

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE CIRURGIA I ESPECIALISTATS QUIRÚRGIQUES

**Reparació del teixit ossi mitjançant
osteotransducció amb ciment de fosfat càlcic.**

Estudi experimental

Tesi doctoral presentada per

PERE TORNER I PIFARRÉ

Per a optar al grau de Doctor en Medicina

Barcelona, 22 de març del 2001

1.- Introducció.

Hem intentat aproximar-nos a l'objectiu d'aquest treball de recerca definint en primer lloc la terminologia més utilitzada i analitzant després l'estructura i funció de l'os sà, els diferents tipus de defectes que s'hi poden produir i les possibilitats de substituir-lo. A continuació ens centrarem en l'anàlisi de les característiques físico-químiques i biològiques del biomaterial objecte d'estudi, el ciment de fosfat càlcic. Finalment intentarem acostar-nos a les perspectives de futur dels biomaterials, comentant les diferents línies de recerca en les quals es treballa més intensament arreu del món.

1.1.- Conceptes. Terminologia.

1.1.1.- Biomaterial.

En la Conferència de consens celebrada a Chester l'any 1991 es fa definir el terme biomaterial com a tot material que, en contacte amb sistemes biològics, augmenta o substitueix algun teixit, òrgan o funció (Comín 1992).

1.1.2.- Implant.

És qualsevol material no viable (encara que no sigui biològicament inert) fixat o empeltat a l'organisme (Friedlander 1983). Sempre que ens referim a la utilització d'un biomaterial sintètic com és el ciment de fosfat càlcic haurem doncs de parlar d'un implant.

1.1.3.- Empelt.

És qualsevol teixit o òrgan separat del seu origen i col.locat en un altre

lloc del propi organisme o d'un altre, de la mateixa o de diferent espècie. S'anomena empelt perquè, un cop implantat, es pot rehabilitar i viu nodrint-se del teixit viu receptor. És per aquest motiu que els empelts ossis no tenen de fet poder osteogènic, donat que no contenen cèl·lules vives, però sí que són osteoinductors i osteoconductors.

1.1.4.- Trasplantament.

Es parla de trasplantament quan l'implant d'un òrgan o teixit requereix la realització d'anastomosis vasculars per a la seva viabilitat cel·lular. Aquest és el cas del teixit ossi autogen vascularitzat, tot i que habitualment es parla d'empelt ossi vascularitzat.

1.1.5.- Biodegradable.

És tot material que, un cop implantat, pateix lisi per interacció amb els sistemes biològics. Aquesta degradació es produeix com a resultat d'un procés d'alteració i transformació de l'implant gràcies a l'acció cel·lular, enzimàtica, bacteriana o viral. Com veurem amb més detall posteriorment, la biodegradabilitat d'un material pot ser passiva o activa. S'anomena passiva quan es deu a què el material no és estable en els fluids biològics. En canvi, la biodegradabilitat d'un material és activa quan requereix la participació de mecanismes cel·lulars de l'hoste on és implantat.

1.1.6.- Biocompatible.

S'anomena així tot material no tòxic i acceptat per l'organisme des del punt de vista immunològic. No existeix cap material totalment biocompatible. La biocompatibilitat es pot interpretar com a *acceptabilitat biològica* i és l'estudi de la interacció dels biomaterials amb els teixits susceptibles d'estar en contacte amb ells.

1.1.7.- Bioinert.

És tot material biocompatible que no reacciona amb els teixits vius on és implantat. Sempre existeix, no obstant, una mínima resposta immunològica.

1.1.8.- Osteogènesi.

És la formació de teixit ossi nou a partir de cèl.lules osteoformadores (osteoblasts).

1.1.9.- Osteoconducció.

És una propietat passiva d'un material que permet acceptar i conduir el creixement ossi a través seu. Aquest creixement es realitza per invasió vascular i cel.lular a partir de l'os viu del receptor.

1.1.10.- Osteoinducció.

És la capacitat d'un material per induir la diferenciació cel.lular cap a la síntesi de matriu òssia mineralitzada. Aquest procés es realitza a partir de diversos factors de creixement (Czitrom 1989).

1.1.11.- Osteointegració.

És la funció per la qual un empelt col.labora en la neoformació òssia gràcies a la presència de cèl.lules mesenquimals (Czitrom 1996).

1.1.12.- Suport biomecànic.

És la funció física de manteniment d'una estructura anatòmica.

1.1.13.- Osteotransducció.

Combina les propietats de biodegradabilitat selectiva (només de forma activa) i d'osteoconducció. En realitat aquest procés suposa una veritable transformació del material que, alhora que és degradat, entra a formar part del procés de neoformació òssia (Driessens 1998).

1.2.- L'os. Estructura i funció.

1.2.1.- Histologia.

En termes biològics, l'os es descriu com a teixit connectiu. El teixit connectiu és el que uneix i actua com a suport de les diferents estructures de l'organisme. Els ossos són capaços de transmetre càrregues, fonamentalment de compressió, flexió i torsió, oferint una elevada rigidesa amb el mínim pes i la màxima eficàcia (Comín 1992). Aquest fet determina l'estructura i la composició del teixit ossi.

1.2.1.1.- Estructura.

L'os és un material format per diferents fases sòlides i líquides. De tots els teixits connectius és l'únic que és dur. Aquesta duresa es deu a què el seu principal component orgànic, la matriu òssia extracel·lular, està impregnada d'una fase mineral constituïda per cristalls de tipus hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) amb un cert contingut d'ions carbonat (Proubasta 1997).

La superfície externa o periòstica de l'os és llisa, i la interna o endòstica és rugosa.

a) Aspecte macroscòpic.

Hi ha dos grans tipus de teixit ossi:

- Os esponjós o trabecular.

Es troba a les regions epifisàries i metafisàries dels ossos llargs i a l'interior dels ossos menors i plans. S'anomena trabecular perquè està format per una xarxa d'espícules o trabècules òssies ramificades que limiten un sistema laberíntic d'espais comunicats ocupats pel moll de l'os. La

interconnexió de les trabècules dóna l'aspecte esponjós o escumós. A l'interior de les trabècules no hi ha vasos sanguinis. L'os esponjós té una gran superfície. A la pelvis humana, la superfície mitja d'os trabecular és de 1600 cm², mentre que la seva superfície periòstica mitja és de només 80 cm² i el seu volum de 40 cm³.

- Os cortical o compacte.

Té una densitat de 2 g/cm³. Es mostra com una massa sòlida i contínua en la que els espais només són visibles al microscopi. Les diàfisis estan formades per un cilindre buit de parets gruixudes de teixit ossi cortical amb una àmplia cavitat medullar central que conté moll d'os.

b) Aspecte microscòpic.

Es defineixen tres tipus d'os:

- **Os plexiforme:** Es troba tant en l'os esponjós com en el cortical en animals joves (en creixement) i en adults després d'alguna lesió òssia. Durant la maduració normal, aquest tipus d'os és substituït gradualment per os laminar. Com a exemple es pot dir que en l'home no hi ha os plexiforme més enllà dels 14 o 16 anys. Una característica típica de l'os plexiforme és que no presenta una relació estable de contingut mineral o col.lagen. De fet, la densitat mineral de l'os plexiforme és molt variable. En l'os laminar i en el haversià, en canvi, aquests elements estan relacionats de forma fixa per a cada espècie.

- Os haversià.

Correspon a l'os cortical madur. L'os haversià està constituït per conjunts de làmines disposades concèntricament anomenats **osteones** o **sistemes de Havers**. Les osteones tenen un diàmetre de 200 µm i una longitud

de 1 a 2 cm. A la llum central de l'osteona es troba l'eix vàsculo-nerviós. L'os osteonal està organitzat per acomodar petits vasos que permeten la microcirculació. L'os haversià es forma com a resultat de la invasió vascular de teixit ossi ja existent.

- Os laminar.

Les osteones de l'os haversià i les làmines de l'os laminar són només diferents configuracions geomètriques del mateix material. En ambdues configuracions cap punt del teixit no es troba a més de 100 μm d'un vas sanguini. En les interfases entre les làmines es troben unes cavitats elipsoidals (llacunes) que contenen els osteòcits, a partir de les quals s'extenen uns canals prims anomenats canalículs. Entre les osteones adjacents es troba la línia de ciment, mentre que l'espai tridimensional irregular entre les osteones es completa amb os laminar.

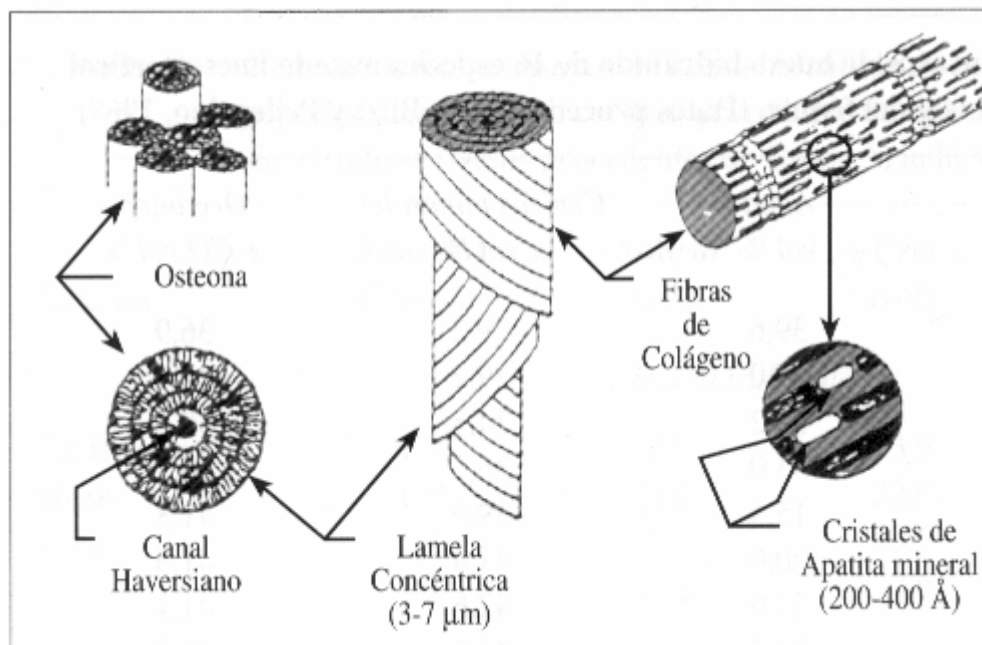


Figura nº 1: Estructura d'una osteona (reproduït de Proubasta et al: Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales, 1997).

Tant l'os haversià com l'os laminar es presenten simultàniament en els ossos humans i animals. En els més joves només hi ha unes poques osteones, anomenades osteones primàries, entre l'os plexiforme. Amb la maduració, l'os plexiforme es transforma en os laminar i posteriorment es produeix una conversió parcial a os haversià. La proporció d'os haversià augmenta amb l'edat. Té menor resistència mecànica i el seu sistema circulatori és menys eficaç que el de l'os laminar.

1.2.1.2.- Composició de l'os.

El teixit ossi conté aproximadament un 20% d'aigua i, del 80% restant (pes sec), el 77% correspon a la fracció inorgànica i el 23% a la fracció orgànica (Comín 1992).

La **fracció mineral** està constituïda fonamentalment per fosfat càlcic de tipus amorf, molt semblant, però no idèntic, a la hidroxiapatita mineral, amb presència d'ions carbonat (CO_3) i sodi.

La cristallització i la relació Calci / Fòsfor depenen del tipus d'os (esponjós o cortical) i de l'edat. Els valors mitjans són: calci: 35,5%, fòsfor: 18,5% i Ca /P: 1,61.

Dues són les funcions de la fracció mineral de l'os: reserva iònica i suport mecànic.

La **fracció orgànica** està formada per cèl.lules (2%) i matriu extracel.lular (98%). Aquesta matriu té un elevat contingut en col.lagen (95%). El col.lagen està constituït per estructures subunitàries periòdiques anomenades molècules de tropocol.lagen, de triple hèlix i que posseeixen

diferents terminacions o caps. Aquestes subunitats estan disposades, cap amb cua, en feixos paral·lels on els caps queden alternats. Això determina l'espai característic de 700 Å de la unitat repetida en les fibres de col·lagen de diferents espècies. Aquests espais constitueixen les zones on es produeix la precipitació de prop de la meitat del mineral que es diposita en l'os; la resta ho fa sobre les fibres i entre aquestes. Les proteïnes no col·làgenes de l'os també es dipositen en aquests espais.

El paper de l'**aigua** en l'os no està encara ben definit. S'ha estudiat la variació de contingut entre les diferents espècies (Blitz 1969), en relació amb l'edat i també en algunes patologies. De fet, les propietats mecàniques de l'os varien significativament segons el seu contingut d'aigua. Alguns autors indiquen que existeix un grau d'hidratació crítica en l'os: per sobre de 48mg H₂O / g d'os, l'aigua passa de trobar-se lligada a l'estructura a trobar-se lliure (Proubasta 1997).

1.2.1.3.- Les cèl·lules òssies.

Són les responsables de produir, mantenir i modificar l'estructura del teixit ossi. Formen una capa cel·lular contínua que cobreix totes les superfícies de la matriu extracel·lular. Es reconeixen quatre tipus de cèl·lules òssies (Marks 1988): osteoblasts, cèl·lules de revestiment, osteoclasts i osteòcits.

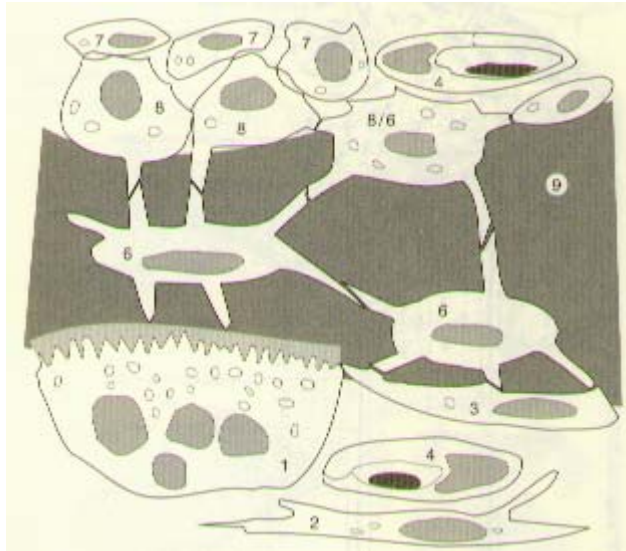


Figura nº 2: Esquema d'una trabècula òssia mostrant els quatre tipus de cèl·lules.

Els osteoblasts (8) i els seus precursors (7) es troben a la superfície sobre una capa de matriu osteoide no calcificada (9). Els osteòcits (6), un osteoclast (1) i una cèl·lula de revestiment (3) apareixen a la superfície inferior. Prop de la trabècula s'observen els capil·lars (4), que contenen cèl·lules sanguínies a la seva llum, i un fibroblast (2). Reproduït de Comín M: Estructura del tejido óseo. En Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación. Ed. Martín, 1992.

a) Osteoblasts.

Es troben situats en totes les superfícies òssies on té lloc la formació activa d'os, ja sigui en les superfícies externes, on solen quedar recoberts per periosti, o bé en les superfícies internes o endòstiques. En el primer cas, els osteoblasts formen part de la capa més interna del periosti. En el segon cas, es troben entre la superfície òssia i elements del moll d'os o bé entre l'esmentada superfície i els canals vasculars. Funcionalment, no hi ha cap diferència entre els osteoblasts periòstics i els endòstics, però l'activitat dels primers dona lloc a canvis en la morfologia de l'os, mentre que la dels segons origina canvis en la densitat de la massa òssia.

La histogènesi dels osteoblasts segueix el camí que detallem a continuació (Roberts 1985):

- les cèl.lules precursors indiferenciades sintetitzen ADN i es multipliquen.
- unes cèl.lules filles mantenen l'estructura original i altres es diferencien cap a la línia osteoprogenitora.
- en presència de certs nivells de tensió i/o deformació, les cèl.lules osteoprogenitores evolucionen a preosteoblasts G_1 i aquests a preosteoblasts G_2 .
- sota determinades influències aquestes cèl.lules realitzen la mitosi i donen lloc als osteoblasts.

El control de la histogènesi osteoblàstica es realitza per (Comín 1992):

- nivell tensional i/o de deformacions mecàniques.
- senyals elèctrics.
- estímuls procedents de factors fisiològics com el flúor , l'activitat hormonal paratiroidal i certs factors de creixement.

La interacció d'aquests i altres factors dóna com a resultats la periodicitat circadiana de la proliferació de precursors cel.lulars, la funcionalitat de les cèl.lules, el creixement esquelètic i la mineralització òssia.

Els osteoblasts representen un tipus cel.lular ben diferenciat de les cèl.lules osteoprogenitores des del punt de vista immunohistoquímic. Produeixen la matriu extracel.lular no calcificada i presenten la morfologia típica de les cèl.lules secretores de proteïnes. Els seus principals productes són les fibres de col.lagen tipus I (90% del total) i els components no col.làgens de la

matriu com són els proteoglicans, fosfoproteïnes, glicoproteïnes i factors de creixement.

Els osteoblasts són cèl.lules allargades, polaritzades, que segreguen matriu a nivell de la superfície apical. L'eix longitudinal d'un osteoblast s'orienta paral·lelament a la superfície òssia i a les fibres de col·lagen que ell mateix produeix. Això porta al fet que els osteoblasts presenten canvis morfològics quan produeixen làmines consecutives d'os amb diferent orientació de les fibres. Les cèl.lules osteoblàstiques es comuniquen amb altres cèl.lules (osteòcits i cèl.lules osteoprogenitores) mitjançant unions tipus gap.

Els osteoblasts també participen en la primera fase de la reabsorció òssia. Tenen receptors de superfície per a factors endocrins i paracrins que indueixen en ells la producció de col·lagenasa. Deixen així exposada la matriu òssia mineralitzada i també els factors que atreuen els osteoclasts.

El mecanisme d'acoplament que lliga la proliferació osteoblàstica (i la formació d'os) amb les llacunes de reabsorció osteoclàstica podria estar constituït per un factor de creixement produït pels propis osteoclasts o bé per factors de creixement alliberats per macròfags.

b) Cèl.lules de revestiment.

Són cèl.lules en repòs que es troben sobre les superfícies òssies inactives. En el cas de l'os adult, poden cobrir el 80% de les superfícies trabeculars i endocorticals. Són, de fet, una fase de diferenciació terminal dels osteoblasts. Són cèl.lules aplanades i amb pocs grànuls. Una fina capa de teixit connectiu no mineralitzat de 100-150 nm separa les cèl.lules de revestiment del límit mineralitzat de l'os.

Com en el cas dels osteoblasts, les cèl.lules de revestiment estan connectades entre sí i amb els osteòcits mitjançant unions tipus gap.

La capa de revestiment constitueix una membrana òssia funcional que separa el compartiment ossi dels fluïds intersticials (Comín 1992). S'ha observat que la composició electrolítica és diferent en els dos compartiments i es creu que les cèl.lules de revestiment poden ser les encarregades de regular l'intercanvi d'ions.

Les cèl.lules de revestiment no mostren normalment cap activitat mitòtica però, en ser estimulades, poden transformar-se de nou en osteoblasts.

c) Osteoclasts.

Els osteoclasts són els responsables de l'eliminació de teixit ossi un cop el procés ha estat iniciat pels osteoblasts.

Són les cèl.lules que realitzen la reabsorció d'os. Des del punt de vista funcional i de desenvolupament, són completament diferents de la resta de cèl.lules òssies. Els precursors dels osteoclasts són cèl.lules d'origen sanguini, de la línia hematopoètica. Aquestes cèl.lules es fusionen per donar lloc als osteoclasts, que contenen nombrosos lisosomes amb hidrolases àcides.

No hi ha comunicacions directes entre els osteoclasts i les altres cèl.lules òssies. La comunicació és indirecta, mitjançant intermediaris químics, factors paracrins secretats pels osteoblasts i factors d'unió de la matriu que són alliberats per l'activitat de la col.lagenasa dels osteoblasts quan inicien el procés de reabsorció (Marks 1988).

d) Osteòcits.

Són les úniques cèl.lules que es troben situades a l'interior de la matriu òssia mineralitzada. Representen un grup d'osteoblasts que ha patit una diferenciació terminal (tenen un antigen de superfície que no està present en els osteoblasts) i ha quedat atrapat en la matriu que s'acaba de calcificar. Se situen en uns espais anomenats llacunes i mantenen comunicació amb altres cèl.lules a través dels canalículs. Cada cèl.lula emet uns 50 processos o anastomosis cel.lulars. Aquests es troben envoltats per un fluïd ric en proteoglicans.

e) Xarxes osteocítiques.

Les cèl.lules osteoprogenitores, els osteoblasts, les cèl.lules de revestiment i els osteòcits són capaços d'actuar com una xarxa funcional única gràcies a l'existència de múltiples contactes intercel.lulars o unions tipus gap (Comín 1992). Aquestes unions permeten l'acoplament elèctric de les cèl.lules, així com el moviment lliure d'un pool d'ions i metabòlits. En els processos cel.lulars, les unions no són extrem a extrem sinó laterals, i sovint la membrana presenta una morfologia ondulada que permet una major àrea de contacte.

En el teixit ossi hi ha comunicacions entre les diferents cèl.lules i també amb cèl.lules endotelials situades a l'interior de la xarxa vascular.

1.2.2.- El procés de reparació de fractures.

1.2.2.1.- Aspectes generals.

L'objectiu del procés de reparació o consolidació d'una fractura és el restabliment de l'estructura tisular original que permeti el manteniment de les propietats mecàniques que caracteritzen l'os.

Es considera el procés de consolidació de les fractures com una sèrie de fases seqüencials que se solapen en el temps. La descripció més completa és la proposada per Sarmiento (1984), però resulta més senzilla la proposada per altres autors com Chao i Aro 1991 o Buckwalter i Cruess 1991 i que determina l'existència de tres fases: inflamació, reparació i remodelació. La reparació implica una estabilització interfragmentària que s'aconsegueix gràcies a la formació del call periòstic i endòstic (Peris 1992).

La inducció i proliferació del teixit indiferenciat del call constitueix el primer pas crític del procés de reparació. El call extern no es forma si la fractura ha estat tractada amb reducció anatòmica i compressió interfragmentària, és a dir, en condicions d'estabilitat màxima, perquè el procés de consolidació (anomenada aquí primària) és lleugerament diferent.

El següent pas crític és la formació d'una unió òssia entre els fragments. Si durant aquesta fase la fractura no està en condicions d'estabilitat, es tendeix a l'aparició d'una pseudoartrosi hipertròfica, degut a la persistència de teixit fibrós a nivell del call. En aquest punt existeix, però, un petit marge de moviment que és tolerable i que fins i tot podria estimular la consolidació de la fractura.

La fase final del procés està regulada per la Llei de Wolff d'adaptació funcional. L'os remodela fins a assolir la resistència inicial.

Diversos factors ambientals influeixen en el procés de consolidació: la funció de l'extremitat, els moviments a nivell del focus de fractura i el desenvolupament vascular. L'activitat funcional genera forces que afavoreixen el moviment interfragmentari. Aquest moviment provoca una resposta inflamatòria que facilita el desenvolupament vascular i l'augment de temperatura. El moviment també genera tensions mecàniques locals que originen potencials de membrana en els teixits adjacents. Aquests potencials afavoreixen la creació d'un ambient amb característiques elèctriques adequades que influeix en la formació i orientació dels teixits, així com en la distribució iònica. A més, el desenvolupament vascular d'una banda origina gradients de pressió capil·lar, i d'altra, representa el mitjà de transport necessari de nutrients i de productes residuals fruit del metabolisme cel·lular. La utilització de models matemàtics d'elements finits pot permetre predir els diversos tipus de diferenciació tisular que s'observen en la consolidació de fractures (Carter 1999).

Així, veiem que el procés de reparació de fractures està influït per factors ambientals de tipus mecànic, elèctric, tèrmic i químic (Sarmiento 1984).

1.2.2.2.- Fases del procés de consolidació de fractures.

Com ja hem esmentat, descriurem el procés dividit en tres fases diferenciades: inflamació, reparació i remodelació (Peris 1992).

a) Fase inflamatòria.

Tot traumatisme que produeix una fractura, no només lesiona les cèl·lules, vasos i matriu de l'os, sinó que també afecta els teixits adjacents com el periosti i els músculs. Es forma un hematoma que és la base del procés de

reparació de la fractura. La lesió vascular deixa els osteòcits sense aport sanguini i per tant moren. Això fa que als extrems fracturaris no hi hagi cèl.lules vives. Si la lesió del periosti, el moll de l'os i altres teixits és important, aquests passen a formar part del material necròtic localitzat a nivell del focus de fractura.

Els mediadors de la inflamació alliberats per les plaquetes i per altres cèl.lules lesionades provoquen vasodilatació i l'aparició d'un exudat plasmàtic que porta a l'edema agut. Aquest és fàcilment observable en qualsevol fractura recent (Simmons 1985, Hulth 1989).

Entre les cèl.lules inflamatòries que migren a aquesta zona es troben leucòcits polimorfonuclears, macròfags i limfòcits. A mesura que minva la reacció inflamatòria, el teixit necròtic i l'exudat plasmàtic són reabsorbits i els fibroblasts s'encarreguen de produir una nova matriu.

b) Fase de reparació.

Entre els factors que estimulen el procés de reparació cal esmentar (Peris 1992):

- factors quimiotàctics alliberats en la fase d'inflamació.
- proteïnes de la matriu que van quedar exposades per la desorganització tisular.
- factors elèctrics. S'ha constatat en fractures recents l'existència d'una certa càrrega negativa que podria estimular l'osteogènesi. El nivell d'electronegativitat va disminuint fins que es completa la consolidació de la fractura.

L'organització de l'hematoma de fractura constitueix el primer pas de la fase de reparació. L'hematoma proporciona un suport de fibrina que facilita la migració de les cèl.lules que permetran la reparació. Els factors de creixement i altres proteïnes alliberats per les cèl.lules localitzades en l'hematoma donen lloc als esdeveniments clau de les fases inicials del procés: migració cel.lular, proliferació i síntesi de matriu (Simmons 1985). En aquest estadi evolutiu, el microambient a nivell del focus de fractura és àcid i això afecta el comportament cel.lular. A mesura que avança el procés, el pH es va alcalinitzant progressivament. És amb un pH alcalí quan la fosfatasa alcalina presenta el seu nivell òptim d'activitat i afavoreix la mineralització del call de fractura.

En condicions normals, són els vasos periòstics els que proporcionen la major part dels rudiments vasculars presents en les primeres etapes de la consolidació, mentre que és l'artèria medul.lar qui més tard s'encarregarà de nodrir la zona (Rhinolander 1986). Se sap que els factors de creixement fibroblàstics són importants intermediaris de l'angiogènesi (Triffett 1987), però l'estímul concret responsable de la invasió vascular i la proliferació de cèl.lules endotelials és encara desconegut. Analitzarem l'acció dels factors de creixement més endavant.

Els extrems fracturaris que han perdut l'aport vascular es necrosen i són reabsorbits per osteoclasts. Sembla que les prostaglandines presents al call podrien estimular l'activitat osteoclàstica (Dekel 1981).

Les cèl.lules mesenquimals pluripotencials presents a nivell del focus o transportades pel torrent sanguini són les responsables de la formació de teixit fibrós, cartíleg i os. La composició bioquímica de la matriu del call de fractura

va canviant a mesura que progressa la reparació. Les cèl.lules substitueixen el coàgul de fibrina per una matriu fibrosa que conté glicosaminoglicans, proteoglicans i col.lagen de tipus I i III. Posteriorment, les cèl.lules transformen el teixit fibrós en fibrocartíleg dens semblant al cartíleg hialí. Amb la formació d'aquest cartíleg augmenta el contingut en col.lagen de tipus II, proteoglicans específics de cartíleg i proteïnes d'unió. Durant la posterior ossificació, augmenta la concentració de col.lagen de tipus I, fosfatasa alcalina i proteïnes específiques de l'os. El procés culmina amb la mineralització de la matriu.

Tot aquest sistema de reparació depèn de la regulació de l'expressió genètica de les cèl.lules que hi intervenen, donat que l'activació genètica és imprescindible per a la síntesi de les proteïnes matricials. La presència simultània de condrogènesi i ossificació en diferents regions del call suggereix que certs mediadors locals i petites variacions en el microambient, tals com tensions mecàniques, determinen quins gens són expressats i, per tant, el tipus de teixit al que les cèl.lules donaran lloc. La compressió disminueix la formació de teixit fibrós i les tensions hidrostàtiques intermitents inhibeixen la calcificació (Peris 1992).

Entre els mediadors locals que poden influir en la funció cel.lular hi ha factors de creixement alliberats per les plaquetes i altres cèl.lules i la tensió d'oxigen. Els factors de creixement fibroblàstic estimulen la producció de condrocits i la formació de cartíleg, així com la proliferació d'osteoblasts i la formació d'os. La tensió d'oxigen col.labora a determinar si es forma os o cartíleg. En les zones amb baixa tensió d'oxigen es forma cartíleg. En canvi, les cèl.lules que reben oxigen suficient i estan sotmeses a estímuls mecànics o elèctrics solen formar os.

La mineralització del call de fractura és el resultat d'una seqüència ordenada d'accions cel·lulars. Les cèl·lules sintetitzen una matriu amb elevada concentració de fibretes de col·lagen de tipus I que presenten una sèrie d'espais regulars anomenats "zones buides". Això crea unes condicions que afavoreixen el dipòsit d'agrupacions de cristalls d'hidroxiapatita a l'interior de les fibretes de col·lagen. La mineralització requereix dues funcions cel·lulars:

- Les cèl·lules han d'eliminar els factors locals que impedeixen la mineralització, com són les elevades concentracions de glicosaminoglicans. Sembla que són els condrocits del call els que segreguen proteoglicanases neutres per degradar aquestes molècules.

- Un cop les cèl·lules han preparat la matriu, els condrocits, i posteriorment els osteoblasts, alliberen complexos de fosfat càlcic en forma de vesícules procedents de la membrana plasmàtica. Aquestes vesícules contenen proteases neutres i fosfatasa alcalina. Això permet, d'una banda, degradar la matriu, i d'altra, hidrolitzar ATP i altres ésters fosfòrics d'alta energia que subministren ions fosfat. Aquests precipiten amb el calci. Quan el call comença a mineralitzar-se, les proteases neutres i la fosfatasa alcalina augmenten la seva activitat.

A mesura que avança la mineralització, els extrems fracturaris apareixen embolicats en una massa fusiforme de call que conté quantitats creixents d'os immadur. L'augment de contingut mineral té relació directa amb la duresa del call. L'estabilitat dels fragments augmenta progressivament i pot tenir lloc en aquest moment la consolidació clínica i radiològica de la fractura. No obstant, la reparació encara no s'ha completat, i per assolir la màxima resistència és necessària la fase de remodelació del call.

c) Fase de remodelació del call.

És la darrera fase del procés de reparació. Se substitueix l'os immadur del call per os lamelar. Els estudis amb radioisòtops mostren una important activitat en focus de fractura de pacients que presenten un restabliment funcional complet i una radiologia de consolidació.

Un cop substituït tot l'os immadur, el procés de remodelació continua amb la reabsorció per part dels osteoclasts de les trabècules mal orientades i la formació de noves trabècules adaptades a les línies de força.

El procés de remodelació implica un augment de rigidesa. Pel que fa al comportament mecànic, es descriuen quatre fases. En la primera, l'os sotmès a assatjos mecànics de torsió es trenca pel call de fractura amb un patró de baixa rigidesa. En la fase II, l'os se segueix trencant a nivell del call però mostra una rigidesa molt més elevada. En la fase III, l'os es trenca en part pel call i en part per altres zones d'os intacte. Finalment, en la fase IV, el nivell de fractura no té relació amb el call. Això indica que el procés de remodelació s'ha completat i per tant s'han recuperat les propietats mecàniques originals (Peris 1992).

1.2.2.3.- Factors que influeixen en la reparació.

En alguns casos, els retards de consolidació i les pseudoartrosis es produeixen sense causa aparent, però sovint es poden identificar factors que influeixen de forma adversa en el procés de reparació.

Aquests factors poden ser dependents del tipus de lesió, del pacient o del tractament aplicat, i alhora poden ser locals o sistèmics. Com a exemples caldria destacar: la lesió greu de teixits tous associada a les fractures obertes o d'alta energia (desvascularització), les fractures articulars (el líquid sinovial

conté col.lagenases), les infeccions, les fractures patològiques, les fractures amb interposició de teixits tous, l'aport sanguini precari, algunes malalties sistèmiques, la desnutrició, els tractaments amb corticoids, ...

Harkness va proposar el següent llistat de factors:

Afavoreixen la reparació

Hormona de creixement
Hormones tiroïdals
Calcitonina
Insulina
Vitamines A i D
Esteroids anabolitzants
Condroitin sulfat
Hialuronidasa
Camps elèctrics
Oxigen hiperbàric
Exercici físic
Factors de creixement
Matriu òssia desmineralitzada
Cèl.lules del moll d'os

Difículten la reparació

Corticoids
Diabetis mellitus
Anèmia
Cera òssia
Manipulació tardana
Denervació
Anticoagulants

L'estabilització d'una fractura afavoreix la consolidació donat que evita la disgregació contínua del teixit de reparació. Alguns tipus de fractura (per exemple, les d'escafoide o les del coll femoral) rara vegada consoliden si no són estabilitzades. Aquesta estabilització és especialment important quan hi ha una greu lesió de teixits tous i quan l'os rep una vascularització precària. En canvi, les fractures que conserven intactes els teixits tous adjacents i que mantenen una correcta irrigació sanguínia, solen consolidar encara que hi hagi un evident moviment interfragmentari (per exemple, en fractures costals, de clavícula o diafisàries d'húmer).

L'estabilització de les fractures mitjançant implants metàl·lics és capaç de mantenir la reducció i permet per tant una funció precoç de l'extremitat lesionada, evitant així l'anomenada "malaltia fracturària" (rigidesa, pèrdua d'arc

de moviment articular i afebliment muscular per la inactivitat). L'estabilització d'una fractura permet la reparació sense formació de cartíleg ni de teixit connectiu, tot i que això no implica una consolidació més precoç (Perren 1989).

No obstant, però, el tractament quirúrgic de fractures també presenta alguns inconvenients, ja siguin derivats del propi acte quirúrgic o bé del material implantat. A més, la fixació rígida pot alterar el procés de remodelació provocant la reabsorció d'os, donat que la rigidesa dels implants sol ser superior a la de l'os sà. En aplicar càrrega mecànica sobre un os fracturat i fixat rígidament, l'os no es veu sotmès a les tensions habituals (Tonino 1976), i això genera una pèrdua de massa òssia local. És l'anomenat efecte de protecció de tensions (Hidaka 1984). Aquest efecte es pot evitar parcialment utilitzant materials menys rígids (amb mòdul d'elasticitat més semblant al de l'os). La disminució de rigidesa d'una placa d'osteosíntesi es pot aconseguir per dues vies (Uthoff 1981):

- canviant el disseny de la secció transversal (plaques de baix contacte).
- triant materials de menor mòdul elàstic (Titani).

L'acte quirúrgic implicat en l'osteosíntesi de les fractures augmenta el risc d'infecció i pot comprometre la vascularització del teixits. La correcta consolidació depèn també de la qualitat de l'osteosíntesi, ja que la formació d'os està en funció del tamany del gap fracturari i de l'estabilitat de la fixació. Si el tamany del gap és superior a 1mm o existeix moviment interfragmentari, les osteones secundàries no són capaces de farcir el gap amb teixit ossi neofomat. El moviment entre fragments afavoreix la reabsorció òssia en el gap i pot provocar un retràs de consolidació o pseudoartrosi.

1.2.3.- El procés de remodelació òssia.

La morfologia òssia representa un compromís dinàmic entre criteris estructurals i metabòlics. És a dir, ajustant la seva forma i massa, l'esquelet ha d'aconseguir una resistència suficient per respondre a les demandes d'activitat però mantenint els avantatges que comporta l'economia tisular. Bàsicament, aquest compromís s'aconsegueix gràcies a l'estímul osteogènic que origina l'activitat mecànica i a l'osteolisi derivada de les necessitats metabòliques. El budell i els ronyons eliminen normalment uns 300 mg de calci per dia. Si no s'absorbeix una quantitat similar amb la dieta, l'organisme es veu obligat a reabsorbir os (Peris 1992).

La idea que l'os és capaç de percebre certs aspectes del seu ambient mecànic i d'adaptar-s'hi no és en absolut recent. Ja l'any 1638, Galileu es va fixar en les implicacions mecàniques de la forma dels ossos. Culmann (1866), Von Meyer (1867) i Wolff (1892) van estudiar l'orientació organitzada de les trabècules femorals. Koch (1917) va demostrar que les orientacions trabeculars del coll femoral corresponien amb els càlculs matemàtics de les trajectòries tensionals. Més recentment, Frost (1964) i Pauwels (1965) han desenvolupat models matemàtics que relacionen les tensions amb els canvis produïts en la geometria transversal de les corticals dels ossos llargs (Peris 1992).

S'ha discutit si és la tensió o bé la deformació el senyal mecànic que indueix una resposta cel·lular. Thompson (1917) va observar que és la deformació (i no la càrrega) la que determina la morfologia òssia. L'any 1942, Glucksmann va demostrar, treballant amb cultius cel·lulars, l'existència de respostes de les cèl·lules front a estímuls de deformació. Aquesta relació entre la deformació i l'estructura de l'os no es va poder demostrar a nivell

experimental fins l'any 1969, quan Lanyon i Smith instrumenten per primera vegada ossos in vivo amb galgues extensiomètriques.

Les lleis matemàtiques que relacionen el procés de remodelació amb les deformacions, així com els sistemes de control biològic no són encara ben coneguts. Com a mecanismes de control s'han proposat: les microlesions per fatiga, els potencials elèctrics generats per la tensió, la pressió hidrostàtica sota càrrega dels fluids extracel·lulars i les alteracions en la difusió de la membrana cel·lular degudes a càrrega directa.

A nivell cel·lular, s'ha demostrat que deformacions estàtiques aplicades sobre cultius cel·lulars d'osteoblasts provoquen un augment de producció de prostaglandines PGE_2 , AMP_C i ADN. L'augment del nivell d' AMP_C pot inhibir la proliferació cel·lular i indueix la síntesi de col·lagen i de proteoglicans en els osteoblasts. També en cultius cel·lulars s'ha demostrat que la pressió hidrostàtica influeix sobre la síntesi d'ADN. En aquest mateix sentit, s'ha observat que la càrrega cíclica sobre un cultiu cel·lular d'osteoblasts provoca un augment d'un 50% en la taxa de proliferació cel·lular. Cal destacar que la resposta cel·lular és, en aquests experiments, independent del període d'aplicació de la càrrega (15min, 4 hores o 24 hores al dia). L'únic imprescindible és que la càrrega sigui intermitent, ja que les càrregues estàtiques no indueixen cap tipus de resposta (Peris 1992).

A més de la resposta cel·lular, sembla també fonamental l'acció de la matriu extracel·lular. S'ha demostrat que l'orientació dels proteoglicans de la matriu canvia en aplicar una càrrega. Sembla doncs que la matriu extracel·lular té funció de percepció de la càrrega i que la població cel·lular és qui avalua la magnitud del senyal físic. El baix nivell de deformació que genera l'activitat

física fa difícil d'imaginar que les cèl.lules rebin directament els senyals. Un possible mecanisme d'activació cel.lular és l'aparició de diferencials de pressió de fluïds com a conseqüència de la deformació tisular. Aquesta generaria un augment de pressió de fluïds i per tant un fluxe d'aquests cap a zones amb menor pressió. Aquest fluxe genera potencials elèctrics d'origen electrocinètic (deguts a fluxos de càrregues elèctriques). Així, quan el fluïd carregat dels canals ossis es desplaça degut a una diferència de pressió entre dues zones del teixit, la càrrega origina un potencial elèctric. Aquest s'anomena potencial generat per deformació. Els ions d'un signe són atrets i s'uneixen a les parets del canal ossi, deixant així el fluxe carregat amb ions de signe contrari. S'estima que la magnitud del potencial elèctric és d'uns 2 mV. Aquesta magnitud és suficient per generar l'estímul osteogènic a nivell de la xarxa de connexions intercel.lulars (unions gap) de les cèl.lules del teixit ossi (Peris 1992).

Tot i que en una primera aproximació pugui semblar que alguns d'aquests conceptes tenen poca relació amb la "simple" substitució d'un defecte ossi amb un biomaterial, creiem que només el coneixement dels mecanismes cel.lulars i moleculars que regulen els processos de reparació i remodelació òssia permetrà posteriorment comprendre les bases teòriques de la síntesi i desenvolupament del ciment de fosfat càlcic i el mecanisme de l'osteotransducció.

1.2.4.- Biomecànica de l'os.

1.2.4.1.- Concepte de biomecànica.

El concepte de biomecànica ha rebut molt diverses definicions. El 1971 Benno Kummer la defineix com el conjunt de relacions entre teixits i òrgans del cos i les seves tensions mecàniques. El mateix any 1971, el Consell Internacional de l'Esport i de l'Educació Física de la UNESCO defineix la biomecànica com el coneixement del paper que juguen les forces mecàniques que produeixen els moviments, el seu suport autonòmic, iniciació neurològica, control integrat i percepció, així com el seu disseny central. Citem finalment la definició de l'Associació Americana d'Enginyeria Mecànica (1972), que diu que la biomecànica és l'estudi del cos humà com un sistema sotmès a dos conjunts de lleis: les de la mecànica newtoniana i les biològiques.

De fet és el punt de trobada entre dues ciències: la biologia i la mecànica. En aquest context neix la definició proposada per l'Institut de Biomecànica de València (Comín 1992), que diu que és el conjunt de coneixements interdisciplinars generats a partir d'utilitzar, amb el recolzament d'altres ciències biomèdiques, els coneixements de la mecànica i diferents tecnologies en, primer, l'estudi del comportament dels sistemes biològics (i en particular del cos humà) i, segon, en resoldre els problemes que li provoquen les diferents condicions a les que es veu sotmès.

La biomecànica constitueix una àrea de coneixement molt jove. La major part de la producció científica en aquest terreny es concentra en la segona meitat del segle XX, lligada a la seva aplicació en tres àmbits: el mèdic, l'esportiu i el professional.

1.2.4.2.- L'os com a estructura mecànica.

Donat que la descripció precisa dels coneixements actuals sobre la biomecànica òssia, els seus mètodes d'estudi i els models matemàtics que s'han desenvolupat és molt extensa, tractem només alguns apartats bàsics que són d'interès per comprendre l'estructura i la funció de l'os i que són també decisius per al disseny i l'anàlisi de nous biomaterials destinats a substituir-lo.

Característiques mecàniques del teixit ossi.

- Fase mineral:

La fase mineral està formada per hidroxiapatita. Aquesta es presenta com a petits cristalls amb forma d'agulla de 2 a 7 nm de diàmetre i de 5 a 10 nm de longitud. Tenen estructura hexagonal.

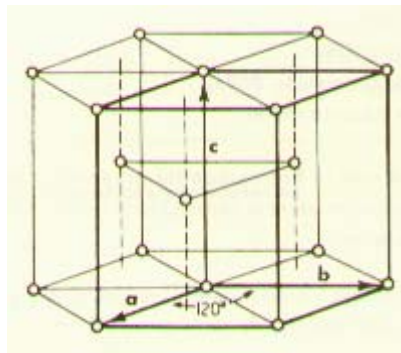


Figura nº 3: Estructura hexagonal de la cel·la fonamental dels cristalls d'hidroxiapatita. Reproduït de Comín M.: Biomecànica de la fractura ósea y técnicas de reparación. Ed. Martín, 1992.

La fase mineral forma una estructura sòlida contínua, com ho demostra el fet que conserva una elevada resistència un cop eliminada la fase orgànica. Els cristalls d'hidroxiapatita s'orienten amb l'eix paral·lel a l'eix longitudinal de la fibra de col·lagen en què s'ha nucleat.

La determinació de les propietats mecàniques de la hidroxiapatita ha estat objecte de nombrosos treballs de recerca. No obstant, els resultats obtinguts no són homogenis degut als diferents processos d'obtenció i als mètodes d'assaig. L'any 1971, Katz estudia les constants elàstiques de la hidroxiapatita mineral i sintètica i obté uns valors del mòdul elàstic de 0,27 i 0,28, valors força propers als de l'os (0,3).

El 1972, Grenoble observa que el mòdul elàstic de la hidroxiapatita varia entre 40 i 117 GPa en funció de la tècnica de mesura utilitzada.

El 1976, Sarcho obté per a la hidroxiapatita sintètica una resistència a la compressió de 917 MPa i a la tracció de 196 MPa.

Les propietats de la hidroxiapatita (Comín 1992) són les següents:

- Densitat (g/cm ³)	3.219
- Mòdul elàstic (GPa)	40 - 117
- Resistència a la compressió (MPa)	294 - 917
- Resistència a la tracció (MPa)	59 - 196

S'observa que la hidroxiapatita presenta, igual que l'os, una major resistència mecànica a la compressió que a la tracció.

En general, les característiques mecàniques de la fase mineral del teixit ossi depenen de la seva porositat. La porositat de l'os cortical es deu a l'existència de cavitats de reabsorció i als canals de Havers i de Volkmann. La de l'os esponjós és deguda als espais intertrabeculars.

- Fase orgànica:

Està formada en un 95% per col.lagen. Cada fibreta de col.lagen està constituïda per tres hèlix disposades sobre un eix comú i formant una unitat

fonamental. Aquestes fibretes estan íntimament barrejades amb la fase mineral.

La regularitat i simetria de l'estructura de les fibretes justifica l'aplicació dels criteris de les xarxes cristal·lines a la fase orgànica de l'estructura òssia. La distribució de les fibretes en la matriu extracel·lular no és, no obstant, perfectament simètrica. Hi ha fibres gruixudes de col·lagen que formen una estructura fonamental. Aquest fet és el responsable de l'anisotropia del material. D'altra banda, les fibres fines de col·lagen formen una xarxa que s'interconnecta amb les branques principals de l'estructura fonamental, mostrant una direccionalitat menor.

La mesura directa de les propietats mecàniques del col·lagen és molt difícil degut a les petites dimensions de les fibres. No obstant, donat que alguns tendons estan constituïts fonamentalment per col·lagen, l'avaluació de les característiques d'aquests dona una mesura indirecta de les propietats mecàniques del col·lagen ossi. Currey (1964), Harris (1980) i Fung (1981) proposen respectivament els valors de 1'2 GPa, 2 GPa i 1'24 GPa per al mòdul elàstic de la fase orgànica de l'os.

Biomecànica de l'os cortical.

L'assaig mecànic convencional de l'os cortical permet definir la corba de tensió-deformació i, per tant, el valor del mòdul elàstic, que és el pendent de la corba en el seu tram lineal.

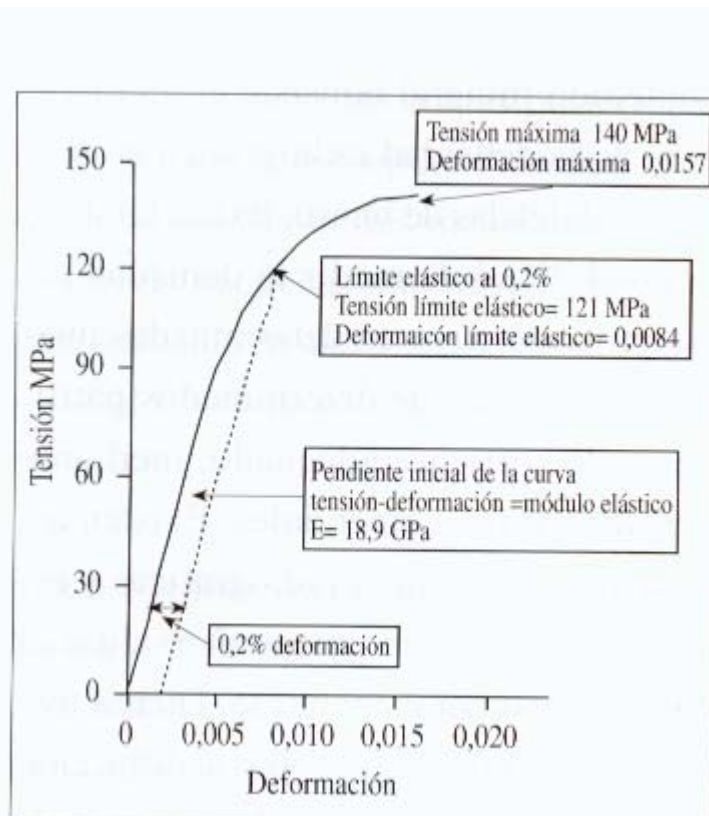


Figura nº 4: Corba de tensió-deformació de l'os cortical per a una velocitat de deformació de $0,01 \text{ s}^{-1}$. Reproduït de Proubasta et al: Fundamentos de biomecánica y biomateriales. Ed. Ergon, 1997.

El límit elàstic és el punt on es produeix la desviació de la relació lineal entre tensió i deformació. En la corba de tensió-deformació de l'os cortical hi ha dues regions clarament diferenciades: una regió elàstica lineal on es compleix la llei de Hooke i una regió plàstica abans de la fractura. Donada la proximitat entre els límits elàstic i plàstic de l'os, és molt rara la deformació elàstica sense fractura en ossos madurs. En canvi, en ossos immadurs, amb menor contingut mineral, és més freqüent la deformació plàstica sense fractura (Proubasta 1997).

La resistència de l'os cortical depèn de la direcció d'aplicació de les càrregues i de la forma com s'apliquen. La resistència a la compressió és major que la resistència a la tracció en totes les direccions. La resistència a la torsió sol ser aproximadament un terç de la resistència a la compressió.

La velocitat de deformació utilitzada en l'assaig afecta notablement la corba de tensió-deformació de l'os. En general, l'os es mostra més rígid i resistent quant major és la velocitat de deformació utilitzada. Aquest fet comporta que el mòdul elàstic de l'os cortical pot variar fins a un 15% en funció de l'activitat física de l'individu (marxa, cursa, ...).

Les propietats elàstiques de l'os poden ser estudiades també mitjançant sistemes d'ultrasons. Aquestes tècniques relacionen la velocitat de propagació del so en un material amb les seves propietats elàstiques. Un avantatge important d'aquest mètode és que mesurant les velocitats ultrasòniques en diferents direccions de la mateixa mostra, es poden determinar tots els coeficients elàstics i caracteritzar així l'anisotropia de l'os.

La resistència a la fatiga es determina sotmetent el material a una tensió cíclica i mesurant el n^o de cicles fins a la fractura.

Els estudis semblen demostrar que existeix una gran dependència de la resistència a la fatiga amb l'amplitud de la deformació cíclica, més que amb la tensió màxima o la deformació màxima suportades per l'os. Aquests resultats suggereixen que la resistència a la fatiga de l'os és molt menor del que es pensava. Això implica que l'os està constantment acumulant dany per fatiga durant l'activitat normal i, per tant, és necessari que es produeixi un procés de remodelació òssia per mantenir la integritat estructural del sistema esquelètic a llarg termini.

Biomecànica de l'os esponjós.

La principal diferència estructural entre l'os esponjós i el cortical és la major porositat del primer. La forma més comú de mesurar la porositat és mitjançant la densitat aparent o estructural, que és la massa per unitat de volum total. Cal distingir la densitat aparent de la densitat de la matriu mineralitzada. Aquesta s'obté descomptant del volum total el dels porus. La densitat aparent és doncs el producte de la densitat de la matriu mineralitzada per la fracció sòlida del volum. Així, si considerem que la densitat de la matriu és gairebé invariable, veiem que la densitat aparent és directament proporcional a la porositat de l'os.

En l'home, la densitat aparent de l'os trabecular varia entre 0,1 i 1 g/cm³ i la de l'os cortical és d'aproximadament 1,8 g/cm³. La densitat de les trabècules varia entre 1,6 i 1,9 g/cm³.

Un os trabecular amb una densitat aparent de 0,2 g/cm³ té aproximadament una porositat del 90%.

L'augment de porositat de l'os comporta lògicament una disminució de les propietats mecàniques. Les trabècules de l'os esponjós tenen com hem vist una densitat similar a la de l'os cortical. En canvi, el seu mòdul elàstic és inferior al d'aquell en un 30-40% (Comín 1992). La corba de tensió-deformació de l'os esponjós mostra una zona elàstica lineal inicial seguida per una zona de fluència. La fluència apareix quan algunes trabècules es comencen a trencar. Després apareix una zona plana que correspon al trencament progressiu de trabècules i finalment la corba comença a augmentar de nou. Aquest fenomen es deu a què fragments de les trabècules trencades omplen els porus de l'os encara intacte i reforcen el seu comportament estructural.

L'estructura de l'os trabecular s'adapta a la funció que desenvolupa a cada os concret. Així, un os més resistent a les sol·licitacions en flexió és el més adequat per a l'absorció d'energia en impactes. En canvi, en altres zones, com l'epífisi proximal de la tibia, l'os esponjós presenta major resistència a les sol·licitacions de càrrega axial.

Com a conseqüència del comportament viscoelàstic de l'os trabecular, les seves propietats mecàniques depenen de la velocitat de deformació.

Criteris generals de disseny de l'aparell locomotor.

L'esquelet s'adapta a la seva funció específica en l'organisme. Aquesta adaptació funcional afecta tant la configuració externa de l'os com la seva estructura microscòpica. La naturalesa sol seguir, en general, la llei del mínim. Així, en l'esquelet, les funcions mecàniques de càrrega i de protecció s'aconsegueixen amb el mínim pes i la màxima eficàcia. L'estructura òssia s'ha utilitzat com a model per a la construcció d'estructures metàl·liques lleugeres. Com a anècdota cal esmentar que els treballs de l'enginyer i matemàtic Karl Culmann, que ja l'any 1866 va estudiar la disposició de les trabècules òssies al cap del fèmur, van influir en la feina d'un altre enginyer anomenat Maurice Koehlin. Aquest era, curiosament, col·laborador d'un tercer enginyer, de nom Eiffel.

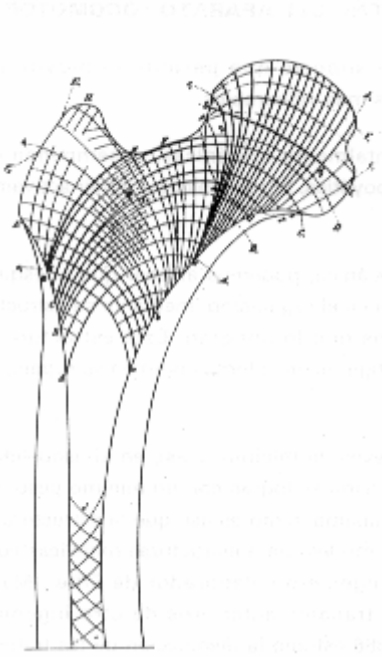


Figura nº 5: Arquitectura trabecular del cap del fèmur estudiada per Cullmann. Reproduït de Comín et al: Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación. Ed. Martín, 1992.

L'os trabecular està dissenyat especialment per absorbir l'energia procedent d'impactes i transmesa per les articulacions. Des del punt de vista mecànic, s'ha estudiat que la millor organització coneguda per a l'absorció d'impactes és justament la d'una estructura porosa plena de líquid. A més, l'estructura de l'os trabecular respon també a la necessitat d'absorbir càrregues estàtiques.

En general, tots els ossos llargs distribueixen el seu material de forma que minimitzen les tensions generades per les càrregues fisiològiques que suporten. Una estructura tubular com la de la diàfisi femoral és la més adequada per suportar una àmplia gama de sol.licitacions de compressió, tracció, flexió i torsió. En canvi, la secció triangular de la diàfisi tibial és l'òptima per absorbir les sol.licitacions de flexió en el pla sagital, que són les que predominen durant la marxa.

La minimització del nivell de tensions en els ossos llargs sota càrregues fisiològiques, en base al seu disseny arquitectònic, es pot analitzar estudiant cossos amb geometries senzilles sotmesos a diferents càrregues. Amb aquesta idea va néixer la teoria de les columnes de Pauwels, que analitza les sol·licitacions que apareixen a l'os en sotmetre'l a diferents tipus de càrrega. El fèmur és mecànicament assimilable a una columna que treballa en flexió composta, de forma que en situació de càrrega queda dividit en una zona de tracció i una de compressió, separades per una superfície neutra amb trajecte en espiral (Turner Baduell 1975).

En l'aparell locomotor, tant el pes del cos com tota la resta de forces són sempre excèntrics en relació a l'os i, per tant, els ossos llargs es veuen sol·licitats sempre en flexió.

Com hem vist, els criteris generals de disseny de l'aparell locomotor tendeixen a l'òptim, és a dir, a minimitzar els nivells de tensió i la quantitat de material. Els nivells de tensió suportats pels ossos es troben en un rang que és osteogènic, per sota del qual apareix la reabsorció i la pèrdua de massa òssia.

No hem intentat en aquest capítol presentar un estudi exhaustiu de la biomecànica de l'aparell locomotor, sinó tan sols posar de manifest l'extraordinària importància que tenen els factors mecànics en l'estructura, composició i disseny dels elements ossis. Òbviament, aquests aspectes són també fonamentals per a l'estudi i disseny de nous biomaterials destinats a substituir l'os, la seva caracterització físico-química, les possibilitats teòriques d'utilització i la seva funció un cop implantats en l'organisme viu.

1.3.- Els defectes ossis.

Els defectes ossis es poden classificar segons la forma i tamany del defecte, segons la seva localització anatòmica i segons el tipus d'os que afecten.

1.3.1.- Defecte ossi cavitari.

Es defineix com la manca d'os localitzada, que conserva la continuïtat anatòmica de l'os. Els defectes cavitaris poden ser de causa tumoral (quist essencial), infecciosa (osteïtis), metabòlica (pseudoquist hemofílic) o postquirúrgica (manca de teixit ossi en recanvis protèsics). Determinades fractures comminutes i pseudoartrosis poden ser considerades com a defectes ossis cavitaris pel seu comportament, encara que impliquin la interrupció de la continuïtat anatòmica de l'os.

Els defectes ossis cavitaris solen regenerar per ossificació centrípeta. Es tracten habitualment amb farcit d'os esponjós.

El model experimental que utilitzem en aquest treball és un defecte ossi cavitari.

1.3.2.- Defecte ossi segmentari.

És la manca localitzada d'os que comporta alhora una solució de continuïtat en l'anatomia. L'origen dels defectes segmentaris pot ser tumoral (tumors malignes), traumàtic (fractures amb pèrdua de substància òssia) o postquirúrgic (grans defectes ossis en recanvis protèsics, osteotomies).

1.3.3.- Defecte ossi esponjós epifisari.

És la manca d'os esponjós a nivell de l'epífisi. Sol ser d'origen tumoral o postraumàtic.

1.3.4.- Defecte ossi esponjós metafisari.

És la manca de teixit ossi a nivell de la metàfisi, que és una regió molt rica en os esponjós. La causa pot ser postraumàtica (fractures amb enfonsament trabecular), tumoral o isquèmica.

1.3.5.- Defecte ossi cortical diafisari.

És la manca d'un fragment de cortical a nivell de la diàfisi d'un os llarg. L'origen pot ser quirúrgic (finestres òssies que es realitzen en recanvis protètics) o tumoral (metàstasis amb afectació cortical).

En l'estudi que presentem hem triat el **defecte ossi cavitari** pels següents motius:

- realització senzilla i ràpida. Evita complicacions com la infecció.
- en no afectar la continuïtat de l'os, no requereix l'implant de material d'osteosíntesi, fet que podria introduir un biaix en els resultats.
- reproductibilitat de la tècnica quirúrgica. Els defectes creats sempre són iguals.
- facilitat d'anàlisi, tant pel que fa a les projeccions radiològiques com als estudis histològics.
- existeixen models experimentals in vivo ja descrits i de comprovada eficàcia (Katthagen 1986).

1.4.- Els substitutius ossis: empelts.

1.4.1.- Història dels empelts.

La tradició cristiana atribueix a **Sant Cosme i Sant Damià** el miracle d'implantar l'extremitat inferior d'un cadàver a un pacient que havia sofert una amputació a nivell del terç mig del fèmur.

El **primer empelt ossi** descrit en la literatura és citat per Job-Van-Méékeren l'any 1668. L'empelt va ser pres de la calota craneal d'un gos per reparar un defecte traumàtic del crani d'un soldat. El mètode va ser considerat un barbarisme en el seu temps i el pacient fou excomulgat. Aquest va demanar llavors al cirurgià que li retirés l'empelt per tornar a estar en gràcia de Déu. En la nova intervenció es va veure que l'empelt s'havia incorporat.

Al **segle XVIII**, Percy va utilitzar en dues ocasions fragments ossis de bou per al tractament de fractures de tibia. Els empelts van ser retirats als 15 i 20 dies donat que no s'obtenia la cicatrització de les ferides.

Les **primeres experiències clíniques satisfactòries** amb empelts ossis es van portar a terme per al tractament de defectes ossis a la calota craneal. El **primer autoempelt** clínic va ser realitzat l'any 1820 a Alemanya per Von Walter. Diversos autors alemanys (Merren, Wiessmann, Klenke, Heine) van intuir que els autoempelts col·locats a la calota craneal podien ser incorporats.

L'any 1852, Middeldorpf va implantar fragments de radi d'un colom a un altre en situació intraabdominal i va veure que eren viables. El 1859, Flourens va demostrar experimentalment la vitalitat de l'os implantat a la calota craneal de porcs. El 1860, Bagdanowsky va realitzar empelts de fragments diafisaris de

cúbit i radi en vuit gossos. Va observar que l'empelt era recobert per una càpsula osteofibrosa que tenia continuïtat amb les vores de l'os receptor.

L'any 1867, **Ollier** publica el seu "**Traité expérimental et clinique de la regeneration des os**". Va mostrar que els autoempelts ossis eren viables. El seu primer resultat satisfactori el va obtenir amb un conill de vuit mesos al qual va trasplantar el radi dret al costat esquerre i viceversa. En el costat dret va obtenir una perfecta consolidació. L'esquerre es va infectar i l'empelt es va reabsorbir quedant el periosti ossificat. Wolf va repetir l'experiment d'Ollier sense obtenir cap empelt viable i va creure que aquest havia arribat a conclusions errònies. Ollier, no obstant, va mantenir la seva postura i va obtenir també resultats positius en humans amb empelts de periosti.

El 1874, Paterson va implantar un fragment de radi de gos en un pacient amb un defecte ossi al mateix os. El fragment tenia una longitud de 3 cm. L'empelt, però, es va reabsorbir en poc temps.

L'any 1878, **Mc Ewen**, que era ajudant de Lister a Glasgow, va realitzar el **primer autoempelt ossi** per tractar un defecte a la diàfisi humeral fruit d'una ressecció òssia per infecció. Va implantar falques òssies de tibia procedents de pacients amb incorbació anterior d'aquest os secundària a raquitisme. Els empelts procedien de sis pacients diferents i el resultat va ser satisfactori. Mc Ewen va arribar a les següents conclusions:

- els empelts ossis entre humans viuen i creixen.
- tots els elements ossis han de ser inclosos en l'empelt.
- la divisió de l'os en fragments petits millora la incorporació de l'empelt.
- l'empelt ha de ser col·locat en condicions d'asèpsia.

Aquestes condicions, exceptuant la primera, coincideixen amb el coneixement actual sobre la incorporació dels empelts ossis.

L'any 1893, **Barth** publica els seus estudis sobre la histologia dels implants ossis. Ell va ser el primer que va observar el **procés de necrosi dels empelts**. Va definir el concepte de *schleichenden ersatz*, que consisteix en la necrosi de l'empelt, l'absorció de l'os necròtic i la neoformació òssia. Per a ell, els empelts no tenen propietats osteogèniques. Creu que la neoformació òssia es produeix a partir de l'os receptor circumdant. Aquestes idees també van ser compartides per altres autors com Axhausen, Brown i Murphy a la primera dècada del segle XX.

El mateix any 1893, **Curtis** presenta les seves experiències amb empelts ossis en quatre pacients. En tres casos va fer servir os descalcificat de Senn per a tractament de defectes cavitaris. El quart cas era una pseudoartrosi de tibia tractada amb empelt autòleg de peroné. En el seu article classifica les diferents substàncies disponibles a l'època per al tractament de defectes ossis. Les divideix en substàncies estranyes (absorbibles o no absorbibles) i os viu (autoempelt, aloempelt o heteroempelt). Per a Curtis, les substàncies absorbibles s'utilitzen amb la idea de donar un suport temporal i proporcionar una estructura que permeti la neoformació òssia. Es defineix així el concepte d'**osteoconducció**. Va fer esment del problema que suposava adaptar la velocitat de reabsorció dels materials a la de la neoformació òssia. Aquest problema, com veurem, encara representa avui dia un punt clau en la recerca de tot biomaterial. Curtis va escriure: "Estem esperant l'ideal del futur, la inserció d'una peça d'os viu que farceixi perfectament el defecte i continuï vivint sense absorció".

L'any 1914, **Phemister** presenta el seu treball sobre empelts ossis realitzats en gossos on descriu el procés de **creeping substitution** de l'os necròtic (ja descrit per Barth com a *schleichenden ersatz*). A diferència de Barth, Phemister pensava que part de les cèl.lules de l'empelt seguien vives i per tant aquest tenia propietats osteogèniques. L'empelt s'incorporava seguint la llei de Roux d'adaptació funcional (l'os col·locat en un lloc on no compleix una funció de suport és reabsorbit). Per a Phemister, la incorporació dels empelts era afavorida amb el fragmentat de les peces. Això feia que sobrevivís un major nombre de cèl.lules donat que l'augment de superfície afavoria la seva nutrició.

L'any 1915, **Albee** va publicar el seu llibre sobre empelts ossis on es recollien els coneixements de l'època.

El 1925, **Lexer** va donar a conèixer **la primera sèrie clínica d'alloempelts** amb un seguiment de 15 anys. Els seus resultats van ser satisfactoris en un 50% dels 23 casos en què va realitzar un trasplantament osteoarticular. Utilitzava com a empelt os fresc procedent de pacients amputats o de cadàvers. El primer cas data de l'any 1907 (tractament d'un sarcoma de tibia) i, tot i que el resultat era satisfactori, va acabar amb l'amputació de l'extremitat per consideracions religioses del pacient. L'examen histològic de la peça va mostrar únicament necrosi al centre de l'empelt i úlceres condrials a nivell del fèmur.

El 1942, **Inclan** publica la seva experiència amb 52 casos d'implant d'os preservat. És conegut com el fundador del **primer banc d'ossos**. Emmagatzemava l'os amb bosses estèrils amb sang citratada o solució de Ringer a una temperatura de 2 a 5°C. El període de conservació era entre 1 i

63 dies. Els resultats van ser comparables als obtinguts amb os autòleg fresc.

L'any 1946, **Wilson** funda el banc d'ossos de l'Hospital for Special Surgery de Nova York. Les peces procedien d'intervencions quirúrgiques on era necessari ressecar os. S'emmagatzemaven a -27°C en bosses estèrils. L'experiència clínica era de 30 intervencions en 25 pacients utilitzant empelt d'os esponjós homòleg. Wilson va ser el primer a plantejar la necessitat d'organitzar un bancs d'ossos amb una metodologia adequada, acurada selecció de donants i controls microbiològics.

El 1946, Sicard estableix a França una "reserva d'al.loempelts" a l'Hospital de Beaujon. Es tractava d'un banc d'ossos. Obtenien les peces de cadàver amb mesures d'asèpsia i realitzaven la conservació inicialment per congelació ràpida a -35°C per tal de vèncer el punt crític de la cristallinització i posteriorment a -18°C per evitar l'activitat de les proteases.

El 1955, **Bonfiglio** defineix la **immunogenicitat dels al.loempelts**. Treballant amb conills, observa que un segon al.loempelt en el mateix animal produeix una resposta inflamatòria major. Si els conills eren immunitzats amb extracte antigènic, la reacció inflamatòria minvava. També va mostrar que la congelació dels empelts a -20°C disminueix la resposta immunitària que generen.

L'any 1959, **Chalmers** va estudiar en rates el rebuig dels empelts cutanis en animals que havien rebut un empelt ossi. Es basava en l'observació de Medawar que un segon empelt cutani homòleg era rebutjat més ràpidament que el primer. Si l'empelt cutani es feia en rates que havien rebut prèviament un empelt ossi fresc homòleg del mateix donant, el rebuig era similar al d'un segon empelt cutani. Si l'os era liofilitzat i congelat a -30°C , el rebuig cutani es produïa

com si es tractés d'un primer empelt. Basant-se en aquests fets, el 1963 **Burwell** va demostrar que l'os emmagatzemat durant una setmana a -20°C tenia menor immunogenicitat. Aquestes experiències han portat a què la congelació sigui el mètode de conservació d'empelts ossis més utilitzat.

L'any 1956 és fundat el Banc Central de Teixits d'Alemanya a la Facultat de Medicina de la Universitat Humboldt de Berlín. Fins avui, ha ofert més de 50.000 al.loempelts ossis per a més de 250 hospitals alemanys.

El centre més important quant a la utilització d'al.loempelts ossis es troba als Estats Units. L'any 1951, Mankin inicia, a l'Hospital General de Massachussets, una llarga sèrie de resseccions tumorals amb substitució per empelts massius obtinguts de cadàvers i congelats a -80°C preservant el cartíleg amb glicerol (Mankin 1983). Els seus resultats a llarg termini són satisfactoris en el 70% dels casos.

També als EUA, Malinin, al Departament de Cirurgia Ortopèdica de la Facultat de Medicina de Miami, inicia una llarga sèrie de més de 900 al.loempelts massius obtinguts de cadàvers i conservats en Nitrogen líquid a -150°C .

A fi d'unificar criteris i crear unes normes, el Consell Musculoesquelètic de la Societat Americana de Bancs de Teixits (AATB) publica, l'any 1979, la primera guia per als bancs de teixits musculoesquelètics. Aquest treball fa un recull dels coneixements científics sobre el tema i de les aplicacions clíniques, proposant uns mínims estàndards per aconseguir al.loempelts segurs i efectius. A partir d'aquest moment van aparèixer els petits bancs regionals i es va popularitzar aquesta tècnica. Posteriorment han aparegut edicions actualitzades d'aquests estàndards (AATB 1991) i manuals tècnics (AATB

1992). Actualment als EUA hi ha dues categories de bancs de teixits: els bancs d'ossos quirúrgics i els bancs de teixits regionals. Els primers obtenen els empelts generalment de caps de fèmur procedents de fractures subcapitals i de substitucions protèsiques, osteotomies de ressecció i artroplàsties de genoll, i segueixen les normatives de la AATB; n'hi ha aproximadament uns tres-cents. Els bancs regionals obtenen els teixits habitualment de donants multiorgànics o tisulars; n'hi ha 41 en 20 estats diferents i un al Canadà (Czitrom 1993).

Als EUA hi ha actualment 220.000 receptors anuals d'alloempelts ossis o de parts toves. Els empelts procedeixen cada any de 5000 donants diferents (Buck 1994).

A Europa, on inicialment s'instal·len més bancs d'ossos és a França (París, Marsella, Rennes,...). El 1991 es publica la Guia per a l'obtenció, selecció i conservació d'alloempelts ossis de la GESTO (Associació per a l'estudi dels empelts i substituïts tisulars en ortopèdia, depenent de la SoFCOT). En general, a tots els bancs d'ossos francesos s'utilitza l'esterilització secundària mitjançant la irradiació.

A Bèlgica destaca el banc de la Clínica Universitària de Brussel·les, als Països Baixos la Fundació Bio Implant Services, al Regne Unit el banc de Leicester, a Àustria el banc de Baumgartner Höhe de Viena, a Alemanya el ja citat Banc Central de Teixits, a Itàlia el banc de l'Institut Rizzoli de Bolònia, a Grècia el banc de l'Hospital Asclepeion, a Finlàndia el banc de l'Hospital Universitari de Turku i a Suècia el de l'Hospital de Lund.

De forma semblant a l'AATB dels Estats Units, apareixen a Europa la Societat Europea de Bancs de Teixits (EATB) (1991) i la Societat Europea de Trasplantament Musculoesquelètic (EAMST) (1992). Ambdues societats

publiquen els seus estàndards a fi de promulgar els mínims per al funcionament dels bancs de teixits. Finalment, l'any 1997 es publiquen els estàndards comuns de les dues societats: EATB-EAMST.

A l'Estat Espanyol, Sanchiz Olmos va fundar el primer banc d'ossos l'any 1951. El material es conservava amb una substància antisèptica, el timenol. Actualment aquestes substàncies antisèptiques s'han rebutjat donat que són tòxiques per als teixits, no aturen el procés de necrosi tisular i no disminueixen la resposta immunitària.

L'any 1953, González Sánchez crea el Banc nacional d'ossos com una secció de l'Institut d'Hematologia i Hemostàsia.

A partir de la dècada dels seixanta, comencen a aparèixer sèries clíniques cada cop més àmplies sobre la utilització d'os crioconservat en el tractament de defectes ossis.

L'any 1992, la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), amb la col.laboració de tretze experts, publica unes recomanacions per unificar els criteris de funcionament dels bancs d'ossos a l'Estat. L'any 1994 es funda la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT).

A Catalunya, als anys vuitanta es creen diversos Bancs d'ossos: Hospital de Sant Pau, Hospital de la Vall d'Hebron i Hospital Clínic de Barcelona. En el context de l'activitat del **Banc de Teixits de l'Aparell Locomotor de l'Hospital Clínic de Barcelona** (fundat el 1987) s'han realitzat diverses revisions clíniques (Susó 1989, Ramon 1992, Segur 1993), entre d'altres les referents a la utilització d'aloempelets en patologia tumoral (Ramon 1992, Combalia 1993), cirurgia protèsica de l'anca (Gallart 1992), artrodesis cervicals (Garcia 1992), osteotomies d'addició (Segur 1992), pseudoartrosis

(Riba 1992), reconstrucció lligamentosa del genoll (Segur 1994) i fractures de planell tibial (Segur 1998). El resum de l'activitat dels 10 primers anys de funcionament del Banc de Teixits de l'Hospital Clínic de Barcelona va ser presentat a A Coruña (Congrés de l'Associació Espanyola de Bancs de Teixits) el 1998.

1.4.2.- Tipus d'empelts.

Els empelts ossis es classifiquen en funció del seu origen i també del receptor. La relació genètica entre donant i receptor és la que defineix els diferents tipus d'empelts ossis.

1.4.2.1.- Autoempelts.

Són els empelts obtinguts del propi individu. El teixit autòleg és considerat com el material amb millors característiques biològiques (Friedlander 1983, Katthagen 1986), ja que no hi ha diferències d'histocompatibilitat ni risc de transmissió de malalties. Ja l'any 1915, Albee va mostrar les utilitats dels autoempelts.

Els principals inconvenients de l'autoempelt ossi (Grob 1989) són la limitació en la quantitat de material que es pot obtenir i els problemes que pot generar la seva extracció: sacrifici d'estructures anatòmiques, morbiditat quirúrgica afegida, augment del temps d'intervenció, risc d'infecció, dolor postoperatori, etc.

1.4.2.2.- Isoempelts o empelts singènics.

Són els que es realitzen entre individus genèticament idèntics, com es el cas bessons univitelins o de determinats animals de laboratori. S'han utilitzat en estudis experimentals (Elves 1975).

1.4.2.3.- Homoempelts o al.loempelts.

En els al.loempelts donant i receptor pertanyen a la mateixa espècie però tenen diferent genotip. Es poden obtenir a partir de donants vius (caps femorals de pacients sotmesos a artroplàstia de maluc), donants multiorgànics o donants de teixits. Es poden conservar mitjançant congelació, criopreservació o liofilització.

A diferència dels autoempelts, s'evita el sacrifici d'estructures anatòmiques i la morbiditat quirúrgica afegida i en principi la quantitat és il.limitada (segons la disponibilitat del banc d'ossos). En general, tenen una escassa immunogenicitat i solen ser ben tolerats pel receptor. En canvi, tenen com a inconvenients un comportament biològic inferior al de l'autoempelt (Burchard 1983), els costos de manteniment (Doppelt 1981), el risc de transmissió de malalties (Buck 1989, Eastlund 1992), una major incidència de fractures (Berrey 1990) i el risc d'infecció (Lord 1988).

Les seves propietats mecàniques i biològiques depenen del sistema de conservació i esterilització utilitzat.

1.4.2.4.- Heteroempelts o xenoempelts.

Són els que es realitzen entre individus de diferent espècie. Han estat sovint centre d'interès de diferents estudis donada la facilitat per a la seva

obtenció, però la seva capacitat immunogènica, tant de les cèl·lules com de la matriu inorgànica, limita la seva utilització i fa necessària la desproteïnitació de l'os (Yablon 1982).

Existeixen actualment al mercat diferents preparats d'heteroempelt ossi. El més conegut és l'os de Kiel, desenvolupat a la Universitat del mateix nom per Maatz el 1952.

Presenta els mateixos avantatges que l'alloempelt però amb nul·la capacitat osteoinductora i pitjors característiques biomecàniques degut als sistemes de desproteïnitació, conservació i esterilització.

1.4.2.5.- Empelts ossis vascularitzats.

Aquest terme és més utilitzat que el de trasplantament ossi. És l'empelt que conserva la seva vascularització. Es realitza mitjançant anastomosis vasculars amb tècniques microquirúrgiques. Normalment es tracta sempre d'autoempelts.

El 1905, Huntington ja exposava els avantatges de la utilització dels empelts ossis conservant el seu aport sanguini.

El 1975, Taylor va presentar el primer cas clínic d'empelt ossi vascularitzat realitzat amb èxit. Un segment de peroné va ser trasplantat a l'extremitat contralateral per a tractament d'un gran defecte tibial.

Serafin i cols. el 1977 van fer servir per primera vegada una costella vascularitzada per a tractar un defecte ossi en una mandíbula.

S'han emprat també empelts vascularitzats de cresta ilíaca, radi i cúbit, escàpula i metatarsians.

També s'han publicat estudis experimentals utilitzant al·loempelts ossis vascularitzats. Aquests, però, són susceptibles de patir rebuig immunològic (com tot trasplantament) i requereixen un estudi d'histocompatibilitat.

1.4.3.- Conservació dels empelts.

1.4.3.1.- Congelació.

És la tècnica que més es fa servir als bancs de teixits per emmagatzemar os homòleg. S'utilitzen temperatures entre -20 i -190°C. La simple hipotèrmia no evita el dany cel·lular produït pel fred (Elves 1974) i, a més, no permet un emmagatzemament prolongat dels teixits donat que no atura els fenòmens enzimàtics cel·lulars. La disminució de la temperatura és el mètode més senzill per enlentir l'activitat enzimàtica de les col·lagenases i altres proteases . La congelació també fa minvar la immunogenicitat dels al·loempelts.

1.4.3.2.- Criopreservació.

És un procés de congelació gradual i que utilitza substàncies crioprotectors com el dimetil sulfòxid (DMSO) o el glicerol. S'empra per a conservar fragments ossis que contenen cartíleg (Tomford 1983). El 1965, Smith va demostrar que els condrocits sobreviuen al procés de criopreservació amb DMSO com a agent protector. Existeixen diferents corbes de criopreservació segons el tipus de teixit que calgui conservar.

Amb els primers treballs de Smith sobre criopreservació (1965), es desenvolupen tècniques que disminueixen el dany cel·lular secundari a la

conservació per fred. Actualment es disposa de sofisticats sistemes informàtics que controlen la congelació i d'una gran varietat d'agents crioprotectors.

Els objectius dels crioprotectors (Larèse 1987) són:

- evitar que la cèl.lula arribi al volum mínim crític.
- reduir el risc de cristal.linització intracel.lular.
- modificar la naturalesa del gel extracel.lular.
- evitar les hiperconcentracions salines intracel.lulars.

1.4.3.3.- Liofilització.

És el procés de deshidratació mitjançant el buit del material prèviament congelat. L'aigua passa directament de l'estat sòlid al gasós sense fase de vapor. La quantitat d'aigua residual oscila entre el 5 i el 8%. Aquesta tècnica s'utilitza per a conservar homoempelts i heteroempelts durant llargs períodes de temps a temperatura ambient.

Com a inconvenients cal esmentar la pèrdua de resistència mecànica dels empelts ossis i la pèrdua de capacitat osteoinductiva si l'empelt ha estat esterilitzat amb radiacions. Així, Zasacki (1991) afirma basant-se en una experiència de 435 casos, que els empelts liofilitzats no s'haurien d'utilitzar quan es considera necessària la capacitat osteoinductiva de l'empelt. El procés de liofilització produeix necrosi cel.lular i per tant fa minvar la immunogenicitat de l'empelt. En canvi, però, el procediment genera canvis físics a les membranes cel.lulars i modifica per tant els antígens presentats (Friedlander 1984).

1.4.4.- Immunologia dels empelts.

La immunologia es pot definir com la ciència que estudia els processos que diferencien entre el que és propi i el que no ho és (Czitrom 1989). El primer estudi publicat sobre la immunologia dels empelts pertany a Bonfiglio (1955). Posteriorment, Chalmers (1959) i Burwell (1961) confirmen l'existència d'una resposta del receptor front els al.loempelts. Heiple (1963) discrimina aquesta resposta segons la metodologia seguida per a la conservació del material a implantar. Així, els al.loempelts congelats generen una resposta immunològica menor, i els liofilitzats provoquen una mínima reacció cel.lular.

El mecanisme cel.lular i molecular del procés que fa que alguns empelts no siguin incorporats o pateixin reabsorció encara no és ben conegut (Horowitz 1987). Diversos treballs (Chalmers 1959, Langer 1975, Friedlander 1976 i 1977) indiquen que els al.loempelts poden sensibilitzar els receptors dels antígens de superfície de les cèl.lules del donant, bé sigui mitjançant la immunitat cel.lular o humoral. L'estímul que origina aquesta resposta és l'existència de diferències antigèniques a nivell del Complex Major d'Histocompatibilitat (HLA) (Czitrom 1989).

1.4.4.1.- Complex d'histocompatibilitat.

Les cèl.lules de totes les espècies animals posseeixen antígens lligats a la membrana. Els sistemes antigènics són molt específics per a cada espècie i, a més, el polimorfisme dins una mateixa espècie és tan gran que cada individu té el seu propi perfil antigènic.

Els antígens cel·lulars es poden classificar en dos grups:

- Complex d'histocompatibilitat menor, que inclou els antígens característics de cada teixit o òrgan, no de l'individu. No té, per tant, transcendència en el cas dels al·loempelts.

- Complex d'histocompatibilitat major. Reuneix els antígens característics de cada individu. En l'home s'anomena sistema d'antígens leucocitaris humans (HLA) i està format per més de trenta antígens.

Els antígens del complex d'histocompatibilitat major (CHM) es classifiquen al seu torn en dos grups:

- CHM I. Són glicoproteïnes de la membrana presents a totes les cèl·lules nucleades. Tenen gran varietat al·lèlica. Es codifiquen segons el seu lloc al cromosoma. Són els HLA A, B i C.

- CHM II. Són cadenes polipeptídiques glicosilades. També tenen gran varietat al·lèlica però, a diferència de les anteriors, no es troben en totes les cèl·lules sinó només en els limfòcits B, limfòcits T activats, macròfags i precursors sanguinis medul·lars. Són els HLA DR, DP i DQ.

1.4.4.2.- Immunogenicitat de l'empelt.

La immunogenicitat de l'empelt pot tenir el seu origen tant en les diferents cèl·lules que el componen com en la matriu extracel·lular.

1.4.4.2.1.- Cèl·lules.

Els diferents tipus de cèl·lules que poden intervenir són:

- **Cèl.lules del moll d'os:** Són les principals desencadenants de la resposta immunològica dels empelts frescos. Fins i tot poden originar, en condicions adequades, una resposta de l'implant contra el receptor. Les cèl.lules més immunogèniques són les precursors de les línies sanguínies, que tenen a la seva superfície antígens del CMH II, implicats directament en la inducció i ampliació de la resposta immunològica.

- **Cèl.lules òssies:** Els osteoblasts, osteoclasts i els seus precursors tenen antígens de superfície del CMH I i del CMH II . Si es trasplanten aïlladament, són ràpidament destruïts pels limfòcits del receptor.

- **Cèl.lules condrials:** Els condriòcits, si s'aïllen de la seva matriu, es comporten com els osteoblasts, però si la matriu es manté intacta, es troben protegits. Si hi ha factors mecànics o d'altre tipus que alteren la integritat d'aquesta protecció, no es pot impedir la resposta immunitària (Mc Kibbin 1978).

- **Cèl.lules endotelials:** Les cèl.lules dels elements vasculars són molt immunògenes, donat que posseeixen antígens del CMH II.

- **Cèl.lules passatgeres:** Són cèl.lules d'origen medul.lar (Czitrom 1985) que es troben en els empelts. Pertanyen a la sèrie de les cèl.lules dendrítiques o macròfags. Tenen antígens CHM II que estimulen limfòcits T col.laboradors.

1.4.4.2.2.- Matriu extracel.lular.

Conté glicosaminoglicans, que tenen antígens diferents en cada individu, però sobretot en cada espècie. Aquests antígens formen part del

complex d'histocompatibilitat menor (Yablon 1982). Només poden ser importants en el cas dels heteroempelts i dels empelts vascularitzats.

Tot aquest conjunt d'antígens dels elements cel.lular i de la matriu extracel.lular indueix a pensar que els empelts poden patir una reacció de rebuig. En realitat, però, aquesta només té lloc en empelts vascularitzats, en els que els elements més actius conserven la seva viabilitat (Serre 1988).

1.4.4.3.- Resposta del receptor.

Existeix una doble resposta, cel.lular i humoral, que té les següents fases:

- **Fase I: reconeixement.** La presència d'alloantígens d'histocompatibilitat és reconeguda per dos mecanismes: específic i inespecífic. En el **reconeixement específic**, els alloantígens dels CHM I són reconeguts per limfòcits T citolítics i els alloantígens del CHM II ho són pels limfòcits T col.laboradors. Finalment, els alloantígens són també reconeguts per limfòcits B productors d'anticossos (Rodrigo 1976). En el **reconeixement inespecífic**, els alloantígens són reconeguts per macròfags i per cèl.lules assassines (limfòcits T *killer*).

- **Fase II: Inducció de la resposta immunitària.** El contacte entre les cèl.lules de l'empelt i els limfòcits T col.laboradors i citolítics desencadena l'alliberament en cascada de substàncies que activen les cèl.lules responsables de la resposta immunològica. Aquesta resposta segueix dues vies diferents:

a) **Via directa:** Els limfòcits T citolítics, en contacte amb els alloantígens del CHM I de l'empelt, alliberen interferó γ i factors estimuladors dels macròfags.

b) **Via indirecta:** Els macròfags fagociten cèl.lules de l'empelt i el producte de la digestió es comporta com a antígen davant dels limfòcits T. A més, els macròfags alliberen interleukina I, capaç d'induir en els limfòcits T activats la síntesi de receptors de membrana per a la interleukina II. Aquesta és segregada pels limfòcits T col.laboradors activats pel contacte antigènic.

- **Fase III: Ampliació de la resposta immunitària.** La interleukina II, que posseeix múltiples accions, afavoreix la proliferació de limfòcits citotòxics. Per un fenomen d'autoestimulació, també afavoreix la proliferació de limfòcits col.laboradors, induint-los a alliberar el factor de creixement dels limfòcits B. A més, la interleukina indueix també els limfòcits col.laboradors a segregar el factor diferenciador dels limfòcits B, convertint-los en plasmòcits capaços de produir anticossos. Aquests anticossos són específics per als antígens que han desencadenat la resposta immunològica.

La regulació d'aquest procés la realitzen els limfòcits T supressors, que inhibeixen els limfòcits T col.laboradors, adaptant així la resposta immunològica a la quantitat d'antígen existent.

- **Fase IV o efectiva.** Hi ha una resposta immunològica doble: cel.lular (limfòcits T citolítics) i humoral (anticossos sintetitzats pels limfòcits B).

1.4.4.4.- Rebuig de l'empelt.

El rebuig d'empelts no isògens comporta principalment mecanismes mediat per cèl.lules i també anticossos humorals (Najarian 1969). En la resposta cel.lular, no participen només els limfòcits sensibilitzats sinó també els

granulòcits amb enzims lisosòmics i els macròfags. En les reaccions més agudes apareixen anticossos humorals.

a) Immunitat cel.lular.

El rebuig és, inicialment, una resposta mediada per cèl.lules T citolítiques. La seva acció es considera com el mecanisme més important en el rebuig d'òrgans i teixits (Stevenson 1992). El desencadenant de la cascada de processos implicats en el rebuig és l'**activació dels limfòcits T**, que comporta la proliferació cel.lular i la secreció de citoquines (Von Boemer 1990).

Les reaccions de rebuig dels empelts ossis suggereixen un procés actiu en el qual els osteoclasts són activats. Friedlander i cols. (1987) van demostrar que les cèl.lules activades del sistema immunològic i els seus productes poden induir una reacció osteoclàstica. Així, s'ha pogut identificar una limfoquina activadora dels osteoclasts produïda pels limfòcits T. S'anomena factor activador dels osteoclasts (Horowitz 1987).

b) Immunitat humoral.

Els al.loempelts indueixen la formació d'anticossos específics (Friedlander 1983), sobretot els implants osteocondrals (Elves 1974, Bos 1983, Stevenson 1987 i 1991). Friedlander (1984) va demostrar la presència d'anticossos front als antígens del CHM en l'home. Aquesta resposta humoral mediada per limfòcits B es mesura detectant els anticossos anti-HLA.

La immunitat humoral té gran importància en el rebuig d'òrgans, sobretot en les reaccions agudes. Aquest procés pot afectar els empelts ossis vascularitzats.

En els empelts no vascularitzats, el fracàs dels quals és degut a una reacció de rebuig crònic, la resposta mediada per anticossos no és valorable (Stevenson 1992). Friedlander (1984) va observar que l'evolució de l'empelt no té relació amb l'aparició d'anticossos anti-HLA específics del donant. Això reforça la idea de l'escassa importància de la resposta humoral en aquest tipus de rebuig. És per aquest motiu que no es considera necessari en clínica el tipatge tisular dels empelts.

Pel que fa referència als grups sanguinis, Knaepler (1990) troba un augment de la taxa d'anticossos front el sistema ABO que no té traducció clínica. No observa en canvi sensibilització en el sistema Rh.

S'han descrit tres tipus de **reaccions de rebuig** (Robbins 1974):

- **rebuig sobreagut**: Apareix en les primeres hores després del trasplantament. Es produeixen lesions vasculars agudes generades per immunocomplexos formats per antígens d'histocompatibilitat i anticossos, amb participació del sistema del complement. Són per tant **mecanismes humorals**.

- **rebuig agut**: Apareix en els primers dies o setmanes després del trasplantament i sol significar la pèrdua de la viabilitat de l'empelt. Participen **mecanismes cel.lulars i humorals**.

- **rebuig crònic**: És el que afecta els al.loempelts ossis. Està mediat fonamentalment per **mecanismes cel.lulars**.

1.4.4.5.- Modificació de la resposta immunitària.

Tres són els factors que poden millorar l'acceptació dels al.loempelts (Horowitz 1991):

- la histocompatibilitat entre donant i receptor.
- la immunosupressió del receptor.
- la disminució de la immunogenicitat de l'empelt.

a) Histocompatibilitat.

Els al.loempelts s'incorporen de forma incompleta i més lentament que els autoempelts (Bonfiglio 1972, Burchardt 1983, Friedlander 1987). La determinació de la histocompatibilitat només és important en al.loempelts frescos vascularitzats (Goldberg 1989), donat que els no vascularitzats no contenen cèl.lules viables, que són els òrgans diana de la resposta immunològica (Stevenson 1992).

b) Immunosupressió del receptor.

El sistema immunitari és el responsable del fracàs en la incorporació dels al.loempelts. És per això que s'han descrit mètodes que disminueixen la resposta immunitària (Robbins 1974):

- fàrmacs:

Els **corticoids** són inhibidors del sistema limfocític. Actuen estabilitzant les membranes cel.lulars, evitant així l'efecte nociu de la resposta immunològica. També actuen per inhibició de la síntesi proteica. Tenen, però, importants efectes indesitjables a llarg termini.

La **Azatioprina** obté una millor incorporació dels al.loempelts ossis, però amb massa efectes indesitjables per aconsellar la seva administració (Goldberg 1984).

La **Ciclosporina A** facilita la supervivència de l'empelt i l'activitat de remodelació endòstica i periòstica en el receptor.

La **Ciclofosfamida** actua com a agent antilimfocitari, produint leucopènia. Actua fonamentalment sobre els limfòcits B productors d'anticossos .

Els fàrmacs **citostàtics (metotrexat, adriamicina)** actuen en l'os normal disminuint el seu cicle fisiològic, sobretot l'activitat osteoblàstica (Friedlander 1984). És per aquest motiu que es rebutja el seu ús.

- globulina antilimfòcit i antitimòcit.

Actua sobretot a nivell de la resposta cel.lular, que és la implicada en el rebuig dels al.loempelts ossis (Robbins 1974). Utilitzada aïlladament no millora la incorporació dels empelts. Associada a fàrmacs immunosupressors com l'Azatioprina pot millorar els resultats (Reeves 1968).

- inducció de tolerància.

Té per objectiu disminuir únicament l'acció d'aquella part del sistema immunològic que respon front a un determinat antigen. Aquest sistema es troba en fase experimental.

c) Disminució de la immunogenicitat de l'empelt.

S'obté amb l'aplicació de les diferents tècniques de conservació, que redueixen la majoria de les substàncies que poden desencadenar el rebuig.

- **Crioconservació**: Langer (1975) treballa amb al.loempelts congelats de rata i no detecta resposta immunitària humoral (sí cel.lular). Friedlander

(1983) indica que la congelació dels al·loempelts ossis humans disminueix la seva immunogenicitat sense alterar les seves propietats mecàniques. Elves (1974) atribueix la disminució de la immunogenicitat a la no viabilitat cel·lular. L'efecte, per tant, és menor si s'utilitzen crioprotectors.

- **Liofilització**: Disminueix la immunogenicitat de l'empelt en major grau que la congelació (Friedlander 1984). Això es deu a la pèrdua cel·lular i als canvis físics en les membranes de les cèl·lules, que modifiquen la presentació dels antígens.

- **Irradiació**: Amb dosis superiors als 20.000 Grays augmenta la solubilitat del col·lagen i dels glicosaminoglicans, es desnaturalitzen les proteïnes i es destrueix la xarxa fibrilar de la matriu extracel·lular.

1.4.5.- Incorporació dels empelts.

L'any 1908 Axhausen, en descriure les experiències de Barth (1893) sobre empelts ossis, anomena *schleichender ersatz* a la neoformació tisular produïda per la invasió de l'empelt per vasos sanguinis. Posteriorment aquesta expressió va ser traduïda a l'anglès per Phemister (1914) com a *creeping substitution*. El procés descriu la reconstrucció dinàmica, tant en l'espai com en el temps, mitjançant la qual l'os neofomat substitueix l'os necròtic.

Urist (1980) descriu la incorporació dels empelts com el procés d'interdigitació i englobament de l'os del donant per l'os nou que forma el

receptor. La incorporació d'un empelt ossi depèn del teixit donant, del llit receptor i de l'equilibri entre les següents variables (Burchardt 1983):

- activitat de les cèl.lules osteoprogenitores.
- diferenciació dels osteoblasts.
- osteoinducció i propietats biomecàniques de l'empelt.

Altres factors que influeixen en la incorporació són el metabolisme de l'os i l'edat del receptor (Enneking 1975).

1.4.5.1.- Fases de la incorporació dels empelts.

El procés d'incorporació dels empelts té grans semblances amb el de curació de les fractures. A diferència d'altres teixits, l'os és capaç de curar per regeneració i substitució per os neofomat. La característica més important de l'homeostasi i la reparació de l'os és el **cicle de remodelació**; hi ha una fase d'activació seguida per una de reabsorció i, finalment, per una fase de neoformació òssia (Friedlander 1987).

- **Fase d'activació**: És relativament poc coneguda. Sembla que pot ser induïda per factors locals i sistèmics que són modulats per elements humorals, càrregues físiques i estímuls elèctrics.

- **Fase de reabsorció**: A nivell de la superfície trabecular apareixen cèl.lules gegants multinucleades (osteoclasts). Procedeixen de cèl.lules mare hematopoètiques precursoras dels macròfags (Kahn 1975).

- **Fase de neoformació òssia**: S'inicia quan els osteoblasts, que també s'originen al moll d'os, dipositen osteoide sobre les superfícies òssies. Aquesta matriu és posteriorment mineralitzada, quedant incloses cèl.lules que

persisteixen com a osteòcits (Bélanger 1969).

La regulació del procés de reabsorció i neoformació òssia és complexa. Intervenien factors humorals locals, de la matriu òssia i de les cèl.lules, i factors sistèmics, que són capaços d'estimular la remodelació i l'osteogènesi. Es coneixen moltes substàncies que intervenen en el creixement i la diferenciació de l'os: prostaglandines PGE1 i PGE2, osteocalcina, somatomedina, proteïna òssia morfogenètica, factor de creixement plaquetari, factor de creixement epidermal, factors activadors dels osteoclasts (Reddi 1987). Quan els processos de reabsorció i neoformació són sincrònics i equilibrats, la massa òssia roman constant. Aquest és el patró de l'homeostasi òssia. La incorporació d'un empelt requereix una sobrecàrrega d'aquest sistema. Aquest procés és relativament previsible, tant qualitativament com quantitativa, en la pràctica clínica, tot i que els mecanismes íntims cel.lulars i moleculars no són encara ben coneguts (Friedlander 1987).

1.4.5.2.- Incorporació dels autoempelts.

En les fases inicials (primers 15 dies), l'autoempelt esponjós i cortical tenen un comportament similar (Abbot 1947). El procés comença amb la formació d'un coàgul sanguini al voltant de l'empelt. Durant la primera setmana, aquest és el focus d'una resposta inflamatòria caracteritzada per la infiltració, des de la perifèria, de botons vasculars (Deleu 1965) i per la presència de limfòcits, cèl.lules plasmàtiques i teixit connectiu amb cèl.lules mono i polinucleades. Durant la segona setmana, disminueixen els processos inflamatoris i apareix teixit de granulació. Hi ha un augment de l'activitat osteoclàstica (Enneking 1975). A mesura que es produeix la invasió vascular,

les cèl·lules mesenquimals primitives es van diferenciant a cèl·lules osteogèniques per un procés d'inducció cel·lular. Aquestes cèl·lules osteogèniques es diferencien inicialment en osteoblasts que recobreixen les trabècules necròtiques dipositant una capa d'osteoides. Posteriorment els osteoclasts reabsorbeixen l'os necròtic. Amb el temps, l'os necròtic és substituït per os neofomat (Burchardt 1983 i 1987).

La diferència histològica més important entre la incorporació de l'os esponjós i cortical és que en aquest últim el procés de revascularització és més lent. La fragmentació de l'os cortical augmenta la superfície exposada, afavoreix la revascularització i, per tant, pot millorar la incorporació de l'empelt (Burchardt 1983).

1.4.5.3.- Incorporació dels al·loempelts.

Histològicament, l'al·loempelt es presenta com a os necròtic. El procés d'incorporació d'un al·loempelt pot trigar entre 1 i 2 anys a formar os amb característiques similars a l'os normal.

A més, l'al·loempelt pot generar una resposta immunològica en el receptor (Horowitz 1991). Això no implica que l'empelt sigui rebutjat, però sí que el procés d'incorporació pot ser més lent, o incomplet, o ambdós alhora (Friedlander 1987).

Un factor a tenir en compte és el sistema de conservació utilitzat, ja que pot modificar, intencionadament o no, les propietats biològiques i mecàniques de l'empelt (Friedlander 1983).

La resposta histològica inicial del receptor front a l'al.loempelt és la mateixa que front a l'os autòleg. La fase inflamatòria té una activitat màxima al final de la segona setmana, amb la presència de limfòcits que persisteixen durant uns dos mesos. Es forma una barrera fibrosa que encapsula l'empelt (Bonfiglio 1972). Aquesta resposta inflamatòria es pot reduir a partir d'aquest moment, o bé pot persistir durant mesos.

La revascularització també és inicialment semblant a la de l'autoempelt, però no s'arriben a formar anastomosis vasculars término-terminals. Al final de la primera setmana, els vasos estan ocluíts i es produeix la necrosi dels osteòcits perifèrics. L'osteogènesi s'inicia a partir de la quarta setmana, originada en el llit receptor, però és inferior a la que genera l'autoempelt (Burwell 1963). La revascularització d'un al.loempelt vuit mesos després de ser implantat no és tan completa com la d'un autoempelt un mes després de la intervenció (Zeiss 1960). El procés d'incorporació de l'os homòleg congelat a -40°C és més lent que el de l'os autòleg (Fernández de Retana 1993).

1.4.6.- Funcions dels empelts.

Les funcions dels empelts són: **osteoconducció, osteoinducció, font de cèl.lules formadores d'os i suport biomecànic.**

L'osteoconducció és la funció de bastida, és a dir, l'aportació d'una estructura que permet i guia el creixement ossi.

L'osteoinducció és la capacitat d'induir la diferenciació cel.lular cap a la síntesi de matriu òssia mineralitzada.

L'aportació de cèl.lules formadores d'os només es dona en els empelts autòlegs.

En el cas de defectes ossis segmentaris, l'empelt té funció de suport biomecànic.

La incorporació de l'empelt és el procés simultani de reabsorció d'os necròtic i de neoformació òssia. Cal interpretar doncs la incorporació d'un empelt com un procés dinàmic.

1.4.7.- Biomecànica dels empelts.

A més de les seves funcions biològiques (reserva de Calci, funció hematopoètica, interacció amb el sistema endocrí, ...), els ossos compleixen importants funcions mecàniques: estructura de suport que permet el moviment i protecció d'òrgans més vulnerables.

Els empelts ossis també estan sotmesos a processos mecànics i desenvolupen la seva funció. L'any 1990, Berrey quantifica en un 16% les fractures dels al.loempelts corticals, degudes fonamentalment al factor biomecànic.

Els factors que influeixen en les propietats biomecàniques dels al.loempelts són (Pelker 1987):

- propietats inicials de l'empelt en el moment de la seva obtenció.
- edat, sexe i característiques del donant.
- conservació, emmagatzemament i esterilització.

Això fa referència a l'empelt abans de ser implantat. Després comença el procés d'incorporació, que també afecta les propietats biomecàniques (Burchardt 1983). Inicialment predomina l'activitat osteoclàstica. Això comporta un afebliment mecànic i una disminució de la densitat òssia. Per això l'os cortical implantat en animals d'experimentació és aproximadament un 45% més feble 6 mesos després de l'implant. A més, la seva porositat és superior en un 15%. A partir dels 6 mesos predomina l'activitat osteoblàstica. Va augmentant l'aposió d'os i aquest assoleix els valors de resistència mecànica normals al voltant de l'any (Burchard 1983).

Aquesta modificació de les propietats mecàniques de l'os cortical implantat explica l'elevada incidència de fractures en al.loempelts corticals durant els primers 6 mesos (Berrey 1990). En realitzar implants d'al.loempelts cal respectar els principis biomecànics que s'utilitzen per al tractament de fractures (Berrey 1990).

1.5.- Els substitutius ossis: biomaterials.

1.5.1.- Concepte de biomaterial.

Es considera com a **biomaterial** tot material destinat a estar en contacte amb sistemes biològics amb l'objectiu d'avaluar, tractar, augmentar o substituir algun teixit, òrgan o funció de l'organisme (definició de la 2^a Conferència de consens sobre biomaterials celebrada a Chester -Anglaterra- el 1991).

Un **substitutiu ossi** és tot aquell biomaterial que pot ser implantat per al tractament de determinades patologies (fractures, retards de consolidació, pseudoartrosis, artrodesis, tumors i altres defectes ossis) amb la intenció d'afavorir la regeneració òssia. Es considera que el substitutiu ossi òptim és aquell que és progressivament substituït per teixit neofomat del receptor (Katthagen 1987).

La utilització de biomaterials es va iniciar fa molts segles; s'han trobat restes de pròtesis implantades en mòmies egípcies. No obstant, és a partir de la Segona Guerra Mundial quan comença la utilització massiva dels biomaterials en cirurgia.

L'implant d'un biomaterial comporta una lesió dels teixits vius i per tant la reacció d'aquests, que comença amb un procés inflamatori i després de cicatrització. La resposta del teixit connectiu a l'implant d'un biomaterial pot produir una fibrosi mínima, sense degradació de teixits i essent el procés inflamatori molt semblant al de la cicatrització d'una ferida. No obstant, la presència de l'implant pot allargar el procés inflamatori i de reparació produint una càpsula fibròtica al seu voltant. La reacció dels teixits també pot estar

influïda per productes de corrosió, degradació o abrasió del material implantat. En aquest cas intervenen fibroblasts i macròfags i es pot formar un granuloma.

La reacció del teixit a l'implant d'un biomaterial no sempre és contraproductent, ans al contrari, de vegades es pot fer servir per afavorir la incorporació del material o per accelerar la reparació d'una lesió. És el cas, per exemple, dels implants de ciment de fosfat càlcic que estudiem en aquest treball. La resposta de l'os a la presència del material interacciona directament amb els components d'aquest i el procés resultant (anomenat osteotransducció i que analitzarem més endavant) permet la reparació del defecte ossi.

1.5.2.- Biocompatibilitat.

1.5.2.1.- Concepte.

La biocompatibilitat és un concepte que fa referència al grau d'acceptació d'un material per part de l'organisme ("acceptabilitat biològica"). És l'estudi de la interacció dels biomaterials amb els teixits susceptibles d'estar en contacte amb ells (Proubasta 1997).

Aquesta **acceptabilitat biològica** pot ser estudiada a diferents nivells:

- interacció entre els materials i els teixits (en ambdues direccions).
- reacció resultant de la degradació del material.
- factors mecànics.

El risc biològic de la utilització de biomaterials depèn tant de la substància utilitzada i de la seva activitat com de la quantitat de material implantat i de la freqüència i durada de l'exposició.

La utilització de nous materials en clínica humana requereix imprescindiblement una avaluació preclínica, que inclou:

- caracterització físico-química del material, que inclou l'estudi de les propietats mecàniques (estàtiques i dinàmiques) de la substància així com la seva composició química.
- avaluació biològica, que comprèn un estudi de biocompatibilitat. El treball que presentem pot ser inclòs en aquest apartat d'avaluació biològica preclínica dels biomaterials.

1.5.2.2.- Organismes reguladors a Europa i als EUA.

En els darrers anys s'ha realitzat un esforç important per al consens en el camp del biomaterials, amb l'objectiu d'evitar que múltiples organismes diferents proposessin les seves pròpies classificacions i els seus sistemes d'avaluació dels nous materials. Als EUA existeix la American Society for Testing and Materials, que s'ocupa del desenvolupament i estandarització de materials, productes, sistemes i serveis. Entre els 129 comitès que la componen trobem l'anomenat F-4 o Comitè d'Implants Quirúrgics, fundat l'any 1962 donada la necessitat d'estandaritzar els diferents materials i aleacions utilitzats en cirurgia. El 1974 va passar a ser anomenat Comitè d'Aparells Mèdico-Quirúrgics, i el seu subcomitè F-4.20 té una secció dedicada a la biocompatibilitat. L'activitat d'aquest subcomitè va portar a la publicació de la primera estandarització dels tests utilitzats en estudis de biocompatibilitat (Recommended Practice for Experimental Testing for Biological Compatibility of Metals for Surgical Implants).

A Europa s'han creat darrerament diferents associacions estatals dedicades a l'estudi i control de la biocompatibilitat dels materials i a la publicació de normes per controlar la proliferació de nous materials. A França existeix la AFNOR (Associació Francesa de Normalització), a Alemanya la DIN, a Anglaterra la BS (British Standards) i a Espanya la AENOR. S'han creat també organismes comunitaris, entre els que destacarem l'ISO (International Standards Organisation). El comitè tècnic ISO TC-194 és l'encarregat de l'avaluació biològica dels biomaterials. El dossier que els estandaritza s'anomena ISO 10993.

1.5.2.3.- Resposta local dels teixits als biomaterials.

Tot estudi sobre biomaterials ha d'incloure l'avaluació de quatre fenòmens (Proubasta 1997):

- processos inicials a la superfície del biomaterial.
- corrosió i degradació del biomaterial.
- resposta local.
- resposta sistèmica.

La interacció entre un biomaterial i un teixit origina una resposta local que és complexa, llarga, de difícil predicció i variable en funció del tipus de biomaterial i també del tipus de teixit. La resposta és semblant a la que apareix en cas d'insult d'un teixit (traumatisme, infecció,...).

La resposta immediata és una reacció inflamatòria aguda, seguida d'una inflamació crònica i d'un procés de reparació.

a) Inflamació aguda.

Immediatament després de l'agressió, apareix vasodilatació, augment del flux sanguini, augment de permeabilitat capil.lar, extravasació sanguínia, estasi venosa i augment de pressió local. Es produeix un augment de permeabilitat capil.lar induït per la histamina. Apareixen al lloc de l'insult tisular leucòcits (sobretot neutròfils i limfòcits) i proteïnes plasmàtiques. Els neutròfils predominen en les primeres 6 a 24 hores. Després els mecanismes quimiotàctics provoquen l'aparició de macròfags, encarregats de la fagocitosi.

Tot biomaterial és considerat com a estrany per l'organisme i, per tant, el seu implant pot estimular els mediadors químics de la inflamació i afectar els processos quimiotàctics. De fet, els macròfags es converteixen en cèl.lules "residents" en els teixits que envolten el biomaterial durant llargs períodes de temps.

b) Inflamació crònica.

És una resposta més proliferativa que exudativa i depèn del tipus i de la intensitat de la lesió tisular. Al teixit hi ha macròfags, cèl.lules plasmàtiques i limfòcits. Els macròfags es poden fusionar per augmentar la seva eficàcia donant lloc a cèl.lules gegants.

c) Reparació-cicatrització.

El teixit de granulació de la fase inflamatòria deixa pas a un teixit on predominen els fibroblasts fusiformes, d'aspecte inactiu i el col.lagen dens. És una matriu extracel.lular amb una vascularització pobre. Aquest teixit fibrós semblant a una cicatriu es pot trobar després de l'implant de determinats biomaterials.

1.5.2.4.- Avaluació de la biocompatibilitat.

La fase preclínica d'estudi de qualsevol biomaterial inclou l'avaluació de:

- característiques físico-químiques: composició, densitat, microestructura, propietats termodinàmiques, ...
- biomecànica: elasticitat, resistència, duresa, ...
- avaluació en banc de proves: desgast, fricció, fatiga, corrosió, envelliment.
- estudi de biocompatibilitat.

Els **factors que influeixen en la biocompatibilitat** d'un material són:

- **Factors químics.** La composició química del material determina gran part de la seva possible toxicitat. Els polímers poden ser tòxics per sí mateixos o bé pels seus productes de degradació.

- **Factors elèctrics.** Els corrents de polarització anòdica o catòdica que poden presentar els metalls condicionen la seva corrosió. La polarització anòdica comporta una dissolució d'ions metàl·lics en l'organisme.

- **Factors de superfície.** La superfície del material pot ser hidròfila o hidròfoba, i això condiciona la seva tolerància. En general, els materials de superfície hidròfila són millor tolerats.

- **Interaccions mecàniques.** Les interaccions mecàniques a la interfase teixit-material condicionen la resposta cel·lular i, en el cas dels implants ossis, poden definir la formació de teixit fibrós (interaccions en forma de tracció o de cisallament) o de teixit ossi (interaccions de compressió).

- **Factors geomètrics.** La resposta a un material és diferent si aquest s'implanta massivament o bé en forma de partícules. En general, l'implant en forma de partícules genera una resposta quantitativament major. La reacció depèn per tant de la granulometria, la geometria i la quantitat de material implantat.

Les **reaccions adverses** són el motiu principal dels estudis de biocompatibilitat dels materials. Es consideren possibles reaccions adverses: inflamació, pirogenicitat, toxicitat sistèmica, sensibilització, mutagenicitat, carcinogenicitat, interacció amb la sang i reacció a partícules estranyes.

Un exemple típic de reacció adversa és la que pot aparèixer amb implants de polietilè d'alta densitat com a component de pròtesis totals de maluc. El polietilè és en principi inert i gairebé no genera cap reacció inflamatòria, però les partícules que es desprenen fruit del seu desgast poden generar una reacció a cos estrany de tal magnitud que comporta l'afluixament dels components protèsics i la pèrdua de teixit ossi, amb el consegüent fracàs de la pròtesi.

Pel que fa a la **funcionalitat dels nous biomaterials** cal dir que, si l'anàlisi de les possibles reaccions adverses és el primer objectiu dels estudis de biocompatibilitat, el poder obtenir informació sobre l'actuació i comportament dels nous materials és considerat com el segon objectiu prioritari. Aquesta informació ha de ser obtinguda en les condicions més semblants possibles al seu posterior ús. Els models animals permeten investigar l'eficàcia dels nous biomaterials i fer una aproximació força fiable a la seva posterior utilitat en

clínica humana. La resposta tisular front als biomaterials se sol analitzar per histologia convencional i per histoquímica enzimàtica. Aquesta darrera tècnica permet avaluar l'activitat de les cèl.lules situades al voltant del biomaterial i els canvis metabòlics induïts per aquest. Es mesuren els nivells de fosfatases alcalines, fosfatases àcides, esterasa no específica, leucina aminopeptidasa i deshidrogenasa. S'obté així informació sobre efectes més subtils dels biomaterials que poden tenir relació amb la seva toxicitat (Proubasta 1997).

1.5.2.5.- Estudis de biocompatibilitat.

Com hem vist, diversos organismes, tant a Europa com als EUA, procuren per l'estandarització dels diferents tests que han de permetre avaluar la biocompatibilitat d'un material. Actualment es tendeix a la realització d'una sèrie de tests biològics que donen com a resultat final l'anomenat Index de Resposta Acumulativa. Les proves que es realitzen poden ser:

- Tests in vitro:
 - Cultius cel.lulars.
 - Test de mutagenicitat.
 - Test de carcinogenicitat.

- Tests in vivo:
 - Test d'hemòlisi.
 - Implant tisular.
 - Irritació cutani-mucosa.
 - Test de sensibilització.
 - Test immunològic.
 - Histoquímica enzimàtica.
 - Test d'irritació ocular.
 - Test de toxicitat general.
 - Test de pirogenicitat.

Algunes d'aquestes proves són comuns a tots els biomaterials i altres només per a determinats tipus. Els 5 tests fonamentals en qualsevol estudi de biocompatibilitat són: cultius cel.lulars, test d'hemòlisi, implantació tisular, irritació cutani-mucosa i test de sensibilització.

a) Cultius cel.lulars.

El comportament de les cèl.lules en la interfase teixit-material permet definir la biocompatibilitat i també la biofuncionalitat del material. L'estudi dona tres nivells de biocompatibilitat:

- no biocompatible: altera les funcions cel.lulars.
- biocompatible: les estructures i funcions cel.lulars específiques es mantenen en qualitat i quantitat.
- bioactiu: el material estimula la diferenciació cel.lular.

Una de les tècniques més utilitzades és la que es coneix com a Agar Overlay, que s'aplica en cultius de fibroblasts.

b) Implantació tisular.

Es pot fer intraperitoneal (alta sensibilitat), intramuscular a nivell paravertebral o subcutània. El test més utilitzat és el "Rabbit Muscle Test" (descrit per Autian l'any 1973), que contempla 12 criteris histològics de resposta tisular que permeten determinar la toxicitat.

Darrerament es preconitza la utilització d'estudis d'histomorfometria, que permeten quantificar la reacció tisular.

c) Test d'hemòlisi.

Permet la valoració in vitro de les propietats hemolítiques dels materials que poden entrar en contacte amb la sang. El material es posa en contacte amb sang de conill i es mesura l'augment d'hemoglobina lliure en plasma.

d) Test de sensibilització.

Avalua el potencial d'una substància per produir una reacció de tipus al·lèrgic en contacte amb la pell.

e) Test d'irritació cutani-mucosa.

Com el test anterior, es realitza amb conills, i s'estudia l'aparició d'eritema o edema.

1.5.3.- Comportament mecànic dels biomaterials.

1.5.3.1.- Conceptes de mecànica de biomaterials.

L'estudi i caracterització de qualsevol biomaterial requereix imprescindiblement l'anàlisi de les seves propietats mecàniques, donat que aquestes adquireixen una importància de primer ordre a l'hora de definir les possibles aplicacions clíniques del material. No obstant, el treball que presentem no inclou el desenvolupament d'un nou biomaterial (camp de l'enginyeria de materials) sinó l'anàlisi del seu comportament biològic. Tenint en compte això, tractarem aquest capítol de mecànica de forma molt resumida, cercant tan sols l'explicació dels conceptes bàsics que ens permeten

comprendre els paràmetres utilitzats per al disseny de biomaterials i per a la seva caracterització físico-química.

La branca de la física que estudia la deformació i els fluxos dels materials sota càrrega rep el nom de reologia. El comportament d'un material sotmès a càrrega mecànica depèn de quatre propietats bàsiques: elasticitat, plasticitat, viscositat i fractura.

Les propietats mecàniques que descriuen el comportament dels materials s'especifiquen a través d'equacions constitutives. La gran varietat de materials existent fa que el nombre d'equacions constitutives sigui molt elevat. No obstant, la simple relació entre tensió i deformació d'un material dona una correcta descripció de les seves propietats mecàniques (Proubasta 1997).

1.5.3.2.- Tensions i deformacions.

En aplicar una força a un cos, aquest sol respondre amb una deformació que és directament proporcional a la força aplicada. La força aplicada sempre ha de fer referència a la unitat d'àrea sobre la qual actua. Si no fos així, el tamany del material condicionaria els valors de deformació obtinguts. Aquest és el concepte de tensió (o esforç), és a dir, la força per unitat d'àrea. S'expressa en MPa. La deformació produïda és la relació entre el tamany final i l'inicial, expressada en percentatge.

Es defineixen quatre tipus de sol·licitacions:

- axial, de compressió o de tracció. Provoca deformacions d'escurçament o allargament, segons el sentit de la força.
- tangencial o de cisallament. Provoca deformacions de lliscament.
- en flexió. La resultant de les forces no passa per l'eix del material. La

magnitud del moment de flexió depèn tant de la força aplicada com de la distància que la separa de l'eix. Gairebé tots els ossos estan sotmesos a sol·licitacions en flexió, ja que la resultant de les forces que actuen sobre ells no coincideix mai amb el seu eix. Les sol·licitacions en flexió produeixen deformacions d'escurçament a un costat de l'eix i d'allargament a l'altre.

- torsió. Quan la resultant de les forces tangencials a una secció no passa pel seu eix de simetria, apareix un moment de torsió que intenta fer girar aquesta secció respecte la immediatament contigua. La torsió genera deformacions angulars.

1.5.3.3.- Elasticitat lineal.

Molts materials tenen un comportament linealment elàstic que segueix la llei de Hooke. Aquesta inclou el principi de superposició (suma de forces = suma de deformacions) i el principi d'independència del temps (la deformació és instantània i no varia amb el temps).

Els assatjos mecànics dels materials permeten definir la corba de tensió-deformació. El pendent d'aquesta corba en el seu tram lineal s'anomena mòdul elàstic de Young. S'expressa en MPa.

Donat que la matèria no es crea ni es destrueix, una força de tracció genera una deformació d'allargament que s'acompanya obligatòriament d'una disminució de l'àrea de secció. La disminució de l'àrea per unitat d'augment de longitud s'expressa per la relació de Poisson. Aquesta relació només és vàlida per a materials isotròpics, donat que els materials anisotròpics com l'os poden presentar contraccions diferents segons la direcció analitzada. La relació de Poisson és una mesura de la capacitat d'un material per resistir un canvi de

volum i/o de forma. Un material linealment elàstic es deforma reversiblement, ja que recupera la seva longitud inicial en desaparèixer la força. El producte de la tensió per la deformació correspon a una energia per unitat de volum, que és exactament l'àrea sota la corba de tensió-deformació. El material guanya energia en càrrega i la cedeix en descàrrega, és a dir, emmagatzema l'energia de deformació. En materials elàstics no lineals (com el cautxo i els elastòmers) el percentatge de treball (energia) recuperat en descàrrega respecte de l'introduït en càrrega és inferior a la unitat. És a dir, dins de la regió elàstica de la corba, es produeix una histèresi mecànica i una despesa energètica.

1.5.3.4.- Deformació plàstica.

En un punt determinat de la corba de tensió-deformació, es perd la relació lineal entre aquests dos paràmetres. Aquest punt és el límit elàstic del material. Tensions superiors generen una deformació plàstica del material, que ja no recuperarà completament la seva longitud inicial. Donat que aquest punt és molt difícil d'identificar, s'accepta per conveni que el límit elàstic correspon al punt on la deformació és del 0,2%. La deformació plàstica implica moviment relatiu dels àtoms i molècules del material.

Els assatjos a tracció també permeten conèixer la ductilitat del material, que és la deformació plàstica en el moment de la fractura.

1.5.3.5.- Fractura dels sòlids.

Inicialment es pot pensar que el concepte de resistència suposa que la força s'aplica uniformement sobre tota la secció del material. Però la presència d'una fenedura, un orifici o una esquerdada que no suporta tensió fa que les

trajectòries s'agrupin de forma que la distribució de tensions està molt més concentrada a l'extrem d'aquesta irregularitat. Aquest és el concepte de concentració de tensions elàstiques i, com veurem, condiona la fractura del material.

L'any 1921, Griffith va formular la teoria bàsica de la fractura lineal d'un sòlid isotròpic. La fractura és la creació de noves superfícies en el material, fet que requereix un aport d'energia. Es pot calcular la tensió necessària per trencar simultàniament tots els enllaços interatòmics sobre un pla. Aquesta tensió té un valor comprès entre $E/5$ i $E/20$, essent E el mòdul elàstic de Young del material. No obstant, la resistència a la fractura habitual se sol situar en valors entre $E/1000$ per a materials fràgils i $E/100$ per a materials dúctils. Això és degut al fenomen de concentració de tensions que originen les fenedures o esquerdes presents al material. Griffith va establir que una esquerda es propagarà quan l'increment d'energia elàstica produït per la tensió aplicada sigui igual o major que l'energia necessària per crear una nova superfície d'esquerda. L'equació de Griffith permet determinar la tensió màxima de treball del material si es coneix el tamany màxim de les esquerdes que conté. És a dir, la resistència a la fractura d'un material està determinada pel tamany i l'orientació de la seva esquerda més àmplia.

La teoria de Griffith només és aplicable a materials linealment elàstics, i no als que es deformen plàsticament. Això es deu al fet que la deformació plàstica fa disminuir la concentració de tensions. Orowan i Irwin van modificar l'equació de Griffith donant lloc a la teoria de la mecànica de la fractura lineal elàstica, vàlida quan la zona plàstica a nivell de la punta de l'esquerda és molt petita.

La tenacitat de fractura és la resistència que ofereix el material a la propagació d'una esquerda. Si l'esquerda es pot propagar de forma ràpida i inestable, la tenacitat de fractura és baixa i el material es considera fràgil. En canvi, si el material pot suportar la presència d'una esquerda i la propagació d'aquesta requereix una gran energia (a la pràctica un gran augment de càrrega mecànica), la tenacitat de fractura és elevada.

Aquests conceptes són fonamentals a l'hora d'avaluar el comportament a fractura de qualsevol material, inclosos els teixits, i sobretot els biomaterials. La determinació de la tenacitat de fractura en les ceràmiques és especialment important, tenint en compte la coneguda fragilitat d'aquests biomaterials.

1.5.3.6.- Viscoelasticitat.

El comportament elàstic implica la recuperació de les dimensions inicials en el moment de retirar la càrrega. Hi ha moviment de matèria però aquest no és permanent. En l'extrem oposat es troben els fluïds viscosos, en els quals els àtoms i molècules que conté es traslladen dissipant energia, i la deformació no es recupera en retirar la càrrega. Així, es considera que el temps de relaxació d'un sòlid elàstic ideal tendeix a infinit (recupera immediatament la forma inicial en retirar la càrrega), i el d'un líquid viscos tendeix a zero. La majoria dels materials reals té un comportament intermig, i una forma útil de descriure'l és la determinació del temps de relaxació. Aquest comportament s'anomena viscoelàstic lineal i es presenta, per exemple, en els polímers, els elastòmers i els teixits biològics. En els materials linealment viscoelàstics el temps de relaxació varia en funció del temps de càrrega. Un exemple és el de la pasta de silicona. En aplicar-li una càrrega lentament, el material flueix

pràcticament com un líquid. En canvi, si la càrrega aplicada és instantània, el material rebotja elàsticament. Aquesta variació en el comportament dels materials viscoelàstics en funció del temps de càrrega dificulta el càlcul del seu mòdul d'elasticitat. Això es pot resoldre de dues formes: aplicant una tensió constant i observant com varia amb el temps la deformació (concepte de fluència) o bé aplicant una deformació constant i observant com varia amb el temps la tensió (concepte de relaxació de tensions).

El comportament dels materials viscoelàstics varia també en funció de la temperatura, i aquest és un paràmetre que cal tenir en compte en caracteritzar un biomaterial. Això és especialment important en el cas dels polímers.

És possible construir models mecànics que permeten analitzar de forma simplificada el comportament mecànic dels materials viscoelàstics. Aquests models donen un tractament matemàtic al comportament real dels materials. La caracterització del comportament mecànic d'un biomaterial és fonamental per definir les possibilitats d'utilització en clínica humana.

1.5.4.- Tipus de biomaterials.

1.5.4.1.- Metalls.

Fins al segle XVIII només s'havien utilitzat implants d'or i de plata. Posteriorment es van introduir els acers i, ja al segle XX, els acers inoxidable i les aleacions de crom-cobalt-molibdè. A partir dels anys 1940 s'inicia la utilització mèdica del titani i les seves aleacions.

a) Acers inoxidables.

Són un grup d'acers resistents a una gran varietat d'agents corrosius. Tots contenen almenys un 12% de crom. Aquest element és molt reactiu i forma una pel·lícula superficial que resisteix l'oxidació fins i tot a elevades temperatures.

Els acers inoxidables es classifiquen segons la seva microestructura en:

- martensítics: Contenen entre un 11,5 i un 18% de crom. Són magnètics i molt resistents a la corrosió i a agents químics. S'utilitzen per a la fabricació d'instrumental quirúrgic.

- ferrítics: El contingut de crom se situa entre el 14 i el 27%. S'utilitzen en la indústria química i alimentària.

- austenítics: Contenen almenys un 23% de níquel i de crom. Són els més utilitzats en la fabricació d'implants de cirurgia ortopèdica, sobretot l'acer inoxidable 316L (16-18% Cr, 10-14%Ni, 2%Mo, 0'03%C). Són els més resistents a la corrosió.

b) Aleacions base Cobalt.

L'aleació de Co-Cr-Ni-Mo s'utilitza per a la fabricació de tiges protèsiques destinades a articulacions sotmeses a càrrega com el maluc. No és recomanable, en canvi, per a les superfícies articulars de les pròtesis per les seves pobres propietats a fricció. La resistència a la fatiga és força elevada. El mòdul d'elasticitat és de 220 a 234 GPa, molt superior al de l'os (20 GPa), fet que afecta el procés de transferència de càrrega entre implant i os.

c) Titani i aleacions.

El Titani té un mòdul d'elasticitat de 110 GPa, més proper al de l'os que els acers. Té una excel·lent resistència a la corrosió donat que reacciona ràpidament amb l'oxigen produint una capa superficial d'òxid impermeable. Actualment es considera el metall més adequat per a la fabricació d'implants quirúrgics. El seu elevat preu limita no obstant la seva utilització. L'aleació més emprada és la de Ti-6Al-4V, degut a la bona relació entre les seves propietats mecàniques i la seva resistència a la corrosió.

d) Altres metalls.

El Tantalí és un material molt biocompatible, però les seves febles propietats mecàniques limiten el seu ús a sutures en cirurgia plàstica.

El Platí presenta una elevada resistència a la corrosió però les seves característiques mecàniques són també molt pobres. S'utilitza per fabricar electrodes de marcapassos.

L'Or i la Plata són també molt resistents a la corrosió però tenen poc interès degut a unes propietats mecàniques inadequades.

1.5.4.2.- Ceràmiques.

Fa ja molts milers d'anys que l'home va descobrir que el foc convertia el fang en ceràmica, i aquest fet va suposar una notable millora de la qualitat de vida. No obstant, els estudis sobre bioceràmiques per a aplicació en el camp de la medicina van començar fa poc més de 20 anys.

L'interès inicial neix del fet que moltes ceràmiques són oxídiques, és a dir, òxids metàl·lics, amb la qual cosa no és possible la seva oxidació i corrosió

en el medi biològic. A més, tenen una gran duresa, fet que evita problemes deguts a la fricció i el desgast. L'exemple més notable és el de l'alúmina (òxid d'Alumini), àmpliament difós com a component de pròtesis de substitució articular.

Tenint en compte el seu comportament in vivo, es descriuen dos tipus de ceràmiques:

- ceràmiques bioinerts: tenen una elevada estabilitat in vivo, una gran resistència mecànica i una biocompatibilitat òptima.

- ceràmiques bioactives: tenen capacitat d'osteoconducció; creen enllaços químics amb l'os viu, però les seves propietats mecàniques són inferiors. Entre les ceràmiques bioactives es troben els fosfats càlcics, una variant dels quals estudiem en aquest treball.

El potencial de les ceràmiques com a biomaterials és enorme, tant per la gran quantitat d'aplicacions en què es poden utilitzar, com per la varietat dels materials inclosos en aquest grup. Actualment s'implanten cada any al món més d'un milió de pròtesis articulars amb materials ceràmics. A més, la seva aplicació en el camp de l'odontologia també està molt difosa.

Les bioceràmiques es poden presentar en forma de monocristalls (zàfir), policristalls (alúmina, hidroxiapatita), vidres (bioactius), vitroceràmiques, carbons i composites.

Tenint en compte la interacció entre les bioceràmiques i els teixits vius, es descriuen quatre tipus de fixació: morfològica (per creixement ossi en les irregularitats de la superfície), biològica (per colonització del material gràcies al creixement ossi), bioactiva (per enllaços químics entre l'os i el material) i de substitució per os neoformat (mecanisme d'osteotransducció). Per la seva

implicació bàsica en els fonaments teòrics d'aquest treball, ampliarem aquests conceptes en el capítol dedicat al ciment de fosfat càlcic.

La fixació morfològica afecta les ceràmiques cristal·lines inerts; la fixació biològica les ceràmiques poroses; la fixació bioactiva els vidres bioactius i vitroceràmiques; la substitució per os neofomat les ceràmiques de fosfat càlcic.

a) Bioceràmiques cristal·lines inerts.

La més utilitzada és l'**Alúmina** (Al_2O_3) d'alta densitat i puresa (>99,7%). S'empra en pròtesis articulars (maluc) i en implants dentals. Combina unes excel·lents biocompatibilitat, resistència a la corrosió, resistència al desgast, i propietats mecàniques (mòdul elàstic, baixa fricció, ...). Es fa servir en forma policristalina de gra molt fi ($<4\mu m$) i amb un 0,5% de magnesi, que facilita la sinterització i limita el creixement del gra durant aquest procés tèrmic. El tamany del gra determina la resistència a la fatiga i a la fractura. Les normes ISO exigeixen una puresa superior al 99,5%, una densitat superior a $3,90 g/cm^3$, un tamany de gra inferior a $7\mu m$, una resistència a la compressió de 4500 MPa i a la flexió de 400 MPa i un mòdul elàstic de 380 GPa. L'alúmina realitza una fixació morfològica. La seva excel·lent biocompatibilitat i la prima càpsula que es forma permet la fixació sense ciment. El desgast d'una articulació ceràmica és 10 cops inferior al d'una de tipus metall-polietilè. El problema principal de l'alúmina és que el seu mòdul elàstic és entre 10 i 50 vegades superior al de l'os (7-25 GPa), fet que pot induir osteolisi i per tant aflujament de l'implant. L'alúmina s'ha utilitzat també en pròtesis de genoll, cargols, reconstruccions maxil·lofacials, substitució òssia a l'orella mitjana,...

b) Ceràmiques poroses.

L'avantatge dels implants de ceràmica porosa és que, essent inerts, ofereixen una bona estabilitat mecànica degut al creixement ossi a l'interior dels seus porus (fixació biològica). L'inconvenient és que la porositat minva les propietats mecàniques fins al punt de limitar la utilització d'aquests materials a aplicacions que els sotmetin a càrregues mínimes o nul·les. Els porus han de tenir un diàmetre superior a $100\mu\text{m}$ per permetre el creixement ossi mantenint la vascularització. Així, l'implant actua com a pont estructural i com a model per a la formació d'os (osteoconducció).

Les microestructures de corall són un material òptim per servir de motlle d'inversió d'estructures amb tamany de porus altament controlat. El procés s'anomena *replamine-forming* i consisteix a duplicar estructures poroses de coralls amb elevada uniformitat en el tamany dels porus. Els millors materials porosos obtinguts amb aquest procés són alumina porosa, titani, fosfats de calci, poliuretà, silicona, polimetilmetacrilat (PMMA) i crom-cobalt.

c) Vidres bioactius i vitroceràmiques.

S'uneixen a l'os per fixació bioactiva. La característica comuna a tots aquests materials és la modificació cinètica de la superfície després de l'implant. Aquesta superfície forma una capa biològicament activa d'hidroxicarbonat apatita (HCA) que proporciona la interfase d'enllaç amb els teixits. La fase d'HCA formada és equivalent química i estructuralment a la fase mineral de l'os. Això permet l'enllaç interfacial. La composició del material és fonamental per permetre l'enllaç químic. L'adhesió a l'os es va demostrar amb vidres que contenen SiO_2 , NaO_2 , CaO i P_2O_5 en proporcions específiques.

Només un 3% d'alúmina en la composició ja impedeix l'enllaç al teixit i el vidre passa a tenir comportament bioinert.

La concentració inicial de cèl.lules (osteoblasts, condroblasts i fibroblasts) a la interfase depèn de l'ajust (*fit*) de l'implant i del tipus de defecte ossi. Tots els materials bioactius requereixen un període d'incubació fins que l'os prolifera i s'estableixin els enllaços. El període d'incubació varia en funció de la composició del biomaterial, que alhora condiciona la cinètica. Si les reaccions superficials són ràpides, l'implant és reabsorbible, mentre que si són massa lentes, es comporta com a bioinert i es realitza una fixació morfològica (no bioactiva). Són exemples de materials bioactius el Bioglass^R i el Ceravit^R.

d) Ceràmiques de fosfat càlcic.

S'utilitzen en cirurgia i odontologia des de fa més de 20 anys (implants dentals, tractament periodontal, augment de la cresta alveolar, otorrinolaringologia, cirurgia de raquis,...). Depenent de si cal un material reabsorbible o bé bioactiu, s'empren diferents tipus de fosfats de calci.

Les fases estables de les ceràmiques de fosfats de calci depenen considerablement de la temperatura i del contingut d'aigua, tant durant el seu processament com del medi on s'implanten. A temperatura corporal i en medi aquós només dos fosfats de calci són estables: la **brushita** o fosfat dicàlcic amb $\text{pH} < 4,2$ i la **hidroxiapatita** amb $\text{pH} > 4,2$. A temperatures superiors també són estables el **fosfat tricàlcic** i el **fosfat tetracàlcic**. Aquests últims, a 37°C , poden interaccionar amb els fluïds corporals per formar hidroxiapatita.

La solubilitat i la tendència a la reabsorció depenen de la relació Ca/P i de la microestructura (porositat) del material.

La resistència mecànica i la resistència a la fatiga depenen també de la porositat, i això condiciona les possibles aplicacions. La porositat pot ser deguda al procés de sinterització (a 1000-1500°C) o creada expressament per permetre el creixement ossi. La primera és la microporositat (porus $<1\mu\text{m}$) i la segona és la macroporositat (porus $>100\mu\text{m}$).

En general, les ceràmiques de fosfat càlcic són poc resistents a la tracció en medi fisiològic. Per això s'utilitzen en forma de:

- grànuls o pols.
- petits implants no sotmesos a càrrega.
- implants dentals amb reforços metàl·lics.
- recobriments sobre implants metàl·lics.
- implants porosos sotmesos a càrregues baixes en els quals l'os en creixement actuarà com a reforç.
- fase bioactiva en materials compostos.

El mecanisme d'enllaç als teixits de la hidroxiapatita densa és molt diferent del dels vidres bioactius. El mecanisme principal és el creixement de petits cristalls d'os sobre els cristalls de l'implant. D'aquesta manera, la zona d'enllaç és molt prima (entre 0,5 i $2\mu\text{m}$). La zona d'unió ultrafina genera un elevat gradient de mòdul elàstic a la interfase entre la hidroxiapatita i l'os. Es desconeixen de moment les implicacions clíniques d'aquest fet (Proubasta 1997). La hidroxiapatita s'utilitza freqüentment per al recobriment de superfícies metàl·liques de pròtesis articulars amb l'objectiu de millorar la fixació a l'os (Oonishi 1989). La tècnica més emprada és la de projecció per plasma de la pols d'hidroxiapatita. S'ha demostrat que la superfície bioactiva de

la hidroxiapatita s'enllaça perfectament a l'os. No obstant, la pròpia tècnica de projecció de la pols planteja problemes tant pel que fa al grau de cristal·linitat de la hidroxiapatita projectada com al comportament mecànic de la interfase metall-hidroxiapatita. Les elevades temperatures poden produir diferents fases en la hidroxiapatita, i fins i tot l'aparició d'una fase vítria, més soluble en el medi biològic. Aquestes fases intergranulars poden afavorir la degradació del recobriment. Pel que fa al comportament mecànic de la interfase metall-hidroxiapatita, cal tenir en compte que no existeix cap tipus d'enllaç entre aquests dos materials, i per tant la resistència a la fractura a nivell de la interfase és molt baixa.

e) Fosfats de calci reabsorbibles.

La reabsorció o biodegradació de les ceràmiques de fosfat càlcic pot ser causada per:

- dissolució físico-química (que depèn del tipus de material i del pH del medi). Això pot conduir a la formació de noves fases a la superfície del material.
- desintegració física en forma de petites partícules a causa d'un atac químic.

Determinats factors condicionen la taxa de biodegradació del material:

a) augmenten la biodegradació:

- l'augment de l'àrea superficial (pols>sòlid porós>sòlid dens.
- la disminució de la cristal·linitat.
- la disminució de l'homogeneïtat dels cristalls.
- la disminució del tamany del gra.
- substitucions iòniques com $(\text{CO}_3)^{2-}$, Mg^{2+} o Sr^{2+} en la hidroxiapatita.

b) disminueixen la biodegradació:

- presència de F en la hidroxiapatita.
- presència de Mg^{2+} en el β -fosfat tricàlcic.
- en fosfats tricàlcics bifàsics, disminució de la relació β -fosfat tricàlcic/hidroxiapatita.

Tot això fa necessari controlar la microestructura, l'estat de les fases i la composició química del material per tal d'obtenir una taxa de reabsorció determinada.

Tractarem més àmpliament el tema de les ceràmiques reabsorbibles de fosfat càlcic en el capítol 1.6.

1.5.4.3.- Polímers.

Els materials polimèrics tenen una àmplia varietat d'aplicacions donat que es poden produir amb múltiples formes (fibres, tèxtils, pel·lícules,...) i que tenen gran semblança amb components dels teixits orgànics com el col·lagen. A més, poden ser sòlids i líquids. S'utilitzen per a la fabricació d'apòsits, tubs, marcapassos, lents de contacte, lents intraoculars, ciments ossis (polimetilmetacrilat), sutures, catèters, ...

Estan formats per cadenes moleculars que s'amplien per polimerització. A mesura que creixen minva la seva mobilitat relativa i això condiona la resistència mecànica del material. La polimerització es pot fer per dos processos: per condensació (ex: dacron) o per addició (ex: propilè).

Les cadenes de polímer es poden disposar de forma lineal, ramificada o com a xarxa tridimensional. Això també condiona les característiques mecàniques dels materials.

a) Poliolefines.

Comprenen el polietilè, el propilè i els seus copolímers. Són compostos termoplàstics lineals.

El **polietilè** és el més utilitzat. La seva densitat condiona la duresa, la rigidesa, la resistència mecànica i la permeabilitat. S'utilitza per a la fabricació de xeringues, guants, bosses de fluïds, sutures, drenatges, etc. El polietilè d'ultra-alt pes molecular s'empra per a la fabricació d'implants protèsics que han de suportar importants càrregues mecàniques (maluc i genoll). Aquest material no té cap dissolvent conegut (a temperatura ambient) i per tant és molt estable.

El **polipropilè** és un material molt lleuger i flexible, però alhora amb elevada resistència química, tèrmica i mecànica. S'utilitza per a la fabricació de sutures, vàlvules cardíques, filtres sanguinis i pròtesis de tràquea, laringe i esòfag.

b) Materials acrílics.

Els més utilitzats en clínica humana són el polimetilmetacrilat, els hidrogels acrílics i alguns diacrilats i dimetacrilats.

El **polimetilmetacrilat (PMMA)** és el material més utilitzat actualment per a la cimentació de components protèsics articulars. També s'empra per a la fabricació de lents de contacte, lents intraoculars, paladars artificials, tubs de traqueostomia, ... Té una resistència mecànica molt elevada (resistència a la tracció de 22 a 48 MPa) però comporta també alguns inconvenients: mòdul elàstic molt diferent al de l'os (entre 1,7 i 3,2 GPa), possible formació de bombolles d'aire atrapades durant el procés d'elaboració (si a més hi ha sang o

greix la porositat pot arribar al 10% i disminuir la resistència mecànica), reacció exotèrmica fins a gairebé els 100°C en el procés de polimerització (lesió de teixits), creació de dues interfases diferents (metall-ciment i ciment-os), i deficient fixació a llarg termini (per aflluixament a nivell d'una de les interfases o per destrucció del ciment en l'anomenada malaltia de les partícules).

Altres materials acrílics d'interès mèdic són:

- **hidrogels acrílics**: Són utilitzats per a la fabricació de lents de contacte toves i de materials substitutius de teixits tous.

- **cianocrilats d'alquil**: S'empren com a recobriments i materials de sutura.

c) Resines epoxídiques.

Els grups epoxídics poden reaccionar amb hidrògens, amines, àcids orgànics, alcohols primaris i secundaris, fenols i mercaptans donant lloc a productes entrecruats de gran resistència. S'han utilitzat com a reforç de fractures òssies, adhesius ossis, recobriments de marcapassos,...

d) Àcid poliglicòlic i polilàctic.

La primera sutura reabsorbible aprovada per al seu ús en clínica humana va ser la d'**àcid poliglicòlic** (PGA). Té una bona biocompatibilitat. El PGA d'alt pes molecular és un polímer cristal·lí insoluble en la majoria de dissolvents però que s'hidrolitza lentament en aigua donant com a resultat molècules d'àcid glicòlic. Aquest és transformat enzimàticament en glicina, que s'utilitza per a la síntesi proteica o de serina, que, transformada en piruvat, s'incorpora al cicle de l'àcid tricarbòxilic (cicle de Krebs). S'han fabricat implants

de PGA per al tractament de fractures. El material és molt menys rígid que els implants metàl·lics, fet que disminueix l'efecte de protecció de càrrega i minva per tant l'osteoporosi secundària. A més, té l'avantatge de ser biodegradable, fet que pot evitar reintervencions per a retirada del material d'osteosíntesi. Les propietats mecàniques del PGA, però, es deterioren en un període de 4 a 6 setmanes.

L'**àcid polilàctic** (PLA) té una llarga història en clínica humana com a material de sutura. El PLA es transforma per desesterificació hidrolítica en àcid làctic, que s'incorpora al cicle de Krebs i s'excreta com a CO₂ a nivell pulmonar. Els implants de PLA són menys rígids que els de PGA però en canvi el seu període de degradació és molt més prolongat (de 6 a 12 mesos).

S'han desenvolupat nombrosos copolímers de PGA i PLA amb l'objectiu de millorar tant les propietats mecàniques inicials com el temps de degradació. L'elevat pes molecular és fonamental en ambdós aspectes. Els implants han de ser esterilitzats amb òxid d'etilè per evitar la degradació dels polímers (que sí apareix amb la irradiació).

S'han obtingut bons resultats clínics utilitzant aquests materials en fractures de consolidació ràpida.

Les propietats mecàniques del PGA (sobretot la resistència a la flexió i a la torsió) milloren molt si s'utilitzen compostos autoreforçats (Daniels 1990) en els quals l'orientació de les fibres de PGA és compactada i sotmesa a fusió diferencial. Això proporciona un material rígid format per fibres sense cap solució de continuïtat.

Els implants de PGA s'han utilitzat àmpliament en el tractament de fractures mal·leolars, amb bons resultats.

e) Altres polímers.

Els **fluorocarbons** tenen una notable resistència a la majoria d'agents químics i a la temperatura. El més utilitzat és el téflon (politetrafluoroetilè). Té aplicacions com a pròtesis d'urèter, de conductes biliars, tràquea o laringe, substitutius de tendons i lligaments i pell artificial.

Les **poliamides** (conegudes com a Nylon) també tenen gran resistència mecànica. La seva estructura inclou enllaços de pont d'hidrogen entre les cadenes que poden ser destruïts in vivo, fet que permet aplicacions com a materials biodegradables. S'utilitzen com a pròtesis d'orella externa, pròtesis nasals, cànules de traqueostomia, pell artificial,...

Els **polièsters** són polímers d'elevat pes molecular. S'utilitzen reforçats amb fibres de vidre per a la fabricació de pròtesis de laringe, urèter i esòfag, pell artificial i sutures.

El **policlorur de vinil** té utilitat com a component de materials auxiliars: tubs, bosses, conductes de drenatge, ...

Les **silicones** tenen propietats anticoagulants i s'utilitzen per tant en dispositius que hagin d'estar en contacte amb el sistema vascular. En oftalmologia són útils per a la cirurgia de reparació de la retina.

Els **poliuretans** s'empren com a tubs vasculars, vàlvules cardíaques, adhesius ossis, ...

1.5.4.4.- Altres substitutius ossis.

a) Col.lagen.

El col.lagen és, junt amb la hidroxiapatita, l'aigua i les cèl.lules, un dels principals components de l'os. Té acció hemostàtica donat que afavoreix

l'agregació plaquetària. Aquesta va ser la causa de la seva utilització inicial. El 1969, Bedach exposa la possibilitat d'implantar col.lagen en defectes ossis. Aquesta utilitat ha estat més estudiada en el camp de la cirurgia maxil.lofacial (Cutright 1972). El 1980, Fabinger realitza un implant de col.lagen en una mandíbula i demostra un augment de regeneració òssia.

Tot i aquests primers resultats, no es realitzen actualment implants de col.lagen aïllat, donat que la seva puresa ha de ser molt elevada i que és necessària la seva desnaturalització (si es tracta de col.lagen xenogènic).

b) Pyrost.

S'obté a partir d'ossos d'animals mitjançant un procés de calcinació lenta en determinades condicions de pressió i humitat (Katthaghen 1986). S'obté una estructura òssia esponjosa natural totalment desproteïtzada, amb canals amples que afavoreixen l'osteoconducció. Els estudis d'experimentació animal han mostrat un ràpid creixement de teixit de granulació com a conseqüència de la penetració de sang al seu sistema de canals, així com una notable formació d'os intersticial, que comença pocs dies després de l'implant. El Pyrost^R es comercialitza en fragments d'aspecte esponjós de diferents geometries.

c) Composites.

Són materials constituïts per diverses substàncies de característiques físico-químiques molt diverses, la combinació de les quals permet millorar notablement les propietats biològiques o mecàniques.

L'any 1977, Mittelmeier desenvolupa el Collapat^R, un compost format per col.lagen i hidroxiapatita. El col.lagen ha de ser liofilitzat per tal de formar una xarxa d'aldehids que fa de suport per al granulat d'apatita. En ser implantat, aquest composite s'impregna de sang i en 1-2 setmanes és envoltat per teixit de cicatrització i progressivament substituït per os. Es comercialitza amb aspecte esponjós, de color blanc i textura flexible.

Existeixen també composites que combinen materials bioactius i/o biodegradables amb materials inerts que els donen major resistència (Martí Valls 1995). Així, s'han creat combinacions de determinades ceràmiques amb materials biològics (col.lagen, matriu òssia) i també composites de polímers biodegradables units a materials inerts que els permeten d'obtenir millors propietats mecàniques.

d) Matriu òssia i BMP.

L'any 1889, Senn, de l'hospital de Milwaukee, desenvolupa la tècnica de preparació de l'os decalcificat amb solucions àcides. Va preparar os fresc de tíbia tallat a llesques primes, en va extreure el moll de l'os i va descalcificar la resta. Un cop rentat i desinfectat amb alcohol, el material va ser implantat primer en animals i després en humans per al tractament d'osteomielitis.

Després d'aquest experiment es va abandonar la utilització de matriu òssia fins l'any 1965, quan Urist va observar que la matriu òssia acel.lular, desvitalitzada i descalcificada (que anomena proteïna òssia morfogenètica - BMP-) pot ser substituïda, un cop implantada en defectes ossis cavitaris, per un teixit connectiu que conté histiòcits, macròfags, limfòcits i fibroblasts, i que condueix a la formació d'os entre les 8 i les 16 setmanes en el 90% dels casos.

Trenta anys de contínua recerca van ser necessaris per identificar i purificar les proteïnes responsables de l'acció osteoinductora (Urist 1994).

Per a Urist, la BMP present a la matriu òssia descalcificada és capaç d'induir la diferenciació cel.lular cap a la línia osteogènica. La BMP es pot aïllar a partir d'os cortical, de dentina i d'alguns tumors ossis. L'any 1986, Nilsson estudia la reparació de defectes ossis cubitals en gossos utilitzant BMP d'origen boví, amb bons resultats. El 1991, Heckman utilitza, també amb bons resultats, BMP per al tractament de pseudoartrosis en un experiment amb gossos. Observa com el resultat és millor amb BMP autòloga que amb heteròloga, degut a l'acció del sistema immunitari.

La matriu òssia és, per tant, la fracció orgànica del teixit ossi un cop desmineralitzat. Fins i tot després del procés de preparació i conservació, hi són presents els factors locals de creixement amb capacitat osteoinductora (Martí Valls 1995).

Una forma de comprovar les propietats osteoinductores d'un material és realitzar implants intramusculars, en llocs on no hi ha cap cèl.lula òssia preexistent. La osteoinducció queda demostrada si es troben osteoblasts a l'interior del múscul. La transformació d'una cèl.lula indiferenciada en una cèl.lula òssia requereix però l'activació d'una cascada de reaccions físico-químiques en la qual la BMP és un dels actors principals però no l'únic. Així, la BMP aïllada és insuficient per activar el procés complet. Són també necessaris altres factors, algun dels quals és encara desconegut. Cal tenir en compte, a més, que aquests factors, com altres factors de creixement, poden tenir accions extraòssies (hepàtiques, neurològiques, ...) encara força desconegudes.

Actualment es disposa de BMP sintetitzada per enginyeria genètica, fet que facilita molt la recerca en aquest camp. S'han realitzat treballs de recerca amb implants de BMP recombinant en artrodesis vertebrals. Actualment l'interès se centra en determinar quina és la dosi mínima de BMP capaç d'induir l'osteogènesi, per tal de limitar el risc que comporta l'acció a distància per difusió. Ja l'any 1982, Urist va demostrar que si la BMP contacta amb la duramare, aquesta es pot calcificar (Takagi 1982). S'intenta doncs trobar un vector capaç de retenir la BMP en el lloc de l'implant. Dels estudis experimentals actualment disponibles es desprèn el gran potencial de la BMP en aplicacions clíniques com pot ser la millora en el procés de consolidació de fractures. No obstant, no existeixen encara estudis clínics que demostrin l'eficàcia d'aquest tractament en l'home (Bostrom 1999).

e) Cartíleg costal.

El cartíleg és una forma especialitzada de teixit connectiu formada per cèl.lules (condròcits) i fibres extracel.lulars incloses en una matriu amorfa semblant a un gel (Bloom 1975). A diferència d'altres teixits, el cartíleg no posseeix vascularització ni innervació pròpies.

La capacitat del cartíleg per créixer amb rapidesa, però alhora conservant un notable grau de rigidesa, el converteixen en un material favorable per a l'esquelet embrionari. La major part de l'esquelet es forma amb models cartilaginosa, que posteriorment són substituïts per teixit ossi. La transformació regressiva més important del cartíleg és la calcificació, que sol precedir a la formació d'os. En l'home, la calcificació del cartíleg costal es considera una evolució normal relacionada amb l'edat.

L'any 1896, König proposa l'empelt de cartíleg costal autogen en patologia maxil.lofacial. Bert (1965) utilitza per primera vegada cartíleg costal al.logènic en cirurgia experimental. El 1946, Peer realitza estudis en humans i demostra la incorporació i creixement d'un empelt cartilaginós autogen primer a nivell facial i més tard (1954) per a la reconstrucció del cartíleg articular del cap femoral i per al tractament de defectes ossis vertebrals. Posteriorment molts altres autors han publicat experiències amb la utilització de cartíleg costal, tant autogen com homòleg. No obstant, els darrers estudis realitzats amb animals d'experimentació desaconsellen la utilització del cartíleg costal com a substitutiu ossi en defectes cavitaris (Del Valle 1999).

1.6.- Els ciments de fosfat càlcic.

1.6.1.- Introducció. Ceràmiques de fosfat càlcic.

Durant la segona meitat del segle XX, el desenvolupament de l'osteosíntesi interna i de l'osteotaxi, així com la profilaxi de les possibles complicacions, han canviat de forma radical el pronòstic dels pacients traumàtics i han reduït enormement les seves seqüeles.

En el tractament quirúrgic de les fractures i defectes ossis traumàtics, així com en el de les pseudoartrosis i tumors cal emprar molt freqüentment empelts ossis. Els empelts, ja siguin autòlegs o homòlegs, tenen importants inconvenients i limitacions (capítols 1.4.2.1. i 1.4.2.3).

Diversos materials han estat proposats per a la seva utilització en cirurgia òssia, tant per reparar defectes de l'os com per augmentar la quantitat d'os, així com per millorar les substitucions articulars (capítol 1.5).

En qualsevol cas, la biocompatibilitat i les característiques del material són essencials per a assolir l'objectiu desitjat. Si el material implantat és inert, no es fixa perfectament a l'os viu que l'envolta. Propietats com la biodegradabilitat (desaparició progressiva del material implantat en un ésser viu) o la bioactivitat (capacitat d'un material d'elicitar o modular l'activitat biològica) són més desitjables per tal d'obtenir una fixació òptima. Les discussions actuals se centren en els conceptes d'osteoconducció (capacitat d'un material per dirigir la neoformació òssia a través seu) versus osteoinducció (estimulació del creixement ossi) i d'enllaç a l'os (establiment de continuïtat entre l'implant i la matriu òssia mitjançant processos físico-químics) versus substitució per os neofomat.

Només dues opcions són possibles:

- substituir el fragment d'os lesionat (p.ex. per un tumor) o absent (fractures comminutes, defectes ossis traumàtics) per un material que supleixi la seva funció (pròtesi, empelt corticoesponjós) o que permeti el creixement ossi a través seu.

- implantar un material que tard o d'hora serà totalment substituït per os sà neofomat.

Actualment es considera que el biomaterial òptim hauria de ser osteoconductor (capaç de guiar la reconstrucció òssia), osteoinductor (capaç d'estimular els fenòmens de reparació) i reabsorbible (sense donar lloc a productes tòxics). Cap dels biomaterials disponibles actualment per a la seva

utilització en clínica humana no compleix totes aquestes característiques (Amédée 1996). Molts són reabsorbibles, però roman sempre present el problema d'adaptar la cinètica de reabsorció del biomaterial a la de formació d'os nou.

Els cristalls d'apatites biològiques són els principals constituents de l'os i de les dents (Posner 1985). Aquestes apatites pertanyen a la gran família química dels fosfats de calci. Entre ells, diversos tenen interès biològic, ja sigui perquè es troben en l'origen de determinades patologies (càlculs renals, calcificacions heterotòpiques,...), ja sigui perquè estan implicats en els processos de mineralització dels precursors dels cristalls ossis (Peru 1994). Els fosfats de calci han estat centre d'interès perquè són comparables a la fase mineral dels teixits calcificats, és a dir, a l'apatita biològica (apatita fosfocàlcica, carbonatada, no estequiomètrica).

1.6.1.1.- Apatites biològiques.

a) Química de les apatites.

Ja l'any 1926, De Jong va demostrar, amb tècniques de difracció de raigs X, l'analogia del mineral ossi amb els minerals de tipus apatític. Des de llavors, nombrosos problemes tècnics en els estudis realitzats han portat a resultats contradictoris sobre la naturalesa i el sistema de formació del mineral ossi. El progrés dels darrers 30 anys ha estat possible pels avenços en el camp de la química en la síntesi d'apatites complexes així com per la utilització de millors tècniques de recerca estructural. L'èxit de les apatites en el domini biològic es deu sobretot a la seva gran adaptabilitat a diferents ambients fisiològics (Daculsi 1996).

Químicament, les apatites es representen per la fórmula:



on Me és un metall bivalent (Ca, Sr, Ba, Pb, ...), XO_4 un anió trivalent (PO_4 , AsO_4 , VO_4 , ...) i Y un anió monovalent (F, Cl, Br, I, OH, ...). Un dels compostos model d'aquesta estructura és la fluorapatita fosfocàlcica:



En general les apatites cristal·litzen en el sistema hexagonal. Una de les característiques essencials d'aquesta estructura és la seva capacitat per formar solucions sòlides i per acceptar un gran nombre de substitutius. Així, el calci pot ser substituït per altres elements bivalents, però també per ions monovalents (Na, K,...) o trivalents (La, Ga,...) o per llacunes. També el grup XO_4 pot ser substituït per ions bivalents (CO_3 , SO_4 , HPO_4 , ...) o tetravalents (SiO_4), però no per llacunes. El segon lloc aniònic també pot ser ocupat per ions bivalents (CO_3 , O, O_2 , S, ...) i/o per llacunes. Això fa que les apatites puguin presentar entre elles notables diferències d'estequiometria, donat que les llacunes catióniques poden afectar fins a un 20% dels llocs i les aniòniques monovalents (Y) fins al 100%. Ambdós tipus de llacunes poden existir en el mateix compost.

En general, les apatites biològiques poden ser definides com a apatites fosfocàlciques carbonatades més o menys llacunars, amb nombrosos elements menors que completen la seva fórmula química.

Les apatites òssies tenen funció de reserva d'ions minerals. Contenen el 99% del calci de l'organisme i el 85% del fósfor. A més, la seva capacitat per integrar nombrosos elements extén aquesta funció de reserva mineral (Mg, Na, K,...). Alguns elements tòxics també poden ser fixats en el mineral apatític de

l'os i la seva eliminació pot ser molt difícil (Pb, Ba, alguns elements radioactius com el ^{90}Sr).

La seva gran flexibilitat química i el fet que accepten moltes variacions estequiomètriques, han permès els fosfats de calci adaptar-se als diferents teixits: esmalt dentari, mineral ossi, espines dels peixos i, a l'interior de les cèl.lules, grànuls minerals dels mitocondris.

La composició química de les apatites biològiques varia molt segons les espècies, els teixits analitzats, l'edat de l'individu, el règim alimentari,... Aquesta variabilitat és senyal d'una adaptabilitat extraordinària, única entre els biomaterials.

b) Mineralització dels teixits.

La mineralització d'un teixit viu pot ser descrita com un fenomen catastròfic, irreversible, generalment circumscrit a un espai ben definit limitat per membranes proteiques (Daculsi 1996). Els cristall d'esmalt dentari, per exemple, estan controlats per una proteïna que regula el seu creixement.

Els mateixos processos són utilitzats per la majoria dels organismes per generar i limitar el creixement dels seus teixits calcificats. L'apatita es pot trobar, com en l'os, estretament associada a una matriu orgànica formant un autèntic material composite amb propietats mecàniques extraordinàries si tenim en compte la seva baixa densitat ($2,3\text{g/cm}^3$ com a màxim per a l'os compacte i molt menys per a l'os esponjós).

L'ossificació requereix la formació d'una matriu orgànica de fibres de col.lagen. Les fibretes de col.lagen formades en el medi extracel.lular s'organitzen espontàniament formant una xarxa que delimita unes zones buides. Aquí és on s'inicia la calcificació. En general, s'admet que

determinades proteïnes, o bé entorns ben definits (ésters fosfatats de treonina o serina), afavoreixen la nucleació del mineral a l'interior mateix de les fibres. La mineralització s'extén llavors progressivament a l'espai interfibril·lar, i després a tot el teixit. Els mecanismes precisos d'aquest fenomen encara no són ben coneguts. La mineralització comporta un lleuger increment del diàmetre de les fibres i s'associa a una eliminació simultània d'aigua.

El fenomen de mineralització comença a l'interior de les fibres. Requereix un aport d'ions minerals i la formació de cristalls. Diverses proteïnes s'han relacionat amb aquest procés, bé sigui com a inhibidors del creixement cristal·lí bé sigui com a agents de nucleació. La inhibició del creixement es realitza per adsorció de les proteïnes a la superfície dels cristalls en creixement. És probable que els primers cristalls mobilitzin proteïnes inhibidores, amb un doble objectiu: permetre la cristal·lització dels llocs més allunyats i preservar les vies de difusió iònica a l'interior de la matriu de col·lagen.

L'activitat de les proteïnes està limitada per la seva baixa capacitat de difusió en comparació amb els ions minerals. Això es deu al petit tamany dels espais lliures que la matriu orgànica crea per a la calcificació.

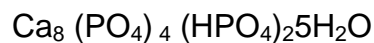
Existeixen també inhibidors iònics del creixement cristal·lí com són els ions carbonat, Mg o pirofosfat. Aquests ions poden difondre en els espais interfibril·lars i limitar el creixement dels cristalls d'apatita.

Tot el conjunt de processos d'ossificació està sota l'estret control dels osteoblasts, responsables de la formació del teixit ossi.

c) Les apatites, minerals evolutius.

Una de les principals característiques de les apatites, que les diferencia de tota la resta de biomaterials, és la seva capacitat d'evolució. La composició de les apatites no queda fixada en el moment de la seva formació.

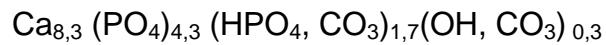
Els primers cristalls d'apatita que es formen en diferents sistemes biològics (esmalt dentari, os, cultius cel·lulars) tenen composicions i característiques estructurals sorprenentment semblants. Això justifica la hipòtesi d'un precursor comú. Aquests cristalls tenen una composició molt propera a la del fosfat octocàlcic (OCP):



Són rics en ions HPO_4 però mantenen una certa quantitat d'ions carbonat. En funció del teixit on creix, l'apatita evoluciona de forma molt diferent, i són aquestes vies de maduració les que li donen les seves característiques definitives. En l'os, els primers dipòsits minerals, molt inestables, evolucionen cap a la formació d'una apatita cada cop més carbonatada i millor cristal·litzada. No obstant, aquest fenomen de maduració és contínuament interromput per la dissolució completa del teixit i la seva neoformació. L'os manté contínuament un procés de "demolició-reconstrucció" per l'acció d'osteoclasts i osteoblasts.

Aquest fenomen s'enlenteix amb l'edat i el mineral té tendència a madurar durant més temps. Els mecanismes de regulació del procés de remodelació o renovació de l'os encara no són ben coneguts però sembla que la maduració de les apatites hi està implicada. En efecte, un mineral ossi massa ben cristal·litzat i poc reactiu no podria desenvolupar correctament les seves funcions.

Les modificacions en la composició mineral no afecten l'estequiometria del mineral. Es pot doncs representar el mineral ossi per la següent fórmula:



Amb l'edat, la proporció $\text{CO}_3 / \text{PO}_4$ augmenta, però el mineral segueix essent molt llacunar.

La maduració de l'esmalt dentari segueix una via diferent, amb major creixement de cristalls i menys llacunes. Això fa el material molt més estable i resistent a l'atac àcid.

El que hem exposat mostra l'adaptabilitat del mineral a la seva funció. L'os, com a teixit viu remodelable, reservori d'ions, està constituït per microcristalls llacunaris fàcils de dissoldre. En canvi, l'esmalt dentari, acel.lular, que ha de resistir les agressions externes (bacteris, aliments àcids,...) és una apatita pràcticament estequiomètrica, molt ben cristal.linitzada.

d) El problema del precursor mineral.

Les apatites fosfocàlciques tenen una velocitat de creixement de cristalls molt baixa i la seva formació in vitro està precedida per la precipitació d'una fase amorfa que evoluciona més o menys ràpidament cap a una apatita (Daculsi 1996).

Durant molt temps es va creure que el mineral ossi estava constituït, com els models sintètics, per una barreja de fase cristal.lina i fase amorfa. Actualment se sap que això no és cert, que la fase mineral és exclusivament apatítica microcristal.lina, amb nombrosos defectes. El problema de l'existència d'un precursor de la fase apatítica de vida curta ha estat objecte de nombrosos treballs de recerca . El precursor proposat és el fosfat octocàlcic (OCP), que té

la composició química més propera a la del mineral ossi. Efectivament, aquest mineral es forma sense problemes en medi aquós i pot hidrolitzar-se fàcilment donant lloc a apatites. La seva estructura també és molt propera a la de l'apatita i pot formar compostos mixtos amb capes intercalades d'apatita i OCP. No obstant, la presència d'OCP en els primers estadis de mineralització de l'os no ha pogut encara ser confirmada (Daculsi 1996).

e) Reactivitat de superfície.

Degut al seu escàs tamany, fins i tot després de la fase de maduració, els cristalls del mineral ossi presenten en conjunt una superfície considerable (uns 3 Km² de mitjana per a un adult). A més, tot i la seva estreta relació amb la matriu orgànica, els cristalls queden relativament accessibles i s'han observat in vivo diverses reaccions d'intercanvi. En animals en estat d'acidosi, per exemple, s'ha observat un alliberament immediat de carbonat amb l'objectiu de restablir el pH fisiològic. Els HPO₄ i els carbonats no apatítics residuals són intercanviables fàcilment i ràpida. La seva presència a la superfície dels cristalls suggereix una funció d'afavorir els intercanvis iònics amb els fluïds biològics.

A més de la matriu de col.lagen, nombroses proteïnes interaccionen a nivell de la superfícies del mineral. S'ha demostrat que les modificacions de la superfície comporten l'alliberament de proteïnes no col.lagèniques. Algunes d'aquestes proteïnes podrien tenir un paper important en la regulació del procés de remodelació òssia.

La reactivitat de la superfície del mineral depèn en gran mesura del grau de maduresa dels cristalls. Els intercanvis en superfície són molt més intensos si el grau de maduració de les apatites és baix. No obstant, els

equilibris dinàmics que impliquen el mineral de l'os encara no són ben coneguts.

f) Sensibilitat a malalties i alteracions metabòliques.

Degut a la seva capacitat d'evolució, el mineral ossi és extremadament sensible als desequilibris en processos implicats en la remodelació òssia (Daculsi 1996).

El dèficit de vitamina D, per exemple, que inhibeix el procés de remodelació, provoca que l'os sigui poc mineralitzat però amb una fracció mineral millor cristal·litzada i amb menys contingut no apatític que un os normal.

El dèficit de calci i de fosfat comporta igualment una calcificació imperfecta de la matriu orgànica, però en canvi el mineral és ric en elements no apatítics i sembla molt immadur, com si l'organisme creés i destruís os més ràpidament per pal·liar la deficiència d'ions minerals.

Els elements que tenen una especial afinitat per la fase apatítica de l'os també poden modificar les característiques d'aquesta. El fluor, per exemple, es fixa a la xarxa cristal·lina i condueix a la formació d'una apatita molt estable, amb elevat grau de cristal·lització i molt pobre en fases làbils. Aquest tipus de mineral és menys soluble i participa menys en els intercanvis iònics, a més de dificultar el procés de remodelació òssia. El fluor ha estat proposat com a tractament de l'osteoporosi, però encara que la seva administració fa augmentar la densitat òssia, no millora el comportament mecànic; els ossos segueixen essent fràgils. Això demostra clarament que el contingut mineral de l'os no és un factor determinant de les seves propietats mecàniques. Cal tenir

en compte també la superfície del material i la seva capacitat d'interacció amb l'entorn proteic.

Cal remarcar que alguns dels actuals tractaments de l'osteoporosi (per exemple, els difosfonats) tenen per objectiu afavorir la formació d'un mineral immadur. Les conseqüències de les modificacions del mineral sobre les propietats mecàniques i biològiques de l'os encara no són ben conegudes.

1.6.1.2.- Fosfats càlcics sintètics.

Els mètodes de preparació de ceràmiques de fosfat de calci reprenen les tècniques clàssiques dels ceramistes. L'operació de frittatge (De Groot 1983) consisteix en obtenir un sòlid a partir d'una pols primer comprimint-la (premsa, compressió isostàtica) i després sotmetent-la a elevades temperatures. Es produeix així la fusió parcial dels components i l'aglomeració dels microcristalls, que es formen en refredar-se i queden soldats per la pressió. Els intercanvis tèrmics, sobretot el refredament, impliquen canvis que poden fisurar el material. Les ceràmiques de fosfat càlcic, a diferència de les utilitzades en la indústria, romanen molt fràgils. Un altre problema derivat del sistema de preparació és la impossibilitat d'obtenir ceràmiques a partir de determinats fosfats de calci (canvi de fase degut a la temperatura). A més, no es poden associar molècules orgàniques degut a la seva sensibilitat tèrmica.

a) Propietats químiques de les ceràmiques de fosfat càlcic.

Hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Químicament, la hidroxiapatita (HA) és el fosfat de calci més proper als cristalls d'apatites biològiques. No obstant, la proporció Ca/P és 1'67, menor

que la d'una pols d'os, de dentina o d'esmalt dentari. Aquesta diferència és deguda a la no estequiometria de les apatites biològiques, que no respecten la fórmula química de la hidroxiapatita. Efectivament, en les apatites biològiques hi ha múltiples substitucions (CO_3^{2-} , Mg^{2+}) i "vacants" (Ca^{2+} , OH^-). Tots aquests fenòmens modifiquen el tamany i la forma dels cristalls, però sobretot les seves propietats de dissolució. Entre els biomaterials de fosfat càlcic, la hidroxiapatita és el menys soluble.

Fosfat β -tricàlcic: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

El β -TCP té una proporció Ca/P de 1,5. S'hi poden observar diferents substitucions. En particular, la substitució de certs àtoms per magnesi dona lloc a la formació de la witlockita. Els cristalls de witlockita existeixen in vivo en calcificacions patològiques. Com en el cas de la hidroxiapatita, les substitucions modifiquen les propietats de dissolució. El β -TCP pur és més soluble que la hidroxiapatita pura. S'admet en general que, tant in vivo com in vitro, el β -TCP és més degradable que la HA.

Tant la HA pura com el β -TCP pur són difícils de sintetitzar. Sovint s'hi barregen altres fases que podrien no ser biocompatibles. No obstant, la principal impuresa de la HA és el β -TCP, en una proporció de 1 a 10%. En canvi, altres materials són sintetitzats expressament fent una barreja de β -TCP i HA, són els compostos bifàsics.

Compostos bifàsics (β -TCP i HA).

Les barreges d'HA i β -TCP permeten associar les propietats físico-químiques de cada component. Aixó té l'avantatge de permetre la preparació

de biomaterials controlant la seva cinètica de reabsorció i adaptant-la per tant al procés de remodelació òssia (Daculsi 1996).

b) Propietats físiques de les ceràmiques de fosfat càlcic.

La síntesi dels fosfats de calci passa sempre per una fase d'escalfament a elevades temperatures. Cal distingir, però, la calcinació (escalfament a 800°C) del complex procés de creació de ceràmiques anomenat frittatge (950 - 1250°C). Les propietats químiques i mecàniques dels compostos varien molt segons el procés utilitzat (calcinació o frittatge) donat que un material dens no té les mateixes propietats que un de porós, i la porositat s'adquireix en les etapes d'escalfament.

Cal diferenciar dos tipus de porositat:

- microporositat (porus amb diàmetre $< 10 \mu\text{m}$). És deguda als espais existents entre els cristalls del biomaterial. Les altes pressions i les elevades temperatures minven molt la micro-porositat .

- macroporositat (porus amb diàmetre 100 - 500 μm). Aquests porus d'obtenen durant la calcinació per addició al fosfat càlcic d'aigua oxigenada, naftalè o un esquelet de cera, que desapareix amb la calcinació. Un cop eliminats aquests additius, romanen els porus del tamany desitjat, i poden ser colonitzats per cèl.lules dels teixits vius.

Les propietats químiques i físiques de les ceràmiques de fosfat càlcic determinen en gran mesura la seva bioactivitat. La biodegradació comporta la modificació de les propietats físico-químiques després de l'implant. Els mecanismes físics implicats són la desagregació, la pèrdua de propietats mecàniques i la modificació de la porositat. Quant a la química, es produeix la

dissolució, la formació d'altres fosfats càlcics i la transformació directa del fosfat càlcic implantat (Daculsi 1989). En aquests processos s'alliberen ions que podrien tenir efectes secundaris. La perfecta caracterització físico-química del material és imprescindible per considerar vàlids els resultats de qualsevol estudi experimental o clínic (Daculsi 1996).

c) Propietats biològiques de les ceràmiques de fosfat càlcic.

Les ceràmiques de fosfat de calci (hidroxiapatita, fosfat β -tricàlcic i compostos bifàsics) són bioactives i biodegradables. La velocitat de degradació és variable en funció del tipus de material i de la presentació, fet que cal tenir en compte a l'hora de la tria (pols, grànuls, blocs, material dens o macroporós, calcinat o fritat,...). Un material poc reabsorbible no ha de ser implantat en un lloc que requereix una remodelació òssia. O viceversa, un material de reabsorció ràpida no està indicat quan cal una estabilitat a llarg termini (implants dentaris). La cinètica de reabsorció dels compostos bifàsics és intermitja entre la de la hidroxiapatita (lenta) i la del fosfat β -tricàlcic (ràpida), i depèn de la proporció de cada un d'ells que contingui. Els compostos bifàsics que contenen un 60% d'hidroxiapatita i un 40% de fosfat de calci tenen una cinètica de reabsorció i d'osteoconducció molt propera a la de l'os humà adult (Daculsi 1996).

1.6.1.3.- Actualització bibliogràfica: ceràmiques de fosfat càlcic.

A continuació analitzem, a través dels treballs més rellevants publicats en els darrers anys, el coneixement actual en el camp de les ceràmiques de fosfat càlcic.

a) Propietats físico-químiques dels fosfats càlcics sintètics.

Alguns dels aspectes que més han preocupat els enginyers de materials els darrers anys són el procés de transformació dels fosfats càlcics en hidroxiapatita i la velocitat de degradació in vivo de les ceràmiques de fosfat càlcic, sovint més lenta del que seria desitjable.

Daculsi (1989) analitza el procés de degradació in vivo d'una ceràmica bifàsica de fosfat càlcic. Suggereix que es podria controlar la velocitat de reabsorció d'aquestes ceràmiques variant la proporció fosfat β -tricàlcic / hidroxiapatita de la barreja.

Brown (1991) analitza les reaccions químiques que permeten la formació d'hidroxiapatita deficient en calci (similar a la de l'os) a partir de fosfat tetracàlcic i fosfat dicàlcic.

Constantz (1991) patenta als Estats Units un producte, barreja de calci i fosfat, precursor de la hidroxiapatita.

Ishikawa (1994) estudia el procés de transformació del fosfat càlcic en hidroxiapatita no estequiomètrica en diferents solucions. El temps d'hidròlisi i el tamany dels cristalls d'hidroxiapatita que es formen depenen del pH de la solució.

Rey (1995) analitza en cultius d'osteoblasts les característiques físico-químiques dels cristalls de fosfat càlcic que es formen durant el procés de calcificació de la matriu extracel.lular.

La possibilitat de cimentar les endopròtesis articulars amb productes derivats dels fosfats càlcics també ha centrat l'interès de la recerca. **Mongiorgi** (1993) proposa afegir fosfat càlcic en pols al ciment de polimetilmetacrilat

(PMMA) per disminuir la magnitud de la reacció exotèrmica en el moment de la presa. Observa com l'addició al PMMA de fosfat alfa-tricàlcic fa que la temperatura assolida en el moment de la presa del ciment sigui de 58°C (enlloc dels 100°C del ciment de PMMA pur). Això fa disminuir la necrosi tisular. Dandurand (1990) proposa afegir fosfat càlcic al ciment de polimetilmetacrilat (PMMA), utilitzat per a la fixació d'endopròtesis, amb l'objectiu de millorar-ne la biocompatibilitat.

En el camp de la biomecànica, la baixa resistència de les ceràmiques de fosfat càlcic ha estat objecte d'estudi. **Zardiackas** (1994) compara en gossos els implants d'autoempelt ossi amb els d'un composite de col.lagen, hidroxiapatita i fosfat càlcic. L'estudi és biomecànic i no troba diferències significatives entre els dos grups un any després de la intervenció.

b) Propietats biològiques dels fosfats càlcics sintètics.

Un dels apartats de màxim interès és el del mecanisme d'osteointegració de les ceràmiques de fosfat càlcic. **Büsing** (1987) presenta un estudi histològic de la degradació d'una ceràmica de fosfat càlcic in vivo (en porcs). Observa com aquesta degradació es produeix gràcies als osteoclasts, en el context del procés de remodelació òssia.

Daculsi (1990) descriu la formació de cristalls d'apatita en implants de ceràmiques de fosfat càlcic. Afirma que la formació de cristalls d'apatita carbonatada en implants fora de l'os es deu al procés de dissolució-precipitació de la ceràmica de fosfat càlcic i a la seva posterior nucleació, i no a les propietats osteogèniques del material.

El mateix autor (Daculsi 1990) realitza implants de blocs de fosfat càlcic en gossos i estudia el procés de reabsorció i d'incorporació del material.

Brook (1991) analitza in vitro, en cultius cel.lulars, l'efecte de l'implant d'una ceràmica de fosfat tricàlcic i d'altres materials. Observa la colonització de la ceràmica de fosfat càlcic per osteoblasts que mantenen el seu fenotip.

Kotani (1991) observa el mecanisme d'enllaç directe entre el fosfat beta-tricàlcic i l'os del llit receptor.

Driessens (1992) estudia les reaccions químiques que produeixen les ceràmiques de fosfat càlcic implantades in vivo en porcs. En el cas dels implants de fosfat β -tricàlcic observa com es produeix la reabsorció parcial i el recobriment per os neoformat. L'anàlisi de la interfase os-implant mostra que es forma os nou directament a la superfícies del material implantat. Conclou per tant que aquests materials són osteoconductors.

Breitbart (1995) proposa l'associació de fosfat tricàlcic amb osteogenina, una proteïna amb capacitat d'osteoinducció. L'estudi es realitza amb conills de raça Nova Zelanda. En el grup que manté durant 6 mesos, observa una diferència estadísticament significativa entre els implants amb osteogenina i els implants de fosfat càlcic no tractats.

Wu (1992) observa que, en animals d'experimentació, els implants de BMP-fosfat càlcic indueixen una neoformació òssia més ràpida que els de BMP sola.

Gao (1995) estudia microscòpicament la interacció entre l'os i implants d'hidroxiapatita, fosfat tricàlcic i un vidre bioactiu. Una reacció amb os trabecular uniforme és observada en els implants de fosfat tricàlcic.

Hamson (1995) descriu la capacitat d'osteoconducció dels implants de fosfat càlcic-hidroxiapatita, amb o sense col.lagen. Obté, però, millors resultats histològics amb els implants d'autoempelt i al.loempelt ossis.

Okuda (1995) proposa afegir factor de creixement (TGF- β 1) als implants de fosfat β -tricàlcic. En rates obté major taxa de neoformació òssia que amb el fosfat càlcic sol.

St John (1995) compara en gossos els implants de col.lagen-hidroxiapatita-fosfat càlcic amb l'autoempelt ossi i amb un grup control no empeltat. Obté els millors resultats amb el material sintètic (un any després de la intervenció).

Kitsughi (1995) analitza amb microscopia electrònica la interfase entre l'os i les ceràmiques de fosfat càlcic, variant la proporció Ca / P. Destaca l'absència de solució de continuïtat entre l'os i el biomaterial.

Sasano (1995) realitza implants subperiòstics de fosfat octocàlcic en rates. Observa l'aparició de condrogènesi i osteogènesi en els implants a la tíbia però només osteogènesi en els implants en os parietal.

Hashimoto-Uoshima (1995) estudia en simis la substitució per os d'un compost bifàsic a base d'hidroxiapatita i fosfat tricàlcic. Confirma la capacitat d'osteoconducció del biomaterial.

Decker (1995) avalua les reaccions cel.lulars als implants d'una ceràmica de fosfat tricàlcic. L'anàlisi del procés de neoformació òssia li permet afirmar que l'origen dels osteoblasts (encara discutit) es troba en les cèl.lules endotelials dels vasos que penetren al defecte ossi.

Vicente (1996) realitza un estudi ultraestructural de l'osteointegració d'una ceràmica de fosfat tricàlcic en fèmurs de conills. Descriu la progressiva

degradació i reabsorció del biomaterial. La reacció macrofàgica és màxima a les 4 setmanes de l'implant. El material és substituït per os neoformat que apareix a la interfase.

Johnson (1996) analitza l'implant en gossos de tres materials: fosfat càlcic, hidroxiapatita i col.lagen-hidroxiapatita. Compara els resultats amb els de l'autoempelt esponjós. Aconsella afegir aspirat medul.lar als implants sintètics. Als 6 mesos només observa signes de biodegradació del material en els implants de fosfat càlcic.

Lu (1998) estudia l'efecte de l'implant de ceràmiques d'hidroxiapatita i fosfat tricàlcic en os cortical, os esponjós i medul.la. Conclou que per estudiar la bioactivitat dels biomaterials el millor és l'implant en teixit esponjós, per l'equilibri existent entre la biodegradació del material i l'activitat osteogènica. En canvi, per als estudis de biocompatibilitat in vivo és millor l'implant en regió medul.lar, perquè aquí les reaccions a cos estrany són més intenses i de major durada.

Dupraz (1998) mostra la integració directa, sense formació de càpsula fibrosa, d'una ceràmica injectable de fosfat càlcic. Descriu la biodegradació del material per fagocitosi per macròfags mononucleats i cèl.lules gegants multinucleades i per dissolució de les partícules.

Lin (1998) analitza els efectes biològics i la citotoxicitat d'un composite de fosfat tricàlcic i glutaraldehyd en cultius d'osteoblasts. Conclou que el comportament biològic d'aquest compost és millor que el del composite de fosfat càlcic amb formaldehyd amb què el compara.

Wang (1998) analitza l'implant d'una ceràmica bifàsica (70% hidroxiapatita + 30% fosfat tricàlcic) a nivell de la columna vertebral en animals

d'experimentació. Mitjançant microscopia electrònica i espectroscopia d'infrarojos, mostra la degradació del material i la formació d'os nou ja a les 4 setmanes de l'implant. Observa que el material es fusiona completament amb l'os natural sense interfase.

Laffargue (1999) afegeix proteïna òssia morfogenètica (BMP) a cilindres de fosfat càlcic i els implanta al còndil femoral de conills. Observa com el material resultant té capacitat d'osteoinducció i la formació d'os nou té relació directa amb la dosi de BMP afegida al fosfat càlcic.

S'han analitzat també les possibilitats d'utilització de ceràmiques de fosfat càlcic en el tractament de determinades patologies.

Witschger (1991) proposa la utilització d'un composite de fosfat tricàlcic, carbonat càlcic i polipropilè fumarat per millorar la fixació de fractures de coll femoral, en substitució del ciment de polimetilmetacrilat que s'utilitza habitualment.

Zerwekh (1992) utilitza, amb bons resultats, un composite de fosfat càlcic i col.lagen per a realitzar fusions espinals en gossos.

Nakajima (1995) utilitza, amb resultats satisfactoris, un composite d'hidroxiapatita i fosfat càlcic per a la reconstrucció de defectes craneals postquirúrgics.

Toth (1995) utilitza una ceràmica porosa de fosfat càlcic per a realitzar artrodesis cervicals intersomàtiques en animals d'experimentació. Utilitza tres materials amb diferent porositat (30, 50 i 70%). Obté millors resultats amb aquests materials que amb l'autoempelt ossi (major percentatge de fusió intersomàtica tant als 3 com als 6 mesos).

Gouin (1995) publica els resultats de l'implant d'una ceràmica bifàsica macroporosa de fosfat càlcic en 22 pacients per al tractament de defectes ossis causats per tumors i pseudoartrosis. Conclou que és un substitutiu ossi perfectament vàlid sempre que s'implanti en llocs amb bona estabilitat mecànica primària.

Les tècniques ja conegudes de recobriment d'implants amb ceràmiques de fosfat càlcic també han estat objecte de treballs de recerca en els darrers anys. **Tisdell** (1994) estudia l'efecte de la hidroxiapatita i el fosfat tricàlcic com a recobriment d'implants de Titani. Utilitza implants femorals en 55 conills. Realitza una anàlisi histològica i histomorfomètrica en 35 animals i biomecànica en la resta. Observa que els implants recoberts amb hidroxiapatita i fosfat càlcic són envoltats per os en un 44% del seu perímetre, contra un 12% en els implants no recoberts. La microscopia electrònica mostra una aposició directa d'os neoformat sobre els implants recoberts, i mai en els implants de Titani sol. La força necessària per a l'extracció dels implants també és superior en els recoberts en tots els períodes de temps analitzats (entre un i dotze mesos).

Caulier (1995) analitza a nivell histològic l'efecte dels recobriments de fosfat càlcic sobre l'os trabecular. L'estudi histomorfomètric mostra una major taxa d'aposició òssia en els implants amb recobriment.

Dean (1995) estudia l'efecte del recobriment d'implants de titani amb ceràmiques d'hidroxiapatita i fosfat càlcic. Els implants es realitzen en fèmurs de conills (en os esponjós i en situació intramedul·lar). Observa que el recobriment augmenta i accelera la formació d'os al voltant de l'implant. Amb microscopia electrònica observa la neoformació òssia directa, sense interfase, al voltant dels implants amb recobriment.

Ong (1995) estudia la resposta cel.lular a implants de Titani recoberts amb fosfat càlcic. L'anàlisi es realitza in vitro en cultius cel.lulars. Compara implants de Titani sol amb implants recoberts. Troba diferències en la quantitat de proteïnes però no en el nombre de cèl.lules presents en el medi.

Lind (1996) estudia en gossos la neoformació òssia que es produeix amb implants de titani recoberts amb fosfat tricàlcic i factor de creixement ossi (TGF- β). La taxa de neoformació òssia és superior a la del grup control (implants sense factor de creixement).

Denissen (1996) analitza els implants dentals amb diferents ceràmiques de fosfat càlcic i fluorapatita en gossos.

1.6.2.- Els ciments de fosfat càlcic.

1.6.2.1.- Introducció.

Les excel.lents propietats biològiques i de biocompatibilitat de les ceràmiques de fosfat càlcic són conegudes des de fa anys. La recerca contínua en el camp dels biomaterials fruit de la necessitat d'obtenir compostos amb característiques cada vegada millors ha portat a la introducció l'any 1983 dels ciments de fosfat càlcic.

La presentació de les ceràmiques de fosfat càlcic en forma de ciment té com a objectius principals aconseguir una fixació òptima al teixit (per la possibilitat d'amotllar-lo perfectament en el moment de l'implant) i millorar l'estabilitat inicial (propietats mecàniques molt superiors a les de les altres formes de presentació de les ceràmiques fosfocàlciques) (Driessens 1998).

Aquestes noves característiques permeten ampliar molt les possibles aplicacions mèdiques d'aquest biomaterial, ja que el fan apte no només per al farcit de cavitats òssies, sinó també per millorar l'osteosíntesi de fractures o evitar desplaçaments secundaris així com per a la fixació d'endopròtesis articulars.

Un altre punt d'interès és la possibilitat d'injectar percutàniament el ciment, fet que podria evitar alguns actes quirúrgics.

1.6.2.2.- Característiques físico-químiques dels ciments de fosfat càlcic.

a) Preparació del ciment.

La preparació del ciment de fosfat càlcic és semblant a la del guix. En aquest, el component inicial (sulfat càlcic hemihidratat) té una elevada solubilitat en aigua. En afegir aigua, primer es dissol i després la solució aquosa esdevé supersaturada amb sulfat càlcic dihidratat, que precipita. La reacció acaba quan tot el sulfat càlcic hemihidratat es transforma en dihidratat. La principal diferència entre el guix i el ciment de fosfat càlcic és la composició química de la fase en pols. La resta del procés és semblant al del guix, amb una diferència fonamental; el producte final del ciment de fosfat càlcic conserva la seva solidesa si entra de nou en contacte amb aigua (Ginebra 1997).

b) Composició química dels ciments de fosfat càlcic.

S'ha demostrat que els pirofosfats i els metafosfats són hidrolitzats en els fluids corporals i per tant només els ortofosfats són útils per a la seva utilització en forma de ciment (Driessens 1993). A més, elevades

concentracions de ions pirofosfats o metafosfats en els fluids biològics poden generar calcificacions extraòssies.

Els fosfats càlcics que poden precipitar en solucions aquoses amb un pH entre 4 i 9 i a temperatura ambient o corporal són els següents: fosfat dicàlcic dihidratat, fosfat octocàlcic, hidroxiapatita deficient en calci i hidroxiapatita precipitada. El precursor mineral de la matriu òssia és l'octofosfat càlcic. Aquest mineral no és estable en els fluids extracel·lulars i es transforma espontàniament en una barreja d'apatita que conté magnesi, sodi i carbonat i hidroxiapatita carbonatada. Durant la remodelació òssia, els osteoclasts destrueixen l'os vell, inclosa la fase mineral, i posteriorment els osteoblasts creen nova matriu òssia induint la formació de nou fosfat octocàlcic. Això descriu el constant reciclatge de l'os viu.

c) Propietats físiques dels ciments de fosfat càlcic.

En general, el **temps de presa** dels ciments de fosfat càlcic depèn de (Driessens 1995):

- la composició química de la pols i el líquid.
- proporció entre fase sòlida (pols) i fase líquida en els components inicials.
- la granulometria de la fase en pols.
- pH.
- utilització d'additius:
 - el temps de presa dels ciments de fosfat càlcic disminueix en afegir a la pols inicial una quantitat d'hidroxiapatita precipitada com a llavor.

- la utilització d'una solució aquosa de fosfat sòdic com a fase líquida dels components inicials també accelera el temps de presa del ciment.

En alguns ciments de fosfat càlcic, durant la presa es produeix una reacció exotèrmica que implica un augment de temperatura d'aproximadament 1°C. Aquesta variació és molt menor que la que genera el clàssic ciment de PMMA (polimetilmetacrilat), que pot assolir temperatures superiors als 90°C.

Quant a les **propietats mecàniques**, cal remarcar que la resistència a la compressió depèn de diversos factors (Driessens 1993):

- la composició química de la fase en pols i de la fase líquida del ciment.

- la mida de les partícules dels components de la pols de ciment.

- la quantitat i morfologia del material afegit com a llavor. La resistència a la compressió és molt major si els cristalls d'hidroxiapatita precipitada que s'afegeixen són petits que si són grans.

- la relació líquid/pols del ciment. En general, la resistència és superior si l'esmentada proporció és baixa, però la quantitat de líquid ha de ser suficient per a permetre que la barreja sigui homogènia.

- la porositat del material. És un dels factors més importants. Existeix una relació exponencial entre la resistència a la tracció diametral i la porositat del ciment (Ishikawa 1995). En el material amb porositat igual a zero, la resistència a la tracció diametral seria de 103 MPa. En canvi, el valor obtingut per al ciment està al voltant dels 10 MPa. No obstant, cal tenir en compte que l'elevada porositat del material afavoreix molt el seu comportament biològic.

- l'estabilitat química del ciment durant el seu emmagatzemament i la seva esterilització.

Un dels avantatges importants del ciment de fosfat càlcic és el fet de ser fàcilment moldejable intraoperatoriament. Després de barrejar els components, s'obté una pasta homogènia en aproximadament 1 minut. Llavors es col·loca la quantitat desitjada de ciment al lloc operatori i se li dóna la forma adequada. Durant aquest temps es pot deformar el ciment sense alterar la seva microestructura. Si es vol injectar el ciment, convé que la pasta sigui més fluïda i que el temps inicial de presa sigui més llarg. Un cop col·locat i moldejat el material, convé que el ciment assoleixi la presa final tan aviat com sigui possible. Després d'això es pot tancar la ferida sense risc que el contacte amb el material s'alteri la seva estructura (Ginebra 1997).

1.6.2.3.- Propietats biològiques dels ciments de fosfat càlcic.

Concepte d'osteotransducció.

El ciment de fosfat càlcic és un biomaterial que queda inclòs en el grup de les ceràmiques bioactives. Ja hem descrit les característiques generals d'aquest grup de biomaterials i les seves grans possibilitats pel que fa a la utilització en medicina (capítol 1.5.4.2.).

Donat que el fosfat càlcic implantat al teixit ossi no té cap efecte sistèmic, només cal valorar les reaccions tisulars i cel·lulars per determinar la biocompatibilitat del material. Els estudis de Gruninger (1984) realitzats in vitro i in vivo no van observar cap efecte mutagènic del material. Sugawara (1990) va estudiar la biocompatibilitat del ciment amb implants subcutanis en rates. Va observar una molt lleu reacció inflamatòria al voltant dels implants de ciment,

igual que la produïda pels implants d'hidroxiapatita que va fer servir com a control.

Un cop establerta la diferència entre ceràmiques bioinerts i bioactives, cal aprofundir en les possibilitats d'interacció entre aquests materials i el teixit viu. Així, es poden definir quatre **tipus de fixació bioceràmica-teixit** (Proubasta 1997):

- **fixació morfològica**: Les ceràmiques denses, no poroses i gairebé inerts es fixen per creixement de l'os en les irregularitats de la seva superfície. Com a exemple podem citar l'alúmina.

- **fixació biològica**: En implants porosos inerts es produeix la colonització per creixement ossi a l'interior del material. Són exemples l'alúmina porosa i els metalls recoberts per hidroxiapatita.

- **fixació bioactiva**: Les ceràmiques, vidres i vitroceràmiques de superfície reactiva, denses i no poroses, es fixen directament establint enllaços químics amb l'os.

- **fixació biològica i bioactiva amb materials biodegradables**: Les ceràmiques reabsorbibles, denses i poroses o no poroses estan dissenyades per a ser lentament substituïdes per os. En són exemples el sulfat de calci, el fosfat tricàlcic i les sals de fosfats de calci.

El nivell de reactivitat d'un implant depèn en part del gruix de la capa interfacial. La fallida dels implants sol tenir lloc a nivell de la interfase material-teixit. Si el material és gairebé inert i no realitza cap enllaç químic (**fixació morfològica**), hi ha un moviment relatiu entre el material i l'os i això comporta la formació d'una càpsula fibrosa no adherent. El gruix d'aquesta càpsula depèn del tipus de material i de la magnitud del moviment relatiu. La capa de

teixit fibrós que es forma amb implants d'alúmina densa en condicions de càrrega mecànica pot ser molt prima i això ha permès el seu èxit en implants protèsics. En canvi, si un material de fixació morfològica, gairebé inert, rep càrregues que provoquen moviment interfacial, la càpsula fibrosa pot assolir un gruix de fins a 100 μm i l'implant s'afluixa ràpidament.

El concepte de **fixació biològica** que afecta les ceràmiques poroses inerts es basa en el creixement de teixit ossi als porus de la superfície o de tot l'implant. L'augment de superfície interfacial entre implant i teixit comporta una major resistència al moviment relatiu. L'os colonitza els porus de la bioceràmica. Aquest tipus de fixació pot suportar estats tensionals més complexos que la fixació morfològica. La limitació que imposa la fixació biològica és que, per permetre que el teixit colonitzador es mantingui sà i viable, cal que els porus tinguin un diàmetre mínim de 100 a 150 μm . Aquest tamany assegura la correcta vascularització del teixit connectiu en creixement. L'existència a nivell de la interfase de moviments relatius que lesionen la vascularització pot conduir a la fallida de l'implant. El problema inherent a la fixació biològica de les bioceràmiques és que l'elevada porositat necessària comporta un afebliment molt notable de les seves propietats mecàniques.

En la **fixació bioactiva**, el material promou una resposta biològica específica que permet la formació d'enllaços químics amb els teixits. S'inclouen en aquest apartat un gran nombre de biomaterials, amb un ampli espectre de taxes d'enllaç i de gruix de la capa d'enllaç interfacial. El temps i el mecanisme de formació dels enllaços i la resistència d'aquests varien molt en funció del material analitzat.

Actualment es considera que el sistema òptim és la **fixació biològica i bioactiva amb materials biodegradables**, és a dir, quan es combinen la colonització del material per teixit neoformat, la formació d'enllaços químics entre el material i el teixit i, finalment, la lenta i progressiva degradació del biomaterial. El resultat és que el gruix de la interfase és mínim o gairebé inexistent.

Els problemes que presenta el desenvolupament de bioceràmiques reabsorbibles són (Daculsi 1996):

- mantenir la resistència i estabilitat de la interfase durant el període de degradació del material i de substitució per teixit natural de l'hoste.

- equilibrar les taxes de reabsorció del biomaterial i de reparació, que poden ser molt diferents.

El pas següent és, per tant, aconseguir un biomaterial que compleixi les característiques descrites però a més entri a formar part directament del procés de neoformació òssia. Això s'aconsegueix si la degradació del material només és possible de forma activa, és a dir, amb la participació directa i necessària de les cèl.lules osteoclàstiques. Aquest és el **concepte de l'osteotransducció**, que podem definir com la **fixació biològica i bioactiva d'un material amb biodegradabilitat selectiva (només activa) i biotransformació** (Driessens 1998). L'osteotransducció és el procés de fixació del material que estudiem, el Biociment-H, ciment de fosfat tricàlcic. El material és porós, fet que permet la fixació biològica (colonització per os). A més, és selectivament biodegradable, ja que aquest procés només és possible a l'interior de l'os i amb participació directa de cèl.lules osteoclàstiques. Els implants subcutanis o intramusculars de fosfat tricàlcic no són degradats.

Un altre fet de màxima rellevància és que els productes de degradació dels material, no només no són tòxics, sinó que aporten elements (calci i fósfor) necessaris per al procés de neoformació òssia per part dels osteoblasts. Així doncs, en realitat el material no és degradat sinó que pateix una veritable transformació a l'interior del teixit ossi. Això millora també el problema d'adaptar les velocitats de degradació del material i de neoformació òssia, donat que en el cas del fosfat tricàlcic no es tracta de dos mecanismes diferents sinó d'un sol procés. És l'**osteotransducció**.

La presentació del material en forma de ciment permet resoldre el segon dels problemes plantejats, és a dir, el de mantenir la resistència i estabilitat de la interfase durant el període de substitució del material per os neofomat (fixació primària).

El mecanisme íntim de l'osteotransducció, vàlid només per als biomaterials de fosfat càlcic, s'ha descrit de la següent manera (Daculsi 1994 i 1996). Durant els primers dies d'implantació, la cicatrització de la regió afectada s'acompanya d'una "neteja" de la superfície de l'implant, que elimina partícules i cèl.lules mortes. Aquesta neteja la realitzen els macròfags per fagocitosi. Posteriorment s'inicia la biodegradació del material per fagocitosi i per dissolució extracel.lular. Aquests mecanismes associen l'acció dels macròfags a la d'altres cèl.lules. Existeix una pseudofagocitosi per fibroblasts que comencen a penetrar a l'interior de la ceràmica. Simultàniament, la solució present entre els cristalls de l'implant s'enriqueix en ions de calci i de fósfor, alliberats per la dissolució d'alguns d'aquests cristalls. En aquest moment es pot produir una precipitació cristal.lina a la superfície i entre els grànuls de l'implant. Aquesta precipitació té lloc en un medi ric en proteïnes i condueix a la

formació de cristalls d'apatites biològiques idèntics als de l'os (Daculsi 1990). La precipitació modifica les propietats mecàniques de l'implant (Trecant 1994). Aquesta calcificació no es produeix necessàriament sobre una matriu col·làgena altament diferenciada com la matriu òssia, sinó sobre una matriu extracel·lular encara indiferenciada. No es tracta doncs d'una ossificació sinó d'una calcificació de la matriu extracel·lular. Si l'acció cel·lular fa que la reabsorció del material sigui massa ràpida, l'osteointegració no serà possible. En canvi, si la reabsorció és massa lenta, el material queda envoltat per microcristalls d'apatites biològiques. Posteriorment, l'osteointegració continua per osteogènesi al voltant i a l'interior dels porus de l'implant. Un os viu neofomat, amb osteòcits i matriu extracel·lular mineralitzada, apareix entre els grànuls del biomaterial. Aquí s'ha pogut observar el procés de remodelació òssia amb el cicle reabsorció-aposició d'os, igual que en l'os sà. Això implica l'existència d'una interfase dinàmica (anomenada de coalescència) on es relacionen directament els cristalls de síntesi de l'implant amb els cristalls biològics que es van dipositant a la matriu extracel·lular (Daculsi 1996).

Els mecanismes de degradació del biomaterial i de calcificació de la matriu extracel·lular estan controlats per processos d'interacció proteïnes / cristalls. Aquests processos poden variar la taxa de reabsorció de l'implant variant el pH o bé modificant l'acció de les cèl·lules implicades (macròfags, osteoclasts, "ceramoclasts", fibroblasts i osteoblasts).

Aquest procés també s'ha pogut demostrar amb l'anàlisi de la fixació d'elements protèsics recoberts amb hidroxiapatita (Soballe 1993).

1.6.2.4.- Avantatges sobre altres biomaterials.

Dels conceptes explicats es desprèn que ens trobem front a un biomaterial que reuneix un gran nombre de característiques que el situen entre els millors dels que disposem actualment. Podríem resumir els avantatges del ciment de fostat càlcic front als empelts i a altres biomaterials en els següents punts:

- en ser un material sintètic el risc de transmissió de malalties infeccioses és nul.

- la quantitat de material és il.limitada.

- menor morbiditat quirúrgica ja que evita una cirurgia addicional per a l'obtenció d'empelt.

- el material és biodegradable i la seva desaparició evita possibles efectes indesitjats a llarg termini (intolerància, toxicitat,...).

- les característiques del material poden permetre la seva utilització com a vehicle d'altres substàncies (factors de creixement ossi, antibiòtics, ...). (Veure sistemes DDS en el capítol 1.7.2.4).

- en ser un ciment, es pot moldejar intraoperatòriament per obtenir la forma necessària per substituir el defecte ossi. La presa del ciment in situ permet obtenir una bona fixació, evitant així els problemes de migració del material que s'havien observat amb altres formes (grànuls, ...). Aquesta propietat de moldejat permet obtenir també una bona aposició entre el ciment i l'os. Se sap que l'existència d'un gap superior a 10 µm entre l'implant i l'os impedeix el creixement d'aquest.

- la presa del ciment comporta una reacció química exotèrmica amb un augment de temperatura de només 1°C, fet que evita la lesió del teixit receptor

(el ciment de polimetilmetacrilat emprat habitualment en la fixació de pròtesis articulars arriba a una temperatura de 70 a 90°C durant la presa).

- modificant convenientment les variables del processat del ciment, es pot obtenir un material amb una fluïdesa inicial suficient per a què sigui injectable de forma percutània a l'interior d'un focus de fractura o d'una cavitat òssia.

- aporta estabilitat inicial al defecte ossi substituït (és un ciment). A més, les seves propietats mecàniques són molt més properes a les de l'os que les dels metalls utilitzats en osteosíntesi o les dels ciments acrílics emprats en la fixació de pròtesis.

- pel que fa a la possibilitat de cimentar endopròtesis de substitució articular, el fet de ser un material biodegradable facilitaria molt el recanvi de la pròtesi quan aquest fos necessari.

En el disseny d'un ciment pensat per a la pràctica quirúrgica cal complir una sèrie de requisits generals (Driessens 1998):

- absència de toxicitat.
- absència d'efectes exotèrmics durant la reacció de presa.
- capacitat de presa en contacte amb els fluïds corporals.
- temps de presa i d'enduriment raonables.
- absència de contracció del volum durant la reacció de presa.
- assoliment d'una resistència mecànica apropiada.
- bioactivitat.

1.6.2.5.- Actualització bibliogràfica: ciment de fosfat càlcic.

El conjunt de teòrics avantatges que hem descrit en el capítol precedent ha fet proliferar els estudis al voltant del ciment de fosfat càlcic.

S'han estudiat les formulacions químiques, les propietats físiques i mecàniques, els efectes de possibles additius, la biocompatibilitat del material i també l'acció biològica. Fins i tot han aparegut alguns estudis clínics utilitzant ciment de fosfat càlcic, sobretot en els camps de l'odontologia i la cirurgia maxil·lofacial, però també en el camp de la cirurgia de l'aparell locomotor.

Analitzem a continuació les diverses àrees en què s'ha centrat en els darrers anys la recerca en el camp del ciment de fosfat càlcic.

a) Formulació química.

Driessens (1993), del Departament de Ciències dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, analitza 100 formulacions possibles de ciments d'ortofosfat càlcic, tot estudiant l'efecte de diferents additius utilitzats com a acceleradors o retardants de les reaccions de presa del ciment.

Bermúdez (1994) descriu el procés de síntesi d'un ciment de fosfat càlcic a partir de fosfat càlcic alfa-terciari, fosfat monocàlcic monohidratat i òxid càlcic. L'estudi pretén optimitzar les formulacions químiques del ciment de fosfat càlcic.

El mateix autor (1994) descriu el desenvolupament d'un ciment de fosfat càlcic α -terciari i fosfat dicàlcic. L'òptima relació molar Ca /P és de 1,36 +/- 0,03. Utilitza una relació líquid / pols de 0,30 ml/g. Observa que l'addició d'un 2% d'hidroxiapatita precipitada disminueix notablement el temps de presa del ciment (de 27,5 a 10 minuts) i afecta poc la resistència mecànica del material (resistència a la compressió de 30 +/- 5 MPa).

De nou **Bermúdez** (1994) estudia diferents materials (α -TCP i fosfat monocàlcic monohidratat) que permeten la síntesi de ciments de fosfat càlcic. Analitza el temps de presa i la resistència mecànica de diversos ciments. Creu necessari fer estudis experimentals per avaluar les possibilitats mecàniques dels ciments de fosfat càlcic quant a la fixació d'endopròtesis en cirurgia ortopèdica.

El mateix autor (1994) descriu el desenvolupament a nivell físico-químic d'un ciment de fosfat octocàlcic. Estudia les proporcions òptimes de components, la relació pols/líquid, els additius, ... per tal d'aconseguir un ciment amb un temps de presa curt i una resistència mecànica elevada. Amb una relació Ca/P de 1'36, un 2% d'hidroxiapatita precipitada i una relació líquid/pols de 0'30 g/g, aconsegueixen una resistència a la compressió de 30 MPa i uns temps de presa inicial i final de 10 i 40 minuts respectivament.

L'any 1995, la Dra. **Ginebra**, del Departament de Ciències dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, presenta a San Francisco (USA), al XXI Congrés de la Societat de Biomaterials, les propietats del Biociment H, el material que hem utilitzat en aquest treball.

Driessens (1995), del mateix Departament, descriu les combinacions químiques de Ca i P que poden donar lloc a ciments, així com els diferents factors que poden accelerar o retardar les reaccions de presa del ciment.

Ginebra (1997) analitza la reacció de presa del ciment de fosfat càlcic. Observa que abans de 24 hores, un 80% del fosfat α -tricàlcic es converteix en hidroxiapatita deficient en calci.

Fernández (1998) estudia, amb un sistema de difracció de raigs X, la reacció de presa dels ciments de fosfat càlcic variant la proporció Ca / P.

Ishikawa (1999) estudia la reacció de presa i la composició final de diversos ciments de fosfat càlcic amb diferents proporcions de fosfat tetracàlcic i fosfat dicàlcic anhidric. Una proporció igual d'ambdós components en la barreja és la que permet obtenir la major resistència mecànica del ciment resultant.

b) Propietats físiques i mecàniques.

Chow (1992) afirma que els ciments de fosfat càlcic amb millors propietats mecàniques i biològiques són els formats per fosfat tetracàlcic i fosfat dicàlcic. Descriu com a principal problema dels ciments de fosfat càlcic les seves pobres propietats biomecàniques, i com a millors virtuts la seva excel·lent biocompatibilitat, la possibilitat de moldejar-lo intraoperatòriament per adaptar-lo al defecte ossi i la seva biodegradabilitat.

Lemaitre (1992) descriu la preparació i les propietats mecàniques de dos tipus de ciment de fosfat càlcic. Observa com el temps de presa i la resistència mecànica dels ciments varien molt en funció de la composició i dels additius.

Bermúdez (1993) estudia el comportament mecànic de 100 formulacions diferents de ciments de fosfat càlcic. Avalua els canvis de resistència mecànica dels diferents ciments en funció de la seva composició, de la relació pols/líquid i de la presència o no de diversos additius. Observa que almenys 15 combinacions diferents de reactius permeten preparar el ciment amb aigua i a temperatura ambient. Obté valors de fins a 68 MPa per la

resistència a la compressió del material. Precisa que aquest valor és insuficient per a aplicacions quirúrgiques que impliquen sol·licitacions mecàniques importants.

Otsuka (1993) observa la influència del tamany de les partícules de fosfat càlcic en el ciment sobre la taxa de transformació en hidroxiapatita i sobre la resistència mecànica del material.

Ginebra (1994) destaca l'absència de reacció exotèrmica durant la reacció de presa del ciment i l'assoliment d'una resistència mecànica a la compressió de 40 MPa.

Driessens (1994) estudia 450 possibles combinacions químiques per a la formació de ciments de fosfat càlcic. Observa que només 15 combinacions permeten obtenir ciment amb un temps final de presa inferior a 60 minuts i una resistència a la compressió superior a 2 MPa. D'aquestes, només 6 mantenen un pH neutre durant la reacció de presa.

Fernández (1995) compara les reaccions físico-químiques durant la presa dels ciments de fosfat càlcic i dels ciments de polimetilmetacrilat (PMMA). Cita com a avantatges del ciment de fosfat càlcic una reacció exotèrmica mínima (que evita la necrosi de l'os circumdant) i una major estabilitat dimensional durant la presa, així com l'absència de teixit fibrós en la interfase.

Ginebra (1995) avalua els efectes de la temperatura sobre la velocitat de presa del ciment de fosfat càlcic. En augmentar la temperatura de 22 a 37°C, el temps de presa del ciment es redueix un 30%. La resistència a la compressió també és superior a aquesta temperatura, i la microestructura del material és més homogènia.

Ishikawa (1995) estudia la resistència mecànica i la porositat crítica del ciment de fosfat càlcic (paràmetres que tenen una relació inversa). Conclou que els valors òptims són una resistència a la tensió de 102 MPa i una porositat del 63%.

Miyamoto (1995) estudia in vivo (en rates) un nou ciment de fosfat càlcic amb temps de presa ràpid (5-7 minuts). Observa que millora la resistència mecànica del ciment en les primeres fases després de l'implant.

Otsuka (1995) mostra que les partícules de petit tamany del ciment de fosfat dicàlcic dihidratat i de fosfat tetracàlcic es transformen completament en hidroxiapatita. Amb les partícules grans, en canvi, la transformació no és completa. El tamany de les partícules influeix també en la resistència mecànica del ciment.

c) Efecte dels additius.

Mirtchi (1989) estudia l'efecte de diversos additius sobre el ciment de fosfat càlcic. Obté els millors resultats quant a la resistència mecànica final afegint alhora sulfat càlcic dihidratat i pirofosfat càlcic. Els additius, però, provoquen un retard en el temps de presa del ciment.

El mateix autor (1991) descriu l'efecte de la utilització de fluor com a additiu en la composició del ciment de fosfat càlcic. L'additiu accelera el temps de presa i millora la resistència mecànica del ciment.

Miyazaki (1993) estudia els efectes de diversos additius (fosfat sòdic, fluor, zirconi, àcid tartàric,...) sobre el temps de presa i la resistència mecànica del ciment de fosfat càlcic.

El mateix autor (Miyazaki 1993) avalua les propietats químiques i mecàniques del ciment de fosfat càlcic amb diferents polímers (polivinil alcohol, àcid poliacrílic...).

Dickens-Venz (1994) estudia in vitro la combinació del ciment de fosfat càlcic amb resines polimeritzables. Valora les reaccions de presa del ciment i la resistència mecànica.

Ginebra (1995) estudia l'efecte de diversos additius sobre les propietats del ciment de fosfat càlcic. L'addició de carbonat, pirofosfat o sals de magnesi al ciment retarda o fins i tot inhibeix la reacció de presa. En canvi, l'addició de fosfat sòdic accelera la reacció de presa del ciment, si bé redueix la resistència mecànica a la compressió. La presència de pirofosfat càlcic o d'hidroxiapatita no afecta les propietats del ciment.

Ishikawa (1995) observa que la utilització d'un additiu amb sodi en el ciment de fosfat càlcic millora les propietats mecàniques del ciment i pot ser aconsellable quan aquest és exposat al contacte amb la sang.

Fernández (1996) destaca la importància d'afegir al ciment de fosfat càlcic un additiu accelerador de la reacció de presa per facilitar l'aplicació quirúrgica del material i evitar alteracions de les seves propietats físico-químiques durant l'implant.

Khairoun (1997) estudia l'efecte de l'addició de carbonat càlcic al ciment de fosfat càlcic. Aconsella la utilització d'aquest additiu quan és inevitable un contacte ràpid amb la sang.

Fernández (1998) estudia les propietats mecàniques i la microestructura del ciment de fosfat càlcic afegint carbonat càlcic com a additiu, amb l'objectiu d'obtenir un biomaterial més semblant a les apatites biològiques.

Observa que l'additiu millora fins a un 40% la resistència a la compressió del material.

Dos Santos (1999) analitza l'efecte dels additius polimèrics sobre les propietats mecàniques del fosfat alfa-tricàlcic. Empren com a additius alginat sòdic, poliàcrilat sòdic i un hidrogel de poliàcrilamida. Observen com aquests additius milloren la resistència mecànica final del ciment de fosfat càlcic.

Leroux (1999) estudia l'efecte de diversos additius sobre el ciment de fosfat càlcic amb l'objectiu d'obtenir un material injectable percutàniament. Veu com és possible aconseguir aquest material sense alterar les propietats físiques i biològiques del ciment de fosfat càlcic.

Khairoun (1999) proposa afegir al ciment de fosfat càlcic substàncies promotores de la cohesió per evitar la desintegració del material quan entra en contacte amb la sang o altres fluïds corporals.

d) Biocompatibilitat del material.

Chohayeb (1987) utilitza un ciment de fosfat càlcic barrejat amb glicerina i àcid fosfòric per a aplicacions d'odontologia en gossos. Observa l'aparició d'una reacció inflamatòria lleu i la capacitat del ciment d'adaptar-se homogèniament a la superfície de la dentina.

Chow (1991) descriu la formació d'un ciment de fosfat càlcic a base de fosfat tetracàlcic i fosfat dicàlcic anhidric o bé fosfat dicàlcic dihidratat. Observa la transformació del material en hidroxiapatita, la seva excel·lent biocompatibilitat, la seva biodegradabilitat i la seva capacitat d'osteoconducció i no d'osteogènesi. Destaca que el ciment de fosfat càlcic té unes propietats mecàniques més pobres que les ceràmiques (degut a la major porositat), però

en canvi és un material fàcilment moldejable, reabsorbible i amb excel·lent biocompatibilitat.

Hong (1991) analitza la reacció del teixit periapical dentari (en simis) a l'implant de ciment de fosfat càlcic. Observa una reacció inflamatòria mínima.

Costantino (1991) descriu les propietats químiques del ciment de fosfat càlcic i la resposta histològica al seu implant en gats. Realitza implants subcutanis, intramusculars i ossis. Observa que no es produeix cap efecte tòxic. En teixits tous apareix una reacció a cos estrany.

Chow (1992) afirma que els ciments de fosfat càlcic amb millors propietats mecàniques i biològiques són els formats per fosfat tetracàlcic i fosfat dicàlcic. Descriu com a millors virtuts la seva excel·lent biocompatibilitat, la possibilitat de moldejar-lo intraoperatòriament per adaptar-lo al defecte ossi i la seva biodegradabilitat.

Sugawara (1992) descriu les reaccions histopatològiques al ciment de fosfat càlcic. Realitza implants subcutanis en rates i observa la bona biocompatibilitat del material (només apareix una molt lleu reacció inflamatòria amb alguns limfòcits i cèl·lules plasmàtiques).

Yoshimine (1993) avalua la biocompatibilitat del ciment de fosfat càlcic emprat com a substitutiu ossi. Estudia els efectes de l'implant del ciment als 3, 10 i 30 dies amb microscopia òptica i electrònica. Observa l'aparició d'una lleu reacció inflamatòria i, als 30 dies, la presència d'os neofomat al voltant de l'implant.

Driessens (1994) observa, en estudis in vitro, que la toxicitat cel·lular dels ciments de fosfat càlcic depèn del pH, i que la biocompatibilitat d'aquests materials és òptima a pH fisiològic.

Liu (1997) realitza estudis de biocompatibilitat amb el ciment de fosfat càlcic. Totes les anàlisis de toxicitat, mutagenicitat i carcinogènesi són negatives. Els implants en el fèmur de conills generen una molt feble reacció inflamatòria de l'hoste.

Miyamoto (1997) realitza implants de ciment de fosfat càlcic de presa ràpida en túbies de rates. Conclou que el material té una excel·lent biocompatibilitat.

Miyamoto (1999) realitza implants subcutanis en rates de diferents tipus de ciment de fosfat càlcic. Una setmana després analitza la reacció inflamatòria al voltant de l'implant. Recomana l'ús de ciments de presa ràpida, perquè la reacció inflamatòria és mínima.

e) Enllaç a l'os.

Hong (1991) analitza la reacció del teixit periapical dentari (en simis) a l'implant de ciment de fosfat càlcic. Observa la formació de teixit ossi nou adjacent al ciment.

Yoshimine (1993) estudia els efectes de l'implant del ciment als 3, 10 i 30 dies amb microscopia òptica i electrònica. Observa l'aparició d'una lleu reacció inflamatòria i, als 30 dies, la presència d'os neoformat al voltant de l'implant. L'estudi ultraestructural mostra que l'osteogènesi es produeix directament (sense interfase) a la superfície del material. Conclou que es tracta d'un material biocompatible i amb capacitat d'osteoconducció.

Fernández (1995) destaca l'absència de teixit fibrós en la interfase os-ciment de fosfat càlcic.

Yoshimine (1995) implanta un ciment de fosfat tetracàlcic en maxil·lars de rates. L'anàlisi ultraestructural mostra la formació d'os nou directament sobre el material (sense interfase).

El mateix autor (1996) analitza amb microscopia electrònica la interacció in vitro entre un ciment de fosfat tetracàlcic i cèl·lules osteogèniques. Observa la formació, a la perifèria del material, d'estructures nodulars tridimensionals cobertes per cèl·lules osteoblàstiques actives. Els nòduls contenen teixit mineralitzat molt semblant a l'os format in vivo. Les imatges de microscopia electrònica mostren el ciment de fosfat càlcic immediatament adjacent a processos citoplasmàtics de les cèl·lules. La mineralització de la matriu col·làgena extracel·lular té lloc directament a la superfície del biomaterial. Conclou que aquests resultats in vitro suggereixen que el ciment de fosfat càlcic participa directament en el procés de neoformació òssia.

Jansen (1996) realitza una anàlisi histològica i mecànica de l'efecte del ciment de fosfat càlcic en l'aposisió d'os. Observa l'absència de reacció inflamatòria i l'íntim contacte entre l'implant de ciment i l'os circumdant.

Vasconcelos (1996) realitza implants de ciment de fosfat càlcic a 8 conills, sacrificant-ne la meitat a les 4 setmanes i l'altra meitat a les 20 setmanes. Observa l'existència de contacte directe entre ciment i os i la progressiva substitució del ciment per os neofomat. Com a grup control utilitza l'implant de ciment de polimetilmetacrilat (PMMA), i confirma l'absència de contacte directe entre aquest material i l'os un mes després de l'implant.

Kurashina (1997) estudia l'implant de ciment de fosfat càlcic en defectes mandibulars de conills. Descriu la unió directa entre el ciment i l'os i la formació activa de teixit ossi nou.

Lu (1999) compara in vivo el ciment de fosfat càlcic amb un ciment de alfa-glicidil-bifenol metacrilat. Els implants es realitzen en el còndil femoral de conills. Observa l'enllaç directe, sense interfase, entre el ciment de fosfat càlcic i l'os.

f) Acció biològica.

Costantino (1991) descriu les propietats químiques del ciment de fosfat càlcic i la resposta histològica al seu implant en gats. Realitza implants subcutanis, intramusculars i ossis. En els implants ossis observa la substitució per os neoformat (osteoconducció + biodegradació).

El mateix autor (1992) utilitza un ciment de fosfat càlcic per a realitzar craneoplàsties en sis gats. Observa la reparació dels defectes ossis per combinació dels mecanismes d'osteoconducció i de biodegradabilitat del ciment de fosfat càlcic.

Shindo (1993) utilitza ciment de fosfat càlcic per a reconstruccions facials en 6 gossos. Realitza implants a la regió supraorbitària, en un costat directament i a l'altre amb una membrana col·làgena interposada. En el costat de l'implant lliure observa l'osteointegració del ciment i la progressiva substitució per os neoformat. En canvi, en els implants recoberts amb col·lagen, observa l'aparició d'una interfase fibrosa.

Ginebra (1994) apunta les possibilitats d'utilització clínica del ciment de fosfat càlcic en odontologia i en cirurgia ortopèdica, atesa la seva caracterització físico-química, la seva capacitat d'osteoconducció i l'absència d'efectes citotòxics.

Ishikawa (1994) estudia in vitro l'evolució del ciment de fosfat càlcic en

una solució semblant al plasma sanguini. Observa la formació de cristalls d'hidroxiapatita però no la dissolució del material. Suggereix que els implants de ciment de fosfat càlcic implantats in vivo no són dissolts en els fluids biològics.

Otsuka (1994) avalua la utilització del ciment de fosfat càlcic com a material DDS (drug delivery system) per a indometacina ⁽¹⁾, 6-mercaptopurina ⁽²⁾ i aspirina ⁽³⁾ en animals d'experimentació.

Kamerer (1994) proposa la utilització de ciment de fosfat càlcic per a la reconstrucció de defectes ossis postquirúrgics de base de crani i os temporal.

Constantz (1995) va publicar un article de gran ressó mundial descrivint la reparació esquelètica amb un material de fosfat càlcic injectable percutàniament. Apunta la possibilitat de millorar el resultat de les osteosíntesis gràcies a aquest material.

Driessens (1995) estudia in vivo (en rates) l'implant subcutani de tres tipus diferents de ciment de fosfat càlcic. Observa que la resistència del material a la compressió es manté inalterada passades 8 setmanes. Descriu els canvis químics que es produeixen després de l'implant i les propietats d'osteotransducció del material.

Fujikawa (1995) estudia les reaccions histopatològiques a l'implant de ciment de fosfat càlcic en defectes periodontals en gossos. Compara la capacitat d'osteoconducció del ciment de fosfat càlcic amb la d'un material d'hidroxiapatita. Observa que tres mesos després de l'implant, el ciment de fosfat càlcic ha estat parcialment substituït per os neoformat. Els implants d'hidroxiapatita obtenen resultats més pobres (apareix teixit connectiu a més del teixit ossi).

Jansen (1995) estudia l'implant d'un ciment de fosfat càlcic (85% α -TCP i 15% β -TCP) en animals d'experimentació. Crea 16 defectes ossis i compara el ciment amb un grup control sense implant. Observa que el ciment de fosfat càlcic no genera reacció inflamatòria. Mostra la reabsorció activa del ciment i la progressiva substitució per os neoformat. Als 6 mesos de l'implant, tot el ciment remanent està envoltat per os neoformat.

Pool (1995) resumeix per al gran públic, a la revista Science, el concepte del ciment de fosfat càlcic basant-se en l'evolució del Norians SRS descrit per Constantz. Explica que s'estan realitzant estudis clínics en 12 hospitals diferents dels Estats Units.

Bruijn (1996) demostra, en cultius cel·lulars, que els osteoclasts poden degradar el Biociment H, el ciment de fosfat càlcic que hem utilitzat en aquest treball.

Stankewich (1996) estudia en fèmurs de cadàver si la injecció de ciment de fosfat càlcic pot millorar la fixació amb cargols canulats de fractures del coll femoral. El resultat positiu li permet suggerir que el ciment de fosfat càlcic és capaç de millorar l'estabilitat inicial de l'osteosíntesi realitzada.

Hardouin (1996) planteja la possibilitat de tractar lesions vertebrals metastàsiques per injecció percutània de ciment de fosfat càlcic. El mateix autor (Hardouin 1996) destaca que la publicació en revistes no mèdiques de treballs sobre les possibilitats dels ciments de fosfat càlcic injectables no pot fer oblidar la necessitat d'estudis científics i assatjos clínics rigorosos.

Kopylov (1996) publica els primers resultats clínics amb el ciment anomenat Norian SRS. Injecta el material a 6 pacients amb fractures inestables de l'epífisi distal del radi, als quals aplica com a única immobilització una fèrula

dorsal durant dues setmanes. Obté bons resultats en 5 dels 6 casos, amb un seguiment d'un any.

Hamanishi (1996) estudia l'implant de ciment de fosfat càlcic en tíbies de conills. Descriu la incorporació del material, la seva degradació i la substitució per os neofomat. El mateix autor (1996) proposa la utilització de ciment de fosfat càlcic amb vancomicina per al tractament d'osteomielitis causades per estafilococ aureus meticilin-resistent (MRSA). Observa un alliberament lent de l'antibiòtic i el contacte directe amb l'os de l'hoste.

Ohura (1996) estudia l'implant d'un ciment de fosfat β -tricàlcic, fosfat monocàlcic monohidratat i sulfat càlcic hemihidratat en conills. Observa que a les 4 setmanes, els implants ja es troben recoberts per os neofomat. A les 8 setmanes el material s'ha reabsorbit i ha estat substituït per teixit ossi.

Mermelstein (1996) estudia in vitro el recobriment de cargols d'esponjosa amb ciment de fosfat càlcic amb l'objectiu de millorar la fixació. Implanta els cargols en fragments de fèmur distal de gos i estudia la força necessària per arrencar-los. El resultat mostra que els cargols reforçats amb ciment de fosfat càlcic requereixen per a la seva extracció una força significativament major que els altres. L'autor conclou que el ciment de fosfat càlcic pot estar indicat per millorar la fixació de cargols d'esponjosa en regions amb deficient qualitat òssia.

Bohner (1997) estudia el ciment de fosfat càlcic com a sistema DDS (drug delivery system) per a administrar gentamicina. L'addició de sulfat de gentamicina millora el temps de fraguat i la resistència mecànica del ciment (a causa dels ions sulfat). L'activitat biològica de la gentamicina persisteix en el ciment.

Driessens (1997) compara el ciment de fosfat càlcic amb el ciments acrílics. Conclou que, tenint en compte els avantatges teòrics del ciment de fosfat càlcic, la seva biocompatibilitat i l'osteointegració, el ciment de fosfat càlcic podria ser apte per a la fixació d'endopròtesis metàl·liques.

Kurashina (1997) mostra com l'implant de ciment de fosfat càlcic en teixit muscular no dóna lloc a la formació d'os.

Moore (1997) estudia l'efecte biomecànic del recobriment de cargols d'osteosíntesi amb ciment de fosfat càlcic en fractures pertrocantèries de fèmur. Compara la resistència a la tracció dels cargols recoberts amb ciment de fosfat càlcic o amb ciment de polimetilmetacrilat PMMA (d'ús molt freqüent en cirurgia ortopèdica). L'estudi es realitza amb 20 fèmurs de cadàvers humans, fent una osteotomia basicervical i implantant un cargol de Richards a compressió. L'autor no troba diferències significatives entre els dos ciments i conclou que la utilització del ciment de fosfat càlcic és aconsellable per millorar la fixació de fractures pertrocantèries en pacients d'edat avançada. El mateix autor (1997) analitza la fixació de cargols pediculars en vèrtebres de cadàvers. Compara de nou l'efecte del ciment de fosfat càlcic amb el del ciment de PMMA. No troba diferències en la resistència a la tracció dels cargols i conclou que el ciment de fosfat càlcic és una alternativa vàlida per millorar la fixació dels cargols pediculars.

Oreffo (1997-1998) estudia in vitro l'efecte del ciment de fosfat càlcic sobre el creixement i la diferenciació de cèl·lules osteoprogenitores del moll d'os. Observa un augment de la diferenciació cel·lular en presència del ciment de fosfat càlcic, així com un increment de l'activitat enzimàtica de la fosfatasa alcalina, marcador del fenotip cel·lular dels osteoblasts.

Constantz (1998) realitza implants en conills de quatre tipus diferents de ciment de fosfat càlcic. Observa el remodelatge ossi mediat per osteoclasts i osteoblasts. Destaca que el ritme de remodelatge depèn no només de la composició del ciment sinó també del lloc on es realitza l'implant.

Driessens (1998) insisteix en el concepte de l'osteotransducció del ciment de fosfat càlcic, entesa com la progressiva substitució del material sintètic per os neofomat. Destaca la immediata osteointegració del ciment de fosfat càlcic i la possibilitat d'emprar-lo com a vehicle de fàrmacs com ara els antibiòtics.

Frankenburg (1998) realitza implants de ciment de fosfat càlcic a la metàfisi femoral de gossos. Descriu el procés d'osteotransducció, la progressiva substitució per os neofomat i l'absència total de teixit fibrós a la interfase os-ciment, així com el restabliment de les propietats biomecàniques de l'os. El procés s'allarga en els gossos fins a les 78 setmanes.

Frayssinet (1998) analitza els efectes de l'implant en el còndil femoral de conills d'un ciment a base de fosfat β -tricàlcic barrejat amb pirofosfat sòdic. L'estudi es fa amb microscopia electrònica. Observa que el material pot ser fagocitat i integrat en l'os neofomat. La taxa de neoformació òssia és superior a l'observada en el grup control.

Kurashina (1998) realitza craneoplàsties en conills amb un ciment amb fosfat bicàlcic, tricàlcic i tetracàlcic. La reconstrucció té èxit en 8 dels 12 animals. L'anàlisi histològica mostra la formació d'os nou a la interfase ciment-os.

Ikenaga (1998) estudia les característiques biomecàniques del ciment de fosfat càlcic implantat en conills. Els implants són cilindres de 4,7mm de

diàmetre i 10mm de llargada. Són col·locats en un defecte creat al còndil femoral del conill. El sacrifici es fa a les 4, 12 i 16 setmanes i l'anàlisi es realitza per histomorfometria. Descriu la reabsorció del material i la formació d'os nou. A les 12 setmanes les característiques mecàniques (resistència a la compressió) són superiors a les del grup control. A les 16 setmanes es recuperen els valors de l'os sà. El mòdul elàstic és superior al de l'os sà en tots els períodes estudiats. L'autor creu aconsellable fer servir el ciment de fosfat càlcic per millorar la fixació inicial de fractures.

Sasaki (1999) utilitza ciment de fosfat càlcic amb gentamicina per al tractament d'osteomielitis experimentals en conills. Observa com es produeix alliberament d'antibiòtic al focus d'osteomielitis durant 2 mesos, i com progressivament el ciment és substituït per os neoformat.

Lu (1999) compara in vivo el ciment de fosfat càlcic amb un ciment de alfa-glicidil-bifenol metacrilat. Els implants es realitzen en el còndil femoral de conills. Observa l'enllaç directe, sense interfase, entre el ciment de fosfat càlcic i l'os. Detecta una disminució de la resistència mecànica fins a les 4 setmanes, amb una lenta recuperació a partir d'aquesta data. El ciment és progressivament substituït per os neoformat i no hi ha reacció inflamatòria evident.

Flautre (1999) realitza implants de ciment de fosfat càlcic en defectes ossis en ovelles. Observa que el ritme de degradació del material i de substitució per os neoformat és tres vegades més lent que en conills. L'activitat osteoblàstica és major en el grup amb ciment de fosfat càlcic que en el grup control (sense implant).

Yetkinler (1999) compara la fixació de fractures de l'epífisi distal del radi en cadàvers amb agulles de Kirschner o amb ciment de fosfat càlcic. Observa que els resultat biomecànic és equivalent.

Thordason (1999) realitza fractures intraarticulares de calcani en 26 peces de cadàver. En un grup fa una osteosíntesi amb empelt d'esponjosa i en un altre la mateixa fixació però afegint ciment de fosfat càlcic enlloc de l'empelt. Sotmet els especímens a tests de fatiga mecànica i observa que la resistència és millor en el grup tractat amb ciment de fosfat càlcic.

Pioletti (2000) estudia l'efecte de les partícules de ciment de fosfat tricàlcic sobre la funció dels osteoblasts. Observa que les partícules de menys de 10 μm de diàmetre poden produir una disminució en la viabilitat i la proliferació dels osteoblasts, així com en la producció de matriu extracel.lular. L'efecte és dosi-depenent. La dosi màxima és de 50 partícules de ciment de fosfat càlcic per cada osteoblast.

Ingham (2000) analitza l'efecte de les partícules de 7 tipus diferents de ciments ossis sobre la producció de factor de necrosi tumoral (α -TNF), interleukina 1 β i IL-6 per part dels macròfags. Conclou que tant les partícules de ciment de polimetilmetacrilat (PMMA) com les de ciment de fosfat càlcic poden induir activitat osteolítica en els macròfags si la quantitat de partícules és prou elevada.

Frayssinet (2000) realitza implants de cilindres de ciment de fosfat càlcic al còndil femoral d'ovelles. La valoració histològica es fa als 20, 60 i 120 dies. Als 60 dies observa fragmentació del ciment a partir dels porus i aparició d'os neofomat entre els fragments. Als 120 dies tot el ciment ha estat substituït per os. Conclou que la presentació en forma de ciment millora la resistència

mecànica del fosfat càlcic i no altera les propietats biològiques, és a dir, el procés d'osteointegració.

Meraw (2000) aplica en mandíbules de 5 gossos un material a base de ciment de fosfat càlcic, proteïna òssia morfogenètica (BMP) i factors de creixement ossi (TGF-b1, PDGF i FGF). El compara amb ciment de fosfat càlcic sol i amb un grup control sense implant. Observa l'àrea de contacte os-material. Conclou que el millor resultat és l'obtingut pel ciment de fosfat càlcic amb BMP i factors de creixement.

Blom (2000) utilitza ciment de fosfat càlcic amb factor de creixement TGF-b1 en cultius cel·lulars d'osteoblasts i de precursors osteoblàstics. Observa com la presència del material estimula la diferenciació dels precursors osteoblàstics in vitro. Conclou que aquest resultat serà la base per a futurs estudis in vivo.

Sánchez-Sotelo (2000) presenta un estudi clínic randomitzat sobre el tractament de fractures d'epífisi distal de radi en pacients majors de 50 anys. Compara el tractament convencional amb guix durant 6 setmanes amb la injecció de ciment de fosfat càlcic Norian i guix durant dues setmanes. L'estudi inclou 110 pacients. La funció de la mà i del canell és millor en el grup de ciment de fosfat càlcic (temps d'immobilització inferior). El resultat radiològic també és millor en aquest grup. No obstant, la taxa de consolidació amb desplaçament és del 18,2%, i l'autor conclou que el tractament amb Norian i guix no és capaç d'evitar aquest fet, si bé disminueix la taxa de desplaçaments secundaris. La complicació més freqüent del ciment és el dipòsit extraossi de part del biomaterial (69,1%). Aquest, però, va desapareixent amb el temps (persistència a l'any del 32,73%).

1.7.- Perspectives de futur dels biomaterials.

En un futur més o menys proper, la recerca en el camp dels biomaterials anirà dirigida en dues direccions (Amédée 1996):

- desenvolupament dels biomaterials osteoinductors.
- evolució dels biomaterials amb l'objectiu de trobar un substitutiu ossi vivent, és a dir, l'os híbrid.

1.7.1.- Biomaterials osteoinductors.

L'aïllament de factors osteogènics i la possibilitat d'obtenir aquests factors amb tècniques d'enginyeria genètica (eliminant riscos biològics i a un cost competitiu) han fet néixer moltes il·lusions sobre el desenvolupament de biomaterials osteoinductors. L'obtenció de substitutius ossis osteoinductors i a ser possible injectables percutàniament és un objectiu ambiciós però ja realista. Els obstacles, però, són importants, sobretot tenint en compte que els efectes in vivo dels factors osteogènics encara no són ben coneguts (Amédée 1996).

1.7.1.1.- Factors de creixement ossi.

El teixit ossi es distingeix d'altres tipus de teixits connectius especialitzats (cartíleg,...) per la presència d'una matriu mineral i per la seva capacitat de regeneració.

El procés de regeneració òssia (remodelació) és un mecanisme fisiològic que implica l'equilibri entre la funció dels osteoblasts i la dels

osteoclasts. La regulació d'aquest equilibri pot tenir lloc a diferents nivells (Amédée 1996). Les cèl.lules òssies poden rebre estímuls procedents de:

- factors de creixement sintetitzats per les pròpies cèl.lules òssies o alliberats per cèl.lules del seu voltant (entorn medul.lar). És la via autocrina/paracrina.
- factors sistèmics o locals dipositats en la matriu i alliberats durant el mecanisme de reabsorció òssia. És la via paracrina retardada.
- hormones sistèmiques circulants.
- estímuls mecànics.

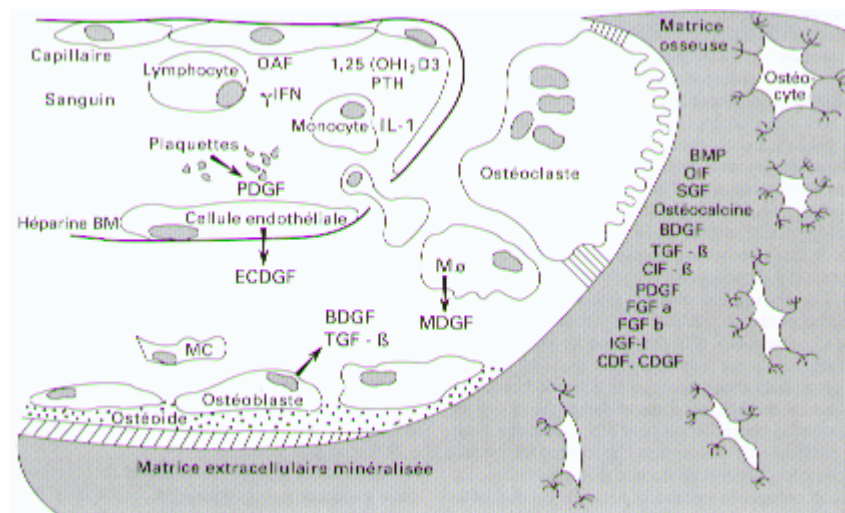


Figura nº 6: Factors locals implicats en el procés de remodelació òssia.

Reproduït de Amédée et al: Les matériaux du futur. En Passuti et al: Biomatériaux de substitution de l'os et du cartilage. Expansion Scientifique Française, pp. 113-123, 1996.

La cicatrització de l'os comporta l'activació d'un procés d'osteogènesi a partir de cèl.lules indiferenciades. Aquest procés està sota el control d'un gran nombre de molècules entre les quals trobem els factors de creixement i altres citoquines. Aquest procés de reparació, però, exigeix certes condicions que poden manca en el cas de defectes ossis de gran tamany. D'aquí neix la idea

d'estimular o induir la regeneració òssia amb un aport exogen de factors de creixement ossis específics.

La matriu extracel.lular de l'os constitueix una important reserva de factors de creixement que hi queden "segrestats". Molts dels factors de creixement han pogut ser aïllats i coneixem els efectes biològics que indueixen en interaccionar amb receptors específics de les membranes cel.lulars.

En funció del seu origen, es classifiquen els factors de creixement en dos grups:

- factors sintetitzats per les cèl.lules òssies o segrestats en la matriu extracel.lular: FGF_s, TGF β , PDGF, IGF I i IGF II.

- factors que arriben a l'os a través de la circulació sanguínia: interleucines IL₁ i IL₂, TNF α , TNF β i interferó γ .

a) IGF (*insulin growth factors*).

Regulen el creixement cel.lular i determinen la calcificació de la matriu (Mohan 1990). La síntesi dels IGF depèn de l'acció de l'hormona de creixement sobre el teixit ossi. Els glucocorticoids, els estrògens i els anàlegs de la vitamina D també poden controlar l'acció dels IGF.

b) TGF β (*transforming growth factor β*).

Té un paper important en el procés de formació de la matriu òssia, així com en el procés de mineralització d'aquesta. L'acció del TGF β està regulada per altres factors com els FGF, els estrògens i la calcitonina.

c) FGF (fibroblast growth factor).

Estimulen la proliferació de cèl.lules indiferenciades en el procés de reparació òssia. També tenen capacitat d'estimular la neoangiogènesi.

d) PDGF (platelet derived growth factor).

Estimula la proliferació de fibroblasts i també d'osteoblasts. Juntament amb l'IGF I es considera un dels factors més importants en el procés de regeneració de l'os (Amédée 1996).

Un dels nuclis de la recerca actual en el camp dels biomaterials se centra en aconseguir compostos d'hidroxiapatita carregats de factors de creixement que podrien millorar tant la velocitat com la quantitat i la qualitat de la regeneració òssia en el lloc de l'implant. S'han fet treballs experimentals amb hidroxiapatita carregada amb FGF₂ (Schnetter 1992), així com amb hidroxiapatita i fosfat tricàlcic carregat amb IGF I (Downes 1991).

1.7.1.2.- Factors osteoinductors.

Les propietats osteoinductores de l'os desmineralitzat van ser descrites per Urist, a la Universitat de Califòrnia, l'any 1965. La fracció proteica responsable d'aquesta activitat es va anomenar proteïna òssia morfogenètica (BMP).

Els factors osteoinductors són sintetitzats i secretats a la circulació en forma de precursors inactius. Després són transformats en la forma activa a nivell de l'òrgan diana.

Les BMP són proteïnes bàsiques de baix pes molecular. Actualment se'n coneixen unes deu. Les limitacions que suposava la seva obtenció a partir de teixits biològics ha portat a la síntesi de BMP recombinants per enginyeria genètica. Dues empreses americanes en tenen les patents.

L'acció de les BMP requereix l'existència de receptors específics a les membranes cel·lulars. Les BMP2, BMP3 i BMP4 indueixen la diferenciació de condrocits in vitro i, igual que la BMP6, actuen estimulants la diferenciació de cèl·lules osteoprogenitores (Hugues 1995). L'acció de les BMP no depèn només del tipus cel·lular sobre el que actuen sinó també del grau de maduració d'aquestes cèl·lules.

1.7.2.- Concepte d'os híbrid.

Els principals criteris de qualitat d'un biomaterial (Heymann 1996) són:

- màxima biocompatibilitat (i per tant no toxicitat).
- acció biològica: el material ha de permetre la formació d'una estructura òssia fisiològica després del seu implant, i més concretament la formació ràpida d'un pont ossi directe entre l'implant i el llit receptor.
- propietats biomecàniques òptimes.

La primera de les qualitats es pot considerar com ja assolida. La segona, però, no sempre és possible amb els biomaterials de què disposem actualment. La tercera és la que representa actualment un problema major, sobretot per a l'implant de biomaterials en llocs de fortes sol·licitacions mecàniques. Els micromoviments de l'implant provoquen la seva encapsulació

fibrosa. Així, els defectes ossis majors (greus traumatismes, tumors,...) representen encara un desafiament important en el camp de la recerca. L'implant de blocs voluminosos de biomaterials comporta greus dificultats per a la regeneració òssia, que sovint fracassa.

Aquestes necessitats clíniques porten al desenvolupament de materials cada cop més biològics. S'intenta l'associació dels biomaterials amb proteïnes recombinants (que afavoreixen els processos de reabsorció, colonització,...) o bé amb elements cel.lulars que portarien a la formació d'un os híbrid, és a dir, un substitutiu ossi viu.

1.7.2.1.- Associacions biomaterials-cèl.lules.

Entre les estratègies de recerca més desenvolupades actualment es troba l'associació de biomaterials amb cèl.lules vives que siguin capaces de cooperar activament amb ells. L'objectiu principal és la posta a punt d'un teixit artificial híbrid que sigui capaç de presentar in vitro les característiques del teixit ossi fisiològic. El desenvolupament d'aquest teixit artificial en un sistema autòleg permetria una biocompatibilitat excel.lent.

Dues condicions són imprescindibles per al desenvolupament d'aquest tipus de material:

- el component cel.lular ha de poder sintetitzar osteoide el més ràpidament possible.
- el suport sintètic ha de ser capaç no només de rebre les cèl.lules sinó també de permetre'ls conservar les seves funcions específiques.

1.7.2.2.- Associacions ceràmiques fosfocàlciques - osteoblasts.

Els osteoblasts són la peça clau en el procés de regeneració òssia.

Actualment es disposa de dues fonts d'osteoblasts:

- osteoblasts diferenciats extrets de l'os esponjós.
- precursors osteoblàstics extrets de l'estroma medul.lar.

La utilització d'osteoblasts diferenciats comporta una sèrie d'inconvenients. Les cèl.lules tenen un temps de duplicació força llarg. Com totes les cèl.lules diferenciades, la seva especificitat funcional (potencial osteogènic) disminueix ràpidament a mesura que avancen les generacions en cultiu, fet que limita l'extensió dels cultius. A aquests inconvenients cal afegir la dificultat d'obtenir una població osteoblàstica pura. És freqüent la presència de cèl.lules contaminants (sobretot fibroblasts) que tenen un potencial proliferatiu important. L'escassa quantitat de cèl.lules produïdes i les dificultats que aquesta producció implica han orientat la recerca cap al desenvolupament de cultius estromals medul.lars com a font de cèl.lules osteogèniques.

Les cèl.lules estromals extretes del moll d'os han de ser separades de les cèl.lules hematopoètiques. Tenen com a particularitat la de presentar una notable capacitat de proliferació i un elevat poder osteogènic. És a dir, permeten la formació de cèl.lules que tenen expressió fenotípica de tipus osteoblàstic (expressió d'osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina, receptors de vitamina D₃ i receptors de proteïna òssia morfogenètica -BMP-).

Per a l'associació dels osteoblasts amb el biomaterial s'han descrit dues possibilitats (Heymann 1996):

- creació de cultius de cèl.lules del moll d'os en presència del biomaterial. Es cultiven simultàniament cèl.lules precursors osteogèniques i no

osteogèniques, i l'os híbrid obtingut és doncs policlonal i té propietats funcionals heterogènies.

- associació d'una població clonal de cèl.lules progenitores osteogèniques amb les millors propietats possibles. Els clons se seleccionen en funció de la seva expressió fenotípica. Aquesta via permetria desenvolupar un os híbrid amb capacitat osteogènica òptima i que podria generar osteoide molt ràpidament.

1.7.2.3.- Associació ceràmiques fosfocàlciques - moll d'os.

El moll d'os és l'origen dels precursors osteogènics i estromals necessaris per al desenvolupament d'una estructura òssia. Està ben establert que el moll d'os conté dos tipus cel.lulars: cèl.lules hematopoètiques i cèl.lules estromals. Aquestes últimes determinen el microambient cel.lular necessari per a l'expressió de la funció hematopoètica (proliferació, diferenciació i maduració de les diferents cèl.lules progenitores). Les cèl.lules estromals inclouen fibroblasts, cèl.lules endotelials, adipòcits, precursors osteoblàstics i cèl.lules reticulars no macrofàgiques. Els cultius cel.lulars de moll d'os a llarg termini han mostrat que és possible mantenir les cèl.lules mare hematopoètiques, els precursors osteoblàstics i els precursors de cèl.lules estromals durant més de 2 mesos. Aquests cultius haurien de permetre desenvolupar un os híbrid format pel conjunt de les cèl.lules implicades en la formació de l'os. El material resultant podria ser reabsorbit (osteoclasts, macròfags) i colonitzat (osteoblasts, cèl.lules estromals). A més, aquest tipus d'os híbrid tindria activitat hematopoètica. L'associació de cultius de moll d'os amb ceràmiques fosfocàlciques es troba de moment en fase experimental.

1.7.2.4.- Associació biomaterials - principis actius.

La millora de les propietats biològiques dels biomaterials depèn essencialment de la seva capacitat per ser transformats per les cèl·lules del llit receptor després de l'implant. Per incrementar les prestacions dels biomaterials s'estan desenvolupant sistemes de lliurament de principis actius (DDS -drug delivery systems-). Els DDS són capaços de lliurar in situ els principis actius de manera prolongada, regular, no tòxica i en quantitat suficient. Els primers DDS desenvolupats utilitzaven materials a base silicona o polímers i funcionaven com a simples bombes internes o externes. La característica principal d'aquests sistemes era la utilització de matrius inerts. No obstant, els inconvenients apareguts (malalties autoimmunes per la silicona, degradació mal coneguda dels polímers) han restringit la seva utilització.

Recentment, les ceràmiques de fosfats càlcics, gràcies a les seves propietats físico-químiques i biològiques, s'han utilitzat com a matriu de sistemes DDS per a lliurament de substàncies a l'interior de l'os (Bajpai 1988). Les propietats de biocompatibilitat i biodegradabilitat dels fosfats càlcics de síntesi actuals fan preveure el desenvolupament de nous DDS en els quals la matriu del sistema ja no serà bioinert sinó bioactiva. La fixació i posterior alliberament d'una substància farmacològica a l'interior de l'os gràcies a les ceràmiques fosfocàlciques permetria crear dues accions sinèrgiques:

- l'acció del principi actiu alliberat que gràcies a la matriu podria exercir la seva funció de forma prolongada.
- l'acció de la matriu com a substitutiu ossi.

Sembla doncs possible associar ceràmiques de fosfat càlcic amb

diversos principis actius com són els antibiòtics o bé els mediadors implicats directament en els processos de remodelació òssia. Aquests materials serien més sensibles a la lisi cel.lular i podrien ser colonitzats més ràpidament, afavorint així el procés de neoformació òssia. Les variables més importants que cal controlar per a la preparació de sistemes DDS són les característiques físico-químiques del material (superfície específica, porositat, granulometria) i la fixació i posterior alliberament del principi actiu (homogeneïtat en el sí del material, absència d'efectes sistèmics).

Els sistemes DDS també podrien ser associats a cultius d'osteoblasts o de moll d'os amb l'objectiu d'obtenir un os híbrid amb millors propietats biològiques (Heymann 1996).

Veiem doncs que la creació d'un os híbrid esdevé un nou repte en el camp dels biomaterials. L'os híbrid hauria de permetre estendre l'ús terapèutic dels biomaterials millorant les seves propietats mecàniques i augmentant el volum implantable. Tot i que queden per resoldre molts problemes, els treballs realitzats en aquest camp obren les portes per al futur desenvolupament dels substitutius ossis vius.

2.- Justificació del tema.

El material més utilitzat actualment per a substituir l'os és el propi os, ja sigui procedent del mateix pacient o obtingut de donants. No obstant, l'aparició de malalties víriques transmissibles (Hepatitis B i C, SIDA i altres), de prions i el risc a curt termini d'aparició de noves soques virals mutants, posen nombrosos interrogants sobre el risc d'aplicar amb seguretat els empelts ossis d'origen humà o animal. Aquest fet, junt amb la necessitat d'aconseguir característiques biològiques cada vegada millors, és el que ha impulsat la recerca en el camp dels materials sintètics.

La síntesi química permet la creació de nous materials i l'avaluació mitjançant estudis in vitro i in vivo permet caracteritzar-los perfectament abans de la seva utilització en clínica humana. Aquest fet és fonamental, donat que la seva capacitat d'osteoconducció comporta una bioactivitat que implica l'alliberament d'elements químics i la precipitació d'estructures apatítiques. Precoçment apareixen reaccions cel·lulars inespecífiques (limfòcits, polimorfonuclears) que precedeixen els mecanismes de reabsorció per cèl·lules específiques (osteoclasts). Aquesta cascada d'esdeveniments és essencial i representa les primeres fases de l'osteoconducció, que portarà a la progressiva substitució del biomaterial per teixit ossi diferenciat (Passuti 1996).

Els factors fonamentals que defineixen la capacitat d'osteoconducció d'un biomaterial són el seu origen químic, la porositat i els micromoviments relatius entre l'os i l'implant (Daculsi 1996). L'osteogènesi només pot ser progressiva i centrípeta, i això comporta la necessitat d'un temps prolongat per a reconstruir els defectes ossis.

D' altra banda, les propietats mecàniques dels biomaterials porosos són ara per ara insuficients, i només a mesura que avança la seva progressiva substitució es va recuperant la resistència original de l'os. Això impedeix una càrrega mecànica precoç sobre aquests materials i la necessitat de protegir-los mitjançant un sistema d'osteosíntesi.

El coneixement d'aquests fets imposa determinats límits en la utilització dels biomaterials i la necessitat d'aprofundir en la recerca per tal d'obtenir materials amb característiques biològiques i mecàniques cada cop més properes a les de l'os sà.

Un dels biomaterials sintètics més estudiat i desenvolupat en els darrers anys és el del grup de les ceràmiques de fosfat càlcic. Ja l'any 1926, De Jong va mostrar amb estudis de difracció de raigs X l'analogia del mineral ossi amb els minerals de tipus apatític (Daculsi 1996). La contínua recerca en aquest terreny ha portat el grup del Departament de Ciències dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, dirigit pel Prof. J.A. Planell, a desenvolupar un nou material sintètic a base de fosfat càlcic i presentat en forma de ciment ossi (Driessens 1995). Això afegeix a les propietats biològiques del fosfat càlcic unes propietats mecàniques de primer ordre. Introdueix, a més, el concepte de l'osteotransducció, que és la formació de teixit ossi nou a partir d'un material sintètic que només pot ser degradat de forma activa, amb participació directa de les cèl.lules osteoclàstiques i entrant per tant a formar part del procés de neoformació òssia (Driessens 1998).

Per comprendre el procés de l'osteotransducció és imprescindible conèixer amb profunditat no tan sols les característiques físico-químiques del ciment de fosfat càlcic sinó també la biologia i la biomecànica de l'os sà, així

com el procés de reparació de les fractures. La complexitat del teixit ossi i dels mecanismes fisiològics que controlen el seu creixement i la seva remodelació fa pensar que és difícil que el ciment de fosfat càlcic sigui capaç d'el·licitar en aquest teixit una resposta que condueixi a la seva regeneració. No obstant, els primers resultats experimentals publicats ens conviden a creure en les possibilitats d'aquest nou biomaterial (Chow 1991, Hong 1991, Costantino 1991 i 1992, Yoshimine 1993, 1995 i 1996, Shindo 1993, Karemer 1994, Fujikawa 1995, Jansen 1995 i 1996, Kopylov 1996, Hamanishi 1996, Vasconcelos 1996, Bohner 1997, Kurashina 1997, Oreffo 1997, Constantz 1998, Driessens 1998, Frankenburg 1998, Frayssinet 1998, Kurashina 1998, Ikenaga 1998, Sasaki 1999, Lu 1999, Flautre 1999, Yetkinler 1999).

És per aquests motius que vam decidir plantejar un treball de recerca que ens permetés aprofundir en el coneixement del comportament biològic del ciment de fosfat càlcic comparant-lo amb el de l'autoempelt i l'al·loempelt ossis, que són els substitutius emprats habitualment en clínica humana.

3.- Objectius i hipòtesi de treball.

Els objectius que hem plantejat a l'hora de desenvolupar el projecte de recerca són l'avaluació de l'activitat biològica del ciment de fosfat càlcic in vivo en animals d'experimentació, la constatació del fenomen de l'osteotransducció i finalment la comparació de les propietats biològiques d'aquest material amb el millor dels materials coneguts fins ara, és a dir, amb l'autoempelt i l'al.loempelt ossis. Per fer-ho, hem triat un model experimental fàcilment reproduïble i la validesa dels resultats del qual ja ha estat demostrada anteriorment.

Pensem que un resultat positiu pot permetre obrir la porta a les múltiples aplicacions clíniques teòricament possibles d'aquest ciment de fosfat càlcic desenvolupat per la Universitat Politècnica de Catalunya i al coneixement del qual hem intentat contribuir amb aquest treball.

Per assolir els objectius definits per a aquest estudi, intentarem demostrar la següent **hipòtesi de treball**:

“La reparació de defectes cavitaris del teixit ossi mitjançant osteotransducció amb ciment de fosfat càlcic és equivalent qualitativament i quantitativa a la que s'obté amb autoempelt i al.loempelt ossis.”

4.- Material i mètodes.

4.1.- Model experimental.

4.1.1.- Animals d'experimentació.

Com a animals d'experimentació utilitzem conills mascles de raça albina Nova Zelanda, procedents de l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Els conills tenen un pes comprès entre 3,5 i 4 Kg. L'edat dels animals oscila entre 4 i 6 mesos de vida (al final del període de creixement). Aquest pes i tamany dels animals evita la presència de fisis i permet crear defectes ossis metafisaris de tamany suficient (6mm de diàmetre).



Figura nº 7 : Conill de raça albina Nova Zelanda.

La utilització del conill com a animal d'experimentació per a estudis sobre consolidació òssia és molt freqüent, donat que el tamany de l'animal és adequat per permetre intervencions quirúrgiques i administració sistèmica de fàrmacs, el cost d'estabulació és moderat i els seu teixit ossi ja segueix

l'estructura d'os haversià que no és present en animals més senzills com els rosegadors petits (Nunamaker 1999).

El règim alimentari standard és un liofilitzat que conté 16'5% de proteïna pura, 13'5% de fibra, 1'2% de Calci i 0'65 de fósfor. Està enriquit amb 10.000 UI de vitamina A i 2.000 UI de vitamina D per cada Kg d'aliment. L'aigua s'administra "ad libitum".

L'estabulari manté les condicions ambientals de temperatura (entre 18 i 25°C) i humitat (50-70%).

4.1.2.- Tipus d'implants.

Per al treball experimental hem utilitzat els següents tres tipus d'implants:

4.1.2.1.- Autoempelt esponjós fresc.

S'obté en condicions d'asèpsia del còndil femoral contralateral del conill en el mateix acte quirúrgic. S'implanta immediatament i, per tant, no requereix cap tipus de conservació.



Figura nº 8 : Obtenció d'autoempelt ossi amb treflina.



Figura nº 9 : Imatge del cilindre ossi obtingut amb la treflina.

4.1.2.2.- Al.loempelt esponjós congelat.

S'obté en condicions d'asèpsia de la regió metafisària distal del fèmur de conills de la mateixa espècie. S'identifica i es conserva mitjançant congelació a -80°C en les instal.lacions del Banc de Teixits de l'Aparell Locomotor de l'Hospital Clínic de Barcelona, seguint els estàndards europeus de conservació del teixit ossi (European Association of Tissue Banks - EATB -).

4.1.2.3.- Ciment de fosfat càlcic (Biociment H).

La síntesi química del ciment es realitza al Departament de Ciències dels Materials i Enginyeria Metal.lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya.



Figura nº 10.: Presentació dels 2 components del ciment de fosfat càlcic desenvolupat per la Universitat Politècnica de Catalunya (Biociment H).

El ciment té les següents **característiques**:

- **Composició**:

- Fase sòlida en pols:
 - 98% en pes de fosfat tricàlcic alfa ($\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
 - 2% en pes d'hidroxiapatita precipitada
- Fase líquida: solució aquosa al 2,5% de Na_2HPO_4 .

- **Relació de barreja**: Líquid/pols = 0.32 ml/g

- **Propietats físiques**:

- Temps de cohesió: < 5 min.
- Temps inicial de presa: 7- 9 min.
- Temps final de presa: 15-22 min.
- Resistència a la compressió:
 - a les 8 hores: 20 MPa.
 - a les 24 hores: 33 MPa.
 - a les 40 hores (resistència màxima): 40 MPa.

- **Producte de la reacció**: Es forma una hidroxiapatita deficient en calci de característiques similars a la fase mineral òssia. La transformació es completa en 64 hores.

El material arriba preparat en bosses de plàstic transparent degudament identificades. L'esterilització del producte s'ha fet amb òxid d'etilè a les instal.lacions del bloc quirúrgic general de l'Hospital Clínic de Barcelona. S'emmagatzema a temperatura ambient.

4.1.3.- Grups de treball.

S'han intervingut 48 conills, repartits en 8 grups de 6 animals, en funció de l'implant rebut i del temps d'establució abans del sacrifici. Cada peça òssia obtinguda ha estat identificada amb dues lletres (que defineixen el material implantat) i quatre xifres (dues per al temps de sacrifici i dues per al número

d'exemplar). Així, per exemple, l'animal marcat com a Ci12-03 és el 3er exemplar del grup que ha rebut ciment i ha estat mantingut durant 12 setmanes abans del sacrifici.

4.1.3.1.- Grup Ci.

Està format pels 12 animals que han rebut ciment de fosfat càlcic com a empelt. Es divideix alhora en 2 subgrups de 6 conills en funció del temps de sacrifici: 4 o 12 setmanes.

4.1.3.2.- Grup Ai.

Els 12 exemplars d'aquest grup han rebut al·loempelt ossi com a implant. 6 exemplars s'han sacrificat a les 4 setmanes i 6 més a les 12 setmanes.

4.1.3.3.- Grup Au.

Està format pels 12 conills als quals se'ls ha implantat autoempelt ossi. També s'ha dividit en dos subgrups en funció del temps de sacrifici (4 o 12 setmanes).

4.1.3.4.- Grup Co.

És el grup control. S'ha creat un defecte ossi idèntic al dels altres grups però no s'ha implantat cap tipus de material. També està format per 2 subgrups de 6 animals sacrificats a les 4 o 12 setmanes.

4.1.4.- Càlcul de la mostra.

Es comparen els diferents grups d'estudi amb el grup Au (autoempelt ossi) donat que aquest és el que teòricament ofereix la millor taxa de regeneració òssia.

S'utilitza la prova unilateral per a comparació de dues mostres:

- Grup Au: 34,15 +/- 6,1 (Katthagen 1986).

- Grups a estudiar: Definim com a significativa una taxa de regeneració òssia superior al 66,66% de l'obtinguda amb el grup Au. Per al càlcul de la mostra s'aplica la següent fórmula estadística:

$$N = \frac{(\alpha \cdot \beta) \cdot s^2}{\Delta x^2} = 5,89$$

$$\alpha = 0,05 \quad \beta = 0,05 \quad \alpha \cdot \beta = 10,824$$

$$s = 6,1 \quad \Delta x = 11,33$$

El resultat del càlcul de la mostra és N=5,89. Això indica que els resultats de l'estudi poden ser estadísticament significatius utilitzant 6 conills en cada grup.

4.2.- Cirurgia experimental.

4.2.1.- Preparació preoperatòria.

4.2.1.1.- Establulació dels animals.

Seguint la normativa vigent, els animals arriben a l'estabulari com a mínim una setmana abans de la intervenció quirúrgica. Durant aquest període romanen en quarentena.

4.2.1.2.- Anestèsia.

L'anestèsia dels animals es realitza combinant dos fàrmacs:

- Calmoneosan^R: S'utilitza com a premedicació anestèsica. La dosi és de 1ml/Kg de pes i s'administra per via intramuscular. És un fàrmac utilitzat habitualment pels veterinaris en les induccions anestèsiques.

- Clorhidrat de Ketamina (Ketolar^R): S'empra per via intramuscular a una dosi de 10 mg/Kg de pes.

Amb aquestes drogues s'aconsegueix una bona relaxació de l'animal al cap de 15-20 minuts. L'efecte dura entre 60 i 75 minuts.

4.2.1.3.- Preparació de la zona quirúrgica.

Es col.loca l'animal sobre una taula quirúrgica en decúbit supí. Es rasura la zona a intervenir amb màquina elèctrica, es pinta amb una solució iodada aquosa i es col.loquen les talles estèrils.

4.2.2.- Intervenció quirúrgica.

La intervenció quirúrgica es realitza amb instrumental estèril. Es fa una incisió cutània longitudinal sobre el còndil femoral intern. S'obre la fàscia muscular i s'accedeix a la regió metafisària del fèmur per darrera del *vastus medialis*. Per facilitar la identificació del còndil femoral s'utilitza com a referència la ròtula, que és fàcilment luxable amb el genoll en extensió.

Es desperiostitza la cara interna de la metafisi distal del fèmur amb periostotom. És important exposar tota la regió metafisoepifisària distal del fèmur per poder centrar bé l'orifici. Tenint en compte el diàmetre dels còndils (uns 8 mm) i el de l'orifici que cal crear (6mm), es compren la necessitat de centrar perfectament l'orifici, ja que qualsevol desviació debilitaria excessivament les parets del defecte ossi, amb el conseqüent risc de fractura. Es marca el centre de l'orifici amb la punta del bisturí. Per evitar possibles desviacions en iniciar la perforació hem utilitzat una broca de 6 mm amb l'extrem amb punxa. La broca es munta sobre un motor elèctric estèril. Cal identificar perfectament la direcció de perforació (paral.lela a la interlínia fémoro-tibial) i evitar la lesió de la cortical externa.



Figura nº 11: Instrumental estèril utilitzat en les intervencions.



Figura nº 12 : Broca de 6mm de diàmetre. L'extrem amb punxa facilita el correcte centrat durant la perforació.



Figura nº 13: Perforació centrada al còndil femoral. Broca de 6mm de diàmetre i motor elèctric.

Un cop fet l'orifici, es renta amb sèrum per eliminar els detritus,

s'asseca amb una gassa i es realitza l'implant corresponent (autoempelt ossi, al.loempelt o ciment de fosfat càlcic). En el cas del grup control, la tècnica quirúrgica és idèntica però no es realitza cap implant.



Figura nº 14 : Imatge del defecte ossi creat al còndil femoral.

El grup que rep ciment de fosfat càlcic com a implant requereix un tractament específic, ja que per les característiques del ciment cal respectar uns períodes de temps definits. En començar la barreja dels dos components, líquid i pols, del ciment es posa en marxa un cronòmetre. Es disposa d'un minut per aconseguir una barreja homogènia. Entre el minut 1 i el minut 5 s'ha de deixar reposar el ciment perquè qualsevol manipulació alteraria les seves propietats físico-químiques. Entre el minut 5 i el minut 6 cal col·locar el ciment en el defecte ossi i adaptar-lo perfectament, retirant-ne l'excés. Entre els minuts 6 i 12 s'ha d'evitar de nou qualsevol manipulació del ciment però cal mantenir la

ferida oberta per permetre l'aireació del material. Als 12 minuts es pot tancar la ferida. Tots aquests períodes han estat estudiats i definits al Departament de Ciències dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya. Són els que permeten una presa òptima del ciment i les millors característiques físico-químiques i biomecàniques del material.



Figura nº 15 : Barreja dels components del ciment de fosfat càlcic.

Figura nº 16 : Un cop feta la barreja, el ciment ha de reposar durant 4 minuts per evitar que s'alterin les seves propietats físico-químiques.

Se sutura la ferida per plans sense deixar cap drenatge. La fàscia muscular se sutura amb Dexon 3/0 i la pell amb seda 3/0.

4.2.3.- Cures postoperatòries.

No s'utilitza cap tipus d'immobilització postoperatòria de l'extremitat. El conill es col·loca a la gàbia immediatament després de la intervenció. S'identifica la gàbia amb el número de grup i tipus d'implant de l'animal, així com amb la data d'intervenció i el període d'estabulació previst abans del

sacrifici (4 o 12 setmanes).

En el seguiment postoperatori s'avalua l'estat de la ferida, la mobilitat espontània de l'extremitat i el consum normal d'aigua i aliment.

4.2.4.- Sacrifici dels animals.

Per al sacrifici dels animals s'utilitzen inicialment els mateixos fàrmacs i dosis que per a l'anestèsia (apartat 4.2.1.2). Un cop l'animal està anestesiàt, s'administra una dosi de 100 mg de vecuroni, que provoca la mort de l'animal per aturada càrdio-respiratòria.

4.2.5.- Recollida de mostres.

Un cop sacrificat l'animal, es realitza un accés longitudinal extern de la cuixa i s'extreu el fèmur complet per desarticulació del maluc i del genoll. L'os es conserva en alcohol de 70º, en pots degudament identificats amb la codificació de l'animal.

4.2.6.- Complicacions.

Com a complicacions intra i postoperatòries hem d'esmentar: 2 casos d'infecció de la ferida quirúrgica, 2 casos de mort intraoperatòria per complicació anestèsica, 1 cas de paràlisi del nervi ciàtic i 1 cas de mort postoperatòria (a les 3 setmanes) per causa desconeguda. En tots els casos els animals van ser exclosos de l'estudi.

4.3.- Mètodes de valoració.

4.3.1.- Radiologia.

4.3.1.1.- Escales de valoració.

S'han descrit diverses escales per a l'avaluació radiològica de la incorporació d'empelts ossis. Totes elles fan referència a l'aspecte radiològic del centre de l'empelt. Els empelts corticals són inicialment invadits per osteoclasts. Això fa disminuir la concentració de sals càlciques i això es manifesta en les radiografies com a osteoporosi. Posteriorment hi ha una fase d'aposisió òssia i va augmentant la densitat radiològica (Glimcher 1983, Burchardt 1983).

Hem de tenir en compte, en el nostre estudi, que el fet d'implantar un material a base de fosfat càlcic fa que les imatges radiològiques mostrin ja des del principi un augment de densitat que no s'ha de confondre amb la regeneració òssia. Entenem doncs que en el cas de l'implant de ciment de fosfat càlcic només podem considerar que hi ha regeneració òssia si observem l'aparició de trabècules, i no per un simple augment de densitat. També cal tenir en compte que els estudis de Fernández de Retana (1993) i Del Valle (1999), fets amb defectes cavitaris en conills, destaquen la falta de correlació entre els resultats radiològics i les dades histològiques i histomorfomètriques.

4.3.1.2.- Metodologia.

S'han obtingut radiografies de front i perfil de cada un dels 48 fèmurs intervinguts. Per millorar la qualitat de la imatge, les radiografies s'han realitzat amb plaques de gra fi. Hem utilitzat unes característiques de 45 KV, 5 mAs i 1

metre de distància focus-placa. Les radiografies han estat digitalitzades i passades a negatiu. Això facilita la interpretació de les imatges en alguns casos.

Per a la valoració radiològica hem utilitzat els criteris descrits per Goldberg l'any 1985. Hem triat aquesta escala de valoració per la seva senzillesa, que creiem que millora l'objectivitat. L'escala és la següent:

<u>Cos de l'empelt</u>	<u>Puntuació</u>
Reabsorbit	0
Parcialment reabsorbit	1
Intacte	2
Reorganitzat	3



Figura nº 17 : Radiografia d'un exemplar del grup A104 (al.loempelt 4 setmanes).

S'identifica clarament el defecte ossi creat.

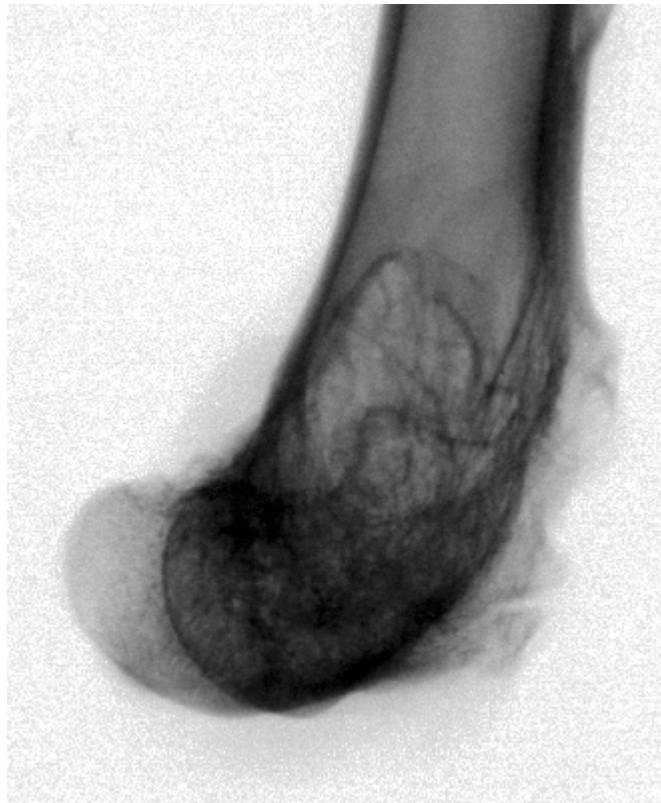


Figura nº 18 : Imatge en negatiu de la radiografia precedent. La digitalització de les imatges radiològiques pot facilitar la seva interpretació.



*Figura nº 19 : Implant de ciment de fosfat càlcic pràcticament intacte a les 4 setmanes.
Calcificació extraòssia al voltant del lloc de l'implant.*



Figura nº 20 : Imatge en negatiu de la radiografia prèvia. S'observa el ciment implantat.

4.3.2.- Histologia.

Un cop obtingudes totes les radiografies, es procedeix a tallar les mostres amb serra elèctrica per obtenir blocs de 5mm de costat. Posteriorment es processen aquests blocs per a l'estudi d'os no decalcificat. Aquesta tècnica inclou els processos que descrivim a continuació i s'ha portat a terme en el Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona.



Figura nº 21 : Preparació del fèmur per fer el tall amb serra elèctrica.



Figura nº22 : Utilització de la serra elèctrica.



Figura nº 23 : Fèmur de conill després del primer tall amb serra elèctrica (tall sagital de l'os).



Figura nº24 : Imatge macroscòpica de la regió condília del fèmur d'un exemplar del grup Ci04 (ciment de fosfat càlcic 4 setmanes).



Figura nº 25 : Ampliació de la imatge prèvia. S'observa ciment intacte al centre del defecte ossi.

4.3.2.1.- Fixació.

Es realitza per immersió de les mostres en etanol 70% durant un mínim de 24 hores.

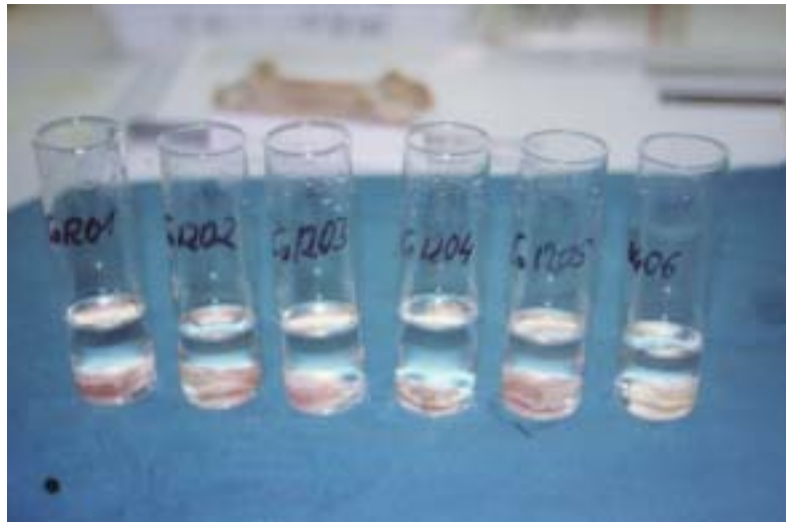


Figura nº 26 : Un grup complet (6 mostres) en procés de fixació amb etanol 70%.

4.3.2.2.- Deshidratació i deslipidació.

Es fan passos successius per diferents gradacions d'etanol i acetona:

- etanol-acetona al 50% durant 12 hores.
- acetona durant 12 hores.
- etanol-acetona al 50% durant 12 hores.
- etanol absolut 12 hores.
- etanol absolut 12 hores.

4.3.2.3.- Infiltració.

La infiltració de la mostra es realitza amb monòmer de metilmetacrilat, donat que el seu baix pes molecular li permet penetrar en els teixits amb facilitat. Les mostres s'infiltra durant 3-4 dies amb una solució de:

- 100 ml de metilmetacrilat (monòmer estabilitzat amb hidroquinolona).
- 20 ml de nonifenol poliglicol-éter acetat (plastoid N).
- 2 ml de dibutiltalat.
- 5 g de peròxid de benzoil.

Aquesta solució s'ha de conservar a baixa temperatura i en flascó tancat hermèticament. Abans d'obrir el flascó s'ha de deixar que assoleixi la temperatura ambient per evitar la condensació d'aigua.

4.3.2.4.- Polimerització.

La polimerització es fa en tubs de vidre que tenen, a la base, una capa de metacrilat completament polimeritzat. Els tubs s'han de preparar prèviament. Per a això, s'omplen tubs de vidre amb la solució descrita en l'apartat anterior fins a una alçada de 15-20mm i es deixa polimeritzar el metacrilat a temperatura ambient durant un període de temps no inferior a dues setmanes.

Posteriorment s'introdueix la mostra en els tubs preparats i s'omple amb l'esmentada solució fins a una alçada de 50-60mm. La polimerització es fa en una estufa que manté una temperatura de 32°C durant les primeres 24 hores. Llavors cal comprovar que ha començat la polimerització (augmenta la viscositat de la solució). Posteriorment s'augmenta la temperatura 2°C cada 12 hores fins que la solució s'endureix (sol succeir als 36°C) i llavors es manté aquesta temperatura durant 24 hores més.

Un cop completada la polimerització es trenca el tub de vidre per obtenir el bloc de metacrilat amb la mostra inclosa a l'interior. Els blocs de metacrilat poden llavors ser tallats amb microtom.

4.3.2.5.- Tincions.

Les mostres obtingudes es tenyeixen amb les tincions d'hematoxilina-eosina, tricròmic de Goldner i Von Kossa.

a) Tinció hematoxilina-eosina.

Es realitzen els següents processos:

- Hematoxilina de Harris durant 5 minuts.
- Rentat amb aigua corrent.
- Diferenciació amb alcohol-àcid.
- Rentat amb aigua corrent.
- Immersió en aigua amoniacal.
- Rentat amb aigua corrent (10-20 minuts).
- Tinció amb eosina a temperatura ambient.
- Immersió en alcohol 95% per treure l'excés d'eosina.
- Deshidratació i muntatge.

La tinció hematoxilina-eosina permet observar l'osteoide de color rosa pàl·lid i l'os mineralitzat de color rosa fosc.

b) Tinció amb tricròmic de Goldner.

La tècnica de tinció comprèn els següents punts:

- Hematoxilina fèrrica durant 5 minuts.
- Aigua corrent durant 10 minuts.
- Ponceau de xilidina durant 45 minuts.
- Rentat ràpid en àcid acètic a l'1%.
- Rentat ràpid en aigua destilada.
- Àcid fosfotúngstic-Orange G durant 7 minuts.

- Rentat ràpid amb àcid acètic a l'1%.
- Rentat ràpid amb aigua destilada.
- Verd llum durant 12 minuts.
- Rentat ràpid amb àcid acètic durant 5 minuts.
- Rentat ràpid amb aigua destilada.

En aquest cas s'observa l'osteòide de color vermell i l'os mineralitzat de color verd.

c) Tinció de Von Kossa.

Cal seguir el següent procés:

- Nitrat de Plata al 3% durant 5 minuts.
- 2 rentats de 5 minuts amb aigua destilada.
- Formol-carbonat de sodi durant 5 minuts.
- Aigua corrent durant 10 minuts.
- Ponceau de xilidina durant 45 minuts.
- Rentat ràpid amb àcid acètic a l'1%.
- Rentat ràpid amb aigua destilada.
- Àcid fosfotúngstic-Orange G durant 7 minuts.
- Rentat ràpid amb àcid acètic a l'1%.
- Rentat ràpid amb aigua destilada.
- Deshidratació i muntatge.

La tinció de Von Kossa permet veure el ribet osteòide de color vermell intens i l'os mineralitzat de color negre. Aquest gran contrast de colors facilita les lectures histomorfomètriques.

4.3.3.- Histomorfometria òssia.

4.3.3.1.- Bases histològiques de la histomorfometria òssia.

La histomorfometria òssia és l'anàlisi histològica quantitativa dels diferents elements que integren el teixit ossi: cèl.lules i substància intercel.lular (Serrano 1990).

La preparació de les seccions histològiques òssies requereix l'extracció dels components minerals inorgànics amb solucions àcides. És per aquest motiu que molts dels estudis no han pogut avaluar la qualitat de la mineralització òssia ni les relacions entre els diferents components del teixit ossi. La tècnica d'inclusió de les mostres en metilmetacrilat permet tallar l'os no decalcificat i preservar així les relacions histològiques.

Els fonaments de la histomorfometria òssia es basen en el fet que l'os viu normal està sotmès a una sèrie de processos de canvi com són el creixement, el modelat, el remodelat i la reparació. El remodelat és el procés mitjançant el qual el teixit ossi envellit és substituït per teixit nou. El remodelat es realitza per acoplament dels processos de reabsorció i de neoformació òssia. El volum d'os preexistent que és canviat per os nou es denomina recanvi ossi o *turnover* i la diferència entre el volum d'os format i el reabsorbit per unitat de temps rep el nom de balanç ossi. En el procés d'incorporació dels empelts s'activen inicialment la reabsorció i la neoformació òssia. Posteriorment s'activa el procés de remodelació de l'os neofomat.

Descriurem a continuació la traducció histològica dels diferents processos, que és el que permet la seva identificació en les mostres òssies obtingudes.

a) Fase de neoformació òssia.

Els osteoblasts són els responsables de la neoformació òssia. Són cèl.lules mononucleades i de citoplasma basòfil. Presenten una forma variable (aplanada, cúbica o cilíndrica) en funció de la seva activitat.

La superfície que uneix l'os preexistent amb l'os neoformat s'anomena superfície d'inversió. La formació d'os no és un procés continu sinó que pateix aturades transitòries. La superfície que reflecteix aquestes interrupcions rep el nom de superfície d'aturada i s'identifica en els talls histològics com una línia basòfila llisa.

L'os nou és dipositat inicialment en forma de matriu òssia no mineralitzada que rep el nom d'osteòide. Aquest està format per col.lagen tipus I i proteoglicans. Posteriorment l'osteòide es mineralitza i es forma així l'os madur. La mineralització primària comença en la interfase entre l'osteòide i l'os mineralitzat. Aquest pla s'anomena front de mineralització. La mineralització implica la formació de cristalls d'hidroxiapatita.

b) Fase de reabsorció.

Les cèl.lules responsables de la reabsorció òssia són els osteoclasts. Són cèl.lules grans, multinucleades i amb citoplasma lleugerament acidòfil.

Els osteoclasts excaven l'os i formen unes imatges d'erosió conegudes com a llacunes de Howship. Durant el procés de reabsorció òssia, els osteoclasts es desplacen sobre el teixit ossi mitjançant un moviment de vaivé comparable al del ribot d'un fuster. La superfície de reabsorció que abarca cada osteoclast rep el nom de domini osteoclàstic.

4.3.3.2.- Mesures histomorfomètriques.

La valoració quantitativa de les característiques estructurals i funcionals del teixit ossi ve definida pels paràmetres histomorfomètrics. Per obtenir aquests paràmetres cal efectuar una sèrie de mesures i relacionar-les entre sí. Detallem a continuació les mesures i els paràmetres que hem utilitzat en el nostre estudi.

a) Superfície d'implant (SIM).

Correspon a la superfície del defecte ossi creat. Tenint en compte que aquest té un diàmetre de 6mm i que els talls de les peces incloses en metacrilat són perpendiculars al defecte, la superfície d'implant hauria de ser de $28'26\text{mm}^2$ (àrea d'una circumferència de 3mm de radi). No obstant, la mesura real no sempre coincideix exactament amb aquesta xifra donat que els talls no són sempre perfectament perpendiculars al defecte ossi.

b) Àrea trabecular total (ATT).

És l'àrea que ocupen les trabècules òssies existents en el defecte cavitari creat. Indica la quantitat d'os decalcificat present a l'interior del defecte ossi. La mesura de la superfície trabecular total no diferencia entre os preexistent (en el cas dels empelts) i os neoformat. És per això que sempre cal interpretar aquest valor analitzant els paràmetres de formació d'osteoides.

c) Longitud total d'osteoides (LTO).

És la vora trabecular amb front d'osteoides en les trabècules òssies del defecte. Indica la quantitat de vora trabecular en què es produeix neoformació òssia.

d) Longitud d'osteoides amb osteoblasts cúbics (LOOC).

La presència d'osteoblasts cúbics sobre l'osteoides és indicativa del potencial de neoformació òssia.

e) Amplitud mitja d'osteoides (AMO).

És el gruix mig dels diferents ribets d'osteoides.

4.3.3.3.- Paràmetres histomorfomètrics.

S'obtenen relacionant entre sí les diferents mesures histomorfomètriques. Utilitzem la nomenclatura descrita per Frost.

a) Superfície específica d'os trabecular (Sv)

És la relació entre la superfície trabecular total i la superfície d'implant.

b) Superfície relativa d'osteoides amb osteoblasts cúbics (Sroc).

És la relació entre la superfície trabecular coberta per osteoides amb osteoblasts cúbics i la superfície trabecular coberta per osteoides amb o sense osteoblasts. És el quocient entre la longitud d'osteoides amb osteoblasts i la longitud total d'osteoides.

c) Superfície relativa de formació (Sf).

És la relació entre la longitud total d'osteoides i la superfície trabecular total.

d) Amplada mitja dels ribets trabeculars d'osteoides (AMO).

Frost va proposar el següent càlcul: $WOS = ATO / LTO \times Ct$, on ATO és l'àrea total d'osteoides trabeculars, LTO és la longitud total d'osteoides i Ct és una constant correctora que és 4: número π . Donat que aquesta fórmula és complexa, hem optat per mesurar directament aquest paràmetre. Per això es mesura el gruix d'osteoides en 3 punts diferents i es calcula la mitja.

e) Àrea d'osteoides (Aos).

S'obté multiplicant la longitud total d'osteoides per l'amplitud mitja d'osteoides.

f) Relació àrea trabecular / àrea d'osteoides (Aos / ATT).

És el quocient entre aquestes dues mesures. Dóna idea de l'activitat de neoformació òssia.

4.3.3.4.- Mètode de lectura histomorfomètrica de les mostres.

Totes les mesures histomorfomètriques han estat realitzades per l'autor del treball al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona.

L'equip de digitalització d'imatges que hem utilitzat, acoplat a un microscopi òptic convencional, està format per:

- video-càmera Sony DXC-950P.
- digitalitzador Sony MPU-F100P.
- adaptador Olympus U-SMAD.
- ordinador Pentium II amb sistema Windows'95.

- software Olympus Micro Image versió 1.0 per a Windows.

El programa permet la digitalització directa de les imatges de microscopia i, per tant, les mesures s'efectuen directament sobre el monitor de l'ordinador.



Figura nº 27 : Microscopi òptic connectat al sistema de digitalització d'imatges. Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona.



Figura nº 28 : Equip complet d'histomorfometria òssia. Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Hem realitzat les mesures d'histomorfometria utilitzant la tinció de Von Kossa perquè, en tenyir les trabècules òssies en negre i el ribet osteoide en vermell, proporciona un gran contrast que facilita molt la lectura al microscopi.

Abans d'iniciar cada sessió d'histomorfometria, cal comprovar la correcta calibració del sistema amb ajuda d'un regle de calibració microscòpica de 0,2mm. Es digitalitza la imatge del regle i s'efectuen les mesures, comprovant la correcta calibració del sistema.

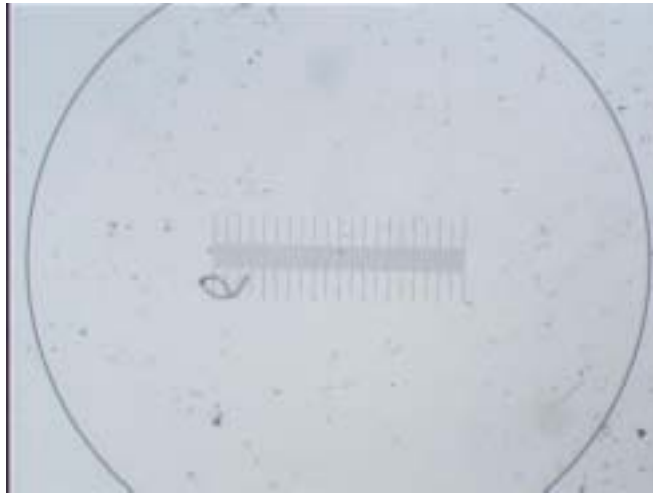


Figura nº 29 : Imatge digitalitzada del regle de calibració que cal utilitzar abans de cada sessió de mesures histomorfomètriques per garantir l'homogeneïtat de les lectures efectuades.

Per poder efectuar les mesures, cal dividir cada mostra de teixit en 6 parts amb l'objectiu de poder-les identificar fàcilment amb el microscopi. Posteriorment, es digitalitza la imatge d'un dels camps i s'obtenen les dades de mesura histomorfomètrica. S'efectuen totes les mesures de forma independent en cadascuna de les 6 parts. El programa informàtic dóna automàticament un resum estadístic de les mesures efectuades i permet traslladar les dades directament a un arxiu del programa de càlcul Excel. Per exemple, per valorar l'àrea trabecular total d'un dels camps, cal mesurar una a una les trabècules òssies que s'observen. El programa informàtic va registrant les mesures i després proporciona dades com la suma de les àrees, la mitja o el nombre total de trabècules.

Les mesures de superfície d'implant i àrea trabecular total es fan amb

10 augments al microscopi; les de longitud total d'osteoides i longitud d'osteoides cobert per osteoblasts cúbics es fan amb 100 augments; la d'amplada mitja d'osteoides es fa amb 400 augments. Cada cop que es canvia l'objectiu cal adaptar la calibració de les mesures al programa informàtic.

Aquest mètode, que permet valorar la totalitat de la mostra, implica la realització d'unes 600 mesures per a cada preparació histològica.

Així s'obtenen totes les mesures histomorfomètriques a partir de les quals podem calcular posteriorment els paràmetres histomorfomètrics i realitzar els càlculs estadístics.

4.3.4.- Anàlisi estadística dels resultats.

Els paràmetres obtinguts en l'estudi histomorfomètric són sotmesos a tractament estadístic. Hem fixat un grau de significació de 0'05, que correspon a un interval de confiança del 95%. Les dades numèriques d'histomorfometria han estat analitzades amb el programa informàtic SPSS.

4.3.4.1.- Anàlisi descriptiva.

S'han analitzat els següents paràmetres: mitja, desviació estàndard, mínim i màxim.

4.3.4.2.- Anàlisi de la normalitat.

Es fan servir proves paramètriques quan les variables són quantitatives i segueixen una distribució normal. El procés d'obtenció de la variable permet assimilar-la a una successió de valors quantitius. Les distribucions normals permeten comparar variables utilitzant la mitja i la variança. Hem utilitzat el **test d'anàlisi de la variança**. Hem aplicat també el **test de Levène**, que valora

l'homogeneïtat de la variància entre les diferents mostres. La positivitat d'aquest test no es considera determinant, però dóna reforça el resultat obtingut.

4.3.4.3.- Test de la T de Student.

El test de la T de Student permet valorar les mostres aparellades que segueixen una distribució normal.

5.- Resultats.

Analitzarem per aquest ordre els resultats obtinguts amb la radiologia, la histologia i la histomorfometria òssia. La discussió i les conclusions finals es basen en l'anàlisi estadística dels resultats histomorfomètrics. La histomorfometria és la tècnica que permet obtenir dades numèriques del procés de reparació dels defectes ossis.

5.1.- Radiologia. Avaluació radiològica per grups.

Al final del capítol de resultats s'exposen les taules de valoració radiològica dels diferents grups segons l'escala de Goldberg (apartat 5.4.1). Com veurem més endavant, creiem que la radiologia és una tècnica a tenir en compte com a control i per a la detecció d'esdeveniments majors (fractura òssia, aparició de calcificacions extraòssies, dipòsit de biomaterial als teixits tous), però no és prou precisa per extreure conclusions sobre el procés de regeneració òssia.

Sí podem destacar quant als resultats radiològics que no hem observat en cap cas la reabsorció completa de l'implant, ja sigui empelt ossi o ciment.

Destaca el fet que en 3 exemplars (50%) del grup de ciment de fosfat càlcic 4 setmanes l'implant sembla intacte en les radiografies. El mateix passa amb 2 exemplars (33%) del grup de ciment de fosfat càlcic 12 setmanes. Això dóna idea de la lentitud del procés de substitució del biomaterial per os neoformat (figura 30).



Figura nº 30: Radiografies de front i perfil del exemplars Ci1204, Ci1205 i Ci1206 (grup ciment de fosfat càlcic 12 setmanes). En el primer exemplar s'observa clarament la presència de ciment residual que ocupa una part del defecte ossi.

5.2.- Histologia.

5.2.1.- Autoempelt ossi.

En general, l'estudi histològic mostra una neoformació òssia important, present en totes les mostres analitzades. S'observa la presència de cèl.lules adiposes i hematopoètiques, així com de trabècules òssies ben connectades amb les que envolten el defecte creat. Els ribets d'osteoides són abundants i homogèniament distribuïts, amb una gran part coberta per osteoblasts cúbics, fet que indica la seva elevada capacitat de neoformació òssia (figura 32).

La neoformació òssia és homogènia i progressiva, amb un ribet osteoide no excessivament gruixut, fet que indica un correcte procés de mineralització.

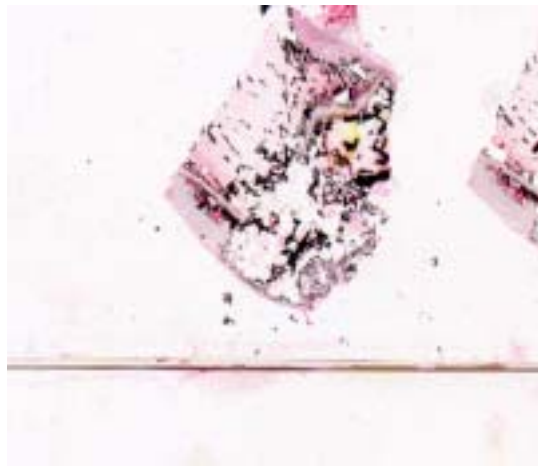
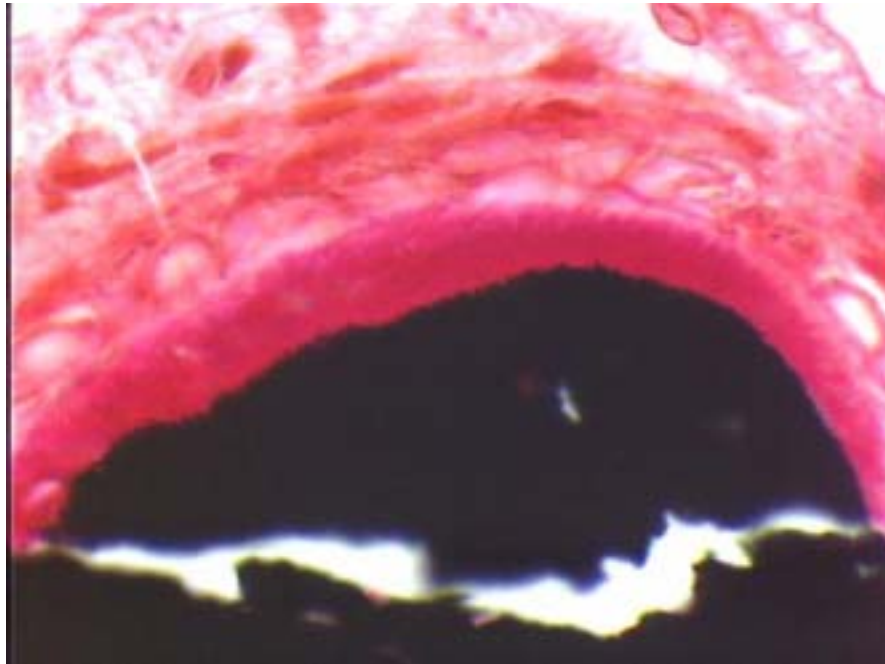


Figura nº 31: Preparació histològica corresponent al grup Au04 sense cap augment.

S'observa una distribució força homogènia de trabècules en el defecte ossi.



*Figura nº 32: Preparació histològica corresponent al grup Au04 (Von Kossa 400x).
S'observa un ribet d'osteoides homogeni cobert per osteoblasts cúbics.*

5.2.2.- Al.loempelt ossi.

En els 12 animals del grup d'al.loempelt ossi s'observa també neoformació òssia però, com veurem més endavant, en general és un procés que podríem qualificar de més "pobre" que en el grup d'autoempelt (figures 33 a 36): la quantitat global d'osteoides és proporcionalment inferior, així com la taxa de recobriment de l'osteoides amb osteoblasts cúbics. Una part important de les trabècules òssies no mostra cap signe d'activitat osteoblàstica (figura 36).



Figura nº 33: Preparació histològica corresponent al grup A104 sense cap augment.

S'observa l'àrea del defecte ossi i algunes trabècules formades des de la perifèria.

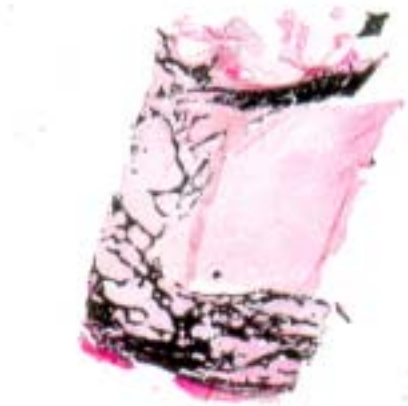


Figura nº 34: Preparació histològica corresponent al grup A112 sense cap augment.

S'observa una regeneració òssia parcial en conjunt més pobre que en els grups d'autoempelt.

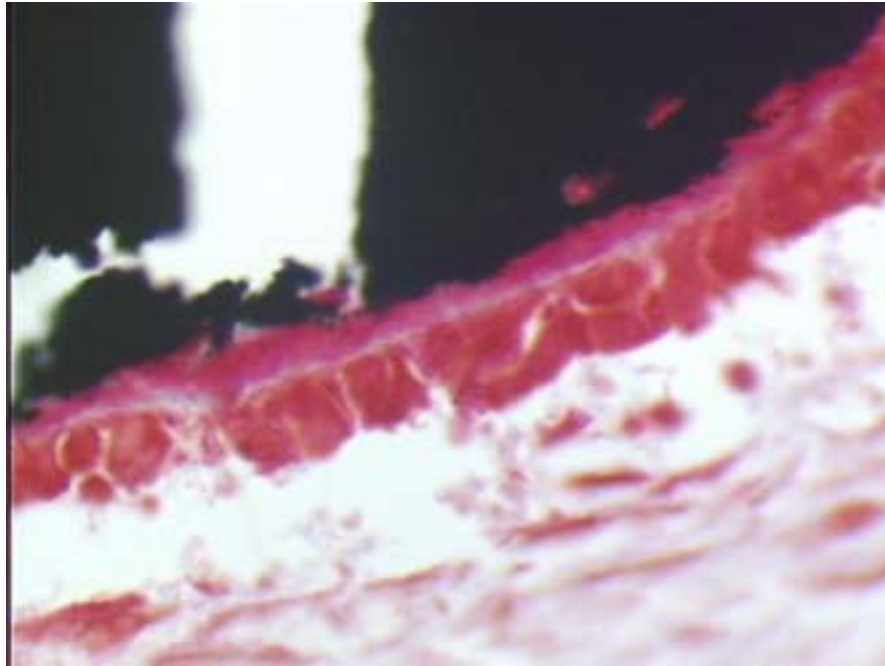


Figura nº 35: Preparació histològica corresponent al grup A104 (Von Kossa 200x). Osteoide cobert per osteoblasts cúbics.

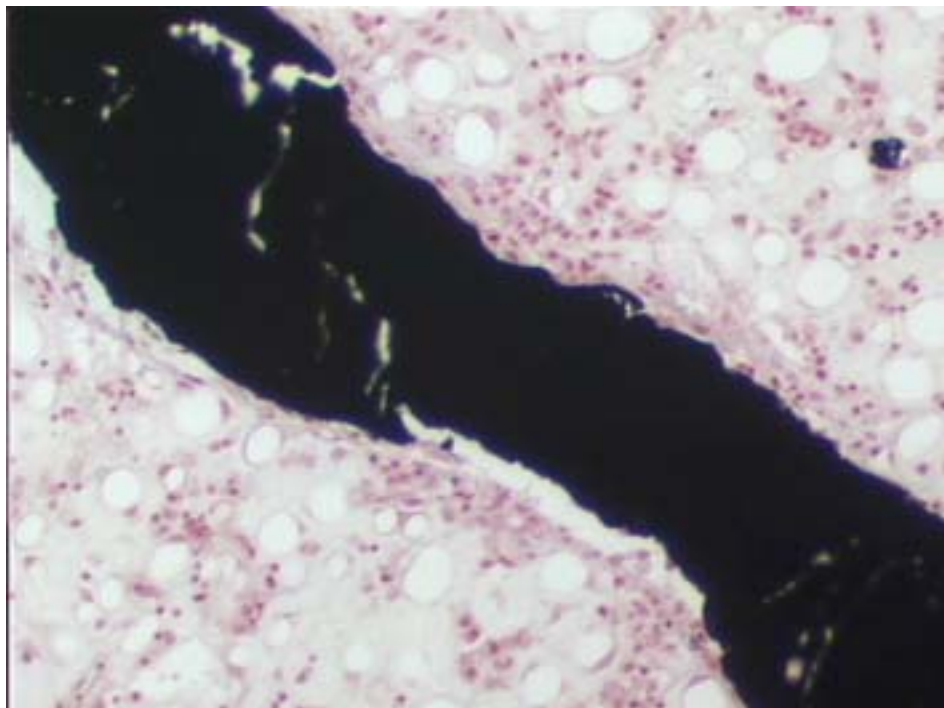


Figura nº 36: Preparació histològica corresponent al grup A112 (Von Kossa 100x). S'observa una trabècula òssia sense cap signe de d'activitat osteoblàstica.

5.2.3.- Ciment de fosfat càlcic.

Quant a la histologia voldríem destacar especialment l'enllaç directe que es produeix entre el biomaterial i les trabècules òssies que l'envolten. No hem observat en cap cas la presència d'una interfase fibrosa que separi el ciment de fosfat càlcic de l'os (figures 45 i 46).

Si bé caldrà precisar alguns aspectes concrets (com farem més endavant en analitzar les dades histomorfomètriques), globalment podríem dir que el comportament del biomaterial ha estat satisfactori, amb absència de fenòmens inflamatoris (de rebuig) i una correcta i progressiva substitució per os neoformat (figures 40, 41 i 42).

Destaca com a dada rellevant que el gruix d'osteòide en el grup Ci04 (ciment 4 setmanes) és força elevat (figura 38). Això podria indicar l'existència d'alguna dificultat en el procés de calcificació de l'osteòide que es fa formant. Les imatges són en alguns casos extraordinàriament semblants a les que es poden observar en l'os osteomalàcic (figura 39), en el qual el dèficit vitamínic dificulta la calcificació de l'osteòide.

Cal fer esment també de l'aparent lentitud del procés de reabsorció del biomaterial, ja que a les 12 setmanes s'observa encara una quantitat notable de ciment de fosfat càlcic intacte a l'interior del defecte òssi (figures 43 i 44).

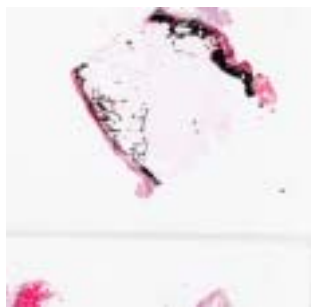


Figura nº 37: Preparació histològica corresponent al grup Ci04 sense cap augment. Comença la regeneració òssia des de la perifèria del defecte.

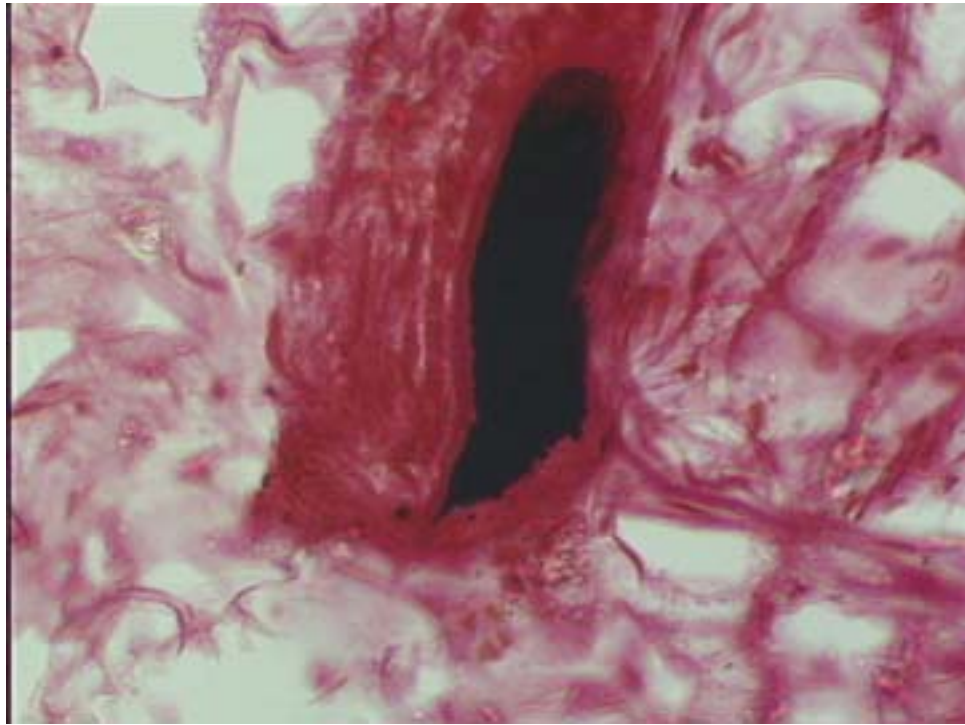


Figura nº 38: Preparació histològica corresponent al grup Ci04 (Von Kossa 200x). S'observa un osteoide molt gruixut amb més de 4 capes lamelars. Imatge semblant a la de l'osteomalàcia, que pot indicar dificultats en el procés de calcificació.

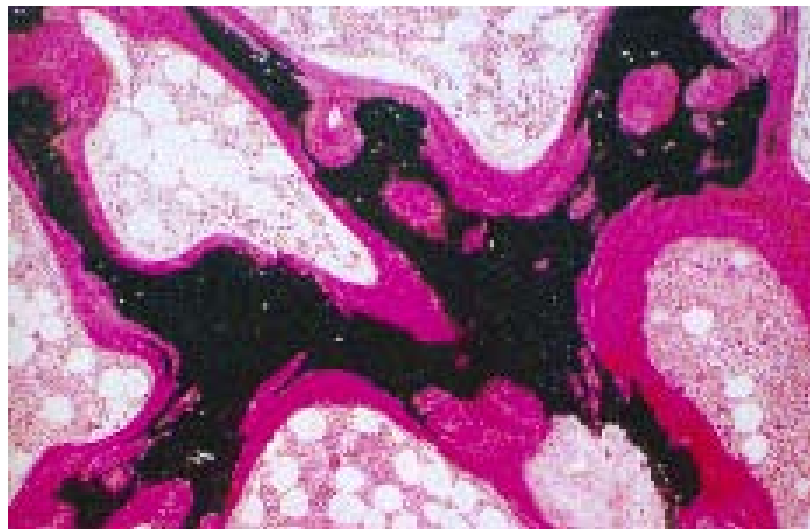


Figura nº 39: Osteomalàcia. Tinció Von Kossa 250x. S'observa l'augment en la quantitat i en el gruix d'osteoide. Reproduït de Serrano S: Histopatología de la osteomalacia. En Serrano S.; Aubià J.: Patología òsea metabólica. Ed. Doyma. Barcelona, 1990.

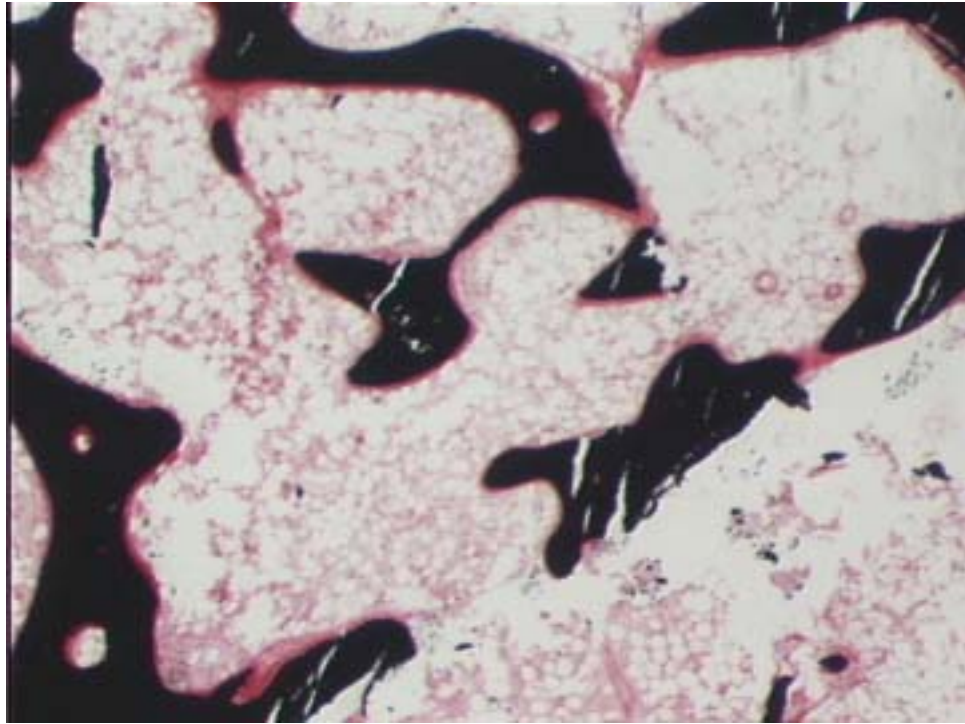


Figura nº 40 : Imatge corresponent al grup Ci04 (Von Kossa 20x). S'observen trabècules òssies neoformades amb abundant osteoide.

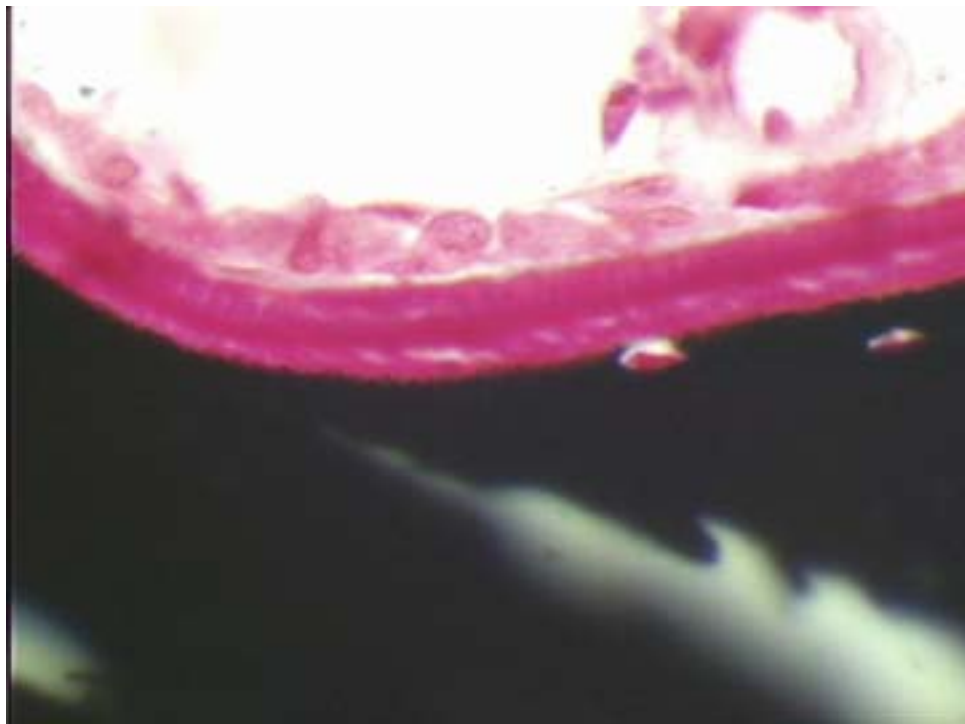


Figura nº 41: Grup Ci04 (Von Kossa 400x). Trabècula òssia coberta per osteoide i osteoblasts.



Figura nº 42: Grup Ci12 (Von Kossa 400 x). S'observa el ribet d'osteoide cobert per osteoblasts cúbics.

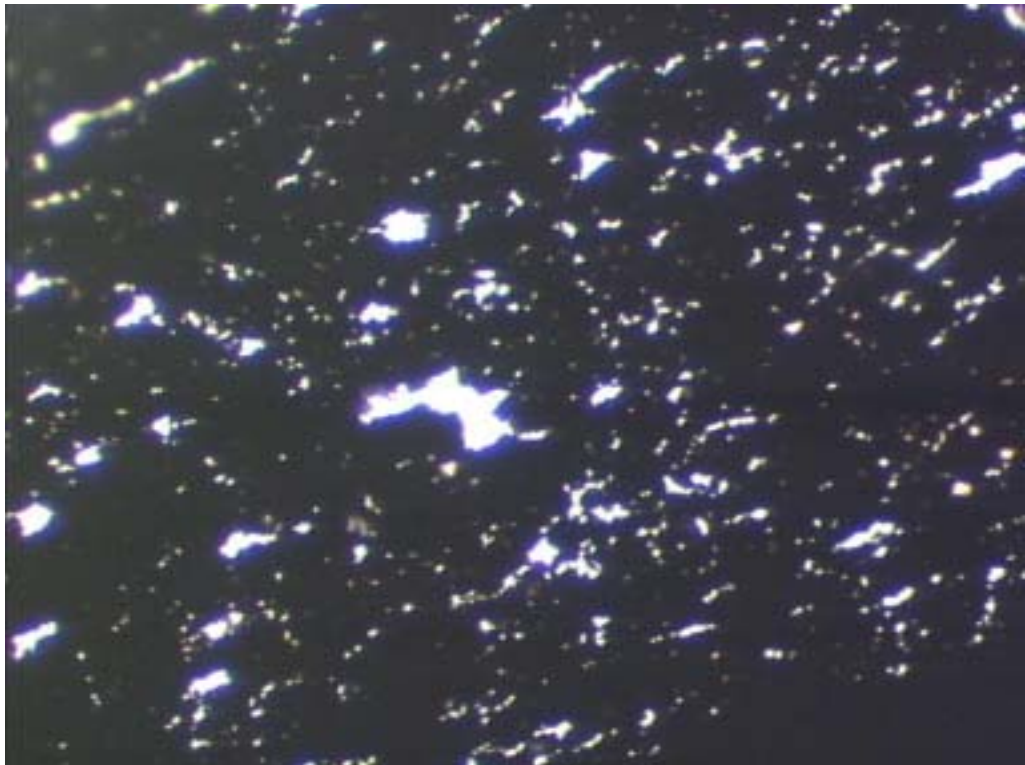
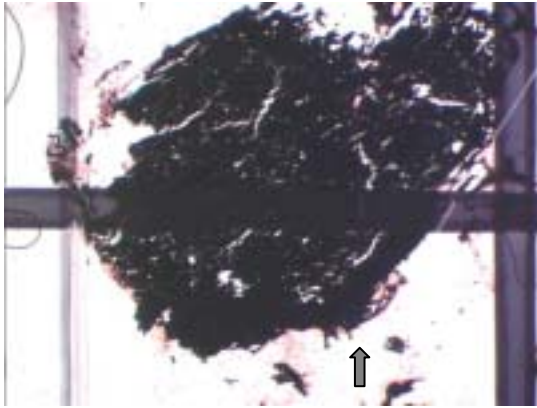
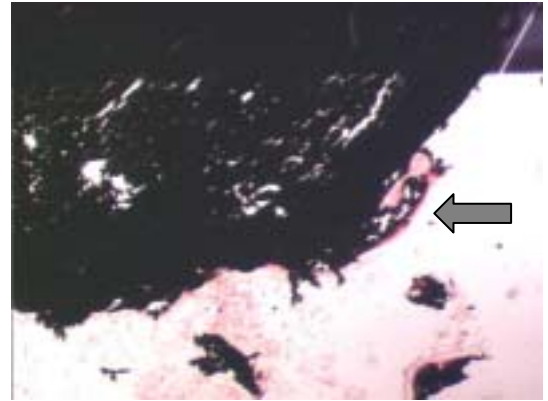


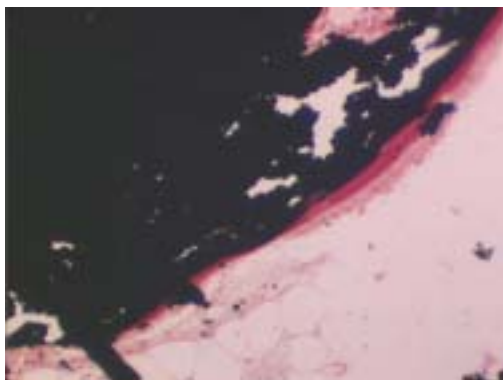
Figura nº 43: Grup Ci12 (Von Kossa 100 x). Ciment de fosfat càlcic no reabsorbit 12 setmanes després de l'implant. S'observa la porositat del material.



*Figura nº 44: Grup Ci12.
Tinció Von Kossa a 10 augments.
Ciment de fosfat càlcic no
reabsorbit 12 setmanes després de
l'implant.*



*Figura nº 45: Grup Ci12.
Tinció Von Kossa a 20 augments.
Ens centrem a l'angle inferior dret
de la imatge precedent. S'intueix la
presència de ribet osteoide i
trabècula òssia en continuïtat
directa amb el ciment (fletxa).*



*Figura nº 46: Grup Ci12.
(Von Kossa 100x) No es distingeix
cap interfase entre el ciment de
fosfat càlcic i la trabècula
neoformada amb el seu ribet amb
osteoblasts cúbics.*

5.2.4.- Grup control.

Ha servit per confirmar la utilitat del model experimental, ja que la regeneració òssia és gairebé nul·la a les 4 setmanes i extraordinàriament pobre a les 12 setmanes (figs. 47 i 48). Hem observat molt poques trabècules neoformades a la perifèria del defecte i molt escassa activitat osteoblàstica.



Figura nº 47: Grup Co04 (sense implant) (Von Kossa 1x). S'observa l'àrea del defecte ossi amb regeneració gairebé nul·la.



Figura nº 48: Grup Co04 (Von Kossa 10x). Escassa regeneració òssia a l'interior del defecte.

5.3.- Histomorfometria òssia.

5.3.1.- Mesures i paràmetres histomorfomètrics.

Les mesures histomorfomètriques són les lectures que es fan directament sobre la imatge microscòpica digitalitzada. Ja hem descrit anteriorment el procés que hem utilitzat per practicar les mesures (apartat 4.3.3.4). De totes les mesures que hem realitzat sobre cada preparació, presentem al final del capítol (apartat 5.4.2) les taules de valors obtinguts per a cada un dels 6 segments en què es van dividir les preparacions microscòpiques dels 36 animals analitzats.

Els paràmetres histomorfomètrics són els valors que s'obtenen aplicant càlculs a partir de les mesures histomorfomètriques realitzades. Les taules de valors obtinguts estan expressades al final del capítol de resultats (apartat 5.4.3).

També al final del capítol (apartat 5.4.5) exposem els càlculs estadístics tal com els expressa el programa informàtic SPSS, amb els valors obtinguts per a cada grup quant al grau de significació estadística amb el test de la t de Student o l'anàlisi de la variància segons el cas i també el test de Levène d'homogeneïtat de variàncies.

5.3.2.- Interpretació de les dades estadístiques.

Hem ordenat els diferents càlculs estadístics en sis apartats diferents en funció dels paràmetres analitzats. Cal tenir en compte que la significació estadística (expressada com a "p") s'obté mitjançant l'anàlisi de la variància quan es comparen grups sencers (per exemple, els grups de 4 setmanes

amb els grups de 12 setmanes) i mitjançant el test de la T de Student quan es comparen mostres aparellades (per exemple, el grup Ci12 amb el grup Al12). S'expressa sempre el resultat del test de Levène d'homogeneïtat de les mostres (L.V. indica test de Levène vàlid). El valor que expressem en els quadres és el del grau de significació estadística "p", destacant-lo en negreta que s'observen diferències estadísticament significatives.

5.3.2.1.- Anàlisi dels valors de superfície específica d'os trabecular (Sv).

	Au04	Al04	Ci04	4 set.
Au12	0,821 (LV)			
Al12		0,140 (LV)		
Ci12			0,109 (LV)	
12set				0,124 (LV)

Anàlisi de la variança:

- Grups 4 setmanes: $p=0,3469$ (LV)
- Grups 12 setmanes: $p=0,5487$ (LV)

Conclusions:

- El test de Levène es compleix en totes les mostres analitzades, fet que reforça el resultat estadístic.
- No s'observen diferències estadísticament significatives entre els valors de superfície específica d'os trabecular en els diferents grups d'implants (autoempelt, al.loempelt i ciment).
- No s'observen diferències estadísticament significatives entre els valors obtinguts a les 4 setmanes i a les 12 setmanes.

5.3.2.2.- Anàlisi dels valors de superfície relativa d'osteoides amb osteoblasts cúbics (Sroc).

	Au04	Al04	Ci04	4 set.
Au12	<0,001			
Al12		0,018		
Ci12			0,431	
12set				<0,001

Anàlisi de la variança:

- Grups 4 setmanes: $p=0,0571$
- Grups 12 setmanes: $p=0,2274$

Conclusions:

- El test de Levène es vulnera en totes les mostres analitzades, fet que indica que els valors de superfície relativa d'osteoides amb osteoblasts cúbics no es distribueixen de forma homogènia en els diferents grups.

- No s'observen diferències estadísticament significatives entre en els diferents grups d'implants (autoempelt, al.loempelt i ciment).

- Els valors obtinguts a les 12 setmanes són inferiors als obtinguts a les 4 setmanes, amb diferències estadísticament significatives. Aquest paràmetre és indicatiu d'activitat de neoformació òssia. Podem dir, per tant, que l'activitat neoformadora és major a les 4 setmanes que a les 12 setmanes.

5.3.2.3.- Anàlisi dels valors de superfície relativa de formació (Sf).

	Au04	Al04	Ci04	4 set.
Au12	0,150			
Al12		0,021		
Ci12			0,607	
12set				0,053

Anàlisi de la variança:

- Grups 4 setmanes: $p=0,6386$
- Grups 12 setmanes: **$p=0,0077$**

Conclusions:

- El test de Levène es vulnera en totes les mostres analitzades, fet que indica que, per als valors de superfície relativa de formació, la distribució de les variàncies no és homogènia.

- No s'observen diferències estadísticament significatives entre els valors de superfície relativa de formació en els diferents grups d'implants (autoempelt, al.loempelt i ciment) a les 4 setmanes, però sí a les 12 setmanes, quan el valor en el grup d'al.loempelt és molt baix.

- El valor de superfície relativa de formació en grup Al12 és inferior al del grup Al04, amb diferències estadísticament significatives.

5.3.2.4.- Anàlisi dels valors d'àrea d'osteoides (Aos).

	Au04	Al04	Ci04	4 set.
Au12	0,039			
Al12		0,006		
Ci12			0,177 (LV)	
12set .				0,372 (LV)

Anàlisi de la varianza:

- Grups 4 setmanes: $p=0,6837$
- Grups 12 setmanes: **$p < 0,01$**

Conclusions:

- El test de Levene no es compleix sempre, fet que indica que en alguns casos la distribució de les variàncies no és homogènia.

- No s'observen diferències estadísticament significatives entre els valors d'àrea d'osteoides en els diferents grups d'implants (autoempelt, al.loempelt i ciment) a les 4 setmanes, però sí a les 12 setmanes, degut a que el grup Al12 obté un valor molt baix.

- Per als grups d'autoempelt, el valor d'àrea d'osteoides és superior a les 12 setmanes que a les 4 setmanes, amb diferències estadísticament significatives. En els grups de ciment de fosfat càlcic, els valors també són superiors a les 12 setmanes, però les diferències no són significatives.

- En canvi, en els grups d'al.loempelt, el valor d'àrea d'osteoides és inferior a les 12 setmanes que a les 4 setmanes, amb diferències estadísticament significatives.

5.3.2.5.- Anàlisi dels valors de relació entre àrea trabecular

i àrea d'osteoides (AOs / ATT).

	Au04	Al04	Ci04	4 set.
Au12	0,702 (LV)			
Al12		0,012		
Ci12			0,601	
12set				0,267 (LV)

Anàlisi de la variància:

- Grups 4 setmanes: $p=0,7298$
- Grups 12 setmanes: **$p=0,0016$**

Conclusions:

- El test de Levene no es compleix sempre, fet que indica que la distribució de les variàncies no és homogènia en alguns casos.

- No s'observen diferències estadísticament significatives entre els valors en els diferents grups d'implants (autoempelt, al.loempelt i ciment) a les 4 setmanes, però sí a les 12 setmanes, degut al baix valor mesurat en el grup d'al.loempelt.

- Aquest mateix valor fa que hi hagi diferències significatives entre la relació AOs / ATT a les 4 i 12 setmanes per al grup d'al.loempelt.

5.3.2.6.- Anàlisi dels valors d'amplada mitja d'osteoides (AMO)

Relació Au04-Ci 04: **p<0,01**

Relació Al04-Ci04: **p<0,01**

Anàlisi de la variança:

- Grups 4 setmanes: **p<0,01**

- Grups 12 setmanes: **p<0,01**

Conclusions:

- S'observen diferències estadísticament significatives entre els valors d'amplada mitja d'osteoides en els diferents grups d'implants (autoempelt, al.loempelt i ciment), tant a les 4 com a les 12 setmanes.

- El grup de ciment 4 setmanes mostra un valor d'amplada mitja d'osteoides més elevat que la resta (autoempelt i al.loempelt 4 setmanes), amb diferències estadísticament significatives.

5.3.3.- Valoració dels resultats histomorfomètrics.

L'estudi histològic i histomorfomètric de les mostres permet conèixer amb detall la regeneració òssia dels diferents grups. En el grup control (sense implant) hem pogut observar la persistència del defecte òssi en tots els exemplars i per tant l'absència de regeneració espontània de l'os amb el model experimental utilitzat. Aquesta observació coincideix plenament amb la dels autors que van descriure el model experimental (Katthagen 1986).

En la resta de grups (empelts i ciment) hem pogut observar una regeneració òssia progressiva (superior en els grups de 12 setmanes) i centrípeta. Així, en les primeres fases s'observa os neofomat sobretot a la perifèria del defecte. La major part de la regeneració òssia es produeix al llarg de les primeres 4 setmanes i, tot i que després el procés segueix endavant, ho fa a un ritme molt inferior. Tant és així que les diferències observades entre els valors de superfície específica d'os trabecular a les 4 i a les 12 setmanes no són estadísticament significatives (capítol 5.3.2.1).

El grup en què s'observa major taxa de regeneració òssia (superfície específica d'os trabecular –figura 49-), tant a les 4 (20,27%) com a les 12 setmanes (26,06%), és el d'autoempelt ossi. No obstant, les diferències observades no són estadísticament significatives. D'aquesta observació es pot deduir que, en el nostre model experimental, el ciment de fosfat càlcic ha permès obtenir una taxa de regeneració òssia equivalent a la dels empelts.

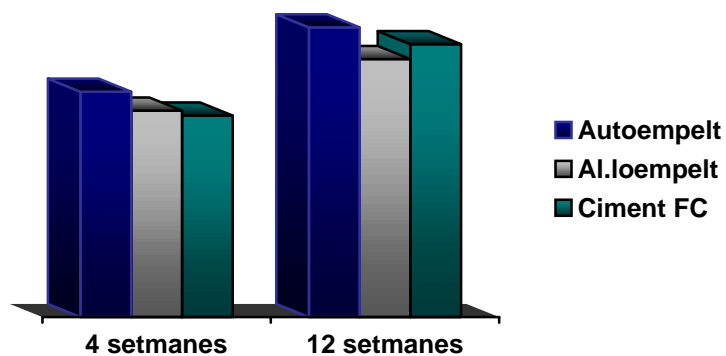


Figura nº 49: Gràfic comparatiu de superfície específica d'os trabecular (Sv). Representa la regeneració òssia global obtinguda en cada grup a les 4 i a les 12 setmanes. Els valors sempre són superiors en els grups d'autoempelt, però amb diferències no estadísticament significatives.

Destaca el fet que, a les 4 setmanes, l'ordre pel que fa a la taxa global

de regeneració òssia és autoempelt-al.loempelt-ciment de fosfat càlcic. En canvi, a les 12 setmanes, el grup de ciment de fosfat càlcic obté un valor intermig (24,55%) entre el de l'autoempelt (26,06%) i el de l'al.loempelt (23,21%). Aquestes diferències no són, però, estadísticament significatives.

La proporció de ribet osteoide cobert per osteoblast cúbics (ribet actiu) és màxima en el grup d'autoempelt 4 setmanes. De nou les diferències entre els grups no són estadísticament significatives (capítol 5.3.2.2), però sí ho són les diferències entre els grups de 4 i 12 setmanes ($p < 0,001$). L'activitat de neoformació òssia és major a les 4 setmanes que a les 12 setmanes. Segueix, per tant, un ritme decreixent en el temps (figura 50).

En el grup de ciment de fosfat càlcic hem obtingut resultats equivalents als dels grups amb empelt ossi (diferències no significatives). Això implica que l'activitat de neoformació òssia és semblant en els tres grups.

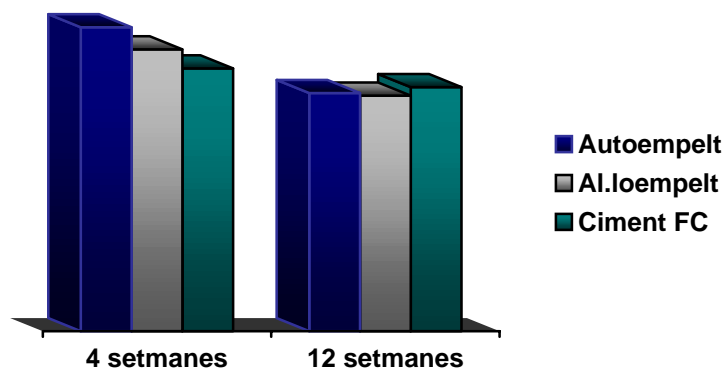


Figura n° 50: Gràfic comparatiu de superfície relativa d'osteoides amb osteoblasts cúbics (Sroc). És un paràmetre indicatiu d'activitat de neoformació òssia. Aquesta activitat és superior en els grups de 4 setmanes que en els de 12 setmanes ($p < 0,001$).

Si analitzem les dades de la superfície relativa de formació (relació entre la quantitat global de trabècules i la longitud total d'osteoides) destaca una

xifra molt baixa (0,064%) en el grup d'al.loempelt 12 setmanes (figura 51). És a dir, a les 12 setmanes, el grup d'al.loempelt mostra una quantitat molt pobra d'osteoides en comparació amb els altres dos grups. Aquesta diferència és estadísticament significativa ($p < 0,05$) (capítol 5.3.2.3).

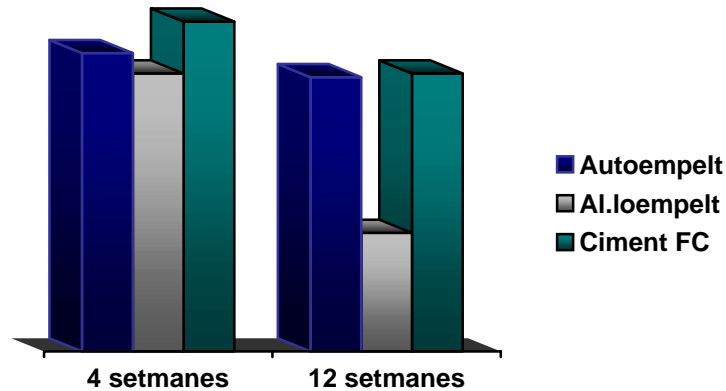


Figura nº 51: Gràfic comparatiu de la superfície relativa de formació. Destaca un valor molt pobre en el grup d'al.loempelt 12 setmanes ($p < 0,05$).

El mateix passa en analitzar l'àrea d'osteoides (longitud per gruix) i la relació entre l'àrea d'osteoides i l'àrea trabecular (figures 52 i 53); la xifra és molt inferior en el grup d'al.loempelt 12 setmanes respecte als grups d'autoempelt i de ciment, amb diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) (capítols 5.3.2.4 i 5.3.2.5).

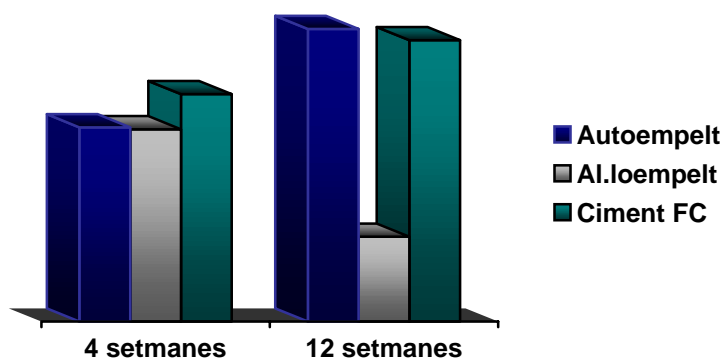


Figura nº 52: Gràfic comparatiu de l'àrea d'osteoides. De nou trobem que el valor del grup Al.loempelt 12 setmanes és molt inferior al dels altres grups ($p < 0,05$).

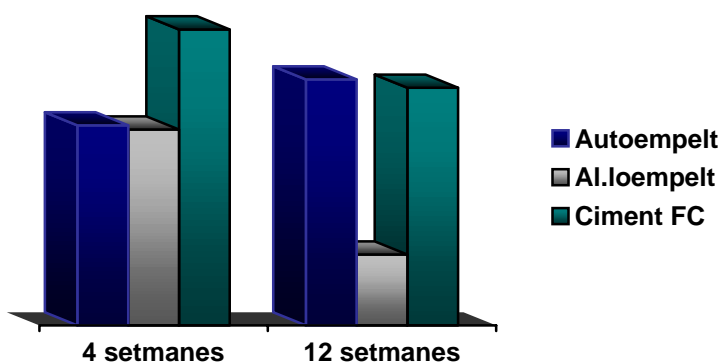


Figura nº 53: Gràfic comparatiu de la relació entre l'àrea d'osteoides i l'àrea trabecular. Les diferències entre els grups de 12 setmanes són estadísticament significatives.

Dos són els paràmetres histomorfomètrics directament indicatius d'activitat osteoblàstica: la superfície relativa d'osteoides amb osteoblasts cúbics i la relació entre l'àrea d'osteoides i l'àrea trabecular. En analitzar-los, observem que globalment el grup que obté millors resultats és el de l'autoempelt ossi, seguit molt de prop pel grup de ciment de fosfat càlcic, amb diferències no estadísticament significatives. El grup d'al.loempelt obté un resultat equivalent al dels altres a les 4 setmanes, però molt més pobre a les 12 setmanes, diferències que sí són significatives ($p < 0,01$).

5.4.- Taules de resultats.

5.4.1.- Radiologia.

En les següents taules mostrem la valoració radiològica dels diferents grups segons l'escala de Goldberg.

Grup Au04: autoempelt 4 setmanes.

<u>Aspecte radiològic escala Goldberg</u>	<u>nº exemplars</u>
Reabsorbit (0 punts)	0
Parcialment reabsorbit (1 punt)	3
Intacte (2 punts)	2
Reorganitzat (3 punts)	1

Total punts: 10.

Grup Al04: al.loempelt 4 setmanes.

<u>Aspecte radiològic escala Goldberg</u>	<u>nº exemplars</u>
Reabsorbit (0 punts)	0
Parcialment reabsorbit (1 punt)	3
Intacte (2 punts)	3
Reorganitzat (3 punts)	0

Total punts: 9.

Grup Ci04: ciment fosfat càlcic 4 setmanes.

<u>Aspecte radiològic escala Goldberg</u>	<u>nº exemplars</u>
Reabsorbit (0 punts)	0
Parcialment reabsorbit (1 punt)	2
Intacte (2 punts)	3
Reorganitzat (3 punts)	1

Total punts: 11.

Grup Au12: autoempelt 12 setmanes.

<u>Aspecte radiològic escala Goldberg</u>	<u>nº exemplars</u>
Reabsorbit (0 punts)	0
Parcialment reabsorbit (1 punt)	1
Intacte (2 punts)	2
Reorganitzat (3 punts)	3

Total punts: 14.

Grup Al12: al.loempelt 12 setmanes.

<u>Aspecte radiològic escala Goldberg</u>	<u>nº exemplars</u>
Reabsorbit (0 punts)	0
Parcialment reabsorbit (1 punt)	2
Intacte (2 punts)	2
Reorganitzat (3 punts)	2

Total punts: 12.

Grup Ci12: ciment fosfat càlcic 12 setmanes.

<u>Aspecte radiològic escala Goldberg</u>	<u>nº exemplars</u>
Reabsorbit (0 punts)	0
Parcialment reabsorbit (1 punt)	1
Intacte (2 punts)	2
Reorganitzat (3 punts)	3

Total punts: 14.

5.4.2.- Mesures histomorfomètriques.

Presentem a continuació les taules de mesures histomorfomètriques.

Les xifres numèriques fan referència a cada una de les sis àrees en què s'ha dividit cada preparació per poder efectuar les mesures. Al final de cada grup s'expressen els totals (la mitja per a la mesura de gruix d'osteoides i sumatoris en tots els altres apartats).

Les dades estan expressades amb les següents inicials:

	Unitats
SIM: superfície d'implant (àrea del defecte ossi creat).	μm^2
ATT: àrea trabecular total.	μm^2
LTO: longitud total d'osteoides.	μm
LOOC: longitud d'osteoides cobert per osteoblasts cúbics.	μm
AMO: amplada mitja d'osteoides.	μm

Grup Autoempelt 4 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	SIM	ATT	LTO	LOOC	AMO
Au0401	7192015	1656646	4639	3421	2,31
	9500335	2639518	3139	2878	2,99
	3643361	1229142	4894	4125	3,11
	18020291	2042252	2421	1846	2,75
	16933871	278905	1548	1112	3,12
	12421251	1905691	1245	991	2,39
	Au0402	10436498	1073265	5069	3113
14475388		1481311	5332	3229	2,25
12415645		896968	2037	1562	2,38
16833542		3364006	5824	4292	2,64
11393890		3102328	5287	2103	1,76
815754		540855	1869	1087	3,76
AU0403		8563266	3360365	2843	2354
	12782051	6841349	3638	3371	3,4
	18753459	6003645	4439	3231	3,81
	18226590	4395199	2474	2136	3,49
	13920457	4134351	4867	4329	2,61
	12651956	3416137	6686	5896	4,05
	Au0404	13531254	1546859	4431	3115
11456853		2453218	5329	2844	2,84
18143128		2846543	6835	3127	2,39
9214778		1103258	4221	3944	2,41
16112139		1649994	5886	4475	3,99
11456564		2499781	6427	4543	4,37
Au0405		11963509	4873068	2667	2114
	18887810	3797510	3321	2649	2,91
	12998930	5167304	6349	5699	2,8
	15219713	2388310	1847	1186	3,03
	18189346	2312976	2354	1715	3,28
	16909183	2441401	1740	1434	2,87
	Au0406	14541338	2348846	6125	4453
18128174		2654812	7584	5211	2,66
11544389		1489654	5458	3649	3,87
11349331		2846249	5548	5321	2,4
12554569		3495320	6894	3155	2,17
13225287		1871425	3579	3158	3,08
TOTAL		474405915	96148461	154846	112868

Grup A1.loempelt 4 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	SIM	ATT	LTO	LOOC	AMO
AI0401	12003518	1807635	6353	5420	3,72
	16937688	2298997	8956	6463	3,82
	18866217	3076432	6588	5082	2,86
	14545844	2851930	6590	3157	3,01
	15783308	522401	1953	1534	3,66
	16193179	1968235	3876	2602	1,95
AI0402	14859219	1883918	1209	565	3,47
	15337276	2943959	2182	1479	2,46
	13777031	4415984	5937	4408	4,12
	12980755	3473554	5570	3956	3,12
	15232410	1589965	1763	672	3,54
	18582711	2434159	1907	1232	2,04
AI0403	10026875	896909	334	129	3,08
	17910206	8265403	5906	3029	3,55
	16360636	8294554	3157	2401	4,28
	14571190	2131227	3924	3128	3,71
	15748087	2855241	3655	2841	3,21
	19598076	3376824	3445	1929	2,95
AI0404	7981378	3325896	1406	928	3,12
	15481125	4174510	3558	3111	3,55
	12683745	1292061	1349	984	2,85
	18808338	5470945	2274	1827	3,4
	18924172	3579032	1084	881	3,21
	14688377	5490413	4775	3421	3,15
AI0405	12248977	1846684	1435	1148	3,36
	16544863	1654876	1178	846	2,8
	17118846	2412354	1654	1362	1,89
	11128943	846283	496	227	2,03
	17444319	1942245	1197	586	3,58
	15561328	2894247	2434	1825	3,41
AI0406	11390751	477077	10811	9269	2,52
	18762071	398897	4927	2916	2,43
	4629895	877218	5760	3643	2,01
	8377083	2229285	14740	8441	4,48
	18160746	3478004	13376	7130	3,48
	13934721	1531508	2745	1802	1,99
TOTAL	533183904	99008862	148504	100374	3,1058

Grup Ciment de fosfat càlcic 4 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	SIM	ATT	LTO	LOOC	AMO
Ci0401	16754258	1507154	3833	2587	5,36
	7544609	1756246	2349	1928	4,54
	11576492	3686214	4724	4103	3,7
	17182773	978263	1437	1125	3,9
	6399125	642268	934	628	4,15
	7221688	485580	1228	899	3,91
	Ci0402	10359906	4387675	9861	2197
12867566		2390755	7892	3452	3,53
14226614		663521	3035	1549	3,88
16320687		2717768	7844	3852	4,51
8080930		2494916	5282	1843	3,39
8301854		2904739	7136	2262	4,8
Ci0403		12664629	1985963	1744	1438
	7017835	2526422	2331	1946	3,89
	15990477	2216292	2814	2481	3,71
	13412022	2609939	4380	3727	4,43
	15471767	1624575	11822	8490	3,62
	11992429	1883542	7551	6488	3,8
	Ci0404	16701026	2563290	1234	943
12974266		2772269	1776	1349	4,02
7778858		1041323	993	756	3,84
12795969		181187	644	328	4,08
13220583		2185538	2894	2112	3,71
17128720		1790386	3362	2471	4,31
Ci0405		16036656	2209708	1776	673
	17503274	1843947	2150	1281	4,24
	13297633	1261918	1894	1332	3,98
	8322733	1301372	2343	1609	3,58
	17300784	875559	1682	1137	4,28
	10556001	3320770	3471	2190	3,37
	Ci0406	9713170	2407120	2570	1856
5793019		2263505	2285	1669	3,98
7693820		3480890	4827	3122	3,74
8222569		4405686	8154	6491	4,07
6954961		4576904	5328	3849	3,79
9945380		1153666	3474	2227	4,08
TOTAL		425325083	77096870	137054	86390

Grup Autoempelt 12 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	SIM	ATT	LTO	LOOC	AMO
Au1201	11134468	8891360	19909	15166	4,86
	14544797	3735014	14051	9081	5,23
	9296716	2949507	3737	1897	3,62
	15339592	2666604	2333	1438	3,02
	12189100	6691528	13049	9838	3,94
	12043451	1849449	1826	1135	3,63
Au1202	12625151	3247740	2728	1339	1,97
	11759796	254829	721	397	3,86
	9384841	3201514	1156	793	2,84
	13385876	3399020	1779	1172	3,39
	13166739	220277	499	293	3,47
	12251678	3291567	4750	1244	3,13
Au1203	15897532	3722928	13434	6397	3,17
	11681605	2340767	9167	4368	4,99
	16233385	4950753	7964	1689	3,89
	11550487	2026922	2780	1410	3,04
	13896898	551604	2163	1101	2,97
	12393412	4202537	4004	2816	4,25
Au1204	17618697	6179895	9103	5456	4,76
	18072113	2523248	2718	1727	3,49
	13268878	1612537	3576	2546	5,23
	13140781	7391590	6153	2746	4,58
	13319218	2491765	2969	1482	4,17
	16569909	3632452	7646	2496	5,77
Au1205	7136196	2600957	365	291	3,74
	8779817	4853788	1660	311	6,03
	16441095	694419	814	203	3,1
	5803364	384994	600	147	3,99
	12594914	1308191	3757	476	4,96
	9110073	43639	211	134	3,87
Au1206	13148564	4825894	6132	3954	4,68
	10128643	5312458	4879	4125	4,28
	15228845	3995423	1684	1159	3,87
	11991222	4765846	4653	2468	2,54
	13431257	6424865	11235	7651	4,55
	15468946	2644568	2967	2237	3,71
TOTAL	460028056	11988044	177172	101183	3,9608

Grup AI.loempelt 12 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	SIM	ATT	LTO	LOOC	AMO
AI1201	16321458	4156873	3554	2846	2,56
	17546879	4235748	2548	2115	2,28
	15687991	3843357	2984	2293	3,78
	11245683	2995251	1655	931	3,65
	15324538	6421254	3895	3125	2,84
	10984567	4657892	3136	2194	1,13
	AI1202	10993193	4040395	595	240
16301666		2655506	632	293	1,01
15133234		3825020	1770	583	2,15
16661220		3613031	298	126	1,43
16956819		38842	128	94	1,51
16582312		7060768	975	198	1,65
AI1203		14622458	4521157	3545	2841
	16325489	2893128	3214	1125	2,87
	10225481	946328	1137	654	3,54
	10289220	1235489	2865	2158	1,96
	16557164	4896214	4687	3325	3,41
	13546872	3248836	2468	2663	2,59
	AI1204	14941371	2449912	694	328
10717579		420451	293	131	2,83
11888269		1271511	1055	758	2,61
13930191		1275461	221	109	2,04
9248751		2017281	439	292	3,74
16305428		11257733	305	144	2,86
AI1205		15654898	3125482	2846	2159
	10223578	4321254	3654	2354	2,94
	16879521	1954332	1456	925	3,75
	17654235	2135459	1873	1228	2,65
	15462572	3846527	1495	1124	3,01
	12254623	3658942	3121	2658	3,56
	AI1206	14313211	3451359	986	250
13129401		3112872	2245	173	4,05
11117716		3124440	2958	992	2,08
12056994		2106582	8886	442	4,81
16184338		1748439	2337	585	3,3
11069891		516194	465	165	2,98
TOTAL		504338811	11707932	75415	42621

Grup Ciment de fosfat càlcic 12 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	SIM	ATT	LTO	LOOC	AMO
Ci1201	11706609	1518794	9589	2804	5,33
	16903583	1066557	8900	4834	2,84
	12935389	265384	3854	2997	3,69
	19222612	1371020	2343	941	4,04
	19440192	3171196	6091	3484	4,42
	17876643	1488583	10706	7156	4,1
Ci1202	8254029	2575564	938	279	2
	19755329	4856280	7224	2352	2,87
	15936563	2570203	2040	1182	3,43
	8586026	2257298	5651	2718	5,39
	12186983	2780593	15866	5252	5,23
	19241768	4389697	11826	2013	3,12
Ci1203	12646501	5087302	4828	4303	3,28
	12207357	4583111	2757	2128	3,13
	14606083	2255793	2312	1856	3,74
	2603328	684323	924	687	3,49
	14787976	2098353	6211	5834	3,89
	15364973	2998930	4313	3958	4,04
Ci1204	14541423	6393882	11794	9811	3,43
	14205241	2873703	4712	4307	3,78
	14179001	6468252	3289	2924	4,3
	11326836	4461316	5570	1329	3,7
	10505825	6388498	2643	2119	3,89
	7290674	3434253	1328	903	4,11
Ci1205	13159027	4378599	2139	1502	3,3
	12798204	3176967	1478	1131	3,79
	10375448	4280787	2149	1891	4,07
	11636872	4776690	4349	1196	3,51
	13790527	858678	833	229	3,93
	17380092	3877923	5979	3554	4,21
Ci1206	17433578	1984565	4689	3655	3,25
	11235789	4321548	7621	5917	3,97
	13546874	3456871	3256	2864	4,13
	15687954	4321568	4687	2659	3,87
	10846873	4689221	2964	2467	2,89
	11245876	2994653	3158	1533	3,54
TOTAL	485448058	11915695	179011	104769	3,7694

5.4.3.- Paràmetres histomorfomètrics.

Resumim a continuació les abreviacions i unitats expressades en els càlculs dels paràmetres histomorfomètrics. Tots els valors expressats en les següents taules s'obtenen aplicant càlculs a les mesures histomorfomètriques efectuades sobre les preparacions microscòpiques.

Els paràmetres histomorfomètrics s'expressen amb les següents unitats:

	<u>Unitats</u>
- Sv: superfície específica d'os trabecular	%
- Sf: superfície relativa de formació	%
- Sroc: sup. relativa osteoide amb osteoblasts cúbics	%
- Aos: àrea d'osteoide	μm^2
- Aos / ATT: relació àrea osteoide / àrea trabecular total	%

Grup Autoempelt 4 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	Sv	Sf	Sroc	Aos	Aos / ATT
Au0401	23,03	0,280	73,74	10.716	0,65
	27,78	0,119	91,69	9.386	0,36
	33,74	0,398	84,29	15.220	1,24
	11,33	0,119	76,25	6.658	0,33
	1,65	0,555	71,83	4.830	1,73
	15,34	0,065	79,60	2.976	0,16
Au0402	10,28	0,472	61,41	20.529	1,91
	10,23	0,360	60,56	11.997	0,81
	7,22	0,227	76,68	4.848	0,54
	19,98	0,173	73,70	15.375	0,46
	27,23	0,170	39,78	9.305	0,30
	66,30	0,346	58,16	7.027	1,30
AU0403	39,24	0,085	82,80	7.960	0,24
	53,52	0,053	92,66	12.369	0,18
	32,01	0,074	72,79	16.913	0,28
	24,11	0,056	86,34	8.634	0,20
	29,70	0,118	88,95	12.703	0,31
	27,00	0,196	88,18	27.078	0,79
Au0404	11,43	0,286	70,30	11.432	0,74
	21,41	0,217	53,37	15.134	0,62
	15,69	0,240	45,75	16.336	0,57
	11,97	0,383	93,44	10.173	0,92
	10,24	0,357	76,03	23.485	1,42
	21,82	0,257	70,69	28.086	1,12
Au0405	40,73	0,055	79,27	9.975	0,20
	20,11	0,087	79,77	9.664	0,25
	39,75	0,123	89,76	17.777	0,34
	15,69	0,077	64,21	5.596	0,23
	12,72	0,102	72,85	7.721	0,33
	14,44	0,071	82,41	4.994	0,20
Au0406	16,15	0,261	72,70	19.906	0,85
	14,64	0,286	68,71	20.173	0,76
	12,90	0,366	66,86	21.122	1,42
	25,08	0,195	95,91	13.315	0,47
	27,84	0,197	45,76	14.960	0,43
	14,15	0,191	88,24	11.023	0,59
TOTAL	20,27	0,161	72,89	465.870	0,48

Grup AI.loempelt 4 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	Sv	Sf	Sroc	Aos	Aos / ATT
AI0401	15,06	0,351	85,31	23.633	1,31
	13,57	0,390	72,16	34.212	1,49
	16,31	0,214	77,14	18.842	0,61
	19,61	0,231	47,91	19.836	0,70
	3,31	0,374	78,55	7.148	1,37
	12,15	0,197	67,13	7.558	0,38
AI0402	12,68	0,064	46,73	4.195	0,22
	19,19	0,074	67,78	5.368	0,18
	32,05	0,134	74,25	24.460	0,55
	26,76	0,160	71,02	17.378	0,50
	10,44	0,111	38,12	6.241	0,39
	13,10	0,078	64,60	3.890	0,16
AI0403	8,95	0,037	38,62	1.029	0,11
	46,15	0,071	51,29	20.966	0,25
	50,70	0,038	76,05	13.512	0,16
	14,63	0,184	79,71	14.558	0,68
	18,13	0,128	77,73	11.733	0,41
	17,23	0,102	55,99	10.163	0,30
AI0404	41,67	0,042	66,00	4.387	0,13
	26,97	0,085	87,44	12.631	0,30
	10,19	0,104	72,94	3.845	0,30
	29,09	0,042	80,34	7.732	0,14
	18,91	0,030	81,27	3.480	0,10
	37,38	0,087	71,64	15.041	0,27
AI0405	15,08	0,078	80,00	4.822	0,26
	10,00	0,071	71,82	3.298	0,20
	14,09	0,069	82,35	3.126	0,13
	7,60	0,059	45,77	1.007	0,12
	11,13	0,062	48,96	4.285	0,22
	18,60	0,084	74,98	8.300	0,29
AI0406	4,19	2,266	85,74	27.244	5,71
	2,13	1,235	59,18	11.973	3,00
	18,95	0,657	63,25	11.578	1,32
	26,61	0,661	57,27	66.035	2,96
	19,15	0,385	53,30	46.548	1,34
	10,99	0,179	65,65	5.463	0,36
TOTAL	18,57	0,150	67,59	461.224	0,47

Grup Ciment de fosfat càlcic 4 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	Sv	Sf	Sroc	Aos	Aos / ATT
Ci0401	9,00	0,254	67,49	20.545	1,36
	23,28	0,134	82,08	10.664	0,61
	31,84	0,128	86,85	17.479	0,47
	5,69	0,147	78,29	5.604	0,57
	10,04	0,145	67,24	3.876	0,60
	6,72	0,253	73,21	4.801	0,99
Ci0402	42,35	0,225	22,28	34.119	0,78
	18,58	0,330	43,74	27.859	1,17
	4,66	0,457	51,04	11.776	1,77
	16,65	0,289	49,11	35.376	1,30
	30,87	0,212	34,89	17.906	0,72
	34,99	0,246	31,70	34.253	1,18
Ci0403	15,68	0,088	82,45	7.447	0,37
	36,00	0,092	83,48	9.068	0,36
	13,86	0,127	88,17	10.440	0,47
	19,46	0,168	85,09	19.403	0,74
	10,50	0,728	71,82	42.796	2,63
	15,71	0,401	85,92	28.694	1,52
Ci0404	15,35	0,048	76,42	4.590	0,18
	21,37	0,064	75,96	7.140	0,26
	13,39	0,095	76,13	3.813	0,37
	1,42	0,355	50,93	2.628	1,45
	16,53	0,132	72,98	10.737	0,49
	10,45	0,188	73,50	14.490	0,81
Ci0405	13,78	0,080	37,89	6.411	0,29
	10,53	0,117	59,58	9.116	0,49
	9,49	0,150	70,33	7.538	0,60
	15,64	0,180	68,67	8.388	0,64
	5,06	0,192	67,60	7.199	0,82
	31,46	0,105	63,09	11.697	0,35
Ci0406	24,78	0,107	72,22	10.331	0,43
	39,07	0,101	73,04	9.094	0,40
	45,24	0,139	64,68	18.053	0,52
	53,58	0,185	79,61	33.187	0,75
	65,81	0,116	72,24	20.193	0,44
	11,60	0,301	64,10	14.174	1,23
TOTAL	18,13	0,178	63,03	545.434	0,71

Grup Autoempelt 12 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	Sv	Sf	Sroc	Aos	Aos / ATT
Au1201	79,85	0,224	76,18	96.758	1,09
	25,68	0,376	64,63	73.487	1,97
	31,73	0,127	50,76	13.528	0,46
	17,38	0,087	61,64	7.046	0,26
	54,90	0,195	75,39	51.413	0,77
	15,36	0,099	62,16	6.628	0,36
Au1202	25,72	0,084	49,08	5.374	0,17
	2,17	0,283	55,06	2.783	1,09
	34,11	0,036	68,60	3.283	0,10
	25,39	0,052	65,88	6.031	0,18
	1,67	0,227	58,72	1.732	0,79
	26,87	0,144	26,19	14.868	0,45
Au1203	23,42	0,361	47,62	42.586	1,14
	20,04	0,392	47,65	45.743	1,95
	30,50	0,161	21,21	30.980	0,63
	17,55	0,137	50,72	8.451	0,42
	3,97	0,392	50,90	6.424	1,16
	33,91	0,095	70,33	17.017	0,40
Au1204	35,08	0,147	59,94	43.330	0,70
	13,96	0,108	63,54	9.486	0,38
	12,15	0,222	71,20	18.702	1,16
	56,25	0,083	44,63	28.181	0,38
	18,71	0,119	49,92	12.381	0,50
	21,92	0,210	32,64	44.117	1,21
Au1205	36,45	0,014	79,73	1.365	0,05
	55,28	0,034	18,73	10.010	0,21
	4,22	0,117	24,94	2.523	0,36
	6,63	0,156	24,50	2.394	0,62
	10,39	0,287	12,67	18.635	1,42
	0,48	0,484	63,51	817	1,87
Au1206	36,70	0,127	64,48	28.698	0,59
	52,45	0,092	84,55	20.882	0,39
	26,24	0,042	68,82	6.517	0,16
	39,74	0,098	53,04	11.819	0,25
	47,84	0,175	68,10	51.119	0,80
	17,10	0,112	75,40	11.008	0,42
TOTAL	26,06	0,148	57,11	701.743	0,59

Grup AI.loempelt 12 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	Sv	Sf	Sroc	Aos	Aos / ATT
AI1201	25,47	0,085	80,08	9.098	0,22
	24,14	0,060	83,01	5.809	0,14
	24,50	0,078	76,84	11.280	0,29
	26,63	0,055	56,25	6.041	0,20
	41,90	0,061	80,23	11.062	0,17
	42,40	0,067	69,96	3.544	0,08
AI1202	36,75	0,015	40,34	904	0,02
	16,29	0,024	46,36	638	0,02
	25,28	0,046	32,94	3.806	0,10
	21,69	0,008	42,28	426	0,01
	0,23	0,330	73,44	193	0,50
	42,58	0,014	20,31	1.609	0,02
AI1203	30,92	0,078	80,14	10.032	0,22
	17,72	0,111	35,00	9.224	0,32
	9,25	0,120	57,52	4.025	0,43
	12,01	0,232	75,32	5.615	0,45
	29,57	0,096	70,94	15.983	0,33
	23,98	0,076	107,90	6.392	0,20
AI1204	16,40	0,028	47,26	1.631	0,07
	3,92	0,070	44,71	829	0,20
	10,70	0,083	71,85	2.754	0,22
	9,16	0,017	49,32	451	0,04
	21,81	0,022	66,51	1.642	0,08
	69,04	0,003	47,21	872	0,01
AI1205	19,96	0,091	75,86	6.204	0,20
	42,27	0,085	64,42	10.743	0,25
	11,58	0,075	63,53	5.460	0,28
	12,10	0,088	65,56	4.963	0,23
	24,88	0,039	75,18	4.500	0,12
	29,86	0,085	85,17	11.111	0,30
AI1206	24,11	0,029	25,35	2.672	0,08
	23,71	0,072	7,71	9.092	0,29
	28,10	0,095	33,54	6.153	0,20
	17,47	0,422	4,97	42.742	2,03
	10,80	0,134	25,03	7.712	0,44
	4,66	0,090	35,48	1.386	0,27
TOTAL	23,21	0,064	56,52	203.530	0,17

Grup Ciment de fosfat càlcic 12 setmanes. Conills 1 a 6.

Conill	Sv	Sf	Sroc	Aos	Aos / ATT
Ci1201	12,97	0,631	29,24	51.109	3,37
	6,31	0,834	54,31	25.276	2,37
	2,05	1,452	77,76	14.221	5,36
	7,13	0,171	40,16	9.466	0,69
	16,31	0,192	57,20	26.922	0,85
	8,33	0,719	66,84	43.895	2,95
Ci1202	31,20	0,036	29,74	1.876	0,07
	24,58	0,149	32,56	20.733	0,43
	16,13	0,079	57,94	6.997	0,27
	26,29	0,250	48,10	30.459	1,35
	22,82	0,571	33,10	82.979	2,98
	22,81	0,269	17,02	36.897	0,84
Ci1203	40,23	0,095	89,13	15.836	0,31
	37,54	0,060	77,19	8.629	0,19
	15,44	0,102	80,28	8.647	0,38
	26,29	0,135	74,35	3.225	0,47
	14,19	0,296	93,93	24.161	1,15
	19,52	0,144	91,77	17.425	0,58
Ci1204	43,97	0,184	83,19	40.453	0,63
	20,23	0,164	91,40	17.811	0,62
	45,62	0,051	88,90	14.143	0,22
	39,39	0,125	23,86	20.609	0,46
	60,81	0,041	80,17	10.281	0,16
	47,10	0,039	68,00	5.458	0,16
Ci1205	33,27	0,049	70,22	7.059	0,16
	24,82	0,047	76,52	5.602	0,18
	41,26	0,050	87,99	8.746	0,20
	41,05	0,091	27,50	15.265	0,32
	6,23	0,097	27,49	3.274	0,38
	22,31	0,154	59,44	25.172	0,65
Ci1206	11,38	0,236	77,95	15.239	0,77
	38,46	0,176	77,64	30.255	0,70
	25,52	0,094	87,96	13.447	0,39
	27,55	0,108	56,73	18.139	0,42
	43,23	0,063	83,23	8.566	0,18
	26,63	0,105	48,54	11.179	0,37
TOTAL	24,55	0,150	58,53	674.764	0,57

5.4.4.- Taules comparatives de resultats histomorfomètrics.

Resumim a continuació els resultats histomorfomètrics més rellevants en els 6 grups analitzats.

a) Superfície específica d'os trabecular (Sv).

Grup Au04: 20.27 %	Grup Au12: 26.06 %
Grup Al04: 18.57 %	Grup Al12: 23.21 %
Grup Ci04: 18.13 %	Grup Ci12: 24.55 %

b) Superfície relativa d'osteoid amb osteoblasts cúbics.

Grup Au04: 72.89 %	Grup Au12: 57.11 %
Grup Al04: 67.59 %	Grup Al12: 56.52 %
Grup Ci04: 63.03 %	Grup Ci12: 58.53 %

c) Superfície relativa de formació (Sf).

Grup Au04: 0.161 %	Grup Au12: 0.148 %
Grup Al04: 0.150 %	Grup Al12: 0.064 %
Grup Ci04: 0.178 %	Grup Ci12: 0.150 %

d) Àrea d'osteoid.

Grup Au04: 465.870	Grup Au12: 701.743
Grup Al04: 461.224	Grup Al12: 203.530
Grup Ci04: 545.434	Grup Ci12: 674.764

e) Relació àrea osteoide / àrea trabecular.

Grup Au04: 0.48 %	Grup Au12: 0.59 %
Grup Al04: 0.47%	Grup Al12: 0.17 %
Grup Ci04: 0.71 %	Grup Ci12: 0.57 %

5.4.5.- Càlculs estadístics.

1) Variable SV (Superfície específica d'os trabecular) Grups 4 setmanes.

Anàlisi de la varianza

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	851,9080	425,9540	1,0695	<u>,3469</u>
En els grups	105	41818,9226	398,2755		
Total	107	42670,8306			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	Mitges
Grp 1	36	25,4236	29,0378	4,8396	15,5986 ..	35,2486 Grp 2
2	36	18,6875	11,4892	1,9149	14,8001 ..	22,5749 Grp 3
36	20,8453	14,8200	2,4700	15,8309 ..	25,8596	
Total	108	21,6521	19,9698	1,9216	17,8428 ..	25,4615

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 1	1,6500	181,5900
Grp 2	2,1300	50,7000
Grp 3	1,4200	65,8100
TOTAL	1,4200	181,5900

Test de Levene d'homogeneitat de variances

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
1,1559	2	106	,330

Variable SV (Superfície específica d'os trabecular) Grups 12 setmanes.

Anàlisi de la varianza

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	284,9676	142,4838	,6036	<u>,5487</u>
En els grups	105	24787,1707	236,0683		
Total	107	25072,1383			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct	Conf Int	mitges
Grp 4	36	26,7169	18,1421	3,0237	20,5785	TO	32,8553 Grp
5	36	23,1067	13,5635	2,2606	18,5174	..	27,6959 Grp 6
36	26,3603	13,9679	2,3280	21,6342	..	31,0863	
Total	108	25,3946	15,3075	1,4730	22,4747	..	28,3146

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 4	,4800	79,8500
Grp 5	,2300	69,0400
Grp 6	2,0500	60,8100
TOTAL	,2300	79,8500

Test de Levene d'homogeneïtat de variàncies

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
1,6843	2	106	,175

Tests de Student per a variables independents de V15 grup v14

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
SV				
<u>V14=1,2,3</u>	108	21,6521	19,970	1,922
<u>V14=4,5,6</u>	108	25,3946	15,307	1,473

Diferència Mitges = -3,7425

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= ,000 P= 1,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges						
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-1,55	214	<u>,124</u>	2,421	(-8,515; 1,030)	
No aparell.	-1,55	200,47	,124	2,421	(-8,517; 1,032)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
SV				
<u>aut4</u>	36	25,4236	29,038	4,840
<u>aut12</u>	36	26,7169	18,142	3,024

Diferència Mitges = -1,2933

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= ,002 P= ,998

Test de Student d'uniformitat de Mitges						
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-,23	70	<u>,821</u>	5,707	(-12,675; 10,088)	
No aparell.	-,23	58,71	,821	5,707	(-12,713; 10,127)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Number de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
SV				
<u>a14</u>	36	18,6875	11,489	1,915
<u>a112</u>	36	23,1067	13,563	2,261

Diferència Mitges = -4,4192

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= ,503 P= ,607

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-1,49	70	<u>,140</u>	2,963	(-10,328; 1,490)	
No aparell.	-1,49	68,16	,140	2,963	(-10,331; 1,492)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
SV				
<u>cim4</u>	36	20,8453	14,820	2,470
<u>cim12</u>	36	26,3603	13,968	2,328

Diferència Mitges = -5,5150

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= ,046 P= ,955

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-1,62	70	<u>,109</u>	3,394	(-12,284; 1,254)	
No aparell.	-1,62	69,76	,109	3,394	(-12,285; 1,255)	

2) Variable SROC (Superfície relativa d'osteoides amb osteoblasts cúbics).
Grups 4 setmanes.

Anàlisi de la varianza

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	1298,6918	649,3459	2,9418	<u>,0571</u>
En els grups	105	23176,6124	220,7296		
Total	107	24475,3042			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 1	36	74,3178	14,0380	2,3397	69,5680 ..	79,0676 Grp
2	36	67,1664	13,7831	2,2972	62,5029 ..	71,8299 Grp 3
36	66,7728	16,5876	2,7646	61,1603 ..	72,3852	
Total	108	69,4190	15,1242	1,4553	66,5340 ..	72,3040

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 1	39,7800	95,9100
Grp 2	38,1200	87,4400
Grp 3	22,2800	88,1700
TOTAL	22,2800	95,9100

Test de Levene d'homogeneïtat de variàncies

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
,4080	2	106	,748

Variable SROC (Superfície relativa d'osteoides amb osteoblasts cúbics).
Grups 12 setmanes.

Anàlisi de la variances

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	1462,7160	731,3580	1,5021	<u>,2274</u>
En els grups	105	51122,8104	486,8839		
Total	107	52585,5263			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 4	36	54,5294	18,6157	3,1026	48,2308 ..	60,8281 Grp
5	36	56,0422	23,7592	3,9599	48,0033 ..	64,0812 Grp 6
36	62,9819	23,4437	3,9073	55,0497 ..	70,9141	
Total	108	57,8512	22,1688	2,1332	53,6224 ..	62,0800

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 4	12,6700	84,5500
Grp 5	4,9700	107,9000
Grp 6	17,0200	93,9300
TOTAL	4,9700	107,9000

Test de Levene d'homogeneïtat de variacions

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
2,4745	2	106	,066

Tests de Student per a variables independents de V15 Agrup v14

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
SROC				
<u>V14=4,5,6</u>	108	57,8512	22,169	2,133
<u>V14=1,2,3</u>	108	69,4190	15,124	1,455

Diferència Mitges = -11,5678

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 20,282 P= ,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif		
Aparell.	-4,48	214	<u>,000</u>	2,582	(-16,658; -6,478)		
No aparell.	-4,48	188,87	,000	2,582	(-16,662; -6,474)		

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
SROC				
<u>aut4</u>	36	74,3178	14,038	2,340
<u>aut12</u>	36	54,5294	18,616	3,103

Diferència Mitges = 19,7883

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 2,988 P= ,057

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif		
Aparell.	5,09	70	<u>,000</u>	3,886	(12,038; 27,539)		
No aparell.	5,09	65,08	,000	3,886	(12,028; 27,549)		

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
SROC				
<u>a14</u>	36	67,1664	13,783	2,297
<u>a112</u>	36	56,0422	23,759	3,960

Diferència Mitges = 11,1242

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 12,404 P= ,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	2,43	70	<u>,018</u>	4,578	(1,994; 20,255)	
No aparell.	2,43	56,16	,018	4,578	(1,954; 20,294)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
SROC				
<u>cim4</u>	36	66,7728	16,588	2,765
<u>cim12</u>	36	62,9819	23,444	3,907

Diferència Mitges = 3,7908

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 8,742 P= ,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	,79	70	<u>,431</u>	4,786	(-5,755; 13,337)	
No aparell.	,79	63,02	,431	4,786	(-5,774; 13,356)	

3) Variable SF (Superfície relativa de formació). Grups 4 setmanes.

Anàlisi de la varianza

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	,0631	,0315	,4504	<u>,6386</u>
En els grups	105	7,3535	,0700		
Total	107	7,4166			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 1	36	,2116	,1299	,0216	,1676 ..	,2555 Grp
2	36	,2537	,4190	,0698	,1120 ..	,3955 Grp 3
36	,1966	,1329	,0222	,1517 ..	,2416	
Total	108	,2206	,2633	,0253	,1704 ..	,2709

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 1	,0530	,5550
Grp 2	,0300	2,2660
Grp 3	,0480	,7280
TOTAL	,0300	2,2660

Test de Levene d'homogeneïtat de variàncies

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
5,2876	2	106	,002

Variable SF (Superfície relativa de formació). Grups 12 setmanes.

Anàlisi de la varianza

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	,3489	,1745	5,1034	<u>,0077</u>
En els grups	105	3,5893	,0342		
Total	107	3,9382			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf	Int de mitges
Grp 4	36	,1694	,1156	,0193	,1303 ..	,2085 Grp
5	36	,0857	,0841	,0140	,0572 ..	,1141 Grp 6
36	,2239	,2866	,0478	,1269 ..	,3208	
Total	108	,1596	,1918	,0185	,1231 ..	,1962

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 4	,0140	,4840
Grp 5	,0030	,4220
Grp 6	,0360	1,4520
TOTAL	,0030	1,4520

Test de Levene d'homogeneïtat de variàncies

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
8,4123	2	106	,000

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
SF				
<u>aut4</u>	36	,2116	,130	,022
<u>aut12</u>	36	,1694	,116	,019

Diferència Mitges = ,0422

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= ,846 P= ,433

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	1,46	70	<u>,150</u>	,029	(-,016; ,100)	
No aparell.	1,46	69,07	,150	,029	(-,016; ,100)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
SF				
<u>a14</u>	36	,2537	,419	,070
<u>a112</u>	36	,0857	,084	,014

Diferència Mitges = ,1681

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 10,681 P= ,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	2,36	70	<u>,021</u>	,071	(,026; ,310)	
No aparell.	2,36	37,82	,024	,071	(,024; ,312)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
SF				
<u>cim4</u>	36	,1966	,133	,022
<u>cim12</u>	36	,2239	,287	,048

Diferència Mitges = -,0272

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 4,669 P= ,012

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-,52	70	<u>,607</u>	,053	(-,132; ,078)	
o aparell.	-,52	49,40	,607	,053	(-,133; ,079)	

Tests de Student per a variables independents de V15 Agrup v14

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
SF				
<u>V14=4,5,6</u>	108	,1596	,192	,018
<u>V14=1,2,3</u>	108	,2206	,263	,025

Diferència Mitges = -,0610

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 1,267 P= ,284

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-1,95	214	<u>,053</u>	,031	(-,123; ,001)	
No aparell.	-1,95	195,64	,053	,031	(-,123; ,001)	

4) Variable AOS (Àrea d'osteoides). Grups 4 setmanes.

Anàlisi de la variances

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	84898696,17	42449348,08	,3816	<u>,6837</u>
En els grups	105	11680452252	111242402,4		
Total	107	11765350948			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 1	36	12927,6667	6312,2023	1052,0337	10791,9247	.. 15063,4087 Grp
2	36	13486,5833	13432,6643	2238,7774	8941,6236	.. 18031,5431 Grp 3
36	15024,5833	10651,1426	1775,1904	11420,7551	.. 18628,4115	
Total	108	13812,9444	10486,0169	1009,0174	11812,6850	.. 15813,2039

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 1	2976,0000	28086,0000
Grp 2	1007,0000	66035,0000
Grp 3	2628,0000	42796,0000
TOTAL	1007,0000	66035,0000

Test de Levene d'homogeneïtat de variances

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
3,8192	2	106	,012

Variable AOS (Àrea d'osteoides). Grups 12 setmanes.

Anàlisi de la varianza

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	4697876270	2348938135	8,7125	<u>,0003</u>
En els grups	105	28308736075	269607010,2		
Total	107	33006612345			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 4	36	21003,2222	22185,2741	3697,5457	13496,8054	.. 28509,6391
Grp 5	36	6291,8889	7402,7181	1233,7863	3787,1694	.. 8796,6084
Grp 6	36	19429,1944	16181,2982	2696,8830	13954,2308	.. 24904,1581
Total	108	15574,7685	17563,3998	1690,0389	12224,4634	.. 18925,0736

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 4	817,0000	96758,0000
Grp 5	193,0000	42742,0000
Grp 6	1876,0000	82979,0000
TOTAL	193,0000	96758,0000

Test de Levene d'homogeneïtat de variàncies

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
12,0091	2	106	,000

Tests de Student per a variables independents de V15 Agrup v14

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
AOS				
<u>V14=4,5,6</u>	108	15574,7685	17563,400	1690,039
<u>V14=1,2,3</u>	108	13812,9444	10486,017	1009,017

Diferència Mitges = 1761,8241

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 11,852 P= ,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif		-
Aparell.	,90	214	<u>,372</u>	1968,336	(-2117,99; 5641,634)		
No aparell.	,90	174,68	,372	1968,336	(-2122,96; 5646,606)		

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
AOS				
<u>aut4</u>	36	12927,6667	6312,202	1052,034
<u>aut12</u>	36	21003,2222	22185,274	3697,546

Diferència Mitges = -8075,5556

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 24,273 P= ,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif		-
Aparell.	-2,10	70	<u>,039</u>	3844,297	(-15742,8; -408,347)		
No aparell.	-2,10	40,63	,042	3844,297	(-15841,4; -309,692)		

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
AOS				
<u>a14</u>	36	13486,5833	13432,664	2238,777
<u>a112</u>	36	6291,8889	7402,718	1233,786

Diferència Mitges = 7194,6944

Test de Levene d'uniformitat de variàncies: F= 6,784 P= ,002

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variàncies	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif		
Aparell.	2,81	70	<u>,006</u>	2556,238	(2096,438; 12292,95)		
No aparell.	2,81	54,46	,007	2556,238	(2070,746; 12318,64)		

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
AOS				
<u>cim4</u>	36	15024,5833	10651,143	1775,190
<u>cim12</u>	36	19429,1944	16181,298	2696,883

Diferència Mitges = -4404,6111

Test de Levene d'uniformitat de variàncies: F= 1,814 P= ,171

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variàncies	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif		
Aparell.	-1,36	70	<u>,177</u>	3228,696	(-10844,0; 2034,820)		
No aparell.	-1,36	60,54	,178	3228,696	(-10861,8; 2052,568)		

5) Variable Aos/ATT (Relació àrea trabecular - àrea d'osteoides). Grups 4 setmanes.

Anàlisi de la variances

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	,3588	,1794	,3159	<u>,7298</u>
En els grups	105	59,6161	,5678		
Total	107	59,9749			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 1	36	,6458	,4654	,0776	,4884 ..	,8033 Grp
2	36	,7478	1,1074	,1846	,3731 ..	1,1225 Grp 3
36	,7814	,5102	,0850	,6088 ..	,9540	
Total	108	,7250	,7487	,0720	,5822 ..	,8678

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 1	,1600	1,9100
Grp 2	,1000	5,7100
Grp 3	,1800	2,6300
TOTAL	,1000	5,7100

Test de Levene d'homogeneïtat de variances

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
4,0526	2	106	,009

Variable Aos/ATT (Relació àrea trabecular - àrea d'osteoides). Grups 12 setmanes.

Anàlisi de la variances

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	7,6551	3,8275	6,8324	<u>,0016</u>
En els grups	104	58,2612	,5602		
Total	106	65,9162			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 4	36	,6906	,5206	,0868	,5144 ..	,8667 Grp
5	36	,2508	,3324	,0554	,1383 ..	,3633 Grp 6
35	,8917	1,1492	,1943	,4969 ..	1,2865	
Total	107	,6084	,7886	,0762	,4573 ..	,7596

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 4	,0500	1,9700
Grp 5	,0100	2,0300
Grp 6	,0700	5,3600
TOTAL	,0100	5,3600

Test de Levene d'homogeneitat de variances

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
10,6981	2	105	,000

Tests de Student per a variables independents de V15 Agrup v14

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
REL Aos/ATT				
<u>V14=4,5,6</u>	107	,6084	,789	,076
<u>V14=1,2,3</u>	108	,7250	,749	,072

Diferència Mitges = -,1166

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= ,016 P= ,985

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-1,11	213	<u>,267</u>	,105	(-,323; ,090)	
No aparell.	-1,11	212,20	,268	,105	(-,323; ,090)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
REL Aos/ATT				
<u>aut4</u>	36	,6458	,465	,078
<u>aut12</u>	36	,6906	,521	,087

Diferència Mitges = -,0447

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= ,448 P= ,641

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-,38	70	<u>,702</u>	,116	(-,277; ,187)	
No aparell.	-,38	69,14	,702	,116	(-,277; ,187)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
REL Aos/ATT				
<u>a14</u>	36	,7478	1,107	,185
<u>a112</u>	36	,2508	,332	,055

Diferència Mitges = ,4969

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 12,598 P= ,000

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	2,58	70	<u>,012</u>	,193	(,113; ,881)	
No aparell.	2,58	41,26	,014	,193	(,108; ,886)	

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE de Mitja
REL Aos/ATT				
<u>cim4</u>	36	,7814	,510	,085
<u>cim12</u>	35	,8917	1,149	,194

Diferència Mitges = -,1103

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 6,133 P= ,004

Test de Student d'uniformitat de Mitges

96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-
Aparell.	-,53	69	<u>,601</u>	,210	(-,529; ,309)	
No aparell.	-,52	46,61	,605	,212	(-,537; ,316)	

6) Variable AMO (Amplada mitja d'osteoides). Grups 4 setmanes.

Anàlisi de la varianza

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	20,4960	10,2480	29,7565	<u>,0000</u>
En els grups	105	36,1616	,3444		
Total	107	56,6576			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf	Int de mitges
Grp 1	36	3,0086	,6334	,1056	2,7943 ..	3,2229 Grp
2	36	3,1058	,6809	,1135	2,8754 ..	3,3362 Grp 3
36	3,9775	,4103	,0684	3,8387 ..	4,1163	
Total	108	3,3640	,7277	,0700	3,2252 ..	3,5028

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 1	1,7600	4,3700
Grp 2	1,8900	4,4800
Grp 3	3,3700	5,3600
TOTAL	1,7600	5,3600

Test de Levene d'homogeneïtat de variàncies

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
4,8879	2	106	,003

Variable AMO (Amplada mitja d'osteoides). Grups 12 setmanes.

Anàlisi de la variances

Font	D.F.	Suma de Valors	Mitja Valors	F Ratio	F Prob.
<u>Entre grups</u>	2	33,3027	16,6513	24,4191	<u>,0000</u>
En els grups	105	71,5994	,6819		
Total	107	104,9021			

Grup	Nombre	Mitja	Desviació Estàndard	Error Estàndard	95 Pct Conf Int	de mitges
Grp 4	36	3,9608	,9091	,1515	3,6532 ..	4,2684 Grp
5	36	2,6989	,8669	,1445	2,4056 ..	2,9922 Grp 6
36	3,7694	,6839	,1140	3,5381 ..	4,0008	
Total	108	3,4764	,9901	,0953	3,2875 ..	3,6653

GRUP	MÍNIM	MÀXIM
Grp 4	1,9700	6,0300
Grp 5	1,0100	4,8100
Grp 6	2,0000	5,3900
TOTAL	1,0100	6,0300

Test de Levene d'homogeneitat de variances

Estadística	df1	df2	2-tail Sig.
1,9479	2	106	,126

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
AMO				
<u>cim4</u>	36	3,9775	,410	,068
<u>aut4</u>	36	3,0086	,633	,106

Diferència Mitges = ,9689

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 7,811 P= ,001

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-	
Aparell.	7,70	70	<u>,000</u>	,126	(,718; 1,220)		
No aparell.	7,70	59,98	,000	,126	(,717; 1,220)		

Tests de Student per a variables independents de V14 grups segons material

Variable	Nombre de casos	Mitja	SD	SE deMitja
AMO				
<u>a14</u>	36	3,1058	,681	,113
<u>cim4</u>	36	3,9775	,410	,068

Diferència Mitges = -,8717

Test de Levene d'uniformitat de variances: F= 8,360 P= ,001

Test de Student d'uniformitat de Mitges							
96% Variances	valor t	df	2-Tail Sig	SE de dif	CI de dif	-	
Aparell.	-6,58	70	<u>,000</u>	,132	(-1,136; -,607)		
No aparell.	-6,58	57,46	,000	,132	(-1,137; -,606)		

6.- Discussió.

El fet que les ceràmiques de fosfat càlcic siguin actualment un dels centres d'interès en recerca en la nostra especialitat fa que contínuament apareguin a la literatura internacional nous articles que en milloren el coneixement. El mateix succeeix amb la presentació en forma de ciment d'aquestes ceràmiques. Els bons resultats preliminars publicats fan que els ciments de fosfat càlcic siguin estudiats actualment a nombrosos centres arreu del món.

No existeix, però, en la literatura disponible fins a aquest moment, cap treball de recerca que compari quantitativament (amb ajuda de les tècniques d'histomorfometria) l'acció biològica del ciment de fosfat càlcic amb la de l'autoempelt i l'al.loempelt ossis, que encara són els materials més utilitzats per al tractament dels defectes de l'os.

Al llarg d'aquest treball, hem intentat aproximar-nos a l'objectiu definint en primer lloc la terminologia més utilitzada i analitzant després l'estructura i funcions de l'os sà, els diferents tipus de defectes que s'hi poden produir i les possibilitats de substituir-lo. Després ens hem centrat en l'anàlisi de les característiques físico-químiques i biològiques del material objecte d'estudi, el ciment de fosfat càlcic i hem descrit també les perspectives de futur dels biomaterials, comentant les diferents línies de recerca en les quals es treballa més intensament arreu del món. Posteriorment, hem explicat la metodologia de treball, els grups d'estudi i les proves realitzades. Finalment hem exposat els resultats obtinguts. A continuació analitzem aquests resultats intentant esbrinar el seu significat.

6.1.- Model experimental.

La utilització del conill com a animal d'experimentació està àmpliament difosa, degut a motius econòmics i també d'infraestructures necessàries i facilitat de manipulació. El **model experimental** que hem fet servir va ser descrit per Katthagen el 1986, tot i que ja abans Nizard havia demostrat que un orifici de 6mm de diàmetre al còndil femoral del conill no es regenera espontàniament fins i tot al cap de mesos. En els treballs de Katthagen s'observa que un defecte cavitari com el que hem utilitzat no es regenera espontàniament ni tan sols 8 mesos després. És a dir, la regeneració òssia que s'observa és atribuïble a l'implant, no al teixit ossi circumdant.

L'extrapolació a l'espècie humana dels resultats obtinguts amb animals segueix essent motiu de controvèrsia. Les condicions del nostre model experimental són molt favorables a la regeneració òssia i, a més, és sabut que aquest és un procés més ràpid en el conill que en l'home. No obstant, creiem que els resultats s'han d'acostar a la realitat perquè, d'una banda, el model experimental que hem fet servir no és nou i la seva eficàcia ja s'ha demostrat en altres treballs (Katthagen 1986, Fernández de Retana 1993, Del Valle 1999), i d'altra, perquè no hem extret cap conclusió a partir de xifres absolutes, sinó sempre per valors relatius respecte els altres grups d'estudi. És a dir, els resultats obtinguts amb l'implant de ciment de fosfat càlcic sempre es comparen, en les mateixes condicions experimentals, amb els de l'autoempelt i l'al.loempelt ossi, el comportament dels quals és ben conegut en l'espècie humana. Som conscients que això no implica que el comportament del ciment de fosfat càlcic que hem observat en el conill sigui directament extrapolable a l'home, però sí pensem que la comparació permanent de les dades amb les de

l'autoempelt i l'al.loempelt fa que les conclusions siguin més fiables. Les diferències observades entre els diferents grups haurien de ser degudes a les propietats biològiques de l'implant utilitzat, ja que la resta de condicions de l'experiment hem intentat que fossin sempre les mateixes.

En referència a la **metodologia quirúrgica**, hem de recordar que la perforació de la regió supracondílica (metafisària) del fèmur del conill amb una broca de 6 mm de diàmetre altera les condicions biomecàniques de la regió i comporta un risc de fractura. En l'estudi de Katthagen la fractura es produeix en un 1.2% dels casos. En el nostre estudi hem utilitzat una broca amb l'extrem en punxa, fet que facilita molt el seu correcte centrat i evita desviacions en sentit anterior o posterior, que podrien provocar la fractura. Creiem que aquest instrument és el que ens ha permès evitar aquesta complicació.

És sabut que les **condicions biomecàniques** poden influir sobre la regeneració òssia (Comín 1992). En el model experimental utilitzat, aquestes condicions són constants en tots els grups i per tant es tracta d'una variable controlada.

En el present estudi hem anomenat **grup control** al grup de conills en els quals s'ha creat el defecte ossi cavitari amb broca de 6mm però no s'ha implantat cap material. Ha servit per demostrar que no hi ha regeneració òssia espontània en les condicions que hem utilitzat. No obstant, a l'hora de realitzar les mesures histomorfomètriques i comparar els resultats dels diferents grups, no hem cregut convenient comparar cada grup amb el grup control, ja que hauríem trobat resultats molt satisfactoris en tots els casos. És per aquest motiu que els resultats histomorfomètrics dels diferents grups s'han comparat amb els del grup que teòricament havia d'oferir els millors resultats, és a dir, el

grup de l'autoempelt ossi esponjós en fresc. L'implant utilitzat serà tant millor quant més s'assembli al comportament del l'autoempelt esponjós.

Pel que fa al **temps d'establació dels animals** abans del sacrifici, hem triat dos períodes: 4 i 12 setmanes. Això es deu a diferents motius. Un període inferior a 4 setmanes només serviria per valorar la biocompatibilitat del material, l'absència de reaccions inflamatòries o de rebuig. No hem cregut convenient incloure un grup de sacrifici tan precoç perquè l'excel·lent biocompatibilitat del ciment de fosfat càlcic ja ha estat provada anteriorment en diversos estudis (Chow 1991, Hong 1991, Costantino 1991, Sugawara 1992, Driessens 1994 i 1995, Jansen 1996, Liu 1997, Miyamoto 1999).

D'altra banda, s'ha comprovat també que entre les 4 i les 8 setmanes apareixen fenòmens de remodelació òssia que comporten una reabsorció parcial de l'os neofomat en les primeres 4 setmanes i, per tant, la quantitat global d'os nou a les 4 i a les 8 setmanes és força semblant (Damien 1989, Ono 1989). També s'ha pogut observar en estudis previs que la velocitat de reabsorció del ciment de fosfat càlcic és més aviat lenta (Driessens 1995). És per això que calia incloure un grup amb almenys 12 setmanes d'establació prèvia al sacrifici. Com hem vist en la nostra experiència, fins i tot amb aquest període de temps s'observa ciment de fosfat càlcic encara intacte a l'interior del defecte ossi. Creiem que estudis futurs haurien d'intentar incloure temps d'establació superiors (entre 6 i 12 mesos).

Així doncs, un grup de 12 setmanes d'establació prèvia al sacrifici es feia imprescindible per valorar l'evolució dels implants en el temps i obtenir resultats dinàmics. Altres estudis realitzats implantant ciment de fosfat càlcic en conills utilitzen períodes semblants (Mermelstein 1996, Ikenaga 1998).

Pel que fa referència als **materials**, cal dir que, si bé la utilització d'empelts ossis, autòlegs o homòlegs, és molt habitual en la cirurgia ortopèdica actual, no sempre representen un tractament ideal i comporten un nombre considerable d'efectes indesitjables: quantitat limitada, necessitat de cirurgia afegida (autoempelts), risc de transmissió de malalties infeccioses (al.loempelts), comportament biològic no òptim (al.loempelts).

En els darrers anys s'han anat desenvolupant diferents tipus de biomaterials amb característiques físico-químiques i biològiques cada vegada millors i amb unes perspectives de futur molt atractives en el camp de la cirurgia de l'aparell locomotor: biomaterials osteoinductors i desenvolupament de l'anomenat os híbrid (capítol 1.7).

Hem centrat aquest treball de recerca en un grup de biomaterials, el dels **ciments de fosfat càlcic**, que reuneix una excel.lent biocompatibilitat amb la capacitat de biodegradació i de progressiva substitució per os neoformat. Aquest procés, que rep el nom d'osteotransducció, és únic entre els biomaterials avui dia coneguts (Driessens 1998).

La utilització de ceràmiques de fosfat càlcic té ja una llarga història en els camps de la cirurgia ortopèdica i també de la cirurgia maxil.lofacial. La possibilitat de variar la composició química dels materials ha permès obtenir unes propietats biològiques cada vegada millors (Daculsi 1989).

Destaca sobretot la capacitat d'aquests biomaterials de crear enllaços directes amb l'os, sense que aparegui cap interfase fibrosa (Yoshimine 1993, 1995 i 1996, Shindo 1993, Fernández 1995, Jansen 1996, Vasconcelos 1996, Kurashina 1997, Frankenburg 1998, Lu 1999).

No obstant, les ceràmiques de fosfat càlcic tenen en general unes propietats biomecàniques pobres, que limiten molt les possibles aplicacions terapèutiques (Gouin 1995).

És per aquest motiu que s'han desenvolupat, des del 1983, els ciments de fosfat càlcic, buscant un biomaterial amb les excel·lents propietats biològiques de les ceràmiques de fosfat càlcic però amb unes propietats biomecàniques més adaptades a les necessitats quirúrgiques (osteosíntesi de fractures, fixació d'endopròtesis) (Driessens 1998).

Es tracta doncs, d'un nou biomaterial amb un gran nombre de teòrics avantatges: quantitat il·limitada, absència de risc de transmissió de malalties, evita la morbiditat quirúrgica afegida per la presa d'empelt ossi, és biocompatible i biodegradable, pot ser utilitzat com a vehicle d'altres substàncies (sistemes "Drug Delivery"), es pot moldejar intraoperatòriament per farcir perfectament el defecte ossi, la reacció exotèrmica durant la presa del ciment és de només 1°C, pot ser injectable percutàniament i té unes propietats biomecàniques correctes (resistència a la compressió d'aproximadament 40 MPa) (Driessens 1998).

Hem volgut amb aquest treball de recerca comparar de forma quantitativa i en relació amb el temps les propietats biològiques de l'autoempelt ossi, l'autoempelt ossi i el ciment de fosfat càlcic desenvolupat al Departament de Ciències dels Materials de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Creiem que els resultats obtinguts amb el treball de recerca tenen dos aspectes positius; d'una banda demostren que el ciment de fosfat càlcic té unes excel·lents propietats biològiques que el fan comparable als empelts ossis (no hem trobat diferències estadísticament significatives quant a la taxa global de

regeneració òssia); d'altra banda, obren alguns interrogants sobre el comportament del biomaterial in vivo, fet que podria ser origen de nous treballs en el futur.

6.2.- El ciment de fosfat càlcic. Resultats.

6.2.1.- Radiologia.

L'avaluació radiològica té com a principal inconvenient la subjectivitat de l'observador i la poca informació final que se'n pot extreure. A més, en el nostre model experimental, la cortical externa del fèmur queda indemne, i això dificulta encara més la interpretació per la superposició d'imatges que genera en les projeccions de perfil.

Dos treballs previs realitzats amb el mateix model experimental (Fernández de Retana 1993 i Del Valle 1999) han demostrat que la valoració radiològica és poc fiable i no es correspon fidelment amb les dades histològiques i histomorfomètriques. Ambdós estudis desaconsellen treure conclusions a partir dels resultats radiològics.

Aquests antecedents i les observacions que hem fet ens han portat a no realitzar cap anàlisi estadística dels resultats radiològics. Creiem que per la seva senzillesa no està de més realitzar les radiografies i que poden servir per detectar esdeviments majors (fractura òssia, reabsorció completa d'un implant, aparició de calcificacions extraòssies), però no permeten extreure conclusions precises i científicament vàlides sobre el procés de regeneració òssia de defectes cavitaris.

Donat que la quantificació no és possible, es divideixen els resultats en quatre grups (reabsorció completa, reabsorció parcial, empelt intacte i empelt reorganitzat).

En la nostra experiència, hem de dir que la interpretació de les radiografies ha generat dubtes i creiem que l'objectivitat és difícil, tot i que hem intentat digitalitzar les imatges per poder invertir els colors i ampliar-les, buscant una major precisió a l'hora de qualificar-les (figures 17 a 20 a les pàgines 182 i 183).

Sí podem dir que en cap cas no hem observat una reabsorció completa de l'implant. En el grup Ci12 (ciment de fosfat càlcic 12 setmanes) l'implant de ciment sembla intacte en 2 dels 6 exemplars, tot i que posteriorment la histologia i la histomorfometria han mostrat que això no és cert, és a dir, que si bé queda encara ciment no reabsorbit a les 12 setmanes, en cap cas no hem trobat el biomaterial intacte, sinó que sempre s'ha iniciat un procés de substitució per os neoformat.

Si observem la suma de punts en els grups de 4 setmanes (Capítol 5.4.1), veiem que el grup que obté millor puntuació és el de ciment de fosfat càlcic, fet que tampoc no es correspon amb les imatges histològiques ni amb les dades histomorfomètriques.

Una visió "global" dels resultats radiològics permet intuir que la regeneració òssia és semblant en tots els grups (exceptuant el grup control sense implant), que els grups d'autoempelt sempre obtenen valoracions més pobres que els d'autoempelt, o que les puntuacions són superiors en els grups de 12 setmanes que en els de 4 setmanes. Es tracta, però, d'una valoració global que no permet extreure conclusions precises.

6.2.2.- Histologia i histomorfometria òssia.

L'estudi histològic i histomorfomètric de les mostres permet conèixer amb detall la regeneració òssia dels diferents grups.

En el grup control (sense implant) hem pogut observar la persistència del defecte ossi en tots els exemplars i per tant l'absència de regeneració espontània de l'os amb el model experimental utilitzat. Aquesta observació coincideix plenament amb la dels autors que van descriure el model experimental (Katthagen 1986).

En la resta de grups (empelts i ciment) hem pogut observar una regeneració òssia progressiva (superior en els grups de 12 setmanes) i centrípeta. Així, en les primeres fases s'observa os neofomat sobretot a la perifèria del defecte. La major part de la regeneració òssia es produeix al llarg de les primeres 4 setmanes i, tot i que després el procés segueix endavant, ho fa a un ritme molt inferior. Tant és així que les diferències observades entre els valors de superfície específica d'os trabecular a les 4 i a les 12 setmanes no són estadísticament significatives (capítol 5.3.2.1). Aquest valor és indicatiu de la regeneració òssia global que s'ha obtingut amb cada grup.

El grup en què s'observa major taxa de regeneració òssia és el d'empelt autogen fresc. No obstant, les diferències observades no són estadísticament significatives. D'aquesta observació es pot deduir que, en el nostre model experimental, el ciment de fosfat càlcic ha permès obtenir una taxa de regeneració òssia equivalent a la dels empelts.

La proporció de ribet osteoide cobert per osteoblast cúbics és indicativa d'activitat de neoformació òssia. De nou les diferències entre els grups no són estadísticament significatives, però sí ho són les diferències entre els grups de

4 i 12 setmanes . L'activitat de neoformació òssia és major a les 4 setmanes que a les 12 setmanes. Segueix, per tant, un ritme decreixent en el temps. En el grup de ciment de fosfat càlcic hem obtingut resultats equivalents als dels grups amb empelt ossi (diferències no significatives). Això implica una activitat de neoformació òssia semblant en els tres grups.

En els paràmetres de superfície relativa de formació, àrea d'osteoide i relació entre àrea d'osteoide i àrea trabecular, el resultat en el grup d'empelt homòleg és molt pobre. Com veurem a continuació, creiem que això no és causat només pel fet que el comportament de l'al.loempelt sigui pitjor. En els càlculs de l'àrea d'osteoide (i per tant en els altres càlculs que se'n deriven) influeix la dada mesurada de l' amplada mitja d'osteoide. Aquest valor és molt elevat en els grups de ciment, sobretot en el de 4 setmanes, però també en el de 12 setmanes, amb diferències estadísticament significatives ($p < 0,01$) (capítol 5.3.2.6). No hem trobat, en la bibliografia consultada, cap referència a l'elevat gruix d'osteoide que s'observa en els implants de ciment de fosfat càlcic. Les imatges que hem pogut observar recorden en alguns casos les que s'observen en l'osteomalàcia (figures 38 i 39 del capítol 5.2.3).

Aquest fet suggereix que pot existir alguna dificultat en el procés de calcificació en presència de ciment de fosfat càlcic. És a dir, el fet que el gruix d'osteoide sigui molt elevat no és necessàriament indicatiu d'una elevada activitat de neoformació òssia. També és possible que l'osteoide que es va formant a ritme normal no es calcifiqui correctament i per tant el gruix vagi augmentant.

En l'osteomalàcia l'augment en el gruix d'osteoide s'acompanya d'una xifra baixa en la proporció de ribet cobert per osteoblasts cúbics (Serrano

1990), fet que indica una activitat neoformadora pobra. Això no apareix en cap dels grups de ciment de fosfat càlcic que hem estudiat, però no obstant creiem que en el futur serà necessari realitzar un estudi dinàmic fent marcatge amb tetraciclins per aclarir aquest punt. En efecte, les tetraciclins tenen la propietat d'unir-se estequiomètricament al mineral amorf dels fronts de mineralització. En canvi, no tenen afinitat pels cristalls d'hidroxiapatita. Són doncs un excel·lent marcador dels fronts de mineralització. L'observació es realitza amb microscopi de fluorescència amb talls sense tenyir d'os no decalcificat. Permet mesurar la velocitat de dipòsit de material càlcic en l'osteòide durant el procés de mineralització (Serrano 1990).

6.2.3.- El ciment de fosfat càlcic.

Hem utilitzat per a la discussió la mateixa seqüència emprada per a la revisió bibliogràfica. Analitzarem doncs les característiques del ciment de fosfat càlcic i els resultats d'aquest treball en els següents cinc apartats:

6.2.3.1.- Formulació química.

En el disseny d'un ciment pensat per a la pràctica quirúrgica cal complir una sèrie de requisits generals (Driessens 1998):

- absència de toxicitat.
- absència d'efectes exotèrmics durant la reacció de presa.
- capacitat de presa en contacte amb els fluïds corporals.
- temps de presa i d'enduriment raonables.
- absència de contracció del volum durant la reacció de presa.

- assoliment d'una resistència mecànica apropiada.
- bioactivitat.

En aquest treball de recerca hem utilitzat l'anomenat Biociment H, un ciment de fosfat càlcic sintetitzat al Departament de Ciències del Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya. Aquest ciment està format per una fase sòlida (98% de fosfat α -tricàlcic i 2% d'hidroxiapatita precipitada) i una fase líquida (solució aquosa al 2,5% de fosfat sòdic). La relació líquid /pols de la barreja és de 0'32 ml/g. Els membres del Departament han considerat que aquesta és la formulació òptima per utilitzar en cirurgia després de diversos treballs de recerca (Driessens 1994 i 1998, Fernández 1996 i 1998, Ginebra 1995 i 1997). S'ha demostrat que els pirofosfats i els metafosfats són hidrolitzats en els fluids corporals i per tant només els ortofosfats són útils per a la seva utilització en forma de ciment (Driessens 1993). A més, elevades concentracions de ions pirofosfats o metafosfats en els fluids biològics podrien generar calcificacions extraòssies.

Els fosfats càlcics que poden precipitar en solucions aquoses amb un pH entre 4 i 9 i a temperatura ambient o corporal són els següents: fosfat dicàlcic dihidratat, fosfat octocàlcic, hidroxiapatita deficient en calci i hidroxiapatita precipitada. El precursor mineral de la matriu òssia és l'octofosfat càlcic. Aquest mineral no és estable en els fluids extracel·lulars i es transforma espontàniament en una barreja d'apatita que conté magnesi, sodi i carbonat i hidroxiapatita carbonatada. Durant la remodelació òssia, els osteoclasts destrueixen l'os vell, inclosa la fase mineral, i posteriorment els osteoblasts creen nova matriu òssia induint la formació de nou fosfat octocàlcic. Això descriu el constant reciclatge de l'os viu.

Bermúdez (1994) estudia en diversos treballs les proporcions òptimes entre els diferents components del ciment, la relació líquid-pols de la barreja i la proporció d'hidroxiapatita precipitada buscant un temps de presa adaptat a les necessitats quirúrgiques i una correcta resistència mecànica del material. En un altre treball, Driessens (1993) analitza 100 formulacions diferents que donen lloc a ciments de fosfat càlcic, valorant les que podrien ser adaptades per a la seva utilització en aplicacions quirúrgiques. La reacció de presa del ciment també ha estat objecte d'estudi. Ginebra (1997) observa com a les 24 hores de l'implant, el 80% del fosfat α -tricàlcic s'ha convertit en hidroxiapatita deficient en calci, de composició molt semblant a la de l'os.

6.2.3.2.- Propietats físiques i mecàniques.

a) Resistència mecànica del material.

De fet, és la coneguda fragilitat de les ceràmiques de fosfat càlcic el que ha impulsat la recerca en el camp dels ciments, tot buscant mantenir les excel.lents propietats biològiques d'aquelles però millorant la resistència mecànica. La presentació de les ceràmiques de fosfat càlcic en forma de ciment té com a objectius principals aconseguir una fixació òptima al teixit (per la possibilitat d'amotllar-lo perfectament en el moment de l'implant) i millorar l'estabilitat inicial, ja que les propietats mecàniques són superiors a les de les altres formes de presentació de les ceràmiques fosfocàlciques (Driessens 1998). Actualment, però, la resistència mecànica és encara un punt feble del biomaterial, i els ciments actuals no poden ser implantats en situacions amb sol.licitacions mecàniques importants. És per aquest motiu que les indicacions

actuals del ciment de fosfat càlcic es limiten encara als defectes ossis cavitaris o al reforç d'osteosíntesis, evitant els defectes segmentaris o el seu implant en regions d'elevada càrrega mecànica (Bermúdez 1993). En el camp de la cimentació d'endopròtesis, s'ha analitzat la possibilitat d'afegir fosfat càlcic al ciment de polimetilmetacrilat (PMMA) utilitzat habitualment, amb l'objectiu de millorar la biocompatibilitat del material (Dandurand 1990) i disminuir la temperatura durant la presa del ciment (Mongiorgi 1993).

El ciment de fosfat càlcic que hem utilitzat en aquest treball té uns valors de resistència mecànica de 20 MPa a les 8 hores de l'implant, 33 MPa a les 24 hores i 40 MPa a les 40 hores, que és quan assoleix la seva resistència mecànica màxima. Aquests valors de resistència mecànica a la compressió són equivalents als obtinguts per diversos autors amb diferents tipus de ciments de fosfat càlcic (Bermúdez 1993, Ginebra 1994). Altres autors, en canvi, obtenen valors de resistència mecànica superiors (Ishikawa 1995) variant la porositat del material. La resistència a la compressió depèn de (Driessens 1993, Otsuka 1995):

- la composició química de la fase en pols i de la fase líquida del ciment.

- la mida de les partícules dels components de la pols de ciment.

- la quantitat i morfologia del material afegit com a llavor. La resistència a la compressió és molt major si els cristalls d'hidroxiapatita precipitada que s'afegeixen són petits que si són grans.

- la relació líquid/pols del ciment. En general, la resistència és superior si l'esmentada proporció és baixa, però la quantitat de líquid ha de ser suficient per a permetre que la barreja sigui homogènia.

- la porositat del material. És un dels factors més importants. Existeix una relació exponencial entre la resistència mecànica i la porositat del ciment (Ishikawa 1995). No obstant, cal tenir en compte que l'elevada porositat del material afavoreix molt el seu comportament biològic. La limitació que imposa la fixació biològica entre el biomaterial i el teixit és que, per permetre que el teixit colonitzador es mantingui sà i viable, cal que els porus tinguin un diàmetre mínim de 100 a 150 μm . Aquest tamany assegura la correcta vascularització del teixit connectiu en creixement.

- l'estabilitat química del ciment durant el seu emmagatzemament i la seva esterilització.

b) Reacció de presa del ciment.

Aquest és un dels aspectes que ha donat lloc a més treballs de recerca. Cal aconseguir un ciment fàcilment moldejable i amb un temps de presa adaptat a les necessitats quirúrgiques. Aquest temps de presa del ciment depèn de diversos factors (Lemaitre 1992, Bermúdez 1993, Otsuka 1993, Ginebra 1994, Driessens 1995):

- la composició química de la pols i el líquid.
- proporció entre fase sòlida (pols) i fase líquida en els components inicials.
- la granulometria de la fase en pols.
- pH del medi.
- temperatura ambient.
- utilització d'additius. En el següent apartat analitzarem els additius utilitzats en el Biociment H. Amb aquests additius, el Biociment H obté uns valors

de 5 minuts per al temps de cohesió, 7-9 minuts per al temps inicial de presa i 15-22 minuts per al temps final de presa. Això condiciona la forma d'aplicació del material, que s'ha de fer regulada amb cronòmetre per evitar que la manipulació del ciment o el contacte precoç amb fluïds biològics alterin les seves propietats mecàniques (Ginebra 1997).

Un altre aspecte important és que la reacció de presa del ciment de fosfat càlcic és mínimament exotèrmica. L'augment de temperatura és de només 1°C i això evita la possible lesió de teixits tous per efecte tèrmic que es produeix amb el ciment de polimetilmetacrilat (Ginebra 1994, Fernández 1995).

6.2.3.3.- Efecte dels additius.

La recerca d'un temps de presa del ciment adequat i d'una resistència mecànica òptima ha fet proliferar els estudis amb molt diversos additius. El sulfat càlcic dihidratat i el pirofosfat sòdic milloren la resistència mecànica però allarguen excessivament el temps de presa del ciment (Mirtchi 1989). El fluor, en canvi, millora tant el temps de presa com la resistència mecànica (Mirtchi 1991). El carbonat, el pirofosfat i les sals de magnesi poden arribar fins i tot a inhibir la reacció de presa del ciment (Ginebra 1995, Daculsi 1996). El carbonat càlcic (Khairoun 1997) i el sodi (Ishikawa 1995) són additius recomanables quan no es pot evitar el contacte precoç del ciment amb la sang. El carbonat càlcic, a més, millora la resistència mecànica del material i el fa més semblant a les apatites biològiques (Fernández 1998).

En el ciment que hem utilitzat, l'addició d'un 2% d'hidroxiapatita precipitada fa disminuir notablement el temps de presa i en canvi afecta poc la resistència mecànica del material. Alhora, la utilització d'una solució aquosa de

fosfat sòdic com a fase líquida dels components inicials també accelera el temps de presa del ciment (Ginebra 1995). S'obté així una resistència mecànica correcta amb un temps de presa adaptat a les necessitats quirúrgiques.

6.2.3.4.- Biocompatibilitat del material.

L'excel·lent biocompatibilitat de les ceràmiques de fosfat càlcic en general i del ciment en particular és un dels factors més positius d'aquests biomaterials. Pràcticament tots els autors coincideixen en destacar aquest aspecte. S'ha observat en alguns casos l'aparició d'una reacció inflamatòria lleu al voltant de l'implant de ciment (Chohayeb 1987, Hong 1991, Sugawara 1992, Yoshimine 1993, Jansen 1996, Miyamoto 1999). Totes les anàlisis de toxicitat, mutagenicitat i carcinogènesi són negatives (Costantino 1991, Liu 1997). L'avaluació de la biocompatibilitat del material no es troba entre els objectius d'aquest treball de recerca i no hem realitzat anàlisis d'histoquímica enzimàtica, però sí podem dir que no hem observat en cap cas l'aparició d'una reacció inflamatòria important, amb macròfags i limfòcits, al voltant dels implants de ciment de fosfat càlcic.

6.2.3.5.- Enllaç a l'os.

L'enllaç directe entre el biomaterial i l'os és una de les propietats més interessants de les ceràmiques de fosfat càlcic. Amb molts altres biomaterials es crea una càpsula fibrosa entre el material i l'os que dificulta l'anclatge i tots els processos de regeneració òssia. La unió directa amb l'os facilita en gran mesura la reparació dels defectes. Cal buscar l'origen d'aquesta propietat en la composició química dels biomaterials. La semblança amb la fase mineral òssia

és el fa possible la unió directa. El mecanisme d'osteointegració del material ha estat àmpliament estudiat en els darrers anys. Així, es descriuen quatre tipus de fixació entre les bioceràmiques i el teixit. La que es produeix amb el ciment de fosfat càlcic és una fixació biològica i bioactiva amb material biodegradable, és a dir, que es combinen la colonització del material per teixit neofomat, la formació d'enllaços químics entre el material i el teixit i, finalment, la lenta i progressiva degradació del biomaterial. El resultat és que el gruix de la interfase és mínim o gairebé inexistent (Proubasta 1997).

Molts són els treballs que han confirmat l'existència d'aquest enllaç directe entre el biomaterial i l'os, tant amb ceràmiques de fosfat càlcic (Kotani 1991, Driessens 1992, Tisdell 1994, Dean 1995, Kitsughi 1995, Dupraz 1998, Wang 1998) com amb ciment de fosfat càlcic (Hong 1991, Yoshimine 1993, 1995 i 1996, Fernández 1995, Jansen 1996, Kurashina 1997, Lu 1999).

La interfase ciment-os s'ha estudiat també amb microscopia electrònica, valorant la interacció in vitro entre un ciment de fosfat tetracàlcic i cèl.lules osteogèniques. S'ha pogut observar la formació, a la perifèria del material, d'estructures nodulars tridimensionals cobertes per cèl.lules osteoblàstiques actives. Els nòduls contenen teixit mineralitzat molt semblant a l'os format in vivo. Les imatges de microscopia electrònica mostren el ciment de fosfat càlcic immediatament adjacent a processos citoplasmàtics de les cèl.lules. La mineralització de la matriu col.làgena extracel.lular té lloc directament a la superfície del biomaterial. Aquests resultats in vitro suggereixen que el ciment de fosfat càlcic participa directament en el procés de neoformació òssia (Yoshimine 1996).

El treball que hem realitzat confirma plenament aquestes observacions. En les imatges de microscopia òptica no hem observat en cap cas la interposició de material fibrós entre el biomaterial i el teixit ossi circumdant. En alguns casos hem pogut observar trabècules òssies actives (amb ribet osteoide cobert per osteoblasts cúbics) en continuïtat directa amb el ciment de fosfat càlcic (figures 44, 45 i 46 a la pàgina 211).

6.2.3.6.- Acció biològica.

L'estudi del comportament biològic del ciment de fosfat càlcic és l'objectiu fonamental d'aquest treball i totes les valoracions efectuades es dirigeixen a aprofundir en el coneixement d'aquest apartat. El ciment de fosfat càlcic té unes propietats biològiques molt particulars, ja que el seu mecanisme d'osteointegració, anomenat osteotransducció (Driessens 1998) és únic entre els biomaterials avui dia coneguts. El material entra a formar part directament del procés de neoformació òssia. Per a això cal que la degradació del material només sigui possible de forma activa, és a dir, amb la participació directa i necessària de les cèl.lules osteoclàstiques. Aquest és el concepte de l'osteotransducció, que podem definir com la fixació biològica i bioactiva d'un material amb biodegradabilitat selectiva (només activa) i biotransformació (Driessens 1998). El material és porós, fet que permet la fixació biològica (colonització per cèl.lules osteoclàstiques). Els implants subcutanis o intramusculars de fosfat tricàlcic no són degradats (Kurashina 1997). Els productes de degradació dels material, no només no són tòxics, sinó que aporten elements (calci i fósfor) necessaris per al procés de neoformació òssia per part dels osteoblasts. Així doncs, en realitat el material no és degradat sinó

que pateix una veritable transformació a l'interior del teixit ossi. Això millora també el problema d'adaptar les velocitats de degradació del material i de neoformació òssia, donat que en el cas del fosfat tricàlcic no es tracta de dos mecanismes diferents sinó d'un sol procés (osteotransducció).

El mecanisme íntim de l'osteotransducció, vàlid només per als biomaterials de fosfat càlcic, s'ha descrit de la següent manera (Daculsi 1994 i 1996). Durant els primers dies d'implantació, la cicatrització de la regió afectada s'acompanya d'una "neteja" de la superfície de l'implant, que elimina partícules i cèl.lules mortes. Aquesta neteja la realitzen els macròfags per fagocitosi (Bruijn 1996). Posteriorment s'inicia la biodegradació del material per fagocitosi i per dissolució extracel.lular. Aquests mecanismes associen l'acció dels macròfags a la d'altres cèl.lules. Existeix una pseudofagocitosi per fibroblasts que comencen a penetrar a l'interior de la ceràmica. Simultàniament, la solució present entre els cristalls de l'implant s'enriqueix en ions de calci i de fósfor, alliberats per la dissolució d'alguns d'aquests cristalls. En aquest moment es pot produir una precipitació cristal.lina a la superfície i entre els grànuls de l'implant. Aquesta precipitació té lloc en un medi ric en proteïnes i condueix a la formació de cristalls d'apatites biològiques idèntics als de l'os (Daculsi 1990). La precipitació modifica les propietats mecàniques de l'implant (Trecant 1994). Aquesta calcificació no es produeix necessàriament sobre una matriu col.làgena altament diferenciada com la matriu òssia, sinó sobre una matriu extracel.lular encara indiferenciada. No es tracta doncs d'una ossificació sinó d'una calcificació de la matriu extracel.lular.

Si l'acció cel.lular fa que la reabsorció del material sigui massa ràpida, l'osteointegració no serà possible. En canvi, si la reabsorció és massa lenta, el

material queda envoltat per microcristalls d'apatites biològiques. Posteriorment, l'osteointegració continua per osteogènesi al voltant i a l'interior dels porus de l'implant. Un os viu neofomat, amb osteòcits i matriu extracel.lular mineralitzada, apareix entre els grànuls del biomaterial. Aquí s'ha pogut observar el procés de remodelació òssia amb el cicle reabsorció-aposició d'os, igual que en l'os sà. Aixó implica l'existència d'una interfase dinàmica (anomenada de coalescència) on es relacionen directament els cristalls de síntesi de l'implant amb els cristalls biològics que es van dipositant a la matriu extracel.lular (Daculsi 1996).

La combinació de les propietats d'osteoconducció i biodegradabilitat del ciment de fosfat càlcic ha estat confirmada per diversos autors (Costantino 1991 i 1992, Shindo 1993, Driessens 1995 i 1998, Jansen 1995, Hamanishi 1996, Ohura 1996, Constantz 1998, Frankenburg 1998, Frayssinet 1998).

En el model experimental que hem utilitzat, el ciment de fosfat càlcic s'ha comportat també com un material osteoconductor i biodegradable, essent progressivament substituït per os sà neofomat. No obstant, hem de destacar que el ritme de degradació del material és lent, i a les 12 setmanes hem observat encara ciment de fosfat càlcic intacte al centre del defecte del defecte ossi (figures 43 i 44 a les pàgines 210 i 211 respectivament). Altres autors, en canvi, observen, en experiments molt semblants (defectes al còndil femoral del conill) com tot el ciment de fosfat càlcic ha estat reabsorbit a les 8 setmanes de l'implant (Ohura 1996). Creiem que aquestes diferències poden ser degudes a la composició química del ciment (fosfat β -tricàlcic i fosfat monocàlcic monohidratat en el treball citat).

No hem trobat en la literatura cap treball que compari de forma quantitativa, amb estudis d'histomorfometria, la regeneració òssia obtinguda amb el ciment de fosfat càlcic amb la que s'aconsegueix amb l'empelt ossi autogen fresc i l'aloempelt congelat. En el nostre treball, el ciment de fosfat càlcic ha mostrat un comportament biològic equivalent al dels empelts pel que fa a la taxa global de regeneració òssia.

Altres autors han centrat la seva recerca en estudis in vitro amb el ciment de fosfat càlcic. S'ha observat que el material no es dissol en posar-lo en contacte amb una substància semblant al plasma sanguini, fet que suggereix que és estable en els fluïds biològics (Ishikawa 1994). També s'ha pogut observar un augment de la diferenciació de les cèl·lules osteoprogenitores del moll de l'os en presència de ciment de fosfat càlcic (Oreffo 1997, Bloom 2000). Altres autors, en canvi, destaquen la possibilitat que un elevat nombre de partícules de ciment de fosfat càlcic (com també de ciment de polimetilmetacrilat) indueixi una reacció osteolítica (Ingham 2000), o que les partícules de ciment de menys de 10 µm de diàmetre poden disminuir la proliferació d'osteoblasts (Pioletti 2000). Aquests són efectes dosi-depenents.

També s'han realitzat estudis biomecànics en cadàver, observant que la utilització de ciment de fosfat càlcic podria millorar la fixació de determinades fractures (Stankewich 1996, Mermelstein 1996, Moore 1997, Yetkinler 1999).

Altres autors han realitzat estudis amb diferents animals d'experimentació; gats (Costantino 1992), gossos (Shindo 1993, Fujikawa 1995, Frankenburg 1998, Meraw 2000), rates (Driessens 1995), ovelles (Flautre 1999, Frayssinet 2000), primats (Hong 1991) i conills (Hamanishi 1996, Ohura 1996,

Constantz 1998, Frayssinet 1998, Kurashina 1998, Ikenaga 1998, Lu 1999). Tots ells, sense excepció, destaquen les propietats d'osteoconducció, biodegradabilitat i biocompatibilitat del ciment de fosfat càlcic, així com la unió directa a l'os sense interposició d'interfase fibrosa. El treball que presentem confirma de nou aquestes propietats.

També s'ha analitzat la possible utilitat del ciment de fosfat càlcic com a material alliberador de fàrmacs (sistemes DDS "Drug delivery system"). En efecte, la progressiva biodegradació del ciment de fosfat càlcic fa que teòricament sigui un material ideal per alliberar lentament fàrmacs a l'interior de l'os. Això permetria administrar fàrmacs com la vancomicina (Hamanishi 1996), la gentamicina (Bohner 1997, Sasaki 1999) o la indometacina (Otsuka 1994).

Finalment, també s'han realitzat els primers estudis en clínica humana utilitzant ciment de fosfat càlcic per millorar els resultats en el tractament d'alguns tipus de fractures, com les de l'epífisi distal del radi (Kopylov 1996, Sánchez-Sotelo 2000). Són de moment, però, resultats preliminars en sèries curtes de pacients.

Pensem que els resultats que hem presentat, que mostren que la taxa global de regeneració òssia que s'obté amb el ciment de fosfat càlcic és equivalent a l'obtinguda amb els empelts ossis, tenen dues conseqüències. D'una banda conviden a realitzar nous treballs per aprofundir en el coneixement de mecanisme íntim de l'osteotransducció i aclarir els dubtes que han anat sorgint. D'altra banda, poden autoritzar l'inici d'estudis clínics més amplis utilitzant ciment de fosfat càlcic en patologies que actualment es tracten amb empelts ossis.

7.- Conclusions.

1.- El ciment de fosfat càlcic situat a l'interior de l'os no genera en l'animal d'experimentació pràcticament cap reacció biològica de rebuig i es fixa directament al l'os circumdant, sense interfase de teixit fibrós.

2.- El ciment de fosfat càlcic col.locat a l'interior de defectes ossis cavitaris en l'animal d'experimentació es comporta com un material osteoconductor i és progressivament degradat i substituït per os neoformat.

3.- En el model experimental utilitzat, el ciment de fosfat càlcic té un comportament biològic equivalent al de l'empelt autogen fresc i l'al.loempelt congelat pel que fa referència a la taxa global de neoformació òssia.

4.- L'al.loempelt ossi congelat té un comportament biològic més pobre que l'empelt autogen i que el ciment de fosfat càlcic, pel que fa referència a l'activitat de neoformació òssia a les 12 setmanes de l'implant.

5.- L'elevat gruix del ribet d'osteoides en el grup de ciment de fosfat càlcic a les 4 setmanes de l'implant suggereix la possible existència de dificultats en el moment de la calcificació de l'osteoides. Caldria analitzar aquest procés amb estudis dinàmics dels fronts de mineralització mitjançant marcatges amb tetraciclins.

8.- Bibliografia.

1. AATB. Standards for tissue banking. McLean, VA, 1991.
2. AATB. Technical manual for tissue banking. AATB, 1992.
3. Abbot L.C.; Schottstaedt E.R.; Saunders J.B.; Bost F.C.: The evaluation of cortical and cancellous bone as grafting material. A clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg* 29: 381-420, 1947.
4. Aebi M.; Regazzoni P.; Schwarzenbach O.: Segmental bone grafting. Comparison of different types of graft in dogs. *Int Orthop* 13: 101-11, 1989.
5. Alho A.; Karaharju E.O.; Korkala O.; Laasonen E.M.; Holström T.; Müller C.: Allogeneic graft for bone tumor. 21 cases of osteoarticular and segmental grafts. *Acta Orthop Scand*, 60: 143-153, 1989.
6. Akeson W.H.; Woo S.L.; Coutts R.D.: Quantitative histological evaluation of early fracture healing of cortical bones immobilized by stainless steel and composite plates. *Calcif Tissue Int* 19: 27-37, 1975.
7. Amédée J.; Baquey Ch.: Les matériaux du futur: les matériaux ostéo-inducteurs. En Passuti N.: *Biomatériaux de substitution de l'os et du cartilage*. Cahiers d'enseignement de la SoFCOT n° 57. Expansion Scientifique Française. Paris, 1996.
8. Andrew C.; Basset M.D: Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop Rel Res* 87: 49-59, 1972.
9. Andrew J.G.; Hoyland J.A.; Thomas J.T.; Boot R.P.; Ayad S.; Marriot A.; Grant M.E.; Freemont A.; Marsh D.: An investigation of the role of collagen X in human fracture healing. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 314, 1992.
10. Andrew J.G.; Hoyland J.A.; Andrew S.M.; Freemont A.; Marsh D.: Demonstration of TGF-beta mRNA by in situ hybridisation in human fracture callus. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 315, 1992.

11. Apte S.S.; Kenwright J.: A new method for localisation of proliferating cells in cartilage and bone in vitro and in vivo. *J Bone Joint Surg* 71B: 726, 1989
12. Aspenberg P.; Wang J.S.; Thorgren K.G.: Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats: increased chondrocyte numbers and accelerated endochondral ossification. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 226, 1993.
13. Bajpai P.K.; Benghuzzi H.A.: Ceramic systems for long term delivery of chemicals and biologicals. *J Biomed Mat Res* 22: 1245-66, 1988.
14. Basset C.A.L.: Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop* 87: 49-68, 1972.
15. Bélanger L.F.: Osteocytic osteolysis. *Calcif Tissue Res* 4: 1-12, 1969.
16. Bermúdez O.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.: Compressive Strength and diametrial tensile strength of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *J Mater Sci Mat Med* 4: 389-93, 1993.
17. Bermúdez O.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.: Optimization of a calcium orthophosphate cement formulation occurring in the combination of monocalcium phosphate monohydrate with calcium oxide. *J Mater Sci Mat Med* 5: 67-71, 1994.
18. Bermúdez O.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.: Development of an octocalcium phosphate cement. *J Mater Sci Mat Med* 5: 144-46, 1994.
19. Bermúdez O.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Ginebra M.P.; Planell J.A.: Chloride- and alkali-containing calcium phosphates as basic materials to prepare calcium phosphate cements. *Biomaterials* 15(12): 1019-23, 1994.
20. Bermúdez O.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.: Development of some calcium phosphate cements from combinations of alfa-TCP, MCPM and CaO. *J Mater Sci Mat Med* 5: 160-63, 1994.
21. Bermúdez O.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.; Boltong M.G.: Comparison of calcium phosphate cements with dental plaster. Fourth World Biomaterials Congress, Berlin, p. 428, April 1992.

22. Berrey B.H.; Lord C.F.; Gebhard M.C.; Mankin H.J.: Fractures in allografts. Frequency, treatment and end-results. *J Bone Joint Surg* 72A: 825-839, 1990.
23. Beruto D.T.; Mezzasalma S.A.; Capurro M.; Botter R.; Cirillo P.: Use of alpha-tricalcium phosphate (TCP) as powders and as an aqueous dispersion to modify processing, microstructure and mechanical properties of polymethylmetacrylate (PMMA) bone cements and to produce bone-substitutes compounds. *J Biomed Mater Res* 49(4): 498-505, 2000.
24. Blitz R.M.; Pellegrino E.D.: The chemical anatomy of bone. *J Bone Joint Surg* 51A: 456-466, 1969.
25. Blom E.J.; Klein-Nulend J.; Klein C.P.; Kurashina K.; Van Maas M.A.; Burger E.H.: Transforming growth factor-beta 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res* 50(1): 67-74, 2000.
26. Bloom W.; Fawcett D.W.: *Tratado de histología*. Ed. Labor. Barcelona, 1981.
27. Bohner M.; Lemaitre J.; Van Landuyt P.; Zambelli P.Y.; Merkle H.P.; Gander B.: Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J Pharm Sci* 86(5): 565-72, 1997.
28. Bolander M.E: Regulation of fracture repair. *Llibre de resums de la Reunió Científica sobre Biomaterials*. Institut de Biomecànica de València, 1994.
29. Bonfiglio M.; Jeter W.S.: Immunological responses to bone. *Clin Orthop* 87: 19-34, 1972.
30. Bos G.D.; Goldberg V.M.; Powell A.E.; Heiple K.G.; Zika J.M.: The effect of histocompatibility matching on canine frozen bone allografts. *J Bone Joint Surg* 65A: 89-96, 1983.
31. Bos G.D.; Goldberg V.M.; Zika J.M.; Heiple K.G.; Powell A.E.: Immune response of rats to frozen bone allografts. *J Bone Joint Surg* 65A: 239-246, 1983.

32. Bos G.D.; Goldberg V.M.; Gordon N.H.; Dollinger B.M.; Zika J.M.; Powell A.E.: The long-term fate of fresh and frozen orthotopic bone allografts in genetically defined rats. *Clin Orthop* 197: 245-253, 1985.
33. Böstman O.M.: Absorbable implants for the fixation of fractures. *J Bone Joint Surg* 73A(1): 148-53, 1991.
34. Bostrom M.P.; Camacho N.P.: Posible participación de las proteínas morfogenéticas óseas en la consolidación de fracturas. *Clin Orthop Rel Res* 1(4): 312-19, 1999.
35. Breitbart A.S.; Staffenberg D.A.; Thorne C.H.; Glat P.M.; Cunningham N.S.; Reddi A.H.; Ricci J.; Steiner G.: Tricalcium phosphate and osteogenin: a bioactive onlay bone graft substitute. *Plast Reconstr Surg* 96(3): 699-708, 1995.
36. Brook I.M.; Craig G.T.; Lamb D.J.: In vitro interaction between primary, bone organ cultures, glass-ionomer cements and hydroxyapatite / tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 12: 179-86, 1991.
37. Brookes M, Revell W.J, Heatley F.W. The vascular response of the intact rabbit femur to simulated bone fracture. *J Bone Joint Surg* 71B: 725-6, 1989.
38. Brown W.E.; Fulmer M.: Kinetics of hydroxyapatite formation at low temperature. *J Am Ceram Soc* 74: 934-40, 1991.
39. Brueton R.N.; Revell W.J.; Brookes M.: Haemodynamic changes during bone healing in a stable fracture. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 314-5, 1992.
40. Bruijn J.D.; Bovell Y.P.; Planell J.A.; Driessens F.C.M.: Osteoclast responses to two types of experimental calcium phosphate bone cements. Fifth World Biomaterials Congress. Toronto. Canada. May 1996.
41. Bruijn J.D.; Blitterswijk C.A.; Davies J.E.: Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *J Biomed Met Res* 29: 89-99, 1995.
42. Bucholz R.W.; Carlton A.; Homes R.: Interporous hydroxyapatite as bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop* 240: 53-62, 1989.

43. Buck B.E.; Malinin T.I.; Brown M.D.: Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate risk of acquired immunodeficiency syndrome. Clin Orthop 240: 129-36, 1989.
44. Buck B.E.; Resnick L.; Shah S.M.; Malinin T.I.: Human Immunodeficiency virus cultured from bone: implications for transplantation. Clin Orthop 251: 249-53, 1990.
45. Buck B.E.; Malinin T.I.: Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. Clin Orthop 303: 8-17, 1994.
46. Bullough P.G.; Bansal M.; DiCarlo E.F.: The tissue diagnosis of metabolic bone disease. Role of histomorphometry. Orthop Clin North Am 21: 65-79, 1990.
47. Buma P.; Gardeniers J.W.: Tissue reactions around a hydroxyapatite-coated hip prosthesis. J Arthroplasty 10:389-95, 1995.
48. Burchardt H.: The biology of bone repair. Clin Orthop 174: 28-42, 1983.
49. Burchardt H.: Biology of bone transplantation. Orthop Clin of North America 18: 187-96, 1987.
50. Burchardt H.; Jones H.; Glowczewskie F.P.; Rudner C.; Enneking W.F.: Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone grafts in dogs. J Bone Joint Surg 60A: 1082-1090, 1978.
51. Burwell R.G.: Studies in the transplantation of bone (V). The capacity of fresh and treated homografts in bone to evoke transplantation immunity. J Bone Joint Surg 45B: 386-401, 1963.
52. Burwell R.G.: Studies in the transplantation of bone (VI). Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. J Bone Joint Surg 45B: 597-612, 1963.
53. Burwell R.G.: Studies in the transplantation of bone (VII). The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. J Bone Joint Surg 46B: 110-40, 1964.

54. Burwell R.G: Studies in the transplantation of bone (VIII). Treated composite homograft-autograft of cancellous bone: An analysis of inductive mechanisms in bone transplantation. *J Bone Joint Surg* 48B: 532-66, 1964.
55. Büsing C.M.; Zöllner C.; Heimke G.: The degradation of calcium phosphate ceramics. *Clin Mat* 2: 303-7, 1987.
56. Cabral R.; Proença A.; Judas F.; Cabrita S.; Can N.: Decalcified bone: antibacterial, antiviral, osteoinductive and clinical properties. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 240, 1993.
57. Carter D.R.; Beaupré G.S.; Giori N.J.; Helms J.A.: Biomecánica de la regeneración esquelética. *Clin Orthop Rel Res* 1(4): 245-58, 1999.
58. Caulier H.; Van der Waerden J.P.; Paquay Y.C.; Wolke J.G.; Kalk W.; Naert I.; Jansen J.A.: Effect of calcium phosphate (Ca-P) coatings on trabecular bone response: a histological study. *J Biomed Mater Res* 29(9): 1061-9, 1995.
59. Charnel J.: Factors influencing the growth and development of fetal cartilage and bone. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 313, 1992.
60. Christel P.; Chabot F.; Leray J.L.; Morin C.; Vert M.: Biodegradable composites for internal fixation. New York, John Wiley & Sons 271-280, 1982.
61. Chohayeb A.A.; Chow L.C.; Tsaknis P.J.: Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer-filler material. *J Endodontics* 13: 384-87, 1987.
62. Chow L.C: Development of self-setting calcium phosphate cements. *J Ceram Soc Japan Int* 99: 927-36, 1992.
63. Chow L.C.; Takagi S.; Constantino P.D.; Friedman C.D.: Self-setting calcium phosphate cements. *Mat Res Soc Symp Proc* 179: 3-24, 1991.
64. Combalia A.; Ramon R.; Segur J.M.; Garcia S.; Alcántara E.; Suso S.: Allografts in pelvic reconstruction after tumor resection. *Llibre de resums 2ond Congress of the European Association of Tissue Banks*. Atenes, 1993.

65. Comín M.; Peris J.L.: Comportamiento mecánico del tejido óseo. Estructura del tejido óseo. En Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación. Instituto de Biomecánica de Valencia. Ed. Martín. València, 1992.
66. Connolly J.; Guse R.; Lippiello L.; Dehne R.: Development of an osteogenic bone-marrow preparation. J Bone Joint Surg 71A: 684-91, 1989.
67. Connolly J.; Guse R.; Tiedeman J.; Dehne R.: Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. Clin Orthop 266: 259-70, 1991.
68. Constantz B.R.; Barr B.M.; Ison I.C.; Fulmer M.T.; Baker J.; McKinney L.; Goodman S.B.; Gunasekaran S.; Delaney D.C.; Ross J.; Poser R.D.: Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. J Biomed Mat Res 43(4): 451-61, 1998.
69. Constantz B.R.; Barr B.M.; Mc Vicker K.: Intimate mixture of calcium phosphate sources as precursor of hydroxyapatite. US Patent 5, 053, 212, October 1, 1991.
70. Constantz B.R.; Ison I.C.; Fulmer M.T.; Poser R.D.; Smith S.T.; Van Wagoner M.; Ross J.; Goldstein S.A.; Jupiter J.B.; Rosenthal D.I.: Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. Science 267 (5205): 1772-96, 1995.
71. Costantino P.D.; Friedman C.D.; Jones K.; Chow L.C.; Pelzer H.J.; Sisson G.A.: Hidroxyapatite cement. Basic chemistry and histologic properties. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 117(4): 379-84, 1991.
72. Cutright D.E.; Bhaskar S.N.; Brady J.M.; Getter L.; Posey W.R.: Reaction of bone to tricalcium phosphate ceramic pellets. Oral Surg 33: 850-6, 1972.
73. Czitrom A.A.; Axelrod T.; Fernandes B.: Antigen presenting cells and bone allotransplantation. Clin Orthop 197: 27-31, 1985.
74. Czitrom A.A.: Bone transplantation, passenger cells and the major histocompatibility complex. En Aebi M.; Regazzoni P. (Ed.): Bone transplantation. Springer-Verlag. Berlín, 1989.

75. Czitrom A.A.: Principles and techniques of tissue banking. AAOS Instruc Course Lect 42: 359-362, 1993.
76. Czitrom A.A, Winkler H.: Orthopaedic allograft surgery. Springer-Verlag. Berlín, 1996.
77. Daculsi G.; Bagot M.; Corlieus F.; Jersdorff M.: Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration: experimental and clinical findings. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101: 669-74, 1992.
78. Daculsi G.; Dard M.: Bone - calcium phosphate ceramic interface. *Osteosynthese Internat* 2: 153-6, 1994.
79. Daculsi G.; Le Geros R.Z.; Nery E.; Lynch K.; Kerebel B.: Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* 2: 883-894, 1989.
80. Daculsi G.; Le Geros R.Z.; Heughebaert M.; Barbieux I.: Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int* 46: 20-27, 1990.
81. Daculsi G.; Passuti N.; Martin S.; Deudon C.; Legeros R.Z.: Macroporous calcium phosphate ceramics for long bone surgery in human and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 24: 379-96, 1990.
82. Daculsi G.; Bouler J.M.; Rey C.: Les matériaux de substitution des tissus calcifiés. En Passuti N.: *Biomatériaux de substitution de l'os et du cartilage. Cahiers d'enseignement de la SoFCOT n° 57.* Expansion Scientifique Française. Paris, 1996.
83. Damien C.J.; Weisman D.S.; Benedict J.J.; Winfield A.M.; Parsons J.R.: Demineralized bone matrix with and without the addition of an osteogenic factor: A comparative analysis in bone and muscle. The 15th Annual Meeting of the Society for biomaterials. Florida 1989.
84. Damien C.J.; Ricci J.L.; Christel P.; Alexander H.; Patat J.L.: Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes. *Calcif Tissue Int* 55: 151-8, 1994.

85. Dandurand J.; Delpech V.; Lebugle A.; Lamure A.; Lacabanne C.: Study of the mineral-organic linkage in an apatitic reinforced bone cement. *J Biomed Mat Res* 24: 1377-84, 1990.
86. Daniels A.U.; Chang M.K.O.; Andriano K.P.; Heller J.: Mechanical properties of biodegradable polymers and composites proposed for internal fixation of bone. *J Applied Biomater* 1:57-78, 1990.
87. Davidson M.D.; Lindsey J.R.; Davis K.K.: Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci* 23: 551-555, 1987.
88. Dean J.C.; Tisdell C.L.; Goldberg V.M.; Parr J.; Davy D.; Stevenson S.: Effects of hydroxyapatite tricalcium phosphate coating and intracancellous placement on bone ingrowth in titanium fibermetal implants. *J Arthroplasty* 10(6): 830-8, 1995.
89. Dean J.C.; Tisdell C.L.; Goldberg V.M.; Parr J.; Davy D.; Stevenson S.: Effects of hydroxyapatite tricalcium phosphate coating and intracancellous placement on bone ingrowth in titanium fibermetal implants. *J Arthroplasty* 10(6): 830-8, 1995.
90. De Boer H.H.: The history of bone grafts. *Clin Orthop* 226: 292-97, 1988.
91. Decker B.; Bartels H.; Decker S.: Relationships between endothelial cells, pericytes and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic. *Anat Rec* 242 (3): 310-20, 1995.
92. De Groot K.: Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties. *En Bioceramics of calcium phosphate*, pp. 100-114. Boca Raton, CRC Press, 1983.
93. Dekel S.; Lenthall G.; Francis M.: Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture: An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg* 63B: 185-9, 1981.
94. Deleu J.; Trueta J.: Vascularisation of bone grafts in the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 47B: 319-29, 1965.

95. Del Valle M.: El uso del cartilago costal criopreservado en defectos óseos experimentales. Tesi Doctoral. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona, 1999.
96. Denissen H.W.; Klein C.P.; Vish L.L.; Van den Hooff A.: Behavior of calcium phosphate coatings with different chemistries in bone. *Int J Prosthodont* 9(2): 142-8, 1996.
97. De Santis E.; Fadda M.; Espa S.; Dau N.; Canetto G.: Hydroxyapatite and osteogenesis. A rabbit model study. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 239, 1993.
98. Dickens-Venz S.H.; Takagi S.; Chow L.C.; Bowen R.L.; Johnson A.D.; Dickens B.: Physical and chemical properties of resin-reinforced calcium phosphate cements. *Dent Mater* 10(2): 100-6, 1994.
99. Doncel A.; Roig J.L.; Majo J.; Redo J.; Celaya F.: Banco de huesos. *Rev Ortop Traum* 33: 151-4, 1989.
100. Doppelt S.; Tomford W.W.; Lucas A.; Mankin H.: Operational and financial aspects of a hospital bone bank. *J Bone Joint Surg* 63A: 1472-81, 1981.
101. Doremus R.H.: Review bioceramics. *J Mat Sci* 27: 285-97, 1992.
102. Downes S.; Wood D.J.; Malcolm A.J.; Ali S.Y.: Improvement of the bone-cement interface using growth-hormone-loaded cement. *J Bone Joint Surg* 71B: 727, 1989.
103. Downes S.; Di Silvio L.; Klein C.P.A.T.; Kaiser M.V.: Growth hormone loaded bioactive ceramics. *J Mat Sci Mat Med* 2: 176-80, 1991.
104. Driessens F.C.M.: Chemistry of calcium phosphate cements. Fourth Euro Ceramics vol.8 (Ravaglioni (Ed.)), pp. 77-83, 1995.
105. Driessens F.C.M.; Boltong M.G.; Bermúdez O.; Planell J.A.: Formulation and setting-times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *J Mater Sci Mat Med*, 4: 503-508, 1993.

106. Driessens F.C.M.; Boltong M.G.; Bermúdez O.; Planell J.A.; Ginebra M.P.; Fernández E.: Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *J Mater Sci Mat Med* 5: 164-70, 1994.
107. Driessens F.C.M.; Boltong M.G.; Zapatero M.I.; Verbeek R.M.A.; Bonfield W.; Bermúdez O.; Fernández E.; Ginebra M.P.; Planell J.A.: In vivo behavior of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement. *J Mater Sci Mat Med* 6: 272-78, 1995.
108. Driessens F.C.M.; Planell J.A.; Boltong M.G.; Khairoun I.; Ginebra M.P.: Osteotransductive bone cements. *J Eng Med* 212(6): 427-35, 1998.
109. Driessens F.C.M.; Ramselaar M.M.A.; Schaeken H.U.; Stols L.H, Van Mullem P.J.: Chemical reactions of calcium phosphate implants after implantation in vivo. *J Mater Sci Mat Med* 3: 413-17, 1992.
110. Driessens F.C.M.; Van Loon J.A.; Van Sliedregt A.; Planell J.A.: Cytotoxicity testing of five calcium and one magnesium phosphate cement in vitro. 11th Eur. Conf.of Biomaterials, Pisa, September 1994.
111. Domingo J.: *Comentaris de Cirurgia Experimental. Idees per a una concepció dinàmica de la cirurgia experimental.* Ed. Minerva. Sabadell, 1995.
112. Dos Santos L.A.; De Oliveria L.C.; Rigo E.C.; Carrodeguas R.G.; Boschi A.O.; De Arruda A.C.: Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. *Bone* 25(2 Suppl): 99S-102S, 1999.
113. Dupraz A.; Delecrin J.; Moreau A.; Pilet P.; Passuti N.: Long-term bone response to particulate injectable ceramic. *J Biomed Mater Res* 42(3): 368-75, 1998.
114. Eastlund T.: Infectious disease transmission through tissue transplantation: Reducing the risk through donor selection. 5th World Congress on locomotor tissue banking. Marseille, 1992.

115. Einhorn T.A.; Lane J.M, Burstein A.H.; Vigorita V.J.: The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. *J Bone Joint Surg* 66A: 274-86, 1984.
116. Elves M.W.: Newer knowledge of the immunology of bone and cartilage. *Clin Orthop* 120: 232-45, 1976.
117. Elves M.W.; Pratt L.M.: The pattern of new bone formation in isografts of bone. *Acta Orthop Scand* 46: 549-57, 1975.
118. Elves M.W.: Humoral immune response to allografts of bone. *Internat Arch Allergy and Appl Immunol* 47: 708-15, 1974.
119. Enneking W.F.; Burchardt H.; Puhl J.J.; Piotrowski G.: Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg* 57A: 237-52, 1975.
120. Enneking W.F.; Eady J.L.; Burchardt H.; Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. *J Bone Joint Surg* 62A: 1039 -58, 1980.
121. Enneking W.F.; Mindell E.R.: Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg* 73A: 1123-42, 1991.
122. Evans C.E, Williamson J.B. The osteogenic potencial of human rib allografts. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 320, 1992.
123. Fernández de Retana P.: Osteointegración del homoinjerto óseo triturado en los defectos cavitarios. Estudio experimental en conejos. Tesis Doctoral. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Juliol 1993.
124. Fernández E.; Ginebra M.P.; Bermúdez O.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.: Dimensional and thermal behavior of calcium phosphate cements during setting compared to PMMA bone cements. *J Mat Sci Letters* 14: 4-5, 1995.

125. Fernández E.; Boltong M.G.; Ginebra M.P.; Driessens F.; Bermúdez O.; Planell J.A.: Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements. *J Mat Sci Let* 15: 1004-5, 1996.
126. Fernández E.; Gil F.J.; Best S.; Ginebra M.P.; Driessens F.; Planell J.A.: The cement setting reaction in the CaHPO₄-alpha-Ca₃(PO₄)₂ system: an X-ray diffraction study. *J Biomed Mat Res* 42(3): 403-6, 1998.
127. Fernández E.; Gil F.J.; Best S.; Ginebra M.P.; Driessens F.; Planell J.A.: Improvement of the mechanical properties of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO₄-alpha-Ca₃(PO₄)₂ system: compressive strength and microstructural development. *J Biomed Mat Res* 41(4): 560-7, 1998.
128. Fernandez E.; Ginebra M.P.; Boltong M.G.; Driessens F.C.; Ginebra J.; De Maeyer E.A.; Verbeeck R.M.; Planell J.A.: Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mat Res* 32(3): 367-74, 1996.
129. Flautre B.; Delecourt C.; Blary M.C.; Van Landuyt P.; Lemaitre J.; Hardouin P.: Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone* 25(2 Suppl):35S-39S, 1999.
130. Frankenburg E.P.; Goldstein S.A.; Bauer T.W.; Harris S.A.; Poser R.D.: Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg* 80(8): 1112-24, 1998.
131. Frayssinet P.; Gineste L.; Conte P.; Fages J.; Rouquet N.: Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials* 19 (11-12): 971-7, 1998.
132. Frayssinet P.; Mathon D.; Lerch A.; Autefage A.; Collard P.; Rouquet N.: Osseointegration of composite calcium phosphate bioceramics. *J Biomed Mater Res* 50(2): 125-30, 2000.
133. Friedlander G.E.: Bone grafts: The basic science rationale of clinical applications. *J Bone Joint Surg* 69A: 786-90, 1987.

134. Friedlander G.E.: Bone banking. Clin Orthop. 225: 17-21, 1987.
135. Friedlander G.E.; Mankin H.J.; Langer F.: Immunology of osteochondral allografts: Background and general considerations. En Osteochondral allografts. Biology, banking and clinical applications. Ed. by Friedlander GE.; Mankin HJ.; Sell KW, Boston, Little, Brown and Co., pp.133-40, 1983.
136. Friedlander G.E.: Immune responses to preserved bone allografts in humans. En Osteochondral allografts. Biology, banking and clinical applications. Ed. by Friedlander GE.; Mankin HJ.; Sell KW, Boston, Little, Brown and Co., pp.159-64, 1983.
137. Friedlander G.E.; Strong D.M.; Sell K.W.: Studies of the antigenicity of bone. Donor-specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts. J Bone Joint Surg 66A: 107-112, 1984.
138. Fukase Y.; Eanes E.E.; Takagi S.; Chow L.C.; Brown W.E.: Setting reactions and compressive strength of calcium phosphate cements. J Dent Res 69: 1852-56, 1990.
139. Fujikawa K.; Sugawara A.; Murai S.; Nishiyama M.; Takagi S.; Chow L.C.: Histopatological reaction of calcium phosphate cement in periodontal bone defect. Dent Mater J 14(1): 45-57, 1995.
140. Fulmer M.T.; Martin R.I.; Brown P.W.: Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature. J Mater Sci Mat Med 3: 199-305, 1992.
141. Gallart X.; Ramon R.; Riba J.; Peidro L.; Samson P.; Del Valle M.; Suso S.: Pròtesis totals de maluc i banc d'ossos. Llibre de resums 5è Congrés de la Societat Catalana de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia. Vic, 1992.
142. Gao T.J.; Lindholm T.S.; Kommonen B.: Microscopic evaluation of bone-implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. Biomaterials 16(15), 1175-79, 1995.

143. Garcia S.; Combalia A.; Segur J.M.; Castillo F.; Suso S.; Ramon R.: L'al.loempelt congelat en les artrodesis cervicals. Llibre de resums 5è Congrés de la Societat Catalana de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia. Vic, 1992.
144. Gartland J.J.: Orthopaedic clinical research. J Bone Joint Surg 70A: 1357-64, 1988.
145. Ginebra M.P.: Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas. Tesi Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, 1997.
146. Ginebra M.P.; Boltong M.G.; Fernández E.; Planell J.A.; Driessens F.: Effect of various additives and temperature on some properties of an apatitic calcium phosphate cement. J Mat Sci Mat Med 6: 612-616, 1995.
147. Ginebra M.P.; Fernández E.; Boltong M.G.; Bermúdez O.; Planell J.A.; Driessens F.C.M.: Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. Clin Mat 17: 99-104, 1994.
148. Ginebra M.P.; Fernández E.; De Maeyer E.; Verbeek R.; Boltong M.; Ginebra J.; Driessens F.; Planell J.A.: Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. J Dent Res 76(4): 905-12, 1997.
149. Ginebra M.P.; Fernández E.; Driessens F.; Boltong M.; Muntasell J.; Font J.; Planell J.A.: The effects of temperature on the behavior of an apatitic calcium phosphate cement. J Mat Sci Mat Med 6: 857-60, 1995.
150. Ginebra M.P.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Bermúdez O.; Planell J.A.: Preparation and properties of some magnesium containing calcium phosphate cements. J Mater Sci Mat Med 5: 103-7, 1994.
151. Glimcher M.J.; Kato F.; Ninomiya S.; Hirotani H.; Suzuki T.; Miyaji N.; Eguro H.; Landis W.J.; Shapiro F.: The biology of bone healing and the repair of autograft, allograft and xenograft. En Osteochondral allografts. Biology, banking and clinical applications. Ed. by Friedlander G.E.; Mankin H.J.; Sell K.W, Boston, Little, Brown and Co., pp.2-36, 1983.

152. Goldberg V.M.; Bos G.D.; Heiple K.G.; Zika J.; Powell A.: Improved acceptance of frozen allografts in genetically mismatched dogs by immunosuppression. *J Bone Joint Surg* 66A: 937-50, 1984.
153. Goldberg V.M.; Powell A.; Shaffer J.W.; Zika J.; Bos G.D.; Heiple K.G.: Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3: 389-404, 1985.
154. Goldberg VM.; Stevenson S.: Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop*. 225: 7-24, 1987.
155. Goldberg V.M.; Powell A.; Shaffer J.W.; Zika J.; Stevenson S.; Davy D.; Heiple K.G.: The role of histocompatibility in bone allografting. Ed. Springer-Verlag. Berlin, 1989.
156. Goldberg VM.; Powell A.; Shaffer JW.; Zika J.; Bos GD.; Heiple KG.: Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res*. 3: 389-404, 1985.
157. Goodship A.E, Adams M.A, Kenwright J.: The influence of mechanical stimulation on different stages of fracture healing. *J Bone Joint Surg* 71B: 725, 1989.
158. Gotfried Y.; Yaremchuk M.J.; Randolph M.A.; Weiland A.J.: Histologic characteristics of acute rejection in vascularized allografts of bone. *J Bone Joint Surg* 69A: 410-25, 1987.
159. Gouin F.; Delecrin J.; Passuti N.; Touchais S.; Poirier P.; Bainvel J.V.: Complements osseux par ceramique phosphocalcique biphasée macroporeuse. A propos de 23 cas. *Rev Chir Orthop Rep Appar Mot* 81(1): 59-65, 1995.
160. Gray J.C.; Elves M.W.: Donor cells contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. *Clin Orthop* 163: 261-72, 1982.
161. Grob D.: Autologous bone grafts: Problems at the donor site. En *Bone transplantation*. Eds. Aebi M.; Regazzoni P. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, p. 245, 1989.

162. Gruninger S.E.; Siew C.; Chow L.: Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 63: 200, 1984.
163. Guarniero R.; Barros T.; Tannuri U.; Rodrigues CJ.: Bone healing and protein malnutrition. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 240. 1993.
164. Guarniero R: An experimental investigation with the use of calcitonin on the consolidation of fractures. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 245, 1993.
165. Gudushauri O.; Dgavakchishvili E.; Chikchaladze R.; Zimlitski M.; Glin G.: Reconstruction of bone tissue: the reaction to the implantation of titanium covered by ceramic. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 240, 1993.
166. Haddad F.S.; Cobb A.G.; Bentley G.; Levell N.J.; Dowd P.M.: Hipersensitivity in aseptic loosening of total hip replacements. The role of constituents of bone cement. *J Bone Joint Surg* 78B(4): 546-9, 1996.
167. Hamanishi C.; Kitamoto K.; Ohura K.; Tanaka S.; Doi Y.: Self-setting, bioactive and biodegradable TTCP-DCPD apatite cement. *J Biomed Mater Res* 32(3): 383-9, 1996.
168. Hamanishi C.; Kitamoto K.; Tanaka S.; Otsuka M.; Doi Y.; Kitahashi T.: A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mat Res* 33(3): 139-43, 1996.
169. Hamson K.R.; Toth J.M.; Stiehl J.B.; Lynch K.L.: Preliminary experience with a novel model assessing in vivo mechanical strength of bone grafts and substitute materials. *Calcif Tissue Int* 57(1): 64-8, 1995.
170. Hanafusa S.; Matsusue Y.; Yasunaga T.; Yamamuro T.; Oka M.; Shikinami Y.; Ikada Y.: Biodegradable plate fixation of rabbit femoral shaft osteotomies. A comparative study. *Clin Orthop* 315: 262-71, 1995.
171. Hardouin P: Les ciments osseux et leurs utilisations en orthopédie et en rhumatologie. GRIBOI. Groupe de Recherche interdisciplinaire sur les Biomateriaux osteo-articulaires injectables. *Presse Med (France)* 25(38): 1860-2, Dec 7 1996.

172. Hashimoto-Uoshima M.; Ishikawa I.; Kinoshita A.; Weng H.T.; Oda S.: Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent* 15(2): 205-13, 1995.
173. Heckman J.D.; Boyan B.D.; Aufdemorte T.B.; Abbot J.T.: The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg* 73A: 750-764, 1991.
174. Heiple K.G.; Goldberg V.M.; Powell A.; Bos G.D.; Zika J.: Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 18: 179-85, 1987.
175. Herr G.; He L.; Küsswetter W.: Isolation and purification of porcine bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 226, 1993.
176. Heymann D.; Passuti N.; Daculsi G.: Os hybride: un substitut osseux vivant. En Passuti N.: *Biomatériaux de substitution de l'os et du cartilage. Cahiers d'enseignement de la SoFCOT n° 57.* Expansion Scientifique Française. Paris, 1996.
177. Hidaka S.; Gustilo R.B.: Refracture of bones of the forearm after plate removal. *J Bone Joint Surg* 66A: 1241-3, 1984.
178. Homes R.E.; Bucholz R.W.; Mooney V.: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defect. *J Bone Joint Surg* 68A: 904-911, 1986.
179. Hong Y.C.; Wang J.T.; Hong C.Y.; Brown W.E.; Chow L.C.: The periapical tissue reactions to a calcium phosphate cement in the teeth of monkeys. *J Biomed Mat Res* 25: 485-98, 1991.
180. Horowitz S.M.; Friedlander G.E.: Immunological aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *Orthop Clin North Am* 18: 227-33, 1987.
181. Horowitz S.M.; Friedlander G.E.: Induction of specific T-cell responsiveness to allogenic bone. *J Bone Joint Surg* 73A(8): 1157-68, 1991.

182. Hugues F.J.; Collyer J.; Stanfield M.; Goodman S.A.: The effects of bone morphogenetic protein-2, -4 and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. *Endocrinology* 136: 2671-2677, 1995.
183. Hulth A.: Current concepts on fracture healing. *Clin Orthop* 249: 265-84, 1989.
184. Ikenaga M.; Hardouin P.; Lemaitre J.; Andrianjatovo H.; Flautre B.: Biomechanical characterisation of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 40(1): 139-44, 1998.
185. Ingham E.; Green T.R.; Stone M.H.; Kowalski R.; Watkins N.; Fisher J.: Production of TNF-alpha and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. *Biomaterials* 21(10): 1005-13, 2000.
186. Inoue K, Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Tabata S, Dohi Y. Persistence of osteoblastic phenotype expression in marrow / hydroxyapatite composite. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 238-9. 1993.
187. Ishikawa K.; Asaoka K.: Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 29 (12): 1537-43, 1995.
188. Ishikawa K.; Eanes E.D.: The hydrolysis of anhydrous dicalcium phosphate into hydroxyapatite. *J Dent Res* 72(2): 474-80, 1993.
189. Ishikawa K.; Miyamoto Y.; Kon M.; Nagayama M.; Asaoka K.: Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. *Biomaterials*, 16(7): 527-32, 1995.
190. Ishikawa K.; Takagi S.; Chow L.C.; Suzuki K.: Reaction of calcium phosphate cements with different amounts of tetracalcium phosphate and dicalcium phosphate anhydrous. *J Biomed Mat Res* 46(4):504-10, 1999.

191. Ishikawa K.; Takagi S.; Chow LC.: Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dent Mater* 10(1): 26-32, 1994.
192. Iwata H.; Maruno S.; Itoh H.; Ishikawa T.: Interface characterization between hydroxyapatite-glass titanium composite and bone. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 239, 1993.
193. Janes G.C.; Collopy D.M.; Price R.; Sikorki J.M.: Bone density after rigid plate fixation of tibial fractures. *J Bone Joint Surg* 75B: 914-17, 1993.
194. Jansen J.A.; Wolke J.G.C.; Hayakawa T.; Planell J.A.; Driessens F.C.M.: A histological and mechanical evaluation of the effect of Ca-P cement on bone apposition. Fifth World Biomaterials Congress. Toronto. Canada. May 1996.
195. Jansen J.A.; De Ruijter J.E.; Schaecken H.G.; Van der Waerden J.P.C.M.; Planell J.A.; Driessens F.C.M.: Evaluation of tricalciumphosphate / hydroxiapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. *J Mater Sci Mat Med* 6: 653-657, 1995.
196. Johnson K.D.; Frierson K.E.; Keller T.S.; Cook C.; Scheinberg R.; Zerwekh J.; Meyers L.; Sciadini M.F.: Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological and radiographic analysis. *J Orthop Res* 14(3): 351-69, 1996.
197. Kahn E.L.; Simmons D.J.: Investigation of cell lineage in bone using a chimaera and quail embryonic tissue. *Nature* 258: 325-7, 1975.
198. Karemer D.B.; Hirsch B.E.; Snyderman C.H.; Costantino P.; Friedman C.D.: Hydroxyapatite cement: a new method for achieving watertight closure in transtemporal surgery. *Am J Otol* 15(1): 47-9, 1994.
199. Katthagen B.D.: Bone regeneration with bone substitutes. An animal study. Springer Verlag, Berlin, 1986.
200. Kawamura M.; Urist M.R.: Induction of callus formation by implants of bone morphogenetic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop* 236: 240-8, 1988.

201. Keller R.B.; Ruducel S.A.; Liang M.H.: Outcome research in orthopaedics. *J Bone Joint Surg* 75A(10): 1562-73, 1993.
202. Kim H.M.; Pho R.W.H.; Goh J.C.H.: Bone remodelling in the fibular graft in growing dogs: vascularized and non-vascularized graft. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 321, 1992.
203. Kitano T.; Yutani Y.; Yoshida K.; Asada K.; Shimazu A.; Yano I.: Adhesion of staphylococcus aureus to biomaterials: molecular aspects of bacterial action. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 239. 1993.
204. Kitsugi T.; Yamamuro T.; Nakamura T.; Oka M.: Transmission electron microscopy observations at the interface of bone and four types of calcium phosphates ceramics with different calcium/phosphorus molar ratio. *Biomaterials* 16(14): 1101-7, 1995.
205. Khairoun I.; Boltong M.G.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.: Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement. *Biomaterials* 18(23): 1535-9, 1997.
206. Khairoun I.; Driessens F.C.M.; Boltong M.G.; Planell J.A.; Wenz R.: Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 20(4):393-8, 1999.
207. Klein C.P.A.T.; Abe Y.; Hosono H.; De Groot K.: Different calcium phosphate bioglass ceramics implanted in rabbit cortical bone: an interface study. *Biomaterials*, 5: 362-4, 1982.
208. Klein C.P.A.T.; Patka P.; Den Hollander W.: Macroporous calcium phosphate bioceramics in dog femora: a histological study of interface and biodegradation. *Biomaterials* 10: 59-62, 1989.
209. Kopylov P.; Jonsson K.; Thorngren K.G.; Aspenberg P.: Injectable calcium phosphate in the treatment of distal radial fractures. *J Hand Surg* 21(6): 768-71, 1996.
210. Koshino T.; Kubota W.; Morii T.: Bone formation as a reaction to hydraulic hydroxyapatite thermal decomposition product used as bone cement in rabbits. *Biomaterials* 16(2): 125-8, 1995.

211. Kotani S.; Fujita Y.; Kitsugi T.: Bone bonding mechanism of beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res* 25(10): 1303-15, 1991.
212. Kurashina K.; Kurita H.; Hirano M.; Kotani A.; Klein C.P.A.T.; De Groot K.: In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an alpha-tricalcium phosphate / dicalcium phosphate dibasic / tetracalcium phosphate monoxide cement paste. *Biomaterials* 18(7): 539-43, 1997.
213. Kurashina K.; Kurita H.; Kotani A.; Takeuchi H.; Hirano M.: In vivo study of a calcium phosphate cement consisting of alpha-tricalcium phosphate / dicalcium phosphate dibasic / tetracalcium phosphate monoxide. *Biomaterials* 18(2):147-51, 1997.
214. Kurashina K.; Kurita H.; Kotani A.; Kobayashi S.; Kyoshima K.; Hirano M.: Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an alpha-tricalcium phosphate / dicalcium phosphate dibasic / tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits. *Biomaterials* 19: 701-6, 1998.
215. Laffargue P.; Hildebrand H.F.; Rtaimate M.; Frayssinet P.; Amoureux J.P.; Marchandise X.: Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits bone defects. *Bone* 25(2 Suppl):55S-58S, 1999.
216. Langer F.; Czitrom A.; Pritker K.P.; Gross A.E.: The immunogenicity of fresh and frozen allogenic bone. *J Bone Joint Surg* 57A: 216-20, 1975.
217. Larèse A.; Ehram A.: Agents cryoprotecteurs. Leur nature et leurs fonctions en cryobiologie. En Poitout D. (Ed.): *Greffes de l'appareil locomoteur*. Masson. Paris, 1987.
218. Lemaitre J: Injectable calcium phosphate hydraulic cements: new developments and potential applications. *Innov. Tech. biol. med.* 16: 109-120, 1995.
219. Lemaitre J.; Munting E.; Mirtchi A.A.: Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 93(3): 163-5, 1992.

220. Leroux L.; Hatim Z.; Freche M.; Lacout J.L.: Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 25(2 Suppl): 31S-34S, 1999.
221. Leung K.S.; Fung K.P.; Sher A.; Liu P.: Bone specific alkaline phosphatase activities during fracture healing and callostasis in rabbit. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 229, 1993.
222. Leung K.S.; Sher A.; Lam T.S.W.; Leung P.C.: Energy metabolism in fracture healing. Measurement of adenosine triphosphate in callus to monitor progress. *J Bone Joint Surg* 71B: 657-60, 1989.
223. Lin F.H.; Yao C.H.; Sun J.S.; Liu H.C.; Huang C.W.: Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyd cross-linked gelatin. *Biomaterials* 19(10): 905-17, 1998.
224. Lind M.; Overgaard S.; Ongpipattanakul B.; Nguyen T.; Bunger C.: Transforming growth factor-beta 1 stimulates bone ongrowth to weight-loaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg* 78B: 377-82, 1996.
225. Lind M.; Overgaard S.; Soballe K.; Nguyen T.; Ongpipattanakul B.; Bunger C.: Transforming growth factor-beta 1 enhances bone healing to unloaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Orthop Res* 14(3): 343-50, 1996.
226. Lind M.; Schumacher B.; Soballe K.; Keller J.; Bünger C.: Enhancement of fracture healing by transforming growth factor-beta1. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 229, 1993.
227. Liu C.; Wang W.; Shen W.; Chen T.; Hu L.; Chen Z.: Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite. *J Endodontics* 23(8): 490-3, 1997.
228. Lord C.F.; Gebhardt M.C.; Tomford W.W.; Mankin H.J.: Infection in bone allografts. *J Bone Joint Surg* 70A: 369-76, 1988.

229. Lu J.X.; About I.; Stephan G.; Van Landuyt P.; Dejou J.; Fiocchi M.; Lemaitre J.; Proust J.P.: Histological and biomechanical studies of two bone colonizable cements in rabbits. *Bone* 25(2 Suppl):41S-45S, 1999.
230. Lu J.X.; Gallur A.; Flautre B.; Anselme K.; Descamps M.; Thierry B.; Hardouin P.: Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mat Res* 42(3): 357-67, 1998.
231. Mankin H.J.: Complications of allograft surgery. En Friedlander G.E.; Mankin H.J.; Sell K.W (Ed.): *Osteochondral allografts. Biology, banking and clinical applications*. Little Brown and Co. Boston, 1983.
232. Marks S.C.; Popoff S.N.: Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton. *Am J Anat* 183: 1-44, 1988.
233. Martí J.; Navarro A.; Pérez M.; Olives A.: Resultados de la utilización de aloinjertos óseos crioconservados. *Rev Ortop Traum* 36IB: 30-35, 1992.
234. Martí J.V.; Planell J.A.; Proubasta I.; Gil F.J. (Eds.): *Sustitutos óseos y biomateriales utilizados en cirugía del aparato locomotor*. PCM Grafic S.L.. Barcelona, 1995.
235. Matsuya Y.; Antonucci J.M.; Matsuya S.; Takagi S.; Chow L.C.: Polymeric calcium phosphate cements derived from polymethyl vinyl ether maleic acid. *Dent Mater* 12(1): 2-7, 1996.
236. Mc Carthy I.D.; Hughes S.P.: Bone cell metabolism and exchangeable mineral. *J Bone Joint Surg* 68B(3): 495. 1986.
237. Mc Kibbin B.; Ralis Z.A.: The site of dependance of the articular cartilage transplant reaction. *J Bone Joint Surg* 60B: 651-66, 1978.
238. Meraw S.J.; Reeve C.M.; Lohse C.M.; Sioussat T.M.: Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J Periodontol* 71(1): 8-13, 2000.

239. Mermelstein L.E.; Chow L.C.; Friedman C.; Crisco J.J.: The reinforcement of cancellous bone screws with calcium phosphate cement. *J Orthop Trauma* 10(1): 15-20, 1996.
240. Mirtchi A.A.; Lemaitre J.; Munting E.: Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of the beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements. *Biomaterials* 10 (9): 634-38, 1989.
241. Mirtchi A.A.; Lemaitre J.; Terao N.: Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system. *Biomaterials* 10(7):475-80, 1989.
242. Mirtchi A.A.; Lemaitre J.; Munting E.: Calcium phosphate cements: effect of fluorides on the setting and hardening of beta-tricalcium phosphate-dicalcium phosphate-calcite cements. *Biomaterials* 12(5): 505-10, 1991.
243. Miyamoto Y.; Ishikawa K.; Fukao H.; Sawada M.; Nagayama M.; Kon M.; Asaoka K.: In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. *Biomaterials* 16 (11): 855-60. 1995.
244. Miyamoto Y.; Ishikawa K.; Takechi M.; Toh T.; Yoshida Y.; Nagayama M.; Kon M.; Asaoka K.: Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone. *J Biomed Mat Res* 37(4): 457-64, 1997.
245. Miyamoto Y.; Ishikawa K.; Takechi M.; Toh T.; Yuasa T.; Nagayama M.; Suzuki K.: Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing. *J Biomed Mat Res* 48(1): 36-42, 1999.
246. Miyazaki K.; Horibe T.; Antonucci J.M.; Takagi S.; Chow L.C.: Polymeric calcium phosphate cements: analysis of reaction products and properties. *Dent Mater* 9(1): 41-5, 1993.
247. Miyazaki K.; Horibe T.; Antonucci J.M.; Takagi S.; Chow L.C.: Polymeric calcium phosphate cements: setting reactions modifiers. *Dent Mater* 9(1): 46-50, 1993.

248. Mohan S.; Baylink D.J.: Bone growth factors. *Clin Orthop* 263: 348, 1990.
249. Mongiorgi R.; Valdre G.; Giardino R.; Maggi G.; Prati C.; Bertocchi G.: Thermodynamical aspects of the polymerization reaction of PMMA cement mixed with phosphatic mineral phases. *Boll Soc Ital Biol Sper* 69(6): 365-72, 1993.
250. Moore D.C.; Frankenburg E.P.; Goulet J.A.; Graziano G.P.; Maitre R.S.; Farjo L.A.; Goldstein S.A.: Fixation enhancement with a new, in situ setting Ca-P cement. 10th European Conference on Biomaterials, Davos, September 1993, p.94.
251. Moore D.C.; Frankenburg E.P.; Goulet J.A.; Goldstein S.A.: Hip screw augmentation with an in situ-setting calcium phosphate cement: an in vitro biomechanical analysis. *J Orthop Trauma* 11(8): 577-83, 1997.
252. Moore D.C.; Maitra R.S.; Farjo L.S.; Graziano G.P.; Goldstein S.A.: Restoration of pedicle screw fixation with an in situ setting calcium phosphate cement. *Spine* 22(15): 1696-705, 1997.
253. Moroni A.; Orienti L.; Stea S.; Visentin M.: Improvement of the bone-pin interface with hydroxyapatite coating: an in vivo long-term study. *J Orthop Trauma* 10(4): 236-42, 1996.
254. Munting E.; Mirtchi A.A.; Lemaitre J.: Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *J Mater Sci Mat Med* 4: 337-344, 1993.
255. Murray D.W.; Rae T.; Rushton N.: The influence of the surface energy and roughness of implants on bone resorption. *J Bone Joint Surg* 71B: 632-7, 1989.
256. Najarian J.S.; Foker J.E.: Mechanisms of kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 1: 184, 1969.
257. Nakajima T.; Yoshimura Y.; Nakanishi Y.; Kanno T.; Sano H.; Kamei Y.: Anterior cranial base reconstruction using a hydroxyapatite-tricalciumphosphate composite (Cerattite) as a bone substitute. *J Craniomaxillofac Surg* 23(2): 64-7, 1995.

258. Nather A.; Balasubramaniam P.; Bose K.: Healing of non-vascularized diaphyseal bone transplants. *J Bone Joint Surg* 72B: 830-34, 1990.
259. Nather A.; Goh J.C.H.; Lee J.J.: Biomechanical strenght of vascularised and non-vascularised autologous cortical bone grafts in tibia of adult cats. *J Bone Joint Surg* 71B: 724, 1989.
260. Nather A.; Goh J.C.H.; Lee J.J.: Biomechanical strenght of non-vascularised and vascularised diaphyseal bone transplants. An experimental study. *J Bone Joint Surg* 72-B: 1031-35, 1990.
261. Nilsson O.S.; Urist M.R.; Dawson E.G.; Schmalzried T.P.; Finerman G.A.: Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg* 68B: 635-42, 1986.
262. Nolan P.C.; Hankey D.P.; Mulholland B.J.; Mollan R.A.B.; Nicholas R.M.; Wilson D.J.: The culture of human osteoblasts: a potencial for complete biological bone replacement in conditions of bone loss. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 320, 1992.
263. Nunamaker D.M.: Modelos experimentales de reparación de fracturas. *Clin Orthop Rel Res* 1(4): 259-268, 1999.
264. Ohgushi H.; Okumura M.; Tamai S.; Tabata S.; Dohi Y.: Gene expression of marrow cells induced osteogenesis in porous hydroxyapatite. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 239, 1993.
265. Ohura K.; Bohner M.; Hardouin P.; Lemaitre J.; Pasquier G.; Flautre B.: Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 30(2): 193-200, 1996.
266. Okuda K.; Nakajima Y.; Irie K.; Sugimoto M.; Kabasawa Y.; Yoshie H.; Hara K.; Ozawa H.: Transforming growth factor-beta 1 coated beta-tricalcium phosphate pellets stimulate healing of experimental bone defects of rat calvariae. *Oral Dis* 1(2): 92-7, 1995.
267. Ong J.L.; Prince C.W.; Lucas L.C.: Cellular response to well-characterized calcium phosphate coatings and titanium surfaces in vitro. *J Biomed Mater Res* 29(2):165-72, 1995.

268. Oni O.O.A.; Stafford H.; Roberts M.; Gregg P.J.: On the origins of the bone forming cells for diaphyseal fracture healing. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 313, 1992.
269. Ono K.; Yamamuro T.; Nakamura T.; Kokubo T.: AW.CC-fibrin mixture as a new bone graft substitute. The 15th Annual Meeting of the Society for biomaterials. Florida 1989.
270. Oonishi H.: Orthopaedic applications of hidroxiapatite. *Biomaterials* 12: 171-8, 1991.
271. Oonishi H.; Yamamoto M.; Ishimaru H.; Tsuji E.; Kushitani S.; Aono M.; Ukon Y.: The effect of hydroxyapatite coating on bone growth into porous titanium alloy implants. *J Bone Joint Surg* 71B(2): 213-6, 1989.
272. Oreffo R.O.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.; Triffitt J.T.: Effects of novel calcium phosphate cements on human bone marrow fibroblastic cells. *Tissue Eng* 4(3): 293-303, 1998.
273. Oreffo R.O.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.; Triffitt J.T.: Effects of novel calcium phosphate cements on the in vitro growth and diferentiation of osteoprogenitors from human marrow. 13th European Conference on biomaterials. Goteborg, Suècia. 4-7 setembre 1997.
274. Oreffo R.O.; Driessens F.C.M.; Planell J.A.; Triffitt J.T.: Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterials* 19(20): 1845-54, 1998.
275. Otsuka M.; Matsuda Y.; Suwa Y.: Effect of particle size of metastable calcium phosphates on mechanical strengh of a novel self-setting bioactive calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 29(1): 25-32, 1995.
276. Otsuka M.; Nakahigashi Y.; Matsuda Y.; Fox J.L.; Higushi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. Effect of biological factors on indomethacin release from the cement loaded in bovine bone. *J Pharm Sci* 83(11): 1569-73, 1994.

277. Otsuka M.; Matsuda Y.; Suwa Y.; Fox J.L.; Higushi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. Physicochemical properties and drug release rate of the cement-containing indomethacin. *J Pharm Sci* 83(5): 611-5, 1994.
278. Otsuka M.; Matsuda Y.; Suwa Y.; Fox J.L.; Higushi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. Drug release behavior from a heterogeneous drug-loaded cement containing an anticancer drug. *J Pharm Sci* 83(11): 1565-8, 1994.
279. Otsuka M.; Matsuda Y.; Suwa Y.; Fox J.L.; Higushi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. Effects of the mixing solution volume on the drug-release rate of heterogeneous aspirin-loaded cement. *J Pharm Sci* 83(2): 259-63, 1994.
280. Otsuka M.; Matsuda Y.; Suwa Y.; Fox J.L.; Higushi W.I.: Particle size effect of metastable calcium phosphates on crushing strength of self-setting bioactive calcium phosphate cement. *Chem Pharm Bull* 41(11): 2055-7, 1993.
281. Passuti N.; Daculsi G.; Rogez J.M.; Martin J.; Biainuel J.V.: Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin Orthop* 248: 169-75, 1989.
282. Passuti N.: Biomateriaux de substitution de l'os et du cartilage. Cahiers d'enseignement de la SoFCOT, n°57. Expansion Scientifique Française. Paris, 1996.
283. Pelker R.D.; Friedlander G.E.: Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin North Am* 18: 124-6 1987.
284. Peris J.L.: Estudio biomecánico de la fractura. En *Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación*. Ed. Martín. València, 1992.
285. Perren S.M.: The biomechanics and biology of internal fixation using plates and nails. *Orthopaedics* 12: 21-34, 1989.

286. Peru L.; Daculsi G.: Synthetic calcium phosphates: models for biological crystals? *Clin Mat* 15: 267-72, 1994.
287. Pioletti D.P.; Takei H.; Lin T.; Van Landuyt P.; Ma Q.J.; Kwon S.Y.; Sung K.L.: The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials* 21(11): 1103-14, 2000.
288. Pool R.: Coral chemistry leads to human bone repair. *Science* 267: 1772, 1995.
289. Posner A.S.: The mineral of bone. *Clin Orthop Rel Res* 2: 87-99, 1985.
290. Powell A.; Bos G.D.; Goldberg V.M.; Zika J.; Heiple K.G.: Immune responses to bone allografts. In *Osteochondral allografts. Biology, banking and clinical applications*. Ed. by Friedlander GE.; Mankin HJ.; Sell KW, Boston, Little, Brown and Co., pp.141-50, 1983.
291. Proubasta I.; Sancho R.; Itarte J.; Valera M.; Sánchez A.; Martí J.: La cerámica de hidroxiapatita como sustituto óseo en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Avances Traum* 27(1): 42-47, 1997.
292. Proubasta I.; Gil J.; Planell J.A.: *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Ed. Ergon. Madrid, 1997.
293. Ramon R.; Suso S.; Segur J.M.: Trasplante óseo. Experiencia del Banco de Huesos del Hospital Clínic de Barcelona. *Med Integral* 19: 199-202, 1992.
294. Ramon R.; Suso S.; Segur J.M.; Combalia A.; Garcia S.; Huguet R.: Massive allografts in bone tumors. 5th World Congress on locomotor tissue banking. Marsella, 1992.
295. Reddi A.H.; Weintraub S.; Muthukumuran N.: Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18: 207-12, 1987.
296. Reeves B.: Studies of vascularized homotransplants of the knee joint. *J Bone Joint Surg*. 50-B: 226-35, 1968.

297. Rey C.; Kim HM.; Gerstenfeld L.; Glimcher MJ.: Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium-phosphate crystals formed during the calcification of the organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture. *J Bone Miner Res*, 10(10): 1577-88, 1995.
298. Rhinolander J.B.; Phillips R.S.; Steel W.M.; Beer J.C.: Microangiography and bone healing. II. Displaced closed fractures. *J Bone Joint Surg* 50A: 643-62, 1986.
299. Riba J.; Gallart X.; Peidro L.; Samson P.; Del Valle M.; Ramon R.; Suso S.: Utilització del banc d'ossos en el tractament de les pseudoartrosis. Llibre de resums 5è Congrés de la Societat Catalana de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia. Vic, 1992.
300. Ripamoti U.: The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Joint Surg*. 73-A: 692-703, 1991.
301. Roberts W.E.; Morey E.R.: Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiological conditions in rat periodontal ligament. *Am J Anat* 174: 105-118, 1985.
302. Robbins S.L.: Patología estructural y funcional. Ed. Interamericana. Madrid, 1974.
303. Rodrigo J.J.; Fuller T.C.; Mankin H.J.: Cytotoxic HLA antibodies in patients with bone and cartilage allografts. *Trans Orthop Res Soc*. 1: 131, 1976.
304. Sánchez-Sotelo J.; Munuera L.; Madero R.: Treatment of the distal radius with a remodelable bone cement: a prospective, randomised study using Norian SRS. *J Bone Joint Surg*. 82-B(6): 856-63, 2000.
305. Sarmiento A.; Latta L.; Stoll J.E.: The effects of function in fracture healing and stability. En A.A.O.S., *Instructional Course Lectures. Principles of Fracture Healing*: 83-106, 1984.
306. Sasaki S.; Ishii Y.: Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. *J Orthop Sci* 4(5):361-9, 1999.

307. Sasano Y.; Kamakura S.; Nakamura M.; Suzuki O.; Mizoguchi I.; Akita H.; Kagayama M.: Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP) stimulates both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia, but only osteogenesis in the parietal bone of a rat. *Anat Rec* 242(1): 40-6, 1995.
308. Scamell BE, Roach HI. Endochondral bone formation during fracture repair includes a switch in cell phenotype from chondrocytes to bone-forming cells. *J Bone Joint Surg* 74B Supp III: 314, 1992.
309. Schnettler R.; Dingeldein E.; Wahlig H.; Tausch W.: Potential of porous hidroxyapatite and bFGF loaded porous hidroxyapatite on bone repair in cancellous bone in mini pigs. Fourth World Biomaterials Congress, p. 260. Berlín, 1992.
310. Segur J.M.; Del Valle M.; Vilalta C.; Combalia A.; Suso S.; Ramon R.: L'avançament de la tuberositat tibial anterior amb aport d'al.loempelt. Llibre de resums 5è Congrés de la Societat Catalana de Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia. Vic, 1992.
311. Segur J.M; Combalia A.; Garcia S.; Alcántara E.; Suso S.; Ramon R.: Hospital Clínic of Barcelona Bone Bank. Clinical experience. Llibre de resums 2ond Congress of the European Association of Tissue Banks. Atenes, 1993.
312. Segur J.M.; Combalia A.; Garcia S.; Ramberde J.; Suso S.; Ramon R.: Allograft reconstruction of the anterior cruciate ligament. Llibre de resums 3rd European Conference on Tissue Banking and Clinical Application of Grafts. Viena, 1994.
313. Segur J.M.: Anàlisi dels factors d'optimització dels resultats d'un Banc d'Ossos Regional. Tesi Doctoral. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Abril 1995.
314. Segur JM.; Torner P.; Garcia S.; Combalia A.; Suso S.; Ramon R.: The use of bone allograft in tibial plateau fractures. *Arch Orthop Traum Surg* 117: 357-9, 1998.
315. Senn N.: On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci.* 98: 219-43, 1989.

316. Serrano S.; Aubia J.; Mariñoso M.L.: Patología ósea metabólica. Ed. Doyma, S.A. Barcelona, 1990.
317. Serre A.; Novakovitch G.; Vannerau H.: Immunologie et conservation des greffons osseux en vue de leur utilisation en orthopédie. En Teot L.; Vidal J.; Dossa J.(Ed.): Le tissu osseux. Sauramps Medical. Montpellier, 1988.
318. Shindo M.L.; Costantino P.D.; Friedman C.D.; Chow L.C.: Facial skeletal augmentation using hydroxyapatite cement. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 119(2): 185-90, 1993.
319. Shinto Y.; Uchida A.; Korkusuz F.; Araki N.; Ono K.: Calcium hydroxiapatite ceramic used as delivery system for antibiotics. J Bone Joint Surg 74-B: 600-4, 1992.
320. Simmons DJ.: Fracture healing perspectives. Clin Orthop 200: 100-113, 1985.
321. Smith A.: Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adults animals. Nature 205: 782, 1965.
322. St. John K.R.; Zardiachas L.D.; Terry R.C.; Teasdall R.D.; Cooke S.E.; Mitias H.M.: Histological and electron microscopic analysis of tissue response to synthetic composite bone graft in the canine. J Appl Biomater, 6(2): 89-97, 1995.
323. Stankewich C.J.; Swiontkowski M.F.; Tencer A.F.; Yetkinler D.N.; Poser R.D.: Augmentation of femoral neck fracture fixation with an injectable calcium-phosphate bone mineral cement. J Orthop Res 14(5), 786-93, 1996.
324. Stevenson S.: The immune response to osteochondral allografts in dogs. J Bone Joint Surg 69A: 573-82, 1987.
325. Stevenson S.; Horowitz M.: The response to bone allografts. J.Bone Joint Surg. 74-A: 939-50, 1992.

326. Stevenson S.; Li X.Q.; Martin B.: The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 73A: 1143-56, 1991.
327. Soballe K.; Hansen E.S.; Brockstedt-Resmussen H.; Bunger C.: Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around leaded implants. *J Bone Joint Surg* 75B: 270-78, 1993.
328. Sugawara A.; Kusama K.; Nishimura S.; Nishimura M.; Ohashi M.; Moro I.; Chow L.C.; Takagi S.: Biocompatibility and osteoconductivity of calcium phosphate cement. *J Dent Res* 69: 312, 1990.
329. Sugawara A.; Nishiyama M.; Kusama K.: Histopathological reactions of calcium phosphate cement. *Dent Mater J* 11(1): 11-6, 1992.
330. Suk S.I.; Lee S.H.; Lee S.H.; Baek G.H.: A study of the osteogenic potential of bone morphogenetic protein and fracture hematoma. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 248, 1993.
331. Summers B.N.; Eisenstein S.M.: Donor site pain from the ilium. *J Bone Joint Surg* 71B: 677-8, 1989.
332. Suso S.; Ramon R.; Segur J.M.; Fernández de Retana P.: L'os cryoconservé: expérience à l'Hospital Clínic de Barcelona. Livre de resums Journées annuelles de cryobiologie, France-Cryo-89. Marsella, 1989.
333. Takagi S.; Chow L.C.; Ishikawa K.: Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements. *Biomaterials* 19: 1593-9, 1998.
334. Takagi K.; Urist M.R.: The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop* 171: 224-31, 1982.
335. Takaoka T.; Okumura M.; Ohgushi H.; Tanaka Y.; Takakura Y.; Tamai S.: Osteogenic response of bone marrow cells in porous hydroxyapatite-coated alumina ceramic. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 239, 1993.

336. Thordarson D.B.; Hedman T.P.; Yetkinler D.N.; Eskander E.; Lawrence T.N.; Poser R.D.: Superior compressive strength of a calcaneal fracture construct augmented with remodelable cancellous bone cement. *J Bone Joint Surg* 81(2):239-46, 1999.
337. Tisdell C.L.; Goldberg V.M.: The influence of a hydroxyapatite and tricalcium-phosphate coating on bone growth into titanium fiber-metal implants. *J Bone Joint Surg* 76A:159-71, 1994.
338. Tomford W.W.; Doppelt S.; Mankin H.J.; Friedlander G.E.: Bone bank procedures. *Clin Orthop* 174: 15-21, 1983.
339. Tomford W.W.; Starkweather R.S.; Mankin H.J.: A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg* 63A: 244-8, 1981.
340. Tomford W.W.; Thongphasuk J.; Mankin H.J.; Ferraro M.J.: Frozen musculoskeletal allografts. A study of the clinical incidence and causes of infection associated with their use. *J Bone Joint Surg*. 72A: 1137-44, 1990.
341. Tonino A.J.; Davidson C.L.; Klopfer P.J.; Linclau L.A.: Protection from stress in bone and its effects: Experiments with stainless and plastic plates in dogs. *J Bone Joint Surg* 58B: 107-113, 1976.
342. Torner Baduell C.E.: Contribución al estudio biomecánico del fémur. *Tesi Doctoral. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona*, 1975.
343. Toth J.M.; An H.S.; Lim T.H.; Ran Y.; Weiss N.G.; Lundberg W.R.; Xu R.M.; Lynch K.L.: Evaluation of porous biphasic calcium phosphate ceramics for anterior cervical interbody fusion in a caprine model. *Spine* 20: 2203-10, 1995.
344. Trecant M.; Delecrin J.; Royer J.; Goyenvalle E.; Daculsi G.: Mechanical changes in macroporous calcium phosphate ceramics after implantation in bone. *Clin Mat* 15: 233-240, 1994.
345. Triffett J.T.: Initiation and enhancement of bone formation: A review. *Acta Orthop Scand* 58: 673-84, 1987.

346. Trueta J.: The role of the vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 45B: 402-18, 1963.
347. Uthoff H.K.; Bardos D.I.; Liskova-Kiar M.: The advantages of titanium alloy over stainless steel plates for the internal fixation of fractures: An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg* 63B: 427-34, 1981.
348. Urist M.R.: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965.
349. Urist M.R.: Bone morphogenetic protein induced bone formation and the bone-bone marrow consortium. En Aebi M. (Ed.): *Bone transplantation*. Springer-Verlag. Berlin. pp. 185-197, 1989.
350. Urist M.R.: Bone transplantation. En Urist MR. (Ed.): *Fundamental and clinical bone physiology*. Philadelphia, J.B. Lippincott. pp. 331-68, 1980.
351. Urist M.R.: The search and the discovery of bone morphogenetic protein (BMP). En: Urist M.R.; O'Connor B.; Burwell R.G.: *Bone grafts, derivatives and substitutes*, pp. 315-62. Oxford, Butterworth-Heinzmann, 1994.
352. Vasconcelos M.; Afonso A.; Branco R.; Planell J.A.; Driessens F.C.M.; Cavalheiro J.: Histological evaluation of two bioactive cements. *Fifth World Biomaterials Congress*. Toronto. Canada. May 1996.
353. Vicente V.; Meseguer L.; Martínez F.; Galian A.; Rodríguez J.; Alcaraz M.; Clavel M.: Ultrastructural study of the osteointegration of bioceramics (whitlockite and composite beta-TCP + collagen) in rabbit bone. *Ultrastruc Pathol* 20(2): 179-88, 1996.
354. Vilar J.: Recomendaciones de la declaración de Helsinki sobre investigación clínica y guías principales en el cuidado y uso de los animales. *Med Clin (Barc)* 91: 702-3, 1988.
355. Von Boemer H.; Kisielow P.: Self-nonsel discrimination by T-cells. *Science* 248: 1369-73, 1990.

356. Wang J.; Chen W.; Li Y.; Fan S.; Weng J.; Zhang X.: Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae. *Biomaterials* 19(15): 1387-92, 1998.
357. Winter M.; Griss P.: Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 2: 159-60, 1981.
358. Witschger P.M.; Gerhart T.N.; Goldman J.B.: Biomechanical evaluation of a biodegradable composite as an adjunct to internal fixation of proximal femur fractures. *J Orthop Res* 9(1): 48-53, 1991.
359. Wu C.H.; Hara K.; Ozawa H.: Enhanced osteoinduction by intramuscular grafting of BMP-beta-TCP compound pellets into murine models. *Arch Histol Cytol* 55(1): 97-112, 1992.
360. Xie L.; Monroe E.A.: Calcium phosphate cements. *Mat Res Soc Symp Proc* 179: 25-39, 1991.
361. Xu X.X.; Li C.S.; Hu C.M.; Miao X.M.: Evaluation of intramedullary cortical graft in the treatment of bone defect: Animal experiments. *J Bone Joint Surg* 75B Supp III: 245, 1993.
362. Yablon I.G.; Cooperband S.; Covall D.: Matrix antigens in allografts. *Clin Orthop* 168: 243-51, 1982.
363. Yamamoto H.; Niwa S.; Hori M.; Hattori T.; Sawai K.; Aoki S.; Hirano M.; Takeuchi H.: Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro. *Biomaterials* 19(17): 1587-91, 1998.
364. Yetkinler D.N.; Ladd A.L.; Poser R.D.; Constantz B.R.; Carter D.: Biomechanical evaluation of fixation of intra-articular fractures of the distal part of the radius in cadavera: Kirschner wires compared with calcium-phosphate bone cement. *J Bone Joint Surg* 81-A(3): 391-9, 1999.
365. Yoshimine Y.; Akamine A.; Mukai M.: Biocompatibility of tetracalcium phosphate cement when used as a bone substitute. *Biomaterials* 14(6): 403-6, 1993.

366. Yoshimine Y.; Maeda K.: Histologic evaluation of tetracalcium phosphate-based cement as a direct pulp-capping agent. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79(3): 351-8, 1995.
367. Yoshimine Y.; Sumi M.; Isobe R.; Anan H.; Maeda K.: In vitro interaction between tetracalcium phosphate-based cement and calvarial osteogenic cells. *Biomaterials* 17(23): 2241-5, 1996.
368. Zardiackas L.D.; Teasdall R.D.; Black R.J.; Jones G.S.; St.John K.R.; Dillon L.D.; Hughes J.L.: Torsional properties of healed canine diaphyseal defects grafted with a fibrillar collagen and hydroxiapatite/tricalcium phosphate composite. *J Appl Biomater* 5(4): 277-83, 1994.
369. Zasacki W.: The efficacy of application of lyophilized radiation-sterilized bone graft in orthopaedic surgery. *Clin Orthop* 272: 82-7, 1991.
370. Zerwekh J.E.; Kourosch S.; Scheinberg R.; Kitano T.; Edwards M.L.; Shin D.; Selby D.K.: Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *J Orthop Res* 10(4): 562-72, 1992.