

## RESUMEN

El presente proyecto final de carrera se fundamenta en la investigación del desarrollo de nuevos materiales de tipo cemento capaces de estimular la regeneración y reparación del tejido óseo. Se estudian tres formulaciones de cementos de fosfato de calcio, basados en el fosfato tricálcico  $\alpha$  ( $\alpha$ -TCP), con el objetivo de evaluar la diferencia del tamaño cristalino en una de ellas (serie 2) y el efecto de la inclusión de albumen (proteína derivada de la clara de huevo) en la composición de otra (serie 3), todo ello respecto a un patrón (serie 1).

Las tres series de cemento se preparan previa caracterización fisico-química de los reactivos empleados. Se estudia el proceso de reacción, determinando los tiempos de fraguado y se caracterizan los cementos mediante las técnicas de difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojo, que revelan la conversión del  $\alpha$ -TCP en hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), muy similar a la hidroxiapatita biológica.

Se realiza un estudio de la topografía superficial de los cementos con el objetivo de evaluar las diferencias de rugosidad, para ello se emplean técnicas como la microscopía electrónica de barrido y la microscopía óptica interferométrica entre otras, obteniéndose la menor rugosidad en la serie 2, de menor tamaño cristalino.

Una vez caracterizadas las superficies con los valores de rugosidad respectivos se determina cual de ellas presenta mejor comportamiento biológico, a partir de cultivos celulares. Para ello se lleva a cabo un estudio *in vitro* de células osteoblásticas sobre los cementos con el fin de evaluar la posible citotoxicidad y biocompatibilidad de éstos. Además, se estudia la adhesión, proliferación y diferenciación celular en relación a la rugosidad superficial y composición de cada serie. Se realizan micrografías a lo largo de los ensayos mediante microscopía electrónica de barrido ambiental y microscopía electrónica de barrido.

Los resultados obtenidos demuestran que ninguna de las series presenta signos de citotoxicidad. La serie 2, de menor tamaño cristalino, favorece la adhesión de los osteoblastos al igual que su diferenciación, sin embargo, se reduce la proliferación. La introducción de albumen en la composición del cemento aumenta la rugosidad considerablemente y mejora la proliferación osteoblástica y la diferenciación, siendo esta formulación la que mejores resultados presenta en este aspecto. Se realiza un estudio de significación estadística de los resultados obtenidos.





## INDICE

	<u>Página</u>
<b>PREFACIO</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>MEMORIA</b>	
<b>1. FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>11</b>
1.1 EL HUESO	11
1.2 LA HIDROXIAPATITA	12
1.3 CEMENTOS DE FOSFATO DE CALCIO	14
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
2.1 MATERIALES	17
2.1.1 COMPONENTES DEL CEMENTO	17
2.1.1.1 Fase sólida	17
2.1.1.2 Fase líquida	20
2.1.1.3 Agente espumante	21
2.2 SINTESIS Y PREPARACIÓN DEL CEMENTO	21
2.2.1 MOLDE	21
2.2.2 PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE CEMENTO	22
2.2.2.1 Relación líquido/polvo	22
2.2.2.2 Preparación de la serie 1	22
2.2.2.3 Preparación de la serie 2	23
2.2.2.4 Preparación de la serie 3	23
2.2.2.5 Preparación de la solución Ringer	24



2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DEL CEMENTO	24
2.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS REACTIVOS	24
2.3.1.1 Difracción de rayos X	24
2.3.1.2 Caracterización física	25
2.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL CEMENTO	26
2.3.2.1 Proceso de reacción	26
2.3.2.2 Difracción de rayos X	28
2.3.2.3 Espectroscopía de infrarrojo	28
2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE	28
2.4.1 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	29
2.4.2 TÉCNICA DE CONTACTO: RUGOSÍMETRO	30
2.4.3 MICROSCOPÍA ÓPTICA INTERFEROMÉTRICA	31
2.4.4 MICROSCOPÍA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM)	32
2.5 ESTUDIO <i>IN VITRO</i>	34
2.5.1 INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR	34
2.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.5.2.1 Materiales	35
2.5.2.2 Preparación del estudio	35
2.5.2.3 Ensavo de adhesión	38
2.5.2.4 Ensavo de proliferación	39
2.5.2.5 Ensavos de diferenciación	40
2.5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS DISCOS	43
2.5.3.1 Microscopía electrónica de barrido ambiental	43
2.5.3.2 Microscopía electrónica de barrido	44
2.6 ESTUDIO ESTADÍSTICO	44



<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS TRES FORMULACIONES	47
3.1.1 CARACTERIZACIÓN DEL POLVO DEL CEMENTO	47
3.1.1.1 Difracción de rayos X	47
3.1.1.2 Distribución del tamaño de partícula del $\alpha$ -TCP	48
3.1.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL CEMENTO	50
3.1.2.1 Proceso de fraguado del cemento	50
3.1.2.2 Superficie específica del cemento fraguado	52
3.1.2.3 Difracción de rayos X	52
3.1.2.4 Espectroscopía infrarroja	54
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE	57
3.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	58
3.2.2 TÉCNICA DE CONTACTO: RUGOSÍMETRO	63
3.2.3 MICROSCOPIA ÓPTICA INTERFEROMÉTRICA	64
3.2.4 MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM)	67
3.3 ESTUDIO IN VITRO	71
3.3.1 ENSAYO DE ADHESIÓN	71
3.3.1.1 Caracterización de los discos	72
3.3.2 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	76
3.3.2.1 Caracterización de los discos	78
3.3.3 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN	82
3.3.3.1 Actividad de la fosfatasa alcalina	82
3.3.3.2 Secreción de la osteocalcina	84
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>



<b>ANEXOS</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO A: FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>97</b>
A.1 HISTORIA	98
A.2 BIOMATERIALES DE FOSFATO DE CALCIO	99
A.2.1 Introducción a los biomateriales	99
A.2.2 Concepto de bioactividad	100
A.2.3 Cementos de fosfato de calcio	101
<b>ANEXO B: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN</b>	<b>106</b>
B.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA: DIFRACCIÓN DE RAYOS X	106
B.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA	108
B.2.1 Granulometría	108
B.2.2 Superficie específica	109
B.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	110
B.4 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE	111
B.4.1 Microscopía electrónica de barrido	111
B.4.2 Técnica de contacto: Rugosímetro	112
B.5 ESTUDIO IN VITRO	116
B.5.1 Tipos de cultivo	116
B.5.2 Biología de la célula en cultivo	117
B.5.3 Evolución de las líneas celulares	117
B.5.4 El medio de cultivo	118
B.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL	120
<b>ANEXO C: MARCAS COMERCIALES DE CEMENTOS DE FOSFATO DE CALCIO</b>	<b>121</b>



## PREFACIO

La necesidad de ofrecer una mejor calidad de vida a personas que sufren ciertos padecimientos crónicos sin solución médica, ha llevado a la búsqueda de materiales que puedan sustituir las diferentes partes del cuerpo humano. La investigación y desarrollo de los materiales de "repuesto" para nuestro organismo ha permitido que hoy se puedan reemplazar numerosos órganos y tejidos con resultados satisfactorios.

Los materiales que se emplean para la fabricación de implantes son de naturaleza diversa; pueden elaborarse con tejidos de los mismos pacientes (autoinjerto), con tejidos de algún donante humano (homoinjerto) o de otras especies (heteroinjerto), así como a partir de materiales hechos por el propio hombre (aloinjertos); a estos últimos se les conoce como biomateriales, y pueden ser de origen sintético o natural (pero modificados por el hombre). Éstos se utilizan en la fabricación de dispositivos médicos capaces de desempeñar diferentes funciones en el organismo humano.

Entre los biomateriales de origen sintético se encuentran los metálicos, cerámicos, poliméricos y los compuestos. En las últimas décadas, las investigaciones sobre biomateriales han tenido resultados espectaculares en el campo de implantes. De hecho, casi cualquier parte del organismo humano puede reemplazarse por algún dispositivo.

El desarrollo de biomateriales resulta complejo, largo y costoso, y además debe llevarse a cabo por un equipo de investigación multidisciplinario. Después de obtener el material con las peculiaridades deseadas, sigue la etapa de diseño y fabricación de prototipos y de evaluaciones toxicológicas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Al final se efectúan protocolos de ensayos y se estudia su efectividad en humanos. Toda la etapa de investigación puede originar que transcurran hasta más de diez años antes de que un nuevo material salga al mercado.

Uno de los principales problemas que afronta la medicina de hoy es el incremento considerable de las patologías relacionadas con los problemas óseos. La mitad de las enfermedades crónicas que sufren las personas mayores de 65 años están relacionadas con problemas en las articulaciones. Durante los últimos diez años, el número de fracturas óseas causadas por osteoporosis se ha duplicado. Además, el incremento de traumatismos causados por accidentes de tráfico también se ha multiplicado durante los últimos años.



Además la cirugía ortopédica y maxilo-facial necesitan realizar en muchas ocasiones resecciones masivas de tejido óseo (tumores, cirugía protésica, etc.), esto obliga irremediamente a dejar cavidades óseas extensas debilitadas por la pérdida de hueso. Estas cavidades ocasionan complicaciones tales como aparición de fracturas, osteoporosis, infecciones óseas y aflojamientos precoces en la cirugía endoprotésica entre otras. Para evitar estas complicaciones se recurre a la colocación de injertos óseos. La utilización del autoinjerto tiene las limitaciones inherentes a su origen que es el propio paciente, no siendo posible disponer de cantidades suficientes para rellenar cavidades extensas. Por otra parte, la utilización del aloinjerto está ciertamente desacreditada debida al alto índice de reacciones de hipersensibilidad que se pueden producir.

De ahí que una de las líneas de investigación de la ciencia médica sea el desarrollo de nuevos materiales que sean capaces de estimular la regeneración y reparación de los tejidos óseos dañados. En la última década, el interés por los cementos de fosfatos de calcio ha ido en aumento debido a las posibilidades en las prácticas quirúrgicas, ya sea como relleno de cavidades óseas, sustitución de hueso, recubrimiento de prótesis metálicas (aplicado principalmente las prótesis de cadera y tobillo), así como dispositivos de liberación controlada de fármacos, substratos para el crecimiento de nuevo tejido (ingeniería de tejidos), etc.

En este sentido, los cementos de fosfatos de calcio se han consolidado como materiales de gran utilidad. El presente proyecto final de carrera se enmarca en el estudio de tres formulaciones de este tipo de cementos.

El trabajo ha sido realizado en el Departamento de “Ciencia de los materiales e Ingeniería Metalúrgica” de la Escuela Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona (UPC) bajo la dirección de la Dra. Maria Pau Ginebra. Se enmarca dentro de la línea de investigación en fase de desarrollo sobre cementos de fosfatos de calcio y forma parte de un proyecto financiado dentro del Programa Nacional de Materiales de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.



## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los cementos de fosfatos de calcio se han consolidado como materiales de gran utilidad en el campo de la regeneración ósea. Además de ser materiales moldeables e inyectables, con las consiguientes ventajas en aplicaciones de cirugía de mínima invasión, su proceso de reacción da lugar en la mayoría de los casos a hidroxiapatitas deficientes en calcio, de rango nanométrico, muy similares a la hidroxiapatita biológica. El control de diversas variables, como la composición química de las fases líquida y sólida, el tamaño de partícula, la relación líquido-polvo, o la introducción de aditivos orgánicos permite ajustar las propiedades de los cementos a requisitos clínicos de cada aplicación específica.

En este trabajo se estudian dos parámetros: el tamaño de partícula, es una vía simple para controlar la microestructura del cemento y la adición de albumen, un agente espumante de base proteica que permite obtener cementos macroporosos que facilitan la colonización ósea y la reabsorción del material.

Se plantea el estudio de tres formulaciones de cementos de fosfato de calcio con los objetivos de valorar la influencia del tamaño cristalino y la introducción de albumen frente al comportamiento celular que presentan en cultivo de osteoblastos. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo *in vivo* pero es una alternativa válida en muchas situaciones ya que permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que pueden suponer si el estudio se hace con animales de experimentación el sacrificio de decenas o cientos.

La metodología seguida durante la ejecución de este proyecto se establece de igual forma para las tres formulaciones. En primer lugar se caracterizan los reactivos, a continuación, se preparan los cementos y se determinan los tiempos de fraguado. Seguidamente se caracterizan los cementos con el fin de verificar el producto de la reacción. Finalmente se realiza un estudio de la rugosidad superficial y se lleva a cabo la evaluación de la citotoxicidad y biocompatibilidad mediante un estudio *in vitro* en un cultivo de células osteoblásticas.





# 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

## 1.1 EL HUESO

A modo de resumen destacamos que, el hueso es un material compuesto, formado por tres constituyentes fundamentales: fibras de colágeno (34% en volumen), cristales de un fosfato de calcio apatítico de orden nanométrico (42% en volumen) y agua (24% en volumen). Se trata de un material biológico, organizado jerárquicamente en una arquitectura compleja en la cual se pueden distinguir distintos niveles.

Por otra parte es un tejido vivo en constante cambio con capacidad de crecimiento, remodelación y reparación. Estas funciones se realizan principalmente por tres tipos de células: osteoblastos (activos en la formación de la matriz ósea), osteocitos (participan en las funciones metabólicas) y osteoclastos (funcionan en la resorción ósea).

La formación de hueso resulta de un proceso complejo que incluye proliferación de células, maduración a osteoblastos, formación de matriz orgánica y finalmente la mineralización de la matriz caracterizada por depósitos de cristales de hidroxiapatita.

Los osteoblastos son células formadoras de tejido óseo, de tamaño mediano, poliédricas, con citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina. Derivan de los preosteoblastos y suelen considerarse células con diferenciación terminal. Los osteoblastos se hallan en contacto directo con las superficies óseas formando grupos compactos de una sola capa de espesor.

Los osteoblastos sintetizan el componente orgánico de la matriz ósea (colágeno, proteoglicanos, proteínas no colágenas como la osteocalcina, la osteopontina y la fosfatasa alcalina y factores de crecimiento) y controlan el depósito de las sales minerales. Tanto *in vivo* como *in vitro* los osteoblastos pasan sucesivamente por tres estadios funcionales: a) proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea, b) maduración de la matriz ósea (cambios en la composición y organización de la matriz que la hacen competente para ser mineralizada) y c) depósito de mineral.



## 1.2 LA HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita es un mineral del grupo de los fosfatos cálcicos, muy semejante a la hidroxiapatita del hueso. Los cristales de hidroxiapatita ósea presentan impurezas de carbonatos y una estequiometría (relación cuantitativa) pobre en Ca: relación Ca/P = 1,5. Se dice que el contenido mineral en el hueso está insaturado, es decir, las concentraciones de Ca y P son insuficientes para producir una precipitación espontánea, aunque suficientes para el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita.

La hidroxiapatita tiene la fórmula  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  y una relación Ca/P de 1,67. Este exceso de Ca en relación con la hidroxiapatita ósea facilita los enlaces químicos con el hueso. En la fase de contacto entre ambas hidroxiapatitas se produce una sobresaturación de Ca que reacciona con el carbonato del hueso.

La hidroxiapatita es el menos soluble de los fosfatos cálcicos y algo menos que la hidroxiapatita ósea. El pequeño tamaño de los cristales y la mayor solubilidad de la hidroxiapatita ósea aseguran una gran actividad química de intercambio en el medio extracelular.

La hidroxiapatita es el componente fundamental del tejido óseo de todos los vertebrados. Por esta razón los materiales fabricados a base de hidroxiapatita no provocan reacción inmunológica apreciable al ser implantados en el organismo receptor. Por otra parte, numerosas experiencias preclínicas y clínicas han demostrado que las cerámicas de hidroxiapatita son biocompatibles, bioactivas, bioestables y osteoconductoras.

La biocompatibilidad de la hidroxiapatita sinterizada es excelente y además tiene la capacidad de formar un enlace directo con el hueso, sin interposición de una cápsula fibrosa. Es decir, tiene la propiedad de ser un material bioactivo.

Se sabe que en todos los materiales que presentan esta propiedad, el mecanismo de formación de este enlace directo sigue cuatro etapas:

- 1) Absorción de proteínas en la superficie, interacciones químicas y actividad celular.
- 2) Iniciación de la mineralización: formación de una capa de apatita carbonatada sobre la superficie.
- 3) Crecimiento de la capa de apatita carbonatada.



- 4) Formación de una matriz de colágeno mineralizado en aposición a la capa de apatita carbonatada.

La bioactividad asegura una buena integración de las cerámicas de hidroxiapatita en el tejido óseo circundante. Sin embargo, si lo que se busca no es sólo la integración sino la regeneración del tejido óseo, es decir, la substitución del biomaterial por tejido neoforado, es necesario contar con un material que además de ser bioactivo sea reabsorbible.

La reabsorción de una biocerámica puede ser de carácter activo o pasivo. El primer caso es el que está mediado por la actividad de las células, que producen ácidos que llevan a la disolución del material. En cambio, los fosfatos de calcio que experimentan reabsorción pasiva son aquellos respecto a los cuales en medio fisiológico está infrasaturado y que se disuelven por procesos químicos, sin mediación celular.

La hidroxiapatita correspondería al primer grupo. Sin embargo, se ha visto que su comportamiento depende de forma muy marcada de sus características específicas (estequiometría, cristalinidad, defectos, etc.), de forma que la hidroxiapatita sintética obtenida por sinterización a alta temperatura se considera prácticamente no reabsorbible, mientras que las apatitas carbonatadas de características similares a las biológicas son reabsorbibles. Las características de la hidroxiapatita (porosa no sinterizada) son las siguientes:

- Posee una estructura altamente porosa.
- Es osteoconductor.
- De reabsorción muy lenta, por lo cual permite una mejor neoformación de hueso.
- Biocompatible.
- Es reabsorbible (10-30%).
- Osteofílica.
- Sufre un proceso de osteointegración.
- Su estructura porosa permite una mejor neovascularización del hueso formado.

En consecuencia, si lo que se busca es un material que sea reabsorbible, es necesario cambiar la filosofía de diseño de la hidroxiapatita: hay que buscar métodos de obtención análogos a los procesos naturales (a baja temperatura y en medio acuoso). Una vía abierta en esta dirección es la de los cementos de fosfato de calcio.



### 1.3 CEMENTOS DE FOSFATO DE CALCIO

Los fosfatos de calcio de interés biológico son los ortofosfatos, sales del ácido ortofosfórico, que se recogen en la tabla 1.1, según una relación Ca/P decreciente, lo que coincide con una acidez creciente.

**Tabla 1.1.- Principales formulaciones de compuestos de fosfato de calcio, obtenidas tanto mediante reacciones térmicas como mediante reacciones de precipitación, con su relación Ca/P (nº de átomos de Ca partido por el nº de átomos de P que existen en el compuesto), el nombre del compuesto, y su formulación.**

NOMBRE	ABREVIATURA	FÓRMULA	Ca/P
Fosfato tetracálcico	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Hidroxiapatita deficiente de calcio	CDHA	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})_2$	1.5
Fosfato de calcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	
Fosfato tricálcico ( $\alpha, \beta$ )	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Fosfato dicálcico (Monetita)	DCP	$\text{CaHPO}_4$	1.0
Fosfato dicálcico dihidratado (Brushita)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5

En el año 1986 Brown y Chow publicaron el primer estudio sobre un cemento de fosfato de calcio. Al mezclar dos sales de fosfatos de calcio, una fase ácida y una fase básica con una solución acuosa obtuvieron un cemento que fraguaba con el tiempo a temperatura ambiente. En general, se puede decir que los cementos de fosfato de calcio consisten en la mezcla de una fase en polvo, formada por uno o más fosfatos de calcio, con una fase líquida (agua o solución acuosa) que fragua y se endurece dando lugar a un cuerpo sólido.

El desarrollo de materiales de tipo cemento, en especial para tratamientos de defectos óseos, lleva asociadas dos ventajas importantes en comparación con la utilización de fosfatos de calcio en forma de bloques o gránulos. En primer lugar, la inyectabilidad, que permite implantar el cemento mediante técnicas de mínima invasión. En segundo lugar, la perfecta adaptación al defecto en el que se implanta, que asegura una perfecta aposición material-tejido óseo en geometrías complicadas. Esto permite que el defecto se estabilice mejor, y por lo tanto, el proceso de curación sea más rápido.



Desde el trabajo original de Brown y Chow se han desarrollado y comercializado varios cementos de fosfatos de calcio, la mayor parte de ellos dan como producto de la reacción de fraguado hidroxiapatitas, más o menos deficientes en calcio, y carbonatadas o no. Diversos estudios llevados a cabo con este tipo de cementos han puesto de manifiesto que se trata de materiales extremadamente biocompatibles, osteoconductores y que estimulan la regeneración ósea. Sin embargo, la mayor parte de ellos, especialmente los apatíticos, aunque son más reabsorbibles que las apatitas sinterizadas obtenidas a alta temperatura, presentan una cinética de reabsorción excesivamente lenta.

El problema de la cinética de reabsorción excesivamente lenta es importante sobre todo en pacientes jóvenes, debido a la fragilidad inherente del material cerámico implantado en comparación con el tejido óseo circundante. El cemento ideal debería ser capaz de reabsorberse a la misma velocidad a la que el tejido óseo puede crecer siendo reemplazado progresivamente por tejido óseo neoformado.

Son diversos los parámetros que influyen en la cinética de reabsorción de los cementos, entre los cuales cabe destacar la macroporosidad, la composición química y la cristalinidad.

Por otra parte, las características mecánicas de un cemento de fosfato de calcio dependen de la composición del cemento. El factor principal es el cociente entre el líquido que se mezcla (L) y la cantidad del polvo del cemento (P).

Si el cociente de L/P es pequeño, la porosidad del cemento es baja. Además, las características mecánicas de un CPC aumentan cuando la porosidad es baja. Sin embargo, cuanto menos porosos son los cementos, menos bioreabsorbibles son. Así pues, hay un equilibrio a encontrar entre la porosidad y las características mecánicas de un CPC para obtener un cemento con la buena reabsorción, con suficientes fuerzas compresivas y extensibles, al igual que unas buenas características reológicas para inyectarlos en los huesos.

El fraguado del cemento es resultado de un proceso de disolución de los reactivos y precipitación de una nueva fase, que tiene lugar a temperatura ambiente o corporal. En la mayoría de los cementos desarrollados en los últimos años, el producto de la reacción es una hidroxiapatita muy similar a la biológica.



Las propiedades de fraguado y endurecimiento de un cemento pueden ajustarse modificando distintas variables de procesado, como la composición química de los reactivos, la relación líquido/polvo, el tamaño de partícula, la adición de semillas, etc. Esto hace de los cementos materiales muy versátiles, que se pueden adaptar a distintos requisitos clínicos para diversas aplicaciones.

En una primera fase la pasta va perdiendo gradualmente su plasticidad, de forma que aunque vuelva a ser mezclada no recupera sus propiedades reológicas. En una segunda etapa, la pasta se consolida adquiriendo la consistencia de cuerpo sólido, hasta que llega al nivel de máxima resistencia mecánica. La primera etapa se conoce como fraguado del cemento y se suele caracterizar determinando el tiempo de fraguado, mientras que la segunda se conoce como endurecimiento.

El tiempo inicial de fraguado, que da una estimación de la pérdida inicial de plasticidad de la pasta, conviene que sea corto pero dentro de unos límites, para permitir al médico trabajar la masa y colocarla en la cavidad de destino. Un rango aceptable podría estar entre 5 y 10 minutos.

El tiempo final de fraguado determina el tiempo que debe transcurrir para que el cemento adquiera una consistencia bastante sólida, soportando cierto nivel de carga. Por tanto, interesa que el intervalo entre el tiempo inicial y el tiempo final de fraguado sea lo más corto posible.

En un cemento para regeneración ósea interesa que el tiempo de fraguado sea lo menor posible. Para poder obtener un cemento implantable, con un tiempo de fraguado razonable que permitiera su uso como sistema inyectable en cirugía mínimamente invasiva, se tendría que utilizar una fase líquida con acelerante. El uso de soluciones de fosfato tienen un efecto de aceleración en la reacción que influyen en la estabilidad de la espuma, reduciendo la macroporosidad de los cementos.

Se sabe que las variaciones de las condiciones ambientales afectan significativamente las propiedades reológicas y el fraguado de estos materiales, Almirall *et al* (2003). Esta característica puede emplearse para controlar y mejorar el comportamiento del cemento durante su uso, de forma que satisfaga los requerimientos clínicos.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La instrumentación utilizada para la realización del presente Proyecto de Final de Carrera pertenece, dado el carácter multidisciplinario de la investigación, a diversos departamentos y entidades.

La primera fase del proyecto, que engloba las síntesis y preparación de las formulaciones de los cementos de fosfato de calcio, se realizó íntegramente en el Departamento de “Ciencia de los materiales e Ingeniería metalúrgica” de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona (UPC). La caracterización de las muestras (rayos X, determinación tamaño de partícula, estudio de rugosidad, microscopía,...) se llevó a cabo en el mismo departamento y en las instalaciones de los “Serveis Científic Tècnics” de la Universitat de Barcelona. Finalmente, el estudio *in vitro* de células osteoblásticas se hizo en las instalaciones que tiene en el Parc Científic de Barcelona el “Centre de Recerca d’Enginyeria Biomèdica” (CREB).

### 2.1 MATERIALES

#### 2.1.1 COMPONENTES DEL CEMENTO

En general, cualquier cemento está formado por dos fases, una sólida en forma de polvo y otra líquida, que al mezclarse forman una pasta que endurece con el tiempo. En este apartado se describen los componentes que forman la fase sólida y la fase líquida del cemento que es objeto de estudio.

##### 2.1.1.1 Fase sólida

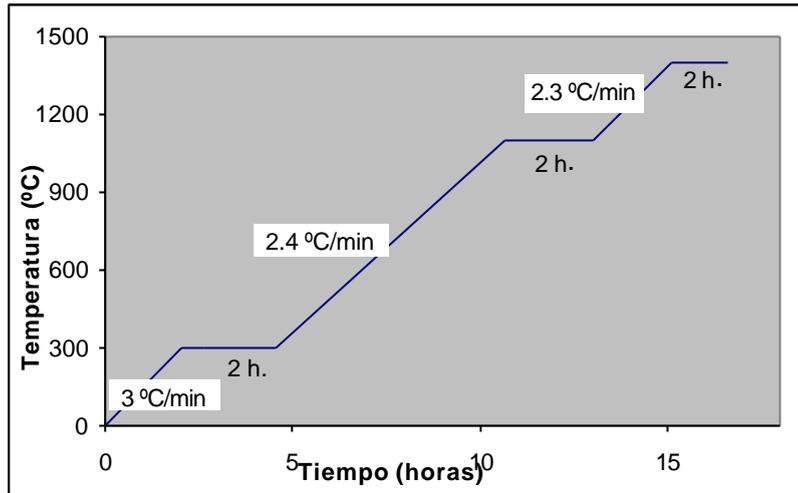
Los reactivos utilizados son los siguientes:

- FOSFATO TRICÁLCICO  $\alpha$

El fosfato tricálcico,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , es una fase que aparece en el diagrama de equilibrio del sistema  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ , como se muestra en la figura 2.1. Tiene una relación molar Ca/P de 1,5 y se obtiene a alta temperatura. En el diagrama se observa como el fosfato tricálcico se







**Figura 2.2.-** Protocolo de calentamiento para la obtención de  $\alpha$ -TCP.

Las rampas de calentamiento tienen una velocidad de calentamiento lo suficientemente lenta para evitar posibles problemas de liberación rápida de agua o dióxido de carbono.

Al finalizar este tratamiento térmico al producto de la reacción en fase sólida se le realiza un temple en aire hasta temperatura ambiente, para retener la estructura monoclinica correspondiente a la fase  $\alpha$ , evitando la transformación a su forma alotrópica  $\beta$ , estable a temperatura ambiente.

Como consecuencia del tratamiento térmico se produce una pre-sinterización del material, por tanto, para poder utilizarlo como polvo, el producto obtenido se somete a un tratamiento de molienda. En general se considera que el parámetro que afecta más significativamente al afinamiento del polvo es el tiempo de molienda. De todos modos, la velocidad es un parámetro importante ya que la fragmentación de las partículas es más efectiva a altas velocidades de molienda. En cuanto al tamaño y número de bolas, si se parte de un material con grandes fragmentos se aconseja moler en una primera fase sólo con las bolas grandes y luego con las pequeñas para afinar el polvo.

La molienda del  $\alpha$ -TCP se lleva a cabo en un molino de bolas tipo centrífugo de la marca Fritsch modelo Pulverisette provisto de un recipiente y bolas de ágata (99.9%  $\text{SiO}_2$ ), cuatro grandes de 30 mm de diámetro y ocho pequeñas de 10 mm. La velocidad se puede regular desde un mínimo de 160 r.p.m. (velocidad 1) hasta un máximo de



700 r.p.m. (velocidad 10), el incremento entre dos velocidades consecutivas es de 60 r.p.m. La capacidad del recipiente es de 500 cm<sup>3</sup>, aunque sólo se puede llenar 2/3 de su volumen, incluyendo las bolas, para hacer efectiva la molienda.

En el trabajo realizado, para moler el  $\alpha$ -TCP, se siguen distintos protocolos con el fin de obtener tamaños de partícula diferentes. Estos protocolos se definen mediante un código formado por varias cifras: la primera corresponde a la velocidad utilizada, la segunda al tiempo de molido con las bolas grandes y la tercera al tiempo de molido con las bolas pequeñas (los tiempos se indican en minutos). Cuando no se escribe el tercer número significa que la molienda se realiza con todas las bolas. Así pues, a todos los lotes de  $\alpha$ -TCP se les realiza una molienda previa de 5:20. La cantidad de polvo máxima que se muele es de 40 gramos.

Al acabar de moler si se observa la presencia de partículas compactas que no se han triturado, se pasa por un tamiz (840  $\mu$ m) y las partículas retenidas en él se vuelven a moler siguiendo el mismo protocolo.

Esta preparación del  $\alpha$ -TCP se realiza en varios lotes para obtener una cantidad de producto suficiente que nos permita la síntesis de todas las series de los cementos.

- HIDROXIAPATITA PRECIPITADA,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

La hidroxiapatita, que tenemos en forma de hidroxiapatita precipitada (PHA, Merck Ref. 2143), se añade al polvo de  $\alpha$ -TCP en un porcentaje del 2% para que actúe como nucleador o semilla de la fase producto.

### 2.1.1.2 Fase líquida

La fase líquida constituye, junto con los reactivos sólidos, el segundo componente principal de un material del tipo cemento. Proporciona el medio adecuado para la disolución de los reactivos y para la precipitación de los productos de las reacciones. Las reacciones de los cementos de fosfato de calcio involucran procesos de hidratación de los reactivos, y, como su uso implica aplicaciones biomédicas, la fase líquida utilizada es agua o una solución acuosa de ácido fosfórico o sales derivadas de éste.



La fase líquida del cemento es agua destilada Millipore extraída de la unidad Sterivex™-GP de 30 litros de volumen, ésta elimina los microorganismos, partículas, precipitados y polvos insolubles mayores de 0.22  $\mu\text{m}$ .

### 2.1.1.3 Agente espumante

El albumen (clara de huevo) es un agente porogénico que se introduce en los cementos para inducir macroporosidad a la microestructura para mejorar la reabsorción y generar así una buena integración material-hueso.

Para inducir macroporosidad el albumen ha de estar en forma espumosa, en nuestro caso, el albumen presente en una de las series no está en forma espumosa ya que en el estudio realizado no se pretende evaluar este comportamiento. El objetivo de la inclusión del albumen en la preparación de los cementos es estudiar su comportamiento *in vitro* en cultivo de células osteoblásticas.

La solución de albumen se prepara a partir de disolver clara de huevo deshidratada (Igreca, Francia), como se explica al final del siguiente apartado.

## 2.2 SÍNTESIS Y PREPARACIÓN DEL CEMENTO

### 2.2.1 MOLDE

Las muestras de los cementos tienen forma de disco con un diámetro de 15 milímetros y un espesor de 2,5 milímetros. El primer molde empleado para conseguir estos discos fue de teflón, diseñado especialmente para tal fin en el taller mecánico de la ETSEIB. Los resultados obtenidos con el uso de este tipo de molde no fueron los esperados debido a la dificultad al sacar los discos ya que éstos se fracturaban o se desprendían trozos. La empresa CONIEX, S.A. nos proporcionó un molde de un elastómero de silicona que nos permitió la obtención de los discos de cemento con un buen acabado superficial y fácil manipulación.



## 2.2.2 PREPARACIÓN DE LAS TRES FORMULACIONES DE CEMENTO

### 2.2.2.1 Relación Líquido/Polvo

La relación líquido/polvo es un factor que influye en la plasticidad inicial de la pasta, y por tanto, en el tiempo de fraguado del cemento. Esta relación es el factor dominante que afecta a las características mecánicas del cemento, agregando menos líquido las propiedades mecánicas aumentan, sin embargo, hace que la pasta sea más difícil de inyectar.

La relación líquido/polvo para la síntesis de las tres series fue en un principio de 0.35, pero, debido a la difícil manipulación de la pasta de cemento, se decidió disminuir esta relación a 0.32.

### 2.2.2.2 Preparación de la SERIE 1

Para la obtención de los discos de cemento de esta serie, se parte del  $\alpha$ -TCP al que se le realiza un tratamiento de molienda específico. Al  $\alpha$ -TCP de partida, que se muele a una velocidad de 5 durante 20 minutos, se le introduce en el molino de bolas a una velocidad de 8 (605 r.p.m.) durante 30 minutos con las bolas grandes y otros 30 más con las bolas pequeñas (8:30:30).

Las cantidades de los reactivos empleados son las siguientes:

- 3.0625 gramos de  $\alpha$ -TCP (8:30:30).
- 0.0625 gramos de hidroxapatita precipitada (PHA), que corresponde a un 2% del peso total del cemento.
- 1 mililitro de agua destilada.

La metodología para la preparación de los discos de cemento es la siguiente:

- 1.- En un mezclador se introducen las cantidades exactas citadas anteriormente de  $\alpha$ -TCP e hidroxapatita y se mezclan durante diez minutos aproximadamente.
- 2.- La mezcla se pone en un pequeño mortero y se añade 1 mililitro de agua destilada.
- 3.- Se mezcla bien todo con la ayuda de una pequeña maza de mortero obteniéndose así la pasta del cemento.



- 4.- Con una espátula se rellenan de cemento las cavidades del molde.
- 5.- Esperamos para que la pasta cohesione.
- 6.- Se sumerge el molde en solución Ringer a 37°C durante 24 horas.
- 7.- Con ayuda de unas pinzas se sacan los discos del molde y se dejan sumergidos en solución Ringer a 37°C durante seis días más.

### **2.2.2.3 Preparación de la SERIE 2**

Para la síntesis de la serie 2, al igual que en los discos de la serie 1, se parte del  $\alpha$ -TCP (5:20). Con el fin de obtener un tamaño de partícula menor que el de la serie 1 se realiza un tratamiento de molienda más severo. El  $\alpha$ -TCP de partida, se introduce en el molino de bolas a una velocidad de 9 (650 r.p.m.) durante 180 minutos con las bolas grandes y otros 180 más con las bolas pequeñas (9:180:180).

La metodología que se sigue para la preparación de los discos de cemento de esta serie es idéntica a la de la serie 1.

### **2.2.2.4 Preparación de la SERIE 3**

La única diferencia entre la síntesis de la serie 1 y la de esta serie radica en la presencia de albumen (clara de huevo) en su composición.

El protocolo de molienda realizado para el  $\alpha$ -TCP (5:20) es idéntico que el seguido para la serie 1, es decir, 8:30:30. Las cantidades de los reactivos empleados para la fase sólida son las mismas, mientras que la fase líquida está formada por 0.833 mililitros de agua destilada y 0.2 gramos de solución de albumen.

#### *· Preparación de la solución de albumen*

La proporción a seguir para la preparación de la solución de albumen es de 0.5 gramos de clara de huevo deshidratada disueltos en 3.5 mililitros de agua destilada. Se deja en la nevera durante 24 horas antes de ser utilizado. La preparación de los discos de cemento es análoga a las dos series anteriores.



### 2.2.2.5 Preparación de la solución Ringer

Como hemos visto en el desarrollo explicativo de las síntesis de los cementos, los discos se sumergen durante una semana en una solución a 37 °C. Ésta simula las condiciones fisiológicas de humedad, temperatura y composición química a las que el cemento estará sometido y se conoce como solución Ringer. Este preparado se consigue disolviendo 9.011 g. de cloruro de sodio (Panreac) en agua destilada enrasando en un matraz de un litro, es decir, es una disolución al 0.9% de NaCl.

La estufa Memmert Schutzart DIN 40050-1P20 se usa para mantener las muestras a una temperatura constante de 37 °C.

## 2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DEL CEMENTO

La caracterización de un cemento implica en primer lugar caracterizar los materiales empleados como reactivos, que se emplean en forma de polvo, en segundo lugar determinar las características del proceso de fraguado del cemento, y por último, caracterizar las propiedades del producto sólido resultante de la reacción. Todas las técnicas que a continuación se detallan pueden complementarse con la información del *anexo B*.

### 2.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS REACTIVOS

El polvo de  $\alpha$ -TCP de partida se caracteriza en primer lugar desde un punto de vista químico, mediante difracción de rayos X para determinar las fases cristalinas presentes. La caracterización física se realiza mediante estudios granulométricos para determinar la distribución del tamaño de partícula y por el método de adsorción de nitrógeno se determina la superficie específica de reacción.

#### 2.3.1.1 Difracción de rayos X

La identificación de las fases presentes en la fase sólida del cemento se lleva a cabo mediante estudios de difracción de rayos X en un difractómetro Siemens modelo D-500. Las condiciones de trabajo son de una diferencia de potencial de 40 kV y una corriente de 30 mA, con un rastreo del tipo  $\theta$ -2 $\theta$ , entre 4 y 60 grados de 2 $\theta$ .



Las muestras se analizan en forma de polvo después de haberlas molido según el protocolo 8:30:30 (para las series 1 y 3) y 9:180:180 (para la serie 2).

### 2.3.1.2 Caracterización física

#### A) GRANULOMETRÍA

Se estudia la granulometría del componente mayoritario de la fase sólida que forma el cemento, es decir, del  $\alpha$ -TCP.

Como se ha visto, dos de las tres formulaciones de cementos de fosfato de calcio estudiadas en este trabajo difieren únicamente en su tamaño partícula. La distribución de los tamaños de partícula del polvo del  $\alpha$ -TCP se determina mediante la técnica de difracción láser, en un equipo Microtrac Particle Size Analyzer SRA-150. El rango de tamaños que puede ser detectado por el equipo oscila entre 0.04 y 2000  $\mu\text{m}$ .

Para evitar la aglomeración de las partículas y obtener valores fiables de tamaño de partícula es necesario preparar adecuadamente las muestras. Esta preparación engloba dos pasos: en primer lugar, se dispersan las partículas en un medio líquido en el cual no sean solubles (en nuestro caso etanol). A continuación, para deshacer los aglomerados de partículas se aplican ultrasonidos.

#### B) SUPERFICIE ESPECÍFICA DE REACCIÓN

Un parámetro importante en la caracterización de los reactivos es la superficie específica de reacción que se determina mediante el método de adsorción de nitrógeno (B.E.T. specific surface). Esta técnica se basa en el equilibrio de adsorción dinámica entre las partículas libres de un gas (nitrógeno en nuestro caso) y un substrato que lo adsorbe (el polvo que es objeto de estudio).

Las medidas se realizan por duplicado en un equipo Quantasorb. En general, se considera que el error experimental cometido en esta técnica es del orden del 3%.



## 2.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL CEMENTO

### 2.3.2.1 Proceso de reacción

Para el estudio del proceso de hidratación y fraguado del cemento se determina el tiempo de fraguado.

Hay distintos procedimientos para medir el tiempo de fraguado de un cemento, algunos métodos se basan en ciertas propiedades físicas del cemento, como la evolución de calor, la conductividad eléctrica o la viscosidad. De todas formas, los métodos más utilizados, debido a su simplicidad, se basan en la resistencia que presenta el cemento a la penetración de una aguja. Entre ellos se han de destacar el método de la aguja de Vicat, descrito en la Norma *ASTM C191-92* (Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement by Vicat Needle) y el de las agujas de Gillmore, descrito en la norma *ASTM C266-89* (Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement by Gillmore Neddles).

La norma *ASTM C266-89* opera con dos agujas de Gillmore (ver figura). Una ligera de 113,4 g de peso y 2,13 mm de diámetro y otra, más pesada, de 453,6 g y 1,06 mm de diámetro. El procedimiento se basa en la mezcla de las fases durante un tiempo determinado y se deposita la pasta en un recipiente poco profundo. El tiempo transcurrido desde el inicio de la mezcla hasta que la aguja ligera no deja huella visible sobre la superficie plana de la pasta se conoce como tiempo de fraguado inicial (I). Análogamente, se define el tiempo de fraguado final (F) como el tiempo transcurrido desde que la aguja pesada no deja huella visible sobre la superficie del cemento. Traducido en números, I es el tiempo que ha de pasar hasta que la pasta del cemento es capaz de soportar una presión estática aproximada de 0.3 MPa mientras que F es el tiempo que ha de pasar para soportar una presión estática aproximada de 5 MPa.





**Figura 2.3.-** *Agujas de Gillmore.*

La norma empleada permite distinguir dos períodos dentro del proceso de fraguado del cemento. I indica el final del período en el cual el cemento se puede moldear, que se caracteriza por la pérdida de las propiedades viscoelásticas que permiten el flujo de la pasta, mientras que F marca el límite de tiempo más allá del cual no se puede tocar el cemento sin dañar seriamente la estructura recién formada.

Algunos factores afectan de manera decisiva en el tiempo de fraguado, como la relación líquido/polvo, la temperatura, humedad, por lo que es importante trabajar en condiciones controladas para obtener resultados reproducibles.

*Medio de reacción: Solución Ringer o ambiente húmedo*

Además de la determinación del tiempo de fraguado se realiza un experimento para evaluar si hay diferencias en la reacción del cemento al someter los discos durante una semana en solución Ringer o el mismo tiempo en ambiente húmedo (sin contacto directo con el líquido), a una temperatura de 37 °C.

Se realiza la experiencia con discos de la serie 3 con el objetivo añadido de estudiar la detección del albumen, para ello se caracterizan mediante difracción de rayos X y



espectroscopía de infrarrojo, comparándolos también con la serie 1. Al mismo tiempo de advertir si este componente afecta a la transformación del  $\alpha$ -TCP a hidroxiapatita.

### **2.3.2.2 Difracción de rayos X**

Al igual que los componentes que forman la fase sólida del cemento, una vez se preparan los discos de las tres series, se caracterizan desde el punto de vista químico mediante la técnica de difracción de rayos X un disco de cada una de ellas. Se estudian también dos discos de la serie 3 expuestos a las distintas condiciones del medio de reacción.

### **2.3.2.3 Espectroscopía de infrarrojo**

En este trabajo se emplea un espectrofotómetro de transformada de Fourier, Bomem modelo MB 120.

Para realizar medidas de intensidad IR transmitida en un material en estado sólido es necesario elaborar una suspensión del material en cuestión en un medio transparente apropiado, formando una mezcla de dos fases. En este estudio se emplea como material transparente el Bromuro de Cesio (CsBr). Se preparan discos de CsBr que contienen pequeñas cantidades del polvo problema dispersadas, obteniéndose unos discos translúcidos.

Además de los discos de las tres series, también es necesario preparar un disco patrón que contenga exclusivamente el material empleado como matriz, CsBr. En el espectrómetro se colocan la muestra patrón y la muestra problema y se miden a la vez las intensidades transmitidas, registrándose la diferencia entre ambas.

## **2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE**

Para caracterizar la microestructura de la superficie de los discos de las tres formulaciones de cemento se emplea la microscopía electrónica de barrido y para el estudio de la rugosidad se utilizan tres técnicas distintas debido a las características superficiales de los mismos.



### 2.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Es una técnica muy útil para la observación y caracterización de los materiales, nos da información sobre la microestructura y tiene la posibilidad de realizar análisis químico puntual mediante el espectrómetro de rayos X. Las imágenes tienen una apariencia tridimensional debido a la gran profundidad del foco y a la gran sensibilidad de los electrones secundarios con la topografía del material.

Las observaciones se realizan en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400 equipado con un espectrómetro de energía dispersada de rayos X (Link Pentafet), con capacidad de análisis de elementos ligeros a partir del boro.



**Figura 2.4.-** Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6400.

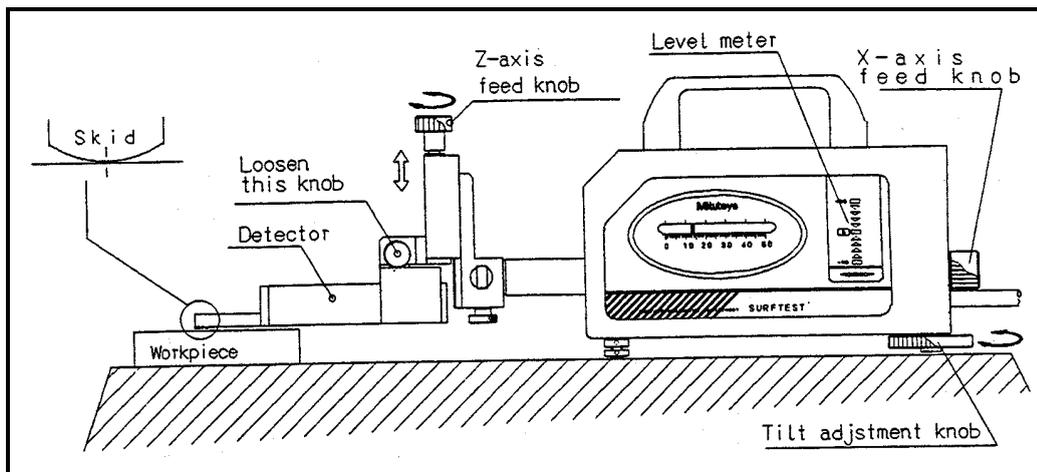
Debido a la baja conductividad eléctrica de las muestras estudiadas se recubren con una fina capa de oro mediante un equipo de Sputtering Balzers, modelo SCD-004, durante 250 segundos y a una diferencia de potencial entre 15 y 20 kV. El metalizado tiene como funciones: hacer conductora la superficie, eliminar la electrificación estática de la superficie, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica. Si una muestra no es conductora al observarse en el microscopio electrónico se carga y no se visualiza correctamente.



### 2.4.2 TÉCNICA DE CONTACTO: RUGOSÍMETRO

El principio de los rugosímetros con palpador es que una punta palpadora (normalmente de diamante) se desplaza sobre la superficie a medir a velocidad constante. Se aplica una carga al palpador que asegura que la punta de éste nunca pierde el contacto con la superficie. Los movimientos verticales del palpador se transforman en una señal eléctrica que se amplifica antes de convertirse en información digital que se visualiza como un perfil lineal o un registro numérico tabulado, con la amplificación de altura relativa a cada distancia a lo largo de la superficie. En nuestro caso se trabaja con un rugosímetro bidimensional de punta palpadora de diamante modelo Surfrest SV 512, Mitutoyo®.

Las propiedades típicas para un aparato de este estilo son: punta palpadora de 90°, radio de la punta entre 2-10 µm, resolución vertical entre 5-10 nm, resolución lateral de 0,5 µm, fuerza de medición sobre 0,1-8 mN, velocidad de medición entre 0,5-1 mm/s, longitud de medición entre 50-100 cm y rango vertical de hasta 8 mm.



**Figura 2.5.-** Esquema del rugosímetro Surfrest SV 512.

Las ventajas de la utilización de este tipo de rugosímetros radican en que tienen un amplio rango de medición, con muchos años de experiencia y con disponibilidad de acceder a normativas.

Las desventajas del método provienen por una parte de la geometría de la punta que puede influenciar en el resultado. La otra problemática radica en que, aunque parece ser que no influye de forma significativa en los resultados, la punta palpadora raya la superficie medida. La deformación plástica sobre la superficie depende de la presión de contacto de la



punta palpadora, del radio del palpador y de las propiedades mecánicas de la superficie del material. Para materiales blandos está recomendado utilizar radios de punta lo más grandes, así como cargas lo más pequeñas que se pueda.

Sobre el perfil de rugosidad obtenido se hacen las determinaciones de los parámetros de rugosidad más característicos, como  $R_a$  y  $R_y$ . (ver anexo, apartado B.4.2)

Para fines industriales existen recomendaciones normativas respecto al número de lecturas necesarias para realizar valoraciones de rugosidad precisas, en 2D (DIN 4775). En investigación no hay normativa al respecto, sin embargo, se pueden encontrar recomendaciones en la literatura. Quizás de todas ellas, la más universalmente aplicable es la que propusieron Bennett y Mattson (1989), sugiriendo que se debían realizar tantas lecturas como fuesen necesarias para conseguir que la desviación estándar de  $R_a$  y  $R_y$  se situase entre 0.1 y 0.2, al promediar los parámetros. Se llevan a cabo ensayos en las tres series para un total de 15 discos.

### 2.4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA INTERFEROMETRICA

La microscopía óptica interferométrica se basa en las interferencias obtenidas a partir de las diferencias de camino óptico entre la luz incidente y la luz reflejada en la superficie de la muestra a diferentes distancias entre el objetivo y la superficie. Las distancias se pueden variar mediante un dispositivo piezoeléctrico o con un dispositivo mecánico, escoger uno u otro dependerá de la precisión y el rango de medida requeridos, siendo el primero más preciso. Esta técnica permite la obtención de una imagen topográfica tridimensional de la superficie de la muestra a observar. También permite obtener valores de rugosidad media, calculadas a partir de la ecuación:

$$rms = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (X_i - X_{medio})^2}$$

Donde  $X_i$  es la distribución de alturas, N es el número total de puntos, X son los puntos experimentales y  $X_{medio}$  es el valor medio de los datos.



El microscopio utilizado, fabricado por Zygo, se encuentra disponible en los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Este puede alcanzar resoluciones laterales de hasta 500nm. La resolución máxima en altura (z) es de 1µm. Es útil para la observación y medida cuantitativa de perfiles de muestras relativamente grandes que quedan fuera del rango del AFM pero que son posibles de medir mediante microscopía óptica, dado que este tipo de microscopía incrementa la profundidad de campo que da el microscopio óptico. Su software, además, permite obtener perfiles de las diferentes secciones de la muestra observada.

Se estudia la rugosidad de tres discos de cada serie realizando varias lecturas para cada uno. Los parámetros estudiados para caracterizar la superficie son  $R_a$  y la distancia pico-valle (P-V), para poder ser comparados con los obtenidos con el rugosímetro, y  $R_{ms}$ .

#### 2.4.4 MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM)

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es, junto con el microscopio de efecto túnel, el sistema de análisis superficial de más resolución (superior a 1 nm). Esta técnica usa electrones en lugar de palpadores o luz y se basa en la medida de pequeñas fuerzas de interacción atómica atractivas y repulsivas, típicamente de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  N, entre una punta y la superficie de la muestra. El valor de la fuerza de interacción depende de la distancia entre la punta (normalmente de silicio o de nitruro de silicio) y la superficie, lo que permite obtener, tanto en materiales conductores como en aislantes, mapas de la topografía superficial con resolución prácticamente atómica.

Estas fuerzas de interacción entre la punta y la muestra pueden ser de los siguientes tipos:

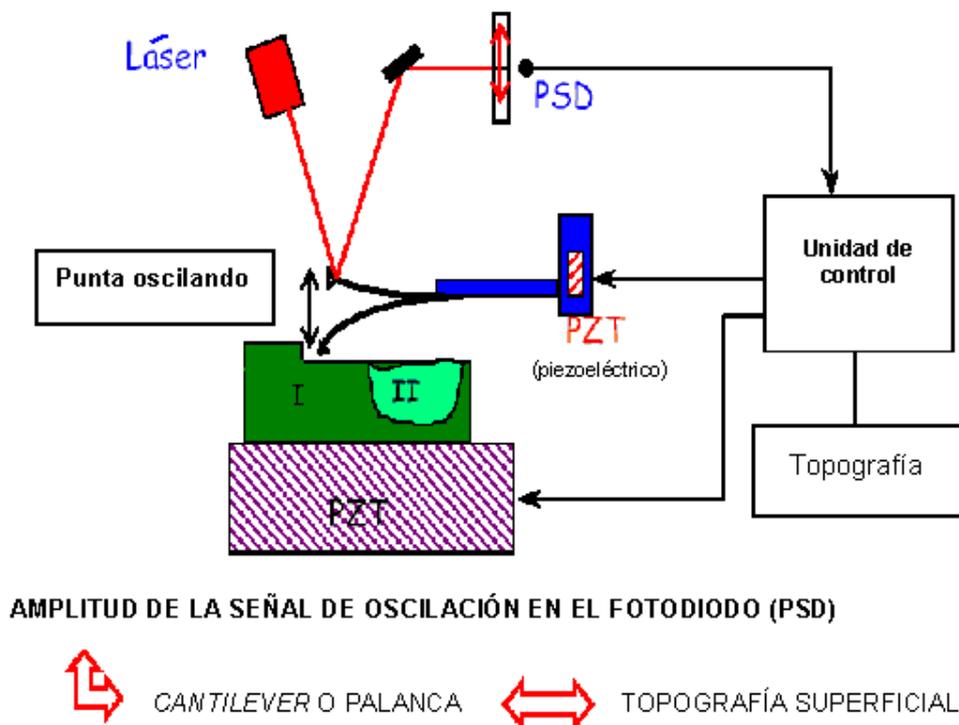
- Fuerzas repulsivas de corto alcance (distancias  $\approx 0,1$  nm), son consecuencia de la interacción entre las nubes electrónicas de los átomos de la punta y la muestra.
- Fuerzas de largo alcance ( $\approx 1$ nm) son debidas a fuerzas de Van der Waals (atractivas) o a fuerzas eléctricas y magnéticas (atractivas o repulsivas).

Dado que estas fuerzas no dependen de la naturaleza de la muestra, la técnica es aplicable a prácticamente todos los materiales sin necesidad de preparación previa. Por otro lado, no permite determinar cualitativamente la muestra analizada.



Los microscopios de fuerza atómica trabajan en dos modos: modo de contacto y modo de no contacto. Mientras que el modo de *contacto* trabaja con la punta situada a 0,1 – 0,3 nm de la superficie de la muestra y se basa en las fuerzas de repulsión, el modo de *no contacto* trabaja a distancias entre 1 y 2 nm, donde predominan las fuerzas de atracción. Es la variación de estas fuerzas, como consecuencia de la diferente topografía de la muestra, la que permite obtener la imagen.

Los microscopios de fuerza atómica comerciales utilizan habitualmente el contacto intermitente (*tapping mode*, figura 2.6), en el cual la palanca y la punta se hacen oscilar con una amplitud de unos 100 nm provocando un contacto intermitente entre la muestra y la punta. Esta variante del método pretende aprovechar la mejor resolución que presenta trabajar en modo contacto, evitando las fuerzas de fricción que aparecen entre la punta y la muestra. Las lecturas para las tres formulaciones se realizan en un microscopio Nanoscope 2I fabricado por Digital Instruments en los “Serveis Científico-tècnics” de la Universitat de Barcelona.



**Figura 2.6.-** Esquema de un microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo *tapping*.

Se ensayan dos discos de cemento de cada serie que, para poder ser comparados, se trabajan en las mismas condiciones siendo las áreas de barrido de 5 y 10  $\mu\text{m}^2$ . La velocidad de barrido es de 1600 Hz y la escala Z (altura) se fija en 500 nm.



## 2.5 ESTUDIO *IN VITRO*

Para evaluar la citotoxicidad y biocompatibilidad de los cementos se realiza un estudio mediante técnicas *in vitro* sobre células osteoblásticas humanas que provienen de una línea celular inmortal modificada genéticamente (MG.63-4). El empleo de este tipo de técnica frente a un estudio *in vivo* tiene como ventajas principales el hecho de que permite un control preciso del medio ambiente, homogeneidad de la muestra, es más económico y por motivaciones éticas.

### 2.5.1 INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Cuando nos referimos a una línea celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que:

- se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.
- se han perdido las interacciones entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular.
- carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la homeostasis *in vivo*, especialmente los sistemas nervioso y endocrino.
- ha sido modificada para convertirse en inmortal.

Cuando se establece el cultivo, las células se desdiferencian, y entre otras cosas se hacen móviles e inician su proliferación. Esta desdiferenciación puede ser revertida por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, confluencia, inductores químicos pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación *in vivo*.

Por todo lo anterior hemos de ser precavidos en cuanto a la validez de los resultados obtenidos *in vitro* respecto a lo que pueda observarse *in vivo*. Sin embargo actualmente se están realizando gran cantidad de estudios de validación de modelos *in vitro* dentro del desarrollo de los métodos alternativos a la experimentación animal, por ejemplo por ECVAM



('European Center for Validation of Alternative Methods'), ALTWEB (Colección de recursos para el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal), Invitox (Colección de protocolos *in vitro*), Invitroderm (Alternativas a los ensayos de irritación dérmica en animales), etc.

## 2.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio *in vitro* se lleva a cabo sobre los discos de las tres formulaciones de cemento (serie 1, 2 y 3). Para realizar este estudio funcional *in vitro* de células osteoblásticas sobre fosfato de calcio se realizan ensayos de adhesión, de proliferación y de diferenciación. Como complemento del estudio se realizan microfotografías mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de barrido ambiental.

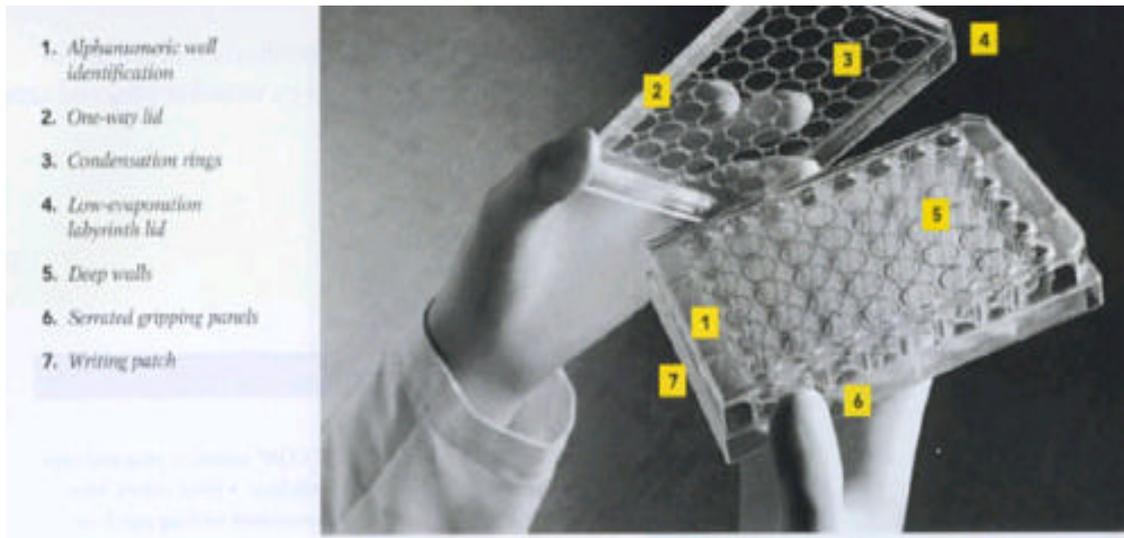
### 2.5.2.1 Materiales

Todos los discos de cemento que se han utilizado en el estudio *in vitro* fueron esterilizados con óxido de etileno en la empresa Klockner Implants, S.A.

Todo el trabajo se realiza en una cabina de flujo laminar. Su función es la de mantener un ambiente estéril, un área libre de partículas, especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras,...) que puedan acceder al cultivo. Esto se consigue mediante un dispositivo mecánico que fuerza el paso del aire a través de un filtro de gran superficie (filtro HEPA). Las cabinas de flujo laminar se diseñan con los propósitos de protección personal, del producto y medioambiental.

El material más utilizado como sustrato es el plástico desechable, en forma de diferentes tipos de recipientes. Los utilizados son: las placas de Petri (ventiladas), las multiplacas (son una variante de las placas de Petri, de varios pocillos, desde 6 a 96 pocillos) y frascos de Roux (botellas ventiladas o no).





**Figura 2.7.-** Multiplaca de plástico desechable empleada para el estudio *in vitro*.

La necesidad de asepsia para el cultivo se extiende no sólo al medio en que se realiza el trabajo sino muy especialmente a los recipientes en que se realiza el cultivo, a los medios líquidos o sólidos, y a los instrumentos que puedan entrar en contacto con éste en algún momento de su manipulación (pipetas, puntas de pipeta automática, pinzas,...). Para esterilizar todo este material se emplean una serie de métodos: irradiación con radiación gamma o rayos X, esterilización por gas, autoclavado, filtración,... En el laboratorio general de cultivos se dispone de: equipo de filtración y autoclave. La esterilización por gas, y la irradiación son técnicas propias de grandes instalaciones (hospitalarias o industriales).

El control morfológico del cultivo se realiza mediante el uso de un microscopio. El hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor hace que un microscopio convencional no sea adecuado (por su pequeña distancia frontal), por lo que se han desarrollado microscopios en los cuales la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional.

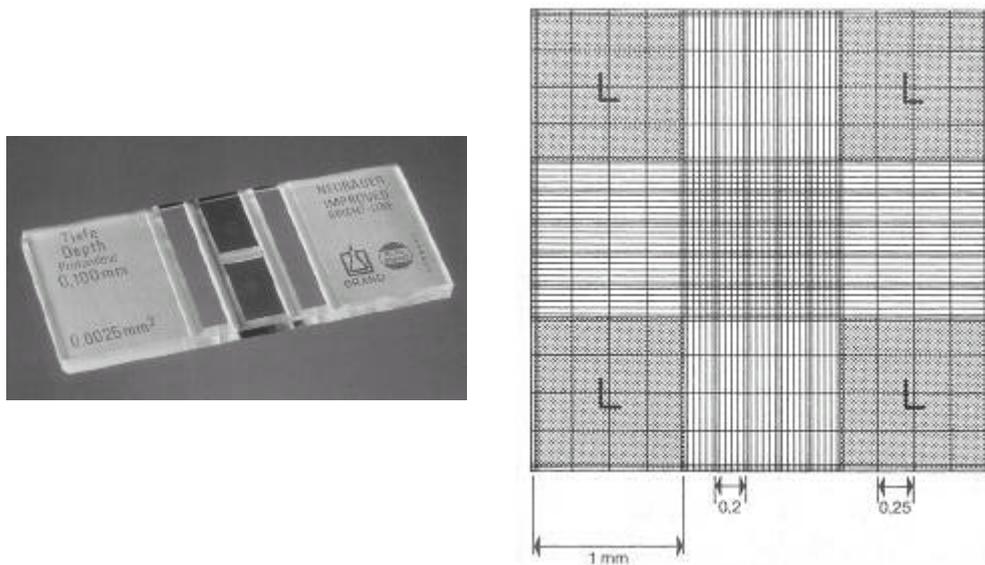
### 2.5.2.2 Preparación del estudio

Como se mencionó anteriormente las células provienen de una línea celular inmortal conocida como MG-63.4 suministrada por ATCC (American Type Culture Collection), el número 4 hace referencia al número de pases realizados. Estas células transformadas que provienen de un tumor de osteosarcoma de un individuo joven se descongelan antes de iniciar su manipulación.



En primer lugar es necesario definir un volumen que contenga un número de células determinado, en nuestro caso 20000, para ello el protocolo seguido es el siguiente: una vez descongeladas las células se lava dos veces con 10  $\mu$ l de PBS. Desechamos el PBS y se añaden 10  $\mu$ l de tripsina, se deja actuar durante 5 minutos en la incubadora. Se adicionan 10  $\mu$ l más del medio preparado (DMEM+10% FCS). Los 20  $\mu$ l se introducen en una centrifugadora durante 5 minutos a 1000 r.p.m. A continuación se separan las células del medio por decantación y se añaden 20  $\mu$ l de DMEM+10% FCS, con la ayuda de un pipeteador automático se resuspenden las células para evitar la formación de conglomerados celulares y promover una buena distribución de las células en el medio.

El recuento de células se lleva a cabo en el microscopio empleando un dispositivo graduado cuyo volumen y área es conocido, llamado cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen.



**Figura 2.8.-** Cámara de Neubauer para el recuento celular.

Como se observa en la figura, la cámara es un cuadrado de 3 x 3 mm con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada "L" corresponde a 1 mm cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 mm cúbico, es decir, 0.1 microlitro.



A continuación, se distribuyen todos los discos en varias multiplacas de 24 pocillos con tres réplicas para cada ensayo a realizar. Los ensayos realizados para los controles y los discos de cada serie son:

- Ensayo de adhesión, se realiza a 6, 12 y 24 horas del inicio del estudio.
- Ensayo de proliferación, se lleva a cabo a los 3, 7 y 14 días.
- Ensayo de diferenciación, se inicia a los 14 días.

Para otorgarle validez a los hallazgos realizados se incluye en cada experimento, un control (sobre plástico). La presencia de los controles es necesaria para una evaluación cualitativa y cuantitativa del experimento.

Una vez distribuidos e identificados los discos en los pocillos se añaden 500 microlitros de medio en cada pocillo. El medio utilizado es Medio MEM modificado por Dulbeco (DMEM) sin rojo fenol. El Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) es el medio de uso más corriente, se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero. La preparación del medio consiste en la adición al DMEM de piruvato de sodio, L-glutamina y penicilina en las mismas proporciones, 1%. Además se añadió un 10% de FCS (suero de ternera fetal).

Las placas con los discos de las tres series se colocan en un incubador de células a 37 °C, (asegura la invariabilidad de temperatura durante prolongados periodos de tiempo), a fin de mantener las células en condiciones en las que las tasas de crecimiento sean constantes. Se colocan los contenedores de células sobre las estanterías de la incubadora. Dejamos las placas dentro durante 24 horas, transcurrido este tiempo, cambiamos el medio (DMEM+10% FCS) de los pocillos y se añaden 20.000 células por pocillo.

### **2.5.2.3 Ensayo de adhesión**

A lo largo de todo el estudio el medio de cultivo se cambió cada dos o tres días con el fin de aportar a las células los nutrientes necesarios para su crecimiento. Una vez distribuidos todos los discos y los controles en los pocillos de las multiplacas se bañan en el medio y se añaden 20000 células por pocillo, en ese momento empieza a contar el tiempo para realizar los ensayos en los que se basa el estudio *in vitro*.



El primer ensayo a realizar evalúa la afinidad de adhesión que presentan las células por las distintas formulaciones de cemento de fosfato de calcio, en el caso de los controles la adhesión se produce sobre el plástico. De este modo se realizan ensayos a 6, 12 y 24 horas del inicio del estudio. Para cada disco y los controles se sigue el mismo protocolo que se detalla a continuación.

En primer lugar se desecha el medio de cultivo y se lava dos veces con 500 microlitros de PBS, a continuación se adicionan 500  $\mu$ l de tripsina y se deja actuar durante cinco minutos en la incubadora a 37 °C; se recogen 20  $\mu$ l de suspensión de células en una micropipeta que se transfiere a la cámara de Neubauer penetrando por acción capilar. Usando el objetivo de 10 aumentos del microscopio se enfoca la cuadrícula de la cámara y contamos las células. A partir de aquí podemos saber la concentración celular dividiendo el número de células obtenido entre el volumen (10<sup>4</sup> ml), lo anterior multiplicado por el factor de dilución y el volumen de suspensión celular nos da el número de células total. Es decir:

$$n^{\circ} \text{ células} = n^{\circ} \text{ células (4 zonas)} / 4 * \text{volumen zona de recuento} * \text{volumen tripsina}$$

La tripsinización se realiza dos veces para asegurar que se recogen todas las células que estaban adheridas al material, se suman los dos resultados para cada pocillo. El portamuestras de la cámara de Neubauer se limpia después con etanol.

A lo largo del ensayo de adhesión se sacan discos (a 6, 12 y 24 horas) para ser estudiados mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de barrido ambiental.

#### **2.5.2.4 Ensayo de proliferación**

Para evaluar la biocompatibilidad del material se realizan ensayos de proliferación celular a distintos tiempos: 3, 7 y 14 días. La técnica se basa, al igual que en los ensayos de adhesión, en el conteo de células mediante la cámara de Neubauer. También se obtuvieron micrográficas mediante las dos técnicas de microscopía.



### **2.5.2.5 Ensayos de diferenciación**

Dos de las multiplacas preparadas al inicio del estudio se hicieron para el estudio de diferenciación. A estas placas durante los 14 días de incubación únicamente se les cambió el medio cada dos o tres días. El ensayo de diferenciación se inicia a los 14 días sincronizando las células para detener su crecimiento y poner fin a la proliferación, el objetivo es la formación de matriz extracelular.

Para ello se retira el medio de cultivo de todos los pocillos y se lavan con 500µl de PBS dos veces. Seguidamente se añade medio de diferenciación 0.1% BSA en ausencia de suero y se introduce la placa en la incubadora a 37 °C durante 24 horas.

Al cumplir este tiempo se cambia el medio de diferenciación 0.1% BSA y se añaden 5 µl de dexametasona  $10^{-8}$ M (un tipo de cortisona que estimula la diferenciación), además se añaden 5 µl de vitamina C. Estas adiciones de dexametasona y vitamina C se realizan cada 24 horas hasta alcanzar las 72 horas. Al cumplirse se opera como se detalla a continuación.

En primer lugar se recogen los sobrenadantes de cada pocillo, se guardan por separado en tubos identificados para cada serie y control y se congelan a la espera de ser empleados para determinar la secreción de osteocalcina.

Seguidamente se lavan dos veces todos los pocillos con 500 µl de PBS y se tripsiniza también por duplicado recogiendo la tripsina en tubos identificados (un tubo para cada pocillo) que se centrifugan durante cinco minutos a 1000 r.p.m. A continuación, se añaden 100 µl del reactivo de extracción de proteína M-PER<sup>®</sup> de la casa Pierce, es un detergente que rompe la membrana celular. Se agita vigorosamente y se centrifuga durante 15 minutos a 14000 r.p.m. El sobrenadante se guarda en tubos que se congelan para determinar posteriormente la actividad de fosfatasa alcalina.

#### *a) Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina*

La actividad de la fosfatasa alcalina se mide mediante un autoanalizador discreto Olympus AU-510, que utiliza como sustrato el 4-nitrofenilfosfato y el tampón dietanolamina HCl Ph=9,8. El aparato mide el cambio de absorbancia por unidad de tiempo. Los resultados se expresan como IU/L.



La técnica se basa en la capacidad de la fosfatasa alcalina en convertir el sustrato p-nitrofenilfosfato en p-nitrofenol, un compuesto muy cromógeno medible a una longitud de onda de 405 nm producido por el p-nitrofenol resultante de la actividad del enzima. A continuación se detalla el método experimental seguido.

#### *Preparación de la recta patrón*

Para la preparación de la recta patrón se utiliza la solución de p-nitrofenol 10  $\mu\text{mol/ml}$  (Sigma), se diluye en proporción 1:10 en tampón dietanolamina 1M pH= 9.8, siendo la concentración de p-nitrofenol de 0.001M. A partir de la solución diluida se preparan las siguientes concentraciones:

**Tabla 2.2.-** Concentraciones realizadas para la preparación de la recta patrón.

Concentración	p-nitrofenol 0.001M	Tampón dietanolamina
$2.0 * 10^{-5}\text{M}$	20 $\mu\text{l}$	980 $\mu\text{l}$
$4.0 * 10^{-5}\text{M}$	40 $\mu\text{l}$	960 $\mu\text{l}$
$8.0 * 10^{-5}\text{M}$	80 $\mu\text{l}$	920 $\mu\text{l}$
$1.2 * 10^{-4}\text{M}$	120 $\mu\text{l}$	880 $\mu\text{l}$
$1.6 * 10^{-4}\text{M}$	160 $\mu\text{l}$	840 $\mu\text{l}$
$2.0 * 10^{-4}\text{M}$	200 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$
$2.4 * 10^{-4}\text{M}$	240 $\mu\text{l}$	760 $\mu\text{l}$

El protocolo seguido para la realización de la curva patrón es el siguiente:

- 1.- Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de cada concentración en una placa de 96 pocillos
- 2.- Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de agua destilada
- 3.- Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de tampón dietanolamina
- 4.- Se mantiene a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante la reacción de la muestra
- 5.- Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 3N (12 g. NaOH en 100 ml. de agua destilada)
- 6.- Se lee la absorbancia a 405 nm y, a partir de los resultados, se construye la recta absorbancia respecto a concentración.



### *Análisis de las muestras*

Para el análisis de las muestras se sigue el siguiente protocolo:

- 1.- Se añaden 50 µl de la muestra en una paca de 96 pocillos (cada muestra se testa por duplicado)
- 2.- Se añade 50 µl de tampón dietanolamina
- 3.- Se añaden 100 µl de reactivo (p-nitrofenilfosfato en tampón dietanolamina 1M pH=9,8)
- 4.- Se deja reaccionar a 37 °C durante 30 minutos
- 5.- Se detiene la reacción con 50 µl de NaOH 3N
- 6.- Se lee la absorbancia a 405 nm
- 7- Utilizando la recta patrón, y teniendo en cuenta el tiempo y la dilución, se calcula la actividad en UI/L (1 UI=  $1.67 \cdot 10^{-8}$  moles/segundo)

### *b) Determinación de la secreción de osteocalcina*

Para la determinar la secreción de la osteocalcina se emplea el kit “Metra Osteocalcin Test”. La osteocalcina resulta útil como indicador bioquímico de la renovación de las células óseas.

### *Procedimiento experimental*

Este procedimiento utiliza unas tiras de pocillos recubiertas con osteocalcina purificada de hueso bovino, un anticuerpo anti-osteocalcina de ratón, un conjugado de IgG-fosfatasa alcalina anti-ratón y un substrato de fosfato de p-nitrofenil para cuantificar la osteocalcina.

El procedimiento experimental se inicia distribuyendo en las tiras de pocillos 25 µl de los patrones de osteocalcina que proporciona el kit (osteocalcina liofilizada purificada de hueso humano, con sales amortiguadoras y estabilizantes). Estos patrones tienen distinta concentración, se presentan en ampollas identificadas, así tenemos: A=0, B=2, C=4, D=8, E=16, F=32 ng/ml. También hay dos controles: L (bajo) y H (alto). En otros pocillos se introducen también 25 µl de los controles de cemento y de las tres series. Todo lo anterior se realiza por triplicado.



A continuación se añaden 125  $\mu$ l de anti-osteocalcina a cada pocillo y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente. Mientras se prepara el conjugado enzimático disolviendo en 10 ml de tampón de lavado (detergente no iónico en una solución tamponada con azida sódica) el anticuerpo IgC anti-ratón de cabra liofilizado.

Una vez transcurrido este tiempo se lava en tres ocasiones con la solución de detergente y se añaden en cada pocillo 150  $\mu$ l de conjugado enzimático reconstituido. Se deja incubando durante una hora a temperatura ambiente. Durante este tiempo se prepara la solución de sustrato de trabajo disolviendo una pastilla de sustrato (fosfato de p-nitrofenil) en un tampón.

Al cabo de una hora se repite la misma operación de lavado que se hizo anteriormente y se añaden en cada pocillo 150  $\mu$ l de la solución de sustrato preparada. Se deja incubar 40 minutos a temperatura ambiente y se añaden 50  $\mu$ l de solución de parada (NaOH 1N) a cada pocillo para detener la reacción.

Se realizan las lecturas de densidad óptica a 405 nanómetros, éstas servirán para determinar la concentración de las muestras y los controles a partir de la curva estándar.

### **2.5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS DISCOS**

#### **2.5.3.1 Microscopía electrónica de barrido ambiental**

El microscopio electrónico de barrido ambiental tiene capacidad para análisis de muestras no conductoras que incluyen, entre otras: cerámicos, plásticos, material biológico, fibras y especímenes con desprendimientos de gases, sin necesidad de preparación previa como en los microscopios de barrido convencionales de alto vacío.

El microscopio Electroscan modelo 2020 con portamuestras termoeléctrico de efecto Peltier se emplea para obtener fotografías mediante microscopía electrónica ambiental de barrido.





**Figura 2.9.-** Microscópio Electroscan2020.

Se preparan discos adicionales destinados a las sesiones de microscopía que siguieron el siguiente tratamiento: en primer lugar se retira el medio que baña los discos y éstos se trasladan a una nueva placa, se lavan con PBS dos veces y se añaden 500 microlitros de glutaraldehído (fijador celular).

### **2.5.3.2 Microscopía electrónica de barrido**

Para realizar las micrografías mediante microscopía electrónica de barrido los discos siguieron el siguiente tratamiento: en primer lugar, en el Hospital Clínic de Barcelona se fijaron las células a la superficie del disco con glutaraldehído y se les hizo una deshidratación con distintos baños de alcohol. Seguidamente, en los “Serveis científico-tècnics” se llevaron al punto crítico mediante la aplicación de una elevada presión de CO<sub>2</sub>. Finalmente se recubren con oro mediante sputtering.

## **2.6 ESTUDIO ESTADÍSTICO**

El estudio estadístico que se realiza tiene como objetivo verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las series 1 y 2 y entre las series 1 y 3 en lo que se refiere a la rugosidad superficial y al estudio *in vitro* realizado.



Todos los datos estadísticos incluidos en los test de comparación de medidas por la aplicación t-student y de comparación múltiple de Turkey (tabla Anova), se han obtenido con el software "Minitab Release 11<sup>®</sup> (Minitab Inc., U.S.A)"

El resultado del estudio es el p-valor, que se define como la probabilidad de que la diferencia de las medias calculadas no es causa de la dispersión de los resultados y determina la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las series comparadas, siempre que  $P < 0.05$ .





## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS TRES FORMULACIONES

#### 3.1.1 CARACTERIZACIÓN DEL POLVO DEL CEMENTO

El fosfato tricálcico, componente principal de la fase sólida del cemento, se obtiene después de una sinterización a alta temperatura. Se caracteriza mediante rayos X y se estudia la distribución de tamaños de partícula del polvo mediante la técnica de difracción láser. Los métodos experimentales utilizados en cada caso se describen en detalle en el capítulo anterior.

##### 3.1.1.1 Difracción de rayos X

En la figura 3.1 se observa el difractograma correspondiente al polvo de  $\alpha$ -TCP.

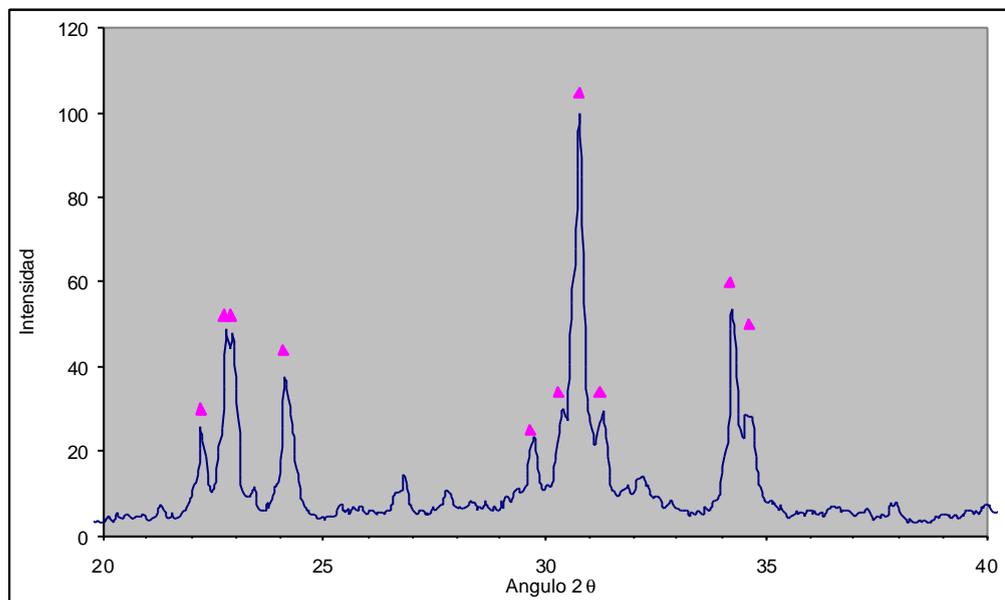


Figura 3.1.- Difractograma de rayos X del  $\alpha$ -TCP.

Comparando los valores de los picos correspondientes a las reflexiones de los planos cristalográficos de la fase  $\alpha$  (ficha cristalográfica JCPDS 29-359) con los obtenidos en el difractograma de la figura observamos que el polvo formado por  $\alpha$ -TCP es



prácticamente puro. Esto se consigue al hacer el temple en aire al producto extraído del horno, de forma que se evita la transformación a  $\beta$ -TCP (hexagonal) y se conserva la fase  $\alpha$  metaestable (monoclínica). La fase  $\alpha$  es más soluble en agua que la  $\beta$ , es por ello que precipita.

La preparación del  $\alpha$ -TCP (apartado 2.1.1.1) se realiza en varias ocasiones para obtener una cantidad de muestra que nos permita la síntesis de todas las series de los cementos. Con el objetivo de verificar que el producto obtenido en todos los casos es  $\alpha$ -TCP se caracterizan todas las remesas mediante rayos X.

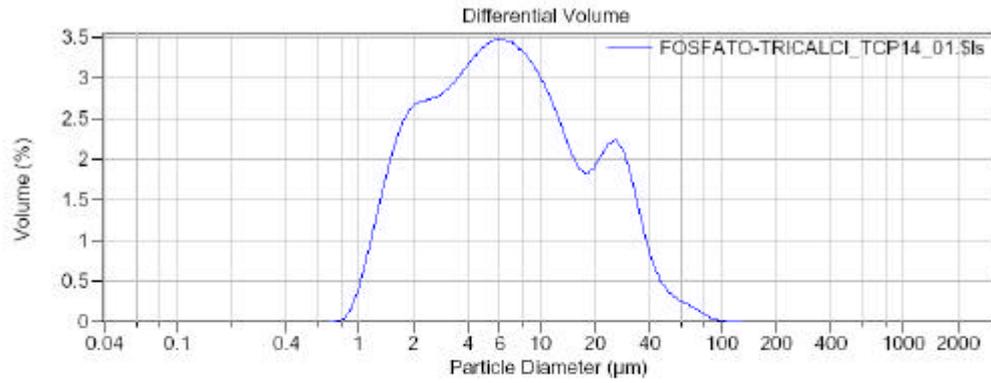
### **3.1.1.2 Distribución del tamaño de partícula del $\alpha$ -TCP**

Se emplea la técnica de difracción láser para evaluar la diferencia de la distribución del tamaño de partícula entre el  $\alpha$ -TCP empleado en la serie 1 y 3, molido según el protocolo 8:30:30, y el  $\alpha$ -TCP de la serie 2, molido según el protocolo 9:180:180.

Para modificar el tamaño de partícula resultante se varían los tiempos y las velocidades de molido. Para obtener resultados reproducibles se mantiene constante la masa de polvo molido en cada remesa.

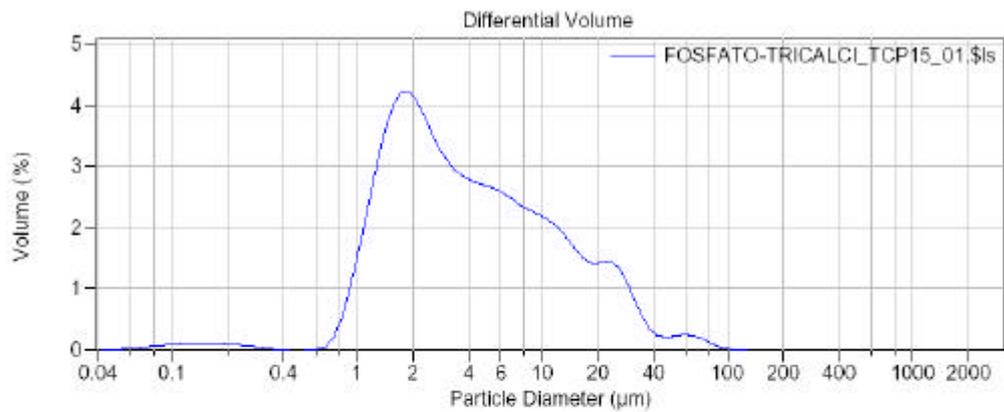
En las figuras 3.2 y 3.3 se representan el % de volumen en función del diámetro de partícula (en micrómetros) del  $\alpha$ -TCP (8:30:30) y del  $\alpha$ -TCP (9:180:180) respectivamente.





Volume Statistics (Arithmetic)		FOSFATO-TRICALCI_TCP14_01.\$ls	
Calculations from 0.0400 µm to 2000 µm			
Volume:	100%	S.D.:	11.20 µm
Mean:	10.43 µm	C.V.:	107%
Median:	6.211 µm	Skewness:	2.263 Right skewed
D(3,2):	4.263 µm	Kurtosis:	6.833 Leptokurtic
Mode:	5.878 µm		
d10:	1.802 µm		
d50:	6.211 µm		
d90:	26.23 µm		

Figura 3.2.- Distribución del tamaño de partícula del  $\alpha$ -TCP (8:30:30).



Volume Statistics (Arithmetic)		FOSFATO-TRICALCI_TCP15_01.\$ls	
Calculations from 0.0400 µm to 2000 µm			
Volume:	100%	S.D.:	10.00 µm
Mean:	7.494 µm	C.V.:	133%
Median:	3.617 µm	Skewness:	3.339 Right skewed
D(3,2):	2.280 µm	Kurtosis:	15.41 Leptokurtic
Mode:	1.919 µm		
d10:	1.296 µm		
d50:	3.617 µm		
d90:	18.96 µm		

Figura 3.3.- Distribución del tamaño de partícula del  $\alpha$ -TCP (9:180:180).



Los resultados obtenidos sobre el 100% del volumen de polvo analizado para cada caso nos muestran, como era de esperar, que las dimensiones de las partículas en el caso del  $\alpha$ -TCP sometido a un tratamiento de molienda de 8:30:30 son mayores que las del  $\alpha$ -TCP 9:180:180.

Los cálculos se llevan a cabo en un rango de diámetro de partícula comprendido entre los 0.04  $\mu\text{m}$  y los 2000  $\mu\text{m}$ , los resultados más representativos del análisis se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 3.1.- Tamaño de partícula del  $\alpha$ -TCP molido en distintas condiciones.**

$\alpha$ -TCP	$d_{10}$ (mm)	$d_{50}$ (mm)	$d_{90}$ (mm)	$M_v$ (mm)	$M_n$ (mm)
<b>8:30:30</b>	1.802	6.211	26.23	10.43	1.417
<b>9:180:180</b>	1.296	3.617	18.96	7.49	1.312

En el caso del  $\alpha$ -TCP (8:30:30) tenemos una distribución en el rango comprendido entre 0.6  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , el valor promedio del tamaño de partícula es de 10.43  $\mu\text{m}$  y la mediana es de 6.211  $\mu\text{m}$ . En el segundo caso, del  $\alpha$ -TCP (9:180:180), la distribución del rango es más amplia y está comprendido entre 0.04  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , el valor promedio del tamaño de partícula es menor que en el caso anterior, 7.494  $\mu\text{m}$  y la mediana es casi la mitad, 3.617  $\mu\text{m}$ .

Todos los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado ya que el  $\alpha$ -TCP molido con un tratamiento más severo, tanto de velocidad como de tiempo, tiene una distribución del tamaño de partícula menor que el  $\alpha$ -TCP molido con el protocolo 8:30:30.

### 3.1.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL CEMENTO

#### 3.1.2.1 Proceso de fraguado del cemento

Para la caracterización del proceso de reacción se estudia el tiempo de fraguado de las tres formulaciones de cemento, se justifican los tiempos medidos en relación con las diferencias existentes entre las series.



El fraguado del cemento es resultado de un proceso de disolución de los reactivos y precipitación de una nueva fase, que tiene lugar a temperatura ambiente o corporal. La transformación comienza en la superficie de las partículas, siendo controlada por la intercara sólido-líquido en las etapas iniciales. La precipitación provoca la formación de unos cristales, que producen un endurecimiento (fraguado), y que se entrelazan entre sí dando lugar a un cuerpo sólido. En la mayoría de los cementos desarrollados en los últimos años, el producto de la reacción es una hidroxiapatita deficiente en calcio muy similar a la biológica.

En la siguiente tabla se muestran el tiempo de fraguado inicial (I) y el tiempo de fraguado final (F) para las tres formulaciones estudiadas con distinta relación líquido/polvo:

**Tabla 3.2.-** *Tiempos de fraguado inicial y final de las tres series.*

<b>Relación L/P</b>	<b>Tiempo de fraguado inicial (min)</b>		<b>Tiempo de fraguado final (min)</b>	
	<b>0.35</b>	<b>0.32</b>	<b>0.35</b>	<b>0.32</b>
<b>Serie 1</b>	31	20	65	54
<b>Serie 2</b>	27	15	46	42
<b>Serie 3</b>	30	18	55	48

Si comparamos los resultados obtenidos en función de la relación líquido/polvo empleada vemos que, como es lógico, los tiempos son menores para la relación L/P de 0.32 ya que al aumentar esta relación hay más proporción de fase líquida y la pasta tarda más en fraguar. Para la discusión de los tiempos medidos nos centramos en la relación de 0.32 que es la que finalmente se emplea.

Como se observa los tiempos de fraguado inicial son similares en las tres series, siendo la serie 2 la que tiene el menor, el molido más severo aplicado al polvo inicial hace disminuir el tiempo de fraguado. Para el tiempo final de fraguado la diferencia entre los tiempos aumenta, siendo de 12 minutos entre la serie 1 y 2.

Es difícil determinar el porqué de estas diferencias en los tiempos de fraguado ya que son varios los mecanismos involucrados en el fraguado del cemento y están interrelacionados.

Si comparamos los tiempos de la serie 2 con los de la serie 1, el menor tamaño de partícula del polvo hace que la microestructura final del cemento cambie, así, en el cemento



más fino se disuelve más fácilmente el  $\alpha$ -TCP y se llega a una sobresaturación más elevada favoreciéndose la nucleación de la hidroxiapatita, disminuyéndose así el tiempo de fraguado. Un tamaño de partícula menor implica una mayor superficie de específica de reacción, lo que facilita el contacto entre el agua y la superficie del polvo, consiguiéndose una hidrólisis más rápida en la fase inicial.

Con la misma relación líquido/polvo, la pequeña diferencia del tiempo final de fraguado entre las series 1 y 3 podría deberse a la fase líquida ya que es la única diferencia entre las dos series. Para la serie 1 la fase líquida es agua destilada, mientras que en la serie 3 se compone, además de agua destilada, de solución de albumen (apartado 2.2.2.4), que le da una consistencia más viscosa. El uso de esta solución de albumen parece tener un efecto de aceleración en la reacción, disminuyéndose ligeramente el tiempo de fraguado final.

### 3.1.2.2 Superficie específica del cemento fraguado

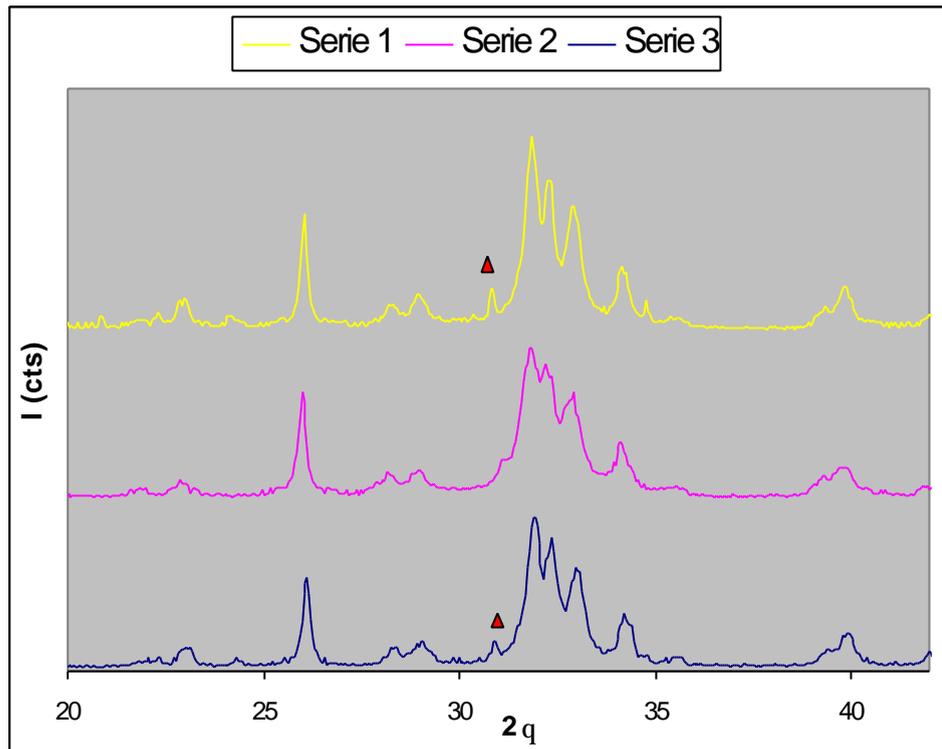
El valor obtenido para la superficie específica del cemento fraguado obtenido a partir del  $\alpha$ -TCP molido según el protocolo 8:30:30 es de  $(15.96 \pm 0.03441) \text{ m}^2/\text{g}$ . En el caso del cemento de la serie 2 en el que el  $\alpha$ -TCP se muele según un protocolo más severo, 9:180:180, la superficie específica del cemento fraguado es de  $(30.39 \pm 0.05321) \text{ m}^2/\text{g}$ .

Como era de esperar, el cemento de la serie 2 tiene una superficie específica de reacción mayor (casi el doble) que el cemento compuesto por un  $\alpha$ -TCP menos fino. Esto provoca una mayor sobresaturación que induce a un menor tamaño de los cristales, como se puede observar en las micrografías realizadas mediante microscopía electrónica de barrido (apartado 3.2.1).

### 3.1.2.3 Difracción de rayos X

En la figura 3.4 se muestran los difractogramas de las tres formulaciones del cemento después de 7 días de reacción en solución Ringer a 37°C.





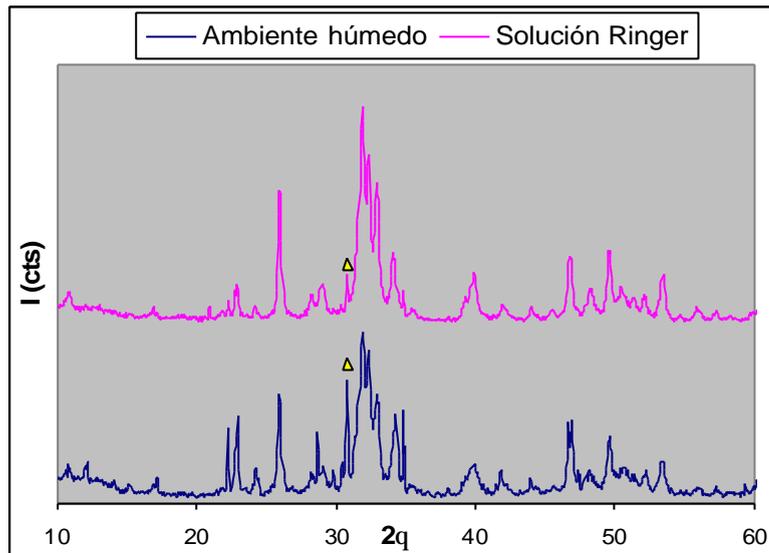
**Figura 3.4.-** Difractogramas de rayos X de los cementos de las tres series después de una semana sumergidos en solución Ringer a 37 °C.

Comparando los tres difractogramas las diferencias más destacables se producen entre la serie 2 y las otras dos. Se aprecia un ensanchamiento de los picos detectados para la dicha serie, este hecho es una manifestación de la mayor conversión de  $\alpha$ -TCP a hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), mientras que en el caso de las series 1 y 3 aun quedan trazas de  $\alpha$ -TCP sin reaccionar (ver figura).

Comparando la serie 1 y la 3 se observa que la conversión de  $\alpha$ -TCP a CDHA no se ve afectada por la adición de albumen en la serie 3.

Para la serie 3 se realiza además una comparación entre un disco expuesto en una atmósfera húmeda y un disco sumergido en solución Ringer, a 37 °C durante una semana en ambos casos. Resultado de este experimento son los difractogramas de la figura 3.5 que se muestra a continuación.





**Figura 3.5.-** Difractogramas de rayos X del cemento de la serie 3 expuesto a diferentes condiciones después de fraguar.

En la figura podemos observar claramente que la transformación de  $\alpha$ -TCP a CDHA es mayor en el cemento sumergido en solución Ringer que en el expuesto a una atmósfera húmeda. La menor intensidad de los picos señalados del disco en solución Ringer demuestra la mayor conversión del  $\alpha$ -TCP. Así pues, todos los discos de cemento se sumergen en solución Ringer a 37 °C durante una semana.

### 3.1.2.4 Espectroscopía infrarroja

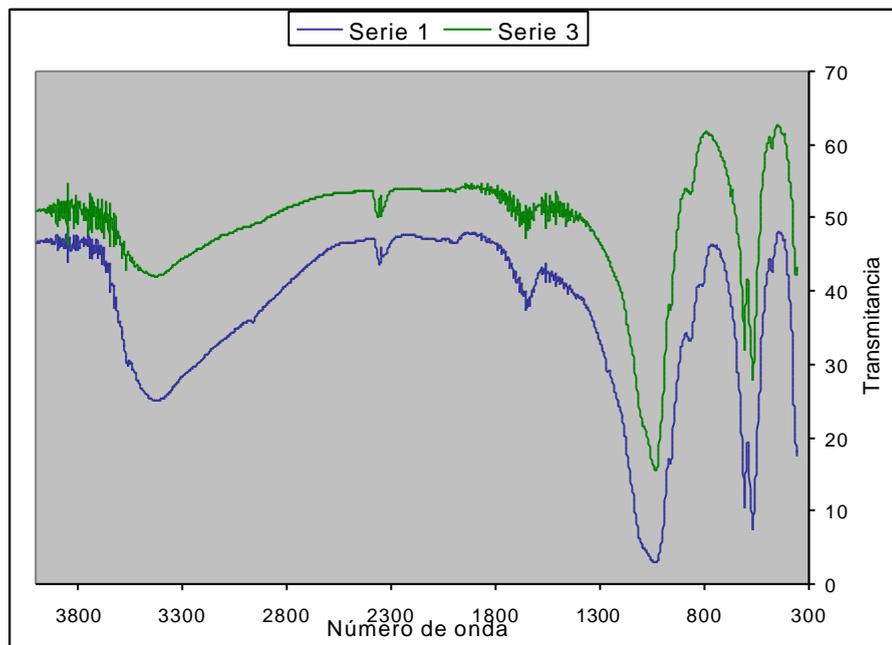
Hasta ahora hemos mostrado, mediante la técnica de difracción de rayos X, que el proceso que da lugar al fraguado del cemento es la transformación del  $\alpha$ -TCP en hidroxiapatita. Teniendo en cuenta que la relación Ca/P del polvo inicial del cemento es 1,5, se ha tomado como hipótesis que la hidroxiapatita formada no es estequiométrica, se trataría de una hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), aunque las diferencias entre ambas no sean detectables mediante la difracción de rayos X convencional. Para confirmar experimentalmente que lo que se obtiene como producto de la reacción es efectivamente una hidroxiapatita deficiente en calcio se usa la técnica de espectroscopía de infrarrojo. El hecho de que las hidroxiapatitas deficientes en calcio, a diferencia de la hidroxiapatita estequiométrica, contengan grupos  $\text{HPO}_4^{2-}$ , responsables de ciertos modos de vibración característicos permite distinguirlos mediante dicha técnica.



El espectro de infrarrojo de las hidroxiapatitas deficientes en calcio es muy similar al de la hidroxiapatita estequiométrica (E.E. Berry, 1967). Las únicas bandas distintas respecto al espectro IR de la hidroxiapatita estequiométrica que aparecen para las CDHA se encuentran en 1210, 1130 (w.sh.) y 870  $\text{cm}^{-1}$ .

Esto es consistente con el hecho de que las apatitas estequiométricas consisten básicamente en una red cristalina apatítica (estructura cristalina hexagonal), con vacantes en posiciones  $\text{Ca}^{2+}$  y OH, manteniéndose la neutralidad por la incorporación de iones H como parte de grupos  $\text{HPO}_4^{2-}$  probablemente involucrados en enlaces de puentes de hidrógeno entre grupos fosfato, del tipo  $\text{O}_3\text{PO-H}\cdots\text{OPO}_3$ . Las bandas que aparecen en las apatitas deficientes en calcio se pueden identificar como sigue: 1210  $\text{cm}^{-1}$ : modo de deformación  $\delta_{\text{OH}}$  del  $\text{HPO}_4^{2-}$  enlazado por hidrógeno; 1133  $\text{cm}^{-1}$  (hombro débil): una componente de la vibración  $\nu_3$  del  $\text{HPO}_4$ ; 870  $\text{cm}^{-1}$ : modo de deformación o extensión simétrica del P-O(H),  $\nu_5$  en el grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

En la figura 3.6 puede observarse como los espectros de infrarrojo de los cementos de la serie 1 y de la serie 3 después de siete días de reacción en solución Ringer a 37 °C no muestran diferencias destacables. El de la serie 2 no se incluye por ser idéntico al de la 1 ya que tienen igual composición.



**Figura 3.6.-** Espectro de infrarrojo del cemento de las series 1 y 3.



Al comparar los espectros de la figura se ratifica que la inclusión de albumen en la composición del cemento no afecta al producto final obtenido.

En la tabla 3.3 se recogen las bandas observadas en el espectro IR del producto obtenido de la reacción de fraguado del cemento después de 7 días (Ginebra, 1996). Se adjuntan asimismo las bandas atribuidas en la bibliografía al espectro de las apatitas deficientes en calcio (CDHA).

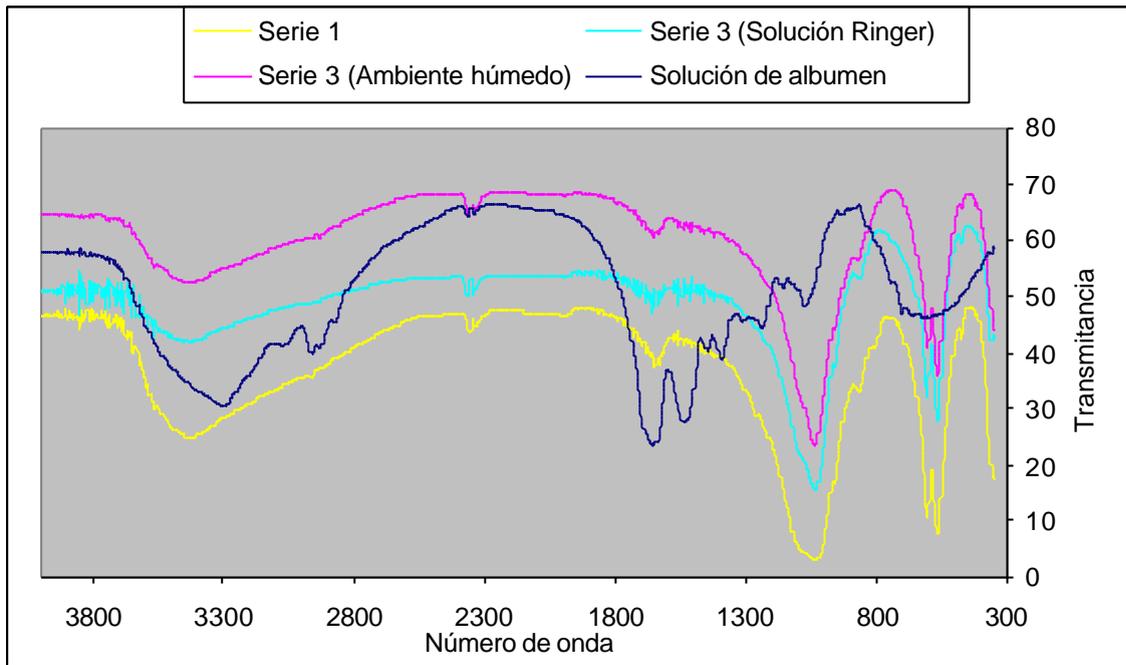
**Tabla 3.3.- Frecuencias de las bandas de absorción IR observadas en el cemento comparadas con las referenciadas en la literatura para la CDHA. (Ginebra, 1996)**

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> ) en el cemento	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> ) en la CDHA según la literatura	Vibración
3573 w	3572 w	OH, extensión
3433 b	3400	Deformación agua adsorbida
1649 w	1625	Flexión OH agua adsorbida
1219 sh, w	1210	Modo $\delta_{OH}$ del $HPO_4^{-2}$ enlazado por H
1130 sh, vw	1133 sh, w	Componente vibración $\nu_3$ del $HPO_4^{-2}$
1078 sh	1087 s	$\nu_3$ ( $PO_4$ )
	$\approx$ 1072 sh	
1029 vs	1046 vs	
	$\approx$ 1032 sh	
968 w	962 w	$\nu_1$ ( $PO_4$ )
877 w	870	Deformación $\nu_5$ P-O(H) de grupos $HPO_4^{-2}$
636 sh vw	630 m	OH, libración
605 m	601 m	$\nu_4$ ( $PO_4$ )
577 m	571 m	

\*w=weak, débil; s=strong, fuerte; m=medium, media; sh=shoulder, hombro; b=broad, ancho; v=very, muy.

En la figura 3.7 se comparan los espectros de infrarrojo de la serie 3, expuesta a distintas condiciones del medio de reacción, el espectro correspondiente a la solución de albumen y el de la serie 1.





**Figura 3.7.-** Espectro de IR del cemento de la serie 3 expuesto a diferentes condiciones después de fraguar y de la serie 1.

De la comparación de los espectros de la figura se desprende que, prescindiendo del medio de reacción en el que se encuentre el cemento, no se detecta albumen. Esto es debido a la poca cantidad de esta sustancia presente en la composición del cemento.

Como conclusión se puede afirmar que el estudio mediante espectroscopía infrarroja proporciona una confirmación experimental de que el producto de la reacción de fraguado del cemento es una hidroxiapatita deficiente en calcio, la cual, teniendo en cuenta la relación molar Ca/P del  $\alpha$ -TCP inicial es 1,5, tendrá una estequiometría cercana a  $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ , la hidroxiapatita biológica.

### 3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE

Uno de los objetivos del presente trabajo es el estudio de la topografía superficial de los discos de cemento para evaluar la diferencia de la rugosidad de las tres formulaciones. Para ello se emplean distintas técnicas.



### 3.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El estudio de la superficie de las tres formulaciones de cemento se inicia con la observación de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido. Esta técnica nos permite observar las diferencias microestructurales entre ellas.

En las figuras 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11 se comparan las micrografías obtenidas para las tres series después de siete días de reacción en solución de Ringer a 37 °C. La magnificación es la misma en todas las micrografías para facilitar la comparación microestructural, se lleva a cabo a 100, 500, 3000 y 10000 aumentos.

Con una magnificación de 100 aumentos obtenemos una vista general de la microestructura de los cementos. Al comparar las tres formulaciones podemos observar que todas las microestructuras tienen un aspecto poroso, destacando en este aspecto la serie 3. Igualmente se aprecia el menor tamaño de los cristales de apatita formados en la serie 2.

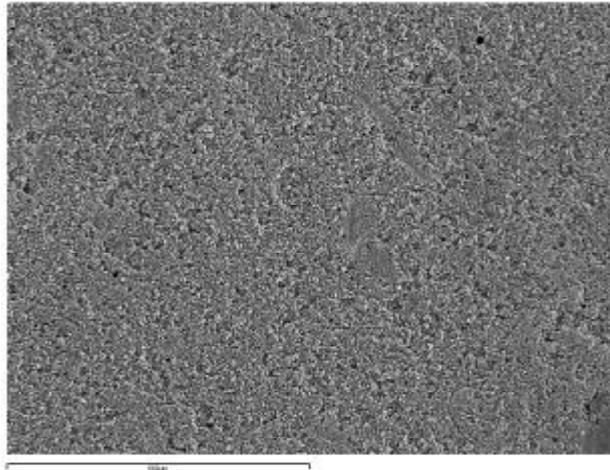
Estos dos aspectos se distinguen mejor en la comparación realizada a 500 aumentos donde se observan ya con claridad el tamaño de los cristales, aunque no se aprecia su aspecto. El hecho que aparezca un menor tamaño cristalino en la serie 2 es consecuencia del menor tamaño de partícula del polvo inicial del cemento, esta característica concuerda con los resultados obtenidos mediante difracción de rayos X y de superficie específica, e induce a la formación de un mayor número de cristales.

A 3000 aumentos se aprecian perfectamente en todas las series los cristales de hidroxapatita formados. La microestructura esta formada por cristales en forma de placas dispuestos en formaciones paralelas o radiales. No se observan partículas sólidas correspondientes a la fase inicial sin reaccionar. Se confirma la diferencia en el tamaño cristalino entre la serie 1, de 6  $\mu\text{m}$ , y la serie 2, de 2.5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente. Además se observan dos niveles de rugosidad en la superficie de los cementos, uno debido a los propios cristales, es decir, la relación entre un cristal y sus vecinos; y, el segundo nivel corresponde al de los núcleos semiesgéricos de apatita que se forman.

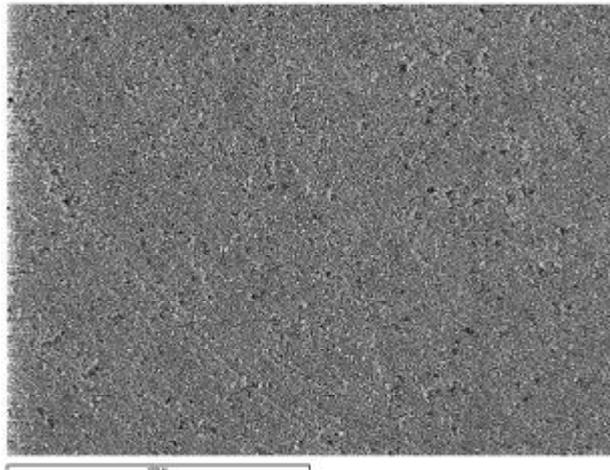
En las micrografías realizadas a 10000 aumentos se distinguen con mayor claridad los niveles de rugosidad y más en concreto el segundo perteneciente a las láminas que forman cada cristal.



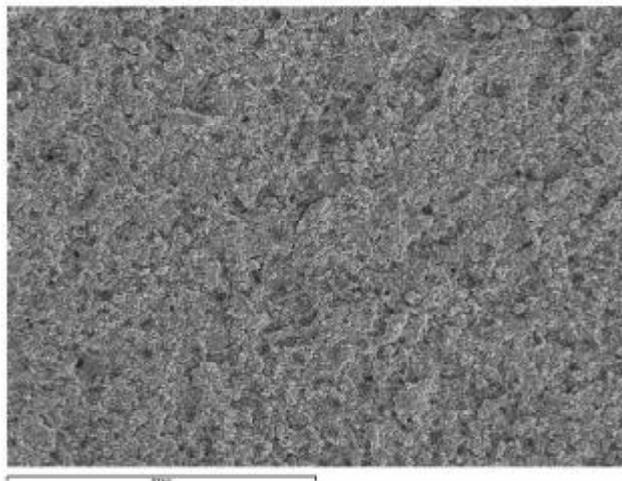
**SERIE 1**



**SERIE 2**

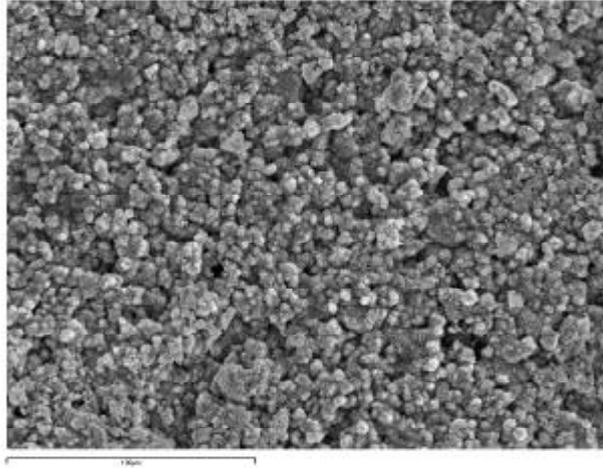
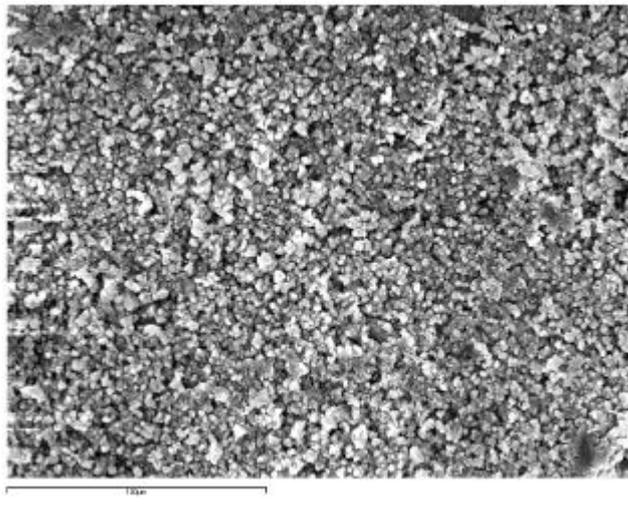
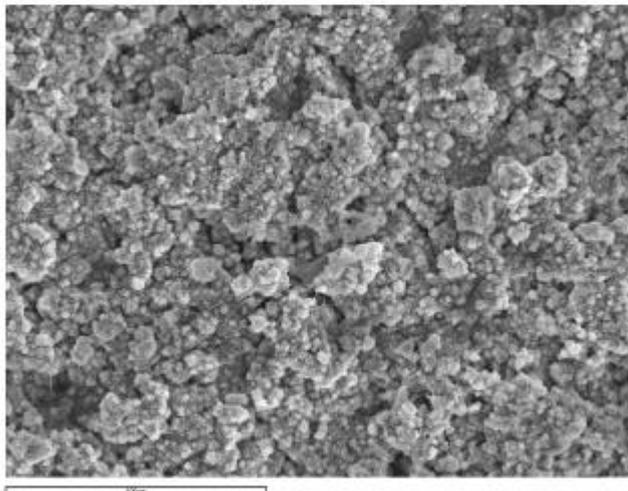


**SERIE 3**



**Figura 3.8.-** *Micrografías de las tres series (x100 aumentos).*

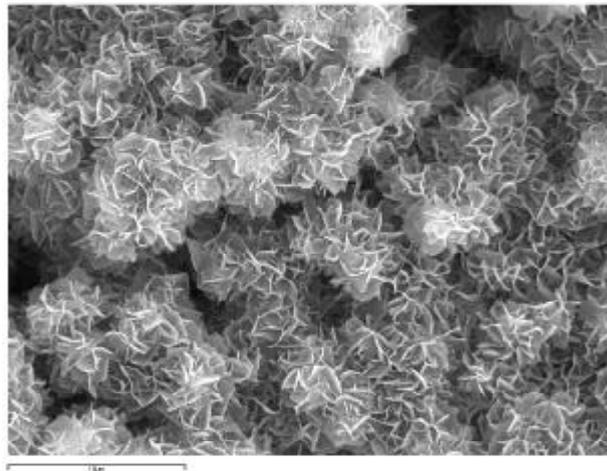


**SERIE 1****SERIE 2****SERIE 3**

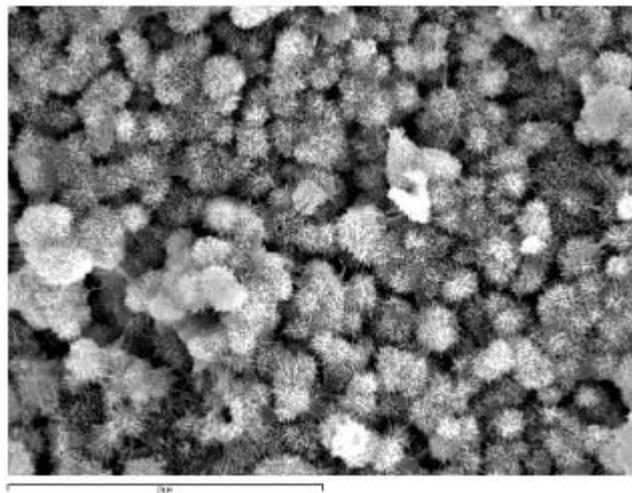
**Figura 3.9.-** Micrografías de las tres series (x500 aumentos).



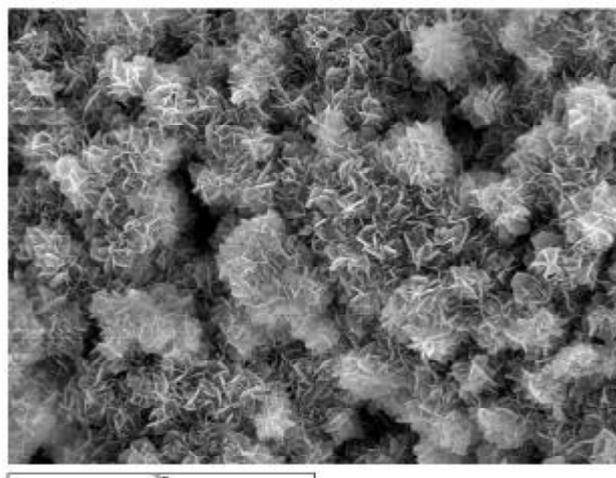
**SERIE 1**



**SERIE 2**

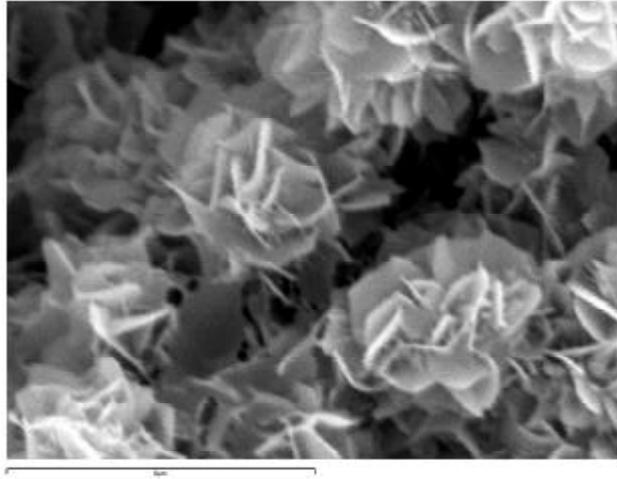
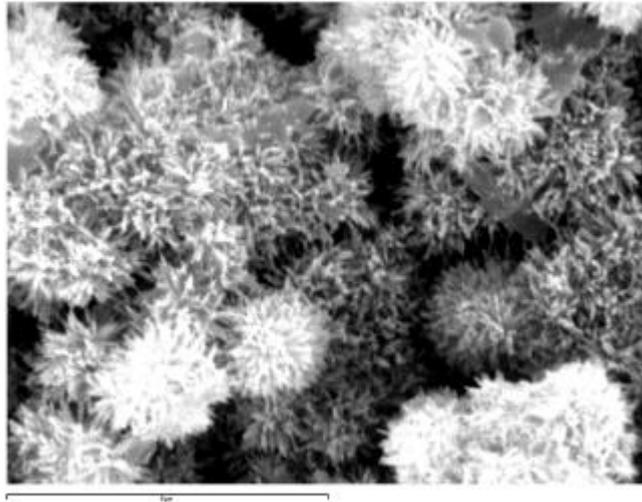
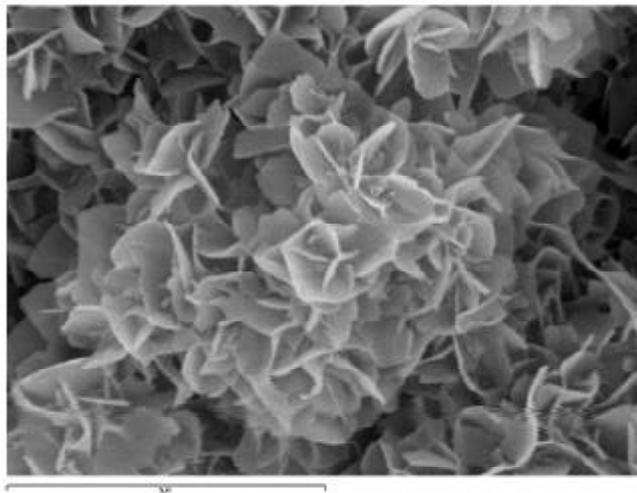


**SERIE 3**



**Figura 3.10.-** Micrografías de las tres series (x3000 aumentos).



**SERIE 1****SERIE 2****SERIE 3**

**Figura 3.11.-** Micrografías de las tres series (x10000 aumentos).



### 3.2.2 TÉCNICA DE CONTACTO: RUGOSÍMETRO

El estudio de la topografía superficial de los discos de cemento se realiza en un rugosímetro bidimensional con palpador de punta de diamante.

Las superficies a evaluar se consideran isotrópicas, de forma que no hay ninguna dirección preferencial, aunque al existir imperfecciones debidas al propio proceso de fraguado y preparación de las muestras se realizan de 8 a 9 lecturas para cada disco, con el fin que la desviación estándar de los parámetros se sitúe entre 0.1 y 0.2 al promediarlos.

Sobre los perfiles de rugosidad se hacen las determinaciones de los parámetros de rugosidad más característicos. Los parámetros se calculan para describir numéricamente la apariencia de la rugosidad superficial. En general, la valoración de la textura superficial se hace a partir de los datos registrados en todas y cada una de las longitudes de muestra, los cuales se promedian a lo largo de la longitud total del ensayo, obteniendo así los parámetros de evaluación.

En la siguiente tabla aparecen los promedios de los resultados obtenidos para todas las lecturas realizadas en los discos de cada serie. La información que nos aporta cada parámetro seleccionado sobre la topografía superficial se explica en el anexo B.

**Tabla 3.4.- Promedios de los parámetros estudiados en micrómetros, entre paréntesis se muestra la desviación estándar.**

	<b>R<sub>a</sub></b>	<b>P-V</b>	<b>P<sub>c</sub>/cm</b>	<b>HSC</b>
<b>SERIE 1</b>	0.876 (0.21)	5.134 (2.57)	140.84 (15.7)	117.09 (13.4)
<b>SERIE 2</b>	0.585 (0.13)	3.105 (0.93)	135.30 (24.3)	102.14 (9.03)
<b>SERIE 3</b>	9.128 (1.65)	30.526 (4.2)	85.47 (31.34)	57.17 (3.43)

La media aritmética de las desviaciones del perfil ( $R_a$ ) es el parámetro más general y comúnmente utilizado para describir la rugosidad. El análisis realizado con t-student muestra que las diferencias entre la serie 1 y 2 son estadísticamente significativas ( $p = 0.000$ ), al igual que entre la serie 1 y la 3 ( $p = 0.000$ ). La máxima altura del perfil, es decir, la distancia entre el máximo pico y el menor valle (P-V) nos da una información análoga a  $R_a$ , al igual que los otros dos parámetros  $P_c$  y HSC.



La diferencia entre la serie 1 y 2 viene dada por el menor tamaño cristalino de la serie 2, como se observó en las micrografías del apartado anterior, que la dotan de una superficie más lisa y uniforme.

También cabe destacar la gran diferencia de rugosidad entre la serie 1 y la serie 3. Esta desigualdad viene dada por la presencia de albumen en la composición de esta última formulación. Una vez se introduce en el molde la pasta (fase sólida + fase líquida) recién mezclada y avanza el proceso de fraguado, se aprecia a simple vista la formación de irregularidades tales como poros superficiales.

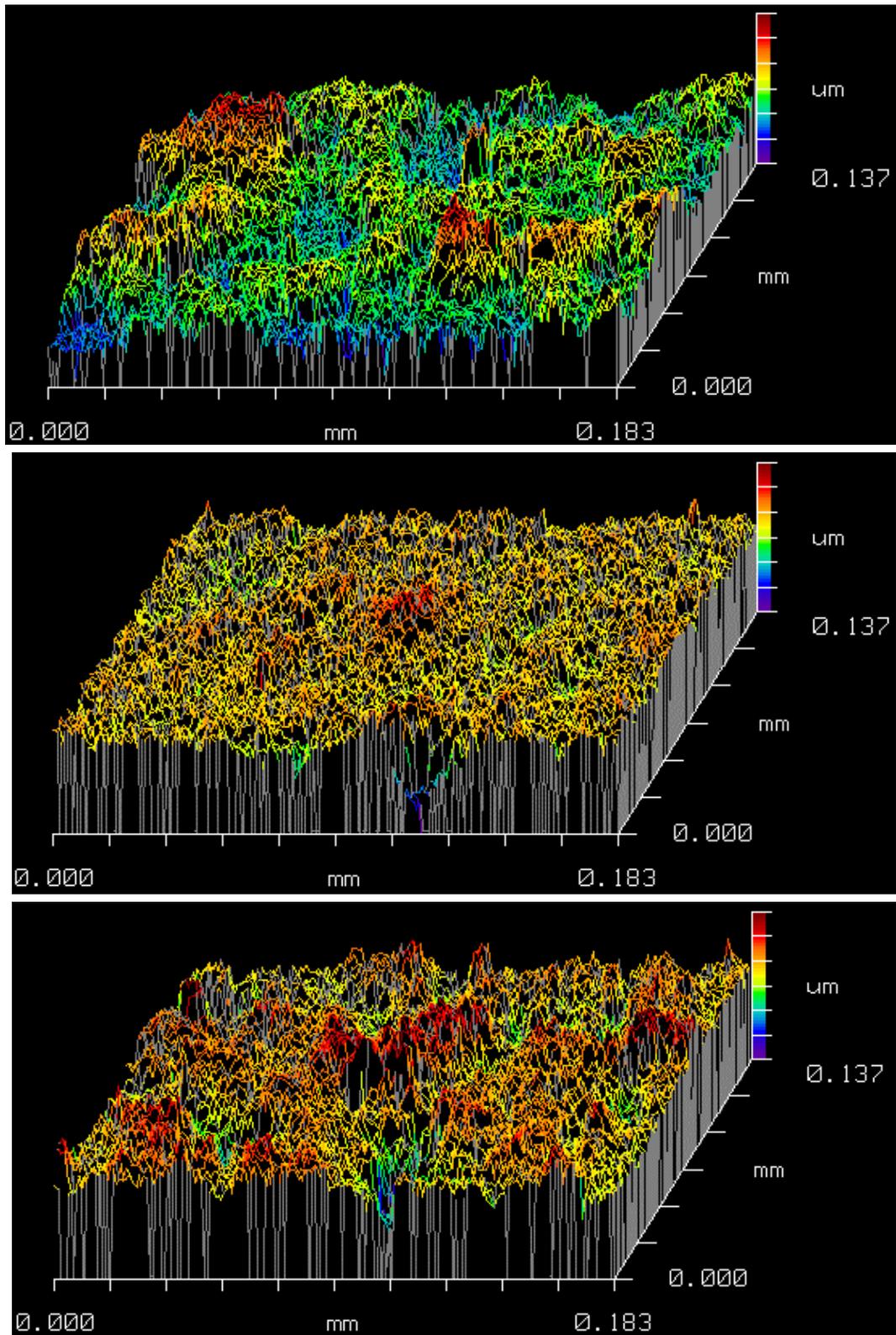
La técnica de contacto mediante el uso del rugosímetro nos permite obtener diferencias significativas entre las series. Con el fin de ampliar el estudio de la topografía superficial se decide caracterizar las superficies mediante la técnica de microscopía de interferometría óptica.

### **3.2.3 MICROSCOPIA ÓPTICA INTERFEROMÉTRICA**

La microscopía óptica interferométrica nos permite distinguir con claridad las topografías superficiales de las tres formulaciones. Esto es debido a que el área de estudio es menor que en el caso del rugosímetro, de 183 x 137 mm y que la escala de la medición es micrométrica, ajustándose más a las características superficiales del cemento. La complejidad de la superficie puede dificultar la penetración del palpador mecánico del rugosímetro, de ahí la elección de una técnica óptica.

En la figura 3.12 se muestra un ejemplo de la topografía superficial de cada serie. Las condiciones de trabajo fueron iguales para todas ellas con el fin de poder ser comparadas.





**Figura 3.12.-** Comparación de las imágenes de interferometría de las tres series, de arriba a abajo serie 1, serie 2 y serie 3.



Al comparar las imágenes se observa que la serie 3 es la más rugosa, mientras que la serie 2 es la más lisa y uniforme. Esto se confirma además con los valores numéricos que aporta esta técnica. Se realizan ocho medidas para cada disco, el promedio de las lecturas obtenidas para el total de los discos ensayados de cada serie se muestran en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5.- Promedios de los parámetros estudiados en micrómetros, entre paréntesis se muestra la desviación estándar.**

	<b>R<sub>a</sub></b>	<b>Rms</b>	<b>P-V</b>
<b>SERIE 1</b>	1.213 (0.11)	1.595 (0.14)	56.478 (19.2)
<b>SERIE 2</b>	0.921 (0.15)	1.254 (0.21)	54.246 (26.1)
<b>SERIE 3</b>	3.931 (1.17)	4.991 (1.36)	88.424 (5.5)

Los resultados obtenidos demuestran que la menor rugosidad corresponde a la serie 2, consecuencia del menor tamaño de los cristales, como ya se ha observado en las imágenes anteriores y mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido. Igualmente se pone de manifiesto que la serie 3 presenta una rugosidad considerablemente mayor a la de la serie 1.

Con el fin de ratificar que existen diferencias significativas entre las series se realiza un estudio estadístico. El análisis realizado con el test de t-student muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las series 1 y 2 (P = 0,002) y entre las series 1 y 3 (P = 0.000).

Comparando el valor promedio de los parámetros estudiados con los obtenidos con el rugosímetro, se comprueba que el orden de rugosidad entre las series que nos proporciona la interferometría óptica sigue la misma secuencia que la establecida con el rugosímetro. Aunque cabe destacar que existen diferencias entre los valores promedios obtenidos según una u otra técnica, debido a las características inherentes a cada una (área de estudio, precisión, escala, etc).



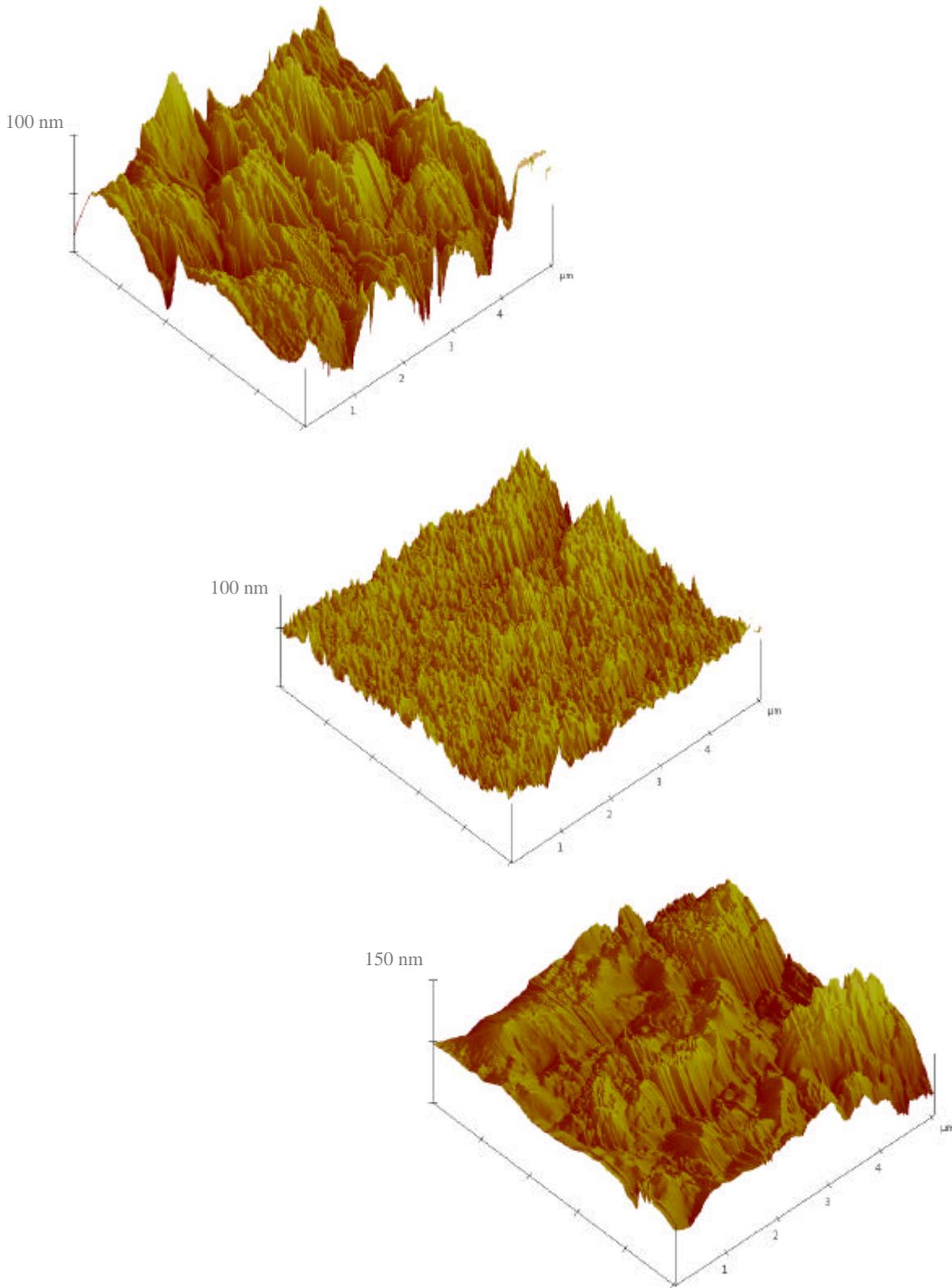
### 3.3.4 MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM)

La microscopía de fuerzas atómicas es una técnica que nos permite caracterizar la topografía superficial con una resolución superior a un nanómetro. Con las dos técnicas anteriores se logra caracterizar la superficie de los cementos en relación a la rugosidad producida por el conjunto de los cristales de hidroxiapatita, es decir, el primer nivel de rugosidad. Con el uso de esta técnica se pretende estudiar las diferencias en lo que respecta al segundo nivel de rugosidad que poseen los cristales individualmente.

En las figuras 3.13 y 3.14 se comparan las tres series con unas áreas de barrido de  $5 \mu\text{m}^2$  y de  $10 \mu\text{m}^2$ , respectivamente. La escala del eje Z varía en la serie 3 (150 nm) respecto a las otras dos series (100 nm) debido a su mayor rugosidad.

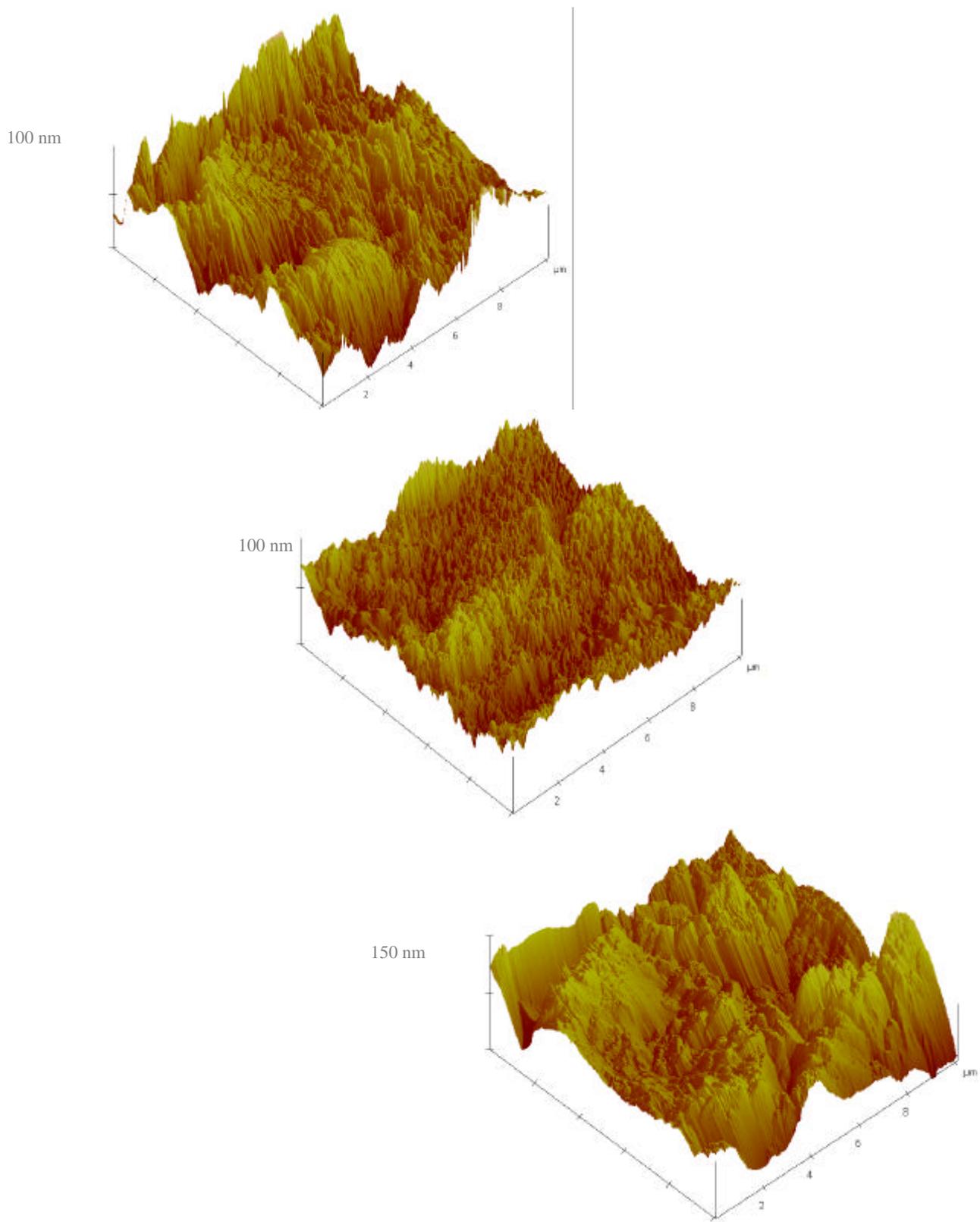
En las imágenes se evidencia la diferencia entre la rugosidad de la serie 2, que presenta la superficie más lisa y uniforme, en comparación con la serie 1. Esto es debido al menor tamaño cristalino de la serie 2 como se comprobaba en las micrografías realizadas mediante microscopía electrónica de barrido (figura 3.11).





**Figura 3.13.-** Comparación de las imágenes de AFM. De arriba abajo: serie 1, serie 2 y serie 3. Área de barrido: 5 x 5  $\mu\text{m}$ .





**Figura 3.14.-** Comparación de las imágenes de AFM. De arriba abajo: serie 1, serie 2 y serie 3. Área de barrido: 10 x 10  $\mu\text{m}$ .



Los parámetros estudiados para caracterizar la superficie son  $R_a$  y P-V (para comparar con las técnicas empleadas con anterioridad) y Rms. El promedio de las lecturas obtenidas para los discos ensayados de las tres series se describen en la siguiente tabla.

**Tabla 3.6.- Promedios de los parámetros estudiados en nanómetros.**

	$R_a$	Rms	P-V
<b>SERIE 1</b>	54.501	70.11	655.79
<b>SERIE 2</b>	44.339	57.55	473.79
<b>SERIE 3</b>	136.32	208.21	147.32

Aunque las imágenes nos aportan una información visual útil para diferenciar las rugosidades entre las series, los resultados numéricos que nos proporciona esta técnica nos imposibilitan encontrar diferencias significativas entre las series 1 y 2. Esto es debido a que el área de estudio, pese a ser pequeña, incluye los dos niveles de rugosidad en el caso de la serie 2, recordamos que el tamaño aproximado de los cristales en ésta es de  $2.5 \mu\text{m}$  y el área de estudio es de  $5 \mu\text{m}^2$ ; mientras que el tamaño de los cristales de la serie 1 es de unos  $6 \mu\text{m}$ . En consecuencia, en la serie 1 se caracteriza la rugosidad propia de los cristales individuales, mientras que en la serie 2 a ésta rugosidad se añade la que existe entre los diferentes núcleos esféricos, es decir, la motivada por los cristales contiguos.

Los valores de rugosidad obtenidos en la serie 1 y 3, al igual que ocurría con la técnica de interferometría y con el rugosímetro, difieren considerablemente. Esta disparidad es consecuencia de la presencia de albumen en la composición de la serie 3.

Con el estudio realizado con las cuatro técnicas anteriores, las superficies de las tres formulaciones de cemento quedan definidas para evaluar la influencia que tienen en el estudio *in vitro* realizado sobre los cementos



### 3.3 ESTUDIO *IN VITRO*

A continuación se exponen los resultados obtenidos para los ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación que se realizan sobre los discos de las tres formulaciones de cemento (serie 1, 2 y 3).

#### 3.3.1 ENSAYOS DE ADHESIÓN

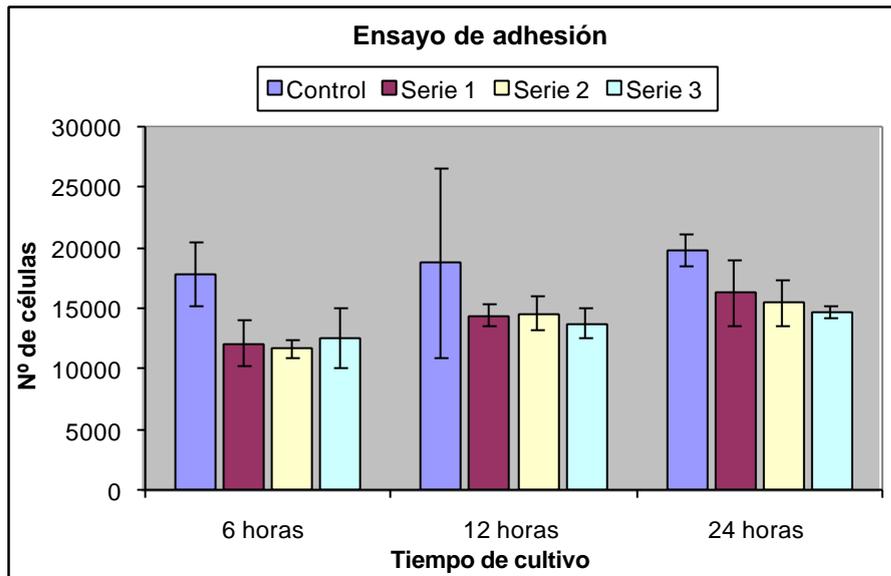
Se evalúa la adhesión de los osteoblastos sobre las tres series y sobre plástico (control) transcurridas 6, 12 y 24 horas del inicio del estudio. En la siguiente tabla se muestran los resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar del número total de células contadas. Cada ensayo se realiza por triplicado.

**Tabla 3.7.- Resultados de los ensayos de adhesión.**

	6 horas	12 horas	24 horas
CONTROL	17.803 $\pm$ 1202	18.750 $\pm$ 1806	19.791 $\pm$ 1301
<b>SERIE 1</b>	12.083 $\pm$ 1909	14.375 $\pm$ 883	16.250 $\pm$ 1651
<b>SERIE 2</b>	11.666 $\pm$ 721	14.583 $\pm$ 1443	15.416 $\pm$ 1909
<b>SERIE 3</b>	12.500 $\pm$ 1500	13.750 $\pm$ 1250	14.687 $\pm$ 441

En el siguiente diagrama se representan los valores de la tabla. Se observa, tanto para las tres series como para el control, que el número de células adheridas en las superficies aumenta con el tiempo de incubación.





**Figura 3.15.-** Resultados del ensayo de adhesión.

El control realizado sobre polietileno es el que más células adheridas presenta en todos los tiempos. Sin embargo, el número de osteoblastos adheridos en las superficies de los cementos es muy similar entre si, aproximándose con el paso del tiempo al control. Se realiza una estadística por comparación múltiple que demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la adhesión de los osteoblastos a las superficies estudiadas en todos los tiempos.

Las tres series permiten una óptima adherencia celular. En un principio y vistos los resultados obtenidos, se podría afirmar al comparar la serie 1 con la 2 que el tamaño cristalino no influye en el número de osteoblastos adheridos a las distintas superficies. Así mismo, al comparar la serie 1 con la 3 se deduce que la inclusión de albumen en la composición de ésta última no afecta a la adhesión.

### 3.3.1.1 Caracterización de los discos

#### Microscopía electrónica de barrido ambiental

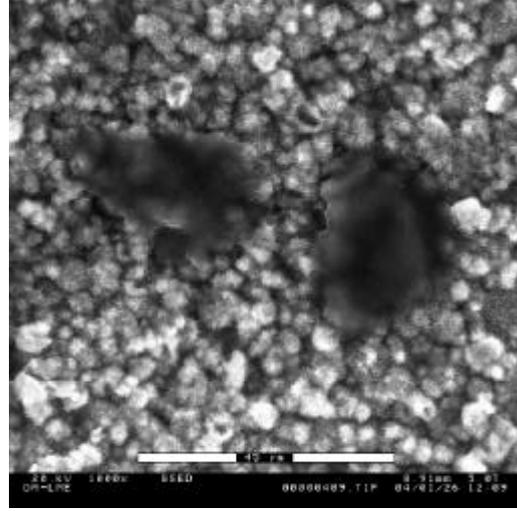
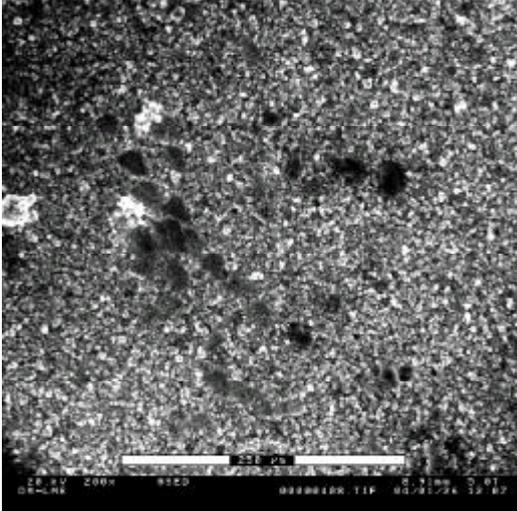
Durante todos los ensayos de adhesión se llevan a cabo sesiones de microscopía electrónica de barrido ambiental con el fin de obtener micrografías del aspecto de las células y de la microestructura superficial. En este apartado se destacan algunas de las obtenidas.



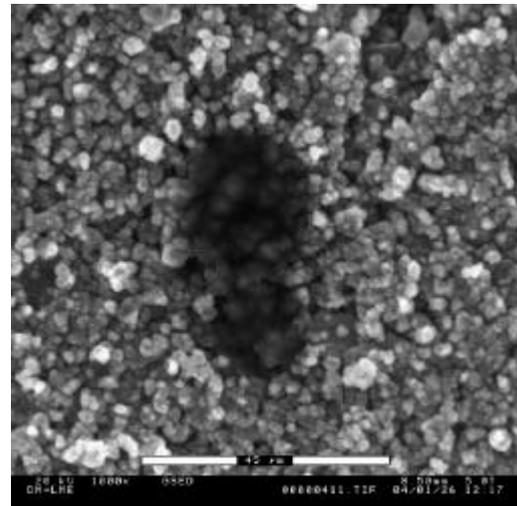
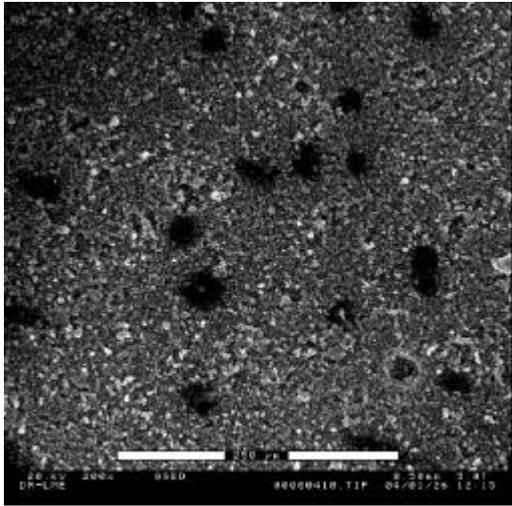
En la figura 3.16 se comparan las tres series a las doce horas del inicio del estudio *in vitro*. Las micrografías de la izquierda tienen una magnificación de 200 aumentos lo que nos permite una observación general de la disposición de las células sobre la superficie de los cementos. A la derecha se aprecian, con una magnificación de 1000 aumentos, la forma y dimensión de los osteoblastos sobre los cristales de hidroxapatita.



## SERIE 1



## SERIE 2



## SERIE 3

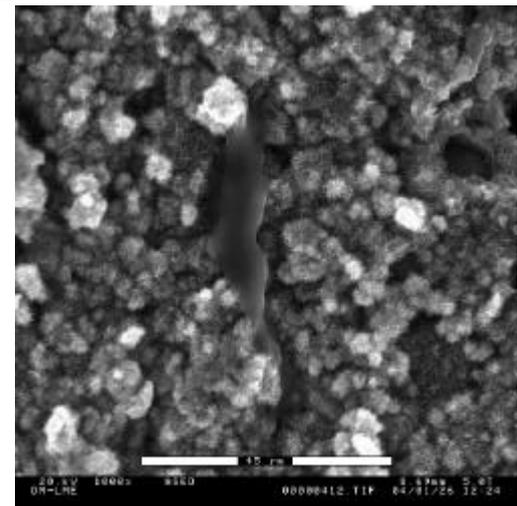
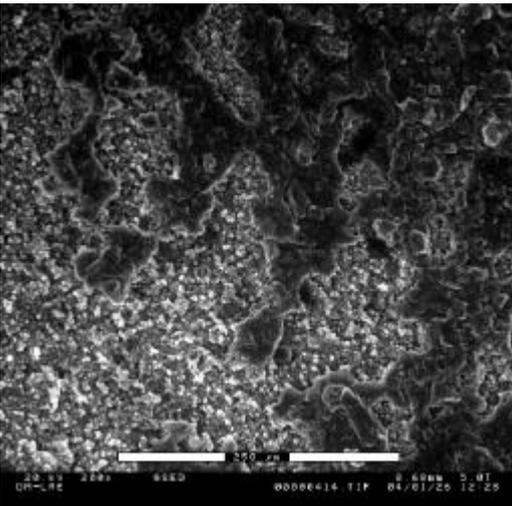
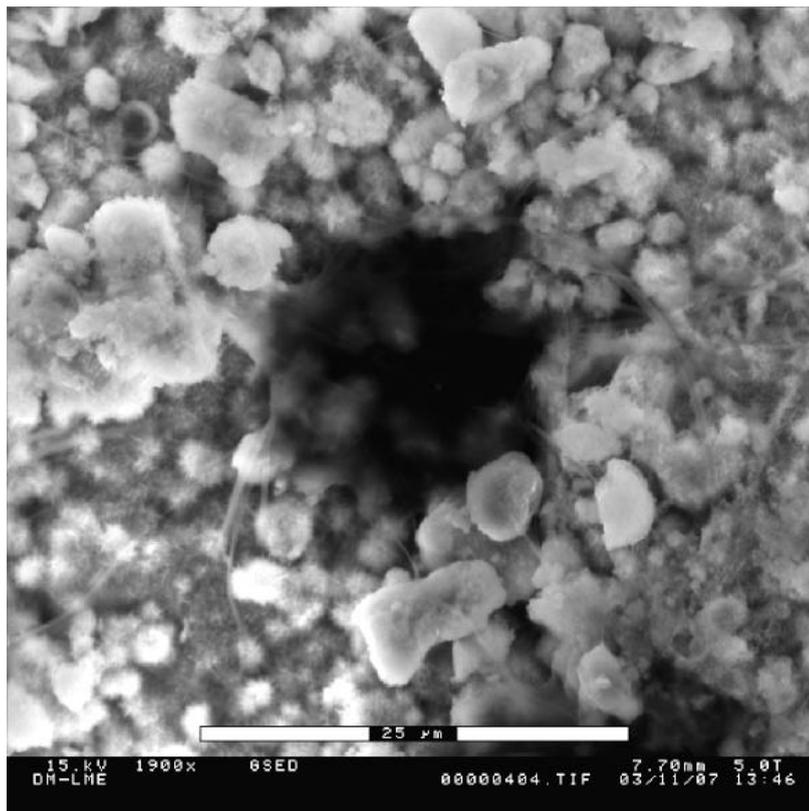


Figura 3.16.- Micrografías de las tres series a las doce horas.



Los resultados obtenidos para la adhesión a 12 horas son similares en las tres series (tabla 3.7) contabilizándose alrededor de 14000 células. Sin embargo, observando las micrografías a 200 aumentos, se podría pensar que la serie 3 tiene mayor número de osteoblastos adheridos a la superficie del cemento que las otras dos formulaciones. Pero viendo los resultados obtenidos en el resto del estudio se puede atribuir este hecho a la heterogeneidad en la distribución de las células en superficie. Es importante destacar que en las microfotografías referentes a la serie 3, las células presentan un aspecto más abultado, menos aplanado que en las otras dos series. Este hecho se debe a la mayor rugosidad del material, que provoca una morfología celular diferente.

En las micrografías realizadas a 1000 aumentos se observan con más detalle los osteoblastos sobre la superficie de cada serie. Para apreciar mejor la adhesión se muestra, a modo de ejemplo, la siguiente microfotografía, a 1900 aumentos, de la serie 3 realizada a las 24 horas.

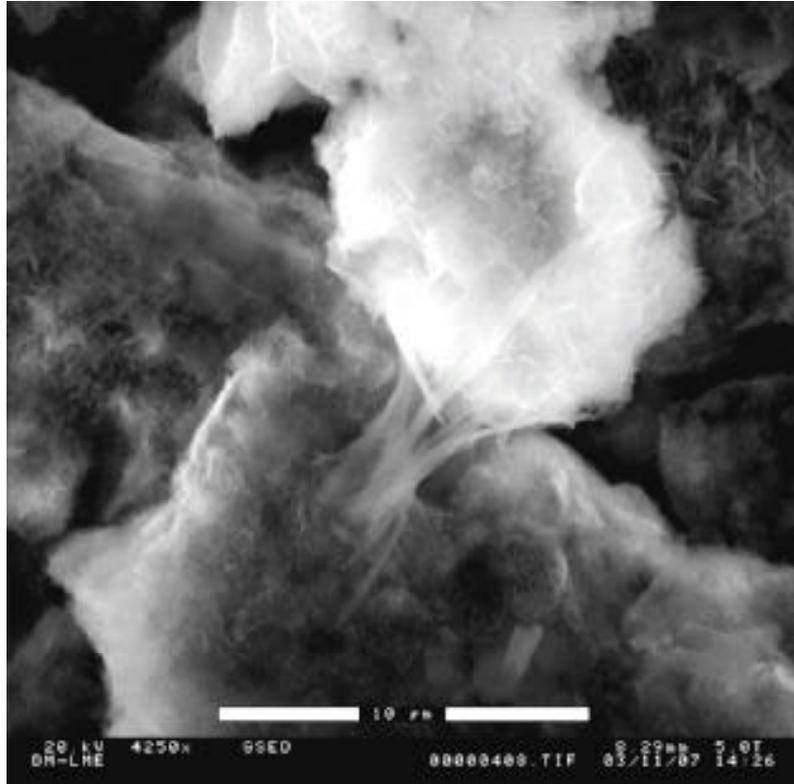


**Figura 3.17.-** Micrografía de la serie 3 a las 24 horas del inicio del estudio.

Se observa como las células están más desarrolladas que a las 12 horas presentando actividad dorsal y filopodios que se fijan en la rugosidad. El osteoblasto se fija a



los cristales de hidroxiapatita mediante los filopodios, así la célula se va integrando a la estructura cristalina del cemento. Este aspecto se observa perfectamente en la figura 3.18 a 4250 aumentos, donde un filopodio de la célula envuelve a un cristal de hidroxiapatita.



**Figura 3.18.-** Micrografía de la serie 3 a las 24 horas del inicio del estudio.

### 3.3.2 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Una vez las células se adhieren a las superficies comienza la expansión de la población además de la síntesis de colágeno de la matriz ósea, este momento es el inicio de la proliferación.

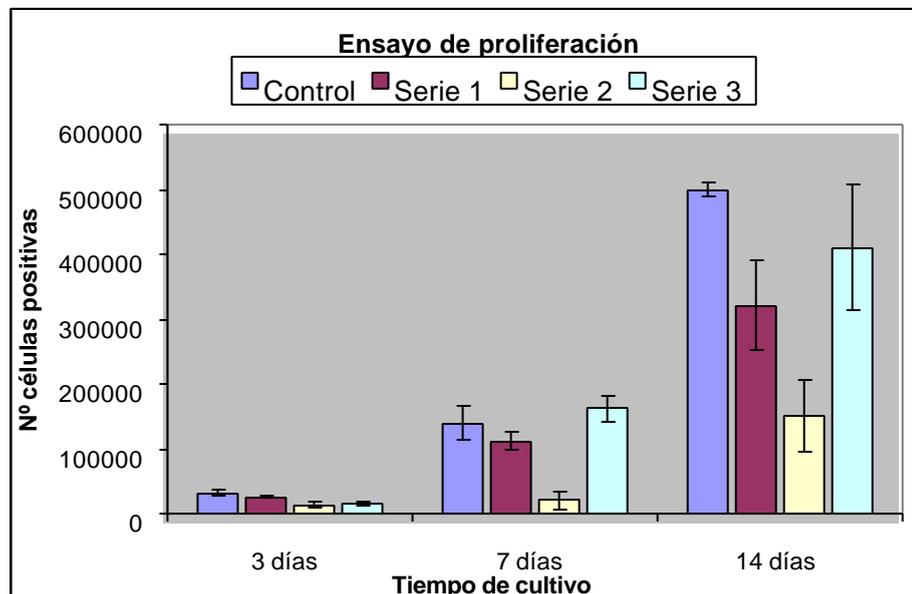
Al igual que en el ensayo de adhesión, se estudia la proliferación de los osteoblastos sobre las tres series de cemento y sobre el control a diferentes intervalos de tiempo: 3, 7 y 14 días del inicio del estudio. En la tabla se muestran los promedios  $\pm$  desviación estándar del número de células contadas, cada ensayo se realiza por triplicado.



**Tabla 3.8.- Resultados del ensayo de proliferación.**

	3 días	7 días	14 días
CONTROL	31.250 ± 4.506	138.750 ± 26.010	500.000 ± 9.437
SERIE 1	25.625 ± 883	111.666 ± 13.768	320.833 ± 39.105
SERIE 2	13.125 ± 3.801	20.416 ± 11.767	150.000 ± 41.800
SERIE 3	16.666 ± 3.145	161.666 ± 20.207	410.416 ± 97.390

En la figura 3.19 se representan los valores de la tabla anterior, se observa que la proliferación celular aumenta en la serie 1 y en la serie 3 con el tiempo de incubación, por lo que podemos afirmar que todas las series presentan una buena biocompatibilidad.

**Figura 3.19.- Resultados del ensayo de proliferación.**

La serie 3 es la que presenta una proliferación celular mayor, en segundo lugar la serie 1 y finalmente la serie 2 que difiere considerablemente de las otras. El estudio estadístico realizado demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre la serie 1 y la 2 a los 7 y a los 14 días y entre la serie 1 y 3 a los 14 días.

En la serie 2, la proliferación es muy baja, pudiendo inducir a pensar en una posible citotoxicidad. Pero debido a que el material es el mismo que la serie 1, ya que sólo varía el tamaño cristalino, y los resultados obtenidos en la determinación de proteínas (apartado 3.3.3) nos induce a pensar que las células se encuentran más fuertemente adheridas a la superficie.



La diferencia en la proliferación celular entre la serie 1 y la 2 se podría atribuir a la distinta rugosidad superficial que provocaría una adhesión de los osteoblastos desigual. Dicho de otro modo, el menor tamaño de los cristales de hidroxiapatita de la serie 2 promovería una fijación mayor entre los osteoblastos y la superficie. Boyan B. et al. (2001) sugiere que la microtextura de la superficie exhibe una mejora en la fijación de las células óseas.

Este comportamiento nos lleva a pensar dos hipótesis: La primera sería que debido a la fuerte adhesión de los osteoblastos a la superficie, éstos perderían movilidad que dificultaría su expansión ocasionando una proliferación más lenta. La segunda sería que la extracción de las células se vería dificultada debido a la fuerte fijación entre las células y la superficie. La técnica empleada para la extracción de los osteoblastos, mediante el uso de tripsina, no sería lo suficientemente efectiva en este caso para llevar a cabo la desunión célula-superficie.

Anselme K. et al (1998) demuestran que la proliferación de los osteoblastos es sensible a los cambios en la superficie de fosfatos de calcio. En este sentido hay estudios que relacionan directamente la interacción célula-biomaterial con la rugosidad superficial, Brunette et al. (1998).

La comparación de los resultados obtenidos entre la serie 1 y la serie 3 nos induce a pensar que la inclusión de albumen en la composición del cemento, que infiere una mayor rugosidad superficial, beneficiaría la proliferación de los osteoblastos. Knabe C. et al. (2000) atribuyen la mayor proliferación celular de un biocemento al mayor grado de rugosidad superficial.

### **3.3.2.1 Caracterización de los discos**

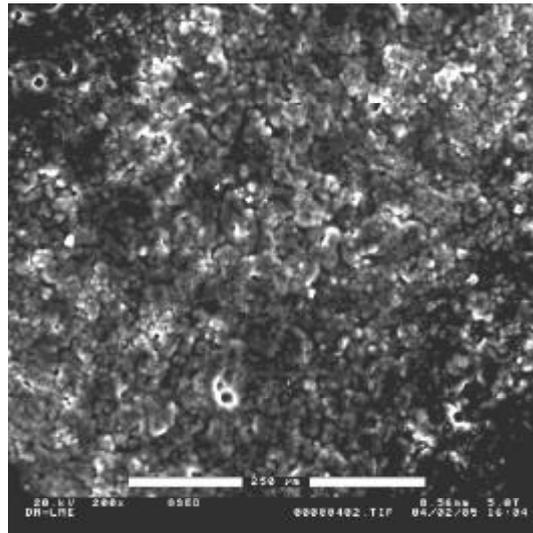
#### *Microscopía electrónica de barrido ambiental*

Durante los ensayos de proliferación se llevan a cabo sesiones de microscopía electrónica de barrido ambiental con el fin de obtener micrografías del aspecto de las células y de la microestructura superficial.

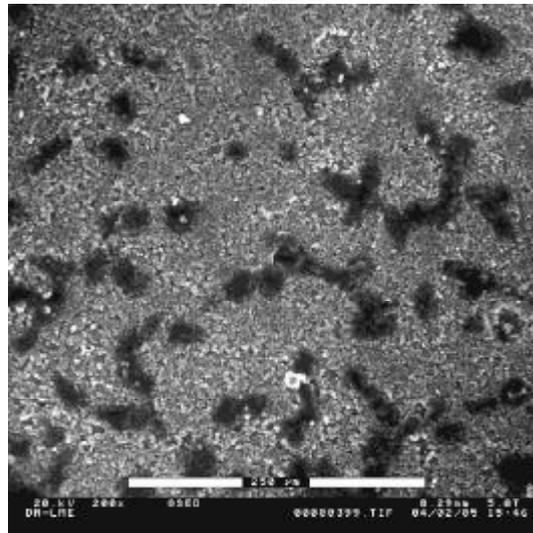
En la figura 3.20 se comparan las tres series a los siete días del inicio del estudio, las micrografías presentan la misma magnificación, 200 aumentos.



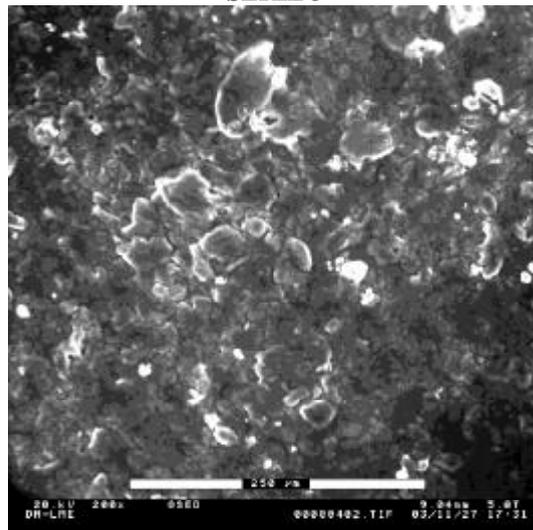
**SERIE 1**



**SERIE 2**



**SERIE 3**



**Figura 3.20.-** Micrografías de las tres series a los siete días del inicio del estudio.



Como hemos comprobado la proliferación de los osteoblastos no se desarrolla de igual forma para las tres series, la figura confirma que hay una notable diferencia entre el número de osteoblastos de la serie 2 y el resto.

La serie 1 y 3 muestran una capa de osteoblastos que cubre toda la superficie, de forma que no se aprecian diferencias visuales entre ellas, aunque se sabe, por el contaje celular realizado, que en la serie 3 a los siete días han proliferado mayor número de células que en la serie 1. Se aprecia la diferencia en la serie 3 respecto a la 1 en lo que se refiere a los aglomerados celulares más voluminosos debido a la mayor rugosidad de la serie 3.

### Microscopía electrónica de barrido

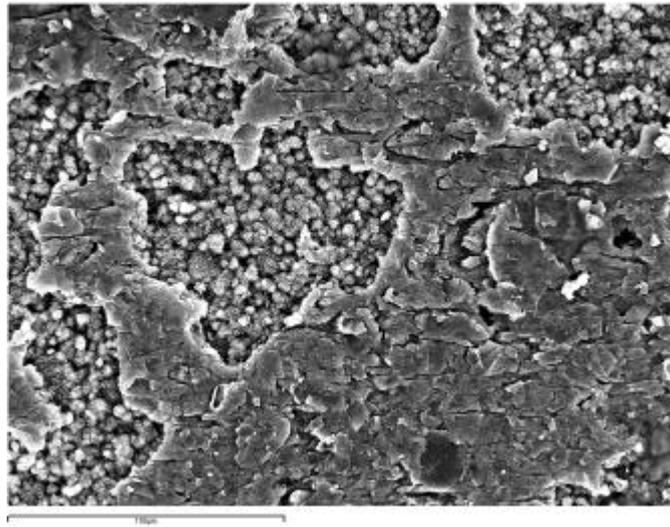
Como complemento a las sesiones de microscopía electrónica de barrido ambiental, se obtienen micrográficas con la técnica de microscopía electrónica de barrido. A modo de ejemplo, en la figura 3.21 se muestra la apariencia de las series a los tres días del inicio del estudio *in vitro*, todas ellas con una magnificación de 500 aumentos.

Entre las series 1 y 2 existe una clara diferencia, mientras que en la serie 1 se distinguen dos zonas: una capa de células que cubre gran parte del área estudiada y los cristales de hidroxiapatita que quedan sin cubrir; en la serie 2 apenas se observan células. El contaje celular realizado a los tres días muestra que proliferan casi el doble de células en la serie 1 que en la 2.

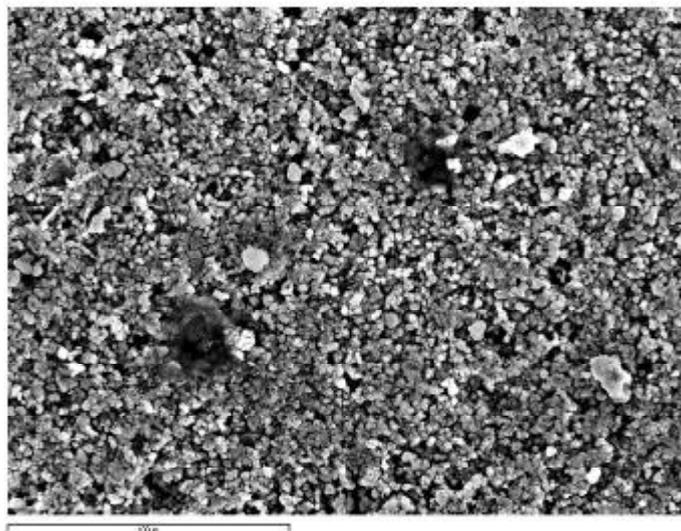
Por otro lado al comparar las series 1 y 3, las diferencias no son tan llamativas, presentando ambas una capa de osteoblastos que van proliferando sobre la microestructura del cemento, siendo más amplia en el caso de la serie 1.



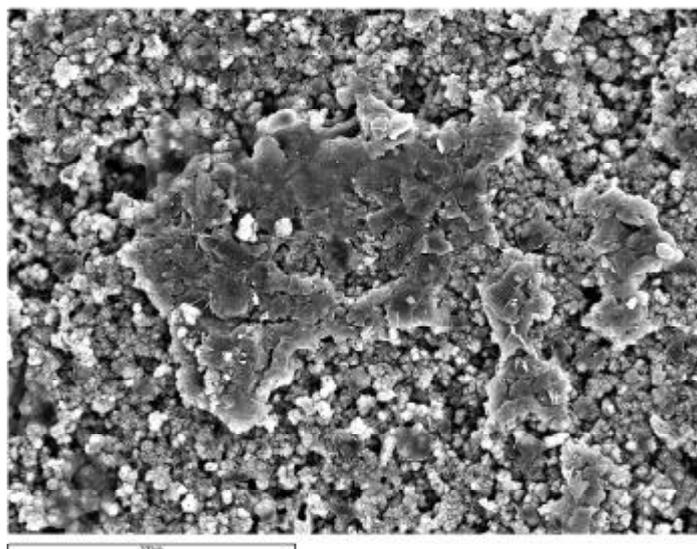
**SERIE 1**



**SERIE 2**



**SERIE 3**



**Figura 3.21.-** Micrografías de las tres series a los tres días del inicio del estudio.



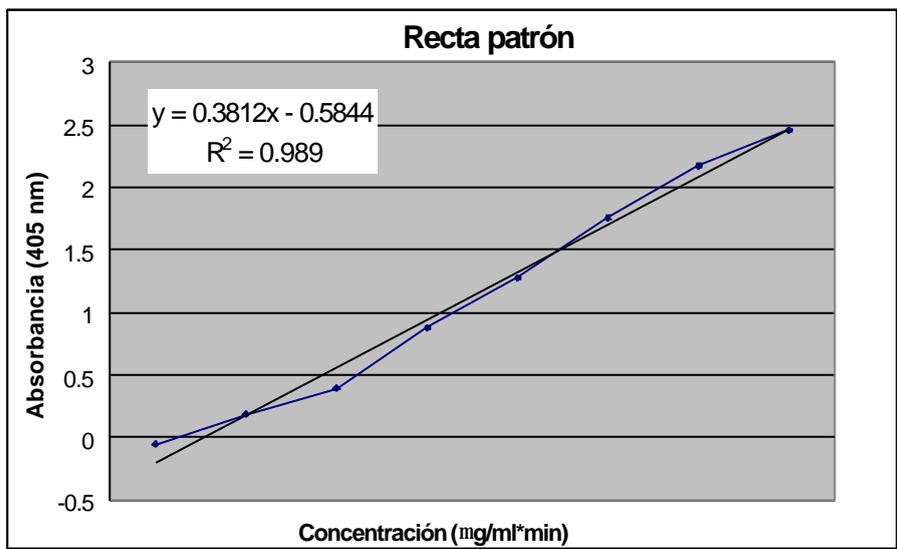
### 3.3.3 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN

En este proyecto se realizan dos ensayos de diferenciación relacionados con la función del osteoblasto en la formación ósea. En primer lugar, para el primer estadio de diferenciación se determina la actividad de fosfatasa alcalina y en un segundo estadio de diferenciación (cuando el osteoblasto es más maduro) se establece la secreción de osteocalcina.

#### 3.3.3.1 Actividad de la fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es un enzima presente en la membrana del osteoblasto que se libera en proporción con la formación de hueso y promueve la mineralización del tejido.

Se realizan las lecturas de las absorbancias a una longitud de onda de 405 nm y se construye la recta de absorbancias respecto a la concentración.



**Figura 3.22.-** Recta patrón de los estándares de BSA.

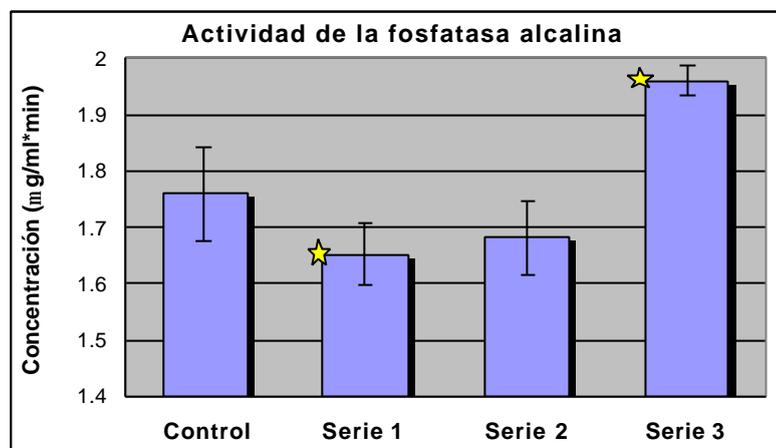
Esta curva nos sirve para determinar la actividad de la fosfatasa alcalina de cada serie y del control.



**Tabla 3.9.- Actividad de la fosfatasa alcalina (mg/ml\*min).**

	Concentración (mg/ml*min)	Desviación estándar
<b>Control</b>	1.759	0.083
<b>Serie 1</b>	1.651	0.054
<b>Serie 2</b>	1.683	0.065
<b>Serie 3</b>	1.961	0.026

En el diagrama de la figura 3.23 se observa que las tres series presentan actividad de fosfatasa alcalina. La serie 3 es la que presenta una mayor actividad, incluso por encima del control. Las series 1 y 2 tienen una concentración similar inferiores al control.

**Figura 3.23.- Resultados del ensayo de fosfatasa alcalina.**

La serie 3 presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la serie 1 ( $p \leq 0,05$ ).

La serie 3 presenta un estadio de diferenciación más avanzado que la serie 1, es decir, los osteoblastos maduran más rápido. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de albumen en la composición de la serie 3, Villareal et al. (1998) demuestran en experimentos con cementos y albumen que la composición es un factor dominante en la diferenciación osteoblástica, incluso sugieren la posible influencia en la actividad de la fosfatasa alcalina.

Según estudios científicos realizados la mayor rugosidad promueve una mayor diferenciación celular. Yuasa T. et al. (2003) demuestran que la diferenciación de osteoblastos en la superficie de un cemento es mayor en comparación con el mismo cultivo en plástico (de menor rugosidad). Esto nos lleva a pensar que la mayor rugosidad de la serie 3 sería otro posible factor que provocaría la mayor actividad de fosfatasa alcalina en esta formulación.



Además de los dos factores anteriores, se conoce que durante la proliferación los osteoblastos sintetizan fosfatasa alcalina, de forma que al ser la serie 3 la de mayor nivel de proliferación es lógico que presente el índice de actividad de fosfatasa alcalina mayor.

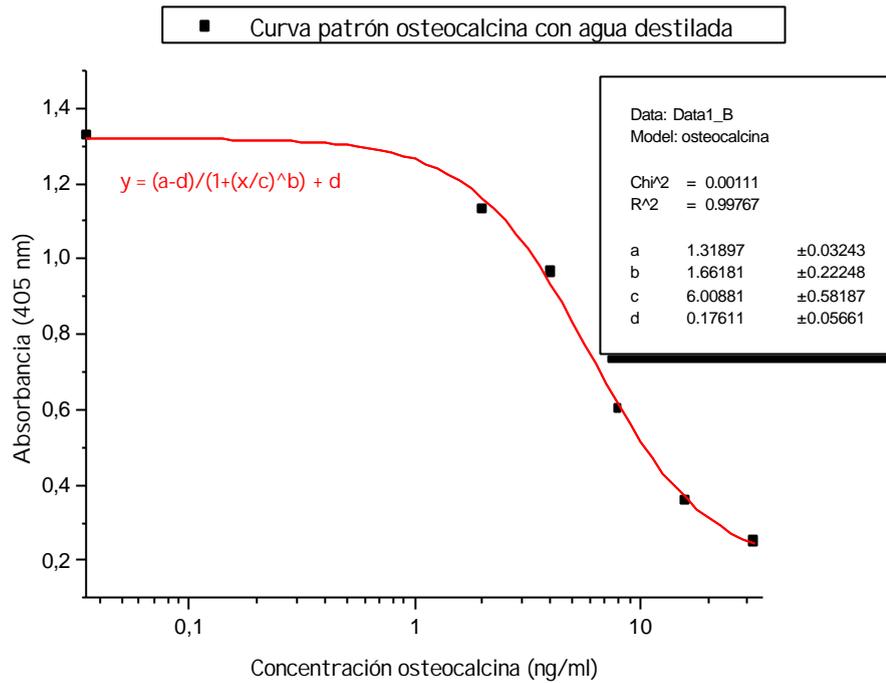
La actividad de la fosfatasa alcalina en la serie 2 demuestra que esta formulación no presenta citotoxicidad, como se señaló en el apartado anterior, ya que es una prueba evidente de la presencia de osteoblastos y de que estos osteoblastos se encuentran activos y con capacidad de diferenciación. Las diferencias en la actividad de fosfatasa alcalina entre las series 1 y 2 no son estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Esto es debido a que ambas tienen idéntica composición y no tienen una rugosidad tan distinta como entre la serie 1 y 3.

### **3.3.3.2 Secreción de osteocalcina**

La osteocalcina o proteína ósea G1a se encuentra exclusivamente en el tejido óseo. Contiene tres residuos de ácido gamma-carboxiglutámico que, según se cree, participan en la unión de los iones cálcicos e hidroxiapatita. Representa el 10-20% de la proteína no colágena en el hueso. Si bien se desconoce la función *in vivo* de la osteocalcina su afinidad con los constituyentes minerales óseos implica que cumple una función básica en la formación ósea.

Se realizan las lecturas de la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm. Se prepara la curva estándar graficando los promedios de las lecturas obtenidas para los patrones de osteocalcina corregidos frente a la concentración.





**Figura 3.24.-** Curva estándar de los patrones de osteocalcina.

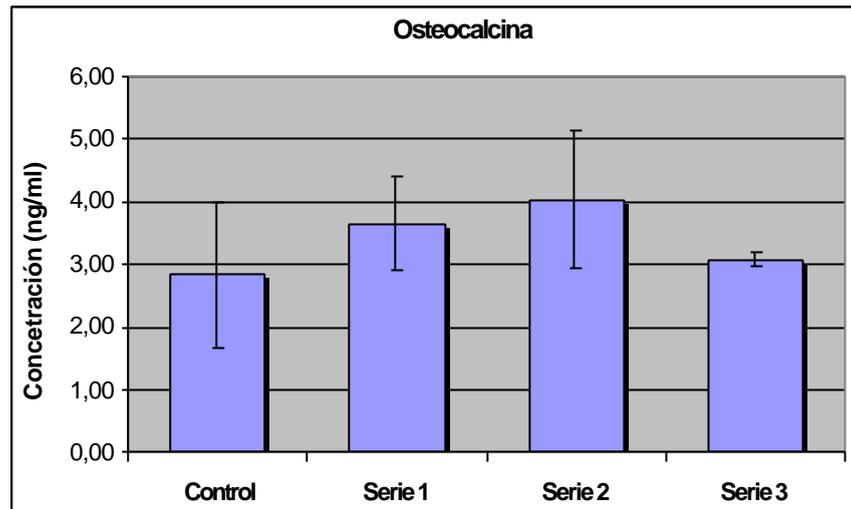
Esta curva nos sirve para determinar la concentración de osteocalcina de cada serie y del control.

**Tabla 3.10.-** Promedios de las concentraciones de osteocalcina (ng/ml).

	Promedio (ng/ml)	Desviación estándar
<b>Control</b>	2.84	1.17
<b>Serie 1</b>	3.64	0.74
<b>Serie 2</b>	4.02	1.10
<b>Serie 3</b>	3.08	0.10

En el diagrama de la figura 3.25 se observa que las series presentan más concentración de osteocalcina que el control. La serie 2 es la que presenta una mayor concentración seguida de la 1 y la 3, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de ellas.





**Figura 3.25.-** Concentración de osteocalcina.

Las tres series presentan substanciales concentraciones de osteocalcina, lo cual es muy importante, ya que indica que no sólo hay células sobre las superficies, sino que además, se desarrollan adecuadamente y con rapidez. Este hecho es importante de cara a mejorar la ostointegración del cemento.

Oreffo R. et al. (1998) examinan la proliferación y diferenciación de dos biocementos encontrando que la diferenciación aumenta al reducirse la proliferación celular. Este comportamiento también lo siguen los cementos estudiados, así pues, la serie 2 presenta la mayor secreción de osteocalcina, seguida de la serie 1 y finalmente la 3 (siguiendo el orden inverso de la proliferación).

La línea celular MG.63 empleada durante todo este trabajo es una línea celular inmadura que se ha utilizado en numerosos estudios para la evaluación del efecto de la rugosidad de los materiales, ya que se sabe que las células más inmaduras son más sensibles a la rugosidad.

Observando globalmente los resultados obtenidos para los dos marcadores de formación ósea éstos nos inducen a pensar que la serie 3 presenta una diferenciación distinta a las otras series. La mayor proliferación celular, mayor actividad de la fosfatasa alcalina y valores de secreción de osteocalcina iguales a las otras dos series nos indican que esta serie demuestra una gran actividad en la proliferación de células óseas y una buena capacidad para formar matriz extracelular. Por el contrario, las series 1 y 2, demuestran una proliferación menor (sobre todo la serie 2) debida a la menor rugosidad, y



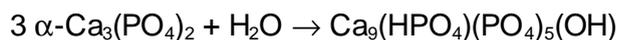
valores más bajos de actividad de fosfatasa alcalina. Aún así, el grado de diferenciación de ambas series es similar al obtenido en la serie 3, según los valores de osteocalcina obtenidos.





## CONCLUSIONES

Los resultados de difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja proporcionan información acerca del producto de la reacción de fraguado en los tres cementos estudiados. Se obtiene una hidroxiapatita deficiente en calcio de baja cristalinidad, similar a las apatitas biológicas según la reacción:



La conversión a CDHA se ve favorecida por el menor tamaño de partícula del polvo de  $\alpha$ -TCP. Además los resultados revelan que la conversión del  $\alpha$ -TCP a CDHA no se ve afectada por la presencia de albumen en la composición del cemento.

La transformación del  $\alpha$ -TCP a CDHA, en idénticas condiciones de tiempo y temperatura, una semana a 37 °C, es mayor cuando el cemento se sumerge en solución Ringer que cuando se expone una atmósfera húmeda, sin contacto directo con el líquido.

Las observaciones mediante de microscopía electrónica de barrido y los resultados de difracción de rayos X demuestran la formación de cristales de hidroxiapatita de diferente tamaño según el tamaño de partícula del  $\alpha$ -TCP empleado. Así, pues, el menor tamaño de partícula de la fase sólida hace que la microestructura final del cemento cambie. En el cemento más fino se disuelve más fácilmente el  $\alpha$ -TCP y se llega a una sobresaturación más elevada favoreciéndose la nucleación de la hidroxiapatita, disminuyéndose así el tamaño de los cristales predipitados y aumentando de forma importante la superficie específica del cemento fraguado.

Los estudios de rugosidad realizados sobre las tres series demuestran que el menor tamaño de partícula del reactivo de la fase sólida induce a una menor rugosidad superficial, a dos niveles, tanto debido al menor tamaño de cristal, como al menor tamaño de los núcleos semiesféricos de apatita que se forman. La adición de albumen en la composición del cemento incrementa la rugosidad superficial considerablemente.

Del estudio in vitro de osteoblastos realizado sobre las tres formulaciones se concluye que los tres materiales son biocompatibles y osteogénicos. Además se puede alterar directamente la función osteoblástica modificando su capacidad de proliferación y de



diferenciación, como la actividad de fosfatasa alcalina y la secreción de osteocalcina, en función de la composición y la microestructura (tamaño cristalino) del cemento.

En referencia al distinto tamaño cristalino se observa el siguiente comportamiento: La menor rugosidad (serie 2) produce un efecto en la proliferación celular. Este efecto es consecuencia de la mayor fuerza de adhesión de los osteoblastos sobre los cristales de la superficie del cemento. Esto provoca que se observen valores de proliferación menores debido a dos posibles motivos: la técnica no es lo suficientemente efectiva para desenganchar los osteoblastos durante la etapa de proliferación o bien sucede una proliferación más lenta debido a la dificultad de movimiento que tienen las células.

La reducción en la proliferación celular está directamente relacionada con un aumento de la diferenciación de los osteoblastos y en la producción de matriz extracelular, así se obtienen los mejores resultados en el marcador de formación ósea (osteocalcina) alcanzando un estadio de diferenciación de los osteoblastos más maduro.

La presencia de albumen en la composición del cemento (serie 3) produce un aumento en la rugosidad superficial que favorece la proliferación celular de los osteoblastos. Además induce a una mayor actividad de la fosfatasa alcalina, alcanzando un primer estadio de diferenciación significativamente mayor que en las otras series y una secreción de osteocalcina menor, aunque sin apreciarse diferencias significativas en la madurez final de los osteoblastos.

Los resultados obtenidos nos llevan a pensar que tanto la adhesión como la proliferación de los osteoblastos dependería de la rugosidad superficial de los cementos. Asimismo, la diferenciación es función de la proliferación y de la composición del cemento.



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Pau Ginebra el haber dirigido este proyecto, por su ayuda, atención y dedicación que me ha prestado en todo momento.

También quiero dar las gracias al Dr. José Angel Delgado por sus explicaciones, consejos, ayuda e ilusión que me transmitió para la realización de este proyecto. Gracias por los ánimos y el optimismo que infundiste en mí.

Agradecer también a los doctores José Maria Manero y a Jordi Diaz por su ayuda en el estudio de rugosidad y las microfotografías, por haberme atendido siempre que lo he necesitado. A Elisabeth Engel por todo lo que me ha enseñado y ayudado en la realización del estudio *in vitro*.

Doy las gracias de forma muy especial a toda la gente con la que he compartido laboratorio y ha hecho que el tiempo transcurrido haya sido muy agradable, Alex, Carol, Marta, Melba, Montse, Sergio y en especial a Amisel que siempre estuvo disponible para ayudarme a superar las dificultades, os deseo mucha suerte en vuestros doctorados. Igualmente a Conrado y a Gastón. A Iris, Pablo y Aleix.

A mis amigos y compañeros de carrera: Carlos, Enric, German, Jaume y Robert.

Gracias a mi familia y a todos mis amigos.

Mil gracias a Noemi... por todo.





## BIBLIOGRAFIA

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amirall A., Ginebra M.P., Planell J.A. "Estudio de la inyectabilidad en cementos de fosfato de calcio" Congreso internacional de Biomateriales 2003.
- Anselme K. [et al ] "In vitro growth of human adult-bone derived cells on hydroxyapatite plasma-sprayed coatings". J. Biomed Mat Res 1998; 34: 247-259.
- Benett, J.M., Mattsson L., "Introduction to surface roughness and scattering". Optical Society of America, Washington D.C. 1989.
- Boyan B. [et al ] "Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography" Calcified Tissue International 2001; 49: 256-263.
- Boyan B. [et al ] " Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology" Annual Review of Materials Research. 2001 pp 257 – 371.
- Brunette M. "The effects of implant surface topography on the behaviour of cells". Int. J. Oral Maxillofac Implants 1998; 3: 231-246.
- Knabe C. [et al.] "Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures" J. Biomed Mat Res,52, p. 498-508, 2000.
- Oreffo R. [et al ] "Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements". Biomaterials 1998; 19: 1845-1854.
- Oreffo R. [et al ] " Effects of novel calcium phosphate cements on human boen marrow fibroblastic cells". Tissue Eng. 1998; 4: 293-303.
- Villareal D. , Sogal A., Ong JL. "Protein adsorption and osteoblasts responses to different calcium phosphate surfaces". J. Oral Implantol. 1998; 24: 67- 73.
- Yuasa T. [et al ] "Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro". Biomaterials 2003; 25: 1159-1166.



## **BIBLIOGRÁFIA COMPLEMENTARIA**

- Almirall A. [et al ] “Effect of Albumen as Protein based Foaming Agent in a Calcium Phosphate Bone Cement”.
- Andrades J.A. [et al ] “Selección, amplificación, inducción y diferenciación de células osteoprogenitoras: una alternativa para la reparación ósea” (1999) *Mapfre Medicina*; 10: 190-201.
- Aubin J.E. [et al ] “Osteoblas and chondroblast differentiation” 1995 *Bone Vol.17*: 77s – 83s.
- Berry E.E. “The structure and composition of some calcium deficient apatites”. *J.Inorg. nucl. Chem* 29, 317-327 (1967).
- Blunt L., Ohlsson R, Rosén B.G. “A Comprehensive Comparative Study of 3D Surface Topography Measuring Instruments”. *Proceedings Nordtrib, Uppsala, Sweden, June 13-15 1994*.
- Buseck E., Cowley J., Eyring L. (eds.) “High resolution transmission electron microscopy”. Oxford University Press, London 1988.
- Cons F. “Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: aplicaciones clínicas” Unidad de diagnóstico de osteoporosis. 2000. Mexico.
- Declercq H. [et al ] “Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source” *Biomaterials* 2004; 25: 757-768.
- Dong, W.P. [et al ] “Instruments and measurement techniques of 3-dimensional surface topography” En: Stout, K.J. (ed.) *Three dimensional surface topography; Measurement, Interpretation and Applications*. Penton Press, London 1994.
- Driessens FCM [et al ] “Calcium phosphate bone cement” *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part B, Applications*, 1995 vol. 2: 855-877.
- Driessens FCM [et al ] “In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement”. *J. Materials Science Mat Med* 1995; 6: 272-278.



- Dyson, J. "Interferometry as a measuring tool". The machinery Publishing Co Ltd Brighton, Sussex, England 1970.
- Fowler B.O., Brown W.E. "Infrared spectra of hidroxiapatite octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate" Arch. Or. Biol. 11 447-492 (1966).
- Fowler B.O. "Infrared studies of apatites. I. Vibrational Assignments for calcium, strontium and barium hydroxyapatites utilizing isotropic substitution" Inorg. Chem 13, 194-207 (1974).
- Ginebra M.P. "Effect of various additives and temperature on some properties of an apatitic calcium phosphate cement". J. Mater Sci Mater Med 1995; 6: 612 – 616.
- Ginebra M.P. [et al ], "Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricalcico- $\alpha$  para aplicaciones quirúrgicas" Universitat Politècnica de Catalunya, Tesis doctoral, 1996.
- Ginebra M.P. [et al ], "Behaviour of a calcium phosphate cement to body fluid constituents". Trans 5<sup>th</sup> World Biomaterials Congress; 1996; p.349.
- Golstein, J. [et al ], "Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis" Plenum Press, New York 1988.
- Goldstein J.I. [et al ]; "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists". Second ed. Plenum Press. Mew York (1993).
- Hardy J.P., Anderson V.J. and Gardner J.S. "Stomatal characterisation of grass leves by four preparation techniques". Micros: The Key Research Toll 22(1): 87-90. (1992).
- John Paul "Cell and Tissue Culture" (1975) 5<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Jumpei A. "Tricalcium Phosphate and its variation" Bulletin of Chemical Society of Japan, 1958.
- Lampin M. [et al ] "Correlation Between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration" J. Biomed Mater Res, 1997; 36: 99-108.



- Lautenschlager, E. P., S. I. Stupp y J. C. Keller (1979) en Functional Behaviour of Orthopedic Surgery. P. Ducheyne, G. W. Hastings (eds.). Florida: CRC Press.
- Makosh, G., Drollinger B., "Surface profile measurement with a scanning differential ac interferometer". Appl. Opt 1984; 23:4544 - 4553.
- Newell R. [et al ] "High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation" Biomaterials 2003; 25: 1215 – 1224.
- Odontología hoy. Revista científica mensual editada por la Sociedad Impresora Americana S.A. Números 10, 11 y 18. Año 1997.
- Parsons E., Bole D., and Thomas W.D.E. "A comparative survey of techniques for preparing plant surfaces for the scanning electron microscope". Journal Microsc. 101:59-74. (1973).
- Proubasta I., J. Gil Mur y J. A. Planell (1992) Fundamentos de biomecánica y biomateriales. Madrid: Ediciones Ergon.
- Rodrigo A.M. [et al ] "Efecto del polietileno sobre las células osteoblásticas: influencia del tamaño de partícula" Mapfre Medicina, 2000, Vol. 11: 81-87.
- Stout K-J. [et al ] "The development of methods for characterization of roughness in three dimensions". EUR 15178 EN of Commission of the European Communities, University of Birmingham, Birmingham 1993.
- Thomas, T.R. "Rough Surfaces", Longman Group Limited, London 1982.
- Ultradent: Materiales y procedimientos. Año 1998. Editorial Merch Valley Utah.
- Uwins P.J.R., Murray M. and Gould R.J. "Effectis of four different processing techniques on the microstructure of potatoes: Comparison with fresh samples in the ESEM". Micros. Res Tech. 25:412-418. (1993).



## ANEXOS

### ANEXO A: FUNDAMENTO TEÓRICO

En la última década, el interés por los fosfatos de calcio ha ido en aumento debido a las posibilidades quirúrgicas de su aplicación, ya sea como relleno de cavidades óseas, sustitución de hueso, recubrimiento de prótesis metálicas (aplicado principalmente las prótesis de cadera y tobillo), así como dispositivos controlados de liberación controlada de fármacos, substratos para el crecimiento de nuevo tejido (ingeniería de tejidos), etc.

Su uso en la cirugía del sistema esquelético está principalmente condicionada por la gran similitud que presentan con respecto al hueso mineral, ya que el constituyente principal del hueso humano está constituido por hidroxapatita (HA), cuya formulación química es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , y presenta una relación  $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ . Sin embargo, la HA biológica difiere de la estequiométrica en cuanto a que la HA biológica es deficiente el calcio, además de presentar iones carbonato, potasio, sodio, etc, y de ser poco cristalina.

Actualmente, los cementos de fosfato de calcio (CPC's) están presentando un gran interés, proponiéndose por ello varias formulaciones. De hecho, el desarrollo de los CPS's inyectables presentan buenas perspectivas en el campo de la sustitución ósea, ya que se basa en el uso de cementos aplicables de forma pastosa, presentando por ello una menor agresividad que la cirugía clásica.

Estos cementos de fosfato de calcio se forman mediante la mezcla de una solución acuosa y de uno o varios fosfatos de calcio, los cuales se disuelven en una solución, para *a posteriori*, precipitar uno de ellos (el menos soluble).

Uno de los fosfatos de calcio que más se está utilizando en la actualidad es el fosfato tricálcico (TCP), el cual presenta la formulación  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , y su elevada utilización se basa en las características que presenta su proceso de hidrólisis.



## A.1.- HISTORIA

La necesidad de encontrar materiales capaces de reparar el hueso humano viene dada desde hace ya décadas. Los esfuerzos principales se centraron en los materiales cerámicos, tales como la Zircona y la Alúmina, siendo las principales razones de su elección, el excelente comportamiento a la corrosión, alta dureza, y a su bajo coeficiente de fricción y roce. Pero ya en la década de los 70 empiezan a utilizarse nuevas cerámicas, conocidas con el nombre de cerámicas bioactivas, debido a que su composición se asemeja a la fase mineral del hueso humano, formado éste principalmente de hidroxapatita carbonatada. Como principales materiales cerámicos bioactivos, se empiezan a comercializar la hidroxapatita (HA) o el  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Pero dichas cerámicas presentan el inconveniente de su proceso de producción, ya que precisan de una sinterización a elevada temperatura, con lo que se obtiene el material cerámico con una determinada forma o granulometría, así como con un determinado tamaño de partícula, con lo cual condiciona o dificulta su aposición (adaptación y fijación), en la cavidad ósea en la que debe de ir situada.

Por todo ello, ya en los años 80, la idea de un nuevo material que sustituya al hueso crea la terminología CPBC (calcium phosphate bone cement), es decir, "cementos óseos de fosfato de calcio". Dichos cementos tienen la ventaja de presentar moldeabilidad e inyectabilidad lo que conlleva a la posibilidad de poder llenar la cavidad afectada del hueso en la propia sala de operaciones, dentro de unas aceptables propiedades mecánicas, y en un razonable tiempo clínico. Otras propiedades de los CPBC radican en su capacidad de activar las células óseas, tales como los osteoblastos en la función de regeneración de hueso cambiando la estructura de dichos cementos con el paso del tiempo.

En 1983, Brown y Chow fueron capaces de sintetizar hidroxapatita en su forma monolítica a temperatura ambiente, partiendo de un proceso de cementación mediante hidrólisis. Ello abrió grandes expectativas, ya que se abría la posibilidad de utilizar un material moldeable en la misma cavidad en la cual había de ser insertado, todo ello con una buenas propiedades de dureza, fijación y contacto con el tejido óseo necesario para el correcto crecimiento del tejido óseo. Desde entonces, muchas investigaciones se han llevado a cabo hasta la actualidad, hasta desarrollar cementos de fosfatos de calcio inyectables, más sencillos de aplicar, así como con una mejor bioactividad, y lo que es más importante, con la posibilidad de reabsorción por parte del hueso humano, con lo que el implante desaparece tras un cierto período de tiempo, en el cual el hueso vuelve a reconquistar la zona dañada.



## A.2.- BIOMATERIALES DE FOSFATO DE CALCIO

### A.2.1.- Introducción a los biomateriales

Los materiales cerámicos aunque frágiles, presentan una excelente resistencia al desgaste y a las cargas compresivas, siendo como ejemplos más representativo, el grupo de los fosfatos de calcio, los cuales engloban los compuestos tales como la Hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP), el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), el fosfato dicálcico anhidro (DCPA) y el fosfato tetracálcico (TTCP). Otros tipos de biocerámicas que se utilizan actualmente son los compuestos basados en óxidos, siendo ejemplos representativos de este grupo la Alúmina (muy utilizada en las prótesis de cadera), la zircona, el óxido de titanio... Otros grupos que pueden llegar a denominarse biocerámicas son los vidrios y los vidrios-cerámicos. Por tanto, como materiales biocerámicos, podemos incluir los siguientes grupos o categorías: Alúmina, Zircona, Fosfatos de calcio, Vidrios cerámicos o vidrios basados en el silicio y Carbones pirolíticos.

Aunque hay gran cantidad de biocerámicos, los compuestos basados en los fosfatos de calcio son los más comúnmente utilizados, en especial la HA y el TCP. La razón principal es que presentan casi la misma composición química que el esqueleto (el 69% del hueso es HA), tienen una excelente biocompatibilidad, y una vez son introducidos en el paciente *in vivo*, ejercen una unión química con el hueso transcurrido un cierto tiempo, llegando a formar parte de él progresivamente, incorporándose al tejido óseo.

#### Tipos de respuesta del tejido al material implantado

Cuando un material es implantado en el cuerpo humano, éste puede reaccionar de dos posibles maneras, ya sea el material *tóxico* o *no tóxico*. En el caso de que el material sea *tóxico*, el tejido vivo reacciona contra el implante, con lo que los tejidos circundantes al material implantado mueren. En el caso de que el material sea *no tóxico*, éste se puede dividir en 3 subgrupos. En el 1<sup>er</sup>. subgrupo se englobaría el material biológicamente inactivo, por lo que los tejidos no se ven afectados por el material. En el 2<sup>o</sup>. subgrupo se encuentran los materiales biológicamente activos, los cuales crean una unión con el tejido. Como 3<sup>er</sup>. subgrupo se encuentran los materiales reabsorbibles, en los cuales, el material implantado es reemplazado progresivamente con el tiempo por tejido óseo.



Otro tipo de clasificación en el caso de las biocerámicas, es según el tipo de fijación o unión, pudiendo estar clasificados en 4 tipos:

- Morfológicos: cerámicas inertes no porosas, se adhieren al hueso sin una unión química en la intercara.
- Biológicos: el hueso crece en el interior de los poros de la biocerámica inerte, llevando a una unión mecánica.
- Bioactivos: el material biocerámico se adhiere al hueso por una unión química en la intercara.
- Reabsorbibles: el material biocerámico es reabsorbido por un proceso de disolución, y reemplazado por hueso.

Biodegradabilidad es un término que se utiliza para definir la reabsorción, la cual determina la estabilidad estructural de la cerámica en el hueso.

Asimismo, la bioreabsorción es la habilidad del cuerpo humano para degradar la cerámica, siendo este proceso controlado por 2 variables: la composición química y el área superficial. Con respecto a la reabsorción, los compuestos de fosfato de calcio se pueden clasificar como no degradables o "permanentes", parcialmente degradables, o completamente degradables, considerándose por ello la HA como permanente, ya que transcurridos 3-4 meses tras su implante en el cuerpo humano, todavía permanece. Por otro lado, el TCP es más reabsorbible que cualquier compuesto de fosfato de calcio, ya que desaparece gradualmente entre las 6-15 semanas de la operación, dependiendo de su porosidad y de su estequiometría. Sin embargo, hay que tener presente el concepto de la relación existente entre el grado de reabsorción y el grado de crecimiento del tejido óseo, teniendo que ser estos *ratios* o relaciones parecidas, ya que caso de no ser así, si el implante es reabsorbido demasiado rápido, pueden llegarse a formar poros en la nueva estructura ósea.

### **A.2.2.- Concepto de bioactividad**

El grupo de los fosfatos de calcio presentan la propiedad de ser capaces de propiciar o potenciar la regeneración ósea. De hecho, como se muestra en este proyecto, ciertos compuestos de fosfatos de calcio fomentan la deposición en su superficie de nuevo hueso vivo, mediante la acción de las células osteoblásticas.



Otro factor a tener en cuenta, es el proceso de la reabsorción de algunos fosfatos de calcio por parte del cuerpo humano, lo cual conlleva a una eliminación progresiva del implante de fosfato de calcio, fruto de un lento proceso de disolución en el medio, el cual es función de la concentración de iones y del Ph del medio, proceso de disolución que únicamente es aconsejable para unos cierto tipos de fosfatos de calcio. Estas y otras propiedades de los fosfatos de calcio, hacen que sean propicios para su uso como sustituto de partes dañadas del esqueleto humano, debido a la bioactividad que dichos fosfatos pueden llegar a aportar al organismo.

### **A.2.3.- Cementos de fosfato de calcio**

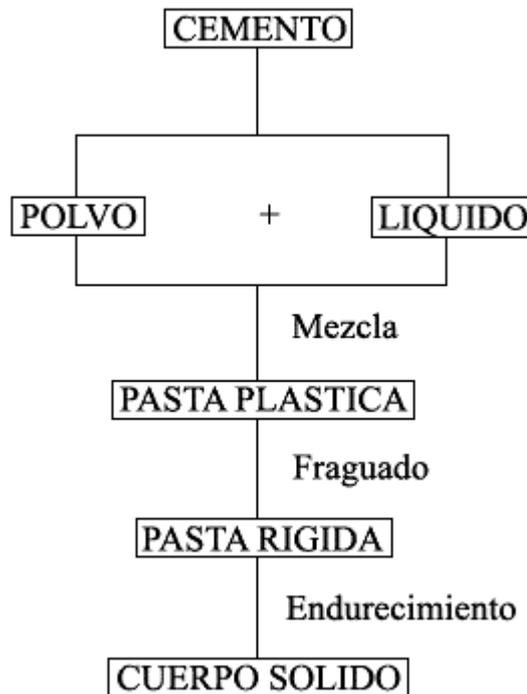
Una de las características principales que presentan los cementos radica en el hecho de que partiendo de una fase en polvo, la cual es mezclada con una fase líquida, obtenemos una masa coherente, la cual se va endureciendo con el paso del tiempo, adquiriendo también una progresiva resistencia mecánica. Se pueden hacer dos posibles grupos, uno de los cuales serían los cementos basados en compuestos orgánicos (los cuales presentan reacciones de polimerización), mientras que el otro grupo posible sería el de los cementos basados en compuestos inorgánicos, que son nuestro objeto de estudio.

Dichos cementos presentan la posibilidad de poseer unas ciertas propiedades plásticas, las cuales se obtienen tras mezclar la fase polvo (en nuestro caso, fase inorgánica) con una solución acuosa, dando lugar a una pasta moldeable. Esta propiedad, que en un principio parece irrelevante, cobra una importancia elevada por el hecho de que nos permite amoldar o adaptar dicha "pasta" o mezcla a una cavidad, fraguando *a posteriori*.

Se considera que en el paso de pasta a cuerpo sólido, tienen lugar dos etapas, siendo la primera de ellas la pérdida de plasticidad, proceso por el cual, aunque dicha pasta vuelva a ser mezclada de nuevo con agua, no va a retornar a su plasticidad inicial.

A la segunda etapa, se la puede denominar con el nombre de etapa de consolidación, en la cual la pasta endurece completamente, aumentando con ello su dureza y resistencia mecánica, y perdiendo por tanto su total plasticidad (presente en la primera etapa). Estos procesos se conocen con los nombres de fraguado y endurecimiento, respectivamente.





**Figura a.1.** - *Proceso de formación del cemento.*

El proceso de fraguado empieza en el mismo momento en el que el polvo cementante entra en contacto con la solución acuosa, momento en el que en la fase líquida empieza a dispersar iones resultantes del polvo cementante, los cuales se harán importantes en el balance de fuerzas de Van Der Waals, así como en las fuerzas electrostáticas creadas entre las partículas. Dicho proceso de fraguado puede ir evolucionando a una pasta, a medida que va avanzando la hidratación, con lo que van entrando en juego otro tipo de variables, como son la difusión, la temperatura, el tiempo...

Según el tipo de cemento, se necesita un intervalo de tiempo determinado de fraguado, que necesita la pasta para adquirir una cierta resistencia mecánica. Para ello hay que definir el *tiempo de fraguado*, que es el intervalo de tiempo desde que la fase sólida entra en contacto con la fase líquida, hasta que la reacción evoluciona hasta obtener una pasta resistente a una cierta presión, la cual es fijada arbitrariamente.

Dicho tiempo de fraguado puede verse influenciado por varios factores, ya sean su relación líquido/polvo, la temperatura, la humedad..., condicionando por tanto, dicho tiempo.

La inestabilidad de un fosfato de calcio está relacionada directamente con su proceso de formación, ya que algunos fosfatos de calcio pueden llegar a ser obtenidos mediante precipitación de alguna solución saturada a una temperatura determinada, mientras que



otros pueden llegar a ser obtenidos mediante una reacción en estado sólido obtenida a una elevada temperatura. Es por ello que los fosfatos de calcio en una solución acuosa no han de ser entendidos únicamente como una sustancia que depende únicamente de sus curvas de solubilidad, sino que también dependen muy directamente de su proceso de formación (o estabilidad térmica durante su preparación).

Como ejemplo de compuestos de calcio obtenidos mediante reacciones de precipitación o mediante reacciones térmicas, se puede observar la tabla 1, en donde aparecen definidas las principales formulaciones de los compuestos de fosfato de calcio, obtenidas mediante dichas reacciones.

Un ejemplo característico de reacción de precipitación vendría representado por el sistema ternario  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ , en el que un cierto número de fosfatos de calcio se obtienen mediante precipitación, llegándose a obtener sólidos cristalinos con una estequiometría definida.

Por otra parte, no todos los fosfatos de calcio del sistema  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  pueden obtenerse por precipitación a temperatura ambiente o corporal, sino únicamente los que se recogen en la tabla 2.

También existen ejemplos de fosfatos de calcio que únicamente pueden llegar a ser obtenidos mediante una reacción a temperatura elevada, como pueden llegar a ser el fosfato tricálcico (TCP), el fosfato tetracálcico (TTCP), y la Hidroxiapatita (HA).



**Tabla a.1.** Principales formulaciones de compuestos de fosfato de calcio, obtenidas tanto mediante reacciones térmicas como mediante reacciones de precipitación.

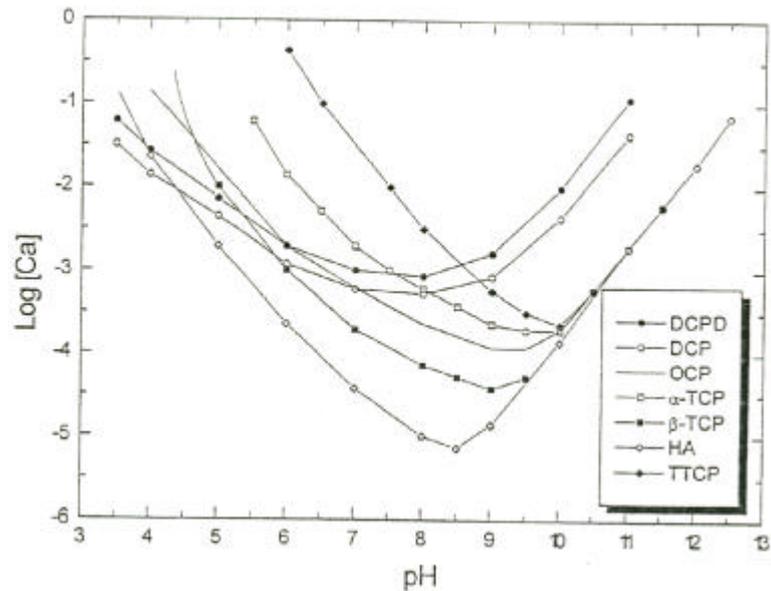
Ca/P	COMPUESTO	FORMULA
0,5	Monocalcio Fosfato Monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,5	Monocalcio Fosfato Anhidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1	Dicalcio Fosfato Dihidratado (DCDP)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1	Dicalcio Fosfato (DCP)	$\text{CaHPO}_4$
1,33	Octocalcio Fosfato (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,5	Fosfato Tricálcico Alfa ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5	Fosfato Tricálcico Beta ( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,67	Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$
2	Fosfato Tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$

**Tabla a.2.** Fosfatos de calcio que pueden precipitar a temperatura ambiente o corporal.

Ca/P	Fosfato de calcio	Fórmula	PH
1.35	Fosfato de calcio amorfo	-----	4-9
0.5	Fosfato monocálcicomonohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0-2
1.0	Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2-6
1.33	Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.5-7
1.5	Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	6.5-9.5
1.67	Hidroxiapatita precipitada (PHA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9.5-12

A continuación se expone el gráfico basado en el diagrama terciario  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a 37°C, el cual es bastante representativo, ya que a parte de visualizarse en ella las principales isotermas de solubilidad de los fosfatos de calcio, nos da a entender qué compuestos son más estables que otros a una temperatura y presión dada (en este caso, es presión ambiente, a una temperatura de 37°C), lo cual implica que una serie de compuestos se crean a partir de otros, como puede llegar a ser el caso de la precipitación de la hidroxiapatita (HA), a partir del fosfato tricálcico alfa ( $\alpha$ -TCP).





**Figura a.2.**-Isotermas de solubilidad de diferentes sales de fosfato de calcio, la cuales están en equilibrio con sus respectivas soluciones, según el diagrama terciario  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a  $37^\circ\text{C}$ , en relación logaritmo de la concentración de iones  $\text{Ca}$ , versus el pH del medio.

En este aspecto, se observa que para valores de  $\text{pH} > 4.5$  y  $\text{pH} < 10.5$ , la HA es el fosfato de calcio menos soluble, lo que es lo mismo que decir que será la que precipitará más rápido que las restantes, y de manera más estable.

De ésta última propiedad también se extrae por tanto, que de todas estas sales en disolución, serán capaces de precipitar HA, puesto que como se ha dicho con anterioridad, todas ellas pertenecen al sistema terciario  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ .



## ANEXO B: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

### B.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA: DIFRACCIÓN DE RAYOS X

En el espectro electromagnético, los rayos X se encuentran entre los rayos gamma de longitud de onda menor y la región del ultravioleta de longitud de onda mayor, es decir, entre los 0.1Å y 100Å. La difracción de rayos X tiene lugar cuando las ondas se dispersan desde un objeto e interfiere destructivamente con otros.

A partir de la representación del átomo de Bohr se puede entender la obtención de los rayos X. Cuando un electrón interno, generalmente del nivel K ó L, es expulsado del átomo por otro electrón de energía elevada (rayo X primario), un tercer electrón que se encuentra en un nivel electrónico más externo puede caer en el orbital vacío emitiendo simultáneamente un fotón de rayos X. La energía del rayo X emitido corresponde exactamente a la diferencia de energías entre los dos niveles que intervienen. Por ejemplo, si se expulsa un electrón del nivel K y un electrón del nivel L ocupa su lugar, se obtiene el rayo X  $K_{\alpha}$  que tendrá la energía expresada en la siguiente fórmula, donde  $E_L$  y  $E_K$ , representan las energías de los niveles L y K respectivamente.

Las líneas de la serie K se obtienen cuando se expulsa un electrón del nivel más interno K, las líneas de la serie L se obtienen cuando se expulsa un electrón del nivel L, etc. Los subíndices  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc. se usan para identificar el nivel electrónico original del electrón que ocupa el lugar vacío. Así, una transición desde el nivel energético más cercano se indica con la letra  $\alpha$ , la de los siguientes con la letra  $\beta$ , y así sucesivamente.

En la práctica, el espectro de rayos X emitido por un elemento dado puede consistir en una serie de líneas agudas y características tal como se deduce de la discusión precedente o bien puede ser un espectro mucho más complicado formado por un espectro continuo de rayos X que presenta unas líneas espectrales muy agudas superpuestas. El que se obtenga uno u otro depende de si se ha utilizado rayos X primarios o electrones de elevada potencia para bombardear el elemento y expulsar el electrón de un nivel interno.

El espectro continuo se debe sencillamente a la rápida desaceleración de los electrones que bombardean la muestra, debido a las múltiples interacciones que tienen lugar con los



electrones de la misma medida que los primero pasan a través del material. La energía perdida se transforma en una radiación continua de rayos X que presenta un mínimo de longitud de onda  $\lambda_{\min}$  (frecuencia máxima) que corresponde a la energía máxima de los electrones. Esta longitud de onda límite es inversamente proporcional al voltaje aplicado tal como se ve en la siguiente ecuación:

$$\lambda_{\min} = h c / V e$$

Donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, e la carga del electrón y V el voltaje de aceleración aplicado al tubo de rayos X.

En la primera década de 1900 W. L. Bragg fue el primero en demostrar que los procesos de dispersión propios de la difracción pueden ser visualizados como si los rayos X fuesen reflexiones de los planos imaginarios definidos por los índices de Miller. Existen dos espectros geométricos a tener en cuenta, el primero es que el haz incidente, la normal al plano de reflexión y el haz difractado son siempre coplanares. El segundo es que el ángulo entre el haz difractado y el haz transmitido es siempre  $2\theta$ . Este ángulo se denomina ángulo de difracción y es el que se mide experimentalmente.

La difracción en general tiene lugar sólo cuando la longitud de onda del haz es del mismo orden de magnitud que la distancia interplanar, Este requerimiento se expresa en la ley de Bragg, de forma que el  $\sin\theta$  no puede ser mayor que 1.

$$n \lambda / 2 d = \sin\theta \leq 1$$

Esto significa que  $n \lambda$  a de ser menor que  $2d$ . Para la difracción el valor más pequeño es  $n=1$ , ya que  $n=0$  corresponde al haz difractado en la misma dirección que el haz transmitido. Por lo que, la condición de difracción para cualquier ángulo observable cumple  $\lambda \leq 2d$ .



## **B.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA**

### **B.2.1 Granulometría**

Esta técnica utiliza el fenómeno de la dispersión a pequeños ángulos de un haz de luz láser proyectado sobre un flujo de partículas suspendidas en un fluido. Cuando el haz luminoso incide sobre un conjunto de partículas una parte se dispersa (difracta), una parte es absorbida y otra transmitida.

En un equipo típico de difracción, un láser de He-Ne emite un haz, el flujo del cual se expande e irradia sobre las partículas suspendidas en el fluido, el haz pasa a través de una lente condensadora que forma su imagen en un detector de células fotoeléctricas situado en el foco de la lente. El patrón de difracción que se obtiene es un conjunto de anillos concéntricos alternativamente brillantes y oscuros que corresponde a la distribución de partículas.

Utilizando la teoría de difracción de Fraunhofer y la dispersión de Mie, se pueden aprovechar los valores de la intensidad para calcular la distribución de tamaños de partícula de la muestra. La radiación dispersada incluye las partes difractada, refractada y reflejada. La radiación absorbida se transmite a una longitud de onda mayor y el dispositivo detector no la recoge.

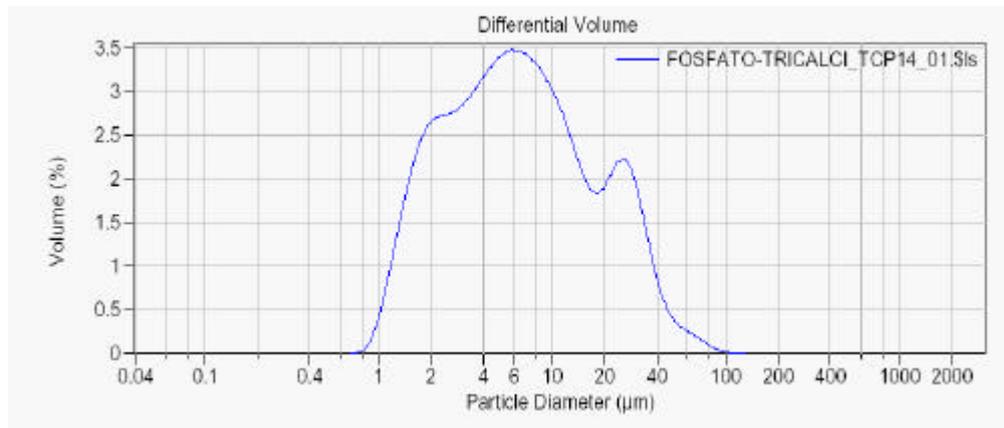
Una vez el polvo está disperso en el medio líquido se hace circular de manera continua por un circuito, pasando por una célula transparente sobre la que incide el haz láser y se mide el flujo de luz difractada a diferentes ángulos.

La técnica de medida utilizada proporciona la distribución acumulativa de volumen y la distribución diferencial de volumen (ver figura):

- Distribución acumulativa de volumen: porcentaje del volumen total (en ordenadas) de la muestra formado por partículas que tienen un tamaño inferior al valor representado en abcisas. La distribución de volumen se identifica con la distribución en peso cuando la densidad es la misma para todas las partículas.

- Distribución diferencial de volumen: representación del % de volumen de muestra (en ordenadas) que ocupan las partículas de un determinado tamaño (en abcisas).





**Figura b.1.-** Distribución del tamaño de partícula del a-TCP.

Una distribución de este tipo permite calcular una serie de valores que caracterizan la distribución, como por ejemplo:

- Media del tamaño de partícula  $d_{50}$ : tamaño de partícula que cumple que un 50% de volumen de la muestra está formado por partículas de tamaño inferior al valor medio. También se pueden dar los valores que cumplen esta condición para un 10% o un 90% del volumen de la muestra,  $d_{10}$  y  $d_{90}$  respectivamente.

- El tamaño medio de partícula en volumen ( $M_v$ ) es:

$$M_v = \frac{\sum V_i d_i}{\sum V_i}$$

Donde  $V_i$  es el volumen ocupado por las partículas de tamaño  $d_i$ .

- El tamaño medio de partícula en número ( $M_n$ ) es la media aritmética del tamaño de partícula respecto al número de partículas. Si  $V_i$  es el volumen ocupado por  $N_i$  partículas de tamaño  $d_i$ , se puede escribir:

$$M_n = \frac{\sum d_i N_i}{\sum N_i} = \frac{\sum (V_i / d_i^2)}{\sum (V_i / d_i^3)}$$

### B.2.2 Superficie específica

Como hipótesis de partida se aceptan los siguientes supuestos:

a) la superficie adsorbente es uniforme y la ocupación de una zona del sustrato por una partícula de gas es independiente de la ocupación de las zonas vecinas.



- b) las moléculas de gas adsorbidas pueden actuar como sustrato para otras moléculas de gas. Estas hipótesis derivan en la teoría que se conoce como la isoterma de BET (del nombre de sus descubridores, Brunauer, Emmett y Teller), de la que se deduce una ecuación que relaciona la cantidad de gas adsorbida por el polvo con la superficie total del polvo. La cantidad de gas adsorbida depende además de la presión parcial del gas, y de la presión de saturación del adsorbato a la temperatura de adsorción (temperatura del nitrógeno líquido). A partir de la medida experimental de la cantidad de gas adsorbida se deduce la superficie específica de la muestra.

### B.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La espectroscopia de infrarrojo estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. La región infrarroja del espectro, incluye la radiación comprendida entre los 12800 y los 10  $\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones se centran en la región del infrarrojo medio comprendida entre los 4000 y los 500  $\text{cm}^{-1}$ .

Cuando la radiación infrarroja atraviesa una sustancia, parte de esta radiación se transmite, mientras el resto es absorbida en distinto grado, en función de la sustancia y la longitud de onda de la radiación.

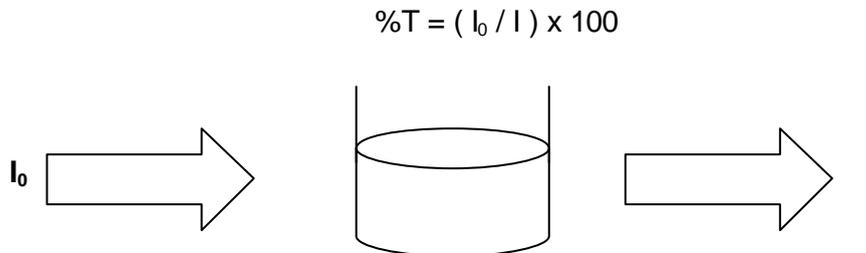
La absorción de la radiación IR promueve las partículas de la muestra desde su estado normal a temperatura ambiente a uno o varios *estados excitados* de energía más elevada, provocando cambios en el modo de vibración de las moléculas. Como la energía asociada a estos cambios es de la misma naturaleza que la radiación infrarroja se puede estudiar en esta región espectral.

Ahora bien, no todas las moléculas pueden absorber la radiación IR. Para poder absorberla, éstas deben experimentar un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración y rotación.

En una molécula, pueden distinguirse dos tipos básicos de vibraciones: de *tensión* y de *flexión*. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de *tijereteo*, de *balanceo*, de *aleteo* y de *torsión*. Cualquier cambio en la amplitud de estas vibraciones da lugar a un pico de absorción en el espectro.



Teniendo en cuenta que cada molécula o grupo funcional tiene una absorción característica, se puede registrar el porcentaje de radiación transmitida (transmitancia, T) en función de la longitud de onda o la frecuencia, e identificar así los grupos funcionales característicos de cada compuesto.



Existen dos tipos de espectrofotómetros: los de *barrido de doble haz* y los de *transformada de Fourier*. Los primeros analizan cada longitud de onda absorbida comparándola con un blanco (suele ser aire). Los de transformada de Fourier hacen incidir todo el espectro de longitudes de onda sobre la muestra varias veces, la radiación transmitida se recoge como una señal de interferencias (interferograma) a la que se le aplica la operación de transformada de Fourier para obtener el espectro.

## B.4 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE

### B.4.1 Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido utiliza como sonda un haz de electrones procedente de un cañón de electrones. Dicho cañón está formado por un filamento de tungsteno que actúa como cátodo montado en un cilindro (Wehnelt) que contiene una pequeña apertura. El ánodo es una placa plana, conectada a tierra, con una apertura axial a través de la cual pasan los electrones. Los electrones procedentes del filamento son emitidos termoiónicamente con energías bajas ( $< 1$  eV) antes de ser acelerados por el campo eléctrico del cañón adquiriendo una gran energía cinética. Posteriormente, este haz de electrones es focalizado a través de la columna mediante lentes electromagnéticas hasta llegar a la muestra.



Cuando interacciona un haz de electrones sobre un material se producen una serie de señales que pueden ser de gran utilidad a la hora de caracterizar los materiales. Con la técnica del microscopio electrónico de barrido se estudian los electrones dispersados hacia atrás o reflejados y los electrones secundarios o emitidos. La resolución espacial viene dada por el área de muestra reflectante, y depende del volumen de interacción de la radiación con la muestra.

Los electrones secundarios son los que se reflejan con baja energía ( $< 50$  eV) procediendo de una penetración del orden de sólo varios nm. Estos electrones son reflejados a ángulos grandes y atraídos por el detector para dar las imágenes conocidas como SEI. Las imágenes SEI son topográficas y de alta resolución ya que corresponden a volúmenes de interacción muy pequeños.

Los electrones elásticos o retrodifundidos son electrones de alta energía que pueden proceder de penetraciones superiores a  $1 \mu\text{m}$ . Dentro de la cámara del microscopio su trayectoria es rectilínea. La cantidad de electrones retrodifundidos que se refleja depende de la composición química de la muestra. Las imágenes producidas por estos electrones se conocen como BEI y son imágenes de baja resolución.

El microscopio electrónico de barrido forma la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra mediante un proceso de barrido.

#### **B.4.2 Técnica de contacto: Rugosímetro**

##### **Medición**

Es importante tener en cuenta la dirección de la lectura de rugosidad cuando se realizan medidas en 2D sobre superficies con cierta anisotropía topográfica, ya que los perfiles que se van a obtener sobre una misma superficie con estas características pueden variar substancialmente en función de la dirección elegida. En nuestro caso, las superficies a evaluar se consideran isotrópicas de forma que no hay ninguna dirección preferencial a la hora de realizar el ensayo.



Para evaluar la medición se ha de tener en cuenta que la textura superficial se divide en forma, ondulación y rugosidad. Para separar estos componentes entre sí hay un proceso de filtrado. Los filtros además aumentan la cantidad de información extraíble de las características de la superficie, así como eliminan los componentes del ruido de la medida. La rugosidad se corresponde con las irregularidades más pequeñas en la frecuencia espacial mayor dentro de la medición, la ondulación con las frecuencias intermedias y la forma con las frecuencias más bajas.

Los parámetros de rugosidad se calculan para describir numéricamente la apariencia de la rugosidad superficial. La obtención de estos parámetros se lleva a cabo sobre las superficies filtradas, es decir, la forma y la ondulación se eliminan.

### **Determinación de la rugosidad**

Para determinar la rugosidad de una superficie se ha de conocer cómo se obtiene el perfil, cuál es la longitud de ensayo utilizada, qué filtros se utilizan para separar la forma y la ondulación de la rugosidad y qué descripción tienen y cómo se obtienen cada uno de los parámetros que se pueden calcular.

Cuando se realiza la lectura de rugosidad, el palpador se desplaza sobre la superficie en una dirección determinada. Como resultado de este desplazamiento se obtiene el perfil que es una serie de datos bidimensionales (X: desplazamiento horizontal del palpador, Z: altura de la superficie en una posición x del palpador), que registra el detector de alta precisión que va unido a la punta palpadora, transmitiendo la información al rugosímetro y éste al software, para que se muestre en pantalla.

Pero este perfil primario no tiene validez para obtener, a partir de él, valores de rugosidad, ya que necesita ser filtrado con el objetivo de eliminar los componentes de forma y ondulación de la superficie. El rugosímetro empleado dispone de tres tipos de filtros diferentes, dos de ellos son filtros eléctricos y el otro es del tipo gaussiano. Se diferencian en las características de atenuación, en la transmitancia de amplitud, en la corrección de fase y en el valor de corte. Se emplea el filtro de tipo gaussiano ya que es el más adecuado, según el manual del rugosímetro, para nuestros ensayos.

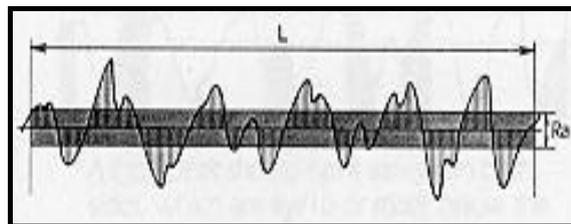


La longitud de corte es una longitud de onda que se utiliza para filtrar el perfil primario. La que elimina los datos de longitudes de onda largas (o bajas frecuencias) se conoce como  $\lambda_c$ . La longitud de corte para eliminar los datos de longitudes de onda cortas (o altas frecuencias), para así obtener el perfil de ondulación se conoce como Fh y FI para eliminar los datos de longitudes de onda largas (o bajas frecuencias) para obtener el perfil de ondulación de línea central. Siguiendo las recomendaciones de las normas existentes, los valores (en milímetros) con los que se trabaja son:  $\lambda_c=0.8$ , FI=0.25, Fh=0.08.

## Parámetros

Los parámetros se calculan para describir numéricamente la apariencia de la rugosidad superficial. Se dividen en tres grupos en función de las características de la superficie: de altura, de espaciado e híbridos. En función del tipo de textura de la superficie, de la información concreta que queramos extraer o de cualquier otro tipo de condicionante, la elección de un parámetro concreto u otro va a ser importante; en nuestro caso se usan los siguientes:

- **$R_a$** : Es un parámetro de altura. Es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil R dentro de la longitud de muestra.  $R_a$  se calcula en micrómetros y es el parámetro más general y comúnmente utilizado para describir la rugosidad, ya que, entre otras cosas describe matemáticamente lo que se entiende de forma más intuitiva como concepto de rugosidad.



- **$R_y$** : Es también un parámetro de altura, un valor extremo que describe la distancia entre la altura del máximo pico y la profundidad del mayor valle, dentro de la longitud de la muestra. Es el máximo valor de altura pico-valle.





## B.5 ESTUDIO IN VITRO

### B.5.1 Tipos de cultivos

Se puede hablar de tres tipos de cultivos:

- A. **Cultivo de órganos.** Implica que la arquitectura del tejido *in vivo* se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que libera los desechos manteniendo su estructura tridimensional.
- B. **Explantos primarios.** Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.
- C. **Cultivo celular.** Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo.

En la siguiente figura se muestra un esquema representativo de la obtención de los diferentes tipos de cultivos.

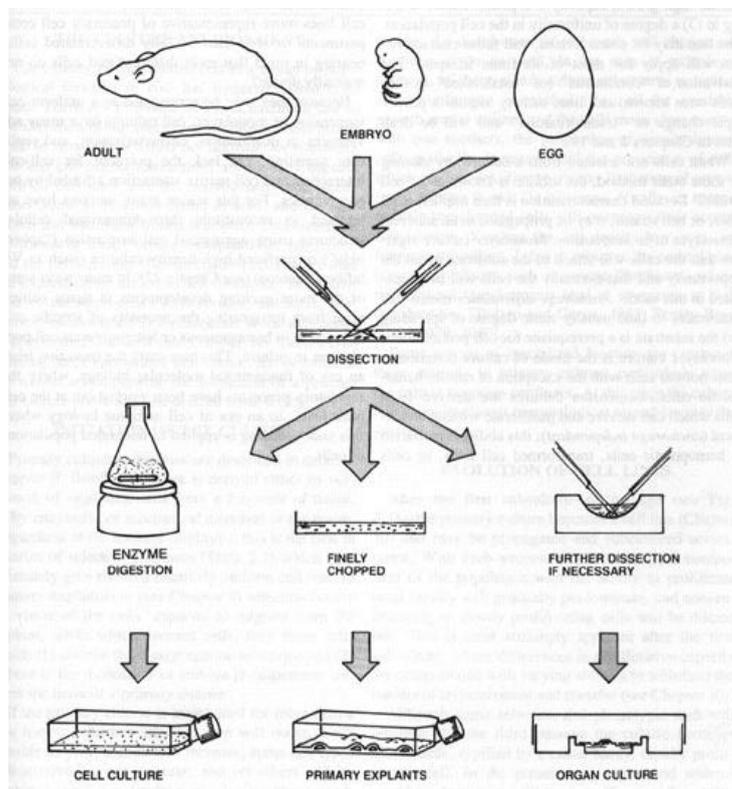


Figura b.2.- Vías de obtención de los diferentes tipos de cultivos. Freshney, 1987, p.5.



### **B.5.2 Biología de la célula en cultivo**

En el proceso de establecer un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así sólo formarán el cultivo aquellas células que sean por una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

El crecimiento en monocapa significa que las células se adhieren al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células. El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores.

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número las células que tienen mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia las células, en general, detienen su crecimiento.

### **B.5.3 Evolución de las líneas celulares**

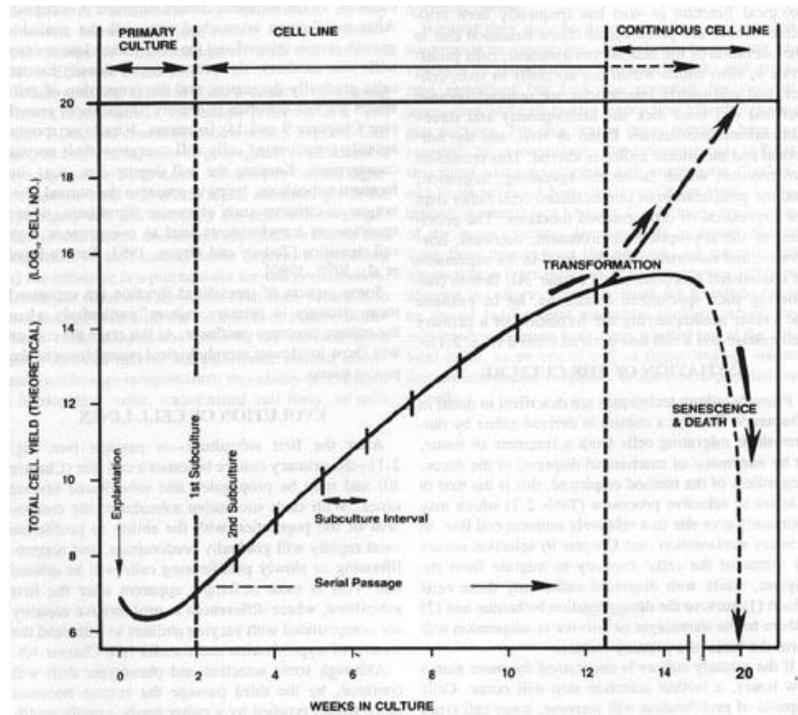
Una vez se alcanza la confluencia en el cultivo es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. Es el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir o replaquear las células.

En el momento en que las células comienzan a dividirse en la placa su número se incrementa, hasta ocupar todo el espacio. En ese momento es necesario tomar algunas y sembrar en una nueva placa.

El crecimiento de las células en cultivo primario prosigue a lo largo de una serie de generaciones o pases característicos de cada tipo celular y condiciones de cultivo. Sólo ocasionalmente un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las



esperadas, debido a la aparición de células inmortales. Estas células forman líneas estables o cultivos celulares permanentes. La razón de la inmortalización de estas células es en la mayor parte de los casos desconocida pero se incrementa la frecuencia de inmortalización mediante infecciones virales, tratamientos con mutágenos, etc... por lo que deben estar relacionadas con la pérdida, espontánea o inducida por el tratamiento, de las vías de control celular. Se hipotetiza que la capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionado directamente con su variabilidad genética.



**Figura b.3.-** Evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a lo largo de las semanas.  
 Figura de Freshney, 1987, p.8.

El cultivo de las células no presenta las mismas dificultades independientemente del tipo de célula de que se trate. Hay grandes diferencias que se relacionan fundamentalmente con el grado de diferenciación del tipo celular. Así pues en general se puede establecer como norma que una línea celular será tanto más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada sea, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas.

#### B.5.4 El medio de cultivo

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos



que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Por ello consideraremos que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos:

1.- *La naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células.* La mayor parte de las líneas celulares crecen en forma de monocapa unidas a un soporte más o menos sólido (vidrio, plástico desechable,...).

2.- *Las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio.* Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos: Soluciones salinas equilibradas (BSS), aminoácidos, vitaminas, otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular, hormonas y factores de crecimiento (suero), inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos).

3.- *La naturaleza y composición de la fase gaseosa.*

4.- *Las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura.*

Uno de los problemas más importantes a la hora de trabajar con cultivos celulares es evitar la contaminación de éstos, la contaminación puede ser de dos tipos:

- Química: Es de difícil detección, está causada por agentes como endotoxinas, iones metálicos,...
- Biológica: Si está causada por bacterias, hongos,... es de fácil detección (el medio se vuelve turbio, hay variaciones de pH) ocurre si el medio no contiene antibióticos. En el caso de ser provocada por virus o micoplasmas, la contaminación es de difícil detección.

Para evitar este tipo de problemas se ha de trabajar con una técnica aséptica y usar equipos y herramientas esterilizadas.



## **B.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL**

El microscopio electrónico de barrido permite la conservación de las condiciones naturales de muestras biológicas y no conductoras, con lo cual se evitan alteraciones de ellas al exponerse a procesos de preparación como secado, fijado, congelado y de recubrimiento iónico de metales, tales como el oro, requeridos para su observación bajo las condiciones usuales de los microscopios de alto y bajo vacío.

Requiere de sistemas periféricos para su funcionamiento, como es el recirculador de agua de enfriamiento. Permite el registro digital de imágenes con diferentes resoluciones.

La observación de muestras utilizando el microscopio electrónico de barrido convencional requiere de una cuidadosa preparación de las muestras con el objeto de deshidratarlos y de esta manera evitar el colapso de las estructuras celulares debidas a la exposición al alto vacío (Uwins et al., 1993).

Hasta la aparición de la microscopía electrónica de bajo vacío o ambiental no era posible la observación del material sin procesar, por lo que los biólogos habían trabajado en la elaboración de complejos procedimientos dirigidos a preservar las estructuras celulares. A pesar de ello se realizaron pocos trabajos de comparación de técnicas involucradas en la preparación de muestras aplicada a un mismo material, entre ellos los trabajos de Parsons et al., (1973); Hardy et al., (1992) y Uwins et al., (1993). En la utilización del MEB Ambiental se utilizan presiones de trabajo comprendidas entre 100 y 1000 Pa (Goldstein et al., 1993) evitando de esta manera la deformación de los especímenes por vacío y la aparición del efecto de carga.



## ANEXO C: MARCAS COMERCIALES DE CEMENTOS DE FOSFATO DE CALCIO

### NORIAN SRS

Norian SRS es un cemento ortopédico indicado para remodelación ósea en fracturas. Es un cemento inyectable, moldeable y biocompatible compuesto de hidroxapatita, que comienza a endurecer después de dos minutos en el cuerpo, se cura completamente en el plazo de 24 horas. Es similar al sistema de la reparación de Norian Craneofacial (CRF), usado como relleno del hueso para los defectos craneomaxilofacial. Sin embargo, lo que distingue a Norian SRS de los llenadores del vacío del hueso y los cementos ya en el mercado son su fuerza compresiva, que es mayor que la del hueso cancellous, y su capacidad estabilizar las fracturas debido a esa fuerza.

La alta fuerza compresiva de este material así como su reemplazo gradual por el hueso apoya su uso potencial en fracturas tales como ciertas fracturas de la muñeca.

Indicaciones: Fracturas en tibia, radio y fémur



**Figura c.1.** - Aplicación de Norian SRS.



Norian SRS endurece de forma replica bastante semejante de la fase mineral del hueso y gradualmente remodela el hueso en el cuerpo por vía de resorción osteoclástica y formación de hueso nuevo.

Características:

- Moldeable e inyectable con máquina percutora, permitiendo buen relleno
- Tensión a compresión de aproximadamente 50 MPa
- Estable a la temperatura fisiológica durante el fraguado, lo que previene la muerte de células próximas a causa de la elevada temperatura
- Tiempo de fraguado de unos 10 minutos
- Radiopaco

## NORIAN CRS

Norian CRS cemento de rápido fraguado es un cemento biocompatible, moldeable que se endurece en la temperatura del cuerpo. Se suministra en dos contenedores: una copa que contiene polvo estéril y un frasco que contiene la solución estéril.



**Figura c.2.-** Suministro de Norian CRS.

Cuando el contenido se mezcla junto, el cemento resultante es adecuado para el aumento y la restauración del esqueleto craneofacial. Cuando fragua completamente, el cemento se



parece mucho a la parte mineral de hueso, y es gradualmente resorbido y reemplazado con hueso durante el proceso curativo.

#### Características:

- Fácil formación y moldeo para la implantación en defectos
- Endurece y fragua en ambiente no muy caliente lo que reduce la necesidad para controlar la humedad y la temperatura en el sitio operativo
- Tiempo de fraguado corto, de 3 a 6 minutos, lo que reduce el tiempo de procedimiento
- Logra una fuerza máxima a compresión de aproximadamente 30 MPa al cabo de 24 horas, que es 2–6 veces más que la fuerza de compresión del hueso cancellous
- Remodela de nuevo gradualmente el hueso en el cuerpo vía resorción osteoclástica con la formación de nuevo hueso
- Endurece isotérmicamente y por tanto, elimina la herida térmica al tejido suave circundante

#### Aplicaciones:

- Cranioplastia
- Regeneración craneal
- Aumento de solapa del cráneo
- Genioplastia de aumento
- Reparación de defectos en la base del cráneo



**Figura c.3.** - *Aplicación de Norian CRS.*



## **BIOPEX**

BIOPEX es un producto de la compañía Mitsubishi Materials Corporation. El uso de BIOPEX como material médico específico se basa en: consolidar y proporcionar la ayuda curativa para las fracturas, facilitar la reparación del defecto del hueso, reforzar los tornillos ortopédicos y realzar la adherencia mientras que los huesos quebrados hacen punto y curan.

Una vez el polvo compuesto y el solvente se mezclan, BIOPEX tarda aproximadamente 10 minutos en endurecer. Mantiene un estado maleable de la goma antes de fijar, y puede ser inyectado usando una jeringuilla.

BIOPEX es un tratamiento ideal en casos como fracturas debido a la osteoporosis, acortando el período requerido a los huesos para curar.

### Características del producto:

- permite el uso con una jeringuilla.
- endurece poco después del uso.
- da lugar a la conducción excelente del hueso, la afinidad orgánica y la restauración del hueso.
- permite una amplia gama de usos clínicos.

### Composición:

A) Polvo (10g): fosfato Alfa-tribásico de calcio: 7.50g, Fosfato de Tetrabásico de calcio: 1.80g, Hidrogenfosfato de calcio: 0.50g, Hidroxiapatita: 0.20g

B) Solvente (1ml): Sulfato de sodio: 54.05mg, Anhídrido dibásico de succinato de sodio: 129.72mg





**Figura c.4.- Composición de Biopex.**

Debe ser mezclado con una cantidad conveniente de solución y ser inyectado.

Empaquetado:

A) Paquete de 3 cc: un paquete de los 5 gramos del polvo, un frasco 4-ml de solvente, jeringuilla.

B) Paquete de 6 cc: un paquete de 10 gramos del polvo, un frasco 4-ml de solvente, jeringuilla.

Precio indicativo:

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| A) Paquete de 3cc | 600€   |
| B) Paquete de 6cc | 1,100€ |

Aplicaciones:

- Reparación de defectos del hueso.
- Reforzar los tornillos ortopédicos e implantes.
- Aumentar la adherencia mientras que los huesos quebrados curan.
- Rellenar gaps entres juntas artificiales con poco cemento y el hueso





**Figura c.5.-** *Aplicación de Biopex.*

## **CEMENTEK**

Cementek es una hidroxiapatita preparada por reacción entre fosfatos de calcio ácidos y básicos en presencia de una solución acuosa. Esta reacción conduce a una pasta maleable que endurece in situ. Esta reacción no es exotérmica y no corre el riesgo de ningún modo de herir los tejidos vivos. Sintetizada a 37° C, esta apatita presenta una cristalinidad vecina de la del hueso. Sus propiedades mecánicas, medidas "in vitro" son aproximadamente de 20 MPa a la compresión.

### Características destacables:

- Es maleable y endurece in situ.
- Es biocompatible, no se ha observado ningún fenómeno de rechazo ni de toxicidad.
- Es osteoconductor, reconocido por las células óseas, se asocia perfectamente a los tejidos.
- Es bioreabsorbible, desaparece después de la biodegradación dejando lugar a un hueso neoformado.

### Uso recomendado:

- Relleno para defectos óseos y en caso de instalación de prótesis.
- Reconstrucción ósea





**Figura c.6.-** *Aplicación de Cementek.*

### **$\alpha$ -BSM**

El cemento conocido por el nombre de  $\alpha$ -BSM de la compañía ETEX, es un fosfato de calcio nano-cristalino sintético que imita la composición y la estructura del contenido mineral del hueso.

Fue aprobado en enero de 1999 para las indicaciones craneofaciales (reparación y reconstrucción de huesos en la mejilla, la barbilla, y la cara así como el cráneo). Integrado enteramente por el fosfato de calcio, promueve nuevo crecimiento del hueso, y se puede aplicar como una masilla moldeable o goma inyectable.

Según los resultados obtenidos con el  $\alpha$ -BSM, el sustituto del hueso era perceptiblemente más fuerte que el hueso y la dislocación en la reparación de las fracturas. El  $\alpha$ -BSM es un sustituto eficaz del hueso en comparación con el injerto del hueso. En base de su funcionamiento biomecánico, el  $\alpha$ -BSM puede convertirse en la solución para los defectos óseos en fracturas.

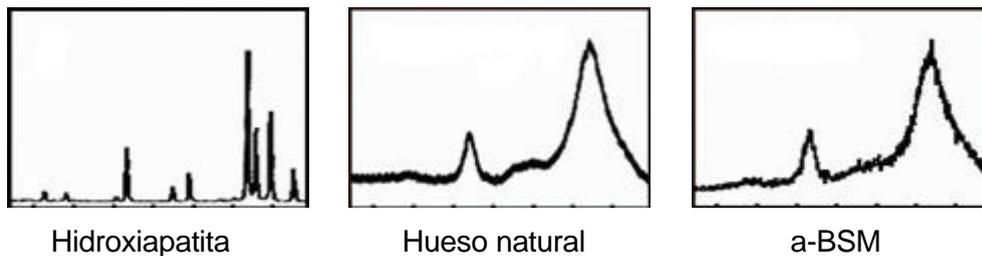
#### Propiedades:

- Ca/P ratio ~ 1.45
- Tensión a compresión (4 horas in-vitro) ~ 12 MPa

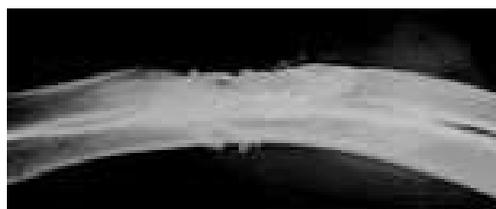


- Porosidad 50-60%
- Tamaño medio de poro  $< 1 \mu\text{m}$
- Tiempo de reacción de fraguado de 15-20 minutos a la temperatura del cuerpo

Según se publicita en la página web de ETEX, la estructura cristalina del  $\alpha$ -BSM está ideada para acercarse lo más posible a la estructura del hueso natural. Algunos estudios han sugerido que los grandes cristales de HA ayudan el proceso de remodelación bajando la resorción. En estos diagramas se puede comparar la HA, el  $\alpha$ -BSM i el hueso natural



Defecto crítico en radio de conejo



Ocho semanas después

En estas dos fotos se puede comprobar como se ha solucionado, gracias al  $\alpha$ -BSM, un defecto de 2 cm (defecto crítico) en el hueso radio de un conejo después de 8 semanas de la intervención quirúrgica. Se ve la formación de hueso nuevo directamente en la superficie del  $\alpha$ -BSM

## BONESOURCE

Bonosource es un cemento ortopédico de la casa Leibinger, obtenido por la mezcla de sales de tetrafosfato de calcio (TTCP) y difosfato de calcio (DCP), las cuales, en presencia de agua reaccionan isotérmicamente y generan un implante sólido, compuesto de hidroxiapatita carbonada. De acuerdo con los conocimientos actuales, ninguna otra combinación química es capaz de lograr las propiedades físicas del cemento BoneSource.



Este cemento basado en patentes de ADAHF fue introducido al mercado por un concesionario de ADAHF en noviembre de 1997 bajo nombre comercial BoneSource®. El producto hasta el momento ha recibido la aprobación del FDA para los usos craneofacial y maxilofacial.

El cemento de hidroxiapatita BoneSource está indicado para rellenar o cubrir orificios de trepanaciones neuroquirúrgicas, defectos óseos post-craneotomía y otros defectos craneales con una superficie máxima de 25 cm<sup>2</sup> por defecto.

Como cemento de hidroxiapatita puro, BoneSource no es comparable a las cerámicas de hidroxiapatita convencionales, obtenidas por sinterización o procedentes de corales marinos.

#### Características:

- Composición: TTCP + DCP obteniendo PHA
- Reabsorbible, Osteoconductor y Biocompatible
- Tiempo de mezclado: 20 min.
- Constancia del volumen después del fraguado
- Excelente resistencia frente a las infecciones.
- Aplicación en cirugía craneofacial y maxilofacial.

Debido a su consistencia de cemento, el BoneSource puede comprimirse fácilmente dentro o sobre las estructuras óseas del cráneo, y modelarse y emparejarse como masilla.

La desventaja de este fosfato de calcio es que tiene pérdida de cohesión en el fraguado y en contacto con la sangre produce reacciones inflamables, por eso es imprescindible prepararlo adecuadamente.

Este cemento como material se puede colocar quirúrgico, moldeado e inyectado a la forma anatómica correcta, y fijará para pasar a estar integrado enteramente por hidroxiapatita, así el material es disuelto y substituido lenta y enteramente por el hueso nuevo, reparando el defecto original.

Los estudios adicionales han conducido a las mejoras significativas en las características de dirección del cemento y del desarrollo de las formulaciones del cemento que serían satisfechas para diversos usos clínicos.

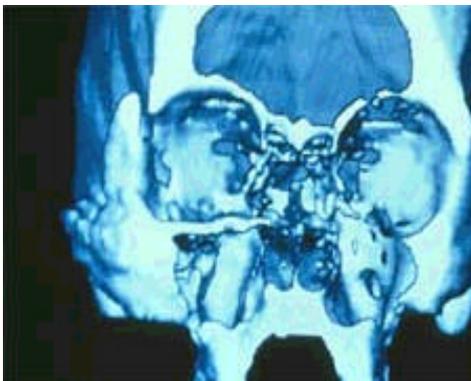


BoneSource se suministra en forma de un polvo listo para ser mezclado con agua estéril y libre de pirógenos. BoneSource se entrega en envases de varios tamaños.

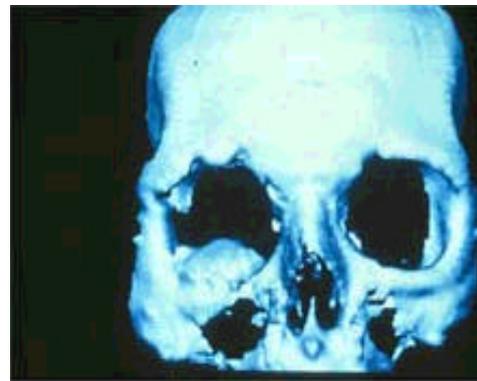
Después de aproximadamente veinte a treinta minutos, el cemento BoneSource se seca constituyendo una masa sólida, a condición de que se mantenga húmedo pero no mojado. Cuatro a seis horas después de la implantación, el cemento fragua y se convierte en hidroxiapatita pura, que es completamente insoluble. Este tiempo de secado y fraguado es constante e independiente de la cantidad de BoneSource utilizada. En base a las cantidades promedio de cemento utilizadas en los estudios clínicos, se aconseja no usar más de 84.0 gr. de cemento por defecto a rellenar.

El cemento de hidroxiapatita BoneSource® es un producto medicinal estéril y libre de pirógenos, que se suministra con detalladas instrucciones para el uso. Este producto es esterilizado con rayos gama.

En las siguientes figuras se puede ver un cráneo con deficiente masa ósea, y posteriormente a la aplicación de este cemento, su total reconstrucción.



Antes De la Reparación



Después De la Reparación

**Figura c.7.- Aplicación de Bonesource.**

## MIMIX

El sistema del reemplazo del hueso de Mimix es un material de hidroxiapatita de un fosfato completamente sintético de  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) y tetrafosfato de calcio (TTCP) mezclado con una solución de ácido cítrico diluido. Se obtiene hidroxiapatita precipitada



para la reparación de defectos craneales. Mimix fue introducido en 1999 por la firma Lorenz Surgical.

Características:

- Es un material de hidroxiapatita con una excelente biocompatibilidad (sin respuesta inflamatoria aguda o crónica significativa).
- Es más radiopaco que el hueso craneal normal, y no experimentará ningún cambio de volumen o tamaño.
- Alcanza el 90% de fuerza compresiva durante las primeras horas.
- Tiempo de fraguado: 4-6 minutos a 37°C
- Fuerza de la compresión: 23 MPa a 37°C
- Tamaño del poro: 211 micras

Mimix está indicado para:

- Reparación de los agujeros neuroquirúrgicos de las rebabas, de los cortes y de otros defectos craneales.
- Restauración o aumento del contorno óseo en el esqueleto craneofacial.

## **CALCIBON**

Calcibon es un cemento de la firma Merck GmbH, obtenido por la mezcla de sales de  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP), hidrogenofosfato de calcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) y carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ). Esta combinación genera una pasta que endurece a la temperatura del cuerpo por una reacción endotérmica para formar una hidroxiapatita microcristalina deficiente en calcio. Calcibon es un sustituto sintético químicamente derivado del hueso previsto para el relleno y la reconstrucción de los defectos del hueso.

La biocompatibilidad de Calcibon es debida a su composición química y a su estructura cristalina que imita la composición química del mineral natural del hueso. La evaluación histológica después de dos semanas demuestra una aposición abundante del hueso en la superficie de Calcibon sin ninguna reacción inflamatoria o encapsulación fibrosa. Calcibon pertenece a la familia de los fosfatos del calcio, grupo de sustitutos del hueso.



Características:

- Biocompatible
- Remodelable y Maleable
- Fácil mezclado, Tiempo de la cohesión: 1 minuto
- Reacción endotérmica
- No produce reacción inflamatoria
- Endurece a la temperatura del cuerpo
- Alta fuerza compresiva (hasta 60 MPa)
- Aplicaciones en traumatología y ortopedia.

- El Polvo

El polvo de Calcibon se sintetiza de las sales de calcio y de fosfato. La distribución proporcional de los ingredientes es casi equivalente al componente del fosfato del calcio del hueso natural, éstos son:  $\alpha$ -TCP fosfato de alfa tricálcico,  $\text{CaHPO}_4$  hidrogeno fosfato de calcio,  $\text{CaCO}_3$  carbonato cálcico, pHA hidroxiapatita precipitada.

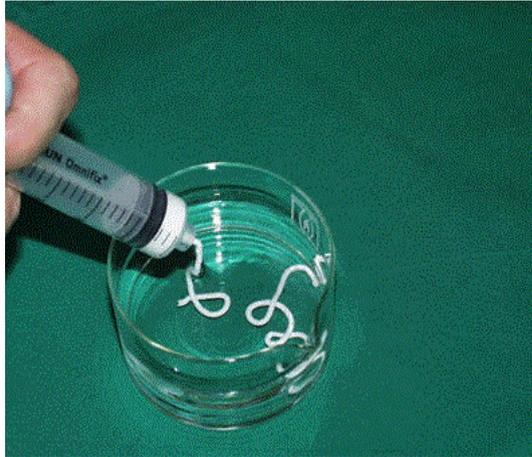
- El Líquido

El líquido de Calcibon es una solución acuosa que inicia el proceso de obtención,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hidrogeno fosfato de disodio.

- El Producto

El mezclar líquido y polvo de Calcibon da lugar a una pasta que tiene la consistencia ideal para el uso fácil en defectos del hueso. La estructura cristalina del material curado es casi equivalente a las del componente del fosfato de calcio del hueso natural: hidroxiapatita deficiente de carbonato de calcio.





**Figura c.8.- Inyectabilidad del Calcibon.**

Indicaciones:

- El Calcibon está pensado para rellenar los vacíos del hueso causados por trauma o enfermedad.
- Reconstrucción de los defectos del hueso. También puede ser utilizado en cada zona aséptica del hueso, excepto el área de discos epifisarios abiertos.

**CERASORB**

Cerasorb es un cemento de origen sintético de la firma Merck GmbH, obtenido por la hidrólisis de  $\beta$ -fosfato tricálcico de fase pura ( $\beta$ -TCP) generando una pasta que endurece a la temperatura del cuerpo obteniendo hidroxiapatita precipitada para la reparación de defectos óseos.

Como Cerasorb esta formado por  $\beta$ -TCP, la hidroxiapatita formada tendrá una rápida bioreabsorción, debido a la elevada porosidad que presenta el fosfato de calcio.

Cerasorb cumple tres funciones diferentes en el defecto óseo:

- Reserva espacio para permitir la formación ósea.
- Funciona como guía dirigiendo el crecimiento del hueso. Es osteoconductor.
- Es un depósito de materiales que facilita un crecimiento óseo óptimo y desaparece sin dejar residuos durante el proceso de regeneración ósea.



### Características:

- Pureza de fase de la cerámica (> 99%).
- Funciona como guía y como “guarda espacio”.
- Porosidad interconectada que permite la osteoconducción.
- Estabilidad del granulado durante la fase inflamatoria.
- Reabsorción completa y simultánea con el crecimiento del hueso.
- Biocompatibilidad.
- Evita el riesgo de transmisión de infecciones.
- Apto para transportar sustancias que estimulen el crecimiento.
- Certificado el uso en combinación con plasma rico en plaquetas - PRP.

### Estructura:

Gracias a su forma esférica tiene un comportamiento favorable respecto a las células circundantes vivas, evita la irritación mecánica del tejido circundante y las membranas no corren el riesgo de ser rasgadas. Así pues:

- Favorece la vascularización y el crecimiento de células dentro de su porosidad.
- El granulado tiene una estructura estable sin partículas sueltas.
- El tamaño de la partícula primaria no provoca la actividad de macrófagos.
- No irrita el tejido circundante.
- Ofrece una gran superficie para transportar sustancias que estimulan el crecimiento.

### Resultado:

El resultado que se obtiene con este producto es que se consigue hueso propio nuevo. Es espacio del hueso regenerado, ofrece una densa estructura y presenta características de un hueso maduro.

### Indicaciones:

Cerasorb ha sido utilizado con éxito para diferentes indicaciones en las siguientes especialidades.

- \* Ortopedia      \* Traumatología      \* Cirugía de la columna vertebral
- \* Cirugía de mano y de pie      \* Cirugía bucal, maxilar y facial      \* Cirugía plástica.





Figura c.9.- Presentación de Cerasorb.

## Chronos

Chronos es un cemento de origen sintético del tipo “brushite” de la firma Mathys Medical, obtenido por la mezcla de  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) y fosfato de monocalcio monohidratado (MCPM). Tiene su aplicación como sustituto sintético de injerto del hueso cancellous. El cemento Chronos, al ser un fosfato de dicalcio dihidratado tiene mayor reabsorción y biocompatibilidad que otros cementos de fosfato.

El uso de Chronos es una alternativa ventajosa a cosechar hueso, acortar tiempos operativos (debido a su elevada solubilidad) y vence las limitaciones en la cantidad y la calidad de injerto disponible de hueso.

Este producto es fácil de utilizar y tiene una excelente conducta en vivo, cuenta con un registro clínico de prestigio de más de 20 años.

### Características:

- Su fuerza es semejante a que de hueso de cancellous ( $7.5 \pm 1$  MPa)
- Su estructura es ideal para la osteoconductividad debido a su elevada porosidad.
- Es gradualmente reabsorbido y reemplazado por hueso nuevo en 6-18 meses.
- Chronos se puede utilizar en todas aplicaciones espinales como injerto de hueso cancellous.
- Biocompatible
- Fácil sintetizado
- Chronos tiene también indicaciones para traumatología y cirugía maxilofacial.





**Figura c.10.-** Aspecto poroso de Chronos.

**Tabla c.1.-** Resumen de las marcas comerciales de los cementos de fosfato de calcio.

CEMENTO	EMPRESA	COMPONENTES	PRODUCTO FINAL	REFERENCIA
$\alpha$ -BSM	ETEX	ACP, DCPD	PHA	(Verecke90)
Biobone	Merck GmbH	-	-	
Embarc	Lorenz Surginal	-	-	
Norian SRS	Norian (Synthes-Stratec)	$\alpha$ -TCP, CaCO <sub>3</sub> , MCPM	CAP	(Constantz95)
Bonesource	Leibinger	TetCP, DCP	PHA	(Brown85)
Cementek	Teknimed	$\alpha$ -TCP, TetCP, Ca(OH) <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	PHA	(Freche99)
Mimix	Lorenz Surgical	$\alpha$ -TCP, TetCP, citric acid	PHA	
Biocement D	Merck GmbH	$\alpha$ -TCP, DCP, CaCO <sub>3</sub> , PHA	CAP	(Driessens98)
Biopex	Mitsubishi materials	$\alpha$ -TCP, TetCP, DCPD	PHA	(Kurashina97)
Fracture Grout	Norian (Synthes-Stratec)	TetCP, CaCO <sub>3</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	PHA	(Frakenburg98)
Chronos Inject	Matiz Medical	$\beta$ -TCP, MCPM	DCPD	

