



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Valoración Histológica e
Histomorfométrica de un Nuevo Biomaterial,
B-TCP+HA y Colágeno Tipo I. Estudio
Experimental en Conejos de Nueva Zelanda

D^a. M^a Esperanza García Callejas

2014

**UNIVERSIDAD DE
MURCIA**



Universidad de Murcia

Facultad de Medicina y Odontología

**Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina
Física**

**VALORACIÓN HISTOLÓGICA E
HISTOMORFOMÉTRICA DE UN NUEVO BIOMATERIAL,
B-TCP + HA Y COLÁGENO TIPO I. ESTUDIO
EXPERIMENTAL EN CONEJOS DE NUEVA ZELANDA.**

M^a ESPERANZA GARCÍA CALLEJAS

2014

AGRADECIMIENTOS

A los profesores **José Luis Calvo Guirado y Francisco Gómez** por su labor como directores de esta tesis.

Al profesor **José Luis Calvo Guirado**, por su apoyo incondicional. Apostaste por mí, me enseñaste todo lo que sé.

Eres responsable directo de que yo esté hoy aquí. Tú me hiciste ver lo difícil, fácil, que las cosas no son imposibles, solo lo difícil que nosotros queramos hacerlas. Me enseñaste a aprender y me brindaste tu mano en los momentos más difíciles de mi vida. **GRACIAS**, de todo corazón gracias.

A mis amigas, Sara, Marga, María, Delia, M^a José por su apoyo incondicional.

A mi compañero de batalla, Miguel Ángel, por su ánimo y apoyo y devolver la esperanza a mi vida

A los guias de mi vida,
Mis padres, **Miguel y Chari**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	pág 16
2. OBJETIVOS.....	pág 44
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	pág 46
3.1 Materiales.....	pág.47
3.2 Método anestésico y quirúrgico.....	pág.56
3.3 Método radiográfico.....	pág. 66
3.4 Método histológico.....	pág. 67
3.5 Método histomorfométrico.....	pág.71
3.6 Método estadístico.....	pág.75
4. RESULTADOS.....	pág.77
4. 1 Resultado histológico e histomorfométricos.....	pág.78
4.2 Estudio radiográfico.....	pág.84
4.3 Resultados estadísticos.....	pág.93
4.3.1 Resumen de resultados estadísticos.....	pág.97
4.3.2 Porcentaje del grosor de cortical neoformada.....	pág.99
4.4 Microscopía electrónica de barrido.....	pág.100
5. DISCUSIÓN.....	pág.105
6. CONCLUSIÓN.....	pág. 113
7. BIBLIOGRAFÍA.....	pág.115

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1 Imagen microscópica de un osteoblasto.....	pág. 21
Fig.2 Imagen microscópica de un osteocito.....	pág. 22
Fig.3 Imagen microscópica de un osteoclasto.....	pág. 22
Fig.4 Imagen hueso trabecular.....	pág. 24
Fig.5 Imagen hueso compacto.....	pág. 25
Fig.6 Hidroxiapatita sintética.....	pág. 38
Fig.7 Animal de experimentación, Conejo de Nueva Zelanda....	pág. 48
Fig.8 Composición 1.....	pág. 50
Fig.9 Composición 2.....	pág. 50
Fig.10 Composición 3.....	pág. 51
Fig.11 Exposición de la zona antero-interna de la tibia.....	pág. 59
Fig.12 Incisión quirúrgica.....	pág. 59
Fig.13 Separación total del colgajo y localización meseta anterior Tibial.....	pág. 60
Fig.14 Primera perforación con la fresa de trefina de 4mm de diámetro hasta la médula.....	pág. 60
Fig.15 Segunda perforación con la fresa de trefina de 4mm de diámetro hasta la médula.....	pág. 61
Fig.16 Relleno de la perforación con el material.....	pág. 61
Fig.17 Perforaciones preparadas según condiciones de la investigación.....	pág.62
Fig.18 Sutura de la zona implantada.....	pág.62
Fig.19 Numeración en la oreja.....	pág.63
Fig.20 Recipiente numerado donde se conservaron las muestras.....	pág.65
Fig.21 Cicatrización de la zona intervenida a los 90 días.....	pág.65
Fig.22 Sistema de radiología digital Kodak 6100.....	pág.66
Fig.23 Soporte diseñado para la realización de radiografías.....	pág.67
Fig.24 Imagen radiográfica de los defectos óseos sin relleno.....	pág.67
Fig.25 Detalle perforaciones para el corte transversal mediante sierra oscilante en tercio proximal de la tibia.....	pág.68
Fig.26 Imagen macroscópica de la tibia diseccionada a los 30 días.....	pág.68
Fig.27 Imagen a los 60 días.....	pág.69
Fig.28 Imagen a los 90 días.....	pág.69
Fig.29 Imagen a los 30 días.....	pág.70
Fig.30 Corte transversal del hueso en la zona perforada.....	pág.71
Fig.31 Microscopio Leica Z6-APO.....	pág.72
Fig.32 Cambio de color de la imagen a niveles grises.....	pág.73
Fig.33 Imagen interactiva de la cavidad medular.....	pág.73
Fig.34 Segmentación zonas óseas según niveles grises.....	pág.74
Fig.35 Imagen binaria tras la segmentación a niveles gris.....	pág.74
Fig.36 Medida referencial.....	pág.75
Fig.37 Imagen microscópica de la zona cortical a los 30 días.....	pág.78
Fig.38 Imagen microscópica del fosfato tricálcico+hidroxiapatita+ colágeno a los 30 días.....	pág.79
Fig.39 Imagen microscópica de la zona cortical a los 30 días.....	pág.80
Fig.40 Imagen microscópica de la zona cortical a los 60 días.....	pág.81

Fig.41 Imagen microscópica del fosfato tricálcico+hidroxiapatita+colágeno a los 60 días.....	pág.82
Fig.42 Imagen microscópica de la zona cortical a los 90 días.....	pág.83
Fig.43 Imagen microscópica del fosfato tricálcico+hidroxiapatita+colágeno a los 90 días.....	pág.84
Fig.44 Imagen radiológica de zona control y zona con biomaterial a los 30 días.....	pág.84
Fig.45 Radiovisografía del corte transversal del control a los 30 días.....	pág.85
Fig.46 Imagen radiográfica del fosfato tricálcico+hidroxiapatita+colágeno a los 30 días.....	pág.86
Fig.47 Radiovisografía del fosfato tricálcico+hidroxiapatita+colágeno a los 30 días.....	pág.87
Fig.48 Imagen de los dos defectos radiográficos a los 60 días.....	pág.88
Fig.49 Imagen del control a los 60 días.....	pág.89
Fig.50 Corte transversal del fosfato tricálcico+hidroxiapatita+colágeno a los 60 días.....	pág.90
Fig.51 Imagen de las 2 perforaciones a los 90 días.....	pág.91
Fig.52 Imagen del control a los 90 días.....	pág.98
Fig.53 Corte transversal del fosfato tricálcico+hidroxiapatita+colágeno a los 90 días.....	pág.92

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Remodelado óseo fisiológico.....	pág.28
Esquema 2. Porcentajes de cada compuesto para cada composición..	pág.53
Esquema 3. Disposición 1 de las composiciones.....	pág.54
Esquema 4. Disposición 2 de las composiciones.....	pág.54
Esquema 5. Disposición 3 de las composiciones.....	pág.55
Esquema 6. Disposición 4 de las composiciones.....	pág.55

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Características ideales de un biomaterial.....pág.41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de cada compuesto para cada composición.....	pág.48
Tabla 2. Descripción de la distribución de la muestra.....	pág.52
Tabla 3. Comparaciones múltiples entre los distintos periodos de experimentación en relación a la variable hueso neoformado.....	pág.93
Tabla 4. Comparaciones múltiples para variable hueso neoformado.....	pág.94
Tabla 5. Comparaciones múltiples para variable defecto óseo.....	pág.95
Tabla 6. Comparaciones múltiples para variable defecto óseo.....	pág.96
Tabla 7. Medida DS de las variables hueso neoformado, tejido conectivo y % de biomaterial presentes en el alveolo para cada uno de los grupos experimentales.....	pág.98
Tabla 8. Medida y desviación típica de los elementos Ca, P, O y C a los 15 días.....	pág.101
Tabla 9. Medida y desviación típica de los elementos Ca, P, O y C a los 30 días.....	pág.101
Tabla 10. Medida y desviación típica de los elementos Ca, P, O y C a los 45 días.....	pág.102
Tabla 11. Medida y desviación típica de los elementos Ca, P, O y C a los 60 días.....	pág.103

1-INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la implantología dental está condicionado por la creciente demanda de rehabilitación quirúrgica oral con implantes. En la actualidad la implantología ocupa un lugar importante entre las distintas especialidades odontológicas. El avance de la implantología oral se basa en la necesidad de encontrar soluciones a las nuevas situaciones que se encuentran en la práctica diaria puesto que con frecuencia encontramos rebordes alveolares que pueden presentar reabsorciones de diferente grado en función de diversas causas.

Las principales causas de atrofia alveolar son: la enfermedad periodontal, extracciones dentales mal realizadas, traumatismos dentoalveolares asociados o no a una fractura mandibular o maxilar con pérdida de sustancia, extirpación quirúrgica de quistes maxilares y mandibulares, defectos alveolares por agenesia, deformidades congénitas o del desarrollo, edentulismo de larga evolución, etc.

La insuficiencia ósea de los huesos maxilares representa un verdadero problema para la rehabilitación de estos pacientes.

La pérdida dentaria conlleva atrofia ósea a nivel de la cresta alveolar que a su vez depende de varios factores: anatómicos, sexuales, biológicos y mecánicos. Tras una extracción, como consecuencia de algunas enfermedades o bien por traumatismo dental, la tabla vestibular del hueso alveolar sufre una remodelación o una pérdida mayor que la tabla cortical lingual. El hueso vestibular que recubre los dientes naturales es mucho más fino que el lingual (**Misch** 2006).

Como consecuencia de la reabsorción severa de los maxilares se producen problemas para la rehabilitación prostodóncica posterior: déficit de volumen óseo para colocar implantes de longitud adecuada a las fuerzas masticatorias,

dirección inadecuada de las fijaciones que ocasiona relaciones oclusales desfavorables con las prótesis antagonistas, posibilidad de sobrepasar o dañar estructuras anatómicas intraóseas (conducto dentario inferior, seno maxilar o fosas nasales) (**González** 2006).

El aumento de la media de edad de los pacientes hace que los grados de atrofia ósea sean mayores, hecho que se contrapone con unos requerimientos estéticos cada vez más exigentes, lo que va a influir directamente en las técnicas y procedimientos.

Para la reconstrucción implantológica es deseable contar con la presencia de suficiente hueso que permita la colocación de implantes de longitud y diámetro adecuados. Un reborde alveolar adecuado es fundamental para el éxito de la rehabilitación protésica convencional o implantosoportada (**Bianchi** 2001), por lo que en pacientes portadores de atrofia alveolar se requiere alguna técnica de aumento previa.

Existen diversas técnicas para la reconstrucción de rebordes atróficos como son los injertos sustitutivos óseos, entre los cuales y dependiendo de su procedencia distinguimos (autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y materiales aloplásticos), acompañados de otras técnicas de cirugía avanzada: elevaciones del suelo sinusal o nasal, transposición del nervio dentario inferior, regeneración ósea guiada, injertos tipo onlay e inlay, desplazamiento de estructuras anatómicas como osteotomía tipo Lefort I. Todas ellas con importantes limitaciones en cuanto a los resultados clínicos (**McAllister** 2007).

De acuerdo con los conocimientos actuales y considerando las disponibilidades terapéuticas para corregir la atrofia alveolar, la cirugía preprotésica, a base de injertos óseos, constituye una parte importante de la rehabilitación quirúrgica de

los pacientes total y parcialmente edéntulos que presentan atrofia alveolar grave, así como de los pacientes oncológicos sometidos a resección parcial o total de los maxilares.

Los métodos clásicos de rehabilitación preprotésica se han basado en el uso de autoinjertos definido como “injerto de hueso autólogo, cuando el donante es el propio individuo. El injerto puede ser de origen intraoral y/o extraoral. Los injertos intraorales abarcan numerosas localizaciones: tramos edéntulos, tuberosidad maxilar, exóstosis o el coágulo óseo obtenido de una ostectomía u osteoplastia. Los injertos pueden ser de origen cortical o medular. Los primeros tienen más BMP - proteínas morfogénicas óseas (Bone Morphogenetic Proteins o BMPs) – y, por tanto, tienen mayor capacidad de osteoinducción. Los medulares tienen mayor componente celular y capacidad osteogénica.” (Boyne 1987), considerado es el patrón de oro de la reconstrucción, pero su cantidad limitada y la morbilidad intrínseca a la técnica ha instigado la búsqueda de nuevos biomateriales, naturales o sintéticos y al desarrollo de la ingeniería genética y tisular para intentar resolver muchos de los problemas aún existentes.

funcionales.

El sustitutivo óseo ideal debe de cumplir tres elementos básicos de la regeneración ósea; Es decir tienen que ser **osteoconductivos, osteoinductivos, osteogénicos.**

Los materiales osteoconductivos aportan una matriz a modo de andamio sobre el que crece el hueso por aposición, los osteoinductivos conservan factores orgánicos de crecimiento que estimulan la fabricación de tejido y los

osteogénicos contienen células óseas vivas capaces de producir proteínas osteogénicas.

FISIOLOGÍA ÓSEA

El tejido óseo

Está formado por **células** y **sustancia intercelular**.

Las **células** que constituyen el tejido óseo son los **osteoblastos, osteocitos y los osteoclastos**.

Los **Osteoblastos**: células sintetizadoras de la matriz ósea, cuboides o alargadas, de 20 μm o más de diámetro, con un citoplasma rico en retículo endoplasmático rugoso, en dictiosomas del aparato de Golgi y en vesículas de secreción de material glucoproteico, que formarán la sustancia intracelular ósea. En su membrana plasmática poseen numerosos receptores para hormonas, factores de crecimiento y vitaminas, que regulan las funciones celulares.

Los osteoblastos segregan sustancia osteoide, durante el proceso de crecimiento, reparación y remodelación de los huesos, que se mineraliza dando lugar a la matriz ósea.

Los osteoblastos quedan aislados en las lagunas ósea y así aislados se transforman en osteocitos.

Están involucradas en el desarrollo y crecimiento de los huesos.

Los **Osteocitos**: células principales del hueso maduro u osificado. Su cuerpo es ovalado, un poco más pequeño que los osteoblastos.

Posee numerosas prolongaciones que se extienden por los canalículos contactando con los osteocitos vecinos por medio de nexus. Se forman a partir de los osteoblastos.

Los **Osteoclastos**: células gigantes, de 20 a 100 μm de diámetro y multinucleadas. Su función principal es la reabsorción de hueso, es decir, la eliminación del hueso mineralizado. Deriva de las células hematológicas. Su forma es alargada y se observa en la zona de reabsorción ósea una región con numerosas microvellosidades, llamado borde plegado o en cepillo.

Los osteoclastos proceden de los monocitos sanguíneos, tras emigración y modulación por factores hormonales inhibidores (calcitonina) y factores estimuladores producidos por los osteoblastos.

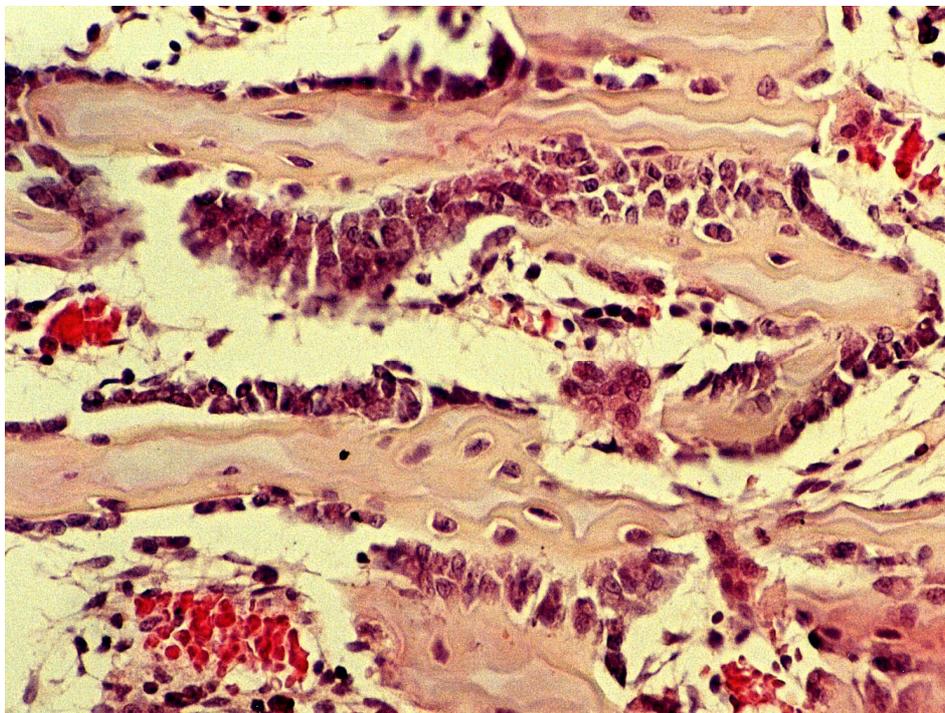


Fig. 1 Imagen Microscópica de un Osteoblasto (cedidas por el Dr. Luis Meseguer, 2011).

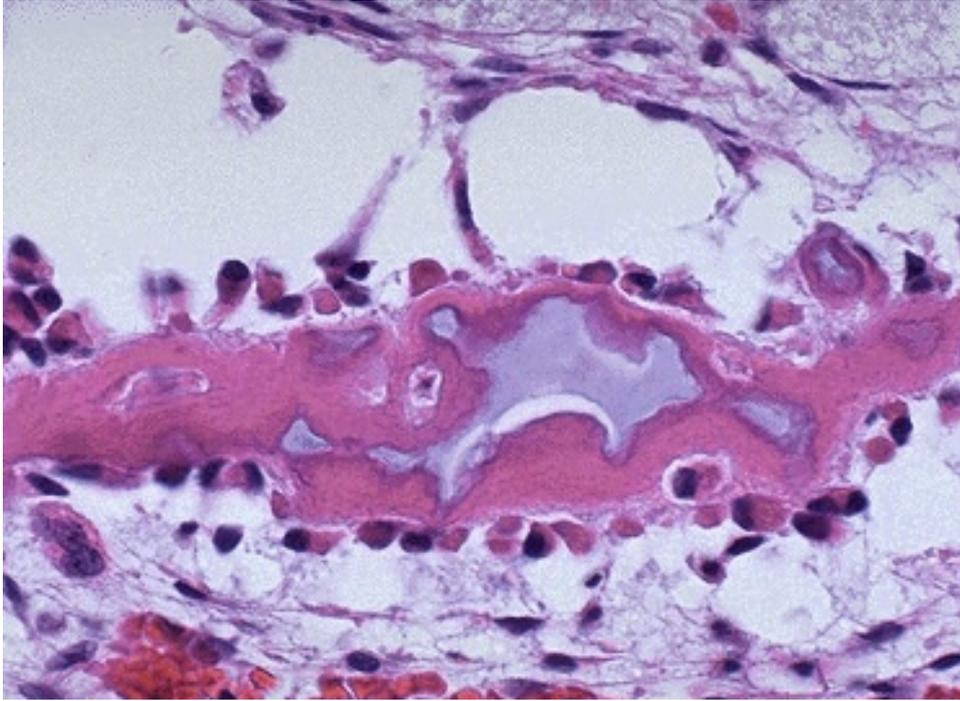


Fig. 2 Imagen Microscópica de un Osteocito. (cedidas por el Dr. Luis Meseguer, 2011).

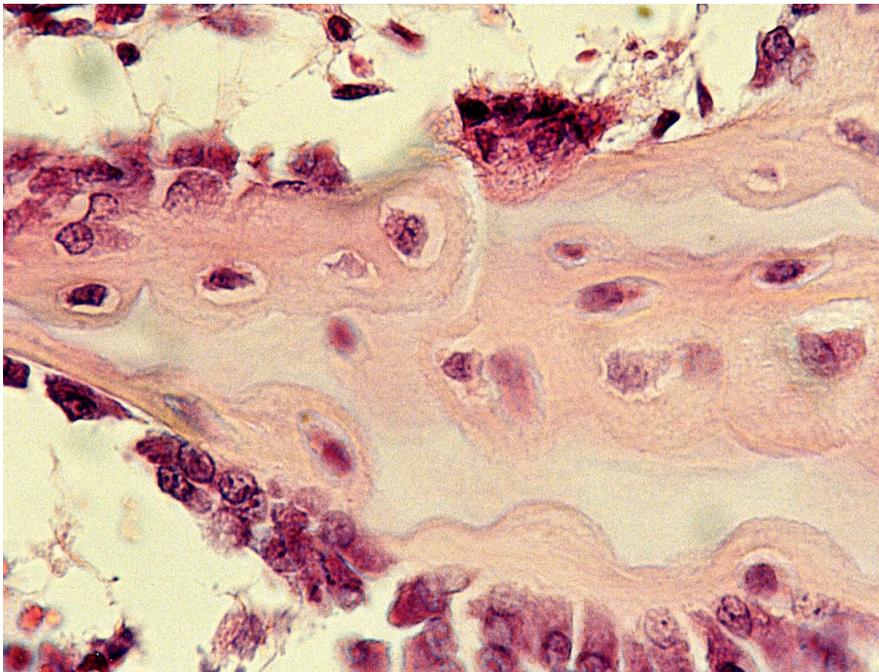


Fig.3. Imagen de microscopia de un Osteoclasto (cedidas por el Dr. Luis Meseguer, 2011).

La **sustancia intercelular**

A su vez está **formada por sustancias inorgánicas y orgánicas amorfas y fibrilares.**

La **sustancia inorgánica** supone un 60% aproximadamente del peso seco del hueso. Compuesta por: el fosfato cálcico que forma cristales parecidos a la hidroxiapatita, además hay citratos, carbonatos y flúor como iones importantes.

La **sustancia intercelular amorfa** es similar a la del cartílago, aunque con una menor cantidad de glucosaminoglicanos y proteoglicanos.

También posee proteínas como la osteocalcina, la osteopontina, proteínas relacionadas con la mineralización del hueso.

La **sustancia fibrilar** es un 90% colágena tipo I y el resto otros tipos de colágena. Los cristales de fosfatocálcico se depositan ordenadamente a lo largo de las microfibrillas de colágena.

Tipos de tejidos óseos

El hueso está formado por dos tipos de tejido óseo, el **esponjoso** y el **compacto.**

Es el **tejido óseo compacto** el encargado de formar las capas externas de los huesos planos, de los cortos y de las epífisis de los huesos largos, también las diáfisis de los huesos largos. Está formado por los sistemas circunferenciales, los Havers u osteonas y los sistemas intersticiales. Las fibras de colágena forman láminas superpuestas, en cada lámina, las fibrillas tienen una dirección oblicua en relación con las adyacentes.

El **tejido óseo esponjoso** está formado por laminillas óseas que se unen formando una red tridimensional entre cuyas mallas se halla la médula ósea. Los vasos sanguíneos quedan fuera de las laminillas y los osteocitos se encuentran a una distancia de los capilares sanguíneos menor de 0,2 mm, quedando así limitado el espesor de las especulas óseas.

Ambos tipos de tejido óseo están formados por grupos de laminillas óseas de unos 5 mm de espesor, entre las que se hallan, más o menos dispuestos los osteocitos. Las laminillas ósea están formadas por fibras de colágeno junto con el resto de elementos de la matriz ósea, fuertemente mineralizadas (Anitua 2000).

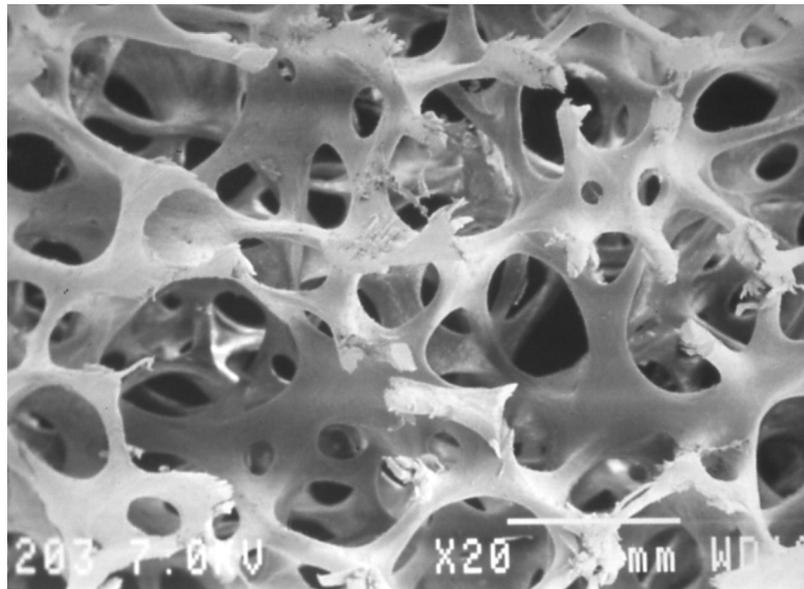


Fig. 4 Imagen de Hueso trabecular (MEB). *(cedidas por el Dr. José Maté 2013).*

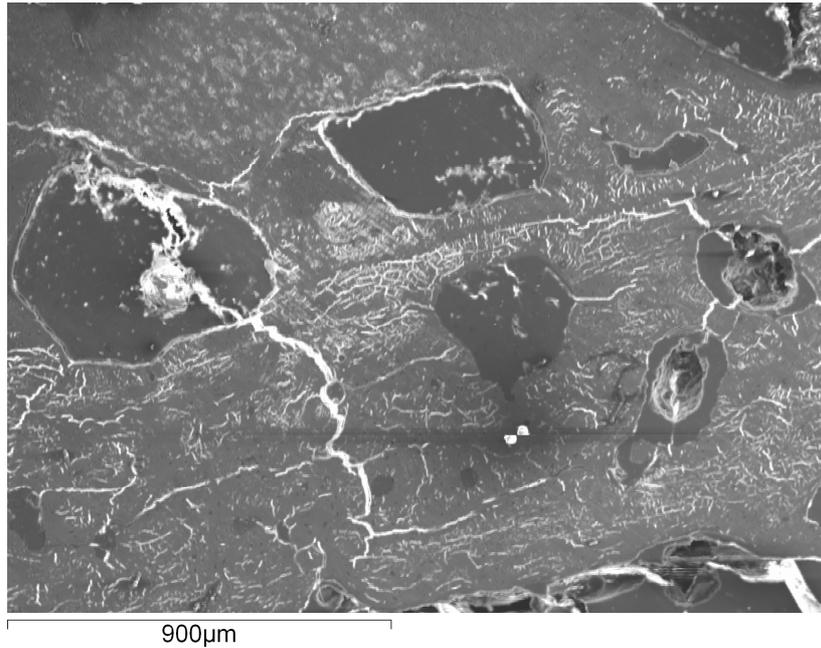


Fig. 5 Imagen de hueso Compacto (MEB).

Biología de la Regeneración Ósea

La regeneración ósea presenta cinco fases bien diferenciadas:

1. **Fase de inflamación**, la cual tiene lugar inmediatamente después del daño inicial. Es en esta fase donde se produce la formación del coágulo de fibrina, con la consiguiente vasoconstricción y necrosis de los bordes de la herida.

En esta fase son las plaquetas las encargadas de dirigir la coagulación, además de controlarla.

En los días 3 y 5 después del trauma inicial, va desapareciendo la red de fibrina, formándose el tejido de granulación que dura hasta los 14 días aproximadamente. Las plaquetas desaparecen como principales factores de crecimiento, siendo los macrófagos los principales productores de citoquinas. Los macrófagos además de expresar factor de crecimiento derivado de las

plaquetas (PDGF) y TGF β , expresarían otros factores como el FGF y el VEGF que junto con el TGF β , promoverían la angiogénesis (por la migración y proliferación de las células y precursores de las células endoteliales,

2. Fase de proliferación y diferenciación celular

La proporción de las MSCs presentes en los canales óseos, endosito, periostio y médula ósea es variable a lo largo de la vida.

Estas células pueden acceder al foco del defecto desde los tejidos de alrededor (periostio y médula ósea) y la sangre.

3. Fase de formación ósea

El primer tejido óseo que se forma es el osteoide o matriz extracelular no mineralizada, formada en su mayoría por colágeno tipo I que va a formar el andamio fundamental para la mineralización de la matriz.

El osteoide es mineralizado progresivamente por un gran número de cristales de hidroxapatita relativamente pequeños, formando el hueso inmaduro entrelazado (2^a-6^a semana) en donde se deposita el 70% del mineral del hueso maduro. Su organización y el depósito del 30% restante pueden durar varios meses.

Una vez formado el hueso entrelazado, se inicia el proceso de aumento de mineralización y de compactación laminar alrededor de un vaso sanguíneo.

En los injertos óseos la formación de hueso inmaduro entrelazado se produce a las 4 semanas. El proceso de maduración del hueso dura hasta los 6 meses aunque el aspecto de hueso normal no ocurre hasta los 6 años.

4. Fase de Remodelado óseo

El conjunto de osteoclastos y osteoblastos que de manera coordinada actúan en la superficie ósea durante un ciclo de remodelado recibe el nombre de Unidad Multicelular Básica (BMU). El remodelado óseo se divide a su vez en cinco fases:

(Fernández- Tresguerres II 2006):

4.1. Fase quiescente: Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

4.2. Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos.

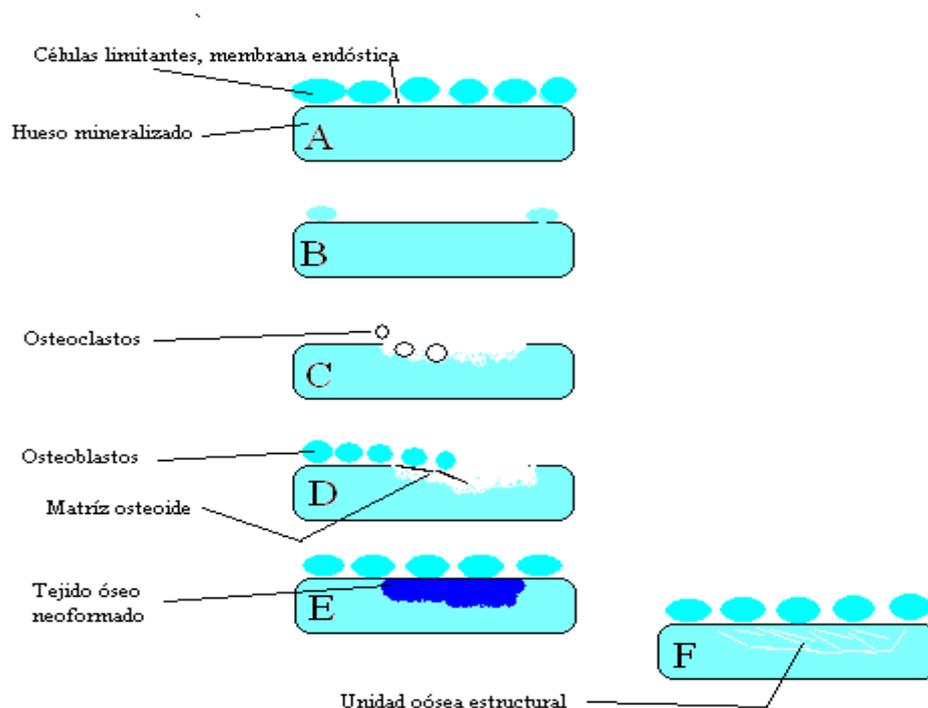
4.3. Fase de reabsorción: Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

4.4. Fase de formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de **preosteoblastos**, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación (**Lind M, Deleuran B,**

Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. 1995). Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la **sustancia osteoide** que rellenará las zonas horadadas.

4.5. Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la **mineralización**, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular.

De nuevo empieza fase quiescente o de descanso.



Esquema 1: Remodelado óseo fisiológico. Quiescente (A), activación (retracción de células, reabsorción de membrana, B), reabsorción (C), formación (D), mineralización (E), quiescente (F). (Compston JE 2001).

Factores reguladores del remodelado óseo

El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales.

2.1. Factores genéticos

Son determinantes muy importantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente (**Grant SFA y Ralston SH 1997 Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrock PN y Ebery S 1987**).

2.2. Factores mecánicos

La actividad física es imprescindible para el correcto desarrollo del hueso. Se cree que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea (**Morey ER, Baylink JJ. 1978**).

2.3. Factores vasculonerviosos

Se sabe desde los trabajos de Trueta (**Trueta J. 1963**) que la vascularización es fundamental para el normal desarrollo óseo, permitiendo el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. Fue Ham en 1952 quien constató este fenómeno (**Ham AW.**

1952), al observar que los osteocitos se mueren cuando están lejos de un capilar (la distancia máxima es de 0.1 mm).

2.4. Factores nutricionales

Es interesante este factor porque puede ser modificado. Se necesita un mínimo de calcio para permitir la mineralización que la mayoría de los autores cifran en unos 1.200 mg. diarios hasta los 25 años; después y hasta los 45 no debe ser inferior a 1 gramo y tras la menopausia debe ser por lo menos 1.500 mg al día. Asimismo, se conoce que hábitos tóxicos como tabaco, cafeína, alcohol y exceso de sal constituyen factores de riesgo para la aparición de osteopenia.

2.5. Factores hormonales

El desarrollo normal del esqueleto está condicionado por el correcto funcionamiento del sistema endocrino, fundamentalmente de la hormona somatotropa (GH) y las hormonas calcitrópicas (parathormona, calcitonina y metabolitos de la vitamina D).

Las **hormonas** más importantes que intervienen en la fisiología ósea son:

2.5.1. Hormonas tiroideas: Poseen dos acciones contrapuestas sobre el hueso. En primer lugar, estimulan la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF-I. En segundo lugar, se produce un efecto contrario, estimulando la reabsorción al aumentar el número y función de los osteoclastos (**Jódar Gimeno E, Muñoz-Torres M,**

Escobar-Jiménez F, Quesada Charneco M, Luna del Castillo JD, Olea N.1997).

2.5.2. PTH (parathormona): Es la hormona que controla la homeostasis del calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. (**Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. 1989**). Este doble efecto de reabsorción y formación se explicaría porque la PTH en administración continua estimularía la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.

2.5.3. Calcitonina: Producida en las células C o parafoliculares del tiroides, es inhibidora de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, esta acción es transitoria, ya que los osteoclastos parecen volverse “impermeables” a la calcitonina en pocos días (**Prieto S.1999**).

2.5.4. 1,25(OH)₂ vitamina D₃ o calcitriol: Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Es necesaria para el crecimiento normal del esqueleto. Algunos autores piensan que puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos (**Raisz LG. 1993**).

2.5.5. Andr6genos: Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a trav6s del est6mulo de los receptores de los osteoblastos. Asimismo, actúan de mediadores en el pico de GH existente en la pubertad. Mientras que la deficiencia androg6nica se asocia a una menor densidad 6sea, la administraci6n de testosterona en j6venes antes del cierre epifisario incrementa la masa 6sea.

2.5.6. Estr6genos: Son esenciales para el cierre de los cart6lagos de conjunci6n y se ha descubierto que juegan un papel importante en el desarrollo esquel6tico tanto femenino como masculino durante la adolescencia. Los estr6genos tienen un doble efecto sobre el metabolismo 6seo: por un lado favorecen la formaci6n 6sea al aumentar el n6mero y funci6n de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorci6n. Se han descrito receptores de estr6genos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Investigaciones recientes han comprobado que los estr6genos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), prote6na producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorci6n (**Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. 1999**), por lo que podr6an jugar un papel importante en la regulaci6n de la osteoclastog6nesis.

2.5.7. Progesterona: Es igualmente anabolizante sobre el hueso, bien directamente, a trav6s de los osteoblastos, que poseen receptores para la hormona o bien de forma indirecta, mediante la competici6n por los receptores osteobl6sticos de los glucocorticoides

2.5.8. Insulina: Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I (factor de crecimiento análogo a la insulina-I).

2.5.9. Glucocorticoides: A dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, factores críticos para la osteoblastogénesis (**Manolagas SC. 2000**). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica (**Lukert BP, Kream BE.1996**).

2.5.10. Hormona de crecimiento (GH): Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

Desde hace unos años se viene considerando a la GH como un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos (**Harvey S, Hull KL. 1998**), teniendo un efecto autocrino y paracrino, además de endocrino.

2.6. Factores locales

El remodelado óseo también está regulado por factores locales, entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y recientemente se han

implicado las proteínas de la matriz ósea, como moduladoras de la acción de otros factores locales (tabla 1). Las células del hueso también juegan un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, así como de citoquinas y factores de crecimiento.

2.6.1. Factores de crecimiento

Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular .

IGF-I y II (Insulin-like Growth Factor I y II)

TGF- β (Transforming Growth Factor- β)

BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)

FGF (Fibroblastic Growth Factor)

EGF (Epidermal Growth Factor)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor)

M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor)

TNF (Tumor Necrosis Factor)

2.6.2. Proteínas de la matriz

Recientemente se ha descubierto que las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento (**Young MF. 2003**). Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan a una concentración mil veces mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían jugar un papel más importante en la regulación de las diferentes funciones celulares (**Horowitz M. 2003**).

Por otro lado, estas proteínas de la matriz también participan en la regulación de la diferenciación de las células contenidas en la matriz.

2.6.3. Citoquinas

- **Interleuquina 1 (IL-1)**
- **Interleuquina 6 (IL-6)**
- **Interleuquina 11 (IL-11)**
- **Prostaglandinas (PG)**

3. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo

Interesan desde un punto de vista clínico para evaluar el proceso de remodelado.

Así hay marcadores de formación ósea, como la fosfatasa alcalina, osteocalcina y procolágeno tipo I (PICP) y marcadores de reabsorción, tales

como la hidroxiprolinuria y la fosfatasa ácida resistente a tartrato. De los 11 marcadores bioquímicos más frecuentemente usados para medir la formación y reabsorción óseas, 9 son proteínas de la matriz extracelular (**Young MF**.2003). Los marcadores de osteoformación son productos de los osteoblastos en diferentes estadios de diferenciación (**Schonau E, Rauch F**. 1997).

Terapéutica de regeneración ósea

Son tres los mecanismos relacionados con el éxito de la regeneración ósea: (**Gómez y Rodríguez** 2000).

La osteogénesis, es el proceso de formación y desarrollo del hueso nuevo. Los osteoblastos son trasladados desde las zonas de origen hacia el defecto óseo. Este mecanismo tiene lugar en el hueso autólogo en el cual se produce a la misma vez la reabsorción del material injertado y el reemplazo por hueso neoformado para conseguir la regeneración total del injerto.

La osteoinducción, es el proceso de formación de hueso en tejidos donde inicialmente no existe gracias a la liberación de proteínas osteoconductoras (BMPs) que favorecen la diferenciación celular.

La osteoconducción, es el crecimiento óseo por aposición a partir de hueso existente por encima del mismo, siendo necesario la presencia de hueso o de células mesenquimales diferenciadas (**Anitua** 2000).

El sustitutivo ideal que reúne las características antes mencionadas es el hueso autólogo, pero en muchas ocasiones no es posible disponer de él, de modo que la ciencia busca nuevas vías para la imitación del proceso de reparación ósea natural (**Gómez – Barrera y cols** 2000). También el sustitutivo debe de tener reproductibilidad, biocompatibilidad y ausencia de toxicidad.

Injertos óseos

Los injertos óseos utilizados en cirugía ortopédica y traumatología pueden dividirse generalmente en: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, materiales sintéticos y combinación de ellos.

Autoinjerto (injerto autólogo): se refiere al tejido óseo tomado e implantado al mismo individuo. La disponibilidad de utilización del injerto óseo autólogo es limitada.

Aloinjerto: injerto recibido de un donante de un individuo de la misma especie. Se utilizan básicamente tres tipos de aloinjertos, que son: hueso congelado medular o cortical, aloinjerto liofilizado mineralizado y aloinjerto liofilizado desmineralizado.

Xenoinjerto: injertos óseos donde la especie donante y receptora son diferentes, por ejemplo, injerto bovino a humano.

Materiales aloplásticos: injertos de origen sintético. Los materiales aloplásticos se clasifican por su capacidad para reabsorberse. Entre los materiales reabsorbibles destacan la hidroxiapatita reabsorbible, el fosfato tricálcico o el carbonato cálcico.

BIOMATERIALES

Sustancias sintéticas empleadas para sustituir o incrementar los tejidos biológicos. La European Society of Biomaterials los define como *“materiales no vitales que se utilizan en aplicaciones médicas con la finalidad de obtener una interacción con un determinado sistema biológico”*. La finalidad de estos materiales es favorecer la osteoconducción, (**Spiekermann 2001**).

La **hidroxiapatita** es uno de los biomateriales más utilizados. Contiene una proporción de calcio-fosfato de 1,67 idéntica al mineral óseo y con un módulo de elasticidad muy semejante al hueso humano.

HA. SINTÉTICAS

Forma de fosfato de calcio cerámico, no son osteogénicos ni osteoinductivos, pero si osteconductivos, es decir, sirven como matriz para la formación de hueso nuevo (**Pettis y cols 1990**).

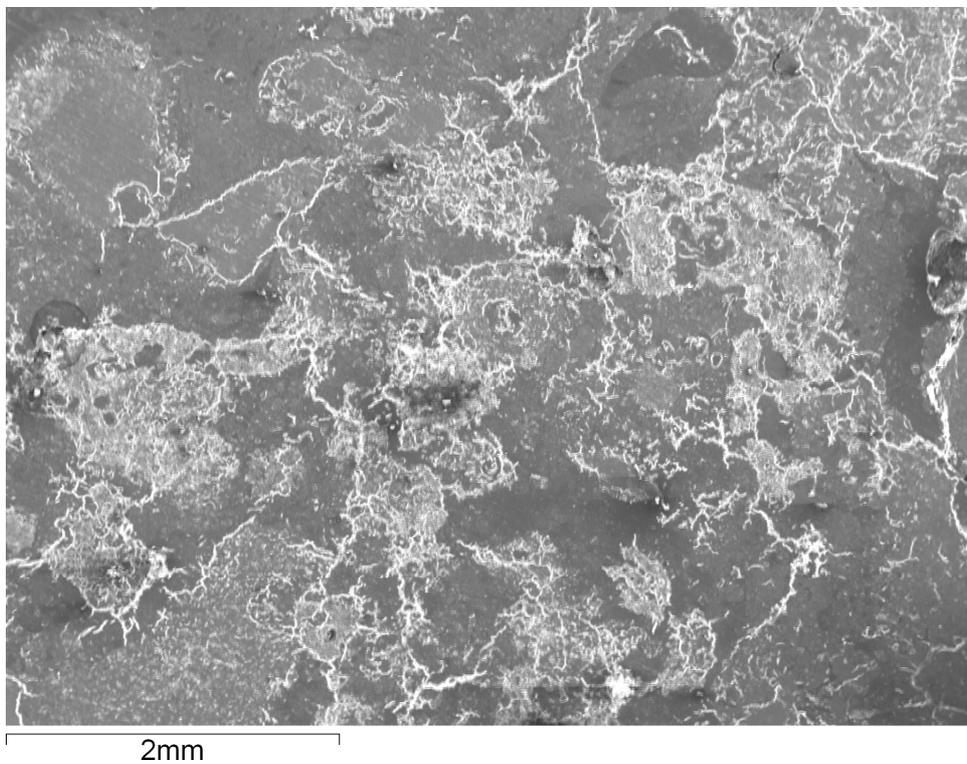


Fig. 6 Hidroxiapatita sintetica (MEB).

HA. NATURALES

Coralinas- Se utilizan como material el coral formador de arrecifes del género *Porites* que presenta un esqueleto formado por acúmulos de cristales de aragonita. La porosidad de los cristales es de aproximadamente 230 micras, comportándose en un adecuado material de injerto cuando los cristales de aragonita (CaCO_3) se convierte en hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (**Smiler y cols 1992**)

Ficogénicas- Debido a la similitud de algunas especies de algas calcificadas con la arquitectura del hueso, después de quitar todas las partes orgánicas y la transformación del carbonato en HA, este ofrece un buen andamiaje para el crecimiento óseo (**Kasperk y cols 1990**).

Bovinas- Se consiguen a partir del mineral óseo del ganado bovino. Este es un material altamente osteoconductor, guardando una gran similitud con el hueso humano. Su contenido en proporción calciofosfato es de 1,67 y con un módulo de elasticidad parecido al mineral óseo humano (**Hämerle y Karring 2000**).

A pesar de sus buenas propiedades físico-químicas del hueso de origen bovino se ha detectado la posibilidad de transmitir la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob también conocida como encefalopatía espongiiforme bovina ó enfermedad de las vacas locas, cuestionando de este modo su seguridad (**Wenz y cols 2001**).

Porcinas y Equinas- Debido a la aparición de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se empezaron a buscar otros posibles orígenes (**Voza y cols 2004**).

El **fosfato tricálcico** es otra cerámica bioactiva que promueve la formación ósea mediante el intercambio de calcio y fósforo. Este forma parte del hueso al

igual que la hidroxiapatita. El fosfato tricálcico es un material osteoconductor que proporciona una estructura adecuada para la regeneración ósea.

Biovidrios o partículas de vidrio cerámico: formados en un 45% por sílice (SiO_2) pero además contiene sales de sodio, calcio, y fosfatos. Su mecanismo de acción consiste en unirse al hueso, siendo integrado por los tejidos en lugar de ser aislado por tejido fibroso. Se produce una unión entre el vidrio y el hueso, llamada fijación bioactiva, que se define como la unión de un implante a los tejidos mediante la formación de una capa de HA biológicamente activa (**Shapoff y cols** 1997).

Polímeros: utilizados en el campo de la ortopedia para la fabricación de válvulas cardíacas protésicas, prótesis de cabeza de fémur, y como cementos óseos, así como el polímero de sustitución de tejido duro. Compuesto por un núcleo de polimetilmetacrilato que es hidrófobo, y una capa externa de polihidroximetilmetacrilato e hidróxido de calcio, que son hidrófilos y proporcionan una carga negativa que favorece la formación ósea. Presenta la desventaja de no ser reabsorbible (**Yukna** 1990).

Actualmente se persigue que los biomateriales además de biocompatibles, es decir, que no produzca signos de reacción tóxica, sean bioactivos, reaccionando con el huésped para favorecer la respuesta tisular.

Las **características** de un biomaterial para sustitución ósea deben ser:

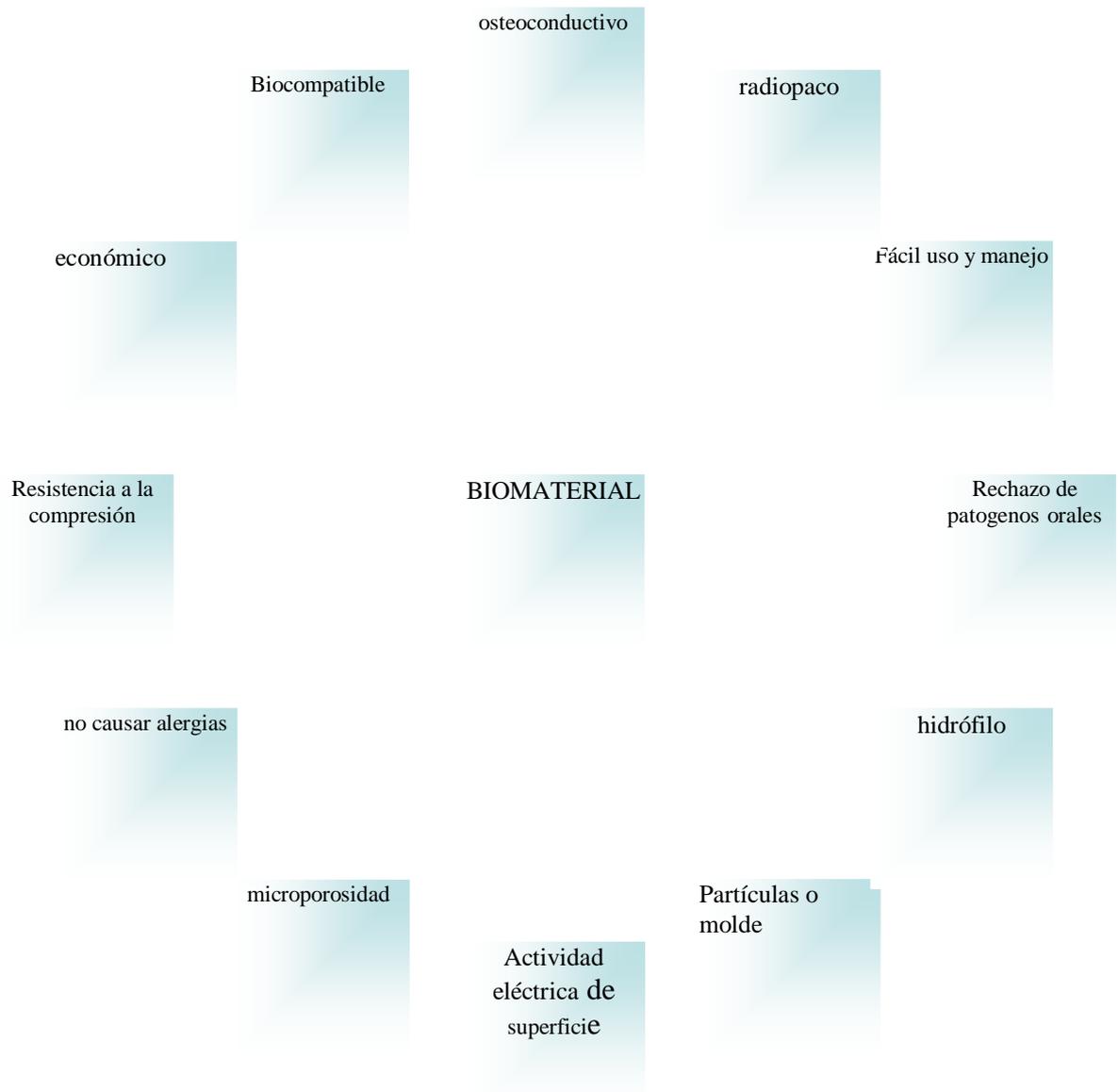


Diagrama 1. Características ideales de un biomaterial. Tomado de McKinney RV.

Implantes dentales endoóseos. Ed. Mosby 1993.

El tratamiento regenerativo del hueso puede estar basado, solamente en la colocación de injertos de hueso o en combinación con membrana. La elección de una de estas dos alternativas va a depender de la morfología del defecto óseo . Un defecto con paredes óseas conservadas (defecto cerrado) puede

cicatrizarse con el simple uso de hueso autólogo, siempre que el mismo, conjuntamente con el coágulo de sangre permanezca estable dentro del espacio a regenerar. En un defecto con ausencia de una o más paredes óseas (defecto abierto), la regeneración puede ser obstaculizada debido a factores como falta de espacio causado por el colapso de tejidos superficiales, o la inestabilidad del coágulo debido a micro-movimientos durante la fase de cicatrización. En estos casos la membrana además de cumplir con la función de barrera mecánica, cumple con la función de mantenedor de espacio, creando a nivel del defecto óseo un ambiente cerrado delimitado por un lado por las paredes óseas residuales y del otro lado por la membrana que sirve de pared provisional durante el período de cicatrización. Este ambiente debe ser espacioso y protegido, de manera que el coágulo sea estable en las primeras fases de cicatrización y de esta forma no se interrumpa el proceso de regeneración ósea.

Regeneración Ósea Guiada (ROG)

Técnica de estimulación para la formación de hueso nuevo en áreas donde existen deficiencias. Basada en el uso de barreras o membranas físicas para evitar que las células del epitelio gingival y del tejido conjuntivo invadan las zonas que van a ser regeneradas. De esta forma se favorece que las células osteoprogenitoras puedan proliferar para formar hueso nuevo. En esta técnica, la membrana actúa como un segundo colgajo y proporciona protección adicional a la herida, disminuyendo el choque de las fuerzas que incide sobre ella y garantizando la diferenciación de las células mesenquimatosas hacia osteoblastos, en lugar de hacia fibroblastos(**Arteaga H.** 2000).

Tiene como objetivo crear hueso sano y suficiente, en los procesos alveolares de los maxilares, para cubrir defectos óseos periodontales o para tener procesos alveolares adecuados, en donde colocar prótesis dentales de manera convencional, o con implantes dentales osteointegrados.

2.OBJETIVOS

Los objetivos que nos hemos planteado en nuestro trabajo con conejos de Nueva Zelanda son:

- 1- Valoración histológica del comportamiento del B-TCP + HA + colágeno tipo I a distintas concentraciones vs control en defectos óseos alveolares en tibias de conejo a los 30, 60 y 90 días
- 2- Valoración radiográfica del comportamiento del B-TCP + HA + colágeno tipo I vs control en defectos óseos alveolares en las tibias de conejo a los 30, 60 y 90 días.
- 3- Comprobar si los implantes del biomaterial cumplen los criterios de: biocompatibilidad, degradación, osteointegración y estabilidad de volumen durante el tiempo de estudio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Animales de experimentación

El estudio experimental se llevó a cabo en el servicio de animales de laboratorio de la Universidad de Murcia (REGAES 300305440012), según las condiciones éticas y legales establecidas El Comité de Ética de Investigación Animal de la Universidad de Murcia, España, será considerado con el protocolo del estudio, que siguen las normas generales establecidas por la Unión Europea la Directiva del Consejo Real Decreto 53/2013, de 1 (2010/63/UE) febrero, por el que se establece el normas básicas para la protección de los animales utilizados para experimentación y otros, incluyendo la enseñanza. Los animales serán alimentados con una dieta diaria de pellets. para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Se utilizaron 30 conejos albinos Nueva Zelanda, con un peso de 3.000 a 4.000 gramos y 15-18 semanas de vida (edades próximas al cierre fisario, cuando alcanzan el volumen óseo adecuado para el estudio) y de ambos sexos, ya que no se han descrito diferencias entre sexos respecto al metabolismo óseo.



Figura 7. Animal de experimentación -Conejos raza Nueva Zelanda Blanco (N.Z.)

3.1.2 COMPOSICIONES

Hidroxiapatita, B- Fosfato Tricálcico y Colágeno

Se han realizado 3 composiciones utilizando distintos porcentajes de los siguientes compuestos: hidroxiapatito (HA), fosfato tricálcico polimorfo Beta (B-TCP) y colágeno.

Compuesto	Composición 1	Composición 2	Composición 3
HA	60%	50%	40%
B-TCP	20%	20%	30%
Colageno	20%	30%	30%

Tabla 1. Porcentajes de cada compuesto para cada composición.

Para la **obtención de las composiciones**, primero se ha sinterizado por reacción en estado sólido el HA y B-TCP.

Los reactivos para la obtención de HA han sido CaHPO_4 y CaCO_3 , ambos reactivos de la marca comercial Sigma Aldrich. La relación Ca/P utilizada ha sido 1,72.

Se han pesado los reactivos en las proporciones indicadas y se homogenizan a temperatura ambiente utilizando acetona. El proceso de homogenización se ha repetido 3 veces. Una vez homogeneizada la mezcla se procede a su descarbonatación, realizando un tratamiento de 3 horas a 1000°C. Tras la descarbonatación el material se ha molido, utilizando molinos de bolas de zircona (MM302-Retsch) e isopropanol como disolvente. Tras la molienda se lleva a sequedad el material utilizando una estufa. Después el material se introduce en un crisol de platino y se lleva al horno de alta temperatura donde se le aplica el siguiente tratamiento térmico al material: 2 horas de rampa de subida hasta 1200°C, 6 horas de palier a dicha temperatura y 3 horas de rampa de bajada hasta temperatura ambiente.

Los reactivos utilizados para la obtención de B-TCP son CaHPO₄ y CaCO₃, de las marcas comerciales Panreak y Fluka respectivamente. De la estequiometría de la reacción se obtienen los pesos necesarios de cada reactivo para la obtención de material.



Tras pesar los reactivos se homogenizan a temperatura ambiente utilizando acetona y llevándose posteriormente a sequedad, este proceso se repite 3 veces. Después de la homogenización se realiza el tratamiento térmico de sinterización, el cual consiste en someter la muestra a 1000°C durante 12 horas. Este tratamiento se lleva a cabo en un horno tipo mufla. Una vez obtenido el material se molutura en un mortero de ágata, obteniendo el tamaño de partícula adecuado para mezclar con el colágeno.

Preparación de las composiciones

Una vez obtenidos las distintas materias primas para realizar las

composiciones indicadas, se pesaron según los porcentajes y se homogeneizaron en seco y a temperatura ambiente. La homogenización se llevó a cabo hasta que visualmente no era posible distinguir un material de otro.

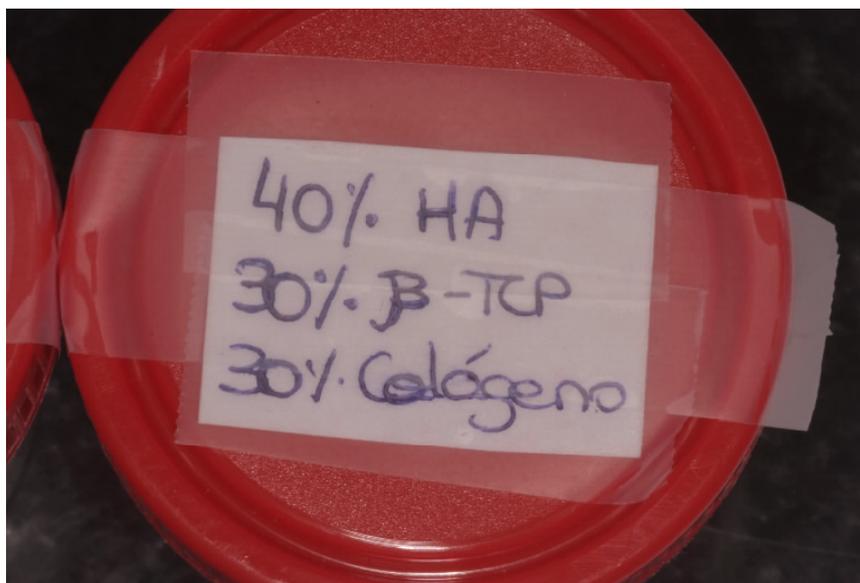


Fig.8.Composición 1

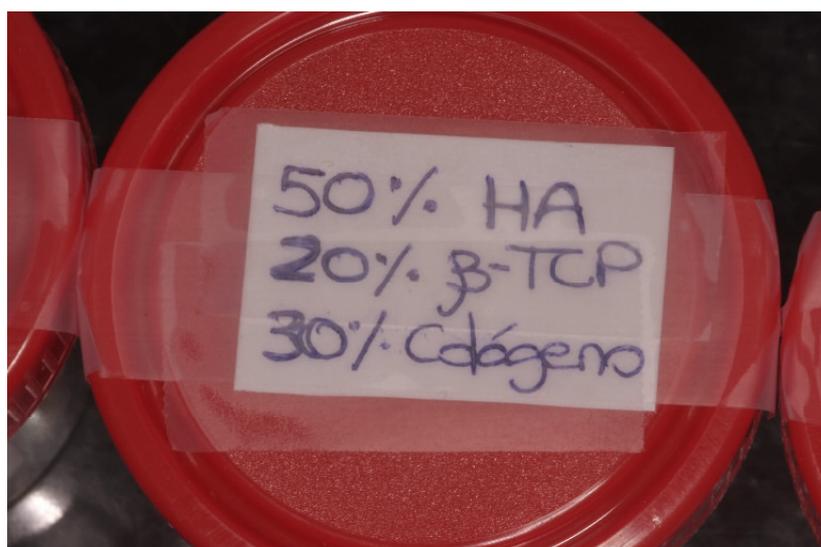


Fig. 9.Composición 2

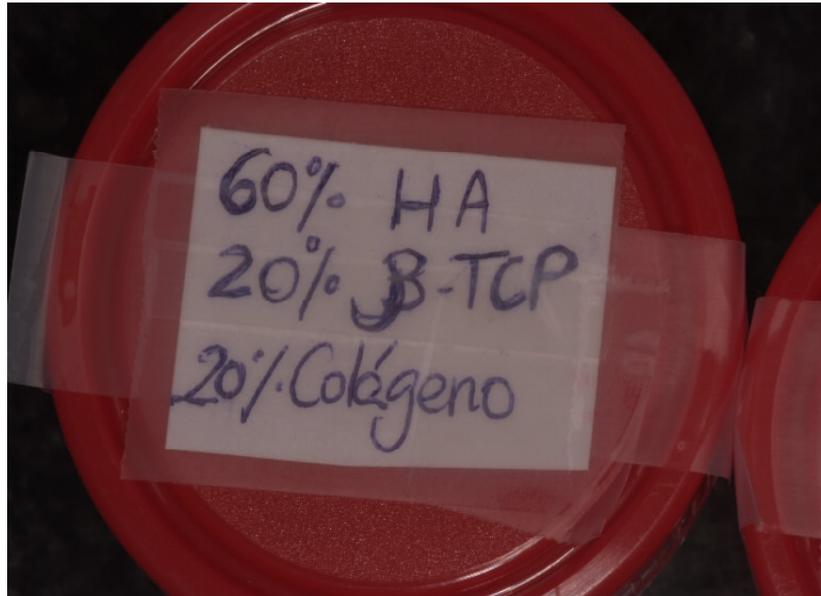


Fig. 10. Composición 3

Síntesis del biomaterial de fosfato tricálcico

El fosfato tricálcico fue sintetizado por reacción en estado sólido de una mezcla estequiométrica de Fosfato hidrogeno de calcio anhidro (CaHPO_4 , Panreac), y carbonato de calcio (CaCO_3 , Fluka) con un tamaño de partícula aproximado de 2-5 μm .

La fabricación se realiza por el calentamiento progresivo del TCP e incorporación de Si, que substituye a la HA. Dicha substitución promueve la actividad biológica por la transformación del biomaterial en su superficie en una apatita, lo que genera una superficie más electronegativa y con una microestructura más fina.

La incorporación del Si, produce una recristalización a HA carbonatada, mediada por proteínas del suero y osteoblastos. (Pietak M y cols. 2007)

Para ello, en el sistema $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{Ca}_2\text{SiO}_4$ se obtendrán, mediante sinterización en estado sólido:

- Así mismo, se obtendrán tres materiales con microestructuras eutéctoides y con composiciones correspondientes, igualmente, a los nuevos puntos invariantes eutéctoides.

A continuación por trituración se obtendrán dos tamaños de partícula en polvo (150-250µm) y en grano (800-1500µm) y para la obtención de los cilindros y los discos una mezcla de polvo y grano (50-50%) se someterá a presión y sinterización para obtener cilindros de diámetro 5x8mm y discos de diámetro 5x1mm. Se presenta una imagen de microscopio electrónico de barrido de los materiales obtenidos en el proceso

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Planificación del procedimiento y agrupación del material

Se utilizaron las tibias traseras de 30 conejos Blancos para el estudio.

Las muestras se extrajeron de forma aleatoria utilizando un programa informático www.randomization.com

CONEJOS	NÚMERO DE PATAS	PROCEDIMIENTOS
<i>Día 0</i>	30	Inserción del biomaterial aleatoria
<i>1 mes</i>	10	Extracción de la primera muestra de forma aleatoria
<i>2 mes</i>	10	Extracción de la segunda muestra de forma aleatoria
<i>3 mes</i>	10	Extracción de la tercera muestra de forma aleatoria
<i>3 grupos</i>	30	

Tabla 2: Descripción de la distribución de la muestra

Se realizaron tres perforaciones de 4mm de diámetro por 8 mm de longitud en las dos tibias de cada conejo, para un total de 240 perforaciones.

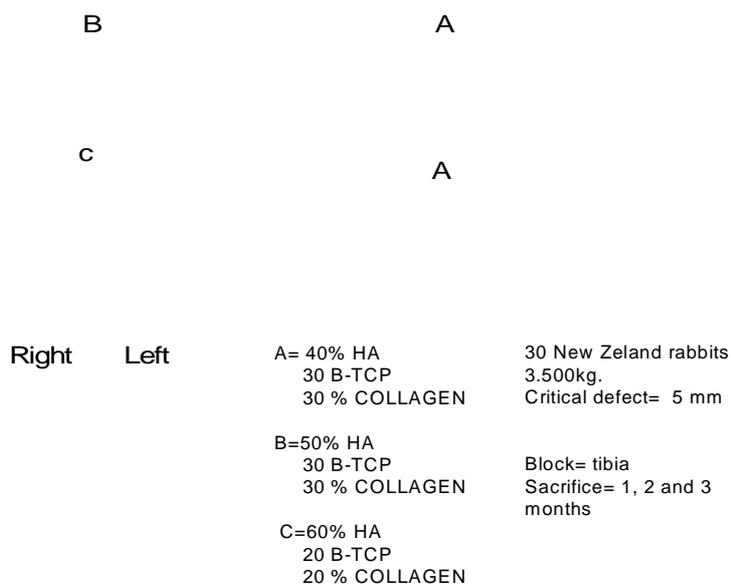
Grupo control: perforaciones sin ningún biomaterial

Test A: perforaciones rellenas con biomaterial 40 %Ha, 30 % Btcp, 30 % Colageno

Test B: perforaciones rellenas con biomaterial 50 %Ha, 20 % Btcp, 30 % Colageno

Test C: perforaciones rellenas con biomaterial 60 %Ha, 20 % Btcp, 20 % Colageno

Diseño del proyecto



Esquema 2: Porcentajes de cada compuesto para cada composición.

5104

C	A
B	A

Esquema 3: Disposición 1 de las composiciones

5108

A	C
A	C

Esquema 4: Disposición 2 de las composiciones

5101

A	B
C	A

Esquema 5: Disposición 3 de las composiciones

5110

A	C
B	A

Esquema 6: Disposición 4 de las composiciones

3.2.2. Método anestésico y quirúrgico.

Método anestésico

Basado en una serie de principios farmacológicos, con los que conseguimos mínima toxicidad hepática y renal, fácil eliminación, alto margen de seguridad y mínimos efectos secundarios. Basándonos en estudios previos (**Meseguer** 1993; **Úbeda** 1994; **Galian** 1995; **Lax** 2004; **Pardo** 2006).

a) Premedicación: Con efecto sedante a los 10-15 minutos de la administración.

-Sulfato de Atropina (0.3 mg/k, vía im.): utilizada para reducir la secreción excesiva de las vías respiratorias altas, la motilidad intestinal, así como la bradicardia producida por ciertos agentes anestésicos.

-Hidrocloruro de clorpromacina (10 mg/k, vía i.m.): su uso permite reducir las dosis de agentes anestésicos, sobre todo de los barbitúricos. Proporciona buena relajación muscular y reduce la ansiedad del animal al carecer de efecto analgésico y anestésico, consiguiendo efecto sedante a los 10-15 minutos.

-Profilaxis antibiótica: Amoxicilina (Clamoxyl LA® laboratorios Pfizer) 0.1 ml/k, vía im, administrada en monodosis y 30 minutos antes de la intervención.

Tras la premedicación del animal, se procedió al rasurado de ambas patas traseras en una zona comprendida entre el 1/3 medio del muslo y el 1/3 medio de la pata. Seguidamente se limpió la zona con polividona yodada al 10 % (Betadine®), garantizando la máxima asepsia del campo quirúrgico.

b) Inducción anestésica:

-Clorhidrato de Ketamina (Merial®)(50 mg/k, vía i.m).

Hipnótico de acción rápida y potente analgésico de escasa acción como relajante muscular, que se potencia con la clorpromacina. Además, no causa depresión respiratoria ni tiene efectos acumulativos, consiguiendo una acción anestésica suficiente para la cirugía a los 15-20 minutos. La pauta de mantenimiento es a demanda, mediante la administración de 20 mg/k, vía i.m ante el menor signo de agitación del animal.

c) Reversión o despertar:

Los animales fueron depositados en las jaulas para evitar manipulaciones intempestivas así como reacciones incontroladas por parte del animal en las primeras horas tras la intervención. Esta fase se realiza de forma suave y espontánea, no requiriéndose medicación alguna.

Esta pauta anestésica resultó ser cómoda de aplicar, consiguió un tiempo anestésico suficiente, excelente relajación muscular y analgesia, careció prácticamente de complicaciones, de efectos tóxicos mínimos y produjo en el animal un despertar suave y progresivo.

3.2.3. Método quirúrgico

La asepsia del campo quirúrgico se consiguió aplicando polividona yodada al 10% (Betadine®). Aislamos dicha zona mediante un paño fenestrado estéril dejando expuesta únicamente el área de la rodilla sobre la que aplicamos un campo estéril del tipo Steri-Drape® de 10 x 10 cm

Con un bisturí del nº 15 realizamos una incisión cutánea de unos 15 mm tomando como referencias anatómicas los relieves óseos proximal y distal de la tuberosidad tibial. Después de realizar un despegamiento total con una desperiostización , marcamos con una punta de grafito la zona donde se

alojarían los implantes y la zona control. El implante central se situaría en línea con la meseta tibial anterior, a continuación marcábamos el orificio superior e inferior separados estos por una distancia de 5 mm. Seguidamente utilizamos fresas sucesivas de 2,8 y 4,0 mm montadas en un micromotor de bajas revoluciones, con la que perforamos la cortical en todo su espesor hasta la médula ósea. A continuación repetíamos el mismo procedimiento en la pata izquierda. Posteriormente lavamos abundantemente las perforaciones con suero fisiológico arrastrando todas las partículas óseas producidas durante el fresado del hueso. En la tibia derecha se colocó en el primer defecto ossceram rehidratado con suero fisiológico, compactando el implante hasta la cortical. En el segundo defecto se colocó ossceram también rehidratado con suero junto a colágeno tipo I. El tercer defecto se dejó vacío como control. En la tibia izquierda se realizó el mismo procedimiento.

Finalmente se realizó el cierre cuidadoso de la herida comenzando por el periostio y el plano muscular profundo con puntos sueltos de vicryl® 4/0, para contribuir en la estabilidad del implante en el lecho receptor evitando su extrusión, así como la formación de hematoma importante. El plano cutáneo se afrontó por medio de una sutura de puntos simples con Seda 3/0 Finalmente, tras el lavado de la herida quirúrgica con suero fisiológico, se aplicó un apósito plástico en spray del tipo Novecután®.

Pasos quirúrgicos:



Fig. 11 – Exposición de la zona antero-interna de la tibia



Fig. 12- incisión quirúrgica



Fig. 13 – Separación total del colgajo y localización de la meseta tibial anterior. Marcaje con punta de grafito de la localización del material óseo



Fig. 14-Primera perforación con fresa de trefina de 4mm de diámetro de la cortical hasta la medula.

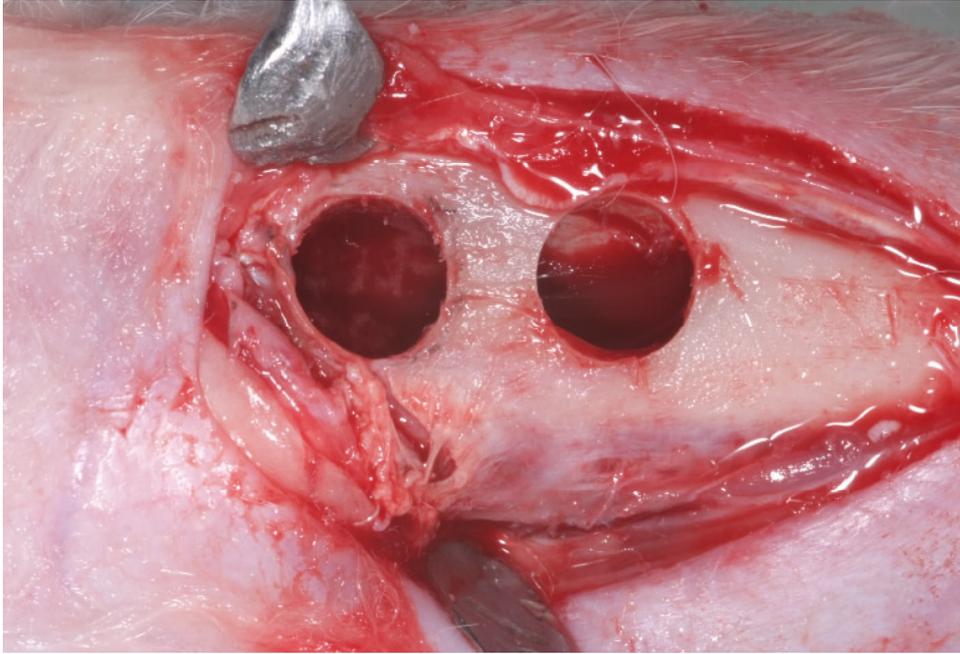


Fig. 15-Segunda perforación con fresa de trefina de 4mm de diámetro de la cortical hasta la medula.

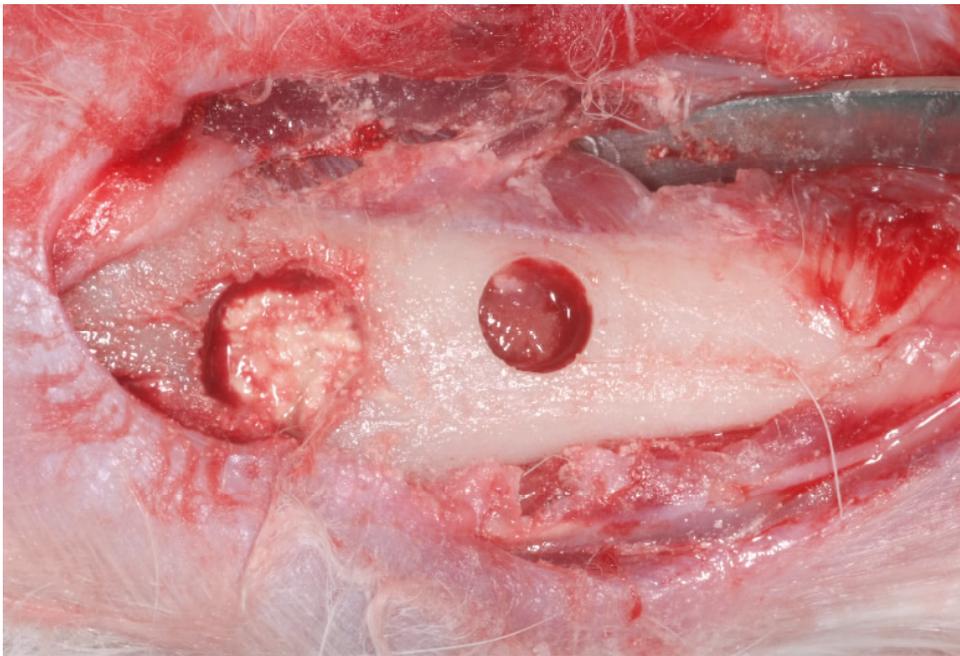


Fig. 16- Relleno de la perforación con el material



Fig. 17. Las perforaciones preparadas según las condiciones de la investigación.

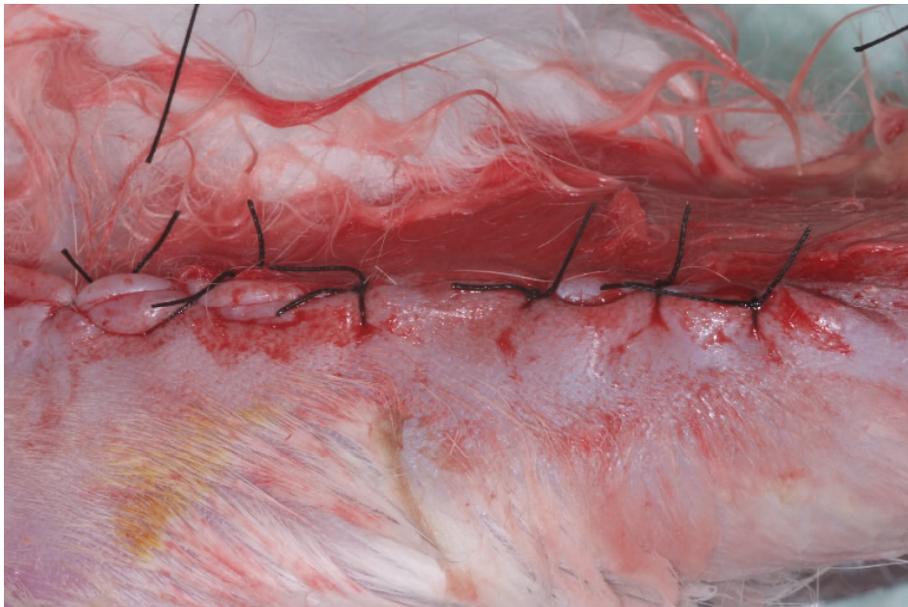


Fig.18 Sutura de la zona implantada con puntos simples con Seda 3/0

Cuidados pre- y postoperatorios

Para la identificación de los animales se realizó una numeración en la oreja con un tatuador Dermotrón, reflejándose junto al nombre del investigador y número de jaula, en el libro de registro. Los datos de cada animal se registraron en una hoja de protocolo individualizada anotando además los detalles de la experiencia.



Fig. 19 Numeración en la oreja con un tatuador dermatón

Tres semanas antes de la intervención, se depositaron en el estabulario de la Universidad de Murcia, individualmente en jaulas de 45 x 65 x 45 cm. con el fin de permitirles adaptarse al medio. Se les mantuvo a una temperatura de 20-21°C, humedad relativa del aire 45-65%, renovación de aire de 15 veces/hora,

velocidad máxima del aire 0,5 m/s, fotoperiodo Luz/Oscuridad 12/12, ruido máximo de 55 dB e iluminación de 350 lux/m².

Se les alimentó con una dieta completa de mantenimiento (Pienso 112 U.A.P, PANLAB) y durante el periodo de adaptación y experimental, los animales bebieron y comieron "ad libitum".

Las intervenciones se realizaron en un quirófano de cirugía experimental convencional de 20 m² separado convenientemente de las áreas de rasurado, almacén de material quirúrgico, área de recuperación y vigilancia postoperatoria, según las recomendaciones de **Alexander** (1974) y normativa actual.

Protocolo de Eutanasia

El sacrificio de los animales se realizó administrando una sobredosis endovenosa de Tiopental Sódico, solución al 2%, 1 g en 50ml. de agua destilada (Pentotal®) provocando paro cardiorespiratorio.

Recogida de las Muestras:

Para la obtención de las muestras óseas se realizó un abordaje lateral longitudinal de la pata del conejo, extrayendo completamente la tibia por desarticulación a piel de la rodilla y el tobillo. Las piezas se almacenaban en formol, en frascos separados y debidamente rotulados para su identificación.

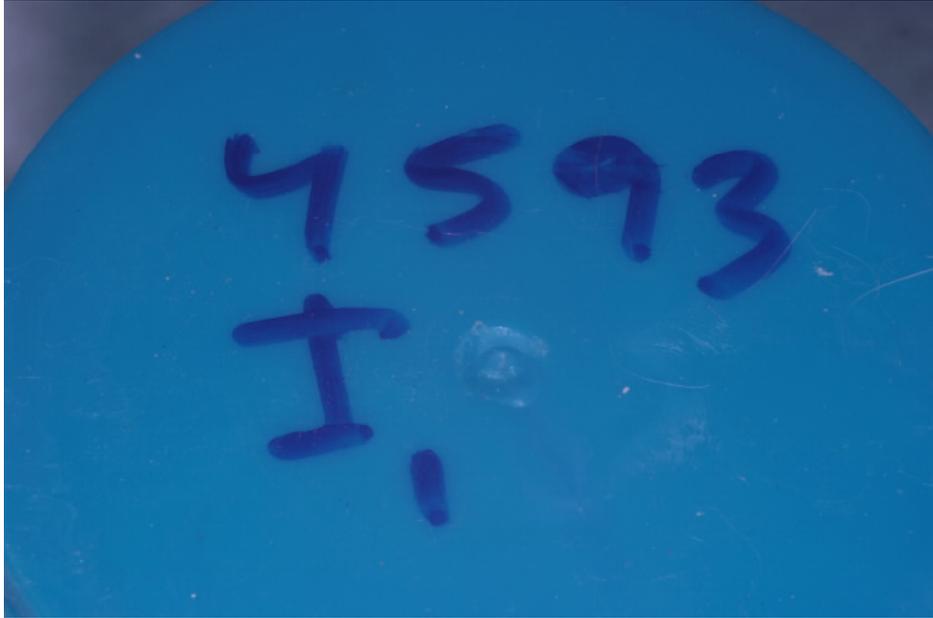


Fig. 20 Recipiente numerado donde se conservaron las muestras



Fig.21 cicatrización de la zona intervenida a los 90 días.

3.3. Método radiológico

Las imágenes radiológicas se obtuvieron mediante radiovisiografía mediante un soporte estandarizado, consistían en la toma de radiografías en dos proyecciones ortogonales (ML) medio-lateral y posteroanterior (PA) de cada una de las piezas anatómicas.

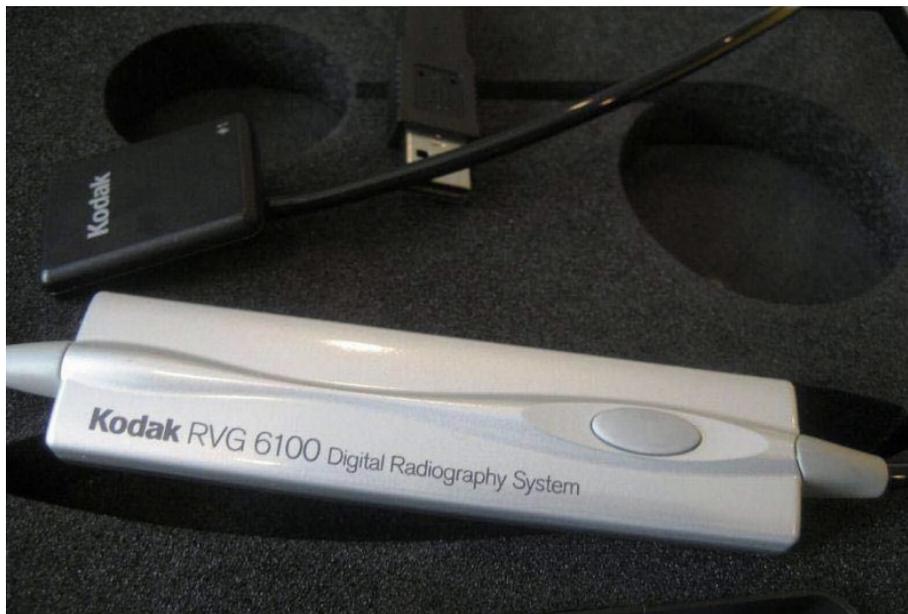


Fig.22 Sistema de radiología digital Kodak 6100

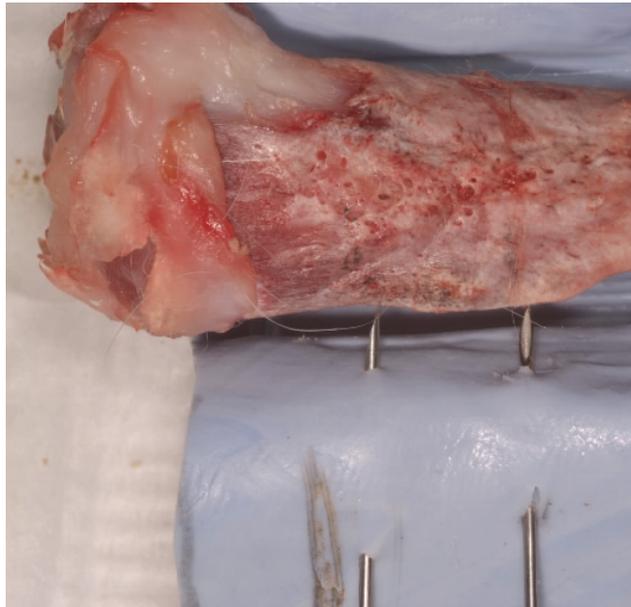


Fig. 23 Soporte diseñado para la realización de imágenes radiograficas



Fig. 24 Imagen radiográfica de los dos defectos óseos sin ningún relleno óseo.

3.4. Método histológico

Obtención de muestras: tras la identificación del área de las perforaciones se obtuvieron las muestras mediante osteotomía transversal con mini-sierra

circular, a una distancia de 5 mm proximal y distal de la zona del implante y de la zona control.



Fig. 25-Detalle de las perforaciones para el corte transversal mediante sierra oscilante en 1/3 proximal de la tibia



Fig 26. Imagen macroscópica de la tibia diseccionada a los 30 días.



Fig 27. Imagen macroscópica a los 60 días de la tibia diseccionada.

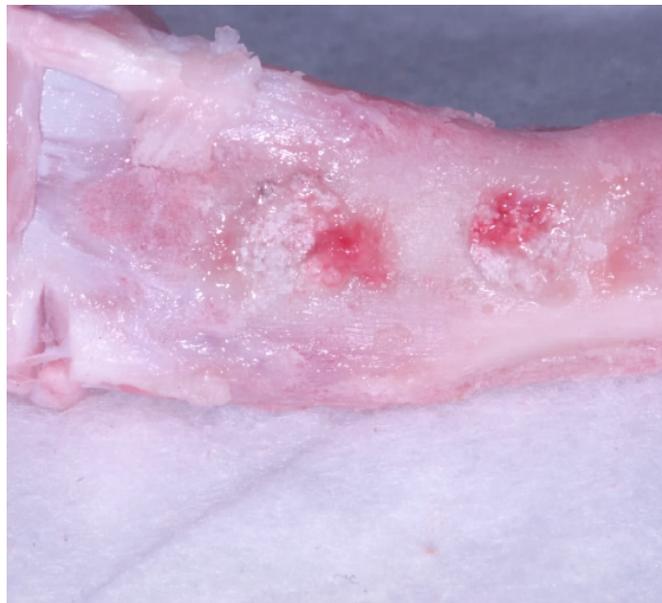


Fig 28. Imagen macroscópica a los 90 días de la tibia diseccionada.

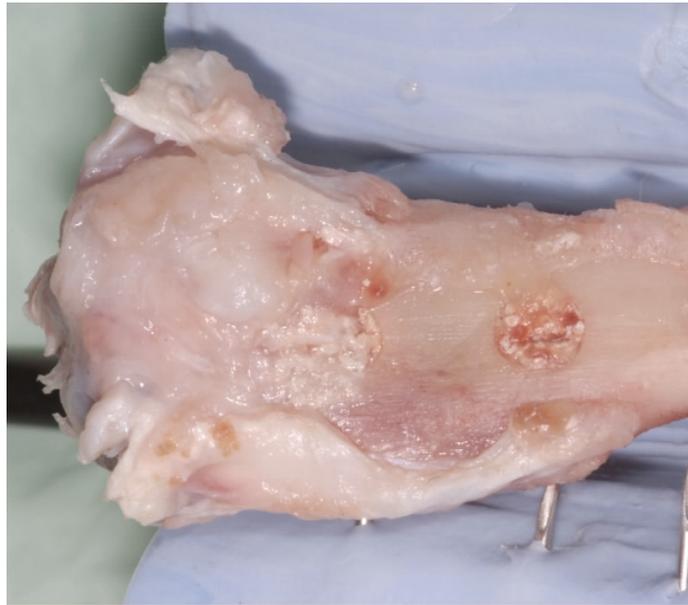


Fig 29. Imagen macroscópica de la tibia diseccionada a los 30 días.

Todas las muestras obtenidas se fijaron en formol neutro tamponado al 10% hasta su proceso de descalcificación. Tradicionalmente se ha utilizado como técnica de decalcificación ósea el formol nítrico que, aunque es un decalcificador eficaz, presenta el problema de crear importantes alteraciones en la morfología celular tanto del tejido óseo como de los tejidos blandos, por lo que en nuestro trabajo, además de utilizar dicha técnica de decalcificación, hemos ensayado la utilización de dos soluciones comerciales denominadas TBD-I[®] y TBD-II[®] (Termo-Shandon SA, Pittsburg, USA) que son de uso habitual desde hace unos años en la práctica clínica de diversos hospitales. Las muestras se mantuvieron durante 2 horas con el decalcificador TBD-I (Ácido hidroclicórico 14% y polyvinylpyrrolidone) y posteriormente utilizamos el TBD-II (Ácido fórmico 26% + Citrato sódico 8.5% + polyvinylpyrrolidone) durante 17 días, realizando un cambio de líquido cada 24 horas. **(Harkness JE, Warner JE, 1980).**

Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua destilada y deshidratadas mediante alcoholes a concentraciones crecientes, continuando con los pasos habituales de este proceso hasta su inclusión en parafina. De los bloques, se realizaron secciones de 5 μm mediante un microtomo de rotación Minot Leitz .

Las secciones histológicas fueron teñidas mediante la técnica de rutina de Hematoxilina-eosina (H-E) utilizada en la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia.

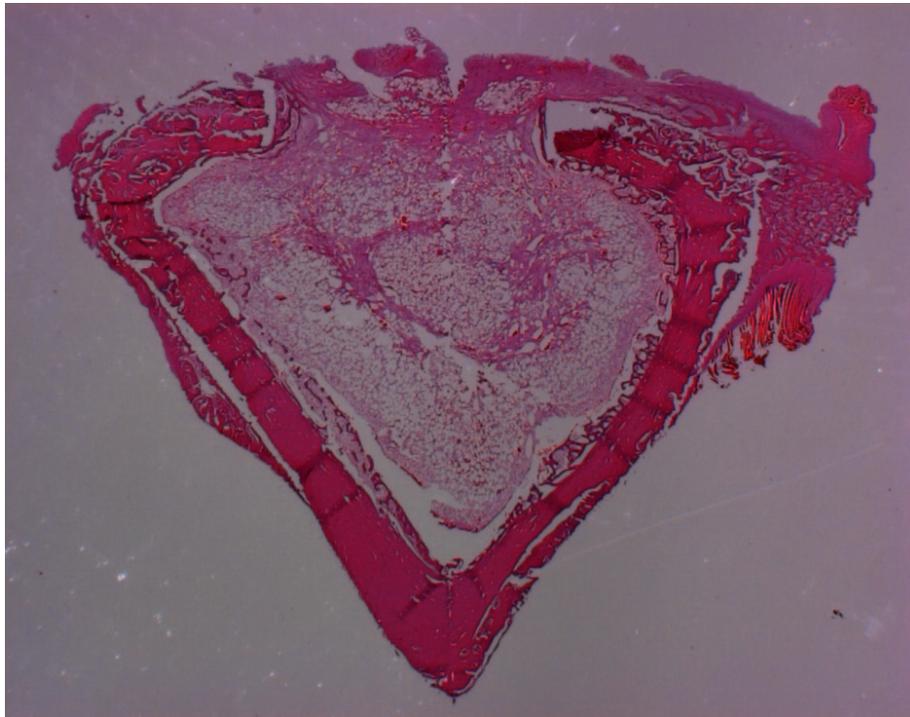


Figura 30. Corte transversal del hueso en la zona de perforación.

3.5. Método histomorfométrico

Para realizar el estudio histomorfométrico de los cortes histológicos, realizamos, en primer lugar, la captura de imágenes en un microscopio Leica Z6 APO, conectado a una cámara Leica DC500, que está a su vez conectada a un ordenador con el software de captura Leica Application Suite V 2.8.1. La

magnificación a la que se capturaron las imágenes fue 25x o 35x, dependiendo del tamaño de la sección de tibia.



Fig. 31. Microscopio LeicaZ6-APO conectado a cámara digital Leica DC500.

Las imágenes capturadas, se analizaron mediante el software de análisis de imagen MIP 4.5 (Consulting Image Digital, Barcelona). El proceso seguido fue el siguiente:

Tras calibrar debidamente el equipo para obtener nuestros datos en milímetros, cambiamos el color de la imagen a niveles de gris.

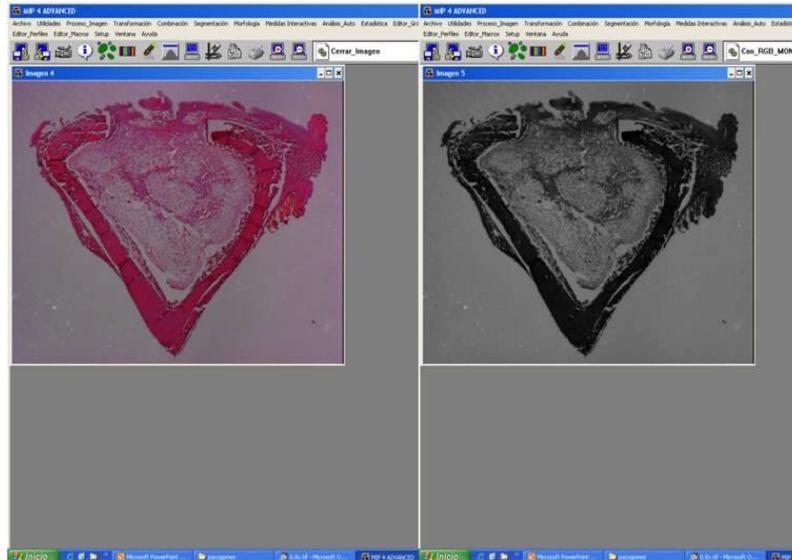


Fig. 32.Cambio de color de la imagen a niveles grises

Después, realizamos una selección interactiva de la cavidad medular, que pasa a ser una imagen binaria. Ya la tendríamos lista para medir

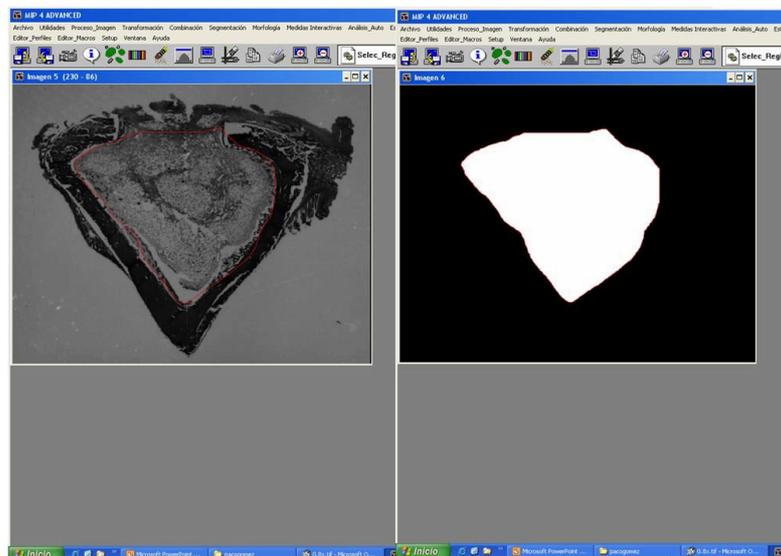


Fig. 33.Imagen interactiva de la cavidad medular

. Segmentamos las zonas de hueso por niveles de gris.

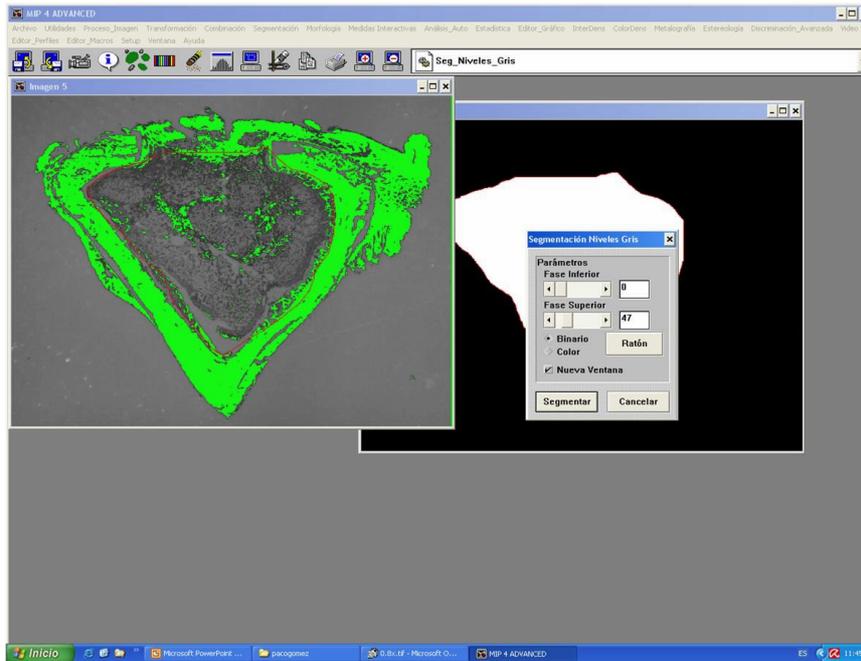


Fig. 34.segmentacion zonas óseas según niveles grises

Volvemos a seleccionar la cavidad medular, esta vez sólo en la imagen binaria obtenida tras la segmentación de niveles de gris.

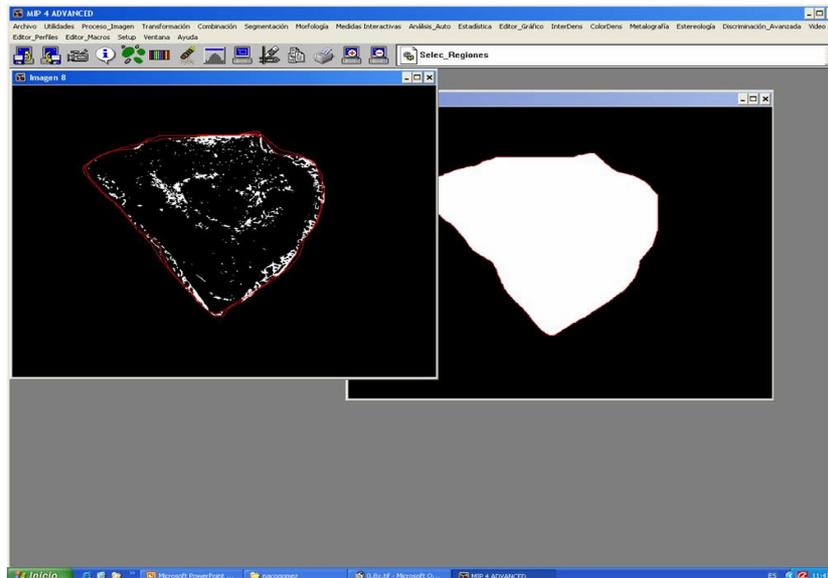


Fig. 35.Imagen binaria tras la segmentacion en niveles grises

Por último, realizamos una medida de campo referencial, es decir, calculamos qué porcentaje de la imagen corresponde al hueso formado en la cavidad medular respecto al área total de la cavidad medular.

Para realizar el estudio histomorfométrico del defecto óseo (zona de entrada de la trefina), seguimos la misma metodología, pero relacionando el grosor del hueso cortical residual y el del hueso neoformado.

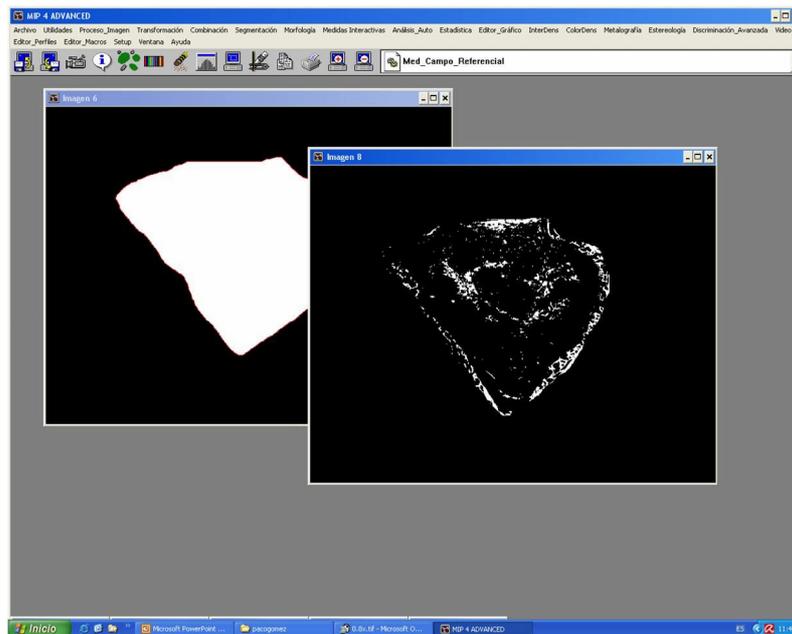


Fig. 36. Medida referencial

3.6. Método estadístico

Los datos obtenidos del tratamiento de las imágenes fueron recogidos en una hoja de cálculo (Excel, Microsoft) y posteriormente se exportaron a programa de análisis estadístico SPSS15.

El análisis estadístico se llevará a cabo en la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la U.M. Realizándose una estadística descriptiva básica con el establecimiento en cada variable de las medias y las desviaciones estándar entre los diferentes cortes de cada muestra. Así mismo

una estadística inferencial que incluirá un análisis de la varianza ANOVA para medidas repetidas. El nivel de significación establecido fue ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Resultados histológicos e histomorfométricos

En los resultados obtenidos se reflejan las diferencias histológicas e histomorfométricas en distintas zonas de las perforaciones (140 muestras en total después de la pérdida de algunas de ellas durante su procesado).

A LOS 30 DIAS

30 DIAS CONTROL

Microscópicamente, a nivel cortical, observamos una costra serohemática en la zona externa del defecto realizado, que aparecía sin remodelar.

En la zona de la cavidad medular existían áreas con un tejido de granulación joven, formado por numerosos fibroblastos de morfología estrellada (secretores) y un gran componente vascular inmaduro de tipo capilar. También observamos células plasmáticas y macrófagos.

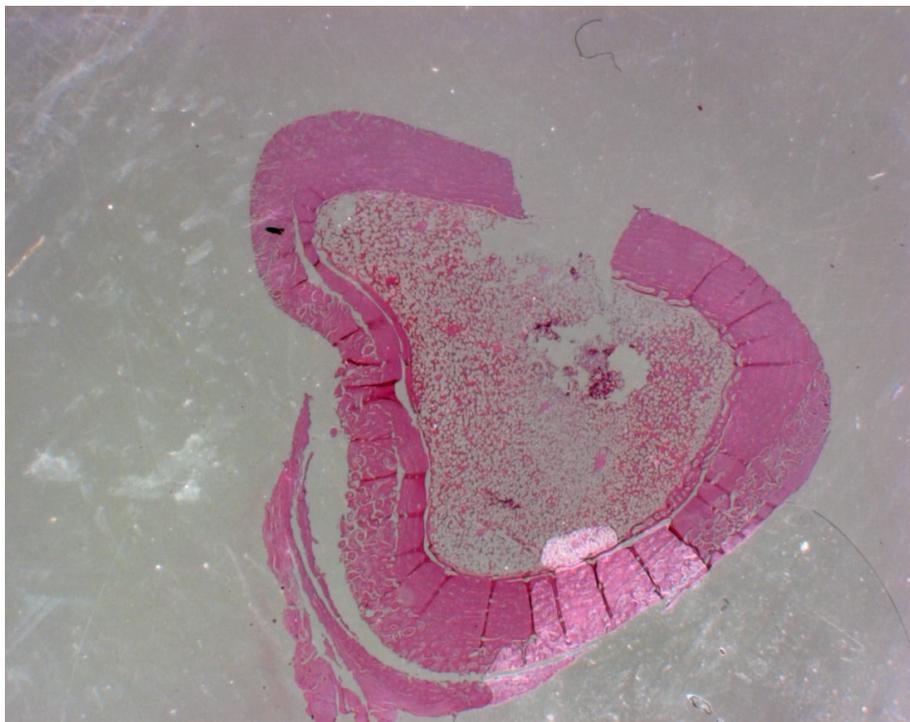


Fig. 37- Imagen microscópica de la zona control a los 30 días.

30 DIAS: HIDROXIAPATITA+FOSFATO TRICALCICO +COLAGENO

Se mostró un crecimiento de hueso en la cavidad medular y un mayor cierre del defecto en la cortical producido en la cirugía.

Microscópicamente, a nivel cortical se observó una costra serohemática en la zona externa del defecto realizado, que aparecía sin remodelar.

En la zona de la cavidad medular existían la formación de hueso y formación de osteoide entre los gránulos.

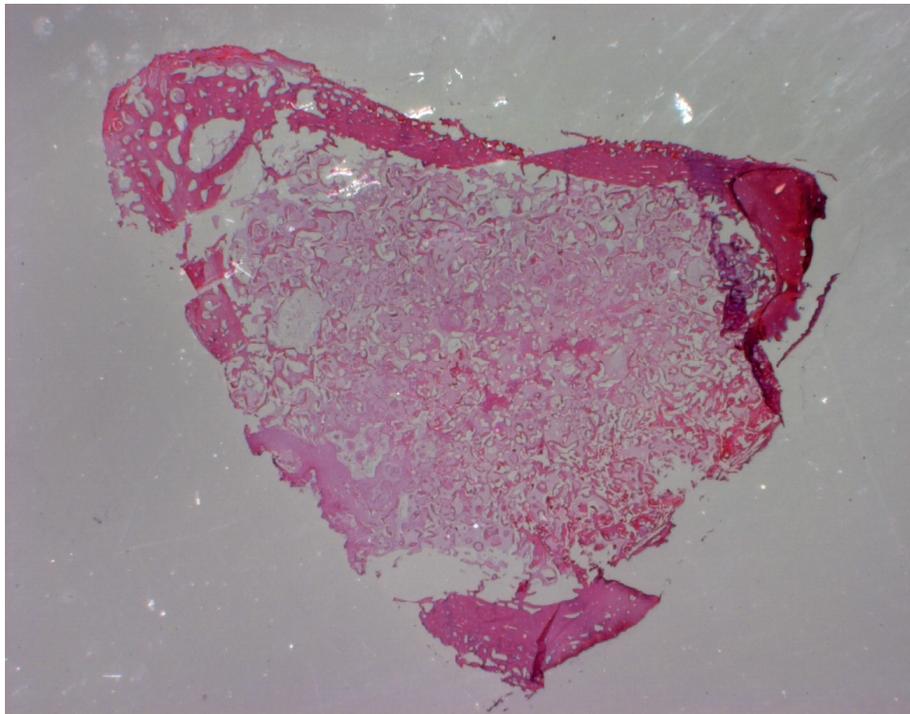


Fig. 38- Imagen microscópica del fosfato tricalcico+ hidroxiapatita+colágeno a los 30 días.

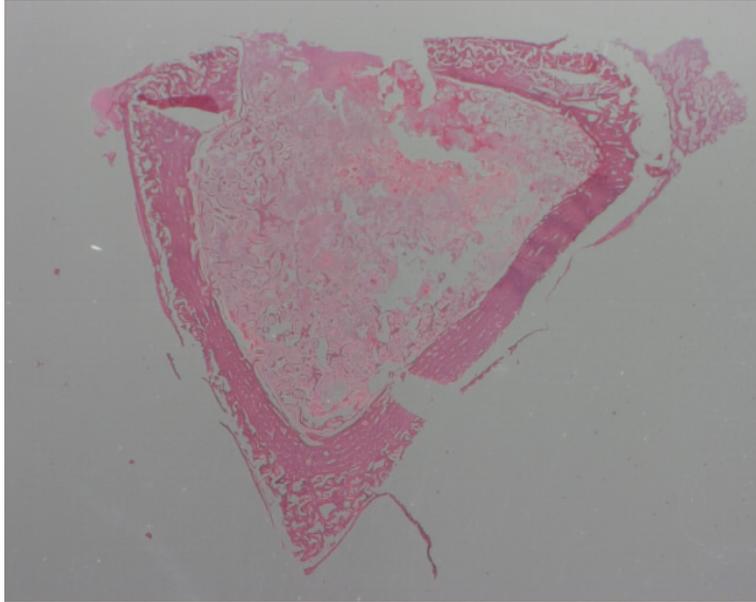


Fig. 39- Imagen microscópica del fosfato tricalcico+ hidroxiapatita+colágeno a los 30 días.

A LOS 60 DIAS

60 DIAS: CONTROL

En este período, ya observamos fenómenos de regeneración ósea, que en el caso de los controles, se focalizaba en la zona del defecto cavitario, observándose material osteoide con una incipiente organización trabecular, procedente de las trabéculas adyacentes.

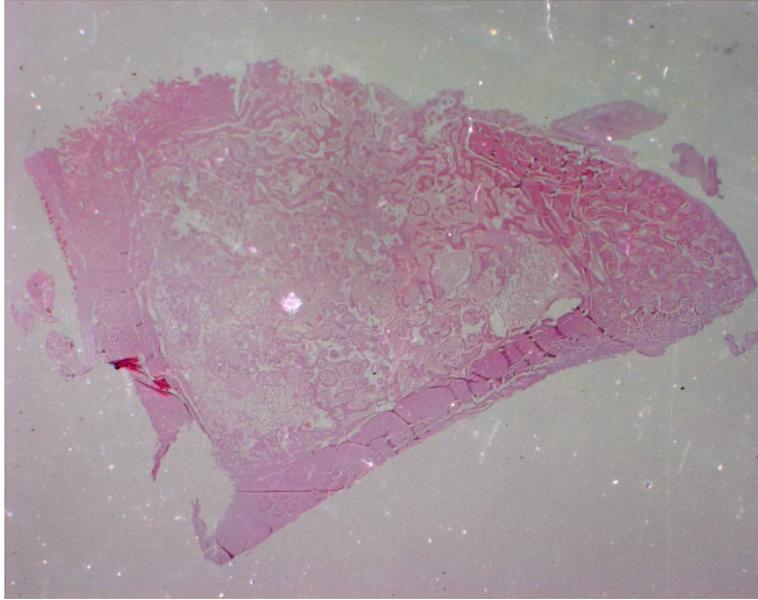


Fig. 40- Imagen microscópica a los 60 días del control.

60 DIAS: HIDROXIAPATITA+FOSFATO TRICALCICO +COLAGENO

Observamos a nivel de los espacios medulares un 25% más de hueso nuevo y materiales de ossceram.

Se apreció maduración ósea y reabsorción parcial del injerto óseo a nivel medular.

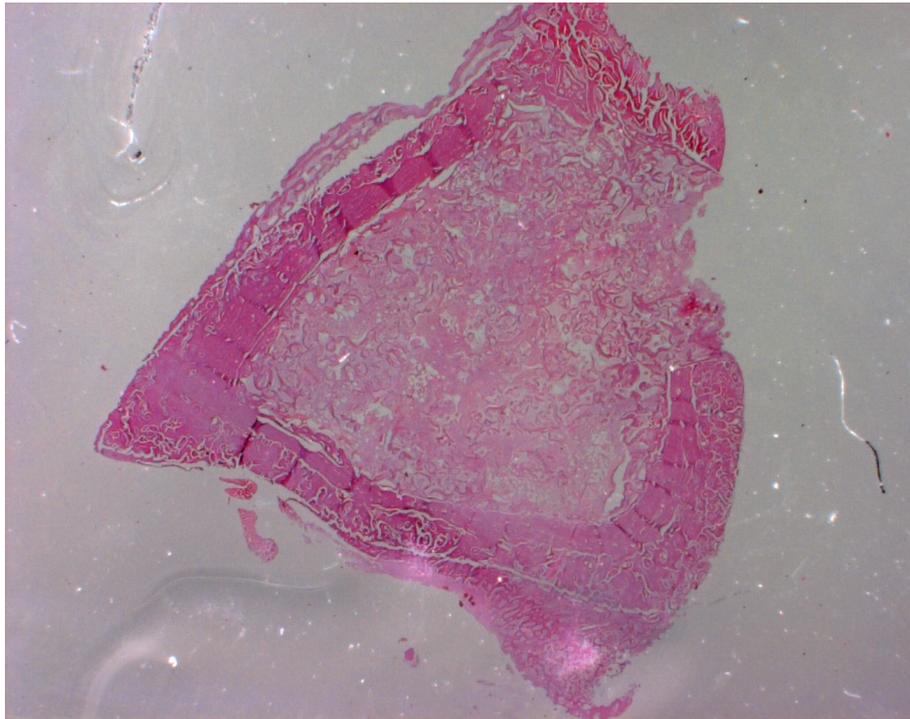


Fig.41- - Imagen microscópica del fosfato tricalcico+ hidroxiapatita+colágeno a los 30 días.

A LOS 90 DIAS

90 DIAS: CONTROL

Se observa una remodelación ósea completa o casi completa en todas la muestras. La médula ósea presentaba un aspecto normal.

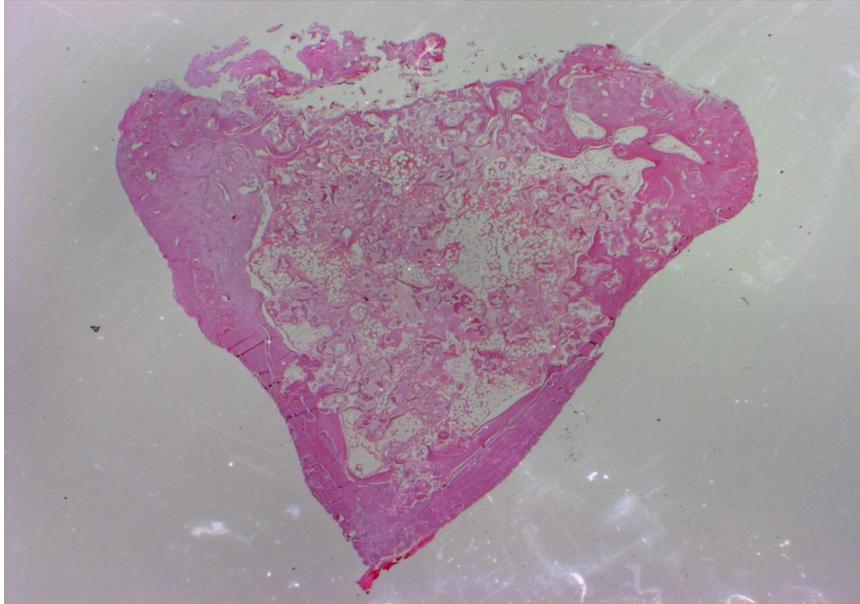


Fig. 42 Imagen al microscopio de la zona control a los 90 días

90 DIAS: HIDROXIAPATITA+FOSFATO TRICALCICO +COLAGENO

La pared del defecto óseo estaba completamente cerrada y una remodelación ósea completa.

Se aprecia microscópicamente en el espacio medular hueso travecular y una cortical muy densa. A nivel del material implantado se observaban áreas en las que todavía predominaban los fenómenos de regeneración ósea alrededor de pequeños islotes del material granular aunque con predominio de médula ósea con características normales, estas alternaban con otras áreas en las que predominaba la médula ósea con trabéculas irregulares anastomosadas con aspecto en encaje, sobre todo en las áreas próximas a la cortical

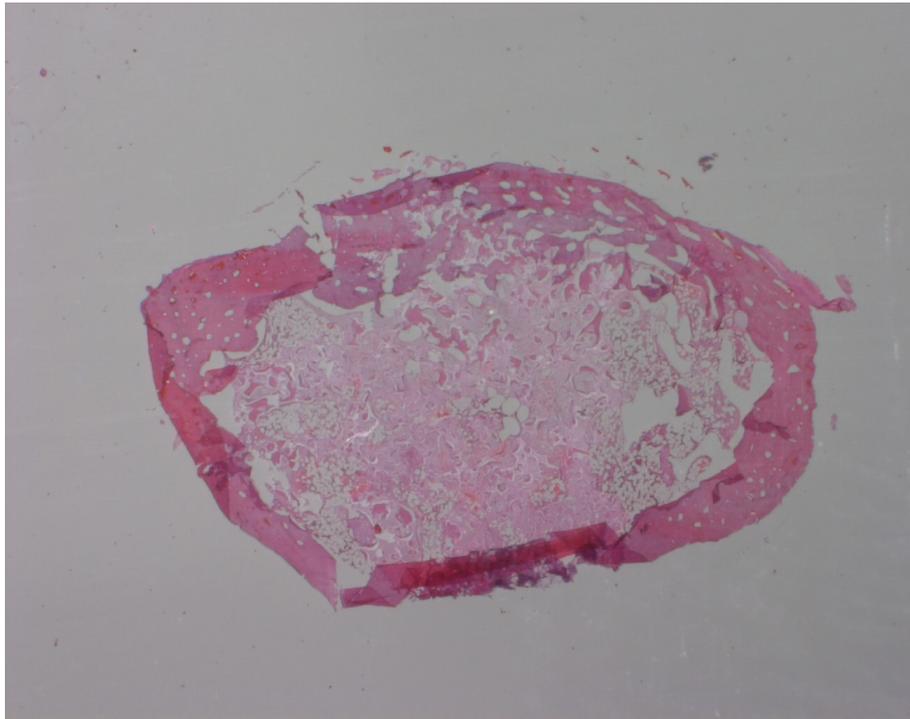


Fig. 43- Imagen microscópica del fosfato tricalcico+ hidroxiapatita+colágeno a los 90 días.

4. 2. ESTUDIO RADIOGRÁFICO

A LOS 30 DÍAS

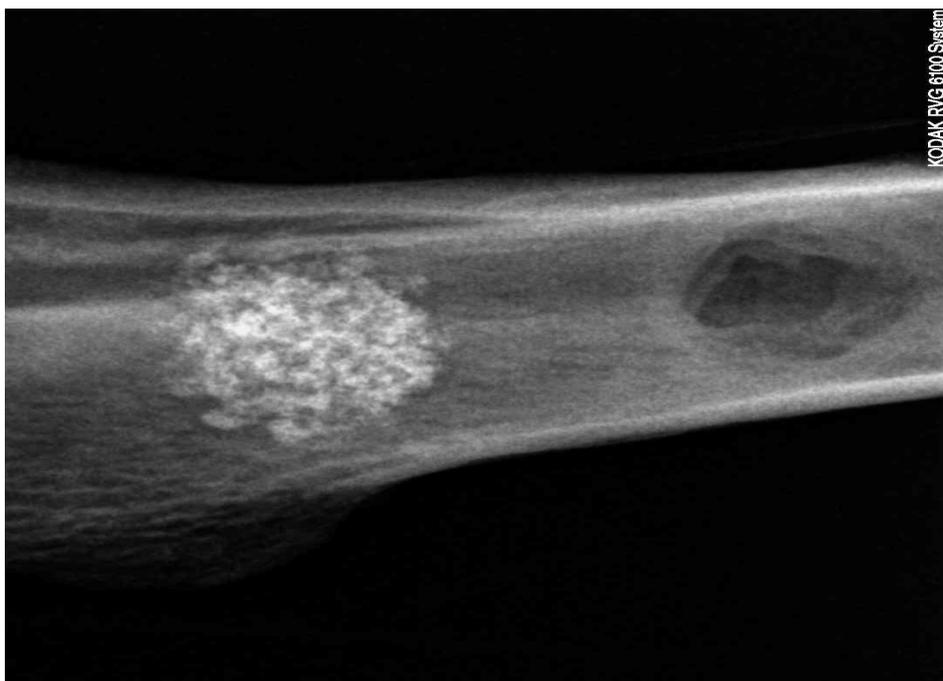


Fig. 44 Imagen Radiográfica de la zona control y zona con biomaterial a los 30 días.

30 DÍAS CONTROL

En la radiografía simple de hueso se observa la imagen lacunar, radiotransparente, del defecto óseo artificial provocado quirúrgicamente. Presenta una morfología redondeada de bordes regulares y lisos que permiten diferenciarlo perfectamente del hueso normal circundante. Según la proyección, puede observarse la ruptura de la línea radiopaca de la cortical ósea. En los cortes transversales realizados a nivel de la laguna ósea puede observarse la pérdida de la cortical diafisaria y la comunicación con la zona medular del hueso. No se aprecian deformaciones, líneas de fracturas o artefactos en el interior de la cavidad artificial realizada. Se observa claramente la pérdida ósea en la zona de la cortical diafisaria en donde se realizó la perforación ósea.

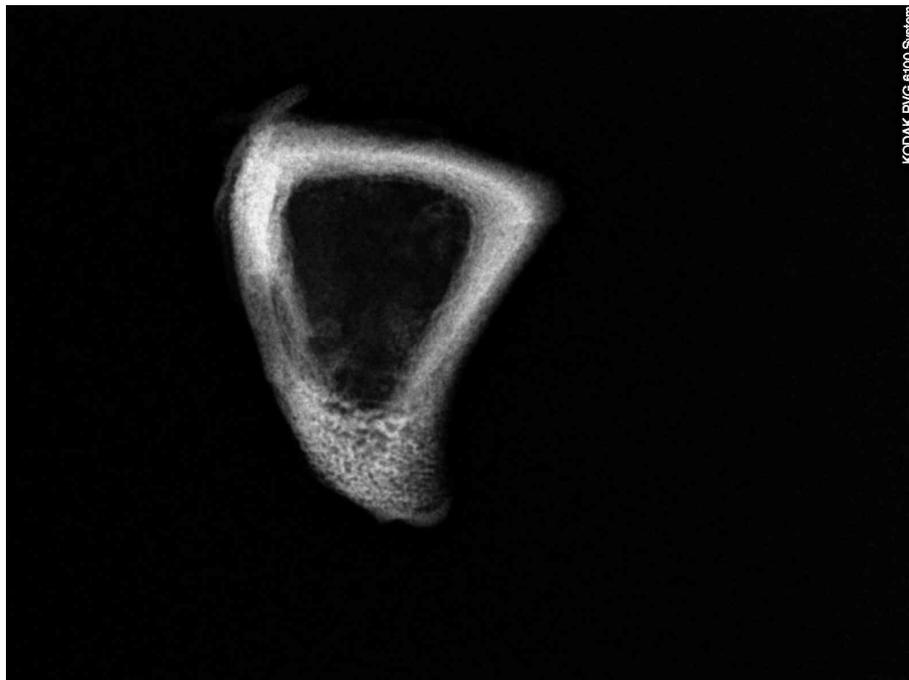


Fig. 45- Radiovisiografía del corte transversal del control a los 30 días

30 DÍAS HIDROXIAPATITA, FOSFATO TRICALCICO Y COLAGENO

En la radiografía del corte transversal se observan los bordes del material implantado menos irregulares a nivel medular. En la zona cortical se observa un mayor engrasamiento debido al uso de la membrana. Un mayor cierre del defecto óseo realizado quirúrgicamente.

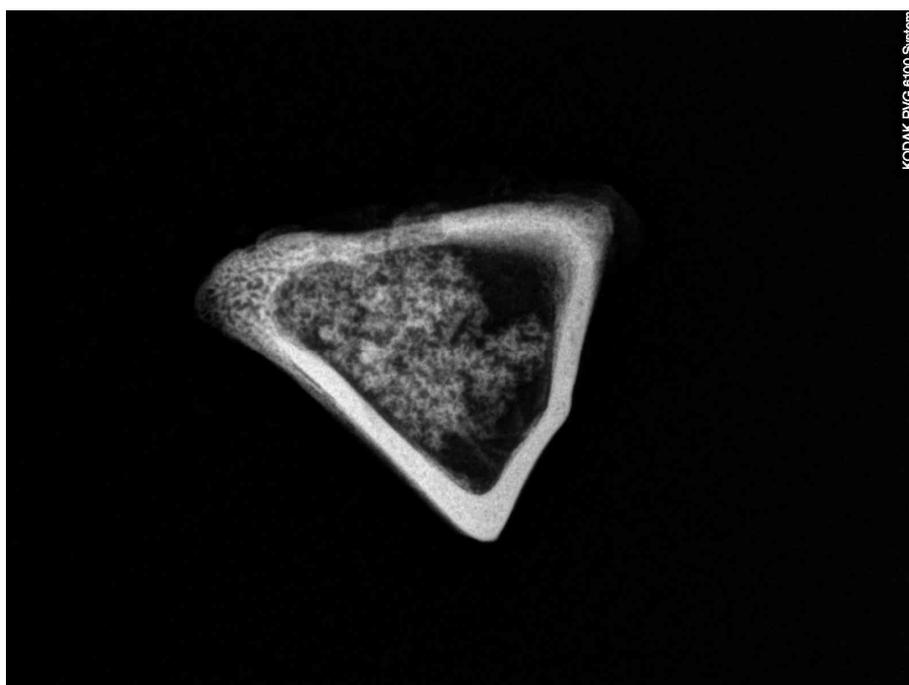


Fig.46. Imagen Radiográfica del corte transversal del Hidroxiapatita, B- Fosfato Tricálcico y Colágeno

Las características radiológicas del material implantado corresponde a la imagen de un elemento cilíndrico con estructura rectangular de 4 x 6 mm que se adapta a la morfología del defecto óseo provocado artificialmente. Presenta una densidad calcio muy elevada, superior a la de las estructuras óseas adyacentes que permite individualizarlo sin dificultad. Su densidad cálcica no es homogénea, parece formado por pequeñas partículas o gránulos muy radiopacos, de pequeño tamaño y aspecto redondeado que le confiere un aspecto denso pero heterogéneo. Por esta razón, los bordes del implante

aparecen irregulares, aunque formados por estas partículas que se observan bien delimitadas debido a su elevada densidad radiológica.

Se observa una solución de continuidad en la cortical de la zona epifisaria utilizada para la introducción del material. El relleno de la laguna ósea, una vez introducido el implante, es prácticamente completo. La estructura radiológica ósea del resto de la tibia no presenta alteraciones ocasionadas por la del implante. En algunas zonas marginales externas el implante contacta con la ausencia de línea ósea cortical y presenta una morfología más radiopaca y de aspecto granular. En la imagen radiológica del corte transversal puede observarse todas estas características del implante que, además, ocupa prácticamente toda la cavidad medular del hueso estudiado al nivel de la laguna ósea practicada.

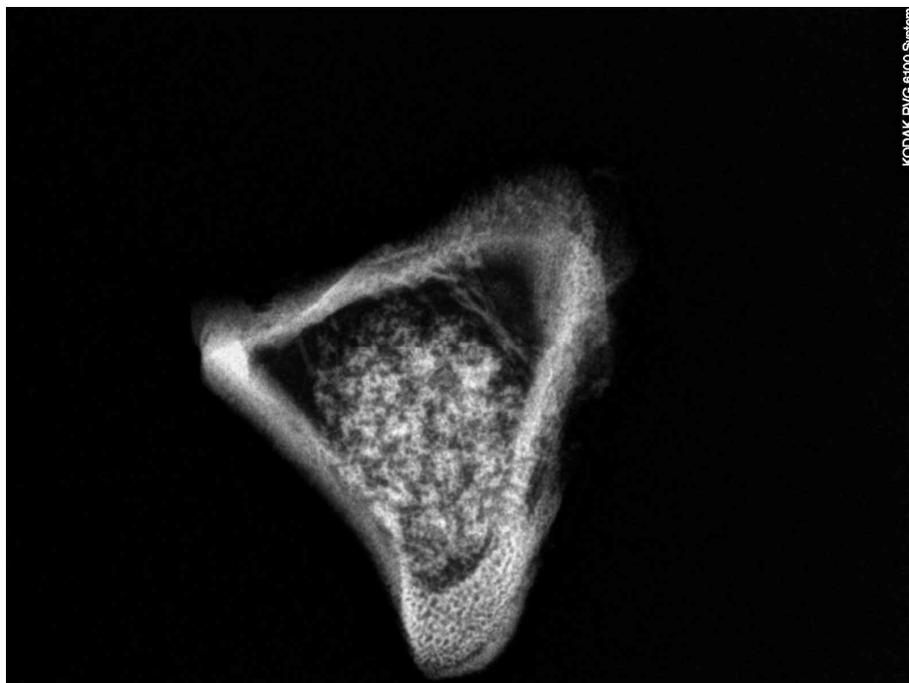


Fig. 47- Radiovisiografía del corte transversal de hidroxiapatita+fosfato tricalcico+colageno a los 30 días

A LOS 60 DÍAS

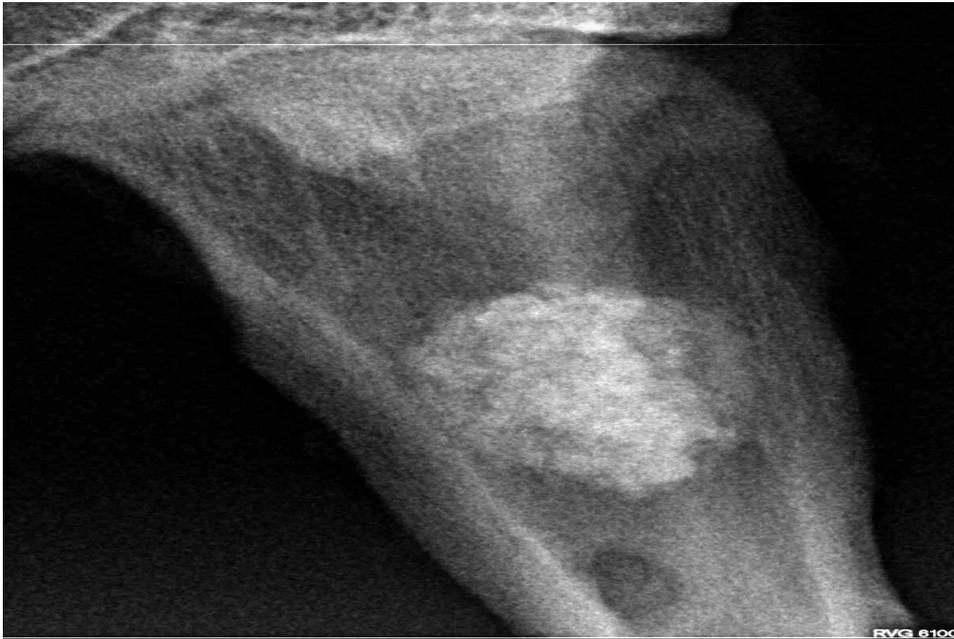


Fig. 48- Imagen de los 2 defectos radiográficos a los 60 días según diseño experimental.

60 DÍAS CONTROL

Las lagunas óseas realizadas pueden observarse inmersas en la imagen ósea de la diáfisis del hueso presentando unos bordes menos nítidos que en el estadio anterior pero con bordes regulares y lisos. En la proyección lateral se observa la línea de densidad calcio que cierra la zona externa de la imagen lacunar cubierta por densidad calcio ligeramente inferior a la del hueso cortical suprayacente. En la imagen radiológica transversal puede observarse el cierre completo de la cortical realizada quirúrgicamente, aunque su grosor y densidad todavía son diferentes a las del hueso circundante y, por ello, permite diferenciarlo todavía fácilmente del hueso de alrededor.

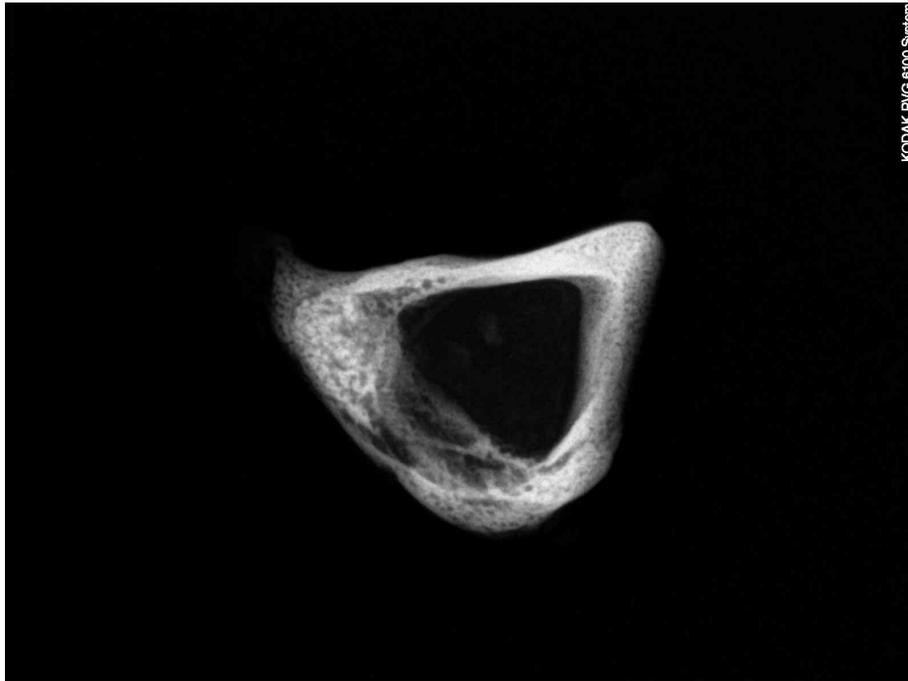


Fig. 49- Imagen del control a los 60 días, corte transversal.

60 DÍAS :HIDROXIAPATITA+COLAGENO+FOSFATO TRICALCICO

A los 60 días el implante presenta una mayor densidad radiológica posiblemente al disminuir su volumen y presentar una mayor compactación entre los gránulos que se observan en su interior. La laguna ósea continúa observándose ocupada completamente por el implante. Los límites con la cortical comienzan a presentar una mayor irregularidad pero con una densidad radiológica menor. Se observa aumento de la densidad ósea en la cortical externa del hueso que consigue cubrir por completo el orificio de entrada en donde se colocó el implante.

La imagen radiológica transversal de la pieza muestra la completa reparación de la cortical en el lugar donde se realizó el implante, aunque su densidad radiológica es claramente inferior y más heterogénea que la presentada por la cortical del resto del hueso.

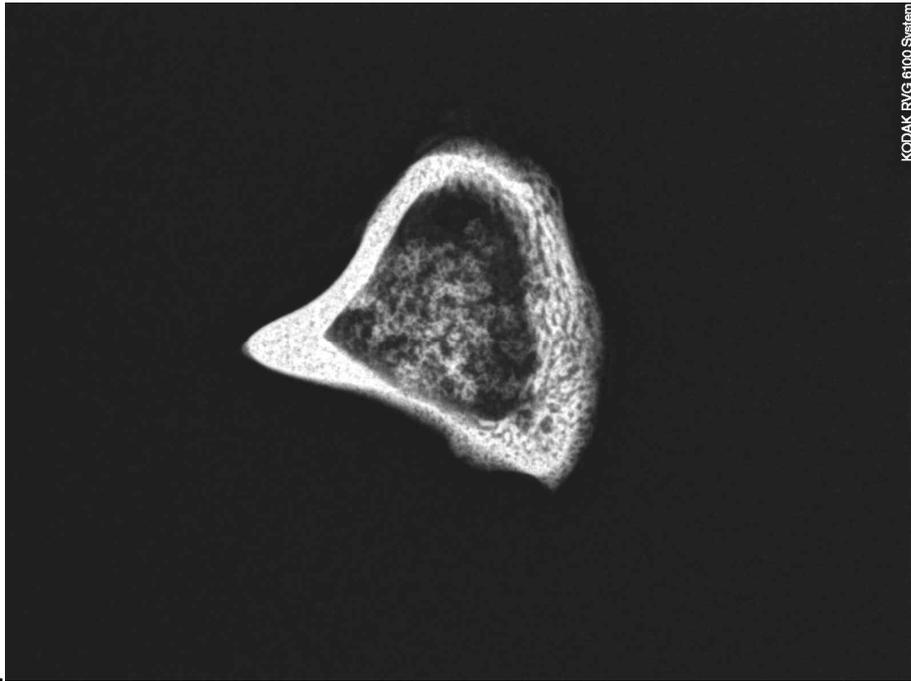


Fig.50- Corte transversal de hidroxiapatita+fosfato tricalcico+colageno a los 60 días

La densidad radiológica del material implantado ha disminuido presentando unos bordes irregulares en contacto con el hueso normal circundante. En este periodo la cortical de hueso aparece incompleta, todavía ocupada por material del implante.

A LOS 90 DÍAS

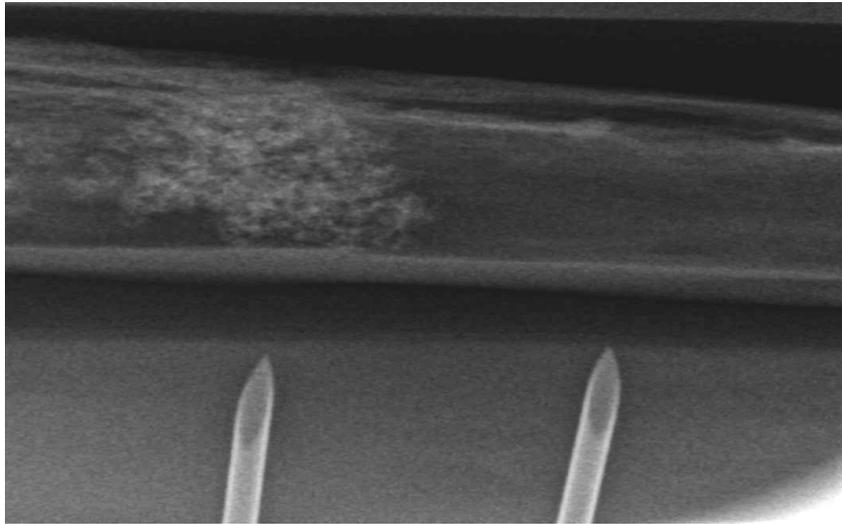


Fig. 51-. Imagen de las dos perforaciones a los 90 días.

90 DÍAS CONTROL

En la imagen simple del hueso todavía puede observarse una pequeña laguna radiotransparente que presenta unos bordes regulares pero ya no tan redondeados en la diafisis del hueso. Se pueden observar imágenes de densidad cálcica en el interior de la laguna, e incluso en numerosas ocasiones, la infiltración, desde el hueso adyacente, de líneas radiopacas compatibles con trabéculas óseas que se introducen hacia el interior de dicha laguna o defecto óseo.

La cortical ósea aparece completamente reparada e, incluso en ocasiones, presenta una anchura mayor a la del hueso circundante. La radiografía transversal de la laguna ósea presenta el cierre completo del defecto óseo por tejido óseo compacto de características radiológicas normales.

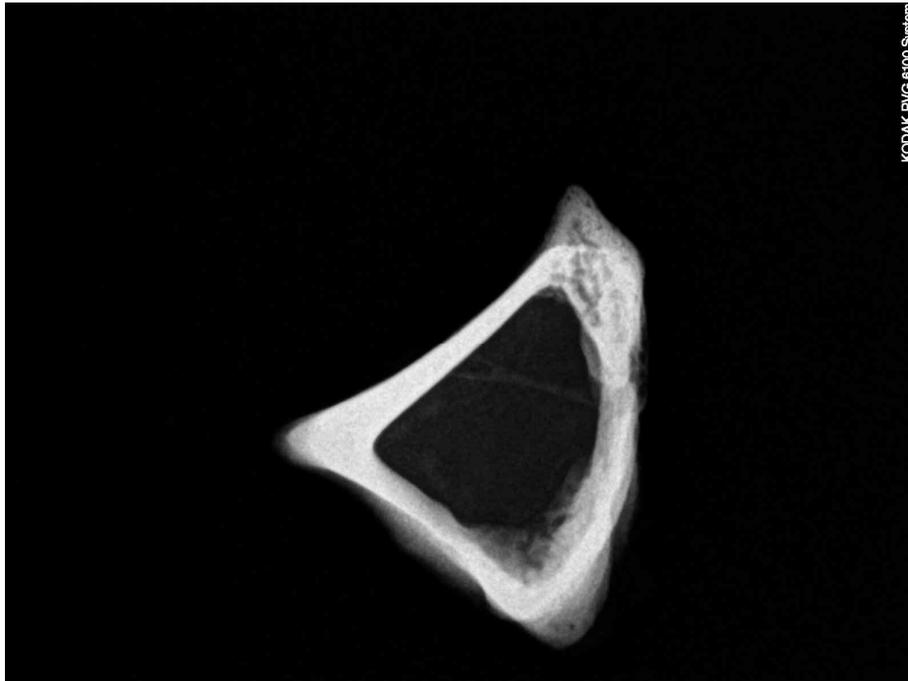


Fig. 52 Imagen del Control a los 90 días.

90 DÍAS: HIDROXIAPATITA+COLAGENO+FOSFATO TRICALCICO

El material implantado presenta un tamaño menor y una disminución de su densidad radiológica pero permanece perfectamente individualizado en el interior del hueso.

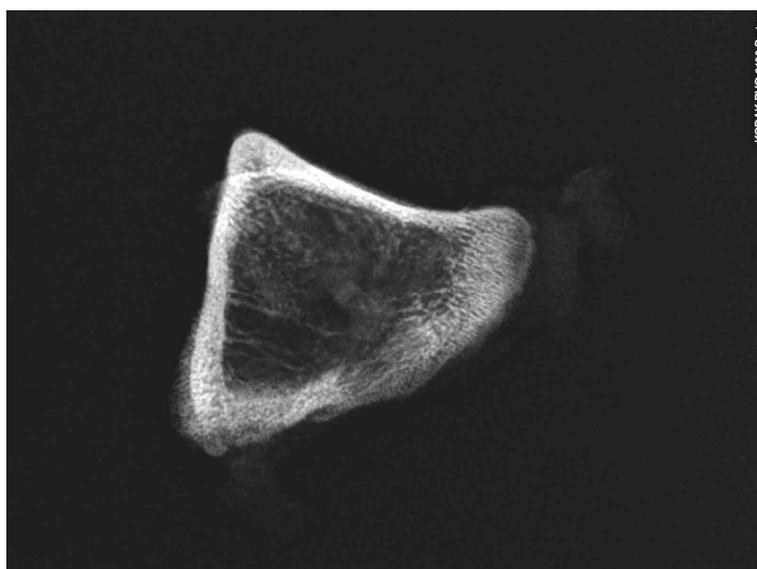


Fig. 53- Corte transversal de hidroxapatita+fosfato tricalcico+colageno a los 90 días

En este período se puede observar la disminución significativa del tamaño del implante junto con una disminución importante de la densidad cálcica del mismo. También se aprecia un aumento de las irregularidades superficiales del implante en las zonas en contacto con el hueso circundante en donde se pueden apreciar líneas densas trabeculares dirigiéndose hacia el interior del implante.

4.3. Resultados Estadísticos

El análisis de la varianza de medidas repetidas si detectó diferencias significativas en los distintos tiempos de implantación para los defectos alveolares.

Tiempo de sacrificio (I)	Diferencias entre medidas (I-J)	Error Típico	Significación
30 días	-7,558*	1,279	0,005
	-23,543*	1,279	0,005
	-30,681*	1,279	0,005
60 días	7,558*	1,279	0,005
	-12,030*	1,279	0,005
	-23,123*	1,279	0,005
90 días	30,681*	1,279	0,005
	23,123*	1,279	0,005
	9,063*	1,279	0,005

Tabla 3: Comparaciones múltiples entre los distintos periodos de experimentación en relación a la variable hueso neoformado.

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre las medias de los periodos de experimentación cuando los comparamos por

pares. El análisis de la varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas entre los tiempos de implantación del biomaterial.

Tiempo de sacrificio	Material (I)	Materia(J)	Diferencia entre (I-J)	Error Típico	Significación
30 días	HA 60%	B-TCP20% COLAGENO 20%	-4,463*	1,329	0,006
		Control	-63,625*	2,053	0,005*
	HA 50 %	B-TCP 20% COLAGENO 30%	4,463*	1,329	0,006
		Control	-57,163*	1,919	0,005*
	HA 40 %	B-TCP20% COLAGENO 20%	61,625*	2,053	0,005*
			57,163*	1,919	0,005*

Tabla 4: Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable hueso neoformado.

Para la variable de hueso neoformado a los 15 días existen diferencias significativas entre el Control . La diferencia entre HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%, fue la mas significativa en este primer periodo, siendo mejor el comportamiento del HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %,

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre el comportamiento de todos los injertos Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%, entre los cuales no existían diferencias significativas para este periodo. El Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, mejora la regeneración ósea y estimula la neoformación.

Para la variable de hueso neoformado a los 30 días existen diferencias significativas entre el Control, Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, y el Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%, . Así mismo en este periodo no existen diferencias significativas entre d Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, . Aunque el Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, se ve mejorado.

Tiempo de sacrificio	Material (I)	Materia(J)	Diferencia entre (I-J)	Error Típico	Significación
45 días	HA 60%	B-TCP20% COLAGENO 20%	3,118	1,329	0,037
		Control	-19,713	2,053	0,005
	HA 50 %	B-TCP 20% COLAGENO 30%	3,118*	1,329	0,037
		Control	-22,830	1,919	0,005*
	HA 40 %	B-TCP20% COLAGENO 20%	19,713*	2,053	0,005*
		Control	22,830*	1,919	0,005

Tabla 5 . Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable de los defectos óseos.

En el análisis de comparaciones múltiples se detectaron diferencias significativas entre el comportamiento de todos los injertos, a excepción del control, para los cuales la diferencia de las medias no resultó significativa.

Para la variable de hueso neoformado a los 45 días existen diferencias significativas entre el Control, entre Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, . Estos últimos presentan diferencias significativas en este periodo resultando mejor el comportamiento del Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,

Tiempo de sacrificio	Material (I)	Materia(J)	Diferencia entre (I-J)	Error Típico	Significación
60 días	HA 60%	B-TCP20% COLAGENO 20%	1,093	1,329	0,427
		Control	-5,953*	2,053	0,013
	HA 50 %	B-TCP 20% COLAGENO 30%	-1,093	1,329	0,427
		Control	-7,045*	1,919	0,003
	HA 40 %	B-TCP20%	5,593*	2,053	0,013
		COLAGENO 20%	7,045*	1,919	0,003

Tabla. 6- Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable de los defectos óseos.

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre el Ha 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 % con respecto al Control.

Para la variable de hueso neoformado a los 60 días existen diferencias significativas entre el control, HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%, , pero no existen diferencias significativas entre el HA 60 % B-Tcp 20% Colágeno 20 %, Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%,

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Tiempo de sacrificio	Material	Biomaterial Media± SD	Hueso neoformado Media± SD	Tejido conectivo Media± SD
15 días	HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	39,49±1,06	25,86±3,31	34,65±3,60
	HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %,	49,19± 0,22	30,32±4,18	19,49±3,91
	Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%	44,16 ± 0,11	29,54±1,33	22,16±0,78
30días	HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	24,76± 1.87*	40,14± 2,74*	35,10 ± 0,76*
	HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %,	27,18 ± 0,66*	42,62± 2,23*	30,20± 0,78*
	Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%		15,88± 2,02*	84,12 ± 2,75*

45 días	HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	12,74±0,31*	71,59± 5,66*	15,67± 0,31*
	HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %,	14,09± 2,19	74,71 ±2,23*	11,20± 2,19
	Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%	18,01± 1.12	33,05± 1,45*	35,87± 1,55*
60 días	HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	4,97±1,08*	90,96 ± 0,62*	4.07 ±1,08*
	HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %,	2,08± 0,54	92,05±1,14	5,87± 0,54
	Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%			
	HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	22,01± 1.12	30.87 ± 1,43	59,93 ±1,25*

*Estadísticamente significativo respecto al control $p < 0,05$.

Tabla. 7- % Media-DS de las variables hueso neoformado, tejido conectivo y porcentaje de biomaterial presente en el alveolo para cada uno de los grupos experimentales.

4.3.2. Porcentaje del Grosor de hueso Neoformado

GRUPO I (15 días): En relación a esta variable destaca el mejor comportamiento del HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, porcentaje del 30,32% que supera al 25,86% Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%,

GRUPO II (30 días): Durante este periodo el Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%, 42,62% y HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, 40,14%, entre no existen diferencias significativas de formación ósea para este periodo.

GRUPO III (45 días): Para este periodo HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, con un 74,71% presenta mejores resultados que HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, con un 71,59%.

Grupo IV (60 días): En este periodo las diferencias entre el HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, con un 92,05% y HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, 90,96%, los cuales obtienen porcentajes similares en relación a la variable de hueso neoformado.

Con estos resultados obtenidos podemos llegar a la conclusión que el HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, empleado como material relleno sin estar acompañado de membrana sufre una más lenta y menor reabsorción, mientras que cuando combinamos al HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %, la reabsorción observada es mayor pero al mismo tiempo también se puede apreciar una mayor neoformación ósea.

4. 4. Microscopía electrónica de barrido

En este apartado hemos querido estudiar las proporciones de cuatro elementos químicos presentes en el tejido óseo, como son el Calcio (Ca), el Fósforo (P), el Oxígeno (O) y el Carbono (C), para poder analizar la respuesta ósea en los cuatro períodos de tiempo establecidos, 15, 30, 45 y 60 días, en tibia de conejo comparando los alvéolos con material óseo implantado con respecto al control.

Los elementos **Calcio** y **Fósforo**, son potenciadores de la formación ósea, luego, cuanta más cantidad de Ca y P aparezca en las muestras más neoformación ósea (turned over) habremos encontrado. En definitiva son determinantes de la cantidad de hueso nuevo.

El **Oxígeno** nos va a determinar la capacidad de respuesta celular por parte de los osteoblastos. Cuanto más O se observe en las muestras más actividad osteoblástica.

El **Carbono** está incluido en el método de tinción de las muestras. En este caso no será relevante pero de igual modo exponemos su resultado.

Si en nuestras muestras, por ejemplo, obtuviéramos un bajo porcentaje de Ca y de P ese resultado nos estaría indicando que en esa muestra hay hueso inmaduro.

A continuación presentaremos los resultados de las muestras obtenidas a los 15, 30, 45 y 60 días de alvéolos para poder apreciar las diferencias de neoformación ósea entre ellos.

RESULTADOS A LOS 15 DÍAS

Materiales	Elementos			
	Ca	P	O	C
Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%,	10,05±2,76%	11,20±5,46%	25,12±11,63%	43,17±0,16%
HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %,	17,07±0,76%	12,30±6,98%	27,12±6,84%	43,30±0,61%
HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	20,32±4,72%	16,11±6,75%	28,65±11,09%	43,20±3,82%

Tabla 8-. Media y desviación típica de los elementos Ca, P, O y C a los 15 días, en. Ca:

Calcio, P: Fósforo, O: Oxígeno y C: Carbono.

RESULTADOS 30 DIAS

Materiales	Elementos			
	Ca	P	O	C
Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%,	13,48±2,76%	14,76±5,46%	28,10±11,63%	46,17±0,16%
HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 %,	16,66±0,76%	13,26±6,98%	23,55±6,84%	46,51±0,61%
HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	18,32±4,72%	17,11±6,75%	27,82±11,09%	46,49±3,82%

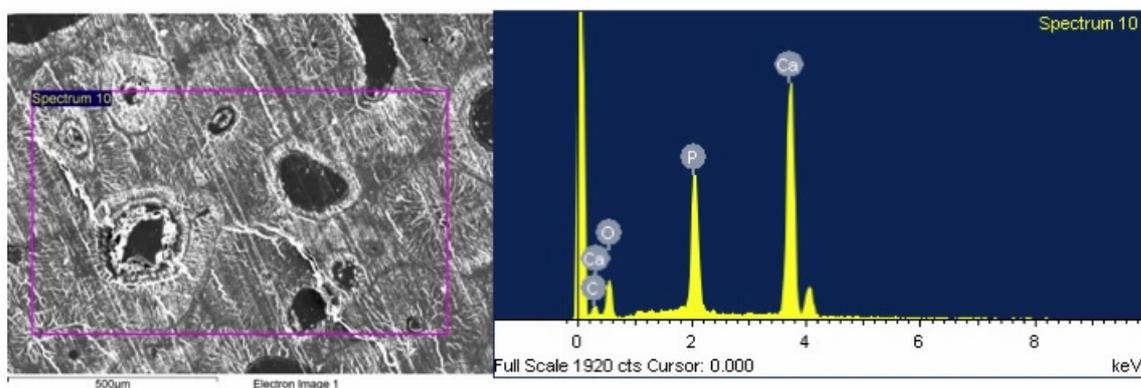
Tabla 9-. Media y desviación típica de los elementos Ca, P, O y C a los 30 días, en. Ca:

Calcio, P: Fósforo, O: Oxígeno y C: Carbono

RESULTADOS 45 DIAS TIBIAS

Materiales	Elementos			
	Ca	P	O	C
Ha 40 % B- Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%,	21,17±6,47%	12,08±6,69%	32,79±0,97%	33,85±12,95%
HA 50 % B- Tcp 20% Colágeno 30 %,	24,63±2,07%	10,95±1,21%	40,72±1,38%	35,08±18,02%
HA 60 % B- Tcp 20% Y Colageno 20%,	25,27±11,66%	10,61±2,37%	34,77±1,87%	33,95±18,69%

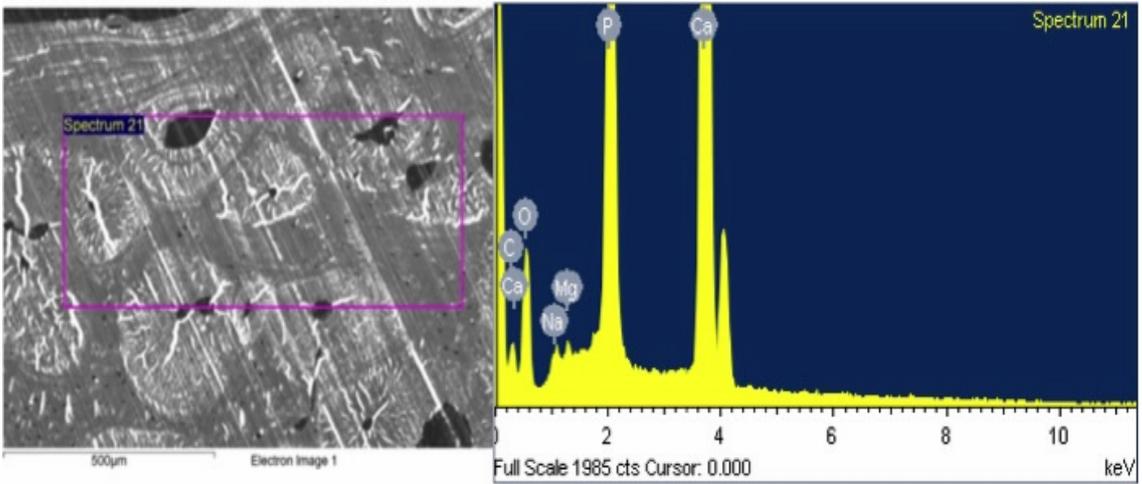
Tabla 10-. Porcentaje y desviación típica de los cuatro elementos Ca, P, O y C a los 45 días en las tres perforaciones óseas . Ca: Calcio, P: Fósforo, O: Oxígeno y C: Carbono.



RESULTADOS 60 DIAS

Materiales	Elementos			
	Ca	P	O	C
Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%, Colageno 30%,	23,01±4,21%	10,35±2,20%	31,76±1,51%	34,76±7,79%
HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30%,	29,83±2,46%	12,67±0,75%	33,54±3,29%	23,32±7,16%
HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%,	25,55±8,93%	11,38±0,25%	32,96±1,54%	31,43±9,52%

Tabla .11- Porcentaje y desviación típica de los cuatro elementos Ca, P, O y C a los 60 días, en las tres perforaciones óseas . Ca: Calcio, P: Fósforo, O: Oxígeno y C: Carbono.



5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la actualidad, los problemas de regeneración ósea ocupan un lugar importante en la práctica clínica. El objetivo de una atención implantológica avanzada sería una osteointegración rápida y cualitativa que nos permita la carga del implante en el menor tiempo posible.

El desarrollo de los materiales es importante para mejorar el proceso de la regeneración ósea. Esto ha dado lugar en los últimos años, a un gran número de investigaciones in vivo e in vitro, con el fin de determinar si un material nuevo se ajusta a los requisitos de seguridad, estabilidad mecánica y biocompatibilidad. Los resultados de los estudios in vitro pueden ser difíciles de extrapolar a la situación in vivo. Por esta razón, el uso de modelos animales, a menudo, es un paso esencial en la prueba de biomateriales dentales antes de su uso clínico en los seres humanos. Un modelo animal es un procedimiento realizado sobre un animal de experimentación concreto, que reproduce una enfermedad o sus procesos, de manera más o menos parecida al humano, para permitir su conocimiento o abordaje mediante diferentes técnicas terapéuticas, y se utiliza para el conocimiento de las bases fisiológicas y anatómicas de un determinado proceso o enfermedad.

Para nuestro estudio, elegimos el conejo albino de Nueva Zelanda como modelo.

La utilización de modelos animales, como perro, oveja, cabra, cerdo y conejo, para la evaluación de las interacciones implante-hueso es bastante frecuente. A la hora de elegir uno u otro modelo, se examinan diversas características específicas como la macroestructura o la composición de la microestructura del hueso, con el fin de hallar la mayor similitud entre el modelo animal y la

situación clínica humana que representa. Aunque el conejo es la especie más utilizada, no es la que muestra más similitud con el hueso humano. Así, por ejemplo, el hueso del cerdo muestra mayor semejanza con los huesos humanos, pero pueden plantearse grandes dificultades en relación con su tamaño y su dificultad de manejo. A este respecto, con el perro, la oveja y la cabra, se han obtenido mejores resultados para la experimentación con implantes que para los biomateriales.

Mientras que ninguna especie cumpla todos los requisitos de un modelo ideal, se debe procurar que la selección de la especie sea la más adecuada para cada investigación.⁷⁵ El empleo del conejo como animal de experimentación está ampliamente aceptado, debido a que involucra costes razonables, requiere una infraestructura que generalmente se encuentra disponible en los laboratorios de cirugía experimental y su intervención y manipulación resulta sencilla.

El hueso cuando es dañado es capaz de regenerarse por sí sólo exactamente igual al original, no obstante en pérdidas mayores de tejido óseo se hace necesario recurrir a sustitutos óseos.

La variedad de aplicaciones clínicas y la abundancia de sustitutos óseos junto con la continua aprobación de nuevos productos, hacen que sea difícil la elección del material de relleno óseo adecuado a cada indicación clínica.

De ahí que se sigan realizando numerosos estudios porque son necesarios para profundizar en problemas, como la pseudoartrosis, la resección de tumores, osteomielitis y la pérdida ósea traumática, en la cirugía ortopédica y traumatológica.

Ya que la selección adecuada de un material de relleno óseo se realiza de acuerdo al problema y al tipo de procedimiento quirúrgico, al tamaño del defecto óseo, la localización y las condiciones iniciales del mismo.

Nos damos cuenta que a pesar de la gran cantidad de investigaciones en biomateriales, no existe un sustituto óseo ideal y que cualquier biomaterial tiene sus ventajas y sus inconvenientes.

Los injertos óseos autólogos, normalmente de cresta ilíaca son el tratamiento de elección, (Cornell et al. 1991; Le Guehennec et al. 2004; Jones et al. 2005; Leupold et al. 2006) ya que es osteogénico, osteoconductor y osteoinductor.

Sin embargo la principal desventaja son las complicaciones en zonas donantes y la limitada cantidad de hueso.(Leupold 2006).

Como alternativa, aparecen los aloinjertos son más fáciles de obtener y no poseen tantas complicaciones postoperatorias como los autoinjertos, pero se teme por la transmisión de enfermedades infecciosas. (Stevenson y Horowitz, 1992),(Bauer, T.W. y Muschler, G.F. 2000).

Otra de las desventajas adicionales en comparación con el hueso autólogo es el retraso en la vascularización.

El rápido desarrollo de materiales totalmente sintéticos durante las últimas décadas ha sido parcialmente alentadora y en parte decepcionante.

Las limitaciones de nuestro propio hueso han llevado al desarrollo de injertos de hueso sintético (Stevenson y Horowitz 1992), (Baner y Muschler 2000; Leupold et al. 2006).

Principalmente los corales naturales, algas, sustancia ósea desmineralizada y fosfato cálcico. Todos estos materiales son biocompatibles, biodegradables y osteoconductivos (Le Guehennec et al. 2004).

Los sustitutivos sintéticos como la HA, TCP y β - TCP tienen una excelente biocompatibilidad y son una alternativa muy buena al hueso autólogo

(Tadic y Eppel. 2004).

Diversos estudios realizados difieren sobre la solubilidad o velocidad de disolución en medios ácidos (Le Guehenec et al. 2004).

En términos generales, los β - TCP son más rápidos en cuanto a la degradación que la HA y β - TCP combinados (Bodde et al. 2007).

Trabajos realizados por Tadic y sus colaboradores demostraron que BGS sintético con un contenido principalmente β - TCP tiene una estabilidad mecánica inferior que los que contienen HA (Tadic y Eppel, 2004). Por lo tanto, una combinación de HA y β - TCP tiene mayor estabilidad y baja degradación que β - TCP sólo.

A partir de todos estos datos los autores concluyen que el β - TCP y HA son materiales de elección para injertos óseos. Otra propiedad de este material es su capacidad osteoconductora.

La hidroxiapatita se utiliza cada vez más durante la década de 1980, no por su buena histocompatibilidad sino por su remodelación ósea.

El crecimiento interno de tejido óseo se ha detectado sólo en la interfase de contacto directo con el hueso nativo, mientras que más distantes aparecen gránulos de tejido conectivo, independientemente de la hidroxiapatita aplicada. Estos gránulos muestran retraso o falta de reabsorción lo que provoca una inflamación.

Los últimos materiales que contienen tricalciofosfato muestran una reabsorción más favorable en comparación con los materiales que poseen hidroxiapatita.

Por lo tanto el criterio para elegir un biomaterial u otro dependerá del comportamiento del mismo respecto a su reabsorción, osteoconducción, remodelación ósea y su histocompatibilidad.

El estudio realizado que hemos realizado ha confirmado la biocompatibilidad del material ya que se ha observado la existencia de respuesta inflamatoria poco relevante, sólo más aumentada en el primer periodo, lo cual puede ser debido a la agresión que supone la perforación ósea y la colocación del relleno óseo. También se confirma su osteointegración ya que había poca cantidad de macrófagos y linfocitos y no había presencia de fibrosis entre el tejido óseo implantado y el hueso huésped.

Por otro lado las radiografías demuestran la existencia de un fenómeno de reabsorción progresiva, un mecanismo de fagocitosis celular a través de macrófagos que se observan en la periferia del tejido óseo. Microscópicamente destacaba la existencia de una reacción inflamatoria leve caracterizada por macrófagos y linfocitos dispuestos de forma dispersa sin formar granulomas.

Otro de los principales factores que influyen en la osteoconducción es el tamaño de gránulo del biomaterial.

Se ha comprobado en diversos estudios (Le Guehennec et al. 2004) que el microporo con un diámetro de menos de 10 μm permite la circulación de fluido dando lugar a la disolución y la degradación del biomaterial. El macroporo con un diámetro de más de 100 μm actúa como andamio para células óseas lo que permite el crecimiento óseo.

A esto es a lo que se debe el éxito de nuestro material, el cual se disuelve poco a poco en el cuerpo, el calcio y la liberación de iones fosfato provoca saturaciones de fluidos corporales y precipita una apatita biológica sobre la

superficie cerámica. Esta capa de apatita sirve como sustrato para las células formadoras de hueso (osteoblastos), proporcionando tanto un contacto íntimo entre hueso e implante y el crecimiento interno del tejido óseo a lo largo de la superficie del implante (osteoconducción). La macroporosidad hace la colonización ósea posible en el centro de la cerámica, mientras que la microporosidad promueve la mineralización, adsorción de proteínas y células adherencia.

Otro estudio en el que se realizó la comparación del (hidroxiapatita y de b-TCP) con otros materiales bifásicos como (b-TCP y el CaP bifásico) en ovejas a las 3, 12 y 26 semanas, resultó ser mayor la degradación del b-TCP en relación con CaP que el b-TCP y la hidroxiapatita, que no se degradó nada.

La diferencia más notable del estudio entre los dos materiales cerámicos fue su comportamiento de degradación.

Varias son las vías que están implicadas en la degradación de la cerámica CaP; el material puede ser físicamente desintegrado, químicamente disuelto o reabsorbido por la actividad celular.

La reabsorción celular está basada en la fragmentación del material o disolución. Pequeños fragmentos de cerámica pueden ser fagocitados, mientras que células gigantes multinucleadas se unen a los fragmentos más grandes e inician la disolución extracelular en un microambiente muy ácido, causado por la secreción de productos. En dicho proceso se ven implicadas células como los macrófagos y los osteoclastos. Los macrófagos se encargan de la fagocitosis mientras que los osteoclastos de la reabsorción celular.

En dicho estudio se pudo observar que pasadas las 26 semanas de la implantación del material de relleno semejante al Ossceram (60% de hidroxiapatita y 40% de b-TCP) pero a otras proporciones(75% de hidroxiapatita y un 25% de b-TCP), no se degradó, mientras que el b-TCP material empleado mostraba una clara degradación, de acuerdo con los estudios realizados por (Yamada et al, 1999). Su hipótesis se debe a que la actividad de los osteoclastos de reabsorber el material depende de la solubilidad del material cerámico empleado, y en este caso la hidroxiapatita es un componente estable y por lo tanto insoluble.

En dicho estudio se pudo llegar a la conclusión que la incorporación del b- TCP al material de relleno produciría una mayor solubilidad del material. Pero no se observó así, por lo que podemos llegar a pensar que la solubilidad del material no solo depende de su composición química sino también de otros parámetros como la temperatura de la superficie ósea.

Por lo tanto el material más idóneo sería un material que tuviese una concentración más baja de hidroxiapatita y más alta de b-TCP para una mejor degradación del producto.

La regeneración, la remodelación del hueso depende del defecto óseo inicial y de la manipulación del mismo. Por lo cual un material de relleno que se usa para ayudar al cierre del defecto óseo puede causar una interferencia en la remodelación ósea, por lo tanto el biomaterial empleado debe ser biodegradable, no solo poco a poco desaparecer, si no que también permita el cierre del defecto óseo sin causar interferencias en su cicatrización.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El biomaterial de origen sintético **HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%**, puede ser considerado como un material, biodegradable, biocompatible y osteoconductor para la regeneración de defectos óseos a los 60 días del estudio comparado con los demás materiales testados.
2. Todos los materiales testados **HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%**, **HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 % y Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%**, **Colageno 30%**, se reabsorben debido a sus propiedades osteogénicas en el examen radiológico comparados con el control a los 60 días de seguimiento.
3. Todos los materiales testados **HA 60 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%**, **HA 50 % B-Tcp 20% Colágeno 30 % y Ha 40 % B-Tcp 20% Y Colageno 20%**, **Colageno 30%** criterios de: biocompatibilidad, degradación, osteointegración y estabilidad de volumen durante el tiempo de estudio.

7. BIBLIOGRAFIA

Anitua E. Reparación versus regeneración. En: Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Vitoria-España: Puesta al día Publicaciones, S.L., 2000; p. 37-46.

Arteaga H. Regeneración ósea guiada en implantes oseointegrados con injerto óseo autólogo y membrana de politetrafluoretileno expandido. Revista ADM; LVII(5) (2000):165-174.

Aubin JE and Triffitt JT. Mesenchymal cells and osteoblast differentiation, Principles Bone Biol 1 (2002) 59-81.

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. J Bone Miner Res 1993;8:565-72

Bascones A, Cano J, Campo J, Chiapasco M. Distracción Alveolar Osteogénica aplicada a la implantología oral. Ediciones Avance SL. Madrid, 2007.

Barber HD, Lignelli J, Smith BM and Bartee BK. Using a dense PTFE membrane without primary closure to achieve bone and tissue regeneration. J Oral Maxillofac Surg 2007, 65: 748-742

Bartee BK. The use of high-density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: Clinical reports. implant Dent 1995, 4: 21

Bartee BK. Evaluation of new polytetrafluoroethylene-guided tissue regeneration membrane in healing extraction sites. *Compenium*. 1998. 19:1256.

Bauer, T.W. & Muschler, G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2000; 371: 10–27.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofacial Surg* 1998; 9: 310-316

Bodde, E.W., Wolke, J.G., Kowalski, R.S. & Jansen, J.A. Bone regeneration of porous betatricalcium phosphate (conduit tcp) and of biphasic calcium phosphate ceramic (biosel) in trabecular defects in sheep. *Journal of Biomedical Material Research Part A* 2007; 82A: 711–722.

Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P.

Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* 1999; 24: 579-589.

Buser D, Dahlin C, Shenk RK (Eds): Guided bone regeneration in Implant dentistry. Quintessence Publishing. Berlin, Chicago, Tokyo 1994.

Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK.

Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. Clin Oral Implants Res. 1998; 9:137-50.

Caja V, Moroni A, Chao EYS. Osteointegración de implantes porosos recubiertos con hidroxiapatita. Estudio experimental. Rev Ortop Traum 1992; 36: 104-109.

Castellani C, Zaroni G, Tangl S, van Griensven M, Redl H. Biphasic calcium phosphate ceramics in small bone defects: potential influence of carrier substances and bone marrow on bone regeneration. Clin. Oral Impl. Res. 20, 2009; 1367–1374.

Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. Endocrinol Metab Clin North Am 1989;18:903-18.

Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. Endocr Rev 2003;24:218-35.

Cancian DC, Hochuli -Viera E, Marcantonio RA, Garcia Junior IR. Utilización of autogenous bone, bioactive glasses and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in Cebus paella monkeys. Int J Oral Maxillofac Implants 2004; 19: 73-79.

Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1993; 55:131-53.

Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 2001; 81: 419-47.

Cornell, C.N., Lane, J.M., Chapman, M., Merkow, R., Seligson, D., Henry, S., Gustilo, R. & Vincent, K. Multicenter trial of collagraft as bone graft substitute. *Journal of Orthopaedic Trauma* 1991; 5: 1–8.

Daculsi G, Legeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate–apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int* 1990;46:20 –27.

Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*, 2003;14:195-200.

Dahlin C, Sennerby L, Lekholm. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1989; 4: 19-25.

Dahners LE, Jacobs RR, Kliethermes JL, Wetzel LH, Rhoades CE. A comparison of grafting materials in experimental bone grafts. *Orthopedics* 1984; 7: 984-988.

Dupoirieux D, Pouquier MC and Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 58-62.

Fan H, Ikoma T, Tanaka J, Zhang X. Surface structural biomimetics and the osteoinduction of calcium phosphate biomaterials. *Nanosci-Nanotechnol*, 2007;7:808-13.

Favero GA. Membrane riassorbibili in implantologia. In: Favero GA, Simion M, Piatelli A (eds). *Rigenerazione guidata dei tessuti e osteointegrazione*. Bologna: Martina, 1996; 101-104.

Fernández -Tresguerres I, Alobera MA, Del Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: 47-51.

Fernández -Tresguerres I, Alobera MA, Del Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: 151-157.

Fleisher N, de Waal H, Bloom H. Regeneration of lost attachment in the dog using vicryl absorbable mesh (Polyglactin 910). *Int J Periodont Rest Dent* 1988; 8: 45-55.

Galian Cánovas A. Respuesta biológica del hueso al compuesto Hidroxiapatita-Colágeno. Estudio morfológico y ultraestructural (Tesis Doctoral), Universidad de Murcia, 1995.

Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998;19:133–139.

Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of calcium–phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 1999;47:28 –35

Gómez Barrera E, Rodríguez Macías MJ. Recubrimiento de hidroxiapatita. En: Vallet M, Munuera L, editor. *Biomateriales: aquí y ahora*. Madrid: Dykinson SL, 2000; p. 97-106.

González R., Rodríguez FJ, Naval L, Muñoz MF, Satre S, Díaz FJ. Mandibular odontogenic myxoma. Reconstructive considerations by means of the vascularized free flap. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: 531-9.

Gotfredsen K, Nimb L, Hjorting-Hansen E. Immediate placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforced with

polyglactin 910. An experimental study in dogs. Clin Oral Impl Res 1994; 5: 3-91.

Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non bioresorbable devices: initial healing and long-term results. J Periodontol 1993; 64: 1157-65.

Gottlow J, Laurell L, Lundgren D. Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device: a longitudinal study in monkeys. Int J Periodont Rest Dent 1994; 14: 437-449

Grant SFA, Ralston SH. Genes and osteoporosis. Endocrinology 1997;8:232-9.

Hämerle CH, Karring T. Guide bone regeneration at oral implant sites. Periodontology 2000 1998; 17: 151-175.

Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissue. J Bone Joint Surg Am 1952;34:701.

Harvey S, Hull KL. Growth hormone: A paracrine growth factor? Endocrine 1998;7:267-79.

Harkness JE, Warner JE. Biología y manejo. En: Biología y clínica de conejos y roedores. Zaragoza: Acribia, 1980; p. 43-50.

Horowitz M. Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblasts function and bone formation. *Calcif Tissue Int* 2003;72:5-7.

Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology* 1995;136:124-31.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367-70.

Hutmacher D, Hurzeler MB and Schliep. hake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Max Impl* 1996; 11: 667-668

Ikeda N, Kawanabe K, Nakamura T. Quantitative comparison of osteoconduction of porous, dense A-W glass-ceramic and hydroxyapatite granules (effects of granule and pore sizes). *Biomaterials* 1999; 20: 1087-95.

Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics.

Clin Orthop 1981; 157: 259-78.

Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. Clin Oral Implants Res. 2007; 18:752-60

Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008.

Jódar Gimeno E, Muñoz-Torres M, Escobar-Jiménez F, Quesada Charneco M, Luna del Castillo JD, Olea N. Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hypertiroidism: Role of biological markers of bone turn-over. Calcif Tissue Int 1997;61:370-6.

Jones, S., Batchelor, M., Bhelt, D., Clarke, A.R., Collinge, J. & Jackson, G.S. Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. Biochemical Journal 2005; 392: 309–312.

Jun YK, Kim WH, Kweon OK, Hong SH. The fabrication and biochemical evaluation of alumina reinforced calcium phosphate porous implants. Biomaterials 2003; 24: 3731-3739.

Kasperk C, Ewrrers R, Simmons B et al. Hidroxiapatita derivada de algas (ficógena). Un estudio histológico comparativo. Avances de Periodoncia 1990; 2: 103-110.

Lax A. Respuesta ósea al implante de espuma de hidroxiapatita: estudio experimental en conejos (Tesis Doctoral), Universidad de Murcia, 2004.

Le Guehennec L, Goyenvalle E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, Daculsi G, Layroll P. Small- animal Models for Testing MacroporousCeramic Bone Substitutes 2004.

Leghissa GC, Boticelli A, Zaffe D. GBR in cirugía impiantare immediata post-estrattiva. Dent. Cadmos 2000; 3: 37-45.

Lekholm U, Becker W & Dahlin C. The rol of early versus late removal of GTAM membranes on bone formation at oral implants placed into immediate extraction sockets: An experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res 1993, 4: 121

Leupold, J.A., Barfield, W.R., An, Y.H. & Hartsock, L.A. A comparison of proosteon, DBX, and collagraft in a rabbitmodel. Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials 2006; 79B: 292–297.

Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger

C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors.

APMIS 1995;103:140-6.

Lukert BP, Kream BE. Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in

bone. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology.

San Diego, California: Academic Press;1996.p.533-48

Lundgren D, Sennerby L, Falk. The use of a new bioresorbable

barrier for guided bone regeneration in connection with implant

installation. Case report. Clin Oral Imp Res 1994; 5: 177-84.

Katthagen BD, Mittelmeier H. Experimental animal investigation of

bone regeneration with collagen-apatite. Arch Orthop Trauma Surg 1984;

103: 291-302.

Kawaguchi H, Pilbean CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins

in the regulation of bone metabolism. Clin Orthop 1995;313:36-46.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms

and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr

Rev 2000;21:115-37.

Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast

differentiation. Gene 2003;316:23-32.

McAllister BS, Haghghat K. Bone augmentation techniques. J

Periodontol 2007; 78: 377-396.

McKinney RV. Implantes dentales endoóseos. Ed. Mosby.1993.

Meseguer Olmo L. Estudio morfológico de la respuesta ósea

inducida por la cerámica beta fosfato tricálcico y el composite beta fosfato tricálcico y colágeno. Modelo experimental en conejo. (Tesis Doctoral),

Murcia, Universidad de Murcia, 1993

Misch CE. Divisions of Available Bone. En: Contemporary Implant

Dentistry 1ª Ed. España: Elsevier-Mosby 2006; p.89-108..

Morey ER, Baylink JJ. Inhibition of bone formation during space flight. Science 1978;19:172-6.

Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. Clin Orthop 1991;263:30-48.

Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effects of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. Bone 1994;15:203-8.

Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. J Periodontol 1993;64:432-44.

Ono K, Yamamuro T, Nakamura, T. Quantitative study on

osteoconduction of apatite-wollstonite containing glass ceramic granules,

hydroxyapatite granules, and alumina granules. *Biomaterials* 1990; 11: 265-71.

Pardo Zamora G. Respuesta biológica de un implante de hidroxiapatita y colágeno de origen porcino: Estudio experimental en conejos de Nueva Zelanda a 15 meses.(Tesis Doctoral). Universidad de Murcia , 2006.

Pettis GY, Leonard BK, Glowacki J. Tissue reponse to composite ceramic hidroxyapatite, demineralised bone implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 48: 1068-1074.

Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrock PN, Ebery S. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest* 1987;80:706-10.

Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología Humana*, 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1999.p.979-93.

Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993;8:457-65.

Ramirez Fernandez MP. Modelo experimental de la respuesta ósea a implantes y melatonina. Estudio radiológico e histomorfométrico.(Tesis Doctoral). Universidad de Murcia, 2009.

Rivera-Munoz E, Diaz JR, Rogelio Rodriguez J, Brostow W, Castano VM. Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: processing and characterization. J Mater Sci Mater Med, 2001; 12:305-11.

Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. J Clin Invest 1992;89:46-52.

Tadic, D. & Epple, M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphatebased bone substitution materials in comparison to natural bone. Biomaterials 2004; 25: 987–994.

Trueta J. The role of blood vessels in osteogenesis. J Bone Joint Surg Br 1963;45:402.

Saller U, Holste J. Ethisorb - ein neues resorbierbares Implantat für die Chirurgie. Ethicon OP Forum 1991; 148: 1-15

Sandenberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by osteopromotion technique using bioabsorbable membranes. An experimental study in rats. J Oral Maxillofac Surg 1993; 51: 1106-1114.

Sánchez MA, Berini L, Gay-Escoda C. Los diferentes tipos de hidroxiapatitas y sus aplicaciones en cirugía bucal. Avances en Odontoestomatología, 1993; 34, 1085-90.

Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. Horm Res 1997;48:50-9.

Shapoff CA, Alexander DC, Clark AE. Clinical use of bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. Compendium 1997; 18(4): 352-363.

Smiler DG, Jonson PW, Lozada JL. Injertos para elevación sinusal e implantes endoóseos. Clin Odontol North Am1992; 1: 155-92.

Spiekerman H. Atlas de implantología. Ed Masson, Madrid, 2001.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Fate of bone formed by guided tissue regeneration with or without grafting of Bio-Oss or Biogran. An experimental study in the rat. J Clin Periodontol 2004; 31(1): 30-39.

Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, Nomura S and Maeda T. A histologica evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. J Biomaterials 2005; 26: 6158-6166.

Trecant M, Delecrin J, Royer J, Goyenvalle E, Daculsi G.

Mechanical changes in macroporous calcium phosphate ceramics after implantation in bone. Clin Mater 1994;15:233–240.

Úbeda García F. Respuesta ósea a implantes del compuesto "fosfato tricálcico/colágena" en defectos óseos segmentarios. Estudio experimental en ratas (Tesis Doctoral), Universidad de Murcia, 1994.

Vanden Bogaerde L, Esposito M. Treatment of localized gingival recessions using a bioresorbable membrane: a case report. Int J Periodont Rest Dent 1997; 17:547-51.

Vanden Bogaerde L. Rigenerazione ossea guidata con membrane riassorbibili. Dental Cadmos 2000; 4: 37- 38.

Voza I, Scarano A, Quaranta M. Studio clinico e istologico sul rialzo di seno mascellare e suo riempimento con osso sterile suino collagenato. Italian Journal of Osseointegration 2004; 4(1): 19-23.

Walsh WR, Chapman-Sheath PJ, Cain S, Debes J, Bruce WJ, Svehla MJ, et al. A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. J Orthop Res 2003; 21: 655-61.

Wenz B, Oesch B, Horts M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from

bovine bone. *Biomaterials* 2001; 22: 1599-1606.

Wiltfang J, Merten HA, Peters JH. Comparative study of guided bone regeneration using absorbable and permanent barrier membranes: a histologic report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13: 416-421

Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res.* 2002;63:115-21.

Winter M, Griss P, De Groot K, Tagai H, Heimke G, Sawai K. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1981; 2: 159-61.

Wolf L. New clinical materials and techniques in guided tissue regeneration. *International dental journal*(2000) ; 50: 235-244

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.

Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int* 2003;72:2-4.

Yunkna RA. HTR polymer grafts in human periodontal osseous defects I. 6- month clinical results. *J Periodontol* 1990; 61: 633-642

ABREVIATURAS

BMP: Proteínas Morfogenéticas

BMPs: Proteínas morfogénicas ósea

BMP-2: Proteína morfogenética ósea -2

BMU: Unidad Multicelular Básica

Cbfa1: Factores críticos para la osteoblastogénesis.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

GBR: Regeneración ósea Guiada

GH: Hormona somatotropa

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

GTR: Regeneración Tisular Guiada

HA: Hidroxiapatita

H-E: Hematoxilina-eosina

IGF-I: Factor análogo a la insulina I

IGF-II: Factor análogo a la insulina II

IL-1: Interleuquina 1

IL-1 α : Interleuquina 1 alfa

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

IL-6: Interleuquina 6

IL-11: Interleuquina 11

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos.

MMP: Metaloproteasa de la matriz

OPG: osteoprotegerina, proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaqueta.

PG: Prostaglandinas

PGA: Ácido Pologlicólico

PGE₁: Prostaglandina E 1

PGE₂: Prostaglandina E 2

PGG₂: Prostaglandina G 2

PGH₂: Prostaglandina H 2

PGI₂ : Prostaglandina I 2

PICP: Prolcolageno tipo I

PLA: Ácido Poliláctico

d- PTFE: Membrana no Reabsorbible de Politetrafluoruroetileno denso.

e- PTFE: Membranas no Reabsorbibles (GORE- TeX) Teflón

RGO: Regeneración Ósea Guiada

TCP: Fosfato Tricálcico

TGFβ: Factor transformante del crecimiento β

TMC: Trimetileno Carbonato

TNF: Factor de necrosis tumoral

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

