

FACULTAT D'ODONTOLOGÍA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
DEPARTAMENT D'ODONTOESTOMATOLOGIA

## TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
OSTEOBLÁSTICA EN LA INTERFASE DE  
IMPLANTES DENTARIOS CON DIFERENTES  
SUPERFICIES MEDIANTE GAMMAGRAFÍA  
ÓSEA CON Tc<sup>99</sup> MDF. ESTUDIO EN UN  
MODELO ANIMAL

M. Ángeles Sánchez Garcés

Director: Prof. Dr. Cosme Gay Escoda

## **5.- MATERIAL Y MÉTODO.**



## **5. MATERIAL Y MÉTODO.**

### **5.1. Material.**

Este estudio ha sido aprobado por el Comitè Ètic D' Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona, una vez examinada la documentación presentada, en cumplimiento del Real Decreto 214/1997. A su vez también fue aprobado el procedimiento experimental por el Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (DARP).

El experimentador se encuentra en posesión del diploma del “Curso de Formación del personal investigador o usuario de animales para experimentación y otras finalidades científicas”, expedido por la Facultat de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, tal como obliga la legislación actual.

Se utilizaron 12 conejos de raza New Zealand White (NZ) homogéneos somáticamente (igualdad de sexo, peso y edad) machos, adultos-jóvenes, de 3'5 Kg para asegurar una respuesta biológica estandarizada, fiable y reproducible. Previamente al inicio del trabajo de experimentación fueron sometidos a cuarentena, aislados, para descartar los que fueran portadores de alguna enfermedad procedente de la granja de cría.

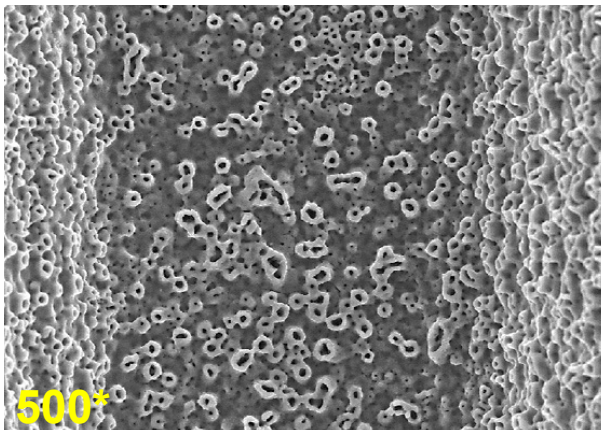
Los animales permanecieron estabulados en el “Estabulario del Campus Universitario de Bellvitge” durante el tiempo que duró el estudio, en condiciones de aislamiento, en jaulas individuales y bajo control de las variables ambientales

(temperatura, ventilación, humedad y luz), cumpliendo los puntos de la Directiva del Consejo 86/609/CEE respecto al bienestar animal.

Para que la muestra fuera aleatoria se numeró los conejos del 2 al 13, y se estableció que los números pares recibirían el implante de superficie tratada en el fémur, y los impares en la tibia.

Los implantes utilizados fueron del tipo:

- MKIII TiUnite<sup>®</sup>, Nobel Biocare, Goteborg (Suecia). A efectos de este estudio se les ha denominado de **tipo a** (superficie tratada) (figura 13 ).
- MK III<sup>®</sup>, Nobel Biocare, Goteborg (Suecia). A efectos de este estudio se les ha denominado de **tipo b** (superficie mecanizada) (figura 14).



**Figura 13. Micrografía de la superficie tratada del implante tipo a (MKIII TiUnite<sup>®</sup>, Nobel Biocare, Goteborg (Suecia)).**



**Figura 14. Micrografía de la superficie mecanizada del implante tipo b (MK III<sup>®</sup>, Nobel Biocare, Goteborg, Suecia).**

Para la realización de las gammagrafías óseas (GO) cada conejo recibió (en cada una de las sesiones gammagráficas practicadas), 185 mBq de Tc<sup>99m</sup>-HMDP (hidroximetilen difosfonato) por vía endovenosa.

La adquisición de imágenes estáticas se realizó con una gammacámara digital ELSCINT SP-6HR de campo amplio equipada con un colimador de alta resolución y baja energía. Cada imagen estática se adquirió en matriz de 512 x 512 bytes. Se adquirieron también imágenes magnificadas de las regiones intervenidas, mediante el colimador “pinhole” a distancia 0 del área de estudio.

Para el procesado de las muestras fue necesario:

- Medio plástico donde eran embebidas: Tecnovit T7200<sup>®</sup> (Kulzer, Wehrheim, Alemania).

- Aparato de fotopolimerización: Kulzer-Exakt-light-polymerisation (EXAKT, Nordenstedt, Alemania).
- Placas de plástico para cementar los bloques de las muestras preparadas para ser cortadas: Exakt micro-parallel-grinding System (EXAKT, Nordenstedt, Alemania).
- Papel de lija de grano 1200 y de grano 4000.
- Soportes metálicos para las muestras.
- Plata coloidal para fijación de la muestra.
- Carbón evaporado para recubrimiento de la muestra.
- Microscopio electrónico de barrido co-electrones secundarios (MEB): Stereoscan 360, LEO, Cambridge, Gran Bretaña; MEB JSM-840, Tokyo, Japan; AN-10000, LINK, Oxford, Gran Bretaña (Serveis Científico-Tecnic, Universitat de Barcelona).

Para las observaciones histológicas fue preciso:

- Papel de lija.
- Placas de plástico.
- Adhesivo transparente: Tecnovit T7210 (Kulzer, Wehrheim, Alemania).
- Material de tinción de con azul de toluidina: tetraborato sódico, azul de toluidina, pironina G y agua destilada.

- Material de tinción tricrómica de Masson: hematoxilina férrica, solución de Masson, ácido acético al 2%, fosformolibdeno-ácido- Orange-G, verde luz y agua destilada.
- Microscopio: Olympus BX50, Olympus (Tokio, Japón) .
- Cámara fotográfica: Nikon 801 Micro Nikkor 50, Nikon Lmt. Tokio, Japón).

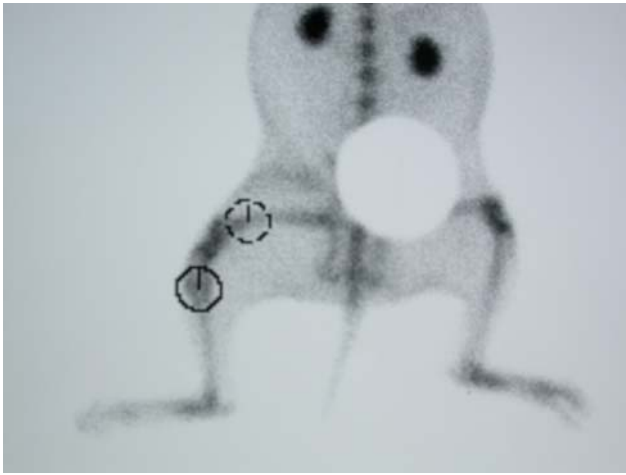
## **5.2. Método.**

### **5.2.1. Método de adquisición de la gammagrafía.**

Dos semanas antes de la intervención quirúrgica, los animales fueron sometidos a una gammagrafía planar general (con colimador de alta resolución y baja energía), recogándose un millón de cuentas por imagen, y una gammagrafía con colimador “pinhole” de las áreas a intervenir, obteniendo una imagen para la tibia y otra para el fémur.

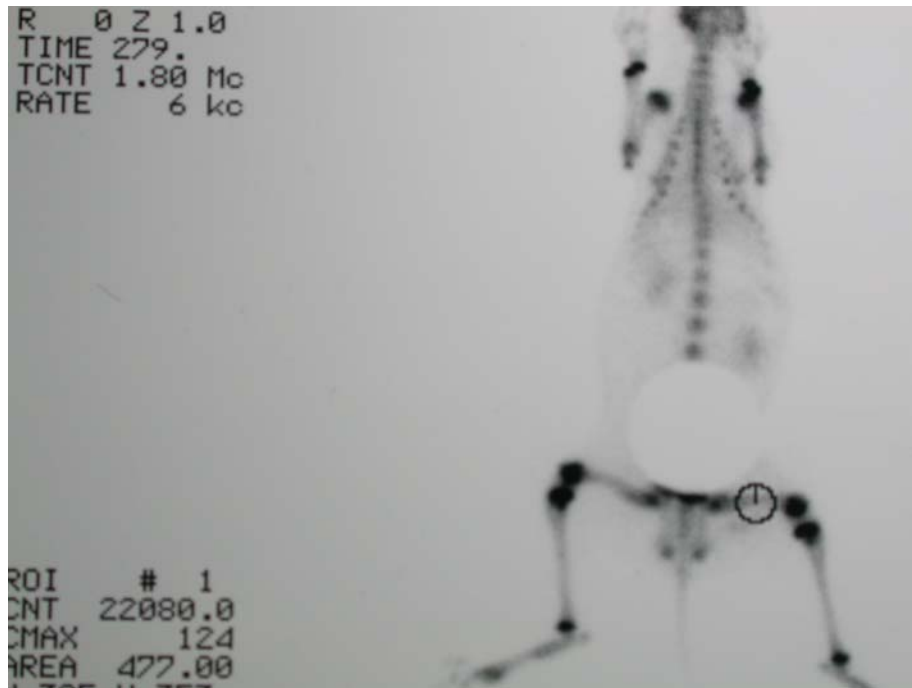
Durante el tiempo de adquisición de la gammagrafía ósea (GO) planar o general, se colocó sobre la zona de la vejiga urinaria una placa de plomo (figura 15), de este modo se anuló de la imagen las cuentas procedentes de la vejiga de la orina, contaminada por el radioisótopo, ya que como hemos descrito anteriormente el  $Tc^{99m}$  tiene eliminación renal.





**Figura 15. Imagen de un ejemplar preparado con una placa de plomo situada en la zona de la vejiga urinaria.**

Las GO se iniciaron una semana antes de la intervención y se denominó sesión “preoperatoria”, en las que se obtenía una GO planar, y dos “pinhole”, una para la tibia y otra para el fémur. Para el análisis de las imágenes, se delimitaron áreas de interés o “Regions of Interest” (ROI), circulares, siempre del mismo diámetro, siendo la ROI 1 la que correspondía a la metáfisis proximal de la tibia, por debajo del cartílago de crecimiento, y la ROI 2 la correspondiente a la metáfisis distal del fémur, por encima del cartílago de crecimiento (figuras 16, 17, 18). Posteriormente a la intervención se practicaron otras cuatro sesiones gammagráficas separadas por intervalos de un mes con el mismo protocolo. Las imágenes obtenidas se muestran en las figuras 19 a 30.



**Figura 16.** Imágenes de la GO planar tibial y femoral preoperatoria conejo n° 11.



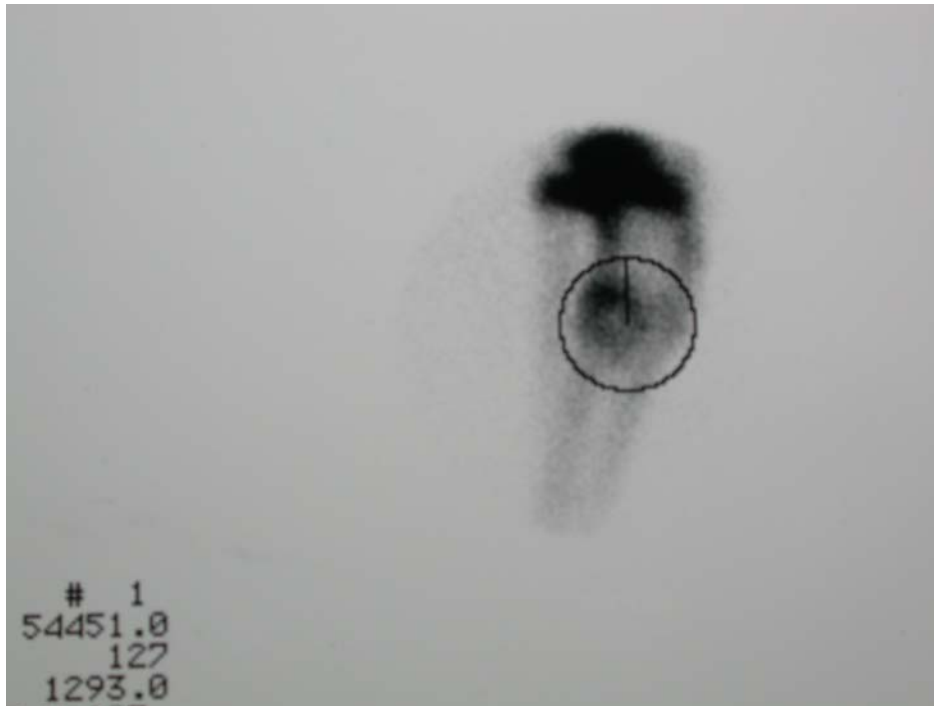
**Figura 17.** Imagen de gammagrafía “pinhole” tibial preoperatoria conejo n° 11.



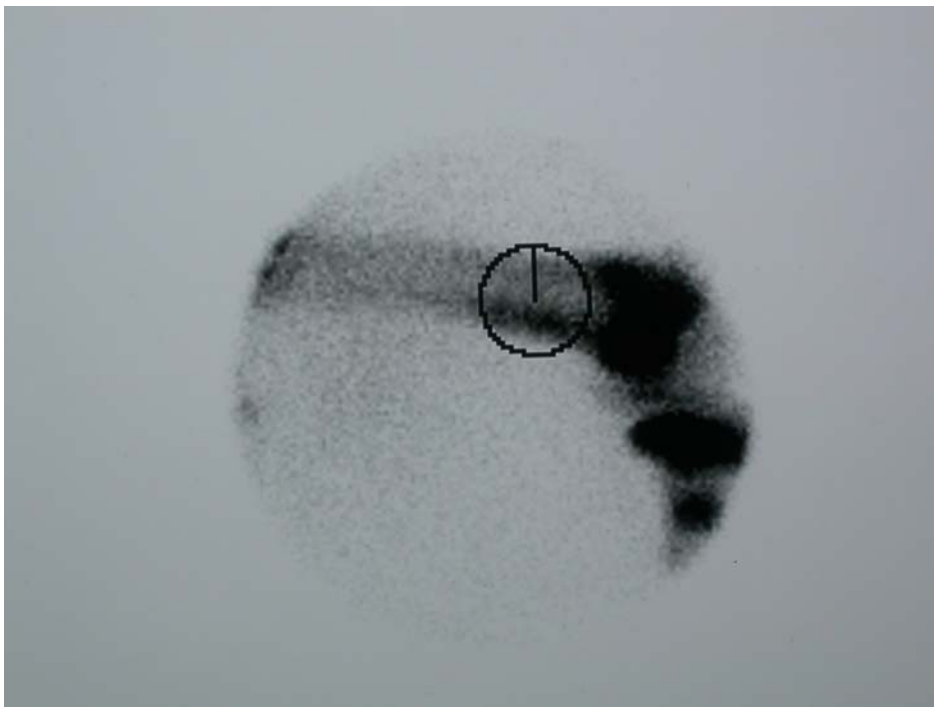
**Figura 18. Imagen de gammagrafía “pinhole” femoral preoperatorio conejo n° 11.**



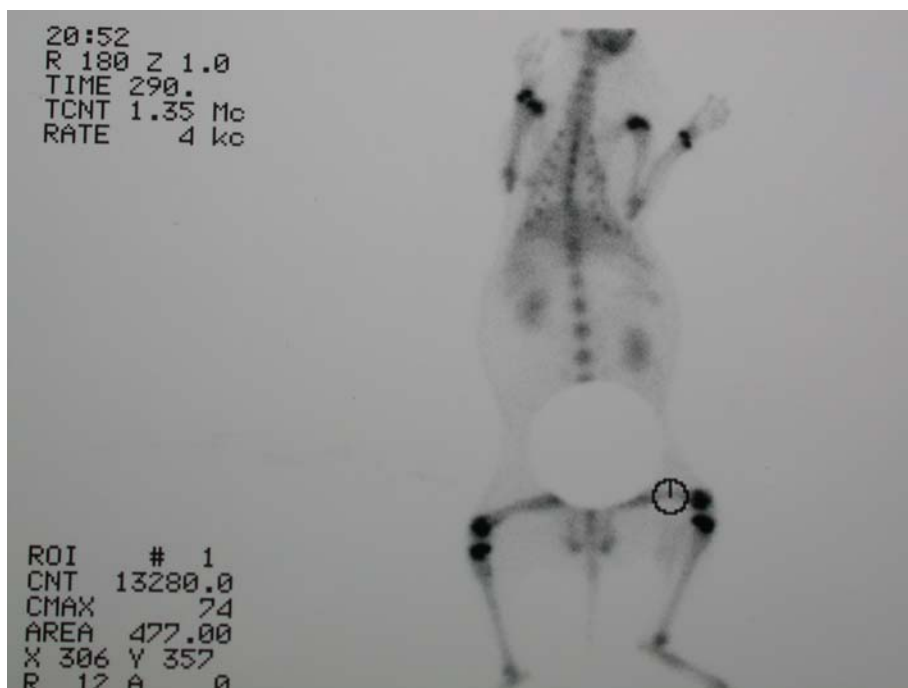
**Figura 19. Imágenes de la GO planar tibial y femoral postoperatoria 1 conejo n° 11.**



**Figura 20. Imagen de la gammagrafía “pinhole” tibial postoperatorio 1 conejo n° 11.**



**Figura 21. Imagen de la gammagrafía “pinhole” femoral postoperatorio 1 conejo n° 11.**



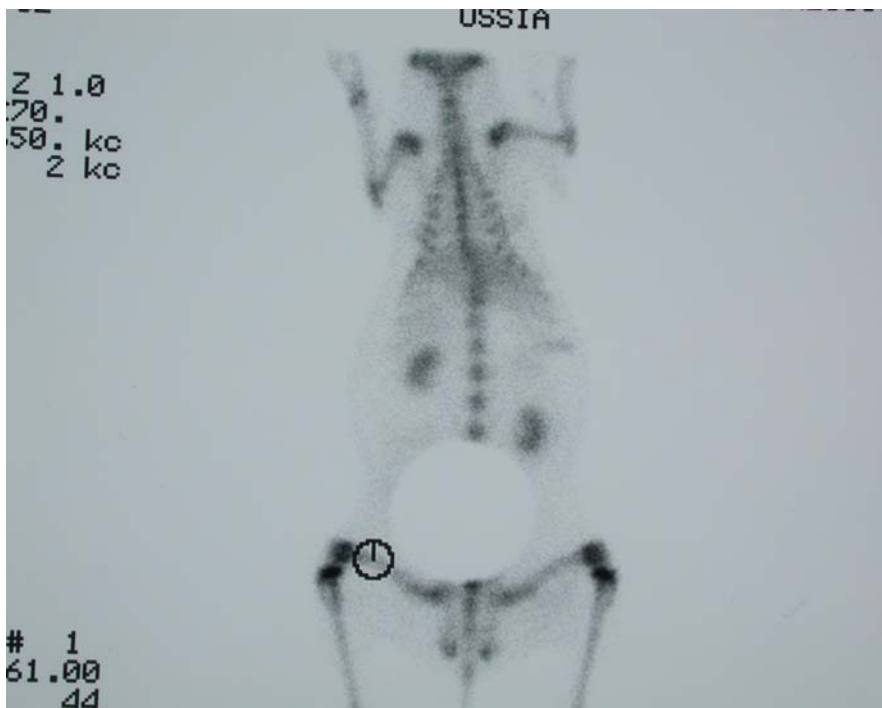
**Figura 22. Imágenes de la GO planar tibial y femoral postoperatorio 2 conejo n° 11.**



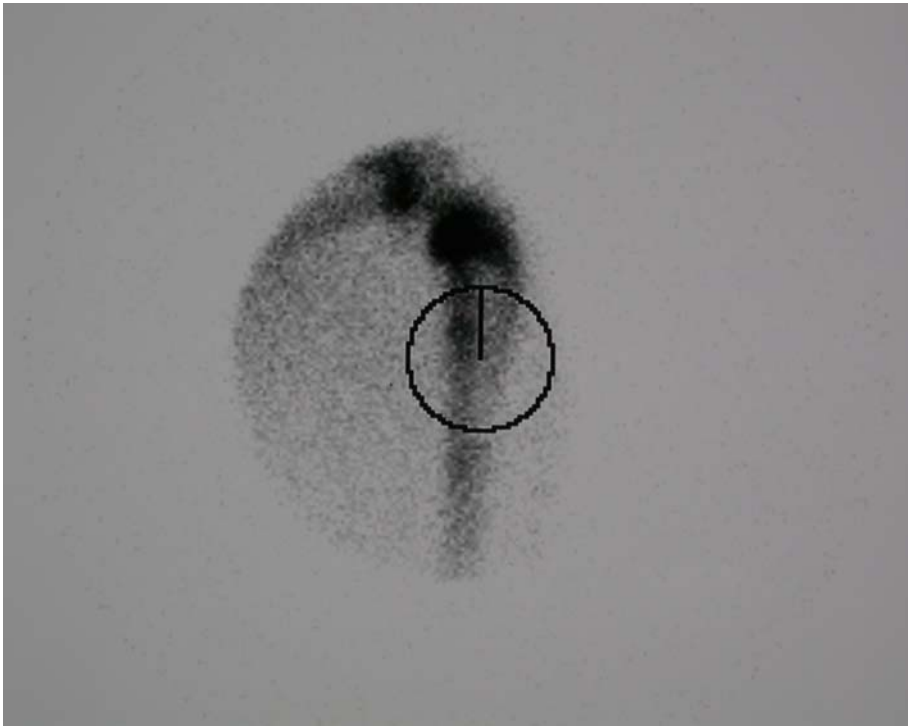
**Figura 23. Imagen de gammagrafía “pinhole” tibial postoperatoria 2 conejo n° 11.**



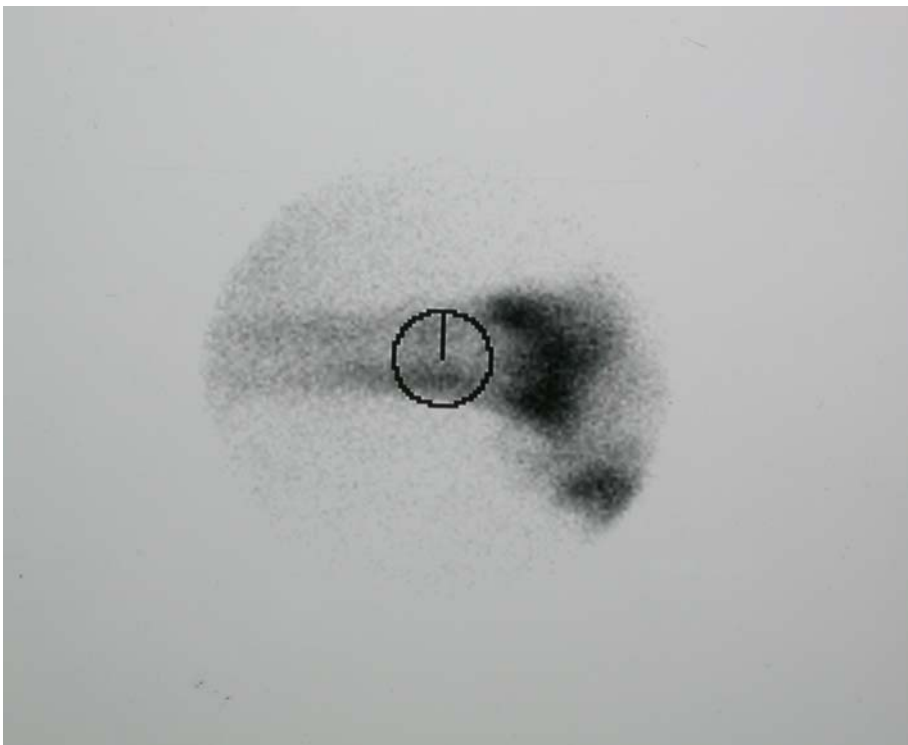
**Figura 24. Imagen de la gammagrafía “pinhole” femoral postoperatoria 2 conejo n° 11.**



**Figura 25. Imágenes de la GO planar tibial y femoral postoperatoria 3 conejo n° 11.**



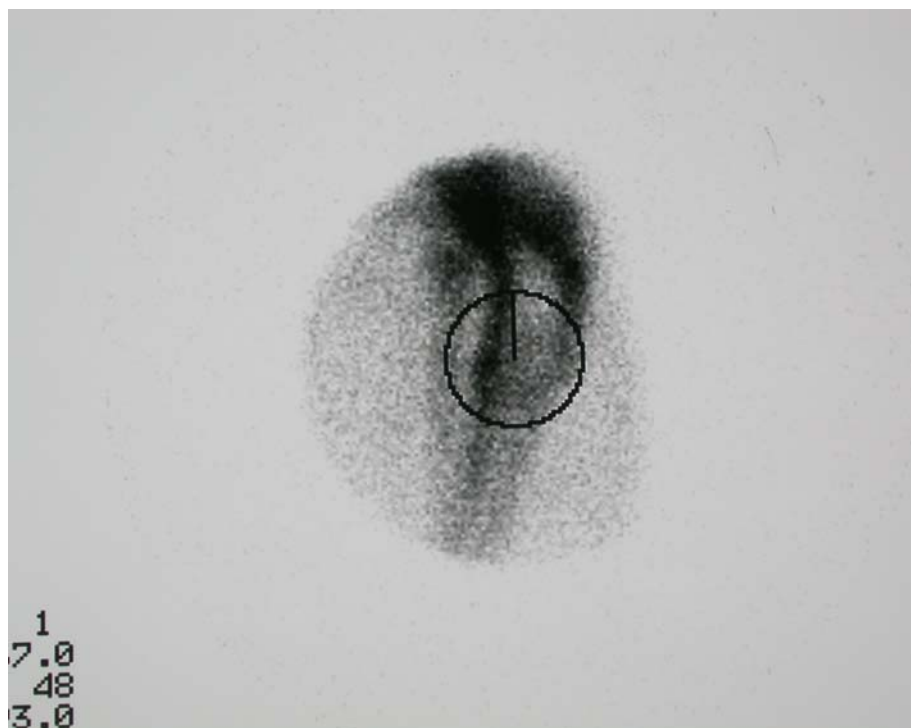
**Figura 26. Imagen de gammagrafía “pinhole” tibial postoperatoria 3 conejo n° 11.**



**Figura 27. Imagen de la gammagrafía “pinhole” femoral postoperatorio 3 conejo n° 11.**

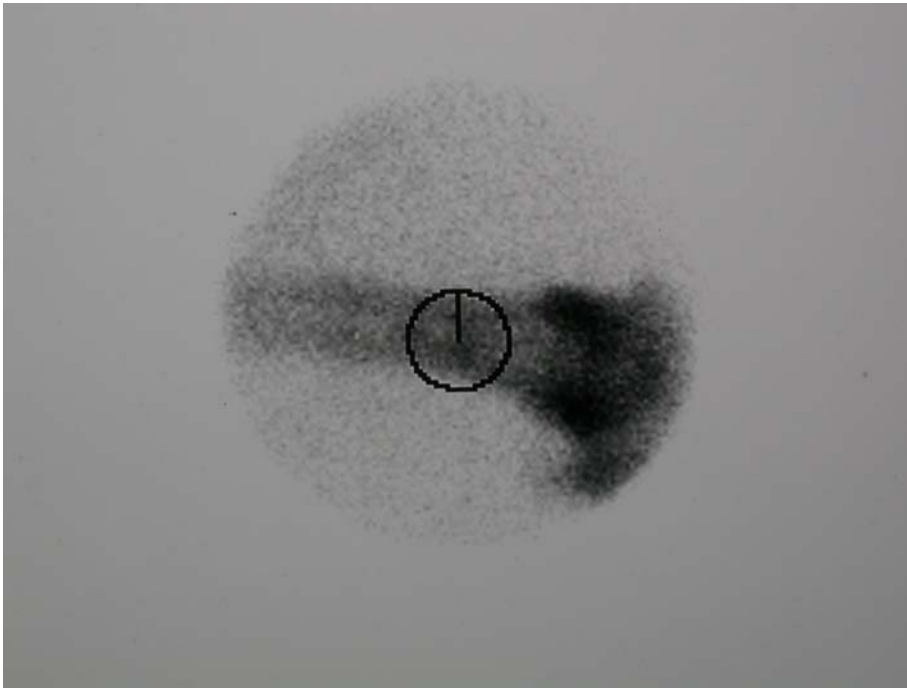


**Figura 28. Imágenes de la GO planar tibial y femoral postoperatoria 4 conejo n° 11.**



**Figura 29. Imagen de gammagrafía “pinhole” tibial postoperatoria 4 conejo n° 11.**





**Figura 30. Imagen de la gammagrafía “pinhole” femoral postoperatorio 4 conejo n° 11.**

Del estudio de las ROI se obtuvieron un número de cuentas totales (CNT) de actividad para cada área, con el fin de establecer una relación de actividad del área de interés en función del tiempo.

En la gammagrafía planar general (con colimador de alta resolución y baja energía), las ROI se registraron en ambas extremidades y en localizaciones equivalentes, tanto de la extremidad que sería intervenida como de la contralateral. El registro de una ROI contralateral se utilizó posteriormente como control a lo largo de todo el trabajo de experimentación en cada una de las sesiones exploratorias realizadas, tanto a nivel tibial como femoral.

En la gammagrafía efectuada con colimador pinhole, se acotó el tiempo de adquisición de imagen en 500 segundos, y se registró la actividad del área de

interés sólo en la pata del animal que debía ser intervenida pero en dos regiones diferentes, una la que correspondería a la situación del implante y otra algo más alejada que no interfiriera en el área de actividad del implante insertado.

Con las dos cifras obtenidas, la de la ROI que correspondía a la zona de inserción del implante y la del control, se procedió posteriormente a establecer un índice de actividad (IA):

$$\text{Índice de actividad (IA)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cuentas de la ROI problema}}{\text{n}^\circ \text{ de cuentas de la ROI control}}$$

El valor del área de actividad en la ROI problema no se consideró como un parámetro de actividad fiable, ya que el número de cuentas absoluto depende de variables ya mencionadas como son: el tiempo transcurrido entre la preparación del radioisótopo y su inyección, grado de hidratación del animal y tiempo de exploración entre otras.

### **5.3. Anestesia.**

Para poder practicar estas exploraciones fue imprescindible que el animal estuviera perfectamente inmóvil durante el tiempo de adquisición de las imágenes por lo que se practicó en todos los casos una anestesia general.

El tiempo necesario para la captación del radioisótopo por el hueso en el conejo fue de una hora, así pues, la anestesia general del animal se inició una hora antes del momento estimado para la obtención de las GO debido a la dificultad

que presentaba la inyección por vía endovenosa del radioisótopo con el animal despierto.

El protocolo seguido una vez instalado el animal en el centro de radiodiagnóstico fue el siguiente: por vía intramuscular se le inyectaba (figura 31)

- Ketamina 25 mg/ kg (Ketolar<sup>®</sup>, Parke-Davis. Pfizer. Dublin, Irlanda).

- Xylazina 5 mg/ kg (Rompun<sup>®</sup>, Bayer. Leverkusen, Alemania).

El tiempo necesario para conseguir que el animal no tuviera reflejo corneal fue de aproximadamente 5 minutos y apartir de ese instante se procedía a preparar el animal para la punción endovenosa del radioisótopo (figura 32).

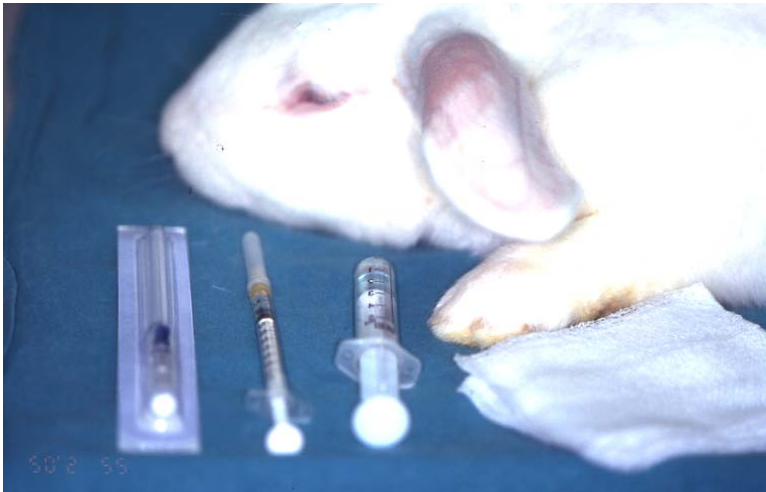


**Figura 31. Inyección intramuscular de los fármacos anestésicos en un ejemplar de estudio.**

Previamente, en el estabulario se había efectuado el rasurado de las orejas por su cara externa, para facilitar la visión de las venas en el momento de la punción. Si las venas no eran muy evidentes, se estimulaba la vasodilatación mediante suaves toques de xylol en la zona a puncionar. Para la desinfección cutánea se utilizó povidona yodada en solución acuosa (Betadine<sup>®</sup>, Asta Médica, Madrid).

La punción venosa se practicó con un catéter de venopunción tipo Adbbocath<sup>®</sup> calibre 21G, posteriormente a la venoclisis se retiraba el fiador y se canalizaba la vena en un trayecto de 1 cm, para asegurar que no se perdiera la vía en algún momento del procedimiento de inyección (figura 33). A continuación se introducía el radioisótopo por el catéter seguido de 1,5 cc de suero fisiológico, con el fin de que no quedara parte de la dosis establecida en el catéter. Finalmente se retiraba dicho catéter haciendo compresión sobre la vena durante unos minutos asegurando la hemostasia.

Durante la hora de espera en la que el radiofármaco era captado por el tejido óseo, el conejo permanecía en su jaula de transporte. Pasado ese tiempo se comprobaba de nuevo que el animal continuara bien anestesiado. Si había recuperado el reflejo conjuntival, era necesaria la inyección de una dosis de refuerzo de los mismos anestésicos que consistía en la mitad de la dosis inicial.



**Figura 32. Animal anestesiado y preparado para la punción del radioisótopo.**



**Figura 33. Imagen donde se muestra la vena auricular elegida para la punción del catéter.**

#### **5.4. Técnica quirúrgica.**

Todos los animales de experimentación fueron sometidos al mismo tipo de intervención quirúrgica, realizando rigurosamente la misma secuencia de actos que se detallan a continuación. El quirófano respetaba todas las normas de asepsia y antisepsia respecto al animal, los medios materiales empleados y respecto al cirujano y ayudantes.

#### **5.4.1. Anestesia durante la cirugía.**

Una vez el animal se encontraba en el quirófano se le inyectaba por vía intramuscular la misma combinación de agentes anestésicos antes citados a doble dosis, es decir:

- Ketamina 50 mg/ kg ( Ketolar®, Parke-Davis. Pfizer. Dublin, Irlanda).
- Xylacina 10 mg/ kg (Rompun®, Bayer. Leverkusen, Alemania).

Aproximadamente a los 5 minutos de la inyección el conejo perdía el reflejo corneal lo que era indicador de la efectividad anestésica.

Una vez anestesiado el animal se procedía al rasurado cuidadoso de la extremidad posterior derecha, distalmente a la ingle y hasta el pie, tanto por su cara ventral como dorsal para favorecer la asepsia y adhesión del apósito que cubriría la herida operatoria. En ese momento también se le inyectaba una dosis de antiinflamatorio no esteroideo de uso veterinario, en forma de dosis única ya que no se repetirá durante el postoperatorio. Se trataba de un preparado de Meloxicam que se administra a razón de 0,2 ml/ 5 kg de peso por vía subcutánea (Metacam®, Boehringer. Ingelheim. Alemania).

A continuación se inmovilizaba el conejo en la mesa operatoria, de forma suave, sujetando las cuatro extremidades con una venda a la mesa quirúrgica, y se procedía a aseptizar la piel rasurada con povidona yodada al 10% (Betadine®, Asta Médica, Madrid, España).

El cirujano y su ayudante procedían al lavado quirúrgico de las manos y antebrazos, siguiendo las mismas normas de asepsia quirúrgica que son recomendables en el caso de intervenciones quirúrgicas realizadas en humanos, ya que el conejo, a diferencia de otros roedores utilizados como animales de experimentación, es susceptible de padecer infecciones.

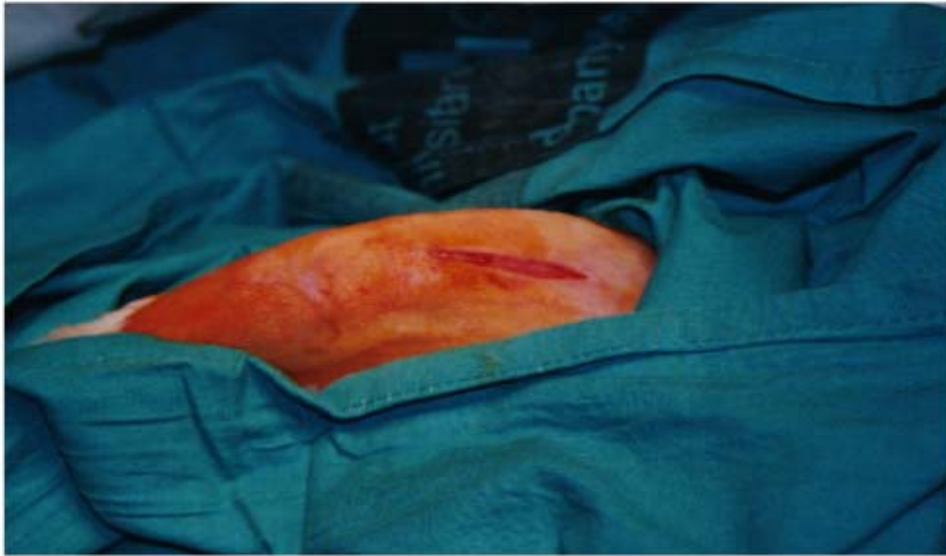
Se preparaba el campo quirúrgico mediante tallas estériles dejando la cabeza al descubierto para poder controlar las reacciones del animal durante la intervención quirúrgica.

Seguidamente se infiltraba con Mepivacaína al 2% (Scandinibsa<sup>®</sup> 2%, Inibsa, Llisá del Vallés, España) las zonas operatorias donde se practicarían las incisiones de abordaje.

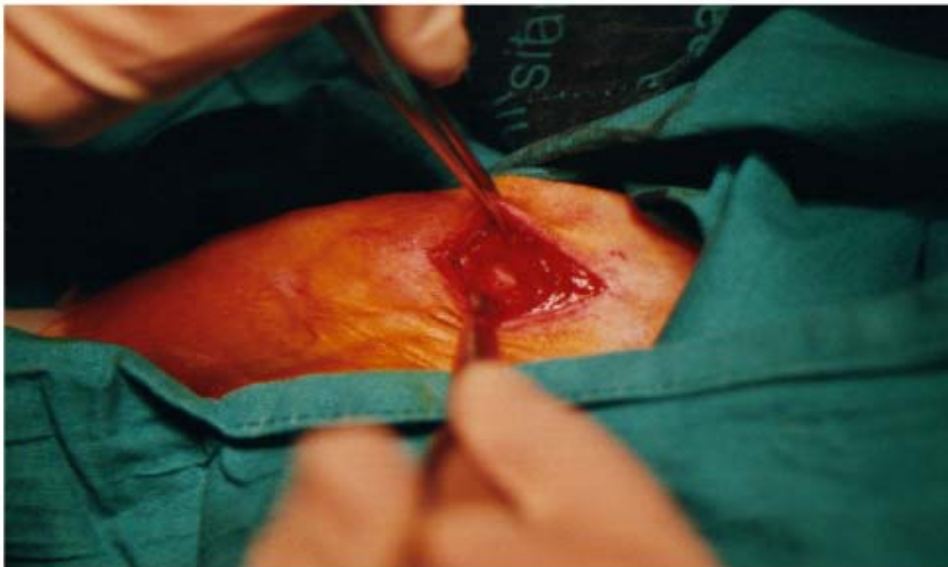
Se efectuaron dos tipos de abordaje, uno para cada hueso intervenido.

#### **5.4.2. Abordaje de la metáfisis distal femoral.**

Se practicaba una incisión cutánea recta en la cara interna del muslo, de unos 10 cm de longitud (figura 34). Se disecaba el plano subcutáneo y muscular entre el vasto medial y el tensor de la fascia lata, aunque en alguna ocasión se diseccionó la masa muscular del mismo vasto hasta llegar al periostio, con tijera de disección curva de punta roma tipo Metzemaum de 15 cm,. El periostio se incidía con hoja de bisturí y se disecaba con periostotomo de Freer dejando el hueso de la metáfisis expuesto de la zona situada cranealmente a la cápsula articular de la articulación de la rodilla (figura 35).



**Figura 34. Incisión cutánea del abordaje quirúrgico.**



**Figura 35. Exposición del hueso de la metáfisis femoral.**

Se decidía la zona por la que se deseaba que emergiera la cabeza del implante, teniendo en cuenta las dimensiones del diámetro transversal de la metáfisis en cada ejemplar.

La preparación del lecho del implante se hizo con el motor Nobel Biocare de Branemark System<sup>®</sup> (Goteborg, Suecia) a 2.000 rpm, conectado a un contraángulo reductor 20:1 y con las fresas pertenecientes al kit de fresas (*drill kit*



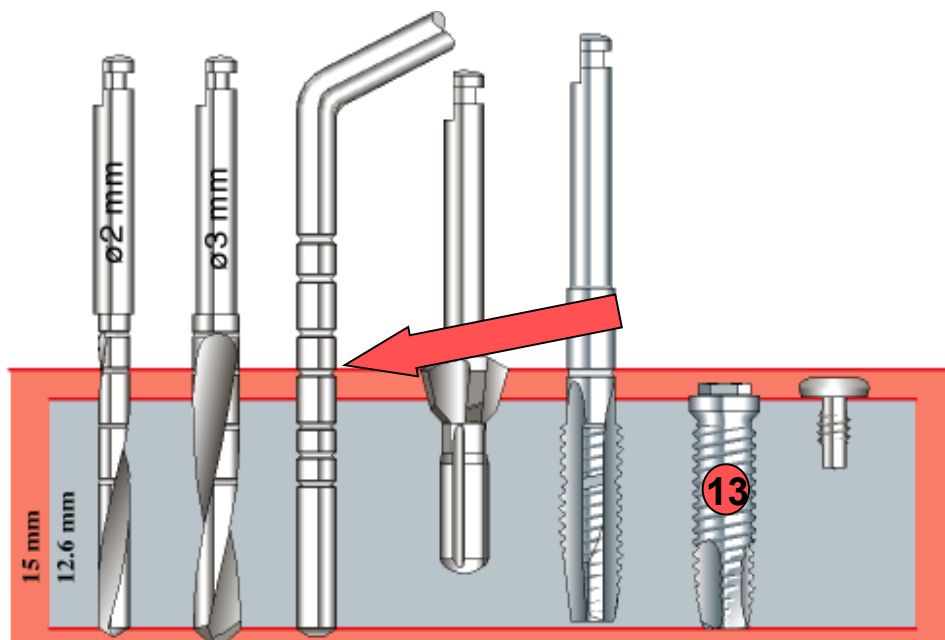
RP de referencia 25028 del catálogo de productos Nobel Biocare), Branemark System<sup>®</sup> (Goteborg, Suecia) que contiene:

- Fresa redonda.
- Fresa espiral de 2mm de diámetro.
- Fresa piloto.

Además de otras fresas que fueron:

- Fresa de 3mm de diámetro (*twist drill*, referencia 25011)
- Fresa avellanadora (*counterbore long MkIII*, RP referencia 25037).

Con estas fresas se conseguía labrar el lecho del implante de forma progresiva y con el mínimo traumatismo para el hueso (figura 36).



**Figura 36. Esquema de la secuencia de fresado óseo y la inserción del implante.**

Todo este proceso se realizó con abundante irrigación con agua destilada estéril, de acuerdo con el protocolo de instalación de implantes a fin de no calentar el hueso y el implante a una temperatura superior a la recomendable.

Una vez preparado el lecho, se procedía a la inserción del implante mediante contraángulo reductor a una velocidad de 20 rpm y un torque de 32 Ncm con irrigación externa continua, comprobando la estabilidad primaria, lo que era factible gracias al alojamiento que se practicaba en la cortical mediante fresa avellanadora y también, a que en algunas ocasiones el implante quedaba bicorticalizado, o sea en contacto con la cortical ósea de la metáfisis del lado contrario al orificio de inserción (figura 37). La estabilidad primaria del implante en este modelo animal no se conseguía gracias a la densidad del hueso medular, puesto que dicho hueso está compuesto por escasas trabéculas óseas.



**Figura 37. Imagen de un espécimen en el que se aprecia la bicorticalización y la oblicuidad del implante.**

Tras un lavado profuso del campo quirúrgico a fin de eliminar el barrillo óseo originado durante el fresado, se procedía al cierre por planos de la herida, lo más herméticamente posible; el plano perióstico, muscular y fascial con sutura reabsorbible de 4/0 aguja C16 (Vicryl Rapid<sup>®</sup>, Johnson and Johnson Intl. St. Stevens- Woluwe, Bélgica), y el plano cutáneo con seda trenzada de 3/0 aguja TC 16 (Aragó<sup>®</sup>, Barcelona, España) mediante puntos simples (figura 38).



**Figura 38. Imagen de la sutura del plano muscular del abordaje femoral.**

#### **5.4.3. Abordaje de la metáfisis proximal de la tibia.**

Se practicaba una incisión recta en la cara medio-ventral de la tibia, en su parte media y proximal.

Después de disecar el plano subcutáneo y fascial, se exponía el tercio proximal de la tibia que se desperiostizaba por su cara medial. Procedíamos al fresado del lecho implantario con el mismo protocolo antes citado, y a la colocación del implante intradiafisario en sentido oblicuo en la mayoría de las

ocasiones, ya que en esta situación el diámetro óseo no permitía la inserción de implantes de 10mm de longitud en sentido perpendicular a la cortical (figura 39).



**Figura 39. Imagen de la incisión muscular del abordaje tibial.**

Al igual que en la anterior intervención quirúrgica, se suturaba la región intervenida por planos (figura 40).



**Figura 40. Surura del plano cutáneo tibial y femoral.**

Finalizada la sutura de la herida, se desinfectaba la piel con povidona yodada y se colocaba un apósito estéril con gasas y se protegía el apósito con un vendaje de gasa y con esparadrapo plástico (Medipore<sup>®</sup> 3M. Neuss, Germany), de toda la extremidad, tipo “calza” (figura 41).



**Figura 41. Imagen del vendaje de una extremidad intervenida.**

### **5.5. Cuidados postoperatorios.**

Antes de llevar al animal a su jaula de transporte, en el mismo quirófano, para garantizar la profilaxis antibiótica y la analgesia se le inyectaba por vía intramuscular:

- Penicilina- Estreptomina 1mg / 10kg (Hipracilin Retard<sup>®</sup>, Hipra. Girona, España).
- Buprenorfina 0,05 mg 7 kg (Buprex<sup>®</sup>, Schering-Plough, Madrid, España).

Finalizado este proceso se devolvía el animal al estabulario del Campus de Bellvitge.

Una vez que el conejo estaba en su jaula del estabulario, con las condiciones ambientales óptimas ya detalladas anteriormente, se le seguía administrando:

- Buprenorfina (Buprex<sup>®</sup>, Schering-Plough, Madrid, España) 0,05 mg /kg, vía intramuscular, 1 vez al día durante 3 días.
- Penicilina- Estreptomicina (Hipracilin Retard<sup>®</sup> Hipra. Girona, España) 1 mg /10 kg, vía intramuscular, cada 48 horas, durante una semana.

El apósito se retiraba a las 48 horas por motivos higiénicos. Si existía algún punto que no cicatrizaba por primera intención se colocaba localmente Blastoestimulina<sup>®</sup> pomada (Almirall-Prodesfarma, Barcelona, España) una vez al día, y a la semana se retiraron los puntos de sutura de la piel en su totalidad.

#### **5.6. Gammagrafías óseas de seguimiento.**

Se realizaron gammagrafías planar y “pinhole” con la misma técnica y siguiendo los protocolos antes descritos en la sesión preoperatoria, a los 15 días de la intervención, al mes, dos meses y tres meses de la primera GO postoperatoria, efectuando un total de 4 sesiones gammagráficas. La interrupción de las gammagrafías se decidió cuando el nivel de cuentas de la ROI donde se habían colocado los implantes era similar al de la gammagrafía basal practicada preoperatoriamente (tabla 8).

GO	Pre op	Intervención	Post op 1	Post op 2	Post op 3	Post op 4
Tiempo (días)	-7	0	+15	+45	+75	+105

**Tabla 8. Secuencia temporal de las GO practicadas.**

## **5.7. Procesado de las muestras.**

### **5.7.1. Técnica de preparación de las muestras para las observaciones con microscopio electrónico de barrido.**

Tras el sacrificio de los animales, en el momento en que la radiactividad en la zona intervenida quirúrgicamente era semejante a la basal como se ha indicado anteriormente, se procedió al sacrificio de los animales y a la disección de la extremidad intervenida. Se obtuvieron mediante una osteotomía distal de la tibia y una proximal del fémur, un fragmento que incluía la porción ósea que contenía los implantes y la articulación de la rodilla en su totalidad. Este espécimen se colocaba en frascos debidamente identificados con el número de animal al que pertenecían, de manera que quedasen sumergidos por completo en una solución de formalina tamponada al 10%. Posteriormente, en laboratorio estas muestras se disecaron de manera que quedasen separadas la porción femoral de la tibial dejando exclusivamente el hueso, y eliminando en consecuencia todos los tejidos blandos (músculo, fascia, tendones y periostio). A continuación se prepararon los especímenes mediante sierra (Exakt micro-pararell-grind System, EXAKT, Nordendsedt, Alemania) (figura 42) para ser incluidos en metil-metacrilato.

Las muestras no decalcificadas fueron deshidratadas en series de alcoholes de gradación creciente y embebidas en un medio plástico de metil-metacrilato para su inclusión (Tecnovit T7200, Exact- Kultzer, Wehrheim, Alemania) siguiendo el método de Manzanares y cols.<sup>(125)</sup> desarrollado a partir del propuesto por Donath y Breuner<sup>(136)</sup>; posteriormente el proceso de fotopolimerización se produjo automáticamente en el transcurso de 8 horas a una temperatura inferior a 40° gracias al aparato de fotopolimerización Kulzer-Exakt-ligth-polymerisation (EXAKT, Nordendstedt, Alemania). Los bloques de tejido polimerizados se adhirieron mediante un cemento a unas placas de plástico para ser pulidos mecánicamente.

Siguiendo el protocolo, el pulido de la muestra se hizo primero mediante lija de 1200, hasta que quedaba expuesta la superficie del implante al nivel deseado, y después se terminó la preparación mediante lija de 4000, con el fin de obtener una superficie tan lisa como fuera posible. Luego el espécimen se despegaba de su placa, se colocaba en una placa metálica, y se fijaba con plata coloidal para ser recubierto posteriormente con carbono evaporado.

Con la finalidad de efectuar estudios ultraestructurales se utilizó el microscopio electrónico de barrido (MEB) descrito anteriormente. La elección de recubrir la muestra con carbono, en lugar de oro como es más usual, fue debida a que así se obtiene un mejor contraste en las imágenes obtenidas, y además el recubrimiento de carbono no enmascarara el espectro del fósforo en el caso de que se decidiera realizar un microanálisis<sup>(124)</sup>.





**Figura 42. Sierra mecánica (Exakt micro-pararell-grind System, EXAKT, Nordendsedt, Alemania).**

Después algunas de las nuestras más representativas fueron procesadas para obtener preparaciones histológicas que se observaron con microscopio óptico (MO). Con este fin los bloques fueron desmontados de su soporte metálico, adheridas de nuevo a una placa de plástico mediante cemento, y pulidos para eliminar el recubrimiento de carbono. Cuando la superficie de la muestra estuvo lisa de nuevo, se fijó a una placa de plástico, esta vez a la superficie pulida, mediante un adhesivo transparente de precisión (Tecnovit 7210, Kulzer, Wehrheim, Alemania), en un pequeño aparato de fotopolimerización (EXAKT, Nordendsedt, Germany). La muestra preparada de esta forma se aseguró a la placa de vacío de la unidad de corte (figuras de la 43 a la 65), cortándose nuevamente con el fin de obtener grosores de 200 a 300  $\mu\text{m}$  por sección, adheridos a la placa de plástico.

Los delgados cortes conseguidos con este procesado procedentes de diversas muestras, se volvieron a pulir hasta conseguir un grosor de  $30\mu m$  para ser teñidos y observados mediante microscopio óptico (MO) (Olympus BX50, Olympus.Tokio, Japan) y fotografiadas con cámara digital (Nikon 801, Micro Nikkor 50, Nikon Ltd, Tokio, Japón). Solo algunas muestras se procesaron para poder ser observadas por este método ya que éste no era el objetivo del estudio.



**Figura 43. Muestra 2 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 2.**



**Figura 44. Muestra 2 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 2.**



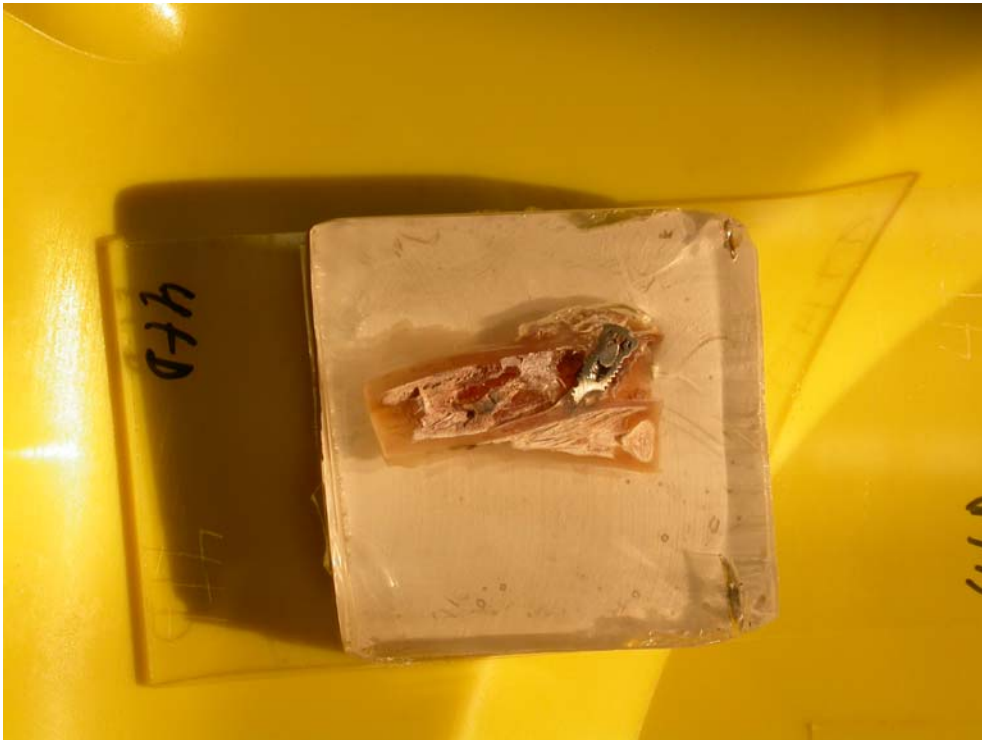
**Figura 45. Muestra 3 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 3.**



**Figura 46. Muestra 3 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 3.**



**Figura 47. Muestra 4 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 4.**



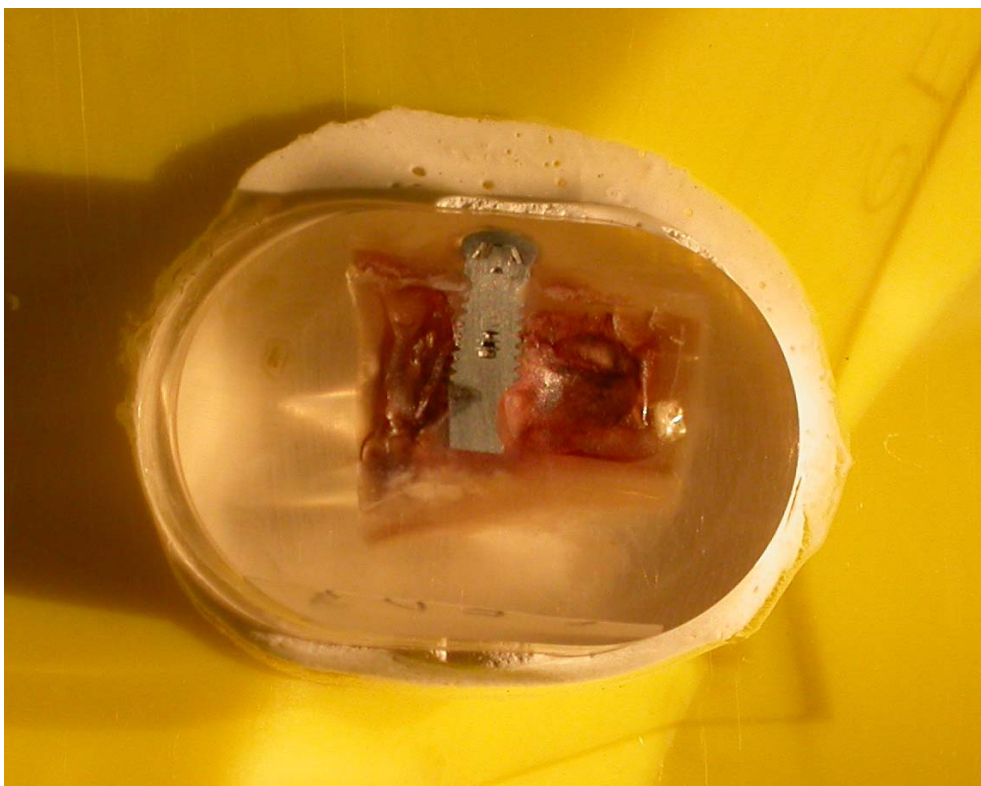
**Figura 48. Muestra 4 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 4.**



**Figura 49. Muestra 5 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 5.**



**Figura 50. Muestra 5 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 5.**



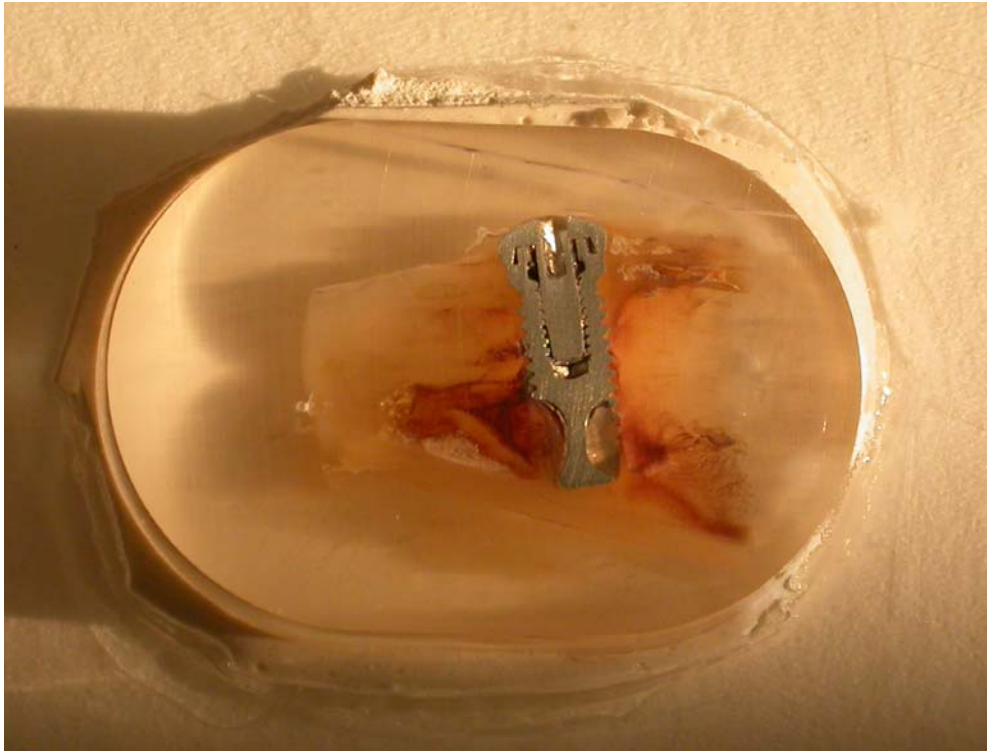
**Figura 51. Muestra 6 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 6.**



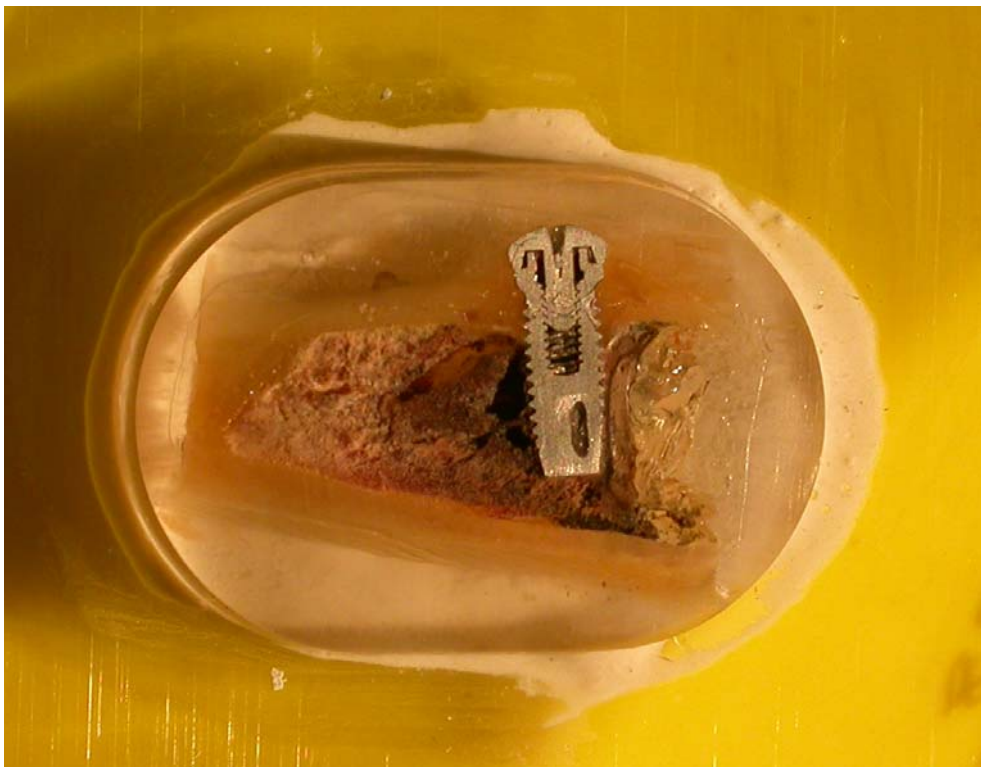
**Figura 52. Muestra 6 t. Inclusión del implante tibial del conejo nº 6.**



**Figura 53. Muestra 7 f. Inclusión del implante femoral del conejo nº 7.**

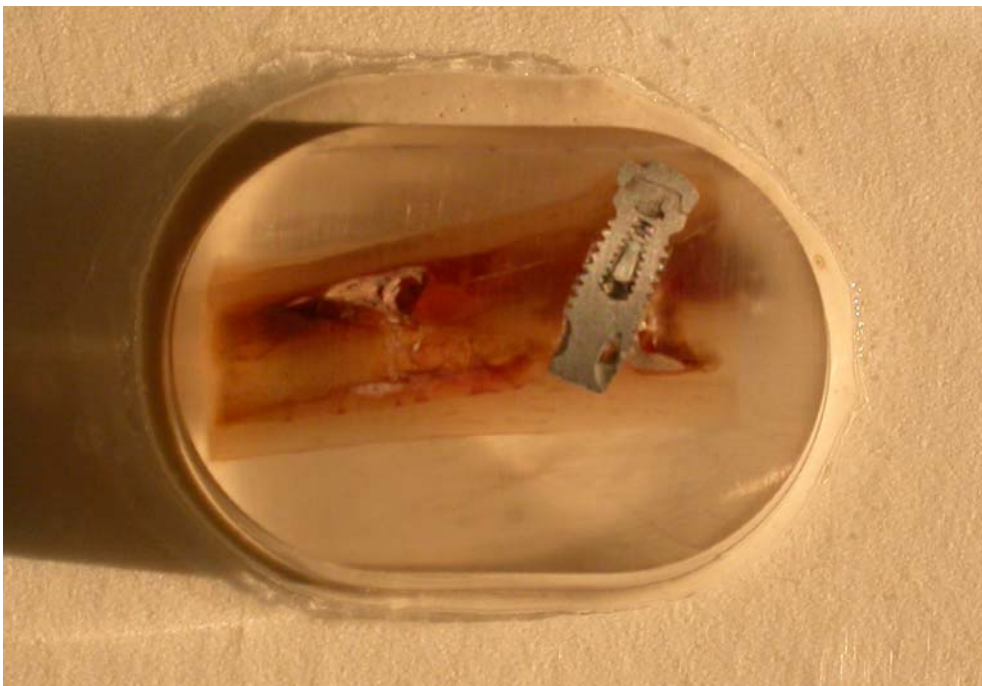


**Figura 54. Muestra 7 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 7.**

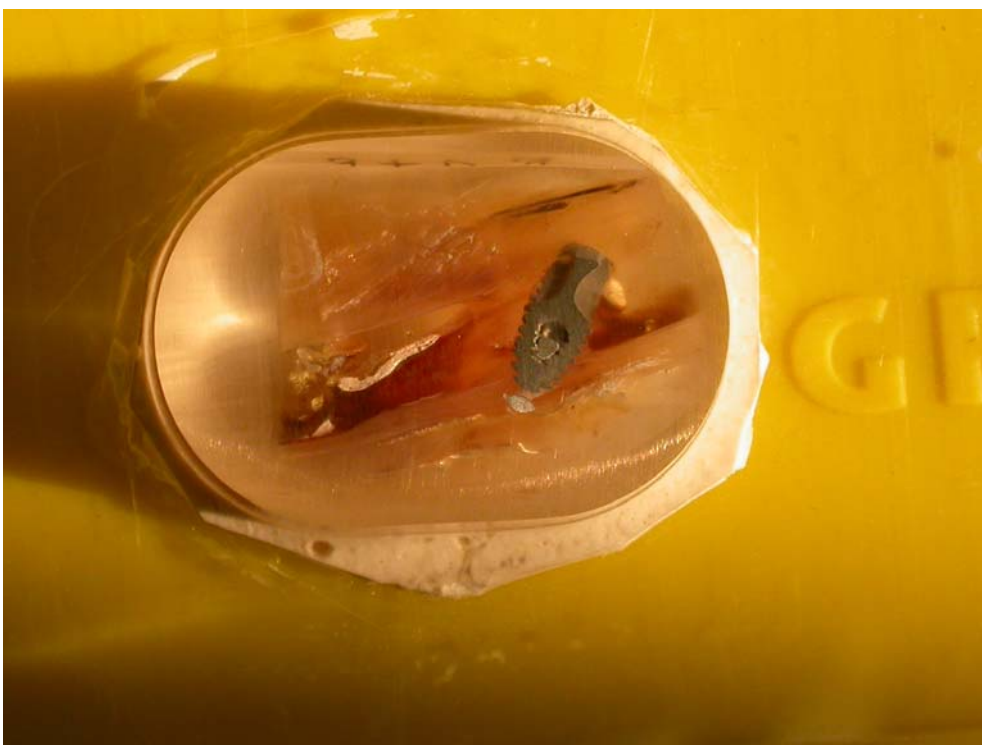


**Figura 55. Muestra 8 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 8.**





**Figura 56. Muestra 8 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 8.**



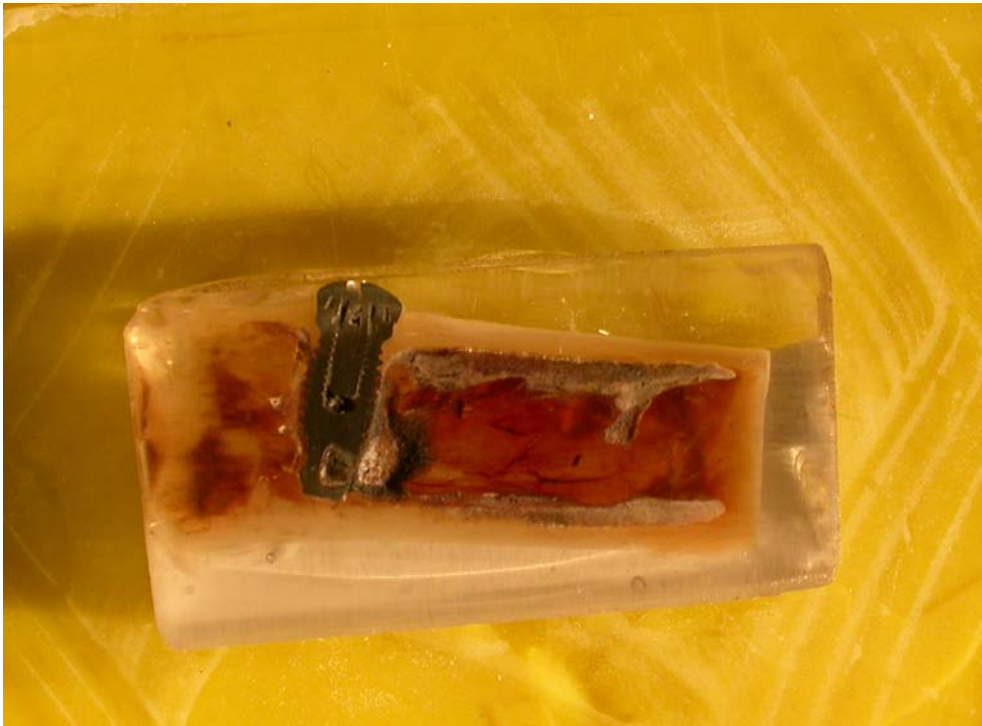
**Figura 57. Muestra 9 t. Inclusión del implante femoral del conejo n° 9.**



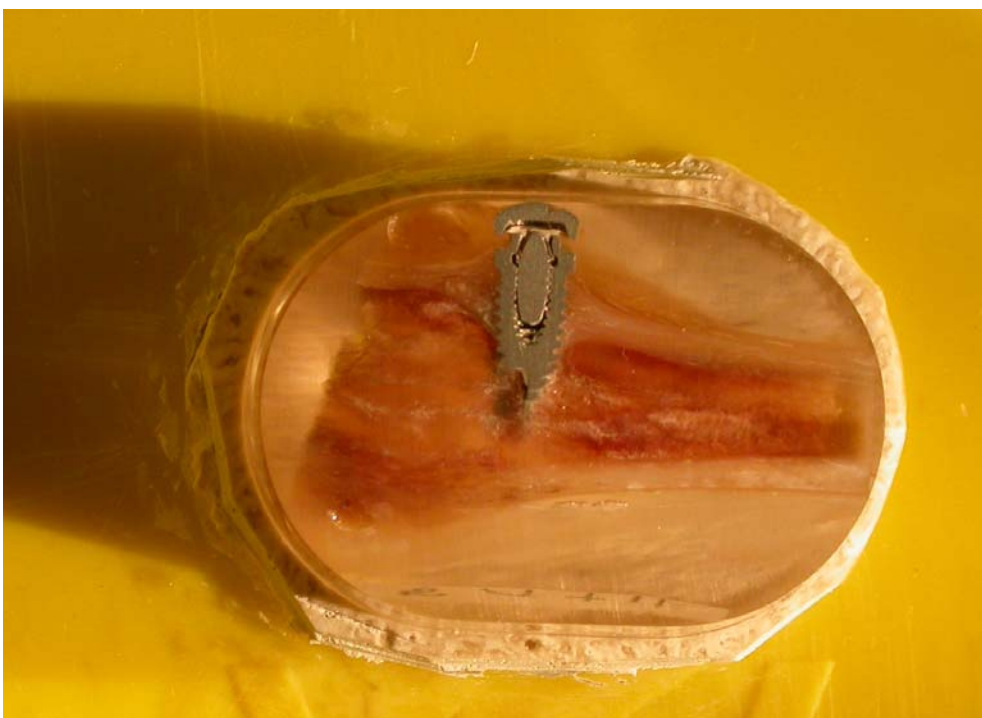
**Figura 58. Muestra 10 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 10.**



**Figura 59. Muestra 10 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 10.**



**Figura 60. Muestra 11 f. Inclusión del implante femoral del conejo nº 11.**



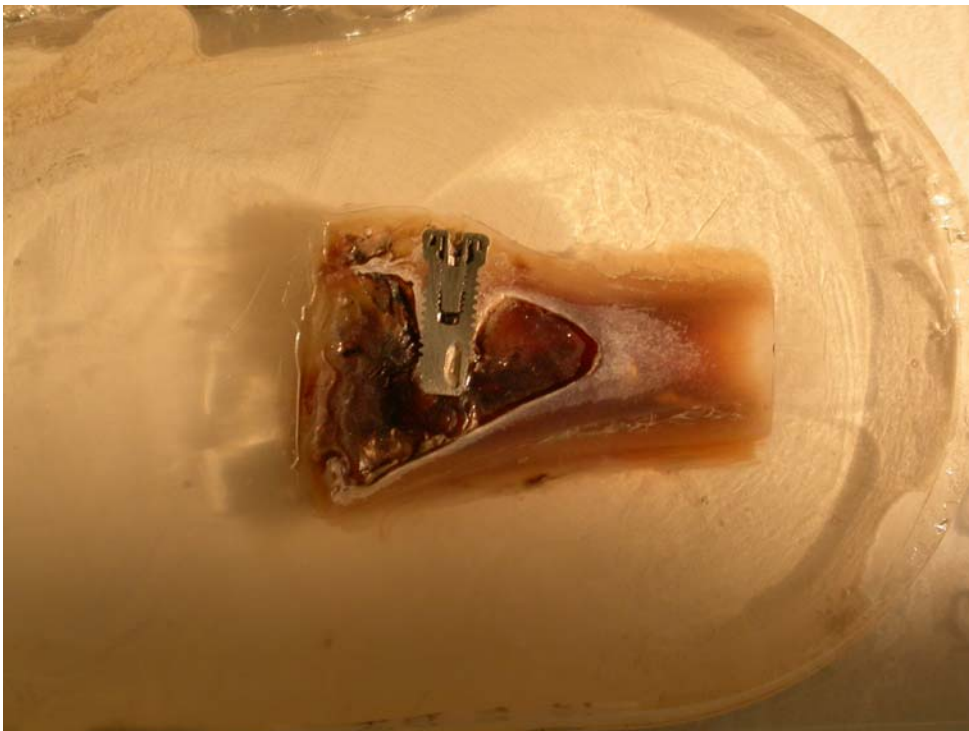
**Figura 61. Muestra 11 t. Inclusión del implante tibial del conejo nº 11.**



**Figura 62. Muestra 12 f. Inclusión del implante femoral del conejo n° 12.**



**Figura 63. Muestra 12 t. Inclusión del implante tibial del conejo n° 12.**



**Figura 64. Muestra 13 f. Inclusión del implante femoral del conejo nº 13.**



**Figura 65. Muestra 13 t. Inclusión del implante tibial del conejo nº 13.**

### **5.7.2. Técnica de tinción para observaciones con microscopio óptico.**

#### *A/ Técnica de tinción con azul de toluidina.*

- 1- Limpieza de la preparación por pulido fino con acetona-alcohol 1:1.
- 2- Inmersión y agitado suave de la preparación durante 5 minutos en un recipiente con agua oxigenada al 30%.
- 3- Lavado con agua corriente abundante.
- 4- Coloreado durante 15-20 minutos con solución de azul de toluidina.
- 5- Lavado de nuevo con agua corriente.
- 6- Secado y diferenciado de la muestra con acetona-alcohol 1:1 y se limpia rápidamente con un paño. Si el plexiglás tomaba color azul, se lavaba con alcohol de 70° con cuidado para no tocar la muestra. Después de 5 minutos se montaba la muestra para poder ser observada.

#### *B/ Técnica de la tinción tricrómica de Masson-Goldner.*

- 1- Teñido de la muestra durante 5 minutos con hematoxilina férrica de Weigert.
- 2- Lavado durante 5 minutos con agua corriente abundante.
- 3- Teñido durante 7 minutos en la solución de Masson (Goldner I).
- 4- Lavado de la muestra con ácido acético al 2%.
- 5- Teñido de nuevo durante 5 minutos con fosformolibdeno-ácido-Orange-G.
- 6- Lavado con ácido acético al 2%.

7- Tinción durante 15 minutos con Verde Luz a 60°.

8- Lavado con ácido acético al 2%.

9- Se sumergía brevemente la preparación en agua destilada para eliminar el exceso de ácido acético y se montaba para poder ser observada.

### **5.8. Lectura de porcentajes de contacto hueso-superficie del implante.**

De las preparaciones obtenidas para su observación en MEB se obtuvieron fotografías digitalizadas.

Mediante el programa IMAT elaborado por los Serveis Científic Tècnics de la Universidad de Barcelona se analizaron las fotografías de manera que las zonas de la superficie roscada del implante, que estaban en contacto con hueso corticalizado, eran marcadas manualmente, despreciándose las zonas correspondientes al cuello y al tornillo de cierre aunque en muchos casos se encontrase recubierto de hueso. A estas zonas se les denominó “zonas de contacto”, y las restantes zonas de superficie correspondientes a las roscas del implante sin contacto con hueso cortical también fueron medidas y se denominaron “zonas de no contacto” dándose los resultados de ambas en milímetros.

A partir de las cifras obtenidas se calculó la superficie total de la zona roscada de los implantes y se calculó el porcentaje de contacto para cada implante analizado.

## 5.9. Procesado de datos.

Se muestra en este capítulo la base de datos obtenidos a partir del cálculo del Índice de Actividad (IA) después de analizar las Regiones de Interés (Regions of Interest –ROI) en las GO de cada uno de los 12 conejos de estudio (tabla 10).

Se presentan cuatro IA de las ROI, dos para cada implante del mismo ejemplar de estudio lo que supone dos tibiales: una obtenida de la gammagrafía planar y una con “pinhole”, y dos femorales: de las mismas características que para las tibiales. Estos mismos datos se obtuvieron en cada tiempo de exploración (tiempo 0,1,2,3,4), siendo el total de cinco sesiones de exploración gammagráfica separadas por intervalos de tiempo (una preoperatorio, una a los 15 días del postoperatorio, y las tres restantes a intervalos de un mes).

La obtención de los datos a evaluar (actividad de las ROI) se realizó de manera que, una vez capturadas las imágenes de las gammagrafía planar y del “pinhole” en la pantalla se procedía a su estudio, marcando las regiones de interés (ROI) en las que se deseaba efectuar la medición de cuentas o actividad, lo que representó:

- 1 medición de actividad en la ROI correspondiente al implante tibial en la GO planar.
- 1 medición de actividad en la ROI en una zona especular tibial de la pierna no intervenida en la GO planar que se consideró la ROI control.
- 1 medición de actividad en la ROI correspondiente al implante femoral en la GO planar.



- 1 medición de actividad en la ROI en una zona especular femoral de la pierna no intervenida en la GO planar que se consideró la ROI control.
- 1 medición de actividad en la ROI correspondiente al implante tibial en la GO realizada con “pinhole”.
- 1 medición de actividad de la ROI seleccionada en una zona alejada de la influencia del implante tibial (más distal), en la GO realizada con “pinhole” que se utilizó como control.
- 1 medición de actividad en la ROI correspondiente al implante femoral en la GO realizada con “pinhole”.
- 1 medición de actividad de la ROI seleccionada en una zona alejada de la influencia del implante femoral (más medial), en la GO realizada con “pinhole” que se utilizó como control.

Esto representó un total de ocho mediciones entre las tres GO ( GO planar, GO pinhole femoral, GO “pinhole” tibial) por conejo y sesión, y quince GO por conejo en el transcurso de la totalidad del estudio.

La primera medición se denominó como tiempo 0, y correspondía a la obtenida antes de la intervención quirúrgica, las sucesivas mediciones postoperatorias se denominaron tiempo 1, 2, 3, y 4.

A su vez se registraron todas las mediciones expresadas por un número de “cuentas” por área, y se procedió a establecer un “índice de actividad” (IA) entre la zona de estudio y la zona no implicada en el lugar de colocación del implante, que correspondería a la zona control:

### IA= Cuentas de la ROI problema

#### Cuentas de la ROI control

Este índice se estableció con la finalidad de poder obtener una cifra de número de cuentas (lo que traduce radiactividad), que no dependiese de la situación puntual que puede tener un animal en un momento determinado, ya que ésta puede variar (según el nivel de hidratación del animal, cambios de peso en el tiempo a igualdad de dosis de radioisótopo, variación de la actividad del radioisótopo durante el tiempo que transcurre desde su preparación hasta su inyección endovenosa). Es evidente que los resultados podrían ser engañosos si se utilizaran únicamente las cifras absolutas obtenidas de la ROI de estudio.

Mediante este protocolo se obtienen 32 mediciones postoperatorias pertenecientes a áreas (ROI) por conejo.

La totalidad de las mediciones postoperatorias efectuadas en las 4 sesiones fueron 384 (162 en las áreas implantadas y 162 en áreas control).

Se establecieron unas variables que podían influir en los resultados que fueron valoradas para los dos tipos de GO, la gammagrafía planar (*g-planar*) y el pinhole en función de: tiempo, tipo de implante **a (TiUnite®)** o **b (mecanizado)**, localización y todas sus posibles interacciones.

El análisis estadístico de los datos así como el proceso de manipulación y lectura de los datos fue realizado mediante el programario del software: *SAS® v8.0 for windows*, (*SAS Institute Inc., Cary, EE.UU.*). Las decisiones estadísticas fueron tomadas con un nivel de significación  $\alpha=5\%$ .

Se ha efectuado una validación de la validez de los datos obtenidos a partir del estudio y comprobación de los valores extremos, el estudio valores faltantes y posibles inconsistencias lógicas.

El análisis de las variables respuesta: *g-planar* y *pin-hole*, ha sido realizado mediante el ajuste de un modelo mixto para medidas repetidas en función del tiempo, del tipo de implante, la localización y todas sus posibles interacciones.

Se ha escogido la estructura correlacional más adecuada mediante el criterio AIC Akaike Information Criteria (-Criterio de Información de Akaike-), de manera que la estructura escogida ha sido AHR (-Autorregresivo Heterogeneo de orden 1-) <sup>(137-148)</sup>.

Se han empleado las LSMEANS (Least Square Means -Medidas Mínimo Cuadráticas-), para cada tipo de implante, y para cada tipo de implante en cada localización.