

**CAPÍTULO 3**

**MATERIAL Y MÉTODO**



## CAPÍTULO 3

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. MODELO EXPERIMENTAL

En la presente Tesis Doctoral se realiza la prueba de esponjosa descrita por Katthagen en 1986, modelo en el que se crea un defecto óseo cavitario de 6 mm. de diámetro centrado en la metáfisis distal del fémur del animal de experimentación<sup>70</sup>.

##### 3.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplean 60 conejos machos albinos de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus Cuniculi*), con un peso comprendido entre 3.000 y 4.000 gramos y una edad entre 4 y 6 meses, para contar con individuos adultos con sus cartílagos de crecimiento cerrados. La intervención quirúrgica de los animales se realiza en el Laboratorio de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción, Chile.

##### 3.1.3. MANEJO ÉTICO DE LOS ANIMALES

El manejo ético de los animales de experimentación de este trabajo de tesis, se ajusta a la directiva EU 86 / 609 de la Unión Europea, el Real Decreto 223 / 1988 de España y las Leyes Autonómicas 3 / 1988 y 5 / 1995 de la Generalitat de Catalunya.

##### 3.1.4. GRUPO CONTROL

Está representado por los animales que reciben como implante autoinjerto óseo esponjoso fresco, los que configuran un grupo control positivo, por cuanto se considera que este sustitutivo óseo es el que ofrece la mayor capacidad de regeneración.



Figura 7. Conejo macho de la raza albina Nueva Zelanda.

### 3.1.5. CÁLCULO DE LA MUESTRA

Se comparan cuatro grupos diferentes con el grupo control.

El cálculo se realiza utilizando la prueba unilateral para comparación de dos muestras:

- Grupo control:  $34.15 \pm 6.10$  (Katthagen 1986).
- Grupos a estudiar: Se define como significativa una tasa de regeneración ósea superior al 66,66 % de la obtenida con el grupo control.

Para el cálculo de la muestra se aplica la siguiente fórmula estadística:

$$(\alpha \cdot \beta) \cdot s^2$$

$$N = \frac{\quad}{\Delta x^2} = 5.89$$

$$\Delta x^2$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.05$$

$$\alpha \cdot \beta = 10.824$$

$$s = 6.1$$

$$\Delta x = 11.33$$

El cálculo de la muestra da como resultado un  $N = 5.89$ , por lo tanto es suficiente utilizar 6 conejos por cada grupo para obtener resultados estadísticamente significativos<sup>69</sup>.

### 3.1.6. IMPLANTES

En este trabajo de tesis se utilizan cinco tipos de implantes que corresponden a:

- Cemento H (cemento de fosfato  $\alpha$  tricálcico)
- Cemento R (cemento de fosfato monocálcico)
- Vidrio G0 (vidrio de fosfato del sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ )
- Vidrio G5 (vidrio de fosfato del sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ - $TiO_2$ )
- Autoinjerto óseo esponjoso fresco (grupo control).

#### 3.1.6.1. CEMENTO H

Cemento de fosfato  $\alpha$  tricálcico de reabsorción intermedia que presenta las siguientes características:

Composición:

A. Fase sólida en polvo:

- 98.0 % en peso de fosfato  $\alpha$  tricálcico ( $\alpha$  - $(Ca_3(PO_4)_2)$ ).
- 2.0 % en peso de hidroxiapatita precipitada (PHA).

B. Fase líquida:

- Solución acuosa al 2.5 % de hidrógeno fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$ ).



Figura 8. Presentación del cemento H.

C. Relación de mezcla: Líquido / polvo = 0.35 ml/g

Se utilizan 12 dosis unitarias de 5.7 gramos cada una, que se mezclan con 2 ml. de la fase líquida.

### 3.1.6.2. CEMENTO R

Cemento de fosfato monocálcico de reabsorción rápida que posee las siguientes características:

Composición:

A. Fase sólida en polvo:

- Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM -  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- Fosfato cálcico sódico potásico (CSPP -  $\text{Ca}_2\text{NaK}(\text{PO}_4)_2$ )

B. Fase líquida:

- Agua destilada

C. Relación de mezcla: Líquido / polvo = 0.55 ml/g

Se utilizan 12 dosis unitarias de 3.6 gramos cada una, que se mezclan con 2 ml. de la fase líquida.



Figura 9. Presentación del cemento R.

### 3.1.6.3. VIDRIO G0

Vidrio bioactivo de fosfato del sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ , cuya composición molar es la siguiente:

- $P_2O_5$	44.5 %
- CaO	44.5 %
- $Na_2O$	11.0 %

Las propiedades mecánicas, solubilidad y temperatura de transición vítrea de este material son:

- Dureza de Vickers (HV):	$357.30 \pm 8.24 \text{ kg/mm}^2$
- Módulo de Young (E):	$59.86 \pm 2.32 \text{ GPa}$
- $T^{\circ}$ transición vítrea ( $T_g$ ):	$350.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Solubilidad:	$1.77 \cdot 10^{-5} \pm 4.32 \cdot 10^{-6} \text{ g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$

Las partículas del vidrio G0 tienen un tamaño de 150 a 297  $\mu\text{m}$ .



Figura 10. Presentación del vidrio G0.

### 3.1.6.4. VIDRIO G5

Vidrio bioactivo de fosfato del sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ - $TiO_2$ , cuya composición molar es la que sigue:

- $P_2O_5$	44.5 %
- CaO	44.5 %
- $Na_2O$	6.0 %
- $TiO_2$	5.0 %

Las propiedades mecánicas, solubilidad y temperatura de transición vítrea de este material son:

- Dureza de Vickers (HV):	$431.10 \pm 7.80 \text{ kg/mm}^2$
- Módulo de Young (E):	$71.10 \pm 1.70 \text{ GPa}$
- T° transición vítrea ( $T_g$ ):	$532.9 \text{ }^\circ\text{C}$
- Solubilidad:	$3.13 \cdot 10^{-6} \pm 1.38 \cdot 10^{-7} \text{ g/(cm}^2 \cdot \text{h)}$

Las partículas del vidrio G0 tienen un tamaño de 150 a 297  $\mu\text{m}$ .



Figura 11. Presentación del vidrio G5.

### **3.1.6.5. AUTOINJERTO ÓSEO ESPONJOSO FRESCO**

Se obtiene en condiciones de asepsia desde el cóndilo femoral medial contralateral del conejo y se implanta en el mismo acto quirúrgico. Por lo tanto, no requiere ningún tipo de conservación.



Figura 12. Injerto óseo esponjoso fresco obtenido con trefina.

### **3.1.7. ELABORACIÓN Y SÍNTESIS DE LOS IMPLANTES**

La síntesis química de los cementos de fosfatos de calcio y la elaboración de los vidrios de base fosfato se realiza en el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, bajo la dirección de los Profesores Josep Anton Planell Estany y María Pau Ginebra Molins.

Los cuatro biomateriales correspondientes a Cemento H (cemento de fosfato  $\alpha$  tricálcico), Cemento R (cemento de fosfato monocálcico), Vidrio G0 (vidrio de fosfato del sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ ) y Vidrio G5 (vidrio de fosfato del sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ - $TiO_2$ ) se almacenan en bolsas de plástico transparente selladas al vacío debidamente identificadas y luego se esterilizan con óxido de etileno en el Hospital del Trabajador de Concepción, Chile. Posteriormente, los materiales se conservan a temperatura ambiente.



Figura 13. Sala de hornos de alta temperatura del Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica.

### **3.1.8. GRUPOS DE TRABAJO**

Se intervienen quirúrgicamente 60 conejos, distribuidos en 5 grupos de 12 animales cada uno, los que a su vez se han dividido en 2 subgrupos de 6 ejemplares, conformando un total de 10 subgrupos, en función del implante recibido y el tiempo de estabulación previo a la eutanasia.

#### **3.1.8.1. GRUPO CH**

Está conformado por los 12 conejos en que se ha implantado cemento de fosfato  $\alpha$  tricálcico. De ellos, 6 animales se eutanasian a las 4 semanas (subgrupo CH - 04) y 6 a las 12 semanas (subgrupo CH - 12).

#### **3.1.8.2. GRUPO CR**

Está formado por 12 ejemplares que han recibido como implante cemento de fosfato monocálcico. También se dividen en 2 subgrupos de 6 ejemplares, uno que se eutanasia a las 4 semanas (subgrupo CR - 04) y el otro a las 12 semanas (subgrupo CR - 12).

### **3.1.8.3. GRUPO G0**

En los 12 conejos de este grupo se ha implantado vidrio G0 ( $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ ). Como en los grupos anteriores, 6 ejemplares se eutanasian a las 4 semanas (subgrupo G0 - 04) y 6 individuos transcurridas 12 semanas desde la intervención (subgrupo G0 - 12).

### **3.1.8.4. GRUPO G5**

Este grupo de 12 conejos ha recibido vidrio G5 ( $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ - $TiO_2$ ). Al igual que en todos los grupos, se eutanasian 6 ejemplares a las 4 semanas (subgrupo G5 - 04) y 6 transcurridas 12 semanas desde la intervención (subgrupo G5 - 12).

### **3.1.8.5. GRUPO CO**

Está constituido por los 12 animales que han recibido autoinjerto óseo esponjoso fresco como implante (grupo control). Este grupo se divide en 2 subgrupos de 6 ejemplares cada uno, el primero de los cuales se eutanasia a las 4 semanas (subgrupo CO - 04) y el segundo luego de 12 semanas de estabulación (subgrupo CO - 12).

### **3.1.9. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANIMALES**

Los animales se identifican con dos letras o una letra y un número, dependiendo del biomaterial con el que han sido implantados. De esta manera, se denominan como CH los conejos que han recibido cemento H, CR los animales que han sido implantados con cemento R, G0 los conejos que han recibido vidrio G0, G5 los animales que han sido implantados con vidrio G5 y CO los conejos que han recibido autoinjerto óseo.

A lo anterior, se agregan dos cifras numéricas que señalan el tiempo de estabulación y el número correlativo del ejemplar. Esta denominación se mantiene posteriormente en las piezas recogidas para el estudio radiológico e histomorfométrico.

Así, por ejemplo, el animal identificado CR-12-05 corresponde al quinto ejemplar del grupo implantado con cemento R y estabulado durante 12 semanas. El individuo denominado G5-04-02 corresponde al segundo conejo del grupo que ha recibido vidrio G5 como implante y que ha permanecido estabulado por 04 semanas.

## **3.2. MÉTODO**

### **3.2.1. MANEJO PREOPERATORIO**

Todos los animales admitidos para cirugía experimental se evalúan rigurosamente, para corroborar que se encuentren en buenas condiciones generales, seleccionando los ejemplares con un peso comprendido entre 3.000 y 4.000 gramos y una edad entre 4 y 6 meses.

#### **3.2.1.1. ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES**

Los animales son cuidados y mantenidos en el Estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción, Chile, bajo condiciones ambientales de temperatura entre 18 y 25 °C y una humedad entre 50.0 y 70.0 %.

El régimen alimentario estándar es liofilizado, con un contenido de 16.5 % de proteína pura, 13.5 % de fibra, 1.2 % de calcio, 0.65 % de fósforo, enriquecido con 10.000 UI de vitamina A y 2.000 UI de vitamina D3 por cada kg. de comida. Se administra agua a demanda.

Los animales ingresan al estabulario una semana antes de la intervención quirúrgica, período en que permanecen en cuarentena.

#### **3.2.1.2. ANESTESIA**

Se realiza con la combinación de tres fármacos que se administran por vía subcutánea<sup>392</sup>.

- Hidrocloruro de Ketamina (Ketostop ®), en dosis de 35 mg/kg de peso.
- Clorhidrato de Xilazina 2.0 % (Xilazina ®), en dosis de 18 mg/kg de peso.
- Acepromazina Maleato 1.0 % (Pacifor ®), en dosis de 1 mg/kg de peso.

Con estas tres drogas se consigue una excelente anestesia y relajación del animal, cuyo efecto tiene una duración entre 45 y 60 minutos.

#### **3.2.1.3. PREPARACIÓN PREOPERATORIA**

Se rasura con máquina eléctrica la zona a intervenir, luego se pincela toda el área con una solución al 10.0 % de polividona yodada y enseguida se cubre con tallas estériles.

#### **3.2.1.4. PROFILAXIS ANTIBIÓTICA**

Se efectúa con Enrofloxacino (Baytril 5.0 % ®) en dosis de 5 mg/kg de peso, administrado por vía intramuscular al inicio del procedimiento de anestesia del animal.

#### **3.2.2. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA**

Se realiza con el animal en decúbito supino sobre una tabla quirúrgica, con el campo quirúrgico delimitado por tallas estériles perforadas. Todo el instrumental y los implantes utilizados en la intervención quirúrgica han sido esterilizados previamente con óxido de etileno. (Fig. 14).

La intervención comienza con una incisión cutánea longitudinal de aproximadamente 1 cm. sobre el cóndilo femoral medial. Enseguida, se incide la fascia muscular y el vasto medial para acceder a la región metafisaria del fémur. La rótula proporciona una buena referencia para la identificación del cóndilo femoral.

Luego se desperiostiza la cara medial de la metafisis distal del fémur para poder centrar bien el orificio, teniendo presente que el diámetro de los cóndilos es de unos 8 mm. y el defecto a crear es de 6 mm.

El punto central de la perforación se marca con un punzón y enseguida se realiza un primer orificio con una broca de 3 mm. de diámetro montada en un motor eléctrico estéril. Posteriormente, se procede a fresar con la broca de 6 mm. para obtener el defecto óseo propiamente tal. (Fig. 15).

Una vez que se completa el defecto cavitario, se lava con abundante suero fisiológico para eliminar los *debris*, se seca el área con una gasa y luego se coloca el implante correspondiente, es decir, cemento R, cemento H, vidrio G0, vidrio G5 o autoinjerto óseo esponjoso fresco.

En el caso del grupo control, que recibe como implante autoinjerto óseo esponjoso fresco, la técnica quirúrgica es similar pero se debe preparar y abordar los cóndilos mediales de ambos fémures, ya que luego de realizado el orificio en el fémur derecho, se debe obtener el injerto óseo esponjoso con una trefina desde el fémur izquierdo. (Figs. 16, 17).

El implante de los cementos de fosfatos cálcicos requiere de un manejo específico ya que, por sus propiedades particulares, la mezcla de sus dos componentes debe respetar tiempos bien definidos que se miden con un cronómetro, de esta manera se obtiene una presa óptima y las mejores características físico-químicas y biomecánicas del material.

Para ello se vierte el componente líquido y el polvo del cemento de fosfato cálcico en un mortero, disponiéndose de un minuto para conseguir una mezcla homogénea. (Fig. 18).

Entre el minuto 1 y el minuto 5, el cemento se deja reposar para no alterar sus propiedades físico-químicas. Entre el minuto 5 y el minuto 6 se coloca el cemento preparado en el defecto cavitario. El cemento H se inyecta con jeringa y el cemento R se aplica con espátula y cucharilla. Entre los minutos 6 y 12 se mantiene la herida operatoria abierta para permitir la aireación del material implantado. A los 12 minutos se procede a suturar la herida operatoria. (Figs. 19, 20).

El implante en el defecto cavitario femoral de los vidrios de base fosfato se efectúa con cucharilla luego de mezclarlos con la sangre del animal. (Figs. 21, 22).

Posteriormente se sutura la fascia muscular con puntos separados de Dexon 3/0 y la piel con seda 3/0, sin dejar dren ni apósitos.



Figura 14. Instrumental utilizado en las intervenciones.

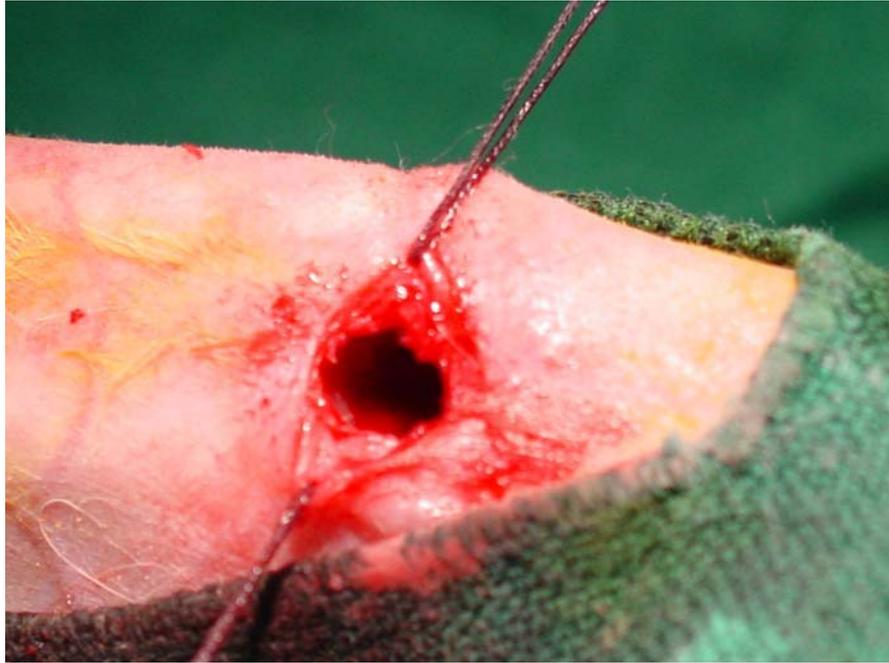


Figura 15. Defecto cavitario de 6 mm.



Figura 16. Trefina de 6 mm.

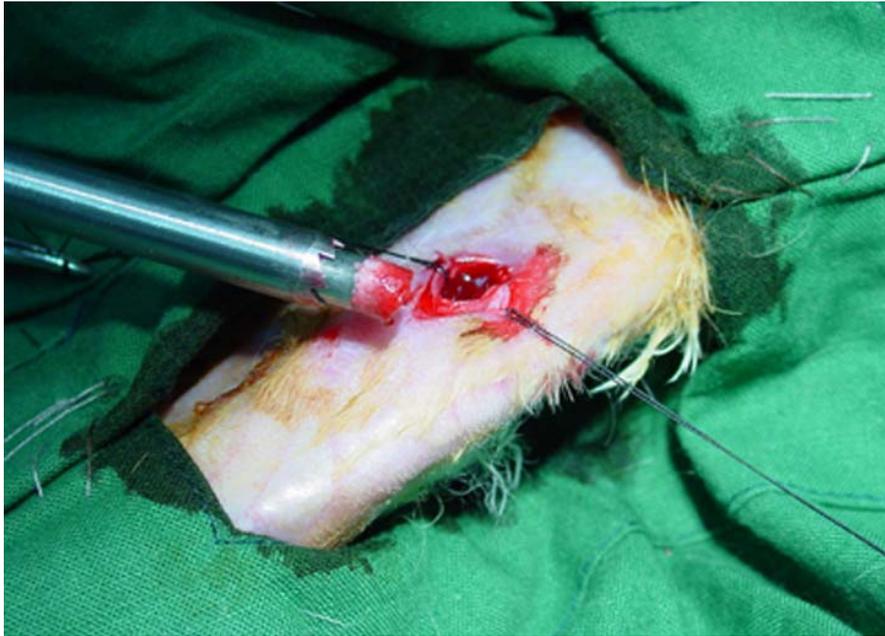


Figura 17. Obtención del injerto óseo.



Figura 18. Mezcla de los componentes de los cemento óseos.



Figura 19. Implantación del cemento H con jeringa.



Figura 20. Implantación del cemento R con espátula.

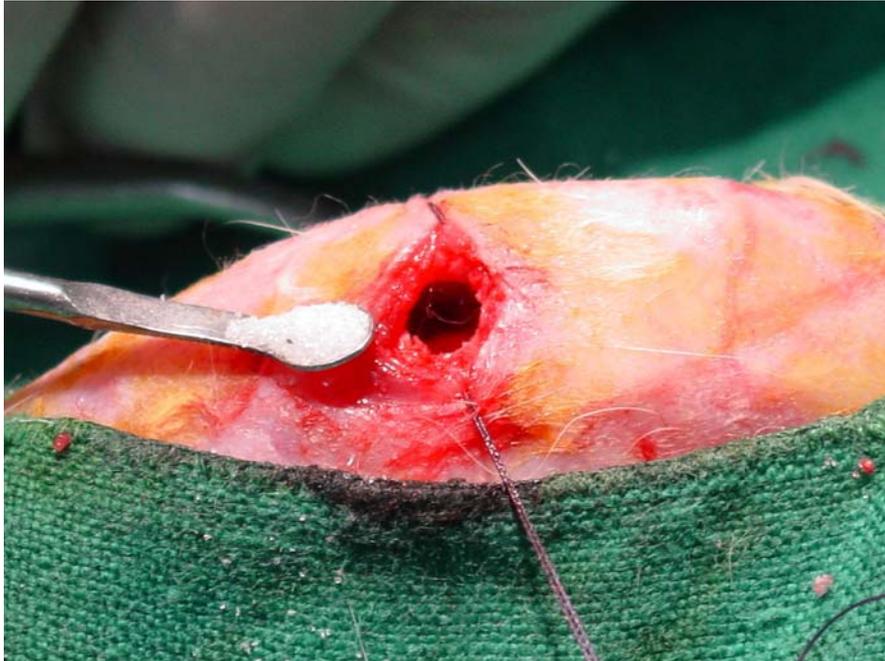


Figura 21. Vidrio de fosfato previo a su implantación.

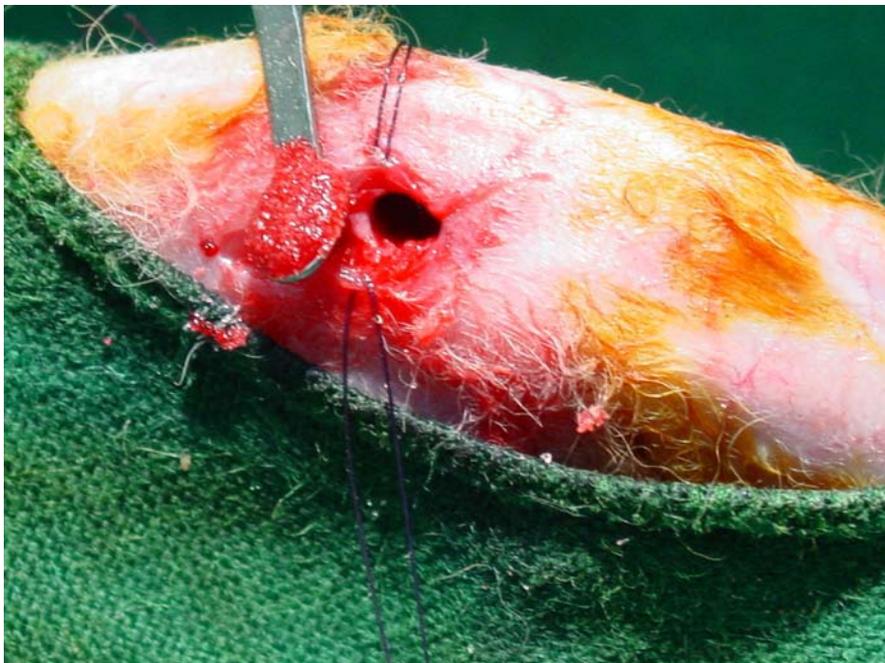


Figura 22. Implantación de un vidrio de fosfato mezclado con sangre.

### **3.2.3. MANEJO POSOPERATORIO**

El conejo se coloca en su jaula individual inmediatamente después de la intervención, sin inmovilizar la extremidad. Cada jaula se identifica con la denominación del animal, la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha de la futura eutanasia.

#### **3.2.3.1. ANALGESIA**

Se efectúa con Ketoprofeno (Ketofen 1.0 % ®) en dosis de 2 mg/kg de peso administrado por vía intramuscular, cuya primera dosis se coloca al terminar la intervención quirúrgica y luego se administra cada 24 horas hasta completar siete días.

#### **3.2.3.2. CONTROLES**

Se evalúa diariamente el consumo normal de agua y alimentos, el estado de la herida y la movilidad espontánea de la extremidad.

#### **3.2.3.3. ESTABILACIÓN POSQUIRÚRGICA**

Los animales permanecen en sus jaulas hasta completar su periodo de estabilación predeterminado, de acuerdo con el material con que han sido implantados y el grupo de estudio específico al que pertenecen.

#### **3.2.3.4. PROTOCOLO DE EUTANASIA**

La eutanasia se realiza con el animal de experimentación previamente sedado con Clorhidrato de Xilazina 2.0 % (Xilazina ®), administrando una sobredosis endovenosa de Tiopental Sódico, solución al 2.0 %, 1 g. en 50 ml. de agua bidestilada (Pentothal ®) lo que provoca el *exitus* por paro cardiorrespiratorio.

#### **3.2.3.5. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS**

Para la obtención de las muestras óseas se realiza un abordaje lateral longitudinal del muslo derecho del conejo, extrayendo completamente el fémur por desarticulación a nivel de la cadera y rodilla.



Figura 23. Serie de muestras óseas recogidas.

### **3.2.4. EVALUACIÓN**

Cada espécimen es preparado para ser consecutivamente sometido a los estudios radiológico, histológico e histomorfométrico.

#### **3.2.4.1. ESTUDIO RADIOLÓGICO**

Una vez recogidas, las muestras óseas son llevadas a la Unidad de Radiología del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital del Trabajador de Concepción, Chile, donde se realiza el estudio radiológico del fémur.

##### **3.2.4.1.1. METODOLOGÍA**

Cada fémur correspondiente a un animal de experimentación útil es sometido a un estudio radiológico frontal y lateral en un equipo Duo Diagnos de Philips ®. (Fig. 26).

Para mejorar la calidad de las imágenes, las radiografías se realizan con una distancia focal de 100 cm., 42 KV, 36 mAs y empleando placas de mamografía de grano fino Min-R S de 18 x 24 cm. Kodak ®. Posteriormente, las radiografías son digitalizadas y transformadas en negativo para facilitar la interpretación imagenológica.

### 3.2.4.1.2. ESCALA DE VALORACIÓN

Para la valoración radiológica de la incorporación de los injertos óseos, se han descrito diferentes escalas que ponderan principalmente el aspecto de su área central. Sin embargo, no existen baremos específicos de evaluación radiológica para el estudio de los defectos óseos cavitarios tratados con injertos óseos o biomateriales <sup>393-395</sup>.

La implantación de biomateriales basados en fosfatos de calcio hace que las imágenes radiológicas presenten, desde el principio, un aumento de densidad que no debe ser confundido con regeneración ósea. De esto se desprende que en el caso de los implantes de cementos y vidrios de fosfatos de calcio, sólo se puede considerar que hay regeneración ósea cuando se observa la aparición de trabéculas. También se debe tener presente que la mayoría de los estudios destacan la falta de correlación entre los resultados radiológicos e histomorfométricos <sup>24,25,26,27</sup>.

En este trabajo de tesis la valoración radiológica se efectúa empleando los criterios descritos para la formación ósea por Lane y Sandhu en 1987 <sup>395</sup>.

**Tabla 1.** Criterios de Lane y Sandhu para la valoración radiológica.

<b>Formación ósea</b>	<b>Puntuación</b>
No hay formación ósea	0
Formación ósea en el 25 % del defecto	1
Formación ósea en el 50 % del defecto	2
Formación ósea en el 75 % del defecto	3
Formación ósea en todo el defecto	4
<b>Remodelación</b>	<b>Puntuación</b>
Sin remodelación	0
Remodelación apreciable	2
Remodelación completa	4

### **3.2.4.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO**

Luego de completar el estudio radiológico se procede a cortar el fémur con una sierra eléctrica en forma longitudinal, obteniendo un segmento óseo de aproximadamente 5 mm. de ancho que incluye el área de implantación. A continuación, las muestras son procesadas para su estudio con técnica para hueso no descalcificado realizando los pasos que siguen:

#### **3.2.4.2.1. FIJACIÓN**

Se lleva a cabo por inmersión de las muestras en etanol al 70 % durante 24 horas, en frascos debidamente identificados con la denominación del animal correspondiente.



Figura 24. Muestras óseas en proceso de fijación.

#### **3.2.4.2.2. DESHIDRATACIÓN Y DESLIPIDACIÓN**

Se realiza a través de pasajes sucesivos de los segmentos óseos por diferentes gradaciones de etanol y acetona.

- Etanol-acetona al 50 % durante 12 horas.
- Acetona durante 12 horas.
- Etanol-acetona al 50 % durante 12 horas.
- Etanol absoluto durante 24 horas.

### 3.2.4.2.3. INFILTRACIÓN

Este proceso se efectúa con una resina plástica hidrosoluble basada en Glicolmetacrilato, JB - 4 Plus ®, que penetra e impregna con facilidad al tejido óseo. Para ello se mezclan 100 ml. de 2-hidroxietilmetacrilato-polietilenglicol con 1 gramo de peróxido de benzoilo en polvo al 70 %, los que se revuelven hasta la disolución completa. Esta mezcla se puede conservar refrigerada a 4 °C en un frasco de vidrio de paredes oscuras, herméticamente cerrado, por 5 a 6 semanas. Enseguida, se colocan las muestras óseas en tubos de vidrio que contienen la mezcla descrita para su infiltración durante 12 horas.

### 3.2.4.2.4. INCLUSIÓN

Una vez que se ha completado la infiltración, se procede a realizar la inclusión de las muestras óseas. Para ello se prepara la resina basada en glicolmetacrilato, mezclando 15 ml. de la solución catalizada refrigerada, previamente descrita, con 1 ml. de solución derivada de pirimidenetrione. Enseguida, se vierte la mezcla preparada en moldes de polietileno que poseen cavidades de 13 x 19 x 5 mm., donde se colocan las muestras óseas debidamente identificadas. Sobre las muestras que se encuentran en proceso de inclusión se instalan bloques plásticos de contención, cubriendo herméticamente los moldes para obtener condiciones anaeróbicas.

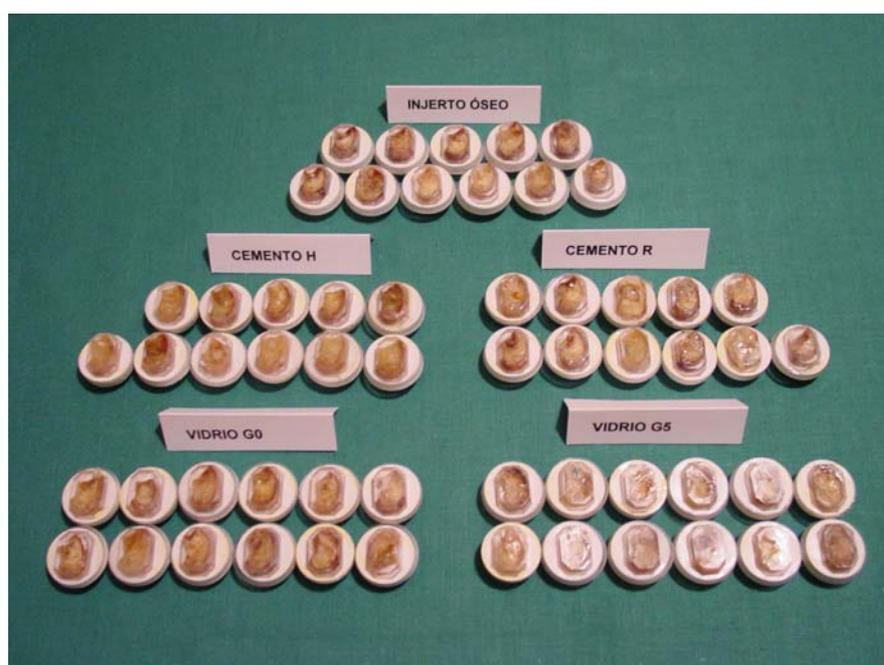


Figura 25. Serie de 57 muestras óseas útiles incluidas en resina de glicolmetacrilato.

La polimerización de la resina plástica basada en glicolmetacrilato se completa en aproximadamente 2 horas a la temperatura ambiente, luego de lo cual las muestras se pueden retirar de los moldes.

#### **3.2.4.2.5. CORTES HISTOLÓGICOS**

La técnica de inclusión de las muestras óseas en una resina plástica basada en glicolmetacrilato permite estudiar el hueso sin descalcificar preservando sus relaciones histológicas. Esto hace posible valorar la calidad de la mineralización ósea y la relación entre los diferentes componentes del tejido óseo.

Los cortes histológicos de las muestras óseas útiles se realizan con un micrótomo especial para tejidos duros, para obtener tres secciones de 5 µm. de espesor.

#### **3.2.4.2.6. TINCIONES**

Cada uno de los cortes histológicos, correspondientes a un animal de experimentación, son teñidos con tres métodos diferentes, tinción de hematoxilina-eosina, tinción de tricrómico de Goldner y tinción de Von Kossa.

##### **3.2.4.2.6.1. TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA**

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.
- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (10-20 minutos).
- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

La tinción hematoxilina-eosina permite observar el osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro.

### **3.2.4.2.6.2. TINCIÓN DE TRICRÓMICO DE GOLDNER**

Este método considera la siguiente secuencia:

- Hematoxilina férrica durante 5 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido en ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Ácido fosfotúngstico-Orange G durante 7 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Verde luz durante 12 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético durante 5 minutos.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Deshidratar y montar.

En este caso se observa el osteoide de color rojo y el hueso mineralizado de color verde.

### **3.2.4.2.6.3. TINCIÓN DE VON KOSSA**

Esta técnica comprende los siguientes puntos:

- Nitrato de plata al 3 % durante 5 minutos.
- Dos lavados de 5 minutos con agua destilada.
- Formol-carbonato de sodio durante 5 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Ácido fosfotúngstico-Orange G durante 7 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Deshidratación y montaje.

La tinción de Von Kossa permite ver el ribete de osteoide de color rojo intenso y el hueso mineralizado de color negro. Este gran contraste facilita las lecturas histomorfométricas.

### **3.2.4.3. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO**

Corresponde al análisis histológico cuantitativo de los diferentes elementos que integran el tejido óseo, es decir, células y sustancia intercelular<sup>64,396</sup>.

#### **3.2.4.3.1. BASES DE LA HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA**

Los fundamentos de la histomorfometría ósea se basan en el hecho que el hueso vivo normal está sometido a una serie de procesos dinámicos como crecimiento, modelado, remodelación y reparación.

La remodelación corresponde a la fase en que el hueso envejecido es sustituido por tejido óseo nuevo, la que se realiza a través del acoplamiento de los procesos de reabsorción y neoformación ósea separados por una fase de reposo.

El volumen de tejido óseo preexistente reemplazado por hueso nuevo se denomina recambio óseo, y la diferencia entre el volumen de hueso formado y reabsorbido por unidad de tiempo recibe el nombre de balance óseo.

En el proceso de incorporación de los injertos óseos inicialmente se activan la reabsorción y la neoformación ósea y, posteriormente, se desencadena la fase de remodelación del hueso neoformado.

La fase de neoformación ósea es desarrollada por los osteoblastos que son los encargados de la síntesis de la fracción orgánica de la matriz ósea. La superficie que une el tejido óseo preexistente con el hueso neoformado se denomina superficie de inversión. La formación de hueso no es un proceso continuo, dado que experimenta interrupciones transitorias. El área que refleja este fenómeno recibe el nombre de superficie de interrupción y se identifica en los cortes histológicos como una línea basófila lisa.

El hueso neoformado se deposita en forma de matriz ósea no mineralizada y se denomina osteoide, la que posteriormente se calcifica transformándose en hueso maduro. La mineralización primaria comienza en la interfaz entre el osteoide y el hueso preexistente, mediante la formación de cristales de hidroxapatita a nivel de un plano que recibe el nombre de frente de mineralización.

La fase de reabsorción ósea es responsabilidad de los osteoclastos, que excavan el hueso formando las lagunas de Howship. La superficie de reabsorción que abarca cada osteoclasto recibe el nombre de dominio osteoclástico.

La traducción histológica de todos los procesos que experimenta el hueso puede ser determinada estudiando las muestras óseas.

#### **3.2.4.3.2. MEDICIONES HISTOMORFOMÉTRICAS**

Corresponden a una serie de recuentos y mediciones efectuadas en el tejido óseo, las que relacionadas entre sí permiten elaborar los parámetros histomorfométricos.

En este trabajo experimental se realizan seis mediciones histomorfométricas, que corresponden a:

##### **3.2.4.3.2.1. ÁREA DE IMPLANTE (A.I.)**

Es el área del defecto óseo de 6 mm. de diámetro realizado en el fémur distal del conejo. Esta debería medir teóricamente 28.274 mm<sup>2</sup> correspondientes al cálculo del área de un círculo con un radio de 3 mm. Sin embargo, la medición real suele no ser coincidente con este valor, debido a que los cortes histológicos no son siempre perfectamente perpendiculares. Se expresa en mm<sup>2</sup>.

##### **3.2.4.3.2.2. ÁREA TRABECULAR TOTAL (A.T.T.)**

Área que ocupan las trabéculas óseas en el defecto cavitario creado e indica la cantidad de tejido óseo presente en su interior. Cuando se realiza la implantación de biomateriales el área trabecular total corresponde completamente a tejido óseo neoformado. En cambio, en el caso de los injertos óseos esta medición no permite diferenciar entre el hueso neoformado y el tejido óseo depositado en el defecto. Por ello es necesario interpretar este valor analizando los parámetros de formación de osteoide. Se cuantifica en mm<sup>2</sup>.

##### **3.2.4.3.2.3. PROFUNDIDAD DE CRECIMIENTO (P.C.)**

La neoformación ósea progresa en forma centrípeta desde los bordes en los defectos óseos

implantados, por lo que esta medición indica el crecimiento medio de las trabéculas desde la periferia. Corresponde al valor promedio de 12 medidas realizadas, a la manera de una esfera de reloj, de la profundidad de crecimiento óseo generada por los distintos implantes. Se expresa en mm.

#### **3.2.4.3.2.4. LONGITUD TOTAL DE OSTEOIDE ( L.T.O.)**

Corresponde al borde de las trabéculas óseas que presenta frente de osteoide en el defecto cavitario. Indica la cantidad de reborde trabecular en que se produce neoformación ósea. Se cuantifica en  $\mu\text{m}$ .

#### **3.2.4.3.2.5. AMPLITUD MEDIA DE OSTEOIDE (A.M.O.)**

Es el grosor promedio de los distintos ribetes de osteoide que se encuentran presentes en el defecto óseo estudiado. Esta medición corresponde a un indicador indirecto de la actividad osteoblástica. Se expresa en  $\mu\text{m}$ .

#### **3.2.4.3.2.6. ÁREA DE BIOMATERIAL NO REABSORBIDO (A.B.N.R.)**

Corresponde al área ocupada por los restos de los cuatro materiales implantados, es decir, cemento H, cemento R, vidrio G0 y vidrio G5, que permanecen sin reabsorber en los dos periodos estudiados. Se cuantifica en  $\text{mm}^2$ .

#### **3.2.4.3.3. PARÁMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS**

Se obtienen relacionando entre sí las mediciones histomorfométricas antes descritas y permiten definir cuantitativamente las características estructurales y funcionales del tejido óseo.

En este trabajo de tesis hemos calculado tres parámetros histomorfométricos, los que se describen a continuación:

##### **3.2.4.3.3.1. SUPERFICIE PORCENTUAL DE HUESO NEOFORMADO (Sv)**

Es la relación entre el área trabecular total (A.T.T.) y el área de implante (A.I.). Es uno de los

parámetros más importantes, debido que es ampliamente utilizado en los distintos estudios que valoran la neoformación ósea cuantitativa. Se expresa en %.

#### **3.2.4.3.3.2. ÁREA DE OSTEOIDE (Aos)**

Se obtiene multiplicando la longitud total de osteoide (L.T.O.) por la amplitud media de osteoide (A.M.O.). Se cuantifica en  $\mu\text{m}^2$ .

#### **3.2.4.3.3.3. RELACIÓN ÁREA DE OSTEOIDE / ÁREA TRABECULAR TOTAL (Aos / ATT)**

Este parámetro se obtiene relacionando el área de osteoide (Aos) con el área trabecular total (ATT) y nos entrega información respecto de la actividad de neoformación ósea. Se expresa en %.

#### **3.2.4.3.4. LECTURA HISTOMORFOMÉTRICA**

El estudio histomorfométrico se realiza en el Laboratorio de Microscopía del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Concepción, Chile, utilizando un microscopio óptico Zeiss® Axioplan 2, conectado a una cámara digital Nikon® DXM 1200 de 12.0 megapixels.

Este equipo permite la visualización y procesamiento directo de las imágenes obtenidas desde los diferentes cortes histológicos en la pantalla de un Ordenador Pentium IV, con el programa Windows XP® Professional Edition, realizando las distintas mediciones histomorfométricas con el programa informático Image-Pro® Plus 4.5.

Para facilitar la realización de las seis mediciones de este estudio, se divide cada muestra histológica en 6 partes y luego se verifican todas las medidas de manera independiente en cada una de estas áreas.

Las mediciones del Área de Implante (A.I.), Área Trabecular Total (A.T.T.), Profundidad de crecimiento (P.C.) y Área de Biomaterial No Reabsorbido (A.B.N.R.) se realizan con 10 aumentos al microscopio.

La medición de la Longitud Total de Osteoide (L.T.O.) se efectúa con 100 aumentos y la correspondiente a la Amplitud Media de Osteoide (A.M.O.) se realiza con 400 aumentos.



Figura 26. Unidad de radiología.



Figura 27. Laboratorio de microscopía.

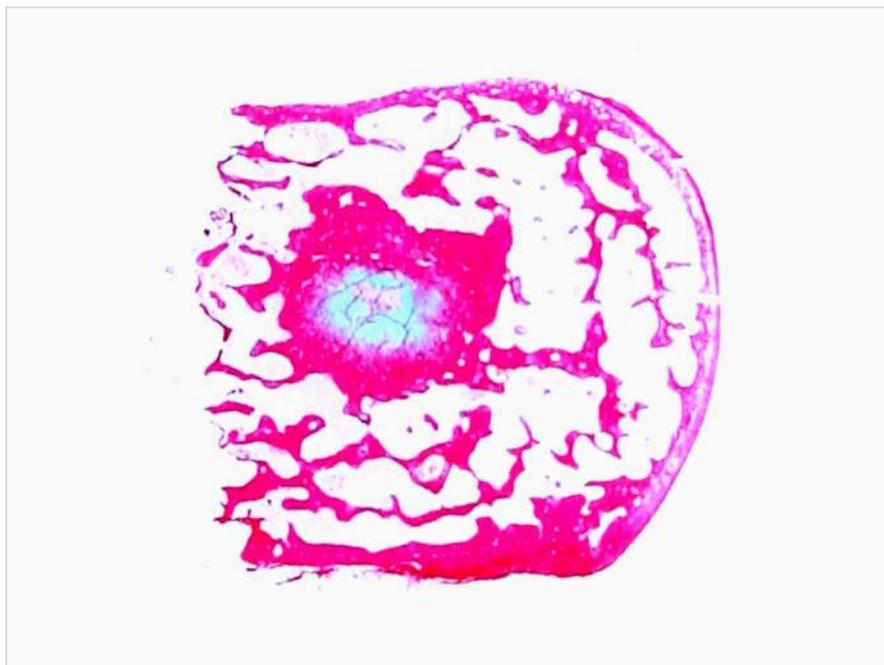


Figura 28. Muestra histológica panorámica del cemento R a las 4 semanas.

#### **3.2.4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico de los resultados radiológicos e histomorfométricos obtenidos con la implantación de los dos tipos de cementos óseos y dos vidrios bioactivos basados en fosfatos de calcio y su comparación con el grupo control correspondiente al autoinjerto óseo esponjoso fresco, se utiliza el programa SPSS 11.0® para Windows.

En este trabajo de tesis se ha fijado un grado de significación de 0.05 que corresponde a un intervalo de confianza del 95 %.

##### **3.2.4.4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA**

###### **3.2.4.4.1.1. VARIABLES CUALITATIVAS**

Las variables cualitativas, nominales y ordinales, se describen expresando el porcentaje de cada categoría.

###### **3.2.4.4.1.2. VARIABLES CUANTITATIVAS**

Las variables cuantitativas se describen utilizando la media aritmética, la desviación

estándar y los valores mínimo y máximo.

### **3.2.4.4.2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA**

#### **3.2.4.4.2.1. PRUEBAS DE NORMALIDAD**

Se efectúan las Pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk y se acepta el supuesto de normalidad si  $P \geq 0.05$ . Cuando las variables son cuantitativas y siguen una distribución normal se realizan pruebas paramétricas. Las distribuciones normales permiten comparar variables utilizando la media y la varianza.

#### **3.2.4.4.2.2. COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS**

Para valorar muestras aparejadas que siguen una distribución normal, es decir, cuando la variable respuesta es categórica cuantitativa y la variable estudio es categórica binaria, se emplea la Prueba de la t de student.

#### **3.2.4.4.2.3. HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS**

Para valorar la homogeneidad de varianzas se utiliza la Prueba de Levene. La positividad de esta prueba no se considera determinante pero da un refuerzo al resultado obtenido.

#### **3.2.4.4.2.4. COMPARACIÓN DE MÁS DE DOS MEDIAS**

Cuando la variable respuesta es cuantitativa y la variable estudio es categórica con más de dos medias se utiliza la Prueba de Análisis de la Varianza (ANOVA).

#### **3.2.4.4.2.5. ESTABLECIMIENTO DE CONTRASTES**

Para el establecimiento de contrastes se emplea el Método de Tukey HSD.

#### **3.2.4.4.2.6. ESTUDIO DE CORRELACIÓN**

Cuando las variables respuesta y estudio son cuantitativas se utiliza el coeficiente de Correlación de Pearson como medida de asociación lineal.