurso de este estudio no ha podido ser identificado anatomopatológicamente.

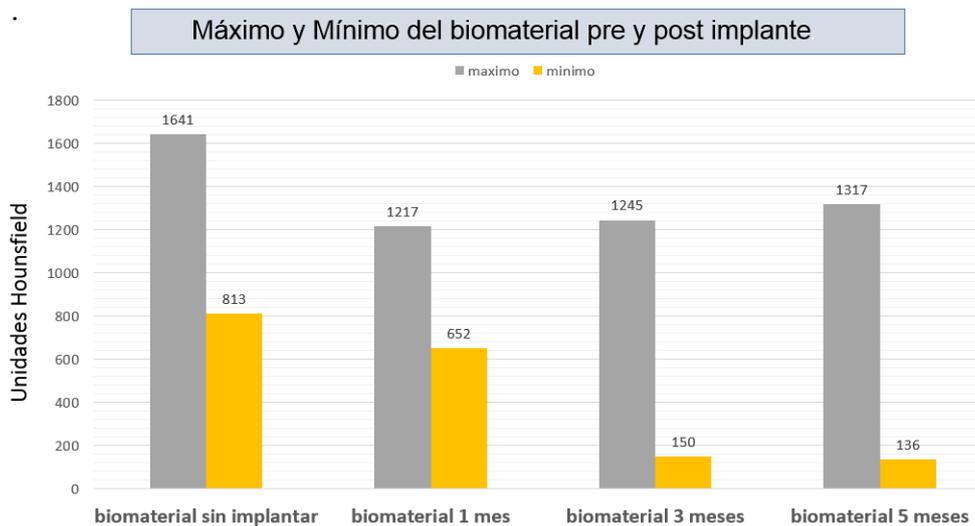


Figura 54: Diagrama de barras de los valores mínimos y máximos de cada una de las muestras del periodo de estudio (biomaterial sin implantar y a los 1, 3 y 5 meses después de su implantación). En el eje de ordenadas los valores máximos y mínimos en unidades Hounsfield.

El análisis estadístico descriptivo global de los valores promedio de todas las muestras del tiempo de estudio, o sea a los 1, 3 y 5 meses de su implantación se refleja en la figura 55 que demuestra un descenso progresivo de los valores promedio en unidades Hounsfield durante los diferentes periodos de tiempo estudiados.

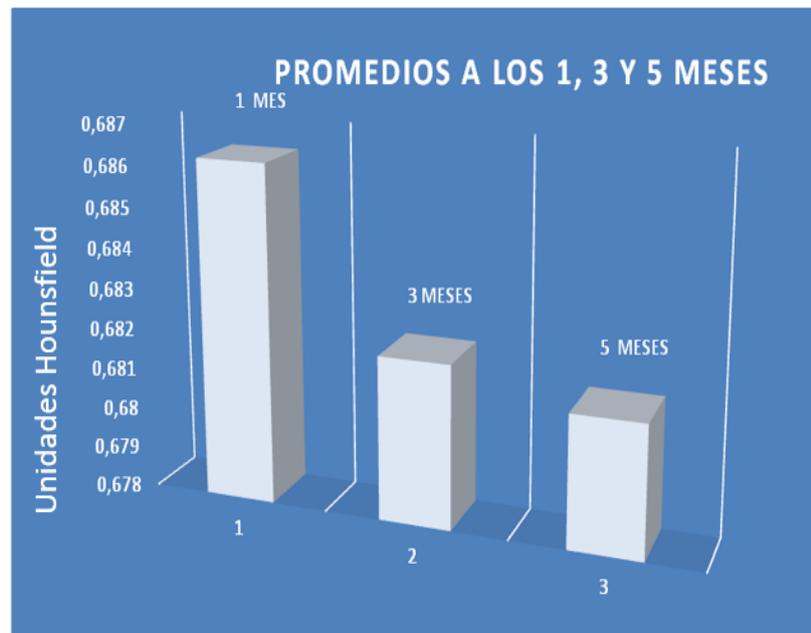


Figura 55:

Valores

promedios de todas las muestras en cada periodo de tiempo. Eje de coordenadas valor promedio en unidades Hounsfield y en el eje de abscisas los grupos de muestras a los 1, 3 y 5 meses de la implantación.

Desde el punto de vista estadístico la mediana y la media no sufren cambios significativos objetivables según la figura 56.

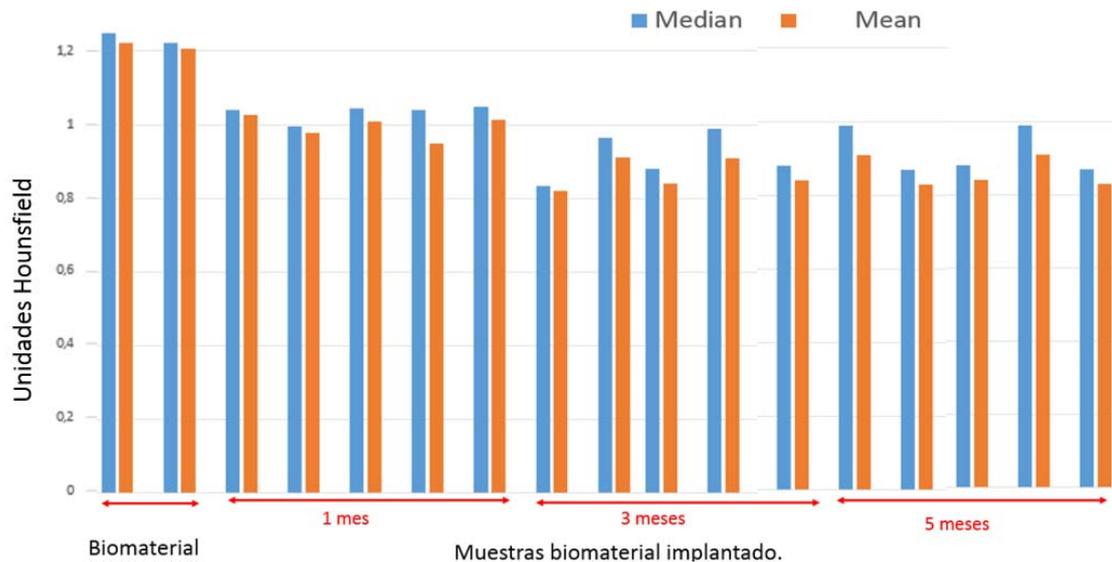


Figura 56: Diagrama de barras de los valores de la mediana y la media de todas las muestras implantadas y las dos primeras del biomaterial sin implantar.

6.3.2. - Resultados de los ROI cúbicos de 10 x 10 x 10 mm: Estudio de la evolución de la dispersión de los granos de cerámica dentro del biomaterial en el tiempo de evolución de los implantes:

De los numerosos datos RAW obtenidos y que dificultaban su procesado (8.146.024 voxeles), hemos preseleccionado sólo los voxeles con Valor ≥ 1.100 unidades Hounsfield (U.H.) y con el fin de centrar la atención en el material cerámico compacto o disgregado como consecuencia de la reabsorción y de la dispersión, y que tiene un valor siempre superior a 1.100 U.H. Se han desechado, por tanto, el resto de los valores o U.H. inferiores a 1.100 y que correspondían a los valores del hueso de la cortical normal, de la cavidad medular y de los valores bajos observados dentro del biomaterial. Con estos valores correspondientes a los voxeles superiores a 1.100 U.H. se ha calculado el "centro de masa" de toda la pieza, y a continuación la distancia media de todos los voxeles a ese centro de masa, ponderando proporcionalmente a la densidad de cada voxel (figura 57). Ello nos permite cuantificar el grado de dispersión que sufre la cerámica en el interior del hueso huésped. También hemos estimado su dispersión calculando la desviación típica ponderando del mismo modo.

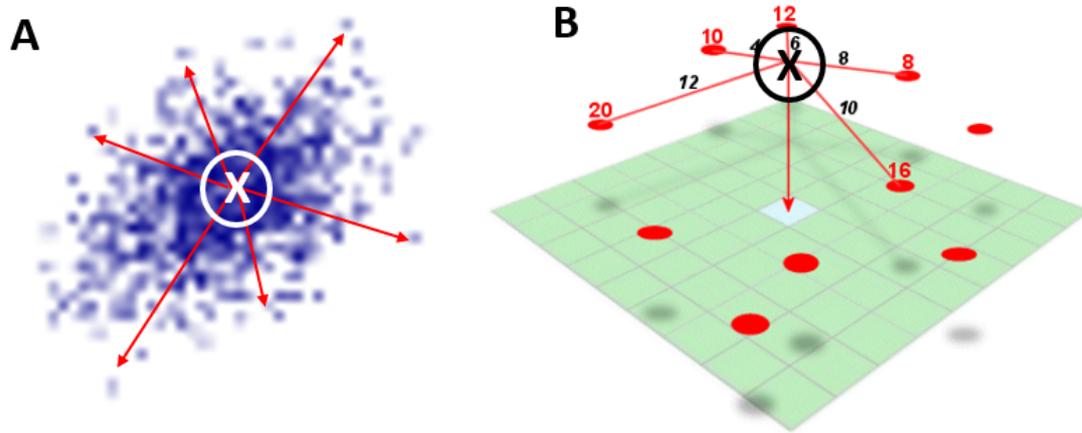


Figura 57: Representación gráfica volumétrica (A) y en píxeles (B) de los voxeles de los granos de cerámica y de su dispersión respecto al centro de masa (X) .

En la tabla 7 se detallan los valores resultantes de estos cálculos matemáticos.

Tabla 7.- : Número de voxeles de alta densidad, distancia media y desviación típica para cada muestra. Se han incluido las dos muestras del biomaterial sin implantar (piezas vírgenes) para poder compararlas entre ellas.

Pieza	N	Distancia	Desv. típ	
b1	397778	2.065	0.563	Biomaterial 1
b2	407310	2.058	0.56	Biomaterial 2
1	242757	2.373	1.056	Muestra 1 mes
2	271389	2,515	0,85	Muestra 1 mes
3	253640	2,313	1,010	Muestra 1 mes dopada
4	276111	2.583	0.77	Muestra 1 mes dopada
5	240459	2,349	1,018	Muestra 1 mes dopada
6	238937	2.134	0.806	Muestra 3 meses
7	279640	2.36	1.206	Muestra 3 meses
8	290101	2.35	1.039	Muestra 3 meses
9	163756	2.196	0.675	Muestra 3 meses dopada
10	172466	2.266	1.403	Muestra 3 meses dopada
11	160885	3.073	1.281	Muestra 5 meses
12	273128	3.087	1.345	Muestra 5 meses
13	303532	3.054	1.042	Muestra 5 meses dopada
14	303020	2.855	1.291	Muestra 5 meses dopada
15	270,321	2.995	1.320	Muestra 5 meses dopada

En la tabla 8 se muestra la representación gráfica obtenida de los datos anteriores.

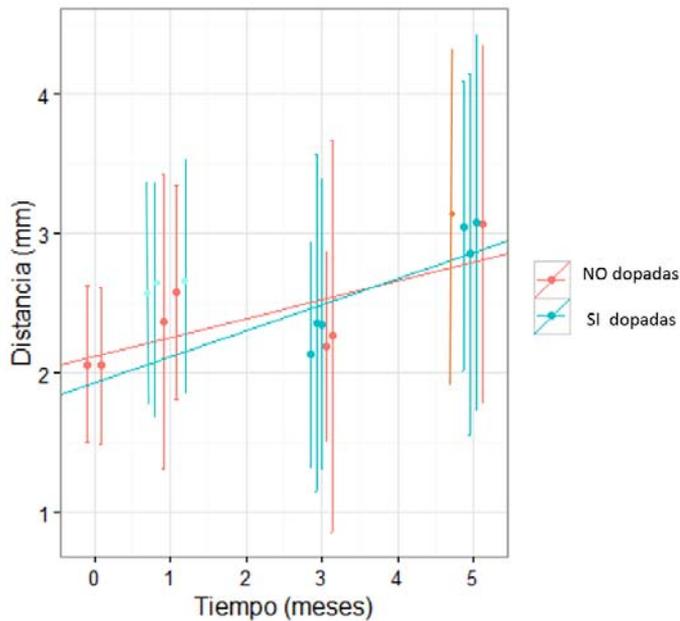


Tabla 8: Evolución temporal de la distancia media para cada pieza, junto a su desviación típica. En el tiempo 0 se incluyen las dos muestras de biomaterial sin implantar.

El incremento de los valores de dispersión entre las diferentes etapas del estudio resultó ser estadísticamente significativo ya que su p -valor es de 0,0002 ($p < 0.05$), sin embargo, no se encontraron diferencias entre los implantes dopados y los no dopados. Con el fin de aclarar visualmente el efecto del tiempo en los valores de dispersión por cada grupo de implantes (dopado y no dopado), se han agregado líneas de tendencia.

La interpretación de estos datos y esta tabla es que los granos de cerámica con valor superior a 1.100 U.H. sufren un proceso de dispersión o emigración hacia fuera del implante distribuyéndose por todo el interior de la cavidad medular. Parte del biomaterial ha sufrido un mecanismo celular (macrófago) y ha sido invadido por tejido óseo de nueva formación. Los voxeles más densos correspondientes a los granos de cerámica, los elegidos con valor superior a 1.100 U.H. sufren una dispersión o aumento de la distancia media respecto al centro de masa de ~ 0.16 mm por mes, desde el comienzo (1 mes) hasta el final (5 meses) del período postquirúrgico analizado.

Analógicamente esta dispersión se observa como la pérdida del contorno compacto y uniforme periférico inicial del biomaterial (figura 41 y 48) siendo sustituido por una forma de contorno más irregular y aumentando su porosidad lo que facilita la

colonización del biomaterial por el hueso huésped en su crecimiento y por tejido óseo neoformado dando lugar a la formación de trabeculaciones óseas dentro y en la periferia del biomaterial.

6.3.3.- Resultados de los ROI cilíndricos de 3 x 3 mm

Este procedimiento nos ha permitido el estudio de la cortical normal en todas las muestras. Sirve para testar el modelo de estudio y confirmar que la cortical normal no sufre cambios después de llevarse a cabo la implantación del biomaterial (figura 58).

Como medida de control, promedio de coeficiente de atenuación estandarizado, se analizó el hueso cortical sin alteraciones quirúrgicas (ventana superior a 0,50 HU) en ROI cilíndrico (3x3 mm). De acuerdo con los resultados obtenidos, los valores promedio de HU cortical inalterada se mantuvieron estables en todo el estudio ($0,83 \pm 0,12$ HU), sin diferencias significativas entre los diferentes tiempos de muestreo (1, 3 y 5 meses después de la cirugía). Los datos obtenidos mostraron una muy pequeña disminución de los valores de la reabsorción con el tiempo, y no es estadísticamente significativa (el p -valor es inferior a 0.005). Tampoco existe diferencia entre las muestras dopadas y las no dopadas.

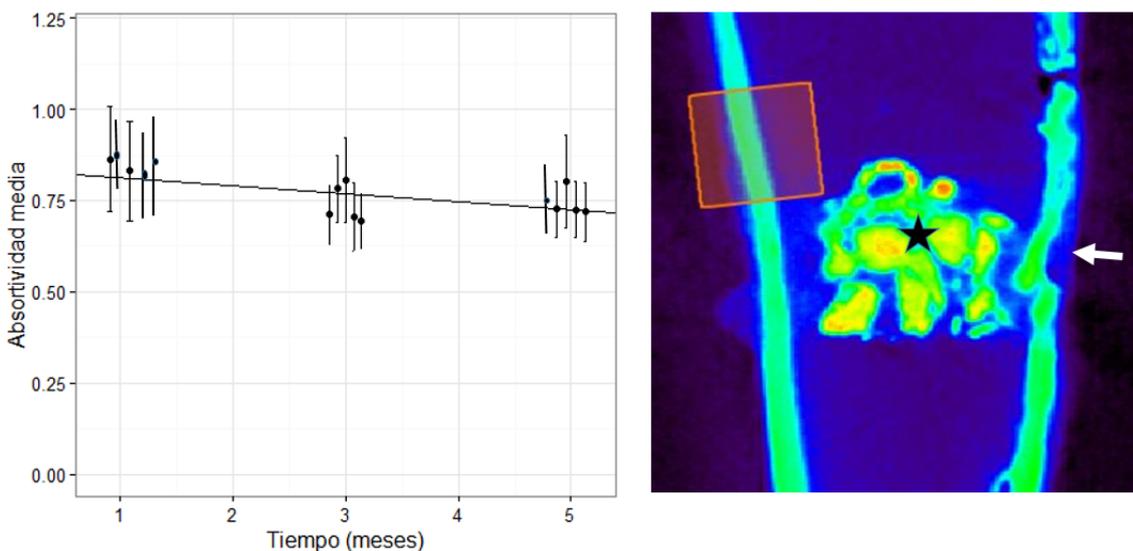


Figura 58: Evolución temporal de la reabsorción ósea que sufre la cortical normal de cada muestra junto a su desviación típica. Datos RAW obtenidos del ROI de 3 x 3 mm situado en la cortical ósea opuesta o alejada de la cortical dañada (flecha) por el procedimiento quirúrgico realizado para implantar el material (asterisco).

6.4. RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS E HISTOMORFOMETRICOS.

6.4.1 Correlación morfológica entre los resultados del microTC y la anatomía patológica

Los hallazgos anatomopatológicos observados después de la implantación del biomaterial A-S se muestran en la figura 59, en donde a partir del corte axial obtenido mediante el microTC y de la sección histológica se permite establecer una correlación mediante flechas entre los granos visualizados en el microTC y en la sección anatómica pero también podríamos en cada corte correlacionar los valores en unidades Hounsfield del tejido u otros elementos de menor densidad radiológica existente dentro del biomaterial. En el corte representativo elegido como ejemplo en la figura 58 se advierte la buena relación existente entre el corte de microTC (imagen en blanco y negro), el corte también de microTC pero visualizado en escala de colores desde naranja hasta azul y cuyos valores se contemplan en la figura 43 y la sección de la anatomía patológica.

Otra opción o posibilidad de constatar y establecer la óptima correlación real que existe entre la imagen proporcionada por el microTC y la imagen histológica del biomaterial implantado en un periodo seleccionado estudiado en la figura 60 donde además se incluyen las reconstrucciones en 3D. Mediante este procedimiento se advierte la estrecha relación existente entre ambos procedimientos; técnicas diagnósticas frecuentemente utilizada en el estudio *in vivo* del biomaterial aplicado en el campo de la medicina regenerativa.

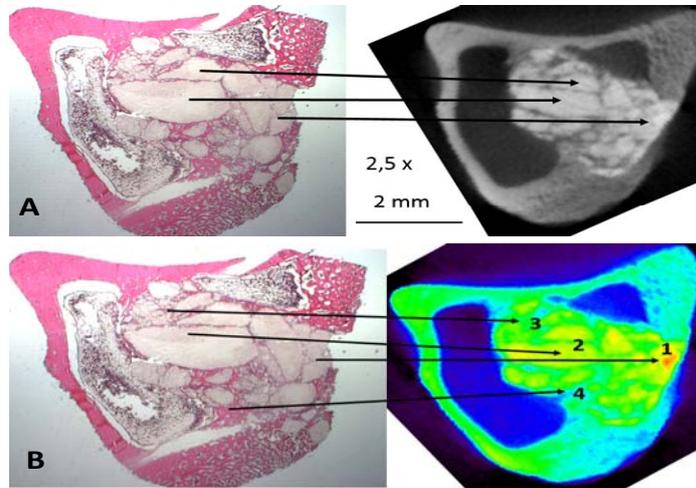


Figura 59: A: Correlación entre la imagen del microTC en blanco y negro y la sección anatomopatológica. (HE, 2,5 X; barra 2 mm). B: Correlación entre la imagen de anatomía patológica y el corte de microTC coloreado con el programa Amide. El valor de la flecha 1 (1300 U.H.) corresponde a granos de biomaterial sin reabsorber. El valor de la flecha 2 (1.200 U.H.) corresponde al biomaterial reabsorbido parcialmente. El valor de la flecha 3 (800 U.H.) corresponde al reabsorbido o en suspensión donde se encuentran dispersos los granos de cerámica. El valor de la flecha 4 (400 U.H. corresponde a tejido conjuntivo neoformado, tejido óseo, tejido de granulación y tejido fibroso que reemplaza al biomaterial.

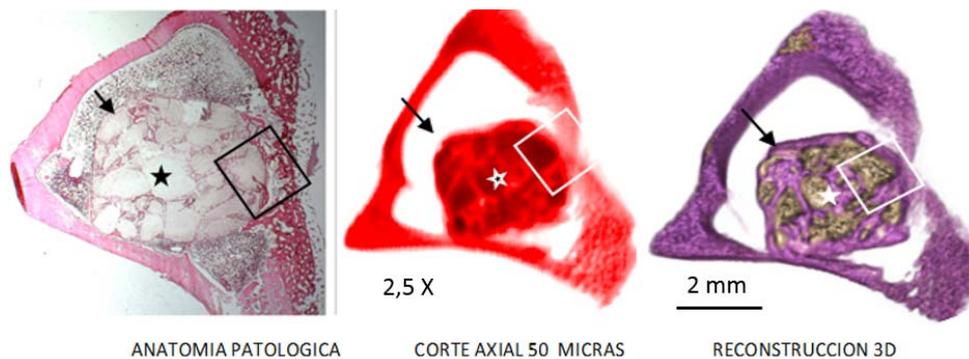


Figura 60: Correlación entre la sección histológica (imagen de la izquierda) representativa del biomaterial implantado a 1 mes, el corte de microTC (imagen del centro) visualizado de rojo mediante el programa Amide (simulando la tinción de H-E) y la imagen de la dicha corresponde a la reconstrucción en 3D con el programa Volview. La flecha indica el borde del implante. La estrella representa un grano de biomaterial en el centro del implante y el rectángulo corresponde a transición entre el implante y la cortical por la que se ha introducido quirúrgicamente el biomaterial. (H-E, 2,5 X, barra de 2 mm).

6.4.2 Correlación entre las imágenes del microTC y las secciones histológicas de cada muestra dopada y no dopada con MOD correspondiente a los diferentes periodos del estudio

Con la intención de demostrar que los cortes del microTC realizados a cada muestra se correlacionan con los hallazgos observados en las secciones histológicas correspondientes. Se han seleccionado una imagen representativa de una muestra dopada y no dopada de cada periodo y mediante una flecha se selecciona un grano de cerámica en cada muestra. En la siguiente figura 61 cada sección histológica teñida con H-E se correlaciona con su corte homólogo de microTC. Se selecciona un grano de cerámica en la sección anatomopatológica y mediante una flecha roja se busca el mismo grano de cerámica en la sección de microTC, buscando siempre la exacta correlación existente.

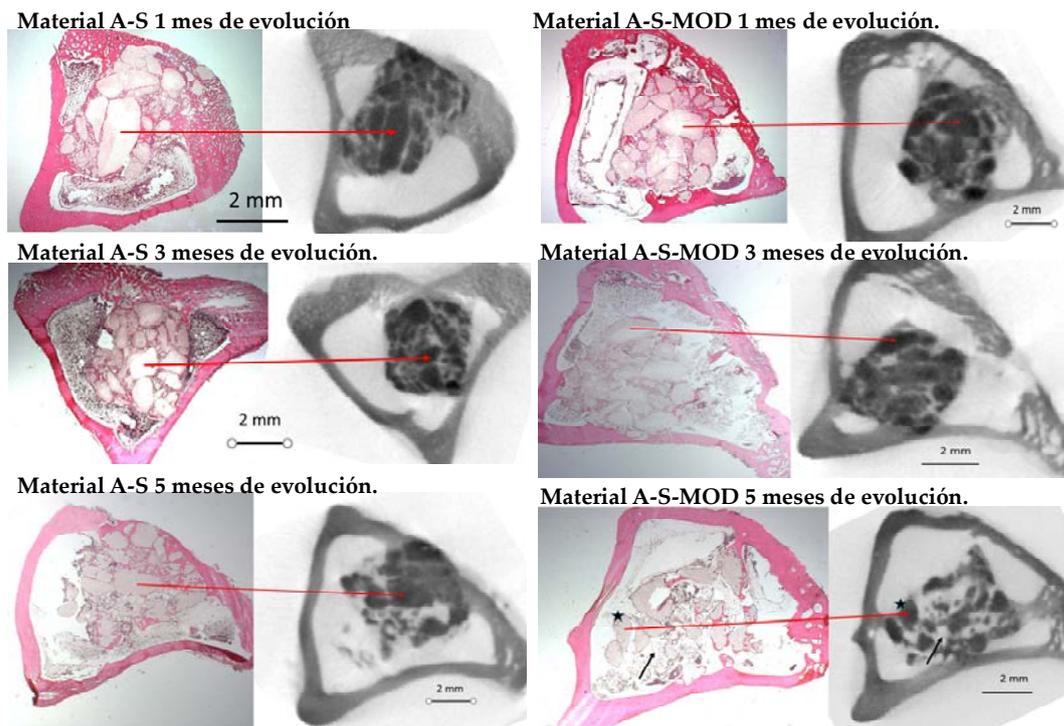


Figura 61: Correlación establecida entre los hallazgos en las secciones histológicas (H-E 2,5 X) y los observados mediante microTC (asterisco) material; (flecha) poros. Se hace en los diferentes periodos del estudio (1, 3 y 5 meses) y en muestras A-S y A-S-MOD.

Ademas de la correlacion descrita, estas imágenes han posibilitado determinar con detalle la presencia de un proceso de carácter fisico-quimico e histológico que se manifiesta de forma simultanea la reabsorcion y dispersion de los granos que componen la ceramica a lo largo del tiempo de estudio. Pero es unicamente con los datos histomorfometricos y con el analisis de los DATARAW cuando se puede predecir que el comportamiento del biomaterial dopado (A-S-MOD) sufre menos reabsorcion que el no dopado (A-S). De igual modo es posible predecir y cuantificar mediante el analisis de los DATARAW el grado de dispersion que experimentan los granos de ceramica del biomaterial en el tiempo de estudio. Dicha dispersion esta relacionada con el incremento de tejido conjuntivo formando en los poros que va desplazando a la periferia restos de material no reabsorbido.

6.4.3 Estudio anatomopatológico

Del examen histopatológico de las secciones realizadas con baja magnificación (10 X) (figura 62 A), se seleccionó el área a estudiar (figura 62 B), magnificándose hasta que se pudieran distinguir con facilidad todos los componentes presentes en el área del implante (figura 62 C), con la intención de llevar a cabo el oportuno análisis morfométrico.

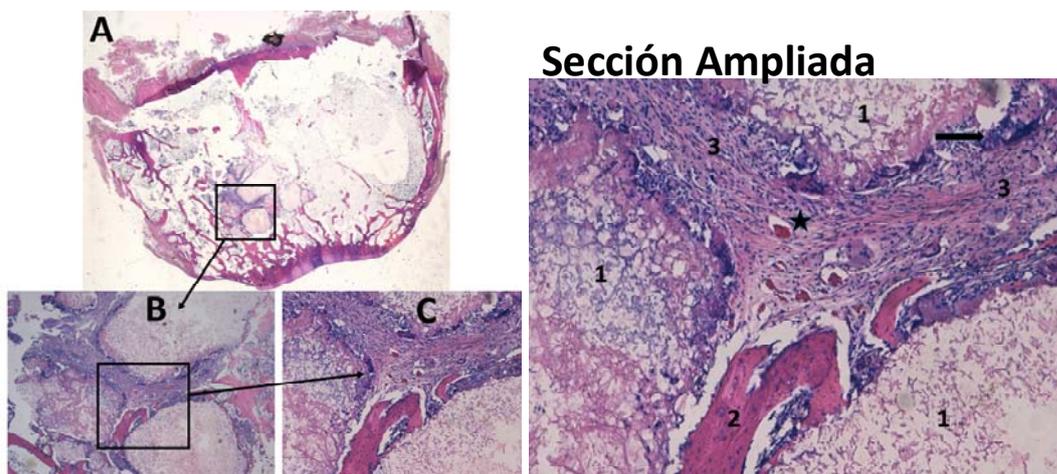


Figura 62: procedimiento de selección del área a estudiar en una sección de tibia de conejo con implante cerámico incluido. Una vez examinada la sección a bajo aumento y seleccionada el área a analizar (A), se magnifica progresivamente (B), hasta alcanzar un aumento en el que se pueda distinguir fácilmente todos los componentes del implante y elementos biológicos adyacentes (C) (H-E), 2.5X (A), 5X (B) y 10X(C). Abajo la sección C ampliada.

Basándonos en estas imágenes y en concreto en la sección C ampliada se puede apreciar 3 componentes bien diferenciados: (1) restos de material cerámico, (2) material de origen ontogénico compatible con tejido óseo neoformado y (3) una matriz de tejido conectivo rico en vasos sanguíneos (asterisco), y un infiltrado de células inflamatorias (flecha) que reabsorben el implante.

6.4.4. ESTUDIO EVOLUTIVO Y COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DEL MATERIAL IMPLANTADO (DOPADO Y NO DOPADO).

6.4.4.1. Superficie total del implante (Figura 63):

Con respecto a este parámetro, se observa en ambos materiales una progresiva disminución de la superficie total del implante que se hace estadísticamente significativa a partir de los 3 meses en el implante A-S, y a los 5 meses en el implante A-S-MOD

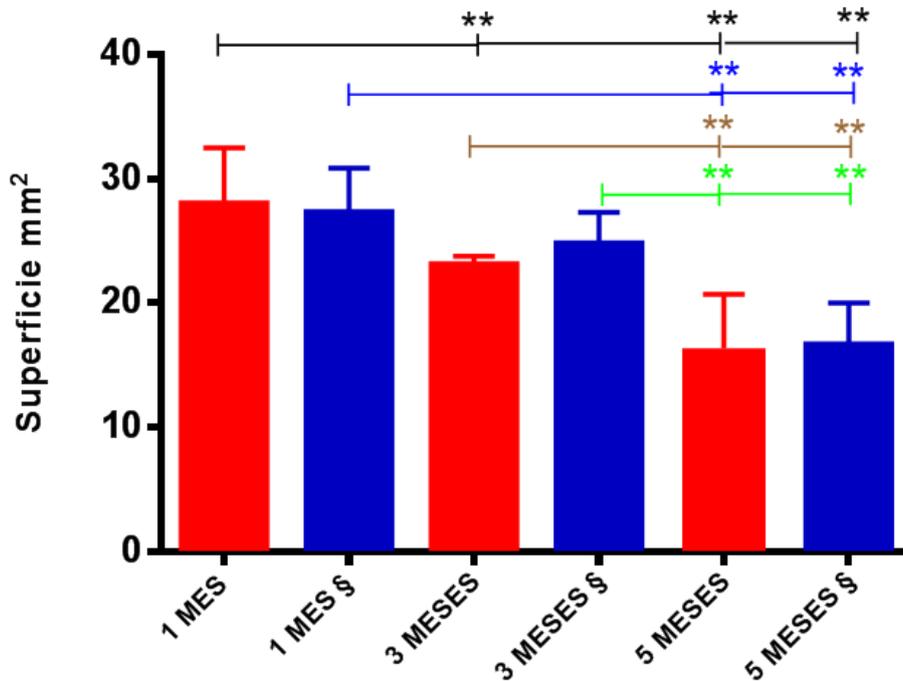


Figura 63: evolución de la superficie total del implante no dopado y dopado (\$) en función del tiempo. Test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras pareadas. El asterisco (*) indica el grado de significación estadística ($p < 0.05$ (*) y $p < 0.005$ (**)).

6.4.4.2. Superficie de tejido óseo neoformado (Figura 64)

El análisis de su evolución en el tiempo permite estimar un incremento progresivo de la superficie del tejido óseo neoformado a partir del 3^{er} mes de la implantación, siendo especialmente evidente a partir del 5^o mes en el material A-S. Este mismo hallazgo fue detectado con el estudio matemático de los DATARAW.

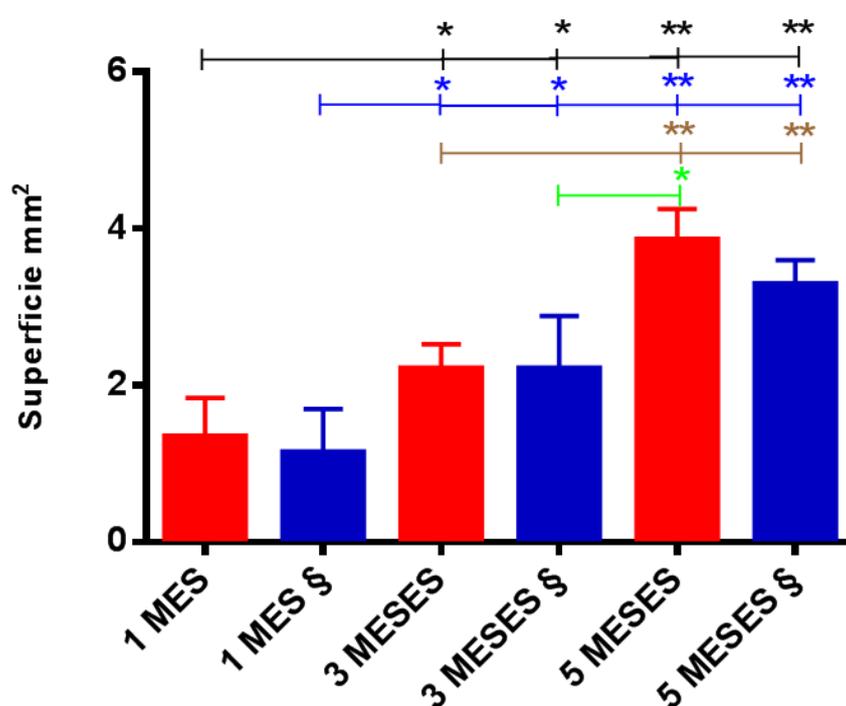


Figura 64: Evolución de la superficie de tejido óseo neoformado en el implante no dopado y dopado (§) en función del tiempo. Test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras pareadas. El asterisco (*) indica el grado de significación estadística ($p < 0.05$ (*) y $p < 0.005$ (**)).

6.4.4.3. Superficie de tejido conectivo neoformado (Figura 65)

El análisis histomorfométrico de este parámetro reveló un ligero incremento no significativo a los 3 meses post-implante en ambos materiales, disminuyendo drásticamente y significativamente a los 5 meses. Un dato interesante es que existe una mayor cantidad de tejido conectivo a los 5 meses en el material A-S-DOP, hecho que coincide con una disminución en la síntesis de tejido óseo. Como ya se puso de manifiesto en el estudio

matemático de los DATARAW, la matriz ósea desmineralizada (MOD) no mejora la capacidad de regeneración de hueso o de neo síntesis de tejido óseo por el biomaterial estudiado (A-S-MOD).

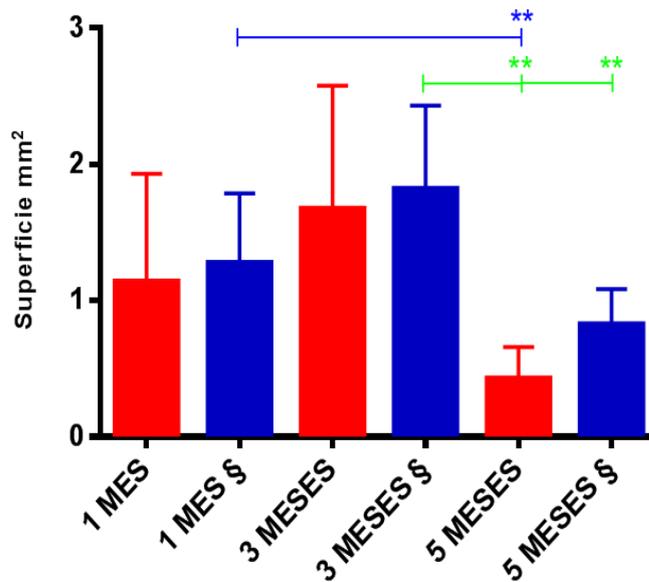


Figura 65: evolución de la superficie de tejido conectivo neoformado del implante no dopado y dopado (\$) en función del tiempo. Test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras pareadas. El asterisco (*) indica el grado de significación estadística ($p < 0.05$ (*) y $p < 0.005$ (**)).

6.4.4.4. Superficie de depósitos cálcicos (Figura 66):

Con respecto al análisis evolutivo de la superficie de estos depósitos cálcicos, se observó una progresiva disminución en la misma a partir del 3^{er} mes post-implante. Estos depósitos, no incluidos en el entramado conectivo, y localizados en la interfase material cerámico-tejido óseo neoformado, son de difícil interpretación debido a su peculiar naturaleza. Aunque pudiera ser interpretado como un artefacto, no es probable que lo sea, debido a que está presente durante todas las fases del estudio y además muestra una evolución muy similar en ambos materiales, en el sentido de su disminución progresiva en función del tiempo. Además, se ha observado que estos materiales, una vez sumergidos en un líquido tampón PBS (pH 7,4) o agua desionizada

(MiliQ), muestran una superficie dinámica, en el sentido de que son capaces de liberar en estos medios iones de calcio, fósforo y silicio. Es, por tanto, presumible que este material observado sea compatible con depósitos cálcicos antes descritos.

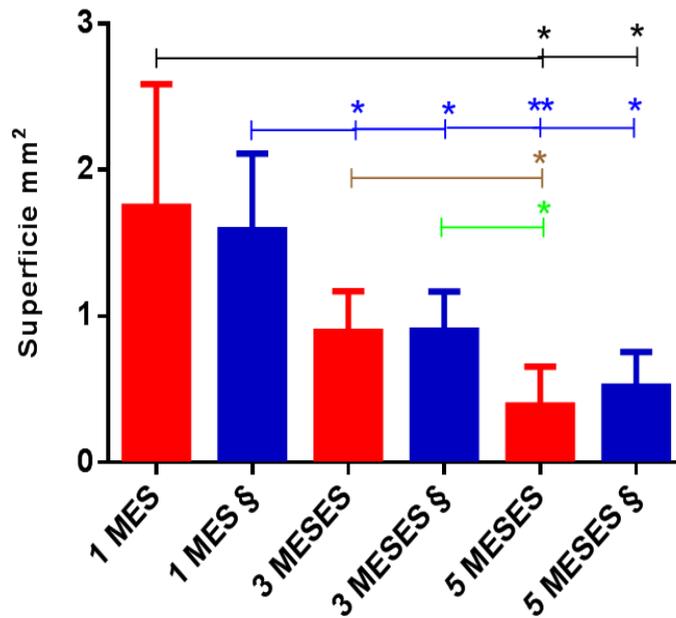


Figura 66: Evolución de la superficie de depósitos cálcicos del implante no dopado y dopado (S) en función del tiempo. Test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras pareadas. El asterisco (*) indica el grado de significación estadística ($p < 0.05$ (*) y $p < 0.005$ (**)).

La siguiente tabla (Tabla 9) reflejan en detalle los resultados del análisis estadístico no paramétrico (valor de p) de la histomorfometría reflejada en las gráficas (Figuras 63-66) entre los dos tipos de material implantado utilizado en los tiempos establecidos en este estudio.

Tabla 9. Resultados del análisis estadístico del estudio histomorfométrico de los implantes (A-S y A-S-MOD), considerando las superficies del implante (A), de hueso neoformado (B), conectivo (C) y depósitos cálcicos (D) en función del tiempo. Test no paramétrico de Mann-Whitney, para un nivel de significación estadística de $p < 0.05$. Los asteriscos indican el grado de significación estadística $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**).

SUPERFICIE DEL IMPLANTE						
A	1 MES	1 MESES [§]	3 MESES	3 MESES [§]	5 MESES	5 MESES [§]
1 MES		>0.999	0.0043 **	0.6277	0.0043 **	0.0043 **
1 MESES [§]			0.823	0.2424	0.0043 **	0.0043 **
3 MESES				0.5317	0.0079 **	0.0079 **
3 MESES [§]					0.0079 **	0.0079 **
5 MESES						0.944
5 MESES [§]						

SUPERFICIE HUESO NEOFORMADO						
B	1 MES	1 MESES [§]	3 MESES	3 MESES [§]	5 MESES	5 MESES [§]
1 MES		0.368	0.0173 *	0.0498 *	0.0043 **	0.0043 **
1 MESES [§]			0.0173 *	0.0195 *	0.0043 **	0.0043 **
3 MESES				0.6667	0.0079 **	0.0079 **
3 MESES [§]					0.0159 *	0.0952
5 MESES						0.0556
5 MESES [§]						

SUPERFICIE CONECTIVO						
C	1 MES	1 MESES [§]	3 MESES	3 MESES [§]	5 MESES	5 MESES [§]
1 MES		0.5714	0.3550	0.1797	0.3203	0.7381
1 MESES [§]			0.4242	0.1320	0.0043 **	0.0931
3 MESES				0.8290	0.0556	0.0823
3 MESES [§]					0.0043 **	0.0043 **
5 MESES						0.0519
5 MESES [§]						

SUPERFICIE DEPÓSITOS CÁLCICOS						
D	1 MES	1 MESES [§]	3 MESES	3 MESES [§]	5 MESES	5 MESES [§]
1 MES		0.6753	0.1320	0.1797	0.0108 *	0.0190 *
1 MESES [§]			0.0455 *	0.0411 *	0.0043 **	0.0190 *
3 MESES				0.9697	0.0173 *	0.1714
3 MESES [§]					0.0173 *	0.1143
5 MESES						0.5556
5 MESES [§]						

En base a los resultados expuestos en las figuras 63, 64, 65 y 66, así como en la tabla 9, se puede analizar de forma global la evolución de los implantes objeto de estudio en el tiempo. Se observa así un aumento progresivo y significativo en el tejido óseo (Figura 64) entre los meses 1 y 5 después de la cirugía. Así, el tejido óseo aumentó significativamente ($p < 0,05$) de $1,27 \pm 0,30 \text{ mm}^2$ (material no dopado) y $1,09 \pm 0,32 \text{ mm}^2$ (material dopado), a $2,12 \pm 0,21 \text{ mm}^2$ (no dopado) y $2,15 \pm 0,35 \text{ mm}^2$ (dopado) pasados 3 meses de la cirugía. Este incremento se hace más evidentes tras 5 meses de la cirugía ($p < 0,005$), alcanzando valores finales de $3,91 \pm 0,39 \text{ mm}^2$ (material no dopado) y $3,43 \pm 0,27 \text{ mm}^2$ (material dopado).

En paralelo al incremento de tejido óseo, se observó una reducción progresiva y significativa en la superficie del material implantado (Figura 63) y el componente basófilo circundante (material de no identificable) (Figura 66). Con respecto al material implantado, su superficie se redujo de $27,21 \pm 5,28 \text{ mm}^2$ (material no dopado) y $26,92 \pm 4,19 \text{ mm}^2$ (material dopado), a valores de $15,88 \pm 5,01 \text{ mm}^2$ (material no dopado) y $16,52 \pm 3,28 \text{ mm}^2$ (material dopado) después de 5 meses después de la cirugía. Un comportamiento similar se ha descrito para la superficie del material no identificable, disminuyendo de $1,75 \pm 0,90 \text{ mm}^2$ (material no dopado) y $1,64 \pm 0,46 \text{ mm}^2$ (material dopado) a 1 mes tras la cirugía, hasta un valor final de $0,30 \pm 0,29 \text{ mm}^2$ (material no dopado) y $0,36 \pm 0,23 \text{ mm}^2$ (material dopado) después de 5 meses después de la cirugía.

Cuando se analizó la evolución de la superficie ocupada por tejido conectivo (Figura 65), no se encontraron diferencias significativas entre 1 mes ($1,10 \pm 0,75$ y $1,22 \pm 0,41 \text{ mm}^2$, para el material no dopado y dopado respectivamente) y 3 meses ($1,63 \pm 0,92$ y $1,78 \pm 0,71 \text{ mm}^2$, para el material no dopado y material dopado respectivamente). Sin embargo, a los 5 meses después de la cirugía, el tejido conectivo se redujo significativamente respecto a los meses anteriores ($p < 0.005$) a $0,43 \pm 0,29 \text{ mm}^2$ (material no dopado) y $0,68 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ (material dopado).

Cuando se compararon los resultados del material dopado y no dopado para cada muestreo (1, 3 y 5 meses después de la cirugía), no se encontraron diferencias estadísticas significativas. A pesar de este hecho, cuando se compararon los valores medios para cada material, después de 5 meses, el material dopado (Activagen®), dio lugar a una reducción promedio menor de tejido conjuntivo (Figura 65) y una menor formación de tejido óseo (Figura 64), en comparación con los valores promedios para el material no dopado. Las diferencias en los valores promedio entre los materiales dopados y no dopados, fueron menos perceptibles para la evolución del área de superficie total del material implantado (Figura 63), y para el material no identificable (Figura 66), que para la evolución de tejido conectivo y la formación de tejido óseo.

DISCUSIÓN

7.- DISCUSIÓN

La sustitución o reemplazamiento del tejido óseo ha sido objeto de investigación durante muchos años por su alto interés en el campo de la cirugía reconstructiva osteoarticular, dada la evidente necesidad de sustituir el tejido óseo en situaciones determinadas como consecuencia de traumatismos, infecciones, tumores y malformaciones, que suponen graves problemas tanto para el paciente como para el cirujano que los tiene que tratar (Burg *et al.*, 2000; Sabir *et al.*, 2009; Winkler *et al.*, 2018). Esto ha supuesto que en las últimas décadas se haya incrementado de forma exponencial la utilización de los injertos de tejido óseo (autólogo, aloingénico y xenogénico) en la práctica habitual en el campo de la cirugía ortopédica, cirugía maxilo-facial, cirugía oral y neurocirugía (Laurencin *et al.*, 1999).

El injerto de hueso del propio paciente denominado autólogo o autoinjerto, es considerado como el más efectivo y utilizado tradicionalmente por los cirujanos para el tratamiento de defectos óseos. El autoinjerto es considerado el "*gold standard*" (Cornell, 1999; Giannoudis *et al.*, 2005), debido a que cumple con los tres elementos fundamentales que constituyen la *triada de la regeneración ósea*, es decir: (1) Presenta una estructura porosa abierta con una disposición tridimensional que permite su colonización por tejido óseo neoformado (osteoconducción), (2) posee proteínas no colágenas presentes en la matriz ósea extracelular que actúan de forma autocrina y paracrina como factores inductores, estimulando la migración y proliferación de células madre osteoprogenitoras de médula ósea (MSCs), así como su diferenciación a osteoblastos (osteoinducción) y (3) aporta numerosas células madre mesenquimales precursoras de osteoblastos y osteoblastos maduros (osteogenicidad). Pero su uso conlleva desventajas relacionadas con la morbilidad de la zona dadora, tales como dolor postoperatorio, sangrado, riesgo de infección, cantidad limitada de tejido óseo y necesidad de sacrificar estructuras normales, motivos por los que se continúa restringiendo su aplicación (Goldber, 1992; Kumar *et al.*, 2014). Teniendo en consideración estos inconvenientes, ha surgido en el mundo científico la necesidad de desarrollar e incorporar materiales biocompatibles que sean capaces de conseguir la regeneración del tejido óseo dañado de una forma verdaderamente eficaz (Hutmacher, 2006).

En base a lo anteriormente expuesto, el biomaterial "ideal" debería ser el resultado de la combinación de matrices osteoconductoras, células osteogénicas y/o materiales o agentes osteoinductores con el fin de proporcionar los tres elementos fundamentales para la regeneración ósea: una matriz osteoconduccionadora porosa que proporcione el andamiaje adecuado para el crecimiento del tejido óseo en su interior; factores osteoinductores que aporten los componente físicos y/o químicos capaces de

inducir la diferenciación de células madre a células de estirpe osteoblástica formadora de tejido óseo que faciliten el desarrollo de las diferentes fases del proceso de reparación ósea, y por último células osteogénicas, tanto maduras como indiferenciadas, que se diferenciaron según los distintos estadios de la regeneración ósea (McMahon *et al.*, 2013). Para el diseño de un biomaterial con la finalidad de ser posteriormente implantado en un defecto óseo, un aspecto importante a tener en cuenta es el tratamiento de su superficie, composición, y estructura 3D (Deligianni *et al.*, 2000; LeGeros, 2002; Karageourgiou y Kaplan, 2005). Es bien sabido que, los materiales bioactivos facilitan el crecimiento y diferenciación de células madre, así como la colonización por tejido óseo neoformado (Sun *et al.*, 2006; Marcacci *et al.*, 2007). La osteoconducción parece depender de una serie de factores como el tamaño del poro, el grado de interconexión entre ellos y de una serie de factores químicos, físico-químicos y biológicos descritos por diversos autores. Así, varios aspectos relacionados con la porosidad del biomaterial, han demostrado su importancia para las propiedades osteoconductoras: (1) el tamaño del poro, (2) el volumen total de poros del material, es decir, la relación entre el volumen del poro y el volumen de la muestra, y finalmente, (3) la interconexión entre los poros, este último aspecto es esencial para mantener el flujo de fluidos biológicos en los primeros momentos de su implantación y más tarde facilitar la invasión vascular que dará sustento a los elementos celulares existentes (Chang *et al.*, 2000; Albrektsson y Johansson, 2001; Zeltinger, *et al.*, 2001; Karageourgiou y Kaplan, 2005;). En definitiva, el tamaño del poro, la interconexión entre ellos y el volumen poroso (número poros/volumen de muestra) son factores primordiales para la invasión del material por parte de los tejidos adyacentes. A lo largo del tiempo y la evolución en investigación, se ha ido alcanzando un consenso en cuanto al tamaño óptimo de los poros (Bobyne *et al.*, 1980; Cook *et al.*, 1985; Murphy *et al.*, 2010; Bohner *et al.*, 2017). Se considera que el tamaño adecuado para permitir la penetración del tejido óseo neoformado oscila entre 100-400 micras, sin olvidar la interconectividad entre ellos. Este último aspecto es en ocasiones difícil de valorar, incluso con técnicas de porosimetría por intrusión de mercurio, pues si bien la técnica proporciona datos o información fiable sobre la distribución de los poros y su superficie interna, sin embargo, no proporciona información relevante sobre poros aislados. La micro-TC, si aporta una solución al problema planteado dado que sus datos pueden ser representados en formatos de 2D y 3D con alta resolución, así, el tejido que coloniza en interior del material puede ser cuantificado (Jones *et al.*, 2004; Gauthier *et al.*, 2005; Bohner *et al.*, 2017).

Cuando el material objeto de estudio en la presente investigación, se introduce en la cavidad medular, inicialmente se recubre de elementos de la medula ósea, para más tarde aparecer hueso inmaduro en su superficie. Con el transcurso del tiempo, este se va remodelando a hueso trabecular bien organizado, tal como se constata en el estudio y coincidiendo con las observaciones de Otsuki et al (2006).

En relación con los cambios del material observados en el estudio radiológico, estos hacían referencia a la densidad radiológica del centro y de la periferia del material y su comparación en los diferentes periodos. El estudio de la trabeculación se hacía con la RX simple. En el presente trabajo se han hecho radiografías simples, mediante equipo de mamografía de alta resolución, a los cortes anatómicos de unos 3 mm obtenidos de la tibia del conejo ya sacrificado (figuras 39, 40, 44 y 45). Estas imágenes quedan muy lejos de aportar la información que nos ha dado el microTC (figura 41) y aún más cuando se amplía la información obtenida en el microTC con el estudio de los DATARAW. Es necesario hacer la observación de que el estudio mamográfico se realizó después de sacrificar al animal, mientras que los estudios mediante TC pueden ser realizados sin necesidad de sacrificar al animal. Es una diferencia muy a tener en cuenta para estudios posteriores de biomateriales implantados, permitiendo estudiar su evolución en el tiempo sin necesidad de sacrificar al animal. El microTC no es lesivo físicamente si exceptuamos los efectos de la radiación. De aquí que podamos no solo hacer un mejor estudio de la imagen, de su procesado matemático, sino que además no se necesita del sacrificio del animal.

Con estos resultados de imagen es imposible defender actualmente el estudio del comportamiento del biomaterial o de la estructura corticomedular del biomaterial y del material oseo mediante la técnica de mamografía de alta resolución. Es una técnica que aporta escasa información respecto al microTC (Castaneda *et al.*, 2006).

7.1 INTERPRETACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LOS ROIs EFECTUADOS A LA PIEZA CON EL microTC

El proceso de reabsorción del material

Del estudio de los ROI de 4 x 4 mm en los que se midió la reabsorción, degradación o integración del biomaterial en el tejido óseo implantado. Se constató que realmente existe una relación estadísticamente significativa entre el fenómeno de reabsorción del material y el factor tiempo, de modo que a medida que trascurrió el tiempo de implantación disminuyen los valores obtenidos de la cerámica, afectando

menos al material dopado (recubiertas) que a las no dopadas. Esta observación no era predecible de antemano, pero se trata de una relación estadísticamente significativa tal como ha quedado demostrado en el análisis matemático de los resultados obtenidos con el microTC y que sin embargo pasaron desapercibidos en la observación visual de las imágenes del microTC.

De igual modo, a medida que pasó el tiempo también se observó un aumento de la variabilidad de los datos referidos a los boxéles obtenidos de la porción centro o interior del biomaterial de cada muestra estudiada tal como se detalla en las figuras 28 y 41. Significa esto que el biomaterial se hizo más heterogéneo en el valor de cada uno de sus voxeles a medida que pasa el tiempo. No se apreció diferencia en la variabilidad de las muestras del biomaterial dopado o no dopado, estando la media de la variabilidad en ambos casos en 0.06. La variabilidad fue mayor en los voxeles de unidades Hounsfield más inferiores, o sea en aquellos que no constituían la mayor densidad de los grumos de cerámica.

Los datos del valor "r" demuestran matemáticamente que el biomaterial se reabsorbe de forma centrípeta desde su superficie hacia el centro del mismo. Este dato también fue imposible observar por los dos expertos en imagen en el estudio descriptivo de las imágenes obtenidas con el microTC realizado.

En cuanto a la variable "X" se ha visto que en las piezas no implantadas no se puede aseverar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la reabsorción de la muestra y la distancia X debido a que el biomaterial aún no ha sido implantado. Por el contrario en el material implantado se aprecia que el biomaterial se reabsorbe más por los bordes de la pieza que por la porción central de la misma, pero sin poder diferenciar entre el borde superficial o cortical y el borde profundo o medular. Esto se comprobó en la interpretación estadística que se hizo durante el desarrollo de la tesis de forma paralela y que no ha sido descrita en el apartado de material y métodos.

En relación al "ángulo phy", no presenta valor estadísticamente significativo por lo que no existen diferencias entre la absorción de la pieza en los voxeles situados en diferencia ángulo respecto al eje de referencia central o X. En cualquier forma este ángulo phy es de difícil estudio porque no se tiene información de la inclinación de la pieza en el momento de su posicionamiento en el hueso huésped. Esta variable del estudio de coordenadas cilíndricas se considera que es un reto para motivar la realización de nuevos estudios quedando solamente aceptado que el sistema de estudio del TC bajo la óptica de un análisis matemático de la imagen queda validado. Es por ello que el valor phi, aunque no tenga representación estadística por sí mismo, sí

que ha servido para testar los resultados obtenidos en las dos otras variables de las tres que componen el estudio de coordenadas cilíndricas, o sea las variables "X" y "r" (figuras 28, 29, 30 y 31).

En definitiva, a partir de los datos obtenidos con el microTC de las muestras analizadas podemos afirmar que el grado de reabsorción del material está en función sobre todo del tiempo que el material está implantado, de que el material este dopado con M.O.D. y de la distancia radial o del borde de la muestra a su eje central X.

Con el resultado del análisis de los valores numéricos máximos y mínimos del biomaterial (figura 53) podemos afirmar:

- a) Los valores máximos sufren un importante descenso tras ser introducido o implantado el material en el tejido oseo huesped o tibia del conejo. El valor maximo se mantiene fijo a lo largo del tiempo de estudio.
- b) Los valores minimos que corresponden al tejido de sosten del biomaterial donde va disuelto los granos de ceramica o lo que despues será el tejido osteogenico y fibroblastico, no cambia excesivamente de valor aunque sufren un descenso a lo lago del tiempo y corresponden en el biomaterial sin implantar a la "amalgama" en la que van dispersos los grumos de ceramica y en el biomaterial implantado va a corresponder a esa amalgama pero invadida por tejido oseo, conectivo y de neoformacion vascular o angiogenesis. La interpretacion radiologica de estos valores minimos o unidades Hounsfield bajas va a ser distinta en los diferentes periodos de tiempo. En el biomaterial sin implantar corresponden al tejido de suspension en el que se encuentran los grumos de ceramica y en el material implantado corresponden al tejido conectivo y oseo neoformado que se entremezcla con el tejido de suspension inicial de los grumos de ceramica que constituyen el biomaterial.

En cuanto al estudio del grado de dispersión de los grumos de cerámica del biomaterial a lo largo del tiempo (ROI cilíndrico de 10 x 10 x 10 mm) y basándonos en los cálculos matemáticos efectuados, llegamos a la conclusión siguiente: La "Distancia media" de los voxels más densos crece con el tiempo en nuestras muestras, aproximadamente 0.16 mm cada mes. Además, el resultado es estadísticamente significativo ($p < 0.0002$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los materiales dopados y los no dopados.

El estudio enfocado a buscar posibles cambios en la evolución de la cortical normal mediante ROI de 3 x 3 mm muestra una muy pequeña disminución de los valores de la reabsorción con el tiempo, y no es estadísticamente significativa (el p -valor es superior a 0.005). Tampoco existe diferencia significativa entre las muestras dopadas y las no dopadas.

Estos resultados respaldan y acreditan que en la cortical normal no se aprecian cambios matemáticos, ni visuales significativos y en cambio sí que apreciábamos cambios en los valores de la reabsorción y la dispersión del biomaterial, o sea que con el mismo estudio matemático se predice que no hay cambios en la cortical normal y que sí que existen cambios significativamente estadísticos en el biomaterial. Estos hallazgos son suficientes para validar el sistema de estudio matemático de los DATARAW de los ROI obtenidos con el microTC.

En síntesis, el análisis matemático del conjunto del estudio de los tres tipos de ROI realizados del biomaterial podemos manifestar o formular que:

- La cortical normal no experimenta cambios durante los periodos de tiempo estudiado.
- El biomaterial sufre una importante reabsorción con el paso del tiempo
- Los grumos cerámicos densos integrados en el biomaterial sufren, no solo una reabsorción, sino también, una dispersión en el interior del canal medular semejante a un “efecto estallido”.
- Este proceso de reabsorción es más importante en los márgenes de la muestra que en el centro. Lo que equivaldría a decir que la porosidad de la muestra aumenta en su periferia (figura 51)
- La reabsorción de la muestra es mayor en sus extremos cortical y medular que en el centro de la muestra según el eje X, pero sin diferencias significativas entre ambos extremos ($p < 0.182$, tabla 6).

Estas observaciones morfológicas quedan representadas en las reconstrucciones en 3 D en donde se refleja las variaciones en la forma del cilindro de biomaterial antes de implantar y entre el primer, tercer y quinto mes postimplantación (Figuras 67, 68 y 69). Llama la atención la gran desestructuración, como consecuencia de la reabsorción, que sufre el biomaterial y la formación de trabéculas óseas no solo dentro del biomaterial sino también entre el biomaterial y la cortical normal próxima al mismo.

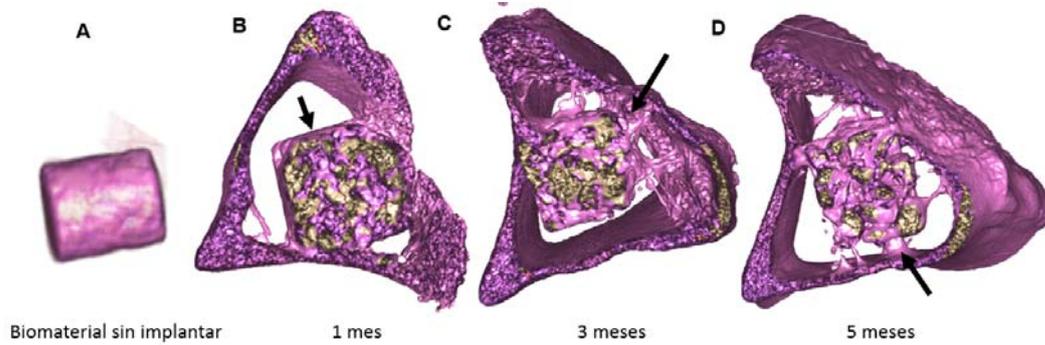


Figura 67: Imágenes representativas en 3D del microTC de muestras del biomaterial sin implantar (A) y al primer, tercer y quinto mes de la implantación (B, C y D). En las imágenes se aprecia la reabsorción progresiva del material en el tiempo de evolución y la formación de trabéculas óseas en la superficie del material (flechas) así como entre el biomaterial y las corticales óseas adyacentes.

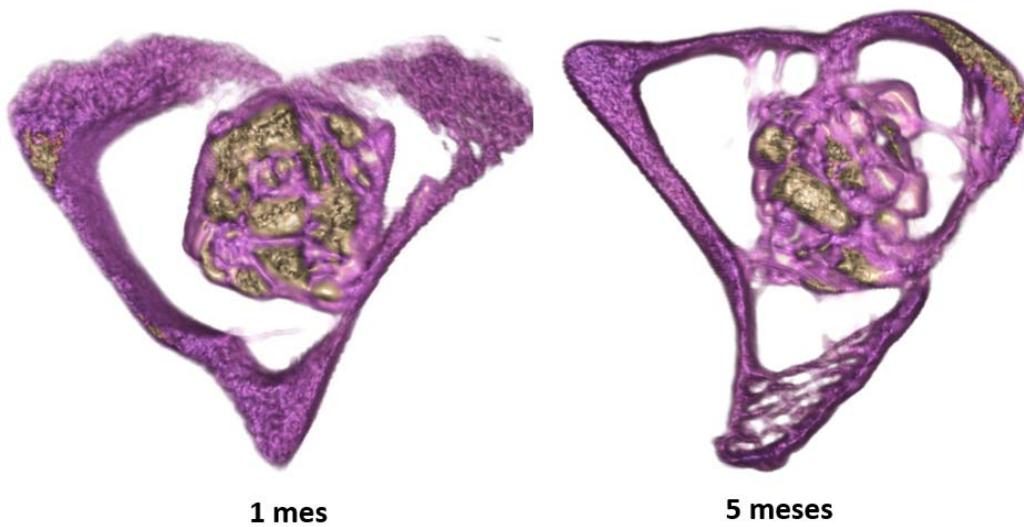


Figura 68: Imágenes representativas en 3D de menor espesor de corte al mes y 5 meses de la cirugía.

La figura 69 muestra la imagen inicial de obtención de la muestra cuando se estudia con el microTC, la imagen de reformateo en el plano sagital y la reconstrucción en 3D. Las trabéculas aunque se observa bien en los cortes axiales son mejor visualizadas en la reconstrucción en 3D donde se consigue un efecto más volumétrico y real del biomaterial implantado y del hueso huésped.

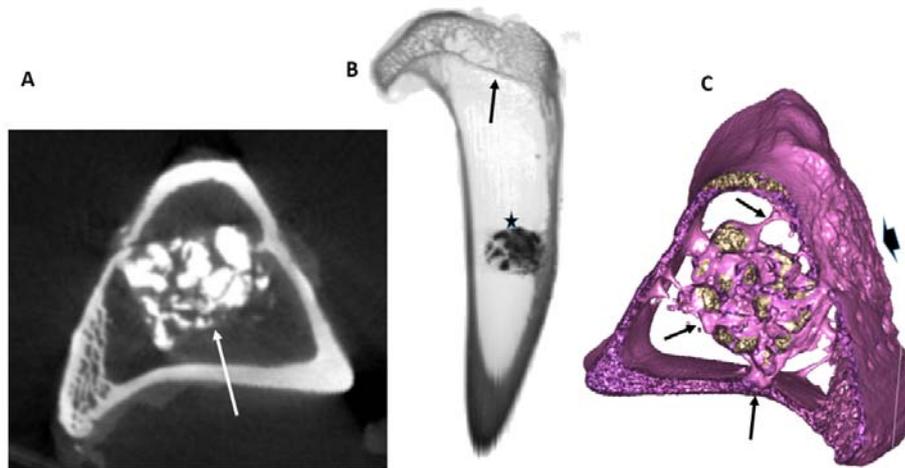


Figura 69: Imágenes representativas obtenidas con el microTC y cortes de 50 micras. (A) Corte axial en donde se identifica el hueso cortical compacto, hueso trabecular y el biomaterial implantado. (Flecha). (B) Reconstrucción coronal tibial en donde se aprecia la línea metafisaria y trabeculación epifisarias (flecha) e implante (asterisco). (C) Reconstrucción volumen rendering de la corticomedular y del biomaterial a los 5 meses de la implantación el cual muestra importante reabsorción, importante trabeculación ósea (flecha). Así mismo se identifica la irregularidad superficial cortical pretibial (cabeza de flecha) a través de la cual se introdujo quirúrgicamente el biomaterial en el momento del implante.

Los resultados de esta forma obtenidos a través de la alta definición que proporciona el micro-TC están en consonancia con los aportados por otros autores (Shao *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007; van Lenthe *et al.*, 2007; Filardo *et al.*, 2018)

7.2 INTERPRETACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO E HISTOMORFOMETRICO

Como se ha sido ampliamente descrito, el proceso de reparación ósea consiste en (1) el reclutamiento de células mesenquimales, que se diferencian en fibroblastos y células osteogénicas, (2) formación de matriz condroide extracelular y (3) mineralización/resorción de matriz condroide (Marsell y Einhorn, 2011). La bioingeniería actual del tejido óseo incluye la implantación de estructuras de fosfato de calcio poroso y de silicato. Su presencia induce una respuesta similar a la descrita para la remodelación ósea (Barrere *et al.*, 2006). Se ha descrito que, cuando se implantan materiales porosos, se reabsorben progresivamente y se sustituyen por tejido óseo neoformado. Este proceso sigue una evolución concéntrica, desde la periferia hasta el

centro del material implantado (Barrere et al., 2006; Jones et al., 2007; Bohner et al., 2017; Sweedy et al. al., 2017). Los resultados del presente trabajo, están en concordancia con este proceso. Después de la implantación, el material se degrada progresivamente, de 1 a 5 meses después de la cirugía. Esta degradación comenzó en la periferia del material implantado y avanzó hasta su núcleo. El análisis descriptivo consensuado del mCT 3D fue capaz de describir este proceso como una desintegración y desorganización progresiva de la morfología inicial del implante, acompañado por la neoformación del tejido óseo. Sin embargo, este análisis descriptivo no fue capaz de detectar la evolución de la matriz conectiva, ni cuantificar la evolución temporal de la degradación del biomaterial, así como la dispersión/neoformación ósea. Para aclarar estos problemas, fue necesario recurrir al análisis de DATARAW e histomorfométricos. La necesidad de complementar los resultados del mTC con otras técnicas para la evolución del biomaterial en el tiempo, en ensayos in vivo se ha descrito en la bibliografía publicada anteriormente (Sancho-Tello et al., 2015; Bohner et al., 2017; Sweedy et al. al., 2017), incluyendo el análisis matemático de imágenes, el análisis histológico macro y microscópico, o el diseño de algoritmos específicos para el análisis de datos.

Como se ha explicado, el análisis de datos brutos mostró que la dispersión del implante tuvo lugar a una velocidad de $\sim 0,16$ mm por mes. Esta dispersión del material refleja su degradación. Teniendo en cuenta una superficie total de 116,63 mm², y de acuerdo con los resultados histomorfométricos, la superficie del implante mostró una degradación aproximadamente dependiente del tiempo, del 12% - 24% después de 5 meses tras la cirugía. Estos resultados se pueden comparar parcialmente con los mostrados por Sweedy et al. (2017), quienes definieron una relación de reabsorción de andamios de $22.16 \pm 3.3\%$ - $31.66 \pm 6.8\%$ para un período de estudio de 6 semanas usando ovejas Swees Alpines. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este índice de reabsorción no solo depende de la especie animal, sino también del tamaño de poro, tamaño y composición del implante (Bohner et al., 2017; Sweedy et al., 2017). Además, Bohner et al. (2017) describieron que esta reabsorción, así como la formación de hueso/tejido mineralizado no es un proceso uniforme, con un rápido aumento en las primeras 4 a 10 semanas seguido de una disminución lenta tras 10 - 12 semanas después de la cirugía. Basandonos en los resultados expuestos anteriormente, la degradación del andamio fue uniforme durante los 5 meses posteriores a la intervención. Por el contrario, la formación de tejido óseo y la reabsorción de la matriz extracelular fueron más intensas al final del período del experimento (5 meses), que durante los 3 primeros meses del mismo. Teniendo en cuenta que las características físicas de los biomateriales (por ejemplo, el diámetro de micro y macro-poros) no se

establecieron durante este estudio, las diferencias entre ambos trabajos en la evolución del proceso de resorción/reparación ósea, no se pueden discutir realmente. Bohner *et al.*, (2017) concluyeron en su trabajo que la matriz mineralizada y la ulterior formación de hueso, necesitaban de una red porosa interconectada, con un tamaño de poro mayor a 1 - 10 μm . Esto significaría que se necesita un proceso de degradación de armazón del implante inicial, para proporcionar una estructura adecuada para la reparación ósea, lo que explicaría la degradación progresiva del biomaterial, así como la lenta resorción de la matriz extracelular y la formación ósea al inicio del estudio descrita anteriormente.

Con respecto a la composición del biomaterial, el tratamiento con gel DBM (Activagen®) no dio lugar a diferencias significativas entre implantes dopados y no dopados. Solo el análisis matemático de datos brutos pudo detectar diferencias significativas en los valores promedio de HU del implante en el estudio entre ambos tipos de materiales. Estos resultados podrían deberse a una mayor resorción fagocítica y osteoclástica en función de la composición del biomaterial. Sin embargo, no se describieron diferencias significativas cuando se analizaron la dispersión del implante, la resorción de la matriz extracelular y la formación del tejido óseo. DBM-gel (Activagen®) está compuesto de gránulos liofilizados de colágeno tipo I. Después de ser implantado en defectos óseos, es degradado por los osteoclastos, lo que lleva a la liberación de factores proteicos que inducen la diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastos (Di Stefano *et al.*, 2009, Shalash *et al.*, 2013). Shalash *et al.*, (2013) publicaron un estudio de 6 meses basado en la comparación entre el uso de TCP solo y TCP más DBM para la regeneración de deficiencias de los rebordes alveolares maxilares antes de la colocación de los implantes. Según este estudio, después de 6 meses, TCP más DBM resultó en una mayor formación de hueso y resorción que el implante de TCP solo. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas cuando se analizó el ancho de la cresta, concluyendo que el implante de TCP solo o en combinación con DBM apoya la formación de hueso nuevo. Como se ha expuesto previamente, en el presente trabajo, la implantación de armazones no dopados dio como resultado una mayor reabsorción del biomaterial, sin diferencias en la formación de hueso nuevo. Aunque la razón de estos resultados sigue sin estar clara, una posible explicación podría ser la estimulación temprana de la diferenciación de los osteoblastos cuando se agrega DBM, controlando la actividad resorbente de los osteoclastos (Martin y Ng, 1994). Debe tenerse en cuenta que el estudio se realizó durante 5 meses, y la síntesis de tejido óseo nuevo pareció ser más activa al final de este período. Con el fin de obtener diferencias significativas en la formación de hueso nuevo entre ambos materiales (dopado y no dopado), se necesitaría un estudio durante un período de tiempo más largo.

En base a los hallazgos anatomopatológicos y su correlación con el microTC demostramos que:

- 1.) Existe una evidente correlación entre las imágenes obtenidas mediante el microTC y las imágenes anatomopatológicas. En la figura 60 se apreció que se podía perfectamente identificar los mismos grupos de cerámica del biomaterial visualizados en las imágenes de microTC y en los cortes histológicos. Mediante una flecha roja se correlacionó la identificación de un grupo de cerámica, valga como ejemplo, en cada muestra dopada y no dopada correspondiente a cada periodo de tiempo del estudio.
- 2.) Con la simple observación e interpretación de las imágenes del microTC no es posible cuantificar el grado de reabsorción ni de dispersión de manera tan precisa como con el estudio matemático de los DATARAW,
- 3.) Es el estudio matemático de la imagen del microTC la más sensible en el diagnóstico de la evolución del biomaterial y por supuesto la histomorfometría la que ajusta y define en última instancia el espacio residual entre los grupos del biomaterial, cuantificando y definiendo la calidad del tejido óseo y el tejido conectivo neoformado.

7.3 TRASLACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES AL ENTORNO CLÍNICO

En principio podemos afirmar que la caracterización del biomaterial y de la corticomedular ósea es más precisa con el uso del microTC que mediante la Técnica Radiográfica simple, en este caso la mamografía, por lo que en el transcurso del estudio se desechó esta técnica de imagen para el estudio de la pieza anatómica ya que no aportaba mejoría de imagen ni por supuesto permitía hacer un estudio matemático y estadístico de todos los datos numéricos de los voxels que se obtenían con el microTC y que constituye la pieza principal de esta tesis.

La utilización de un microTC experimental permite realizar cortes de 50 micras. Cuando la muestra a estudiar es muy pequeña se necesita hacer cortes con un microTC. Los TC convencionales realizan cortes de 0,5 mm, mientras el microTC permite hacer cortes de 50 micras e incluso inferiores. Con los resultados obtenidos mediante el estudio con microTC de un espécimen animal pequeño se puede conseguir una metodología de estudio de imagen que una vez validada es extrapolable al campo

asistencial y en concreto al futuro estudio en pacientes clínicos en los que se quiera valorar, por ejemplo, material quirúrgico, implantes de biomateriales, etc.

Se establece un puente científico entre el estudio TC experimental preclínico y el TC clínico. Siendo exportable en un futuro toda la validación que se pueda hacer de modo experimental para su aplicación en el campo clínico traumatológico, protésico, cirugía maxilofacial con implantes dentales, etc. (Bagi *et al.*, 2011)

7.4 DEFINICION DE LAS UNIDADES DE MEDIDA CON EL TC

Con la técnica del TC o microTC obtenemos unos valores o unidades Hounsfield que corresponden al valor resultante de la absorción del haz de rayos X cuando atraviesa un voxel o unidad de volumen del animal a estudiar y se traduce en un valor numérico o pixel. Con estos valores o unidades Hounsfield se reconstruyen las imágenes y también se pueden hacer cálculos matemáticos y procesarlos para obtener resultados científicos, como se ha hecho en este trabajo. Estas unidades Hounsfield se pueden representar en una escala de grises, donde el negro representa valores negativos, por ejemplo, el aire; y el blanco valores positivos, por ejemplo el hueso. Oscilan entre unos +1.000 unidades para el hueso y -1.000 unidades Hounsfield para el aire, Los valores medios corresponden a las estructuras líquidas con un valor aproximado de alrededor de 1a10 unidades Hounsfield. Los valores o unidades Hounsfield por debajo de cero, o sea negativos, corresponden a la grasa.

Los programas de reformateo o programas de visualización de la imagen llevan escalas de colores que podemos aplicar y dentro de cada escala ajustar los valores. Este procesado o mejor post-procesado informático de la imagen es muy operador dependiente. Valga como ejemplo que al procesar las imágenes obtenidas del estudio con microTC de la tibia del conejo con el material implantado se podían obtener tres tipos de imágenes iguales en un principio, porque responden al mismo valor numérico o unidades Hounsfield, pero diferentes entre sí según el color que le asignemos.

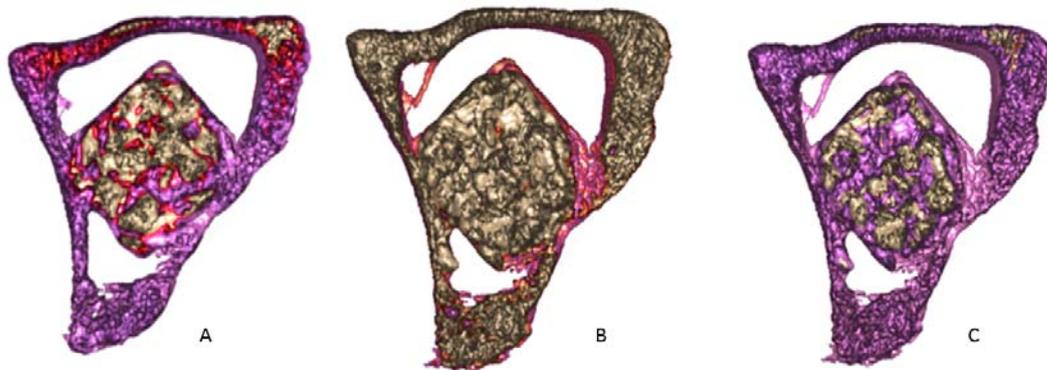


Figura 70: Imágenes correspondientes al mismo corte anatómico e igual unidades Hounsfield. La imagen B era muy uniforme y la imagen A muy artificiosa por lo que se optó por elegir la imagen C para representar el biomaterial y la cortical

Veamos el siguiente ejemplo de la figura 69 donde se aprecia el mismo corte anatómico y las mismas unidades Hounsfield pero según nos movamos en la escala de color asignado a cada unidad podremos obtener tres tipos de imagen (Figura 70 A, B y C) donde la diferenciación entre la corticomedular normal y el material implantado es diferente en las tres imágenes. En la figura B es indistinguible y en la figura A se obtiene una imagen muy artificiosa por lo que se optó por utilizar la escala de colores representados en la figura C que permitía diferenciar la cortical normal y el implante con sus grumos de cerámica de un valor aproximado a la propia cortical y el resto de los constituyentes del material implantado. Estos presentaban un valor que oscilaba alrededor de 600 unidades y que no ha sido posible diferenciarlo e identificarlo en la imagen de microTC ni con el estudio matemático de los RAWDATA contenidos en los diferentes ROI seleccionados. Ha sido finalmente la anatomía patológica la que ha podido definir que corresponde a tejido óseo neoformado, tejido conectivo neoformado y a un material de descomposición del propio biomaterial con sus grumos de cerámica en el interior.

En resumen, se debe saber y conocer que los programas de estudio de imagen son muy operador dependiente, quedando en manos del operador que procesa la imagen el seleccionar aquel nivel de ventana que consiga representar las imágenes de manera más ilustrativa, diagnóstica y que se aproxime más a la realidad anatómica que se estudia.

7.5 DIFICULTADES OBTENIDAS EN EL ESTUDIO DEL MATERIAL IMPLANTADO.

Existen dos puntos importantes que han dificultado el estudio sobre el biomaterial estudiado:

- A. el primero es debido a que el biomaterial posee una estructura muy heterogénea, aunque las dos muestras previas a su implantación procedan del mismo proceso de fabricación. Esta heterogeneidad pudiera introducir variables no apreciadas en este estudio. Este hecho queda constatado en figura 71 en donde se muestra la heterogeneidad del biomaterial: la muestra 1 del biomaterial tiene un valor medio en unidades de 0.52488 (valor máximo de 1.54493), mientras que la muestra 2 tiene un valor medio de 0,54284 (valor máximo de 1.65094) (figuras 53 y 54)

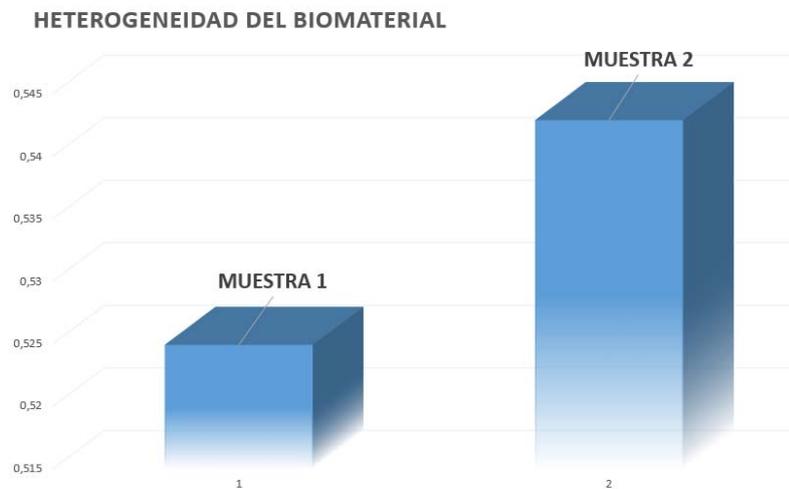


Figura 71: Valores promedios de las dos muestras de biomaterial sin implantar.

- B. El segundo punto que ha dificultado el estudio es que no se ha utilizado la misma pieza del biomaterial para ser estudiada antes de su implantación en el hueso huésped y después, ya sea al mes, tres o cinco meses de sacrificio del animal. Al ser el biomaterial de una porosidad con distribución aleatoria variable (no uniforme) cada pieza es distinta.

7.6 CALIDAD DE LAS IMÁGENES DEL MICROTCT

Es sabido que un TC clínico permite realizar cortes finos de hasta 0,5 mm, pero las imágenes obtenidas no han aportado la información ni calidad suficiente para poder definir bien la diferencia entre biomaterial, estructura corticomédular, etc. (figura 72)

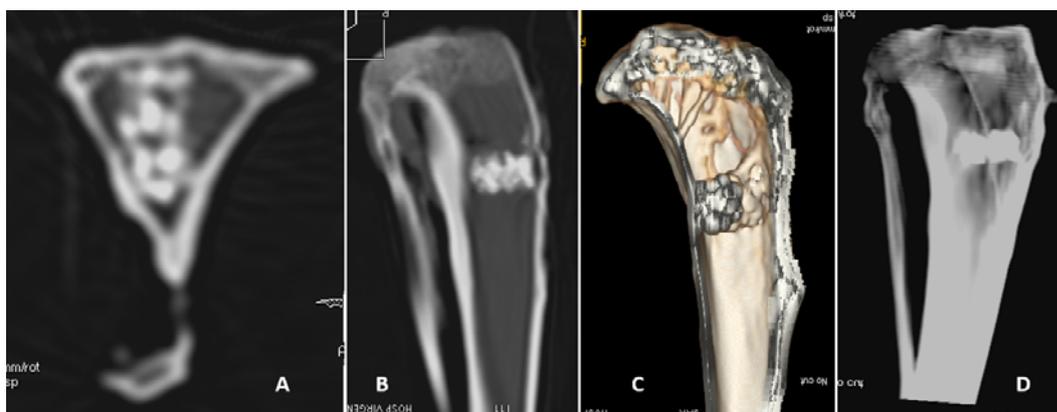


Figura 72. Imágenes obtenidas con TC convencional, clínico o asistencial. En estas imágenes se aprecia de izqda. a dcha. el corte axial (A), la reconstrucción sagital multiplanar (B), la reconstrucción en volumen rendering con ventana de hueso (C) y la reconstrucción también en volumen rendering con algoritmo de hueso transparente (D).

Ha sido con el microTC experimental perteneciente a la Universidad de Murcia, cuando se han conseguido imágenes de las que se pudieron obtener resultados, en cuanto a información, satisfactorios. El TC se realizó mediante cortes de 50 micras de espesor, lo que supuso una cantidad total de imágenes de entre 800-1000 imágenes abarcando solo la extensión del biomaterial y dependía en función de la inclinación del mismo.

Con las imágenes obtenidas con el microTC se puede afirmar que las reconstrucciones hechas aportan suficiente información iconográfica a la vista de las imágenes publicadas en otros trabajos de la bibliografía en relación con el estudio de biomateriales (Harkness, 1980; Meseguer, 1993).

Otras alternativas actuales aplicadas en el campo de la investigación es el SINCROTOM o CICLOTRON (acelerador de partículas de trayectoria circular usado para el bombardeo del núcleo de los átomos para producir transmutaciones y

radiactividad artificial). Esta radiación es muy intensa, concentrada y coherente espacialmente, propiedades idóneas para poder realizar una amplia gama de experimentos para explorar las propiedades de todo tipo de materiales orgánicos e inorgánicos, utilizando técnicas como la espectroscopia, dispersión, difracción y microscopía. En el sincrotrón es el objeto a estudio, animado o no, el que gira sobre la fuente energética, a diferencia de los microTC, donde es, al contrario. En nuestro caso (experimentación animal) sería imposible hacer girar a los animales de experimentación sobre la fuente de energía.

La figura 73 representa la comparación de las imágenes, unas obtenidas de la bibliografía y otras de nuestro microTC.

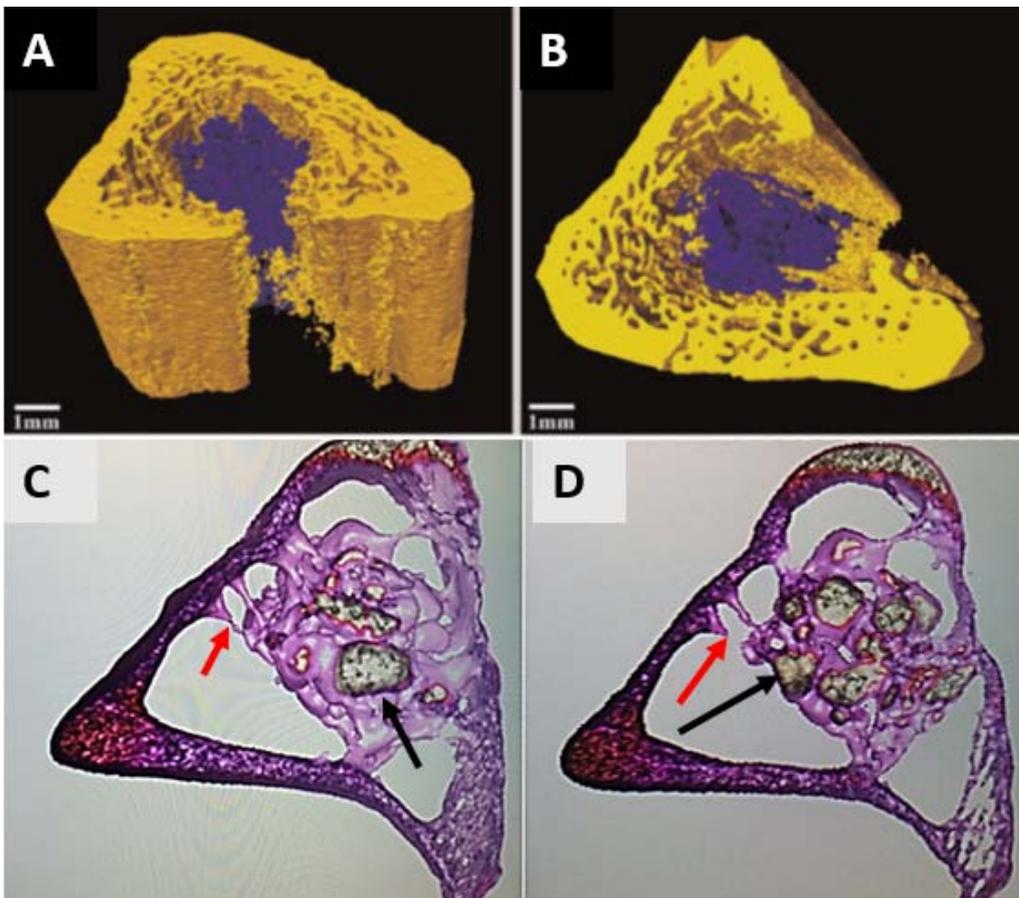


Figura 73: (A y B) imágenes obtenidas mediante ciclotrón. (C y D) imágenes en 3 D obtenidas con nuestro equipo de microTC. En amarillo-blanco el biomaterial (flecha negra) y en rosa-rojo (flecha roja) el tejido óseo trabecular neoformado así como la cortical de la tibia del animal. Las imágenes en color disponible en línea en

www.liebertonline.com/tea

7.7 VALIDACION DE LAS IMAGENES DEL TC

Las imágenes obtenidas con el microTC y reconstruidas, una vez validadas matemática e histológicamente, nos consideramos capaces de reproducir los resultados y aseverar que con la imagen del microTC se puede llevar a cabo una predicción de los cambios, cuantitativos y cualitativos, que va a experimentar el biomaterial con el paso del tiempo y después de ser implantado en el hueso huésped.

En la figura 74 se aprecia la correlación entre las imágenes obtenidas con el microTC y las obtenidas con el microscopio óptico. La validación de las imágenes de microTC queda aceptada viendo la gran correlación que existe con las imágenes histológicas. Con las imágenes del microTC se puede predecir el resultado anatomopatológico.

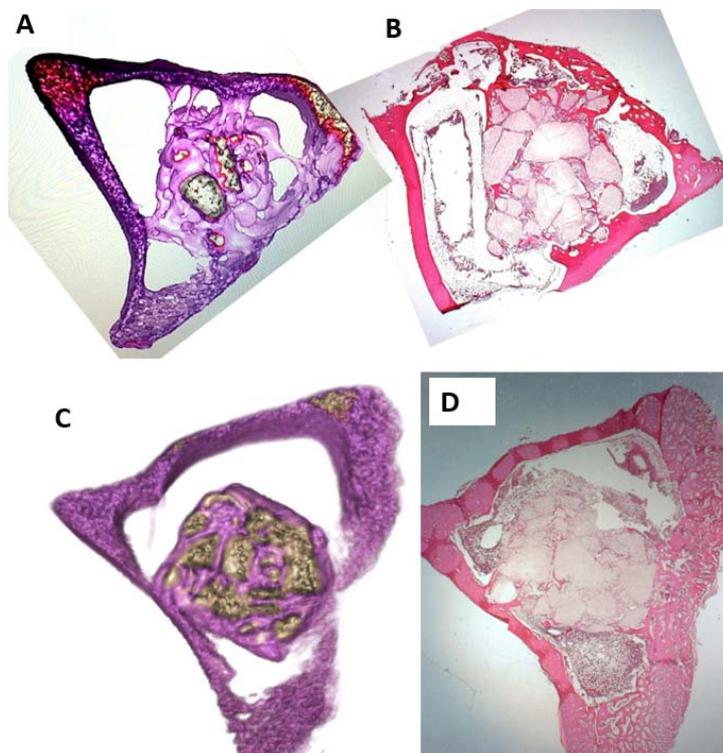


Figura 74: A y C corresponde a imágenes representativas de reconstrucciones en 3D del microTC; B y D las imágenes histológicas de los cortes correspondientes a la misma pieza.

En futuros estudios, y validado el procedimiento de estudio del microTC, objetivo principal de esta tesis, podemos aseverar que de una imagen TC con alta precisión de un hueso, biomaterial, etc, seremos capaces de poder predecir los acontecimientos que están ocurriendo a nivel histológico. De modo que se puede informar predictivamente la histología y la anatomía patológica mediante el microTC.

Se puede resumir afirmando que el estudio con microTC, el reformateo posterior de la imagen y el estudio matemático de los valores de cada pixel, tiene gran capacidad predictiva en visualizar los cambios buscados en el biomaterial y tejido óseo huésped. Lo que podría ser extrapolable al estudio de otros materiales y tejidos.

7.8 FUTURO PREDECIBLE.

Este trabajo pretende aportar nuevas perspectivas en el estudio de experimentación animal utilizando el microTC como herramienta de estudio de los tejidos anatómicos que se estudien en un futuro (grasa, parénquima, hueso, etc.).

La continuidad de este trabajo sería el seguir profundizando en el campo de la imagen, tanto de TC como de RM e incluso de ecografía, aunque esta última técnica es muy operador dependiente. Seguir trabajando buscando como resultado futuro el que las imágenes digitales sean procesadas matemáticamente, no solo con perspectivas a construir dicha imagen para ser visualizada por el observador, con las conocidas leyes matemáticas de la transformada de Fourier o de Radon, sino el que los datos numéricos de esas imágenes sean procesados estadísticamente para que sean incorporadas a un banco de datos producto de resultados normales repetitivos que definan la normalidad y a partir de aquí sentar las bases matemáticas para que un programa informático aporte anomalías que posteriormente, siempre sean validadas, por el observador. Esto no solo le ayuda en su trabajo sino que le aporta tranquilidad al evitar errores de observación por cansancio, agotamiento, distracción, o simplemente porque somos incapaces de observar las diferencias que matemáticamente sí que son objetivables.

No se trata de autoinformarse la imagen por si sola, sino como herramienta de apoyo para que el observador la use, y la valide o no, en función de sus conocimientos y experiencia.

Es mas aún, se intentaría hacer un estudio del TC clinico-asistencial ante por ejemplo, un paciente oncologico, para intentar caracterizar histologica e inmunologicamente el tumor, valorar el componente edematoso o fibrotico que lo acompaña, o valorar en el tiempo el tipo de respuesta al tratamiento oncologico.

Este analisis a partir de los DATARAW y no solo de las imágenes ya reformateadas se podrian correlacionar con los datos anatomopatologicos, inmunologicos y con la evolucion clinica del paciente y establecer unos patrones de conducta (CAD) que nos permitan predecir la evolucion del proceso neoplasico e incluso detectar con prontitud cualquier cambio o mutacion que pudiera existir en cualquier proceso neoplasico (figura 75).

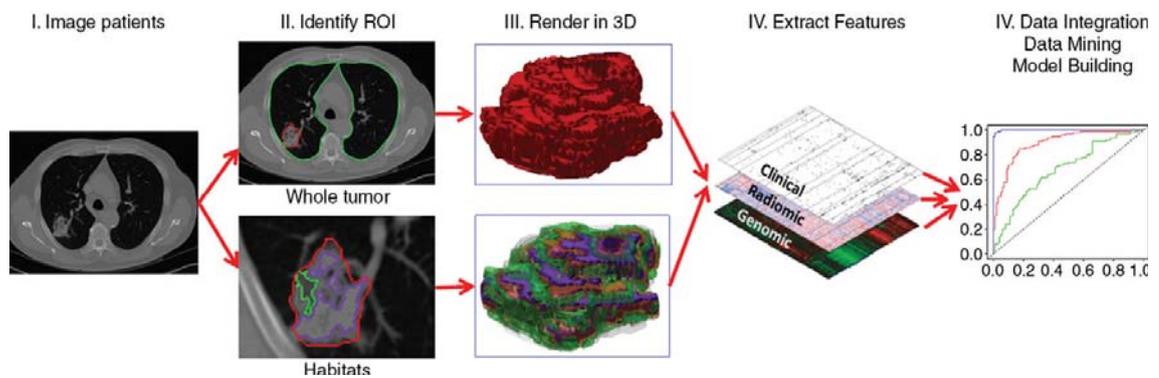


Figura 75: Imagen extraida de Radiology 2016; 278:563–577

CONCLUSIONES

8.- CONCLUSIONES

1. Mediante el estudio de la imagen del TC se aprecia que el biomaterial sufre un proceso de desestructuración y remodelación del mismo a lo largo del tiempo. Lo que es indicativo de que dentro del biomaterial existe una reabsorción y formación de tejido de partes blandas que en la anatomía patológica e histomorfometría se confirma que esta colonización existente dentro del biomaterial corresponde a tejido conectivo y nuevo tejido óseo. Este tejido conectivo constituye la base sobre la que posteriormente se formará hueso sólido.

2. El modelo matemático utilizado predice la evolución del biomaterial a lo largo del tiempo. Tanto en cuanto a su reabsorción, como a su dispersión o disgregación. Lo que supone una validación del método matemático elegido para estudiar las imágenes del microTC.

3. El estudio matemático de la imagen supera la observación visual y la propia reconstrucción de la imagen por parte del observador. Dicho estudio aportó mayor información que la obtenida por los observadores expertos en los siguientes puntos:

- a. Las piezas dopadas respondieron de forma distinta a las no dopadas.
- b. El biomaterial es reabsorbido por el hueso huésped desde fuera hacia dentro, desde sus bordes o periferia al centro.
- c. La reabsorción es mayor por su borde cortical o superficial y medular o profundo que por su zona central, sin existir diferencias significativas entre dichos bordes.
- d. La reabsorción del biomaterial es circunferencial, o sea por capas cilíndricas, desde la periferia al centro.
- e. Al tercer mes cuando se inicia la verdadera colonización de tejido conectivo dentro del biomaterial.

4. Todo esto puede abrir el futuro supuesto de que el microTC experimental y el TC asistencial se acompañen de un informe previo automático que posteriormente deberá ser validado por un observador experto. Lo que supone una gran ayuda al radiólogo en cuanto al proceso de estudio de la imagen y en cuanto a la precisión diagnóstica.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- A. Parrilla, MJ Buades, Bonifacio Manuel, Daniel Rodríguez, Francisco Sarabia, José Domingo Lago. Optimización de dosis en TC de Tórax: podemos diagnosticar con imágenes más ruidosas. Comunicación oral. Sociedad Española de Radiología (SERAM). Bilbao, 2016.
- AI Pearce, RG Richards, S Milz, E Schneider and SG Pearce. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells and Materials* Vol. 13. 2007 (pages 1-10)
- Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 10(2), S96-S101.
- Albrektsson, T., & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 2001; 10(2), 96 - 101.
- Alenius, S., & Ruotsalainen, U. (1997). Bayesian image reconstruction for emission tomography based on median root prior. *European journal of nuclear medicine*, 24(3), 258-265.
- An SH, Matsumoto T, Miyajima H, Nakahira A, Kim KH, et al. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. *Dent Mater*. 2012; 28(12):1221-31.
- Atwood, R.C., Jones, J.R., Lee, P.D., and Hench, L.L. Analysis of pore interconnectivity in bioactive glass foams using X-ray microtomography. *Scripta Mater* 51, 1029, 2004.
- Atwood, R.C., Jones, J.R., Lee, P.D., and Hench, L.L. Analysis of pore interconnectivity in bioactive glass foams using X-ray microtomography. *Scripta Mater* 51, 1029, 2004.
- Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011 Feb
- Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011 Feb;61(1):76-85.

- Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011 Feb
- Barrère, F., van Blitterswijk, C. A., & de Groot, K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International journal of nanomedicine*, 2006, 1(3), 317.
- Bauer, T W., y Muschler, S.T.: "Bone graft materials. An overview of the basic science". *Clin. Orthop.*, 2000;371: 10-27.
- Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol*. 2007;19(1):39-52.
- Belen Níguez Sevilla, 2016. Estudio in vivo de la respuesta biológica del hueso inducida por una cerámica porosa de composición $\text{Ca}_7(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)_2 - \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ dentro del sistema binario fosfato tricálcico-silicato dicálcico.
- Bobyn, J. D., Pilliar, R. M., Cameron, H. U., & Weatherly, G. C. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clinical orthopaedics and related research*, 1980; (150), 263-270.
- Bohner M, Baroud G, Bernstein A, Dobelin N, Galea L, Hesse B, Heuberger R, Meille S, Michel P, von Rechenberg B, Sague J, Seeherman H. Characterization and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of b-tricalcium phosphate bone substitutes. *Mater Today*, 2017;20:106–115.
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10), 546-554.
- Burg, K. J., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21(23), 2347-2359.
- Burg, K. J., Porter, S., & Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2000; 21(23): 2347-2359.
- BUSHONG, S. (1998).- Manual de radiología para técnicos. Física, Biología y Protección Radiológica (6ªed.). Harcourt & Brace, Madrid.

- Buzug, T.M. (2007). *Computed Tomography: From Photon Statistics to Modern Cone-Beam CT*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag
- Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramírez-Fernández MP, Mate-Sánchez JE, Ortiz-Ruiz A, et al. Histomorphometric and mineral degradation study of Osscerams: a novel biphasic B-tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clinical Oral Implant Research*. 2012; 23(6):667-75.
- Calvo-Guirado JL, Ramírez-Fernández MP, Delgado-Ruiz RA, Maté-Sánchez JE, Velasquez P, de Aza PN: Influence of biphasic β -TCP with and without the use of collagen membranes on bone healing of surgically critical size defects. A radiological, histological, and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 2013. doi:10.1111/clr.12258.
- Cao, L., Wang, J., Hou, J., Xing, W., & Liu, C. (2014). Vascularization and bone regeneration in a critical sized defect using 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles incorporating BMP-2. *Biomaterials*, 35(2), 684-698.
- Carlisle EM. A silicon requirement for normal skull formation in chicks. *J Nutr* 1980;110:352-9.
- Carlisle EM. Silicon: A Possible Factor in Bone Calcification. *Science* 1970;167: 279-80.
- Carlisle EM. Silicon: An essential element for the chick. *Science* 1972;178:619-21.
- Castaneda S, Largo R, Calvo E, Rodriguez-Salvanes F, Marcos ME, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. *Skeletal Radiol*. 2006 Jan;35(1):34-41.
- Chan G1, Mooney DJ. *Trends Biotechnol*. 2008 Jul;26(7):382-92. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.03.011. Epub 2008 May 22. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response.
- Chang, B. S., Hong, K. S., Youn, H. J., Ryu, H. S., Chung, S. S., & Park, K. W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, 2000; 21(12), 1291-1298.
- Cho, M.K.; Youn, H.; Jang, S.Y.; Lee, S.; Han, M.C. & Kim, H.K. (2012). Digital Tomosynthesis in ConeBeam Geometry for Industrial Applications:

- Feasibility and Preliminary Study. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 13(9), 1533-1538.
- Chong, J. & Essue, J. (2008). Innovations in Cardiac Computed Tomography: Cone Beam CT/Volume CT and Dual Source CT. *UWOMJ* 77(2), 6-11.
- Coathup M.J., Bates P., Cool P., Walker P.S., Blumenthal N., Cobb J.P. and Blunn G.W. Osseo-mechanical induction of extra-cortical plates with referente to their surface properties and geometric designs. *Biomaterials*, 20, 793-800, 1999.
- Cong, W. & Wang, G. (2011). X-Ray Scattering Tomography for Biological Applications. *J. Xray. Sci. Technol.* 19(2), 219-227.
- Cook, S. D., Walsh, K. A., & Haddad, J. R. Interface mechanics and bone growth into porous Co-Cr-Mo alloy implants. *Clinical orthopaedics and related research*, 1985; (193), 271-280.
- Cook, S.D. y Rueger, D.C.: "osteogenic protein-1. Biology and applicatiions". *Clin Othop.* 1996; 324: 29-38.
- Cornell, C. N. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthopedic Clinics*, 1999; 30(4), 591-598.
- Cornell, C.N.: "osteoconductiva materials and their role as substitutes for autogeneois bone graft". *Orthop. Clin. Nort. Am.*, 1999; 30: 591-598.
- Cragolini F. New eutectoids biomaterials in the system dicalcium silicate-tricalcium phosphate for bone regeneration. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 2012.
- Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 12/15;89(24):11740-11744.
- David F. Williams [Biomaterials 30; 5897-5909; (2009)
- Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28: 5058-5067. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.049.

- De Aza P.N., Luklinska Z.B., Anseau M.R., Guitian F. and De Aza S. Transmission Electron Microscopy of the interface between bone and pseudowollastonite implant. *J. Microscopy*, 201, 33-43, 2001.
- Deligianni, D. D., Katsala, N. D., Koutsoukos, P. G., & Missirlis, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 2000; 22(1): 87-96.
- Di Stefano DA, Artese L, Iezzi G, Piattelli A, Pagnutti S, Piccirilli M. Alveolar ridge regeneration with equine spongy bone: a clinical, histological, and immunohistochemical case series. *Clin Implant Dent Relat Res*.2009;11:90–100.
- Ding J, et al. Evaluating the effectiveness of using standard mammogram form to predict breast cancer risk: Case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*.2008;17:1074–81. [PubMed]
- Dodde R, 2, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT. Spontaneous bone healing in the rabbit. *J Craniofac Surg* 2000 07;11(4):346-349.
- Dziedzic-Goclawska, A.N.N.A., & Kaminski, A. (2002). Histomorphometry of bone. In *Research Methodology In Orthopaedics And Reconstructive Surgery* (pp. 171-187).
- E. M. Carlisle, "Silicon as an Essential Element," *Federation proceedings*, vol. 33, 1974.
- Eggl PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone in growth and implant substitution. *Clin Orthop*. 1988; 232:127-38.
- Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jesion, G. & Kleerekoper, M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 4, 3–11.
- Fernández Villán, M. (2015). Matriz proteica tridimensional de origen autólogo en la regeneración de defectos de hueso largo.

- Filardo, G., Perdisa, F., Gelinsky, M., Despang, F., Fini, M., Marcacci, M., ... & Schütz, K. Novel alginate biphasic scaffold for osteochondral regeneration: an in vivo evaluation in rabbit and sheep models. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2018; 29(6), 74.
- FREMAP, 2003. Biomateriales, trasplantes e ingeniería tisular en cirugía ortopédica y traumatología. XXIX simposium internacional de traumatología y ortopedia Fundación Mapfre medicina.
- G. J. Lugo, P. Mazon, and P. N. De Aza, "Phase transitions in single phase Si-Ca-P-based ceramic under thermal treatment," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 35, pp. 3693-3700, Nov 2015.
- Gauthier, O., Müller, R., von Stechow, D., Lamy, B., Weiss, P., Bouler, J. M., ... & Daculsi, G. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials*, 2005; 26(27): 5444-5453.
- Gehrke S. & Wirth, K.E. (2005). Application of Conventional- and Dual-Energy X-Ray Tomography in Process Engineering. *IEEE Sens. J.* 5(2), 183-187.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36(3), S20-S27.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. *Injury*, 2005; 36(3): 20-27.
- Giavaresia G., Ambrosio L., Battistoni G.A., Casellato U., Gerbasio R., Finia M., Aldini N., Martini L., Rimondini L. and Giardino R. Histomorphometric, ultrastructural and microhardness evaluation of the osseointegration of a nanostructured titanium oxide coating by metalorganic chemical vapour deposition: an in vivo study. *Biomaterials*, 25, 5583-5591, 2004.
- Gil-Albarova, J.; Garrido Lahiguera, R; Gil Albaroba, R., y Melgosa, M.: "Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia génica en cirugía ortopédica y traumatología". *Mapfre Medicina*, 2003; 14: 51-65.

- Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI (1988) Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 255: E416-E421.
- Goldberg VM. Natural history of autografts and allografts. *Bone implant grafting*: Springer; 1992. p 9-12.
- Goldring, S. R. y Goldring, M.B.: "Cytokines and skeletal physiology". *Clin. Orthop.*, 1996; 324: 13-23.
- Gomes SP, Deliberador TM, Gonzaga CC, Klug LG, da Costa Oliveira L, et al. Bone healing in critical-size defects treated with immediate transplant of fragmented autogenous White adipose tissue. *J Craniofac Surg.* 2012; 23(5):1239-44.
- González Rico, J., Delabat, R y Muñoz, C. *Tecnología Radiológica*. Paraninfo, Madrid. 1996.
- Groth, T., Falk, P. & Miethke, R.R. (1995) Cytotoxicity of biomaterials-basic mechanisms and in-vitro test methods – a review. *Alternatives to Laboratory Animals* 23: 790–799.
- Guo J, Meng Z, Chen G, Xie D, Chen Y, Wang H, et al. Restoration of critical-size defects in the rabbit mandible using porous nanohydroxyapatite-polyamide scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2012 06;18(11-12):1239-1252.
- Harkness JE, Wagner JE. *Biología y Manejo*. En: Harkness JE, Wagner JE. *Biología y clínica de conejos y roedores*. Zaragoza: Acribia; 1980. p. 43-50
- Hatcher, D. C. (2010). Operational principles for cone-beam computed tomography. *The Journal of the American Dental Association*, 141, 3S-6S.
- Hench LL, Clark AE. Reaction mechanisms at bioceramic interfaces. *J Am Ceramic Soc.* 1970;49(4):481.
- Hench LL. Bioceramics: from concept to clinics. *J Am Ceram Soc.* 1991; 74(7):1487-1510.
- Herman, G. T. (2009). *Fundamentals of computerized tomography: image reconstruction from projections*. Springer Science & Business Media.

- Hernández, S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2006, 2 (3) - 252-256.
- Hildebrand, T. & Rueggegger, P. (1997) A new method for the model independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J. Microsc.* 185, 67.
- Ho ST, Hutmacher DW. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8):1362-76. Epub 2005 Sep 19.
- HOFER, M (2001).- Manual práctico de TC. Introducción a la TC. (3ªed). Médica Panamericana, Madrid. Óscar Javier Espitia Mendoza¹, Yuri Hercilia Mejía Melgarejo², Henry Arguello³
- Huang Y.H, Xiropaidis A.V., Sorensen R.G., Albandar J.M. and Hall J., Wikesjö U.M.E. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite™) oral implants in type IV bone. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite™) oral implants in type IV bone. *Clin. Oral Impl. Res.*, 16, 105-111, 2005.
- Hutmacher, D. W. (2006). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. In *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* (pp. 175-189).
- J. Chevalier and L. Gremillard, "Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, pp. 1245-1255, Apr 2009.
- J. Chevalier and L. Gremillard, "Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, pp. 1245-1255, Apr 2009
- Jea-Beom Park, Eun-Young Kim, Janghyun Paek, et al., "Primary Stability of Self-Drilling and Self-Tapping Mini-Implant in Tibia of Diabetes-Induced Rabbits," *International Journal of Dentistry*, vol. 2014, Article ID 429359, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/429359.
- Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials* 2007; 28: 2491–2504.

- Jones, A. C., Milthorpe, B., Averdunk, H., Limaye, A., Senden, T. J., Sakellariou, A., ... & Rohner, D. Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via micro-computed tomography imaging. *Biomaterials*, 2004; 25(20): 4947-4954.
- José E. Mate-Sánchez de Val a, *, José L. Calvo-Guirado b , Rafael A. Delgado-Ruiz a , Ma P. Ramírez-Fernández b , Isabel M. Martínez c , José Manuel Granero-Marín d , Bruno Negri b , Fernando Chiva-García a , José María Martínez-González e , Piedad N. de Aza. New block graft of a-TCP with silicon in critical size defects in rabbits: Chemical characterization, histological, histomorphometric and micro-CT study. Volume 38, NUMERO 2. MARZO 2012, PAGINAS 1563 A 1570.
- José Luis Iturbe (2001) *Fundamentos de radioquímica*. Universidad de México.
- Juan R Zaragoza. (1992). *Física e instrumentación médica* Ed. Salvat.
- Jugdaohsingh, R. (2007). Silicon and bone health. *The journal of nutrition, health & aging*, 11(2), 99.
- K. Ioku, "Tailored bioceramics of calcium phosphates for regenerative medicine," *Journal of the Ceramic Society of Japan*, vol. 118, pp. 775-783, Sep 2010.
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005; 26(27): 5474-5491.
- Kumar G, Narayan B. Morbidity at bone graft donor sites. *Classic Papers in Orthopaedics*: Springer; 2014. p 503-505.
- Kusakabe H., Sakamaki T., Nihei K., Oyama Y., Yanagimoto S., MasaruIchimiya C., Kimura J. and Toyama Y. Osseointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem. *Biomaterials*, 25, 2957-2969, 2004.9.
- Lanza R, Langer R, Vacanti J. *Principles of Tissue Engineering*. 3a ed. Burlington: Elsevier Academic Press. 2000.
- Laurencin CT, Ambrosio A, Borden M, Cooper Jr J. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual review of biomedical engineering* 1999; 1(1): 19-46

- LeGeros R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. Clin. Orthop. Relat. Res., 395, 81-98, 2002. 11.
- LeGeros, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2002; 395, 81-98.
- Lemons, J.E. (2004) Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. The Journal of Oral Implantology 30: 318–324.
- Levakhina, Y. (2013). Three-Dimensional Digital Tomosynthesis. Iterative Reconstruction, Artifact Reduction and Alternative Acquisition Geometry. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Lewitt, R.M.; Member, S.; Matej, S. & Member, S. (2003). Overview of Methods for Image Reconstruction From Projections in Emission Computed Tomography. Proceedings of the IEEE 91(10), 1588-1611.
- Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. J Orthop Translat. 2015; 3(3):95-104.
- Lidia Fernández Sierra, 2014. Evaluación de la regeneración ósea in vivo de cerámicas de HAp activado con PRP y quitosano/rhBMP-2. Madrid 2013-2014.
- Lima, I.; Assis, J.T.; Apoloni, C.R.; Mendonca de Souza, S.M.; Duarte, M. E. & Lopes, R.T. (2009). Non-Destructive Imaging Materials Investigation by Microfocus 3D X-Ray Computed Tomography. IEEE Transactions on Nuclear Science 56(3), 1448-1453.
- López-López J, Chimenos-Küstner E, Manzanares-Céspedes MC, Muñoz-Sánchez J, Castañeda-Vega P, et al. Histomorphological study of the bone regeneration capacity of platelet-rich plasma, bone marrow and tricalcium phosphate. Experimental study on pigs. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009; 14(12):e620-7.
- Lugo GJ, Mazón P, Baudin C, de Aza PN. Nurse's A phase: Synthesis and characterization in the binary system $\text{Ca}_2\text{SiO}_4 - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. J Am Ceram Soc. 2015; 98(10):3042-6.

- M. Vallet-Regi and E. Ruiz-Hernandez, "Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine," *Advanced Materials*, vol. 23, 2011.
- Manzanares MC, Carvalho O, Torres B, González A, Fuertes S, et al. Biomaterials in critical-size bone defects: pointers for a standardized analysis. In: Natal Jorge RM, Reis Campos JC, Tavares JM, Vaz M, Santos SM, editores. *Biodental engineering II*. London: Taylor & Francis Group; 2014. p. 55-8.
- Mapara P, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012; 9(1):111-8.
- Marcacci, M., Kon, E., Moukhachev, V., Lavroukov, A., Kutepov, S., Quarto, R., ... & Cancedda, R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6-to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue engineering*, 2007; 13(5), 947-955.
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011; 42(6), 551-555.
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011; 42(6), 551-555.
- Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage controsteoclast formation and activity. *J Cell Biochem*, 1994;56:357-66.
- Martínez IM, Velásquez P, De Aza PN. The sub-system α TCP ss- Silicocarnotite within the binary system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{Ca}_2\text{SiO}_4$. *J Am Ceramic Soc*. 2012;95:1112-7.
- Matthew I.R. and Frame J.W. Ultra structural analysis of metal particles released from stainless steel and titanium miniplate components in an animal model. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 56, 45-50, 1998.
- Mayo, S.C.; Miller, P.R.; Wilkins, S.W.; Davis, T.J.; Gao, D.; Gureyev, T.E.; Paganin, D.; Parry, D.J.; Pogany, A.; Robb, T. & Stevenson, A.W. (2002). *Phase-Contrast X-Ray Projection Microscopy for Materials Characterization*. *Mater. Forum*, 26, 15-19.

- McMahon, R. E., Wang, L., Skoracki, R., & Mathur, A. B. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2013; 101(2), 387-397.
- Meseguer Olmo, L. Estudio morfológico de la respuesta ósea inducida por la cerámica beta fosfato tricálcico y el composite beta fosfato tricálcico y colágeno. Modelo experimental en conejo. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 1993.
- Morais, J. M., Papadimitrakopoulos, F., & Burgess, D. J. (2010). Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS journal*, 12(2), 188-196. Anderson, J. M. (1988). Inflammatory response to implants. *ASAIO transactions*, 34(2), 101-107.
- Morand C et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin*
- Mundy, G.R.: "Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors". *Clin. Orthop.*, 1996; 323: 24-28.
- Murphy, C. M., Haugh, M. G., & O'Brien, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2010; 31(3), 461-466.
- Nappe CE, Baltodano CE. Guided osseous regeneration for the vertical augmentation of the alveolar ridge. *Rev. Clin. Periodoncial Implantol. Rehabi. Oral*. Vol 6 (1); 38-41, 2013
- Natterer, Frank, and Frank Wübbeling. *Mathematical methods in image reconstruction*. Vol. 5. Siam, 2001.
- Newman E, Turner AS, Wark JD (1995) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16: 277S- 284S.
- Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC (1998) Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J* 18: 118-123.
- Nutr. 2011 Jan;93(1):73-80. doi: 10.3945/ajcn.110.004945.

- Otsuki, B; Takemoto M; Fujibayashi S. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth in to porous implants. *Biomaterials* 2006; 27: 5892 – 5900.
- P. Ros-Tárraga, R. Rabadán-Ros, P.A.Velásquez, L. Meseguer-Olmo,, P.N. De Aza. Assessment of Effects of Si-Ca-P Biphasic Ceramic on the Osteogenic Differentiation of a Population of Multipotent Adult Human Stem Cells. *Materials* 2016, 9(12), 969; doi:10.3390/ma9120969.
- Parfitt AM, Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;1:5-7.
- Parida, P., Behera, A., & Mishra, S. C. (2012). Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 1(3), 125-129.
- Patricia Ros-Tárraga, Patricia Mazón, Luis Meseguer-Olmo and Piedad N. De Aza. Revising the Subsystem Nurse's A-Phase -Silicocarnotite within the System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Materials* 2016, 9(5), 322; doi:10.3390/ma9050322
- Paulo G. Coelho, J.M. Granjeiro, George E. Romanos, Marcelo Suzuki, Nelson R. F. Silva, Giuseppe Cardaropoli, Van P. Thompson, Jack E. Lemons. Review Basic. Research Methods and Current Trends of Dental Implant Surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Feb;88(2):579-96.
- Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn* 2013 08;242(8):909-922
- Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L (1994) Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* 15: 173-190.
- Porter A.E., Nalla R.K., Minora A., Jinschek J.R., Kisielowskia C., Radmilovica V., Kinney J.H., Tomsia A.P. and Ritchie R.O. A transmission electron microscopy study of mineralization in age induced transparent dentin. *Biomaterials*, 26, 7650-7660, 2005.
- Qiang Fu, Wenhai Huang, Weitao Jia, M.D., Mohamed N. Rahaman , Xin Liu, M.S and Antoni P. Tomsia. Three-Dimensional Visualization of Bioactive Glass-

- Bone Integration in a Rabbit Tibia Model Using Synchrotron X-Ray Micro computed Tomography. *TISSUE ENGINEERING: Part A* Volume 17, Numbers 23 and 24, 2011 ^a Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/ten.tea.2011.0068
- Radon, J, 1917: On the determination of functions from their integrals along certain manifolds. Translation in [Deans, 2007]
- Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L., & Zioupos, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering & physics*, 20(2), 92-102.
- Richards RG, Stiffanic M, Owen GR, Riehle M, ap Gwynn I, Curtis AS (2001) Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualized in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. *Cell Biol Int* 25: 1237-1249.
- Rivas, R., & Shapiro, F. (2002). Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. *JBJS*, 84(1), 85-100.
- Robert J. Gillies, PhD; Paul E. Kinahan, PhD; Hedvig Hricak, MD, PhD, Dr(hc). Radiomics: Images Are More than Pictures, They Are Data. *Radiology: Volume 278: Number 2—February 2016* n radiology.rsna.org.
- Rodríguez Yunta E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioeth.* [Internet]. 2007 Jun [citado 2016 Dic 09]; 13(1): 25-40.
- Rodríguez Yunta Eduardo. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioeth.* [Internet]. 2007 Jun [citado 2016 Dic 09]; 13(1): 25-40.
- Röntgen WC. Übereineneue art von strahlen. *Sitzungsberichte der physikalisch-medizinischen gesellschaft zu Würzburg*. 1895:137.
- S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian, and J. Huang, "Bioceramics: Past, present and for the future," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 28, pp. 1319-1327, 2008

- Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of materials science*, 2009; 44(21): 5713-5724.
- Sachot, N., Engel, E., & Castaño, O. (2014). Hybrid organic-inorganic scaffolding biomaterials for regenerative therapies. *Current Organic Chemistry*, 18(18), 2299-2314.
- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 20-31.
- Sancho-Tello, M., Forriol, F., Gastaldi, P., Ruiz-Saurí, A., Martín de Llano, J. J., Novella-Maestre, E., ... & Carda, C. Time evolution of in vivo articular cartilage repair induced by bone marrow stimulation and scaffold implantation in rabbits. *The International journal of artificial organs*, 2015, 38(4), 210-223.
- Sarita R Shah, Simon Young, Julia L Goldman, John A Jansen, Mark E Wong, Antonios G Mikos. A composite critical-size rabbit mandibular defect for evaluation of craniofacial tissue regeneration. *Nature Protocols* 11, 1989-2009 (22 September 2016) doi:10.1038/nprot.2016.122
- Schmitz, J.P., y Hollinger, J.O.: "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions". *Clin. Orthop.*, 2002: 395; 4-10.
- Schwarz K, Milne DB, Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature* 1972; 239:333-34
- Shalash, M. A., Rahman, H. A., Azim, A. A., Neemat, A. H., Hawary, H. E., & Nasry, S. A. (2013). Evaluation of horizontal ridge augmentation using beta tricalcium phosphate and demineralized bone matrix: a comparative study. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 5(5), e253.
- Shao, X. X., Hutmacher, D. W., Ho, S. T., Goh, J. C., & Lee, E. H. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials*, 2006; 27(7), 1071-1080.
- Sipe JD. Tissue engineering and reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci* 2002. 06;96:1-9.

- Soffer E, Ouhayoun JP, Meunier A, Anagnostou F. Effects of autologous platelet lysates on ceramic particle resorption and new bone formation in critical size defects: the role of anatomical sites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006; 79(1):86-94.
- Stevenson, P. J.; Janarv, P.M., y Hirscht, G.: Internal fixation with biodegradable rods in pediatric fractures. One-year follow-up of fifty patients”, *J. Pediatr. Orthoped.*; 1994; 14: 220-224.
- Stewart C. Bushong.(1993). *Manual de radiología para Técnicos.* 1ª Edición. Ed. Mosby.
- Sun, H., Wu, C., Dai, K., Chang, J., & Tang, T. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials*, 2006; 27(33), 5651-5657.
- Sweedy, A., Bohner, M., & Baroud, G. (2017). Multimodal analysis of in vivo resorbable CaP bone substitutes by combining histology, SEM, and microcomputed tomography data. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(4), 1567-1577.
- Tabata, Yasuhiko. “Biomaterial Technology for Tissue Engineering Applications.” *Journal of the Royal Society Interface* 6.Suppl 3 (2009): S311–S324. PMC. Web. 8 Feb. 2017.
- Thorsten M. Buzug. *Computed Tomography: From Photon Statistics to Modern Cone-Beam CT.* *Contemporary Physics* 51(5):554-555 · November 2010.
- Tomford, W.W., y Mankin, H.J.: “Bone Banking. Update on Methods and materials”. *Ortophe. Clíin. North. Am.*, 1999; 30: 565-570.
- UGCT (2015). Centre for X-ray Tomography of the Ghent University (UGCT). Recuperado de: [http:// www.ugct.ugent.be](http://www.ugct.ugent.be).
- Van Lenthe, G. H., Hagenmüller, H., Bohner, M., Hollister, S. J., Meinel, L., & Müller, R. (2007). Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold–bone interaction in vivo. *Biomaterials*, 28(15), 2479-2490.

- Van Rietbergen B., Huiskes R., Weinans H., Sumner D.R., Turner T.M., Galante J.O. (1993). "The mechanism of bone remodeling and resorption around press-fitted stems". *Journal of Biomechanics*; 26(4/5): 369-382.
- Van Rietbergen B., Müller R., Ulrich D., Rügsegger P., Huiskes R. (1999). "Tissue stresses and strain in trabeculae of canine proximal femur can be quantified from computer reconstructions". *Journal of Biomechanics*; 32: 165-173.
- Van Rietbergen B., Weinans H., Huiskes R., Odgaard A. (1995). "A new method to determine trabecular bone elastic properties and loading using micromechanical finite – element models". *Journal of Biomechanics*; 28(1): 69-81.
- Velásquez P, Meseguer Olmo L, Mate Sánchez de Val JE, Calvo Guirado JL, Delgado Ruiz RA, et al. α TCP ceramic doped with dicalcium silicate for bone regeneration applications prepared by powder metallurgy method, in vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A*. 2013; 101(7):1943-54.
- Wang X, Ruan JM, Chen QY. Effects of surfactants on the microstructure of porous ceramic scaffolds fabricated by foaming for bone tissue engineering. *Mater Res Bull*. 2009;44:1275–1279.
- Wataha JC, Hanks CT, Sun Z (1994) Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. *Dent Mater* 10: 156- 161
- Weinans H., Huiskes R., Grootenboer H.J. (1992). "The behavior of adaptive boneremodeling simulation models". *Journal of Biomechanics*; 25(12): 1425-1441.
- Weinans H., Huiskes R., Grootenboer H.J. (1993). "Quantitative analysis of bone reactions to relative motions at implant-bone interfaces". *Journal of Biomechanics*; 26(11): 1271-1281.
- Whalen R.T., Carter D.R., Steele C.R. (1988). "Influence of physical activity on the regulation of bone density". *Journal of Biomechanics*; 21(10): 825-837.

- Williams DF, editor. Definitions in biomaterials. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials; 1986 Mar 3-5; Chester, United Kingdom. Amsterdam: Elsevier: 1987.
- Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, et al. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(Suppl 2):115-21.
- Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone & Joint Research*,7(3), 232-243.
- Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone & Joint Research*, 2018; 7(3): 232-243.
- Williams D, Black J, Doherty P, editors. Biomaterials-Tissue Interfaces: proceedings of the ninth European Conference on biomaterials; 1991 Sept 9-11; Chester, United Kingdom. Amsterdam: Elsevier: 1992.
- Wnek, G. E., & Bowlin, G. L. (Eds.). (2008). *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. CRC Press.
- Wu C, Ramaswamy Y, Zreiqat H. Porous diopside (CaMg-Si(2)O(6)) scaffold: a promising bioactive material for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2010;6:2237-2245.
- Yasmina Guadilla González, 2010. Estudio de los diferentes modelos de regeneración ósea guiada previa a la colocación de implantes dentales osteointegrados. Tesis doctoral Universidad de salamanca, Junio 2010
- Zaleske, D. J., Ehrlich, M. G., Piliero, C. H. R. I. S. T. O. P. H. E. R., May, J. J., & Mankin, H. J. (1982). Growth-plate behavior in whole joint replantation in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 64(2), 249-258.

Zeltinger, J., Sherwood, J. K., Graham, D. A., Müller, R., & Griffith, L. G. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue engineering*, 2001; 7(5), 557-572.

