

UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO: DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA,  
RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA.

TÍTULO:

**“MODELO EXPERIMENTAL DE LA RESPUESTA  
ÓSEA A IMPLANTES Y MELATONINA: ESTUDIO  
RADIOLÓGICO E HISTOMORFOMÉTRICO”**

M<sup>a</sup> Piedad Ramírez Fernández

**2009**



## **AGRADECIMIENTOS**

A los profesores Jose Luis Calvo Guirado, Vicente Vicente Ortega y Miguel Alcaraz Baños por darme la oportunidad de aprender a investigar, por su inestimable labor como directores de esta tesis, el tiempo que me habéis dedicado y por apoyarme continuamente durante la realización de este trabajo. Gracias

Al profesor D. Manuel Canteras Jordana, Catedrático de Bioestadística, por su imprescindible colaboración en el diseño, el análisis e interpretación de los resultados.

A la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Castells del Servicio de Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia por su ayuda en el diseño del método de medida.

Al Dr. Luis Meseguer Olmo por su asesoramiento y apoyo en el método quirúrgico.

Al Dr. Guillermo Pardo Zamora, profesor y amigo, por su colaboración incondicional.

A mi compañera de doctorado Gabriela Cortez, juntas empezamos el camino, gracias por tu amistad y apoyo en momentos difíciles.

A todos mis amigos que de alguna manera formaron parte de esta tesis, Rafa, Antonio, Fara, Victor, Nuria, Carmen, Antoñina, Raquel, Vicente, Baños, gracias por vuestra colaboración.



A las niñas de mis ojos,  
mis hijas ***Gemma*** y ***Raquel***.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>pág 3</b>
<b>2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>pág 9</b>
-Fisiología del Tejido Óseo.....	pág 11
-Biología de de la Regeneración ósea.....	pág 23
-Terapéuticas de regeneración ósea.....	pág 37
-Fisiología de la Melatonina.....	pág 69
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>pág 87</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>pág 91</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	
-Grupo I.....	pág 125
-Grupo II.....	pág 143
-Grupo III.....	pág 159
-Grupo IV.....	pág 171
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>pág 187</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>pág 215</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>pág 237</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>pág 241</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig 1-</b> Fases de remodelado óseo.....	<b>pág 28</b>
<b>Fig 2-</b> Biosíntesis de la melatonina a partir del triptófano.....	<b>pág 70</b>
<b>Fig 3-</b> Vía nerviosa de la regulación de la síntesis de melatonina.....	<b>pág 73</b>
<b>Fig 4-</b> Principales mecanismos de acción de la melatonina.....	<b>pág 74</b>
<b>Fig 5-</b> Animal de experimentación-Conejos raza N.Z.....	<b>pág 91</b>
<b>Fig 6-</b> Imagen del estabulario de los animales de experimentación...	<b>pág 92</b>
<b>Fig 7-</b> Material de sustitución ósea- MP3®.....	<b>pág 93</b>
<b>Fig 8-</b> Imagen microscopía de MP3®.....	<b>pág 93</b>
<b>Fig 9-</b> Material de sustitución ósea-Endobon®.....	<b>pág 94</b>
<b>Fig 10-</b> Imagen microscopía Endobon®.....	<b>pág 94</b>
<b>Fig 11-</b> Polvo de Melatonina sigma- Aldrich <sup>TM</sup> .....	<b>pág 95</b>
<b>Fig 12-</b> Imagen de hueso autólogo.....	<b>pág 96</b>
<b>Fig 13-</b> Representación del diseño experimental.....	<b>pág 97</b>
<b>Fig 14-</b> Exposición de la zona proximal antero-interna de la tibia...	<b>pág 102</b>
<b>Fig 15-</b> Incisión quirúrgica tomando como referencia los relieves óseos proximal y distal de la tuberosidad tibial.....	<b>pág 102</b>
<b>Fig 16-</b> Desperiostización y localización de la meseta tibial anterior	<b>pág 103</b>
<b>Fig 17-</b> Marcaje con punta de grafito de la localización de los implantes.....	<b>pág 103</b>
<b>Fig 18-</b> Identificación de las zonas de implante.....	<b>pág 104</b>
<b>Fig 19-</b> Perforación con fresa trefina de 4mm. de diámetro de la cortical hasta la medular tibia derecha.....	<b>pág 104</b>
<b>Fig 20-</b> Marcaje con punta de grafito de la localización de los implantes en la tibia izquierda.....	<b>pág 105</b>
<b>Fig 21-</b> Perforación con fresa trefina de 4mm. de diámetro de la cortical hasta la medular tibia izquierda.....	<b>pág 105</b>
<b>Fig 22-</b> Gránulos de xenoinjerto de origen bovino (Endobon®).....	<b>pág 106</b>
<b>Fig 23-</b> Colocación en el 1 <sup>er</sup> defecto un xenoinjerto de origen bovino (Endobon®).....	<b>pág 106</b>
<b>Fig 24-</b> Hueso autólogo obtenido de la perforación de las corticales Óseas.....	<b>pág 107</b>
<b>Fig 25-</b> Colocación en el 2 <sup>o</sup> defecto de hueso autólogo cortical.....	<b>pág 107</b>
<b>Fig 26-</b> Imagen del 3 <sup>er</sup> defecto óseo sin cubrir actuando como control en la tibia derecha.....	<b>pág 108</b>
<b>Fig 27-</b> Jeringa de MP3®.....	<b>pág 108</b>
<b>Fig 28-</b> Colocación en el 1 <sup>er</sup> defecto de un xenoinjerto de origen porcino (MP3®).....	<b>pág 109</b>
<b>Fig 29-</b> Colocación en el 2 <sup>o</sup> defecto óseo de la pata izquierda 5 mg. de polvo de melatonina .....	<b>pág 109</b>

<b>Fig 30-</b> Imagen del 3 <sup>er</sup> defecto óseo sin cubrir actuando como control en la tibia izquierda.....	<b>pág 110</b>
<b>Fig 31-</b> Sutura por planos de la herida.....	<b>pág 110</b>
<b>Fig 32-</b> Escaner TC de 64 capas "Brillance" de Philips.....	<b>pág 113</b>
<b>Fig 33-</b> Sistema de radiología digital Kodak 6100.....	<b>pág 113</b>
<b>Fig 34-</b> Detalle de las perforaciones para el corte transversal mediante sierra oscilante en 1/3 proximal de la tibia.....	<b>pág 114</b>
<b>Fig 35-</b> Detalle de uno de los cortes de tibia transversal de 5 mm de espesor en la zona implante.....	<b>pág 114</b>
<b>Fig 36-</b> Macroscopio LeicaZ6-APO conectado a cámara digital Leica DC500.....	<b>pág 116</b>
<b>Fig 37-</b> Microscopio Leica DM 6000 B conectado a cámara Leica DFG 280.....	<b>pág 117</b>
<b>Fig 38-</b> Imagen de la sección histológica capturada .....	<b>pág 118</b>
<b>Fig 39-</b> Selección Interativa del Perímetro.....	<b>pág 118</b>
<b>Fig 40-</b> Medición de la longitud el Defecto Creado.....	<b>pág 119</b>
<b>Fig 41-</b> Medición de la Longitud del Defecto Cubierto.....	<b>pág 119</b>
<b>Fig 42-</b> Medición del grosor de la cortical neoformada.....	<b>pág 120</b>
<b>Fig 43-</b> Medición del Grosor de la Cortical Normal.....	<b>pág 120</b>
<b>Fig 44-</b> Imagen radiológica Tibia Drcha -15 días(control).....	<b>pág 129</b>
<b>Fig 45-</b> Imagen radiológica Tibia Drcha-15 días(Endobon®).....	<b>pág 130</b>
<b>Fig 46-</b> Imagen radiológica Tibia Drcha-15 días(H. autologo).....	<b>pág 131</b>
<b>Fig 47-</b> Imagen radiológica Tibia Izqda-15 días(MP3®).....	<b>pág 132</b>
<b>Fig 48-</b> Imagen radiológica Tibia Izqda-15 días (Melatonina).....	<b>pág 133</b>
<b>Fig 49-</b> Imagen macroscópica tibia diseccionada-15 días.....	<b>pág 134</b>
<b>Fig 50-</b> Melatonin-15días.Imagen panorámica (H.E.-23x).....	<b>pág 138</b>
<b>Fig 51-</b> MP3®- 15 días.Imagen panorámica (H.E.-23x).....	<b>pág 138</b>
<b>Fig 52-</b> Melatonina- 15 días.Imagen panorámica (T.M.-23x).....	<b>pág 139</b>
<b>Fig 53-</b> Control-15 días.Imagen panorámica (T.M.-23x).....	<b>pág 139</b>
<b>Fig 54-</b> Melatonina-15 días.Detalle microscopía (T.M.-250x).....	<b>pág 140</b>
<b>Fig 55-</b> Control-15 días.Detalle microscopía (H.E.-125x).....	<b>pág 140</b>
<b>Fig 56-</b> MP3®-15días.Detalle microscopía (T.M.-125x) .....	<b>pág 141</b>
<b>Fig 57-</b> Endobon®-15 días. Detalle microscopía (T.M.-1000x).....	<b>pág 141</b>
<b>Fig 58-</b> Melatonina-15 días.Detalle microscopía (T.M.-500x).....	<b>pág 142</b>
<b>Fig 59-</b> Hueso Autólogo-15 días.Detalle microscopía (T.M.-1000x)	<b>pág 142</b>
<b>Fig 60-</b> Imagen radiológica Tibia Drcha-30 días(control).....	<b>pág 146</b>
<b>Fig 61-</b> Imagen radiológica Tibia Drcha-30 días(Endobon ®).....	<b>pág 147</b>
<b>Fig 62-</b> Imagen radiológica Tibia Drcha-30 días(H.autólogo).....	<b>pág 148</b>
<b>Fig 63-</b> Imagen radiológica Tibia Izqda-30 días(MP3®).....	<b>pág 149</b>
<b>Fig 64-</b> Imagen radiológica Tibia Izqda-30 días(Melatonina).....	<b>pág 150</b>
<b>Fig 65-</b> Imagen macroscópica tibia diseccionada-30días.....	<b>pág 151</b>
<b>Fig 66-</b> Endobon®-30 días.Imagen panorámica (T.M.-23x).....	<b>pág 154</b>
<b>Fig 67-</b> Melatonina-30 días.Imagen panorámica (T.M.-23x).....	<b>pág 154</b>

<b>Fig 68- H. autólogo-30 días.Imagen panorámica (H.E.-23x).....</b>	<b>pág 155</b>
<b>Fig 69- MP3® -30 días.Imagen panorámica (T.M.-23x).....</b>	<b>pág 155</b>
<b>Fig 70- Control-30 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 156</b>
<b>Fig 71- Melatonina-30 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 156</b>
<b>Fig 72- Melatonina-30 días.Detalle microscopía (H.E.-125x).....</b>	<b>pág 157</b>
<b>Fig 73- Melatonina-30 días.Detalle microscopía (H.E.-500x).....</b>	<b>pág 157</b>
<b>Fig 74- MP3®-30 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 158</b>
<b>Fig 75- Endobon®-30 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 158</b>
<b>Fig 76- Imagen radiológica Tibia Drcha-45 días(control).....</b>	<b>pág 161</b>
<b>Fig 77- Imagen radiológica Tibia Drcha-45 días(Endobon®).....</b>	<b>pág 162</b>
<b>Fig 78- Imagen radiológica Tibia Drcha-45 días(H. autólogo).....</b>	<b>pág 163</b>
<b>Fig 79- Imagen radiológica Tibia Izqda-45 días(MP3®).....</b>	<b>pág 164</b>
<b>Fig 80- Imagen radiológica Tibia Izqda-45 días(melatonina).....</b>	<b>pág 165</b>
<b>Fig 81- Imagen macroscoscópica tibia diseccionada-45 días.....</b>	<b>pág 166</b>
<b>Fig 82- Melatonina-45 día.Imagen panorámica (T.M.-23x).....</b>	<b>pág 168</b>
<b>Fig 83- MP3®- 45 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 169</b>
<b>Fig 84- Endobon®- 45 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 169</b>
<b>Fig 85- Melatonina-45 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 170</b>
<b>Fig 86- Melatonina-45 días.Detalle microscopía (T.M.-250x).....</b>	<b>pág 170</b>
<b>Fig 87- Imagen radiológica Tibia Drcha-60 días(control).....</b>	<b>pág 173</b>
<b>Fig 88- Imagen radiológica Tibia Drcha-60 días(Endobon®).....</b>	<b>pág 174</b>
<b>Fig 89- Imagen radiológica Tibia Drcha-60 días(H. autólogo).....</b>	<b>pág 175</b>
<b>Fig 90- Imagen radiológica Tibia Izqda-60 días(MP3®).....</b>	<b>pág 176</b>
<b>Fig 91- Imagen radiológica Tibia Izqda-60 días(Melatonina).....</b>	<b>pág 177</b>
<b>Fig 92- Imagen macroscoscópica tibia diseccionada-60 días.....</b>	<b>pág 178</b>
<b>Fig 93- H.Autólogo-60 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 181</b>
<b>Fig 94- H.Autólogo-60 días.Detalle microscopía (T.M.-500x).....</b>	<b>pág 181</b>
<b>Fig 95- MP3®-60 días.Detalle microscopía (T.M.- 125x).....</b>	<b>pág 182</b>
<b>Fig 96- MP3®-60 días.Detalle microscopía (T.M.-500x).....</b>	<b>pág 182</b>
<b>Fig 97- Melatonina-60 días.Detalle microscopía (T.M.-125x).....</b>	<b>pág 183</b>
<b>Fig 98- Melatonina- 60 días.Detalle microscopía (T.M.-250x).....</b>	<b>pág 183</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-</b> Proteínas de la matriz osteoide.....	<b>pág 14</b>
<b>Tabla 2-</b> Tipos de células que forman parte del Tejido Óseo.....	<b>pág 15</b>
<b>Tabla 3-</b> Principales tipos de Hidroxiapatitas.....	<b>pág 42</b>
<b>Tabla 4-</b> Características idóneas de un biomaterial.....	<b>pág 45</b>
<b>Tabla 5-</b> Clasificación de los grupos experimentales.....	<b>pág 97</b>
<b>Tabla 6-</b> Grosor de la Cortical Neoformada expresado Media(Sd)..	<b>pág 188</b>
<b>Tabla 7-</b> Contraste de Levene sobre igualdad de las varianzas.....	<b>pág 188</b>
<b>Tabla 8-</b> ANOVA Grosor de la Cortical Neoformada.....	<b>pág 188</b>
<b>Tabla 9-</b> Análisis de la varianza (Tiempo sacrificio) para el grosor de la cortical neoformada.....	<b>pág 189</b>
<b>Tabla 10-</b> Comparaciones múltiples (Método de la LSD) entre los distintos periodos de experimentación en relación a la variable Grosor de la Cortical Neoformada.....	<b>pág 189</b>
<b>Tabla 11-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Grosor de la Cortical Neoformada(Grupo I).....	<b>pág 190</b>
<b>Tabla 12-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Grosor de la Cortical Neoformada(Grupo II).....	<b>pág 191</b>
<b>Tabla 13-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Grosor de la Cortical Neoformada(Grupo III).....	<b>pág 192</b>
<b>Tabla 14-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Grosor de la Cortical Neoformada(Grupo IV).....	<b>pág 193</b>
<b>Tabla 15-</b> Longitud del Defecto Cubierto expresado en Media(Sd).	<b>pág 199</b>
<b>Tabla 16-</b> Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas...	<b>pág 199</b>
<b>Tabla 17-</b> ANOVA Longitud del DefectoCubierto.....	<b>pág 199</b>
<b>Tabla 18-</b> Análisis de la Varianza (Tiempo de sacrificio) para la longitud del defecto cubierto.....	<b>pág 200</b>
<b>Tabla 19-</b> Comparaciones múltiples (Método de la LSD) entre los Distintos periodos de experimentación en relación a la variable Longitud del Defecto Cubierto.....	<b>pág 200</b>
<b>Tabla 20-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto( Grupo I).....	<b>pág 201</b>
<b>Tabla 21-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto( Grupo II).....	<b>pág 202</b>
<b>Tabla 22-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto (Grupo III).....	<b>pág 203</b>
<b>Tabla 23-</b> Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto (Grupo IV).....	<b>pág 204</b>
<b>Tabla 24-</b> Media(Sd) del Grosor de la cortical Neoformada y Longitud del Defecto Cubierto (grupos experimentales).....	<b>pág 209</b>



# ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Representación de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada.....	<b>pág 187</b>
<b>Gráfico 2.</b> Representación Media- Desviación Estandar de la Media Para la variable Grosor de la cortical Neoformada.....	<b>pág 187</b>
<b>Gráfico 3.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada- Grupo I (15 días).....	<b>pág 194</b>
<b>Gráfico 4.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada- Grupo II (30 días).....	<b>pág 195</b>
<b>Gráfico 5.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada- Grupo III (45 días).....	<b>pág 196</b>
<b>Gráfico 6.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada- Grupo IV (60 días).....	<b>pág 197</b>
<b>Gráfico 7.</b> Representación de la Media de la Longitud del Defecto Cubierto.....	<b>pág 198</b>
<b>Gráfico 8.</b> Representación Media- Desviación Estandar de la Media para la variable Longitud del Defecto Cubierto.....	<b>pág 198</b>
<b>Gráfico 9.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) del la Longitud Del Defecto Cubierto-Grupo I (15 días).....	<b>pág 205</b>
<b>Gráfico 10.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) del la Longitud Del Defecto Cubierto-Grupo II (30 días).....	<b>pág 206</b>
<b>Gráfico 11.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) del la Longitud Del Defecto Cubierto-Grupo III (45 días).....	<b>pág 207</b>
<b>Gráfico 12.</b> Comparaciones múltiples (Método LSD) del la Longitud Del Defecto Cubierto-Grupo IV (60 días).....	<b>pág 208</b>



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ADNm:** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial  
**ADP:** Adenosin bifosfato  
**AFMK:** N1- acetil-N2-formil-5-metoxiquinurenamina  
**ALP:** Fosfatasa Alcalina  
**AMK:** Acetil -5-metoxiquinurenamina  
**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico  
**ARNm:** Ácido ribonucleico mitocondrial  
**ATP:** Adenosin trifosfato  
**BIC:** Ratio de contacto óseo  
**BMPs:** Proteínas morfogéticas óseas  
**BMU:** Unidad multicelular básica  
**BSP:** Sialoproteína  
**CBF A1:** Core-binding factor A1  
**COX:** Ciclooxygenasa  
**DDS:** Sistema de liberación de principios activos  
**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico  
**FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico  
**GEN *Ihh*:** Indian hedgehog  
**GFs:** Factores de crecimiento  
**GH:** Hormona de crecimiento  
**GM-CFU:** Unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos  
**GMPc:** Guanosin monofosfato tricíclico  
**GPx:** Glutation peroxidasa  
**GTP:** Trifosfato de guanosina  
**HA:** Hidroxiapatita  
**HIOMT:** Hidroxiindol-O-metil transferasa  
**IGF:** Factor de crecimiento semejante a la insulina  
**IL:** Interleucina  
**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible  
**LOX:** Lipooxygenasa  
**LPO:** Lipoperoxidación  
**MAO:** Monoaminooxidasa  
**MSCs:** Células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas  
**NAT:** N-acetil-transferasa  
**NFkB:** Factor nuclear Kappa B  
**nNOS:** Óxido nítrico sintasa neuronal  
**NOS:** Especies reactivas del nitrógeno  
**OCN:** Osteocalcina  
**ODF:** Factor de diferenciación del osteoclasto  
**OP-1:** Proteína osteogénica

**OPG:** Osteoprotegerina  
**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas  
**PG:** Prostaglaninas  
**PMNs:** Polimorfonucleares  
**PTH:** Paratohormona  
**RANK:** Receptor activador del factor nuclear kB  
**RANK-L:** Ligando de unión al receptor activador del factor nuclear kB  
**RDG:** Tripéptido(Arg-Gly-Asp)  
**rhTF:** Factor tisular humano recombinado  
**ROS:** Especies reactivas del oxígeno  
**Shh:** Sonic hedgehog  
**SIBLINGS:** Small integrin-binding ligand, N linked glycoprotein  
**SOD:** Superóxido dismutasa  
**TFN- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$   
**TRAP:** Fosfatasa Ácida tatrato resistente  
**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular

# **1. INTRODUCCIÓN**



En la práctica clínica odontológica encontramos con frecuencia rebordes alveolares que puede 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 protodóncica 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).

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. La implantología avanzada ha aportado resultados clínicos esperanzadores en estos casos de atrofia severa de los maxilares, siendo una de las condiciones más discapacitantes, la razón reside en que es crónica, progresiva e irreversible.

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 (**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. En los últimos años se han identificado una serie de sustancias promotoras del crecimiento óseo que parecen tener un papel importante en la reparación ósea.



## **2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**



La sustitución del tejido óseo constituye un problema aún no resuelto, que precisa de nuevas investigaciones sobre diversos materiales (metales, polímeros y cerámicas) que sean capaces de sustituir dichos defectos óseos así como de estimular el crecimiento del hueso huésped (proteínas morfogenéticas, factores de crecimiento, hormonas) para alcanzar su reparación definitiva. Aunque este problema está parcialmente resuelto con la utilización del injerto óseo; no obstante y dados los problemas intrínsecos que suelen conllevar este tipo de sustitutos óseos (tanto autólogos como heterólogos), hacen precisa la búsqueda de nuevos materiales denominados genéricamente como sustitutos de los injertos óseos.

El sustituto óseo ideal debería reunir los tres elementos básicos de la regeneración ósea: una matriz osteoconductiva, factores osteoinductivos y células osteogénicas. Hasta el momento se han utilizado materiales con distintos orígenes que han marcado sus propiedades teniendo en cuenta las tres propiedades mencionadas: osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. Los materiales osteoconductivos aportan una matriz a modo de andamio sobre la 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. El sustituto ideal que reúne las características mencionadas es el hueso autólogo, pero en numerosas 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)**

Además el biomaterial “ideal” debe ser seguro desde el punto de vista biológico y debe contar con propiedades mecánicas parecidas a las del hueso. Asimismo, la seguridad de un sustituto corresponde a la calidad de su reproducibilidad, su biocompatibilidad y ausencia de toxicidad. De este modo, los sustitutos deben ser estudiados en todos estos aspectos antes de su utilización en la clínica, con el fin de poder establecer un análisis predictivo de los riesgos del biomaterial

Los xenoinjertos presentan sólo la propiedad de osteoconducción es decir, el proceso por el que el material implantado proporciona una trama para el crecimiento óseo desde los márgenes del defecto. Dicho material puede ser permanente o reabsorbible. Un material osteoconductor puro no forma hueso de forma intrínseca en implantación ectópica, su osificación no es endocondral, y la formación de hueso siempre comienza en la periferia. El proceso osteoconductor implica que el material tiene la capacidad de influir sobre las células no pluripotenciales del lecho para convertirse en osteoblastos que lleven a cabo la regeneración ósea. El proceso se diferencia del osteoinductivo en que tiene lugar sobre células predeterminadas y no en células pluripotenciales, con lo que la respuesta a la osteoconducción es limitada a una población celular que ya ha sido programada. El efecto de un material osteoconductor puro sobre la regeneración ósea a partir de la superficie de un hueso nativo es el mismo que el de un material osteoinductivo puro, pero extremadamente limitado e insuficiente en la regeneración de defectos extensos (Lax 2004).

## Fisiología del Tejido Óseo

Cuando el tejido óseo sufre un daño estructural, ya sea por traumatismo, extracción dental o colocación de un implante se pueden producir dos fenómenos fisiológicos. Puede que sufra un proceso de reparación en donde se produce la restauración de dicho tejido sin que este conserve su arquitectura original ni tampoco su función o puede experimentar un fenómeno de regeneración originándose un nuevo tejido que posee todas las propiedades del tejido original, es decir, se produce una “restitution at integrum”. Así la regeneración será siempre el objetivo terapéutico deseado (**Bostrom** 2000).

Desde el punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de las laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso.

El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen láminas óseas en forma de red que delimitan las cavidades areolares en cuyo interior se encuentra la médula ósea.

La matriz ósea está formada por un componente inorgánico 65%, un 20% de componente orgánico y agua 10%. Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica o sustancia osteoide y matriz inorgánica o mineralizada (**Anitua** 2000).

**Matriz Orgánica o Sustancia Osteoide** - El componente orgánico se forma por proteínas colagénicas y proteínas no colagénicas. Estas son importantes para la proliferación y diferenciación celular así como para la adhesión célula-célula y célula-substrato. La matriz orgánica es producida por los osteoblastos y representa un tercio del peso óseo (**Fernández-Tresguerres y cols I 2006**). (**Tabla 1**)

**Colágeno**- El 90% de la matriz extracelular está constituida por colágeno tipo I (>95%) y tipo IV (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp, que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas.

Las proteínas no colagénicas representan el 10% de las proteínas de la matriz osteoide y además de contribuir a tal estructura, intervienen o median fundamentalmente en la fisiología dinámica del hueso. Entre ellas destacan (**Karsenty 1999**):

**Proteoglicanos** -Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. Existen cuatro grupos de proteoglicanos en la matriz osteoide: Hialuronano y Condroitín-sulfato, de molécula grande, intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Biglicano y Decorina, de molécula más pequeña, aparecen en las fases siguientes a la formación ósea.

**Proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico**-Son la osteocalcina (OCN) y la proteína de la matriz con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis.

La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colagénicas de la matriz y se considera uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.

**Glicoproteínas**-Son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripeptido RDG (Arg-Gly-Asp).

La osteonectina es una proteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25 % de las proteínas no colagénicas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células.

La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Se considera un buen marcador de la actividad osteoblástica.

Proteínas con el tripéptido RDG, también llamadas (SIBLINGS, Small Integrin-Binding Ligand, N-Linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina tromboespondina y vitronectina. Son fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y osteoclastos.

**Proteínas procedentes del plasma**-Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la  $\alpha$ 2-SH-glicoproteína, relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

**Factores de Crecimiento**-Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares como el hígado o las plaquetas, intervienen en la diferenciación crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina y paracrina (Canalis y cols 2003).

<b>COLÁGENO</b>	<b>Tipo I,II,V,XII</b>
<b>PROTEOGLICANOS</b>	-condroitin sulfato -decorina -biglicano -hialuronano
<b>PROTEINAS CON ÁCIDO <math>\gamma</math>-CARBOXIGLUTÁMICO</b>	-ostocalcina -proteína de la matriz con ácido $\gamma$ -carboxi-glutámico
<b>GLICOPROTEÍNAS</b>	-osteonectina -fosfatasa alcalina -proteínas con RGD: *fibronectina *tromboespondina *osteopontina *vitronectina *sialoproteínas óseas
<b>PROTEÍNAS DEL PLASMA</b>	-albúmina - $\alpha$ 2-SH-glicoproteína
<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	-IGF-I y II (Insulin growth factor I y II) -TGF- $\beta$ (Transforming growth factor-beta) -PDGF (Platelet derived growth factor)

**Tabla 1-** Proteínas de la matriz osteoide tomada de (Fernández-Tresguerres I 2006)

**Matriz inorgánica o mineralizada**-El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Contiene aproximadamente un 99% de calcio, un 85% del fósforo y alrededor de un 40% y 60% de sodio y de magnesio, respectivamente.

El componente inorgánico de la matriz ósea está constituido en su mayor parte por fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxapatita. La precipitación de fósforo y calcio en forma más o menos cristalina sobre la red de colágeno va a depender de la acción de diferentes proteínas no colagénicas de la matriz. Los cristales se disponen en forma de bastones o agujas que se disponen entre las fibrillas de colágeno.

**Células Óseas**-En el hueso existen varios tipos de células. (**Tabla 2**) Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas o mesenchymal stem cells.

<b>ESTROMA MEDULAR</b>	<b>TEJIDO ÓSEO</b>
<b>Stem cells hematopoyéticas</b>	Osteoblastos
<b>Stem cells mesenquimales</b>	Pre-osteoblastos
<b>Adipocitos</b>	Osteocitos
<b>Macrófagos</b>	Osteoclastos
<b>Mastocitos</b>	Pre-osteoclastos
<b>Células endoteliales</b>	Células linfoides

**Tabla 2**-Tipos de células que forman parte del Tejido Óseo.Tomada de (**Fernández-Tresguerres I 2006**)

**Linaje osteoblástico-**A partir de las MSCs se van a diferenciar los preosteoblastos, los osteoblastos, las células de revestimiento y los osteocitos. Los **preosteoblastos** son células de aspecto fibroblástico cercanas a las superficies óseas pero separadas de estas por otros tipos celulares (células de revestimiento, osteoblastos). Los **osteoblastos** son células de forma cúbica, de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina. Derivan de los preosteoblastos y suelen considerarse células con diferenciación terminal, y por lo tanto incapaces de dividirse, no obstante existen datos que sugieren que, al menos en parte, conservan la capacidad de proliferar de manera limitada. Los osteoblastos se hallan en contacto directo con las superficies óseas formando grupos compactos de una sola capa de espesor. De manera característica el núcleo de estas células se sitúa en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como el calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la conexina (**Civitelli y cols** 1993).

El estudio ultraestructural permite comprobar que entre el núcleo y la superficie de contacto con el hueso se sitúan de manera sucesiva el aparato de Golgi y abundantes cisternas del retículo endoplasmático rugoso. Estas características ultraestructurales son típicas de las células con capacidad para segregar grandes cantidades de proteínas. Los osteoblastos sintetizan el componente orgánico de la matriz ósea: colágeno tipo I, proteínas no colagénicas y GFs. Su vida media está en un rango de 1-10

semanas a partir del cual desaparecerían mediante un proceso apoptótico, algunos sin embargo se convierten en células de revestimiento y un 15% en osteocitos (**Martin** 2000).

El desarrollo de los osteoblastos está controlado por la respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes y de las proteínas morfogenéticas óseas (**Yamaguchi** 2000).

1) El CBF A<sub>1</sub> (core-binding factor A<sub>1</sub>, también llamado Runx 2), codificado por el factor de transcripción específico de los progenitores del osteoblasto. Este factor regula la expresión de genes de proteínas específicas de esta célula, como osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I, sialoproteínas óseas y ligando del receptor activador de factor nuclear – KB (RANK-L).

2) El gen Ihh (Indian hedgehog) y el Shh (Sonic hedgehog), necesarios para el desarrollo embrionario del hueso y la actividad de los osteoblastos.

3) Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs), constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde la células mesenquimales pluripotenciales.

A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. El colágeno I y la osteopontina (OPN) se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La

sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto a osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización (**Mc Carthy y cols 2000**).

Los osteoblastos pueden permanecer en las superficies óseas o quedar rodeados por la matriz que sintetizan. Cuando los osteoblastos que han permanecido en la superficie finalizan la síntesis de matriz, se aplanan y se convierten en **células de revestimiento** (células del endostio o “lining cells). Estas células, a través de la producción de IL-6 e IL-1 parecen desarrollar un importante papel en el control del remodelado óseo mediante la atracción de osteoclastos.

Los osteoblastos que quedan en el espesor de la matriz adquieren aspecto estrellado y pasan a denominarse **osteocitos**. Estas células se hallan en contacto entre sí y con las células de la superficie (células de revestimiento, osteoblastos) mediante finas prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina laguna osteocitaria y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplasmáticas reciben el nombre de conductos calcóforos. El estudio ultraestructural de los osteocitos revela que presentan un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso menos desarrollado que los osteoblastos. Estas organelas se concentran en el cuerpo celular donde se disponen alrededor del núcleo. En los puntos de contacto entre las prolongaciones citoplasmáticas se observan uniones tipo gap. En estas uniones existen pequeños canales intercelulares con un diámetro interno de 1,5nm. Estos canales permiten el paso directo de una

a otra célula de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles (aminoácidos, azúcares, nucleótidos y vitaminas) por lo que posibilitan una comunicación química y eléctrica.

Los osteocitos son células con una escasa actividad metabólica pero su preservación parece necesaria para que el tejido óseo mantenga sus propiedades biomecánicas. La situación de los osteocitos es teóricamente ideal para detectar el estrés mecánico y las microlesiones de la matriz. Estas células podrían transmitir señales a las células de revestimiento que utilizan la información recibida para modular localmente el remodelado (**Lanyon** 1993).

**Linaje Osteoclástico**-Los osteoclastos proceden embriológicamente de las células madres hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU, GM colony-forming unit), precursoras de monocitos y macrófagos. Estas células alcanzan el hueso bien desde la médula incluida en su seno o desde la circulación (**Rodman** 1996).

Los **osteoclastos** son células multinucleadas 10-12 núcleos, con un diámetro de unos 100  $\mu\text{m}$ , de citoplasma acidófilo y ricas en anhidrasa carbónica y fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas. Se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos.

Al igual que los osteoblastos son células polarizadas en la que los núcleos se sitúan en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. Sus organelas se concentran en el citoplasma

perinuclear donde los complejos de Golgi son abundantes. En el resto del citoplasma se observan abundantes mitocondrias y estructuras vesiculares de diversas densidades y tamaños. Es probable que algunas de estas estructuras vesiculares correspondan a lisosomas ricos en TRAP y colagenasas. Las cisternas del retículo endoplasmático rugoso no son muy numerosas ni muy extensas. Es característico de estas células que la zona de su membrana que entran en relación con la matriz ósea se halle fruncida. Entre los plegamientos de la membrana y la matriz ósea existe un estrecho espacio poco denso a los electrones. A ambos lados de la zona de plegamiento la membrana se aplanan y se adhiere más íntimamente a la matriz. En las tres dimensiones del espacio este segmento aplanado corresponde a un rodete que adhiere el osteoclasto a la superficie ósea de manera parecida a como lo haría el borde de una ventosa. Así el espacio comprendido entre la membrana fruncida y la matriz ósea queda convertido en un microambiente que se halla aislado del intersticio medular (**Minkin y cols 1999**).

El segmento de citoplasma adyacente a esta zona aplanada se halla libre de organelas por lo que se denomina zona clara. Esta zona contiene abundantes microfilamentos de actina que probablemente se relacionan con la capacidad de traslación de la célula. De hecho los osteoclastos a medida que reabsorben el hueso realizan un movimiento de vaivén parecido al que efectúa el cepillo de un carpintero. El territorio sobre el que se desplaza un osteoclasto durante el proceso de reabsorción es varias veces superior al de la superficie de la célula y se denomina dominio osteoclástico.

**Regulación molecular de la diferenciación osteoclástica-**Respecto a la osteoclastogénesis los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Las células precursoras de osteoclastos y estos mismos expresan en superficie el receptor de RANKL producido por los osteoblastos este junto a otras citoquinas provocarían la diferenciación y activación de los osteoclastos (**Teitelbaum** 2000).

La PTH, la 1,25 dihidroxivitamina D, y también el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y la IL1 producidos por células inflamatorias actuarían sobre las células mesenquimales y preosteoblastos que producirían las IL11, IL6, el factor de diferenciación osteoclástico (ODF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) que actuarían sobre los preosteoclastos para seguir la diferenciación y fusionarse con otros preosteoclastos y formar el osteoclasto (**Takahashi y cols** 2005).

En los preosteoclastos la IL6 activaría el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Nucleo Factor Kappa B) y también los factores de transcripción Fos y Jun (AP-1) que repercuten en la diferenciación de determinados genes que transforman el preosteoclasto en osteoclasto. El ODF, también llamado Ligando RANKL (Receptor Activator Nuclear factor Kappa Ligand) se encuentra en las membranas de preosteoblastos, MSCs y linfocitos T. Parece que su formación en las membranas está relacionada con la expresión del factor de transcripción Cbfa1. Se une en el preosteoclasto al receptor RANK y es también un activador del NF- $\kappa$ B del preosteoclasto y puede ser bloqueado por la osteoprotegerina (OPG) evitando que se una al RANK. Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe

la unión RANKL- RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica (Marie y cols 2000).

Tanto en los preosteoclastos como en los osteoclastos existen también receptores para la calcitonina que inhibiría la reabsorción.

La adhesión de las células de estirpe osteoclástica a la matriz es posible porque expresan en su membrana moléculas de adhesión de la familia de las integrinas. La integrina  $\alpha_2 \beta_1$  interacciona con el colágeno y la integrina  $\alpha_v \beta_3$  con la vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea. Esta unión con las proteínas de la matriz se realiza a través del péptido RGD y esta unión parece que también transmitiría señales de transducción. También intervenirían otras proteínas de adhesión en la membrana del osteoclasto como las anexinas y caderinas.

Después de la adhesión, la activación del gen c-Src provoca la formación del osteoclasto polarizado maduro, y otras proteínas como la OPG inhibirían esa diferenciación final. Para terminar la maduración es necesario la presencia exterior de moléculas inductoras (óxido nítrico, hidrogeniones, peróxido de hidrógeno) a través de los cuales la célula empieza a sintetizar enzimas proteolíticas (metaloproteinasas, catepsina K, TRAP, anhidrasa carbónica tipo II) (Yasuda y cols 1998).

## **Biología de la Regeneración Ósea**

La regeneración ósea va a seguir una serie de fases diferenciales en cuanto al proceso biológico que se produce, pero que se superponen en el tiempo (**Bascones 2007**)

**1) Fase de inflamación-**Tras el daño inicial de la osteotomía quirúrgica se produce una laceración de los vasos sanguíneos con exudado de líquidos y proteínas plasmáticas (edema) e inmediatamente después formación del **COÁGULO** de fibrina tras la cascada de la coagulación, vasoconstricción y necrosis de los bordes de la herida. Dirigiendo la coagulación se encuentran las plaquetas, con una doble función, control hemostático y como contenedor de señales como PDGF, el  $TGF\beta_1$ ,  $TGF\beta_2$ , el IGF-I y ciertas proteínas de adhesión como la fibronectina, que son desprendidos a través de sus membranas en forma de gránulos  $\alpha$ . Estos factores aparecen en la fase inicial del coágulo, y actúan actúan quimiotácticamente sobre las MSCs y sobre los osteoblastos de revestimiento que se van acercando al foco en pequeñas cantidades.

Las plaquetas van a contener también el mayor inhibidor de plasmina, el  $\alpha_2$ -antiplasmina, por lo que su mayor producción retrasa la disolución de la red de fibrina creada. También aparecen IL-1 e IL-6 a partir de los linfocitos, y aparecen también en estas fases tempranas las BMPs procedentes de la matriz extracelular del hueso adyacente de los osteoblastos de revestimiento. En este coágulo inicial, los productos de degradación producidos por la necrosis celular y los factores de crecimiento iniciales, atraen a los polimorfonucleares (PMNs neutrófilos), linfocitos y monocitos (que se transforman en macrófagos, los cuales

pueden permanecer varios meses en la zona de regeneración) que inician la fagocitosis de los productos de necrosis (**Marx 1999**).

Marx establece una extrapolación en humanos de los eventos observados experimentalmente de la regeneración en defectos óseos maxilofaciales rellenos con injertos óseos. Observaron que el ambiente que se produce en esta fase es de una disminución del pH (4-6) y de la tensión de oxígeno (5-10mm Hg) que atrae a los macrófagos y a los PMNs al foco debido al gradiente de tensión en relación con el hueso adyacente (45-50 mm Hg). Sin embargo, esta disminución de pH también favorece la diferenciación condroblástica si se continúa en el tiempo.

En los días 3 y 5 después del trauma inicial, va desapareciendo progresivamente la red de fibrina, se forma **TEJIDO DE GRANULACIÓN**, que se mantiene hasta aproximadamente los 14 días. Se regeneran nuevos vasos, varios isótopos de colágeno (fundamentalmente tipo III) que forman una nueva red, y aparecen otras células (fibroblastos, linfocitos, monocitos y macrófagos) aumentando también la proporción de MSCs. Las plaquetas desaparecen como principales presentadores de GFs, siendo los macrófagos los principales productores de estas citoquinas. Los macrófagos, aparte del PDGF y TGF $\beta$ , expresarían otros factores como el FGF y el VEGF que junto con el TGF $\beta$ , promoverían la angiogénesis (por la migración y proliferación de células endoteliales, y precursores de células endoteliales).

**2) Fase de proliferación y diferenciación celular**-La proporción de las MSCs presentes en los canales óseos, endostio, periostio y médula ósea es variable a lo largo de la vida y se considera que el procedimiento

mesenquimal seguiría el mismo proceso de señales que suceden el periodo embriológico y que sólo se diferenciaría la cantidad de MSCs. Estas células pueden acceder al foco del defecto desde los tejidos de alrededor (periostio y médula ósea) y la sangre.

Estas células precursoras migran a través de una superficie implantada osteoconductiva o a través de las redes osteoconductivas de la matriz extracelular. En el caso de no existir un implante estas células son la vanguardia de las espículas de crecimiento óseo.

En el modelo de injertos óseos a los 14 días se equilibraría el gradiente de tensión de oxígeno entre la zona de injerto y zona de hueso adyacente, disminuiría la angiogénesis y se aumentaría considerablemente la migración de MSCs y la diferenciación y proliferación de osteoblastos maduros. Parece que los componentes colágenos actuarían como presentadores de los factores de crecimiento moduladores a las células receptoras. La diferenciación de los osteoclastos a partir de los macrófagos va a iniciar la reabsorción y renovación de la capa de hueso necrótico que se ha producido en el trauma inicial.

**3) Fase de formación ósea**-El primer tejido óseo que se forma es el **osteóide**, o matriz extracelular no mineralizada, formada en su mayoría por colágeno tipo I que va a formar el andamiaje fundamental para la mineralización de la matriz. A medida que se va formando este osteóide algunos osteoblastos quedan incluidos en él diferenciándose en osteocitos (Adriaens 1999)

El osteóide es mineralizado progresivamente por una gran número de cristales de hidroxapatita relativamente pequeños, formando el **hueso**

**inmaduro entrelazado** (2<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> 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. Esta ordenación ósea puede ser una variante fina **osteona primaria**, o de manera más basta **hueso en espiral** dando lugar a la osteona primaria ó trabécula primaria que sigue estando formada por **hueso inmaduro de fibras paralelas** (6<sup>a</sup>-18<sup>a</sup> semana). Esta osteona ó trabécula primaria de hueso inmaduro debe pasar por un proceso de remodelado (18<sup>a</sup>-54<sup>a</sup> semana) para pasar a una osteona secundaria que sí está formada por hueso laminar o haversiano.

En el modelo de injertos óseos se observó que la formación de hueso inmaduro entrelazado se observa a las 4 semanas. El proceso de maduración de ese hueso dura hasta los 6 meses aunque el aspecto de hueso normal llega a tardar en aparecer tras el remodelado hasta 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). Las BMU se activan de manera asincrónica, por lo que mientras unos ciclos de remodelado se hallan en fase de reabsorción, otros se encuentran en fase de reposo o de formación (**Fig.1**). La BMU trabecular (hemicono de corte) avanza la mitad de la distancia que la cortical, a la mitad de velocidad, en aproximadamente el mismo periodo de tiempo (**Parfitt 2002**).

Cada ciclo de remodelado puede ser dividido en las siguientes fases (**Fernández-Tresguerres II 2006**):

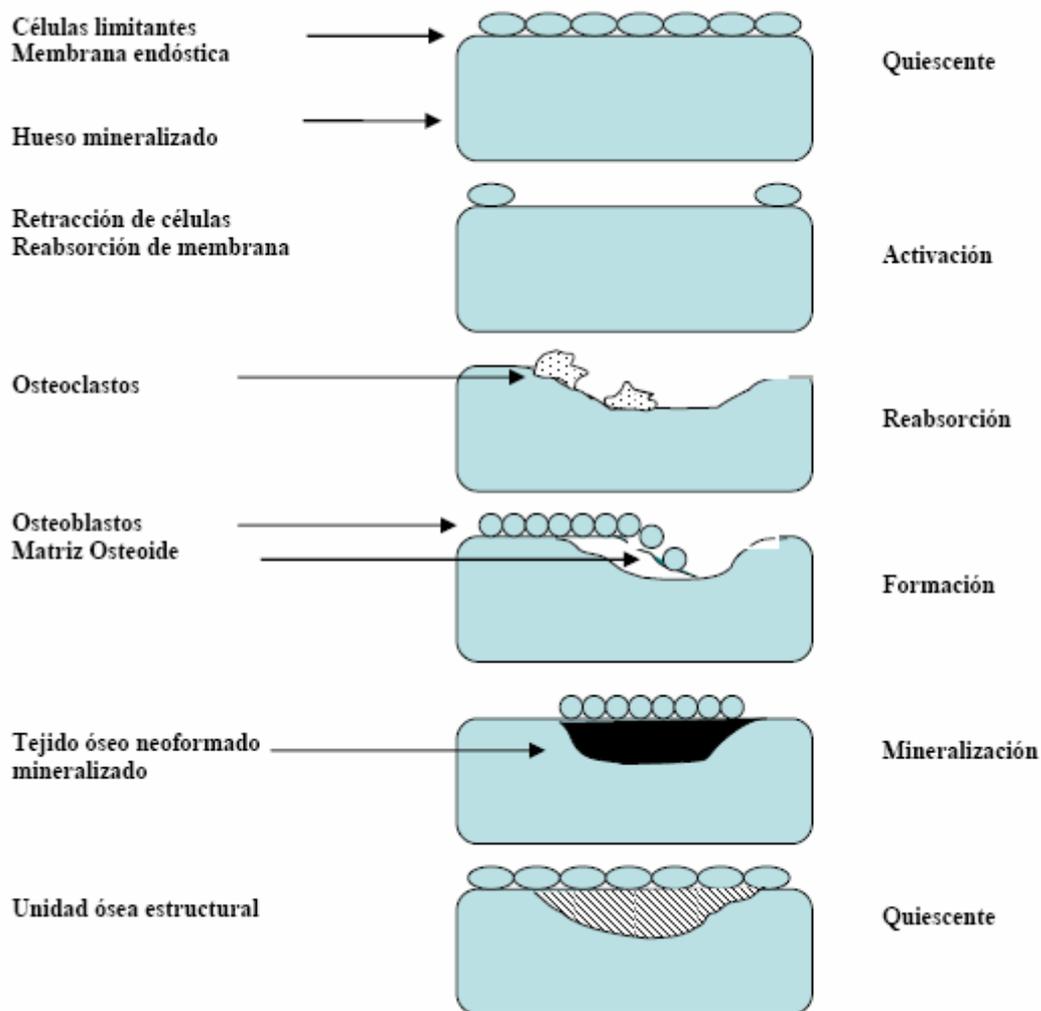
**A) Fase quiescente:** Corresponde al hueso en condiciones de reposo.

**B) 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.

**C) 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- $\beta$ , PDGF, IGF-I y II.

**D) 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. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs, responsables de la diferenciación. A los pocos días los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

**E) 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 los 90 días en el trabecular. Y de nuevo comenzará la fase quiescente o de descanso.



**Fig 1.** Fases de remodelado óseo. Tomado de (Compston JE 2001).

## **Factores reguladores del remodelado óseo**

El balance entre la reabsorción y la formación ósea está influido por una serie de factores, interrelacionados: genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales (**Riancho y Gutierrez 2003**).

**Factores hormonales sistémicos-** El desarrollo del esqueleto está condicionado por el correcto funcionamiento del sistema endocrino, fundamentalmente de la hormona somatotropa (GH) y las hormonas calcitropicas (paratohormona, calcitonina y metabolitos de la vitamina D. Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúa a distancia de su lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (efecto autocrino y paracrino) (**Gotcher y cols 1998**):

\**Paratohormona* (PTH). Se segrega en las células principales de las glándulas paratiroides, que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiente por excelencia, al favorecer la reabsorción. Se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea a través de la síntesis de IGF-I y TGF- $\beta$ . 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 osteoblasticas, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso asociado a un incremento de los factores de crecimiento antes

mencionados, disminuyendo la apoptosis de los osteoblastos (**Canalis y cols** 1989).

\**1-25 Dihidroxitamiana D3-* Es un derivado por doble hidroxilación de la vitamina D (coleciferol): se obtiene de la dieta y se sintetiza en la piel a través de sus precursores). Sobre el hueso tiene una acción activadora de la acción osteoclástica de forma indirecta (vía receptores en células de estirpe osteoblástica que activan los osteoclastos maduros) o directa (acción inmunomoduladora) sobre la diferenciación de los preosteoclastos. Su principal función a nivel general es aumentar la absorción intestinal del calcio y la disminución de la eliminación urinaria del calcio favoreciendo la calcemia (**Raisz** 1993).

\**Calcitonina-* Es un péptido secretado por las células parafoliculares del tiroides. Tiene una acción inhibitoria sobre los osteoclastos, bien de manera directa a través de receptores de membrana o bien inhibiendo los preosteoclastos, de tal manera que se secreta cuando hay un aumento de la calcemia para reducirla y realiza un aumento de la eliminación de calcio y fosfato en la orina.

\**Estrógenos-* Tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo, por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y la función de los osteoblastos, y por otro lado disminuyen la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción, por lo que jugaría un papel muy importante en la regulación de la osteoclastogénesis (**Hofbauer y cols** 1999).

\*Progesterona- Es igualmente anabolizante sobre el hueso, bien directamente a través de los osteoblastos o bien de forma indirecta mediante competición por los receptores osteoblasticos de los glucocorticoides.

\*Insulina- Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través de la síntesis hepática de IGF-I (factor de crecimiento análogo a la insulina).

\*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 la Cbfa 1, factores críticos para la osteoclastogénesis (**Manolagas** 2000).

\*Hormona de crecimiento (GH)- Tiene dos acciones sobre el hueso directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores par 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 síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función (**Tresguerres y cols** 2002)

**Factores locales**-El remodelado óseo también está regulado por factores locales, entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y más recientemente se han implicado las proteínas de la matriz ósea como moduladoras de la acción de otros factores locales.

**1) Factores de Crecimiento-**Los factores de crecimiento (GFs) son polipéptidos que mediante un proceso autocrino o paracrino van a facilitar la migración, proliferación y diferenciación de las MSCs en el proceso de regeneración ósea, así como en el control de la actividad funcional de las células de la Unidad Multicelular Básica (BMU) que intervienen en el remodelado. En un sentido estricto se deberían denominar “factores reguladores” ya que no sólo tienen una función mitogénica o proliferativa (**Barnes y cols 1999**)

*\*Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), (Tipo I y II)-* Con una semejanza del 50% con la insulina se encuentran en el torrente circulatorio unido a proteínas de unión específicas. Producido por las plaquetas, macrófagos, osteoblastos y MSCs, también se encuentra en la matriz ósea. De manera autocrina o paracrina estimula la proliferación (mitogénesis) y la diferenciación de las MSCs y de las células de revestimiento, así como la formación de parte de los osteoblastos de osteocalcina, fosfatasa alcalina, y de colágeno tipo I. Durante el remodelado óseo su liberación de la matriz, al igual que las BMPs y el TGF $\beta$ , induciría la diferenciación de MSCs y las células de revestimiento (**Hill y cols 1995**).

*\*Factor de transformación  $\beta$  (TGF $\beta$ ).* Descrito inicialmente en células que presentaban transformación maligna. Presenta 5 isoformas pero las formas  $\beta$ 1y  $\beta$ 2 han sido las más investigadas por lo que de manera general se refiere de manera conjunta a las 2 isoformas como el TGF $\beta$ .

Las TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 se encuentran en las plaquetas principalmente y también en los macrófagos, linfocitos, neutrófilos, MSCs, osteoblastos (que lo producen con un efecto autocrino) y la matriz ósea. Van a actuar de manera paracrina o autocrina y su principal función es la de quimiotaxis y diferenciación de las MSCs y para la producción de colágeno por parte de los osteoblastos. Favorecen también la angiogénesis. Inhiben la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea. No es bien conocido pero parece que tiene un efecto mitogénico en las células mesenquimales e inhibitorio de la proliferación en células epiteliales, y dependiente de la presencia de otros GFs (**Baylink y cols 1993**).

*\*Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)* se encuentran presentes en varias fases de la reparación y remodelación ósea. Son un subgrupo de la superfamilia de TGF $\beta$  y parece que son más selectivos con el hueso que este último y presentan hasta 16 isoformas. Son recogidas inicialmente de la matriz extracelular del hueso adyacente y posteriormente producida por las MSCs y los osteoblastos. Parece que actúan más sobre la diferenciación osteoblástica de las MSCs que en su proliferación (mitogénesis). A diferencia de otros factores de crecimiento, las BMPs sólo son mitogénicas para células óseas y no para otros tipos celulares. Se diferencian claramente de los TGF $\beta$ , así mientras que las BMPs inducen la producción de osteocalcina (marcador de la diferenciación osteoblástica), los TGF $\beta$  la inhibirían, además tendrían diferentes receptores de membrana y diferentes caminos citoplasmáticos.

Tienen capacidad de inducir la formación de hueso de manera ectópica (osteoinducción estricta). No se ha demostrado que las BMPs causen oncogénesis sino más bien su aumento de expresión sea un producto de algunos tumores osteogénicos, pero no la causa. En el ámbito maxilofacial se están utilizando las formas recombinantes humanas de la BMP-2 y de la BMP-7 (**Yamaguchi y cols 2000**).

*\*Factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF)*, Presenta 3 isoformas AA, AB, BB. Actúan en las células a través de un receptor tirosina-Kinasa y puede ser de tipo  $\alpha$  que se unen a cadenas A y B, y de tipo  $\beta$  que sólo se unen a cadenas B. Está principalmente producido por las plaquetas aunque también por los macrófagos, osteoblastos (isoformas BB), condrocitos, fibroblastos y células endoteliales. Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales; realiza un efecto quimiotáctico y activador sobre células de inflamación (macrófagos); favorecen la quimiotáxis y proliferación de células mesenquimales (mitogénico); y facilitan la formación de colágeno tipo I por parte de los osteoblastos. Se achaca a este factor el 50% del efecto mitogénico proveniente de las plaquetas, el resto correspondería a otros GFs. Se considera que en la sangre normal existen 0,06 $\mu$ g de PDGF por millón de plaquetas o 1.200 moléculas de PDGF por cada plaqueta (**Ross y cols 1986**).

*\*Factor de crecimiento fibroblástico (FGF tipo I y II)*-Su efecto sobre los fibroblastos, fue la primera de sus funciones descrita, lo que le valió el nombre. La forma II o básica parece que es la más potente en la función mitogénica. Hoy se sabe que actúa sobre otras células. Son

producidos no sólo por los fibroblastos sino también por los macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales a lo largo del proceso de curación ósea. Parece que aumenta la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la inhibición de osteoclastos. Actúan sobre los fibroblastos aumentando su proliferación y la producción de fibronectina. También favorecen la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre las células endoteliales (**Marie** 2003).

*\*Factor de crecimiento epidérmico (EGF)*- Descrito por primera vez en la glándula submaxilar, tienen una gran similitud con el TGF $\alpha$  lo que hace que se una al mismo receptor. Su acción parece que también es regulada por la acción de TGF $\beta$  Y PDGF. Su función es mitogénica, proapoptótico, migración y de diferenciación no sólo de las células epiteliales, sino también sobre fibroblastos, células del cristalino, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales (**Bolufer** 1988).

*\*Factor de crecimiento vascular y endotelial (VEGF)*- Proteína que presenta 4 isoformas. También llamado factor de permeabilidad vascular (VPF). Actúa sobre la quimiotaxis y la proliferación de las células endoteliales. Realiza una hiperpermeabilidad de los vasos. Producido por varias células, entre ellas las plaquetas, macrófagos, osteoblastos y células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia. Su acción parece que está regulada por la acción de TGF $\beta$  y PDGF. Existen 0,0006ng de VEGF por millón de plaquetas (**Banks y cols** 1998).

**2) Proteínas de la matriz-**Recientemente se ha descubierto que las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento (**Young 2003**).

Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan en 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.

**3) Citoquinas-**Son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas que juegan un papel importante en múltiples funciones celulares, como la respuesta inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con efecto autocrino y paracrino.

\*Interleuquina 1(IL-1)- Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos.

\*Interleuquina 6(IL-6)- Estimula la reabsorción ósea. Se cree que juega un papel muy importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y  $1,25 (OH)_2 D_3$ .

\*Interleuquina 11(IL-11)- Se produce en la médula ósea e induce la osteoclastogénesis.

\*Prostaglandinas (PG)-Tienen un efecto contradictorio. Producidas por las MSCs y osteoblastos. Aunque en un principio la Prostaglandina E2 (PGE2) tiene un efecto reabsortivo sobre el hueso, sin embargo favorecen la producción del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y de síntesis de colágeno tipo I (**Kawaguchi y cols 1995**).

## **Terapéuticas de regeneración ósea**

Las terapéuticas actuales tanto en traumatología como en odontología de regeneración tisular se basan en la utilización de biomateriales artificiales o naturales así como el uso de proteínas que aporten señales estimuladoras que desencadenen el proceso fisiológico de la regeneración. Existen tres mecanismos relacionados con el éxito de la regeneración ósea: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. (Gómez y Rodríguez 2000)

**Osteogénesis**-Es el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo. Los osteoblastos son trasladados desde las zonas de origen hacia el defecto. Este mecanismo es el que se produce en los injertos de hueso autólogo, en donde ese establece un actividad de remodelado, que simultáneamente lleva a la reabsorción del material injertado y el reemplazo por hueso neoformado para conseguir la regeneración total del injerto.

**Osteoinducción**-Es el proceso de formación de hueso en tejidos donde originalmente no existe gracias a la liberación de proteínas osteoconductoras (BMPs) que favorecen la diferenciación celular.

**Osteoconducción**-Consiste en la creación de un andamiaje o matriz física apropiada para la deposición de hueso nuevo. La osteoconducción caracteriza el crecimiento óseo por aposición a partir del hueso existente y por encima del mismo, siendo necesario para este proceso la presencia de hueso o de células mesenquimales diferenciadas (Anitua 2000).

## INJERTOS ÓSEOS

Los injertos óseos se definen como partes de hueso vivo no sujetas al cuerpo que sirven para cubrir, rellenar, conectar o dar soporte a otras partes del cuerpo lesionadas (**García y cols** 2005).

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. Las preparaciones de autoinjerto comprenden la médula ósea aspirada, el hueso esponjoso o cortical y los injertos vascularizados. Los autoinjertos óseos vascularizados y los injertos esponjosos introducidos en una zona sana de un receptor pueden ser al mismo tiempo osteogénicos (porque llevan células vivas), osteoinductores (por las proteínas de la matriz) y osteoconductores (por la matriz ósea). Aunque sólo una pequeña parte de las células transplantadas dentro de un segmento avascular del autoinjerto sobrevivan, pueden contribuir a una mejor respuesta curativa.

**Injerto óseo autólogo:** Desde la perspectiva de crecimiento óseo exclusivamente el mejor injerto es el hueso autólogo, ya que por sus propiedades engloba los tres mecanismos involucrados en la regeneración, proporcionando células óseas, proteínas osteoconductoras como factores de crecimiento y BMPs así como una importante matriz de soporte. La actividad osteogénica está dominada por células óseas, mediante la formación de tejido osteoide, pero no sólo las células óseas injertadas contribuyen a la formación de hueso.

El injerto sufre un proceso de remodelación que hace que durante la fase de reabsorción se liberen factores de crecimiento y BMPs procedentes de la matriz que favorecen la osteoinducción. La estructura ósea del injerto actúa como matriz del hueso neoformado, permitiendo el efecto osteoconductor.

El punto de referencia que sirve para comparar cualquier sustituto óseo es el injerto óseo convencional autólogo con esponjosa y cortical tomado de la cresta ilíaca; sin embargo, tiene algunos inconvenientes.

Así la disponibilidad de utilización del injerto óseo autólogo es limitada y muchos pacientes con problemas de reconstrucción complejos pueden tener que someterse a varias extracciones, dejando finalmente inservible la cresta ilíaca para este fin. Además, suele acompañarse de complicaciones mayores en el 8,6% y menores en el 20,6% de los casos (**Arrington y cols** 1996). Las complicaciones por la toma del injerto en la cresta ilíaca (zona donante por excelencia) pueden ser de este orden: hematoma, seroma, falso aneurisma, lesiones arteriales y nerviosas, alteraciones de la marcha, fracturas de ala ilíaca, lesión visceral y uretral, perforación del peritoneo, infección, inestabilidad sacroilíaca, dolor y alteraciones del crecimiento en niños. La reabsorción que tienen lugar tras el injerto es menor con hueso de mentón, rama ascendente o de calota (origen intramembranoso) que con el obtenido de la cresta iliaca (origen endocondral). Además recientemente se ha comprobado que los injertos de origen membranos poseen más factores de crecimiento IGF y TGF- $\beta$  que los de origen endocondral (**Finkelman y cols** 1992).

Por estas razones se recomienda tener otras opciones de aumento. Una alternativa a los injertos autólogos son los aloinjertos.

**Aloinjerto:** Se define como un tejido tomado a un sujeto e implantado a otro de la misma especie. En este sentido, el receptor se espera que haga una reacción inmune contra las células de un aloinjerto fresco, de manera que las preparaciones de aloinjerto óseo humano se procesen para retirar células y disminuir la reacción inmune del receptor. La retirada de restos celulares también disminuye la posibilidad de transplantar partículas de virus intracelulares.

Los aloinjertos se pueden clasificar según su anatomía, métodos de procesado y esterilización y propiedades de manejo. Al faltar células viables, los aloinjertos no aportan propiedades osteogénicas como el autoinjerto. La extensión de las propiedades ostoinductoras y osteoconductoras y la resistencia mecánica del aloinjerto varían en parte con los métodos de procesado del injerto. Los aloinjertos pueden transmitir enfermedades infecciosas y precisan de una infraestructura socio sanitaria compleja; los bancos de hueso precisan de una gran inversión con un elevado coste económico (**Schwartz y cols** 1998).

**Xenoinjerto:** Es un tejido óseo de una especie implantado a otra diferente. Una vigorosa respuesta inmunitaria impide el empleo de la mayor parte de preparaciones de xenoinjertos. El injerto óseo desproteinizado y desgrasado muestra una respuesta inmunitaria reducida, pero este proceso destruye también las proteínas de la matriz

osteoinductoras. El colágeno de bovino procesado derivado de hueso parece ser biocompatible y es el componente de varias preparaciones de injertos óseos actuales. También pueden tener una procedencia equina o porcina.

**Materiales Aloplásticos:** Son productos sintéticos biocompatibles que han permitido en parte una gran expansión de medios de injerto óseo disponible. Se clasifican en cerámicas, polímeros y composites. Están apareciendo varios materiales osteoconductores para la aplicación en cirugía ortopédica que varían mucho en osteoconductividad, osteoinductividad, fuerza mecánica y propiedades de manejo y coste.

Actualmente existe un gran desarrollo de las cerámicas y los compuestos de fosfato. Las más empleadas son las cerámicas, que pueden ser bioinertes (óxido de aluminio y óxido de titanio) o bioactivas (materiales de fosfato cálcico) (Lax 2004).

## **BIOMATERIALES**

Son sustancias sintéticas empleadas para sustituir o incrementar los tejidos biológicos. La European Society of Biomaterials define los biomateriales 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, es decir servir de estructura para la deposición de hueso nuevo (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.

**(Tabla 3)**

Origen	Tipos	Reabsorción
SINTÉTICAS	Densas	No
	Porosas	Si
NATURALES	Coralina	Lentamente
	Ficógena	Lentamente
	Bovina	Lentamente
	Porcina	Lentamente
	Equina	Lentamente
COMBINADAS	Bovino-Colágeno	Lentamente

**Tabla 3-** Principales tipos de Hidroxiapatitas. Tomada de (Sánchez y cols en 1993)

### HA. SINTÉTICAS

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

### 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 ( $\text{CaCO}_3$ ) 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 calcio-fosfato 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, pero en una proporción de 1,51, lo cual hace que el comportamiento de ambos biomateriales sea distinto.

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

Los **biovidrios o partículas de vidrio cerámico** están formados en un 45% por sílice ( $\text{SiO}_2$ ) 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**).

Los **polímeros** se utilizan en el campo de la ortopedia para la fabricación de válvulas cardíacas protésicas, prótesis de cabeza de femur, 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.

## **Características de un biomaterial para sustitución ósea**

Las características de un biomaterial deben ser:

<b>-Biocompatibilidad</b>
<b>-Osteoconducción</b>
<b>-Radiopacidad</b>
<b>-Facilidad de uso y manipulación</b>
<b>-Rechazo del crecimiento de los patógenos orales</b>
<b>-Hidrofilia</b>
<b>-Posibilidad de suministro en partículas o molde</b>
<b>-Actividad eléctrica de superficie</b>
<b>-Microporosidad</b>
<b>-Ausencia de acción alérgica</b>
<b>-Resistencia elevada a la compresión</b>
<b>-Precio económico</b>

**Tabla 4-** Características idóneas de un biomaterial. Tomado de **McKinney RV**. Implantes dentales endoóseos. Ed. Mosby 1993.

La osteoconducción corresponde a la cualidad pasiva de un material para asimilar el crecimiento óseo mediante la infiltración vascular y celular a partir de la zona de contacto con el tejido óseo receptor. Se trata de un proceso tridimensional que tiene lugar cuando se implanta un material poroso en el hueso, de manera que constituye un andamiaje o soporte para la formación de un nuevo tejido óseo.

**Jarcho** 1981, destacó la excelente capacidad de dirigir y permitir la formación ósea en íntimo contacto sobre las cerámicas de fosfato cálcico (considerando una unión química), la ausencia de respuesta inflamatoria o respuesta a cuerpo extraño, así como que los iones de calcio y fósforo derivados de los implantes entrarían en el "pool" corporal y serían utilizados como el resto de iones plasmáticos. Con respecto a la osteogenicidad de estos implantes afirmó que no se podía asegurar que inducían la formación de hueso, aunque sí eran capaces de "guiar" el crecimiento óseo a áreas que no estarían normalmente ocupadas. Esto fue llamado por algunos autores como "osteoconductividad" y "osteofilia".

No obstante, se debe diferenciar el término "osteoconducción" definido anteriormente del término "osteoinducción" que ( **Boyne** 1993), describió como sinónimo de "estimulación osteoblástica" e implica que el material utilizado como injerto tiene la capacidad de inducir la formación de hueso en un lugar donde no existe; mientras que la "osteoconducción" sería la capacidad del material de influir sobre las células programadas hacia osteoblastos para diferenciarse más rápida y eficazmente hacia la formación de hueso nuevo.

Diversos estudios han coincidido en señalar la capacidad osteoconductor de los biomateriales y xenoinjertos elaborados a partir de hidroxiapatita y fosfato cálcico confirmando, asimismo, su excelente comportamiento en ese sentido (**Meseguer-Olmo** 1993; **Meseguer y cols** 1994; **Thomas** 1994; **Galian** 1995; **Cornell y Lane** 1998; **Boyde y cols**, 1999; **Ikeda y cols** 1999; **Denissen y cols** 2000; **Walsh y cols** 2003; **Jun y cols** 2003). No obstante, existen referencias contradictorias. Así, los

estudios de (**Dahners y cols** 1984), no coinciden con la mayoría de los autores, al concluir que la hidroxiapatita y el colágeno no poseían capacidad osteoconductora y en que este último solo podría ser utilizado como agente hemostático.

Años más tarde, diversos estudios demostraron la importancia que tenían algunas características del material en el proceso de osteoconducción como: el tamaño del gránulo, el grado de interconexión entre ellos, la porosidad global del material y una serie de factores químicos, físico-químicos y biológicos estudiados por diferentes autores en la búsqueda de un biomaterial ideal (**Jarcho** 1981; **Klein y cols** 1983; **Holmes y cols** 1984; **Daculsi y cols** 1989; **Einhorn y Simon** 1990; **Meseguer-Olmo** 1993; **Galian** 1995; **Zyman y cols** 1998; **Cornell y Lane** 1998; **Andrade y cols** 2002).

Los biomateriales pueden tener una gran variedad de texturas, tamaños y formas. La proporción de reabsorción varía y depende de la estructura química del material, la porosidad y el tamaño de partícula.

### **Relación biodegradación, porosidad y densidad del material:**

**a) Biodegradación:** La biodegradación de la hidroxiapatita es un factor inherente a la compatibilidad del material. **Jarcho** en 1981, propuso dos mecanismos para explicar en qué consiste la degradación: el basado en la "solubilidad o mecanismo químico" y el basado en la "fagocitosis o mecanismo celular". El proceso de reabsorción se llevaría a cabo por un mecanismo celular a través de macrófagos y células gigantes

multinucleadas a cuerpo extraño y no por medio de osteoclastos como se había señalado. La superficie es otro factor imputable al material que afecta a la degradación biológica, de modo que, de forma general a mayor área de superficie mayor reabsorción. Así pues, los biomateriales densos con pequeña área de superficie se biodegradan más lentamente cuando se comparan con implantes porosos, por lo que la forma y la arquitectura del biomaterial tienen un profundo efecto sobre las tasas de reabsorción.

### **b) Porosidad:**

La diferente porosidad de los materiales está determinada por el tamaño del vacío o poro. La porosidad de las cerámicas fosfocálcicas se subdivide en tres tipos: la macroporosidad creada por la adición de un porógeno en el momento de la síntesis, corresponde a los poros de diámetro superior a varias decenas de micrones (arbitrariamente mayor o igual a 100  $\mu\text{m}$ ), la microporosidad, porosidad residual tras la síntesis, cuyos poros son de un diámetro inferior a una decena de micrones (menor de 5  $\mu\text{m}$  para otros autores) y la porosidad de conexión (ventanas) entre los macroporos, cuando los poros de la superficie del material comunican con los de la profundidad.

En el microporo, los fluidos biológicos se enriquecen de iones calcio y fósforo liberados por procesos de disolución intra y extracelular, creándose un nuevo equilibrio de saturación. Este fenómeno de precipitación conduce a que se formen cristales de apatita y a una calcificación precoz, que más tarde limita los fenómenos de intercambio, difusión y disolución. El uso de material macroporoso presenta las siguientes ventajas: una mayor fijación del implante al huésped que alude a

la fijación biológica inicial descrito por **Jarcho** en 1981, una posible reducción de la cápsula fibrosa, así como de las posibles propiedades carcinogénicas.

**c) Densidad:** Un implante de densidad alta supone una superficie con menor área de contacto lo que implica un grado bajo de reabsorción del material. A la inversa, un implante de baja densidad al aumentar el área de superficie implica una elevada capacidad de reabsorción. Los macroporos son rápidamente colonizados por células mesenquimales que se diferencian en osteoblastos evitando la encapsulación fibrosa del implante similar a la observada en las reacciones a cuerpo extraño, al contrario que cuando se utilizaban materiales densos o microporosos (**Jarcho** 1981; **Daculsi y cols** 1989; **Einhorn y Simon** 1990 y **Andrade y cols** 2002).

El hueso esponjoso autólogo continúa siendo el material más osteogénico y fiable para la reparación de los defectos óseos, siendo el hueso el tejido más frecuentemente transplantado después de la sangre (**Prolo y Rodrigo** 1985). Sin embargo, existen importantes desventajas asociadas con el uso de estos injertos, especialmente la limitada cantidad de éstos y la asociada morbilidad postoperatoria. De otra parte, el uso de aloinjertos con suficientes garantías de riesgo de contagio por VIH, (**Malinin** 1993) conlleva otra serie de problemas como disponibilidad y adquisición, así como un elevado coste económico (**Doncel y cols** 1989; **Fernández y cols** 1989).

El empleo de xenoinjertos, sólo o mezclado con hueso autólogo, para restaurar los rebordes alveolares es una alternativa predecible y cada vez

más utilizada según la bibliografía. A partir de especies bovinas, porcinas y equinas, se ha producido un material óseo poroso xenógeno que ha permitido limitar la resorción de los rebordes alveolares. Este material óseo de origen animal es sometido a un proceso para eliminar toda la materia orgánica, dejando sólo la parte inorgánica, compuesta fundamentalmente de hidroxiapatita, pero que también puede contener otras sustancias inorgánicas y orgánicas, dependiendo del proceso de elaboración. Dado que este producto inorgánico tiene la porosidad del hueso normal y contiene algo de carbonato y fosfato tricálcico, además de hidroxiapatita, siempre se produce alguna resorción osteoclástica del mismo. Este proceso de resorción lenta, unida a una respuesta favorable de remodelación y reconstrucción ósea, se prolonga durante mucho tiempo. El reborde alveolar se mantiene durante el tiempo en que se van reabsorbiendo y remodelando las partículas de mineral xenógeno (**Boyne** 1987).

El xenoinjerto óseo bovino desproteínizado mineralizado es uno de los biomateriales más estudiados e investigados experimentalmente según la bibliografía. Ha sido utilizado para la regeneración de alvéolos postextracción, en elevaciones de seno maxilar, reconstrucciones del reborde atrófico, etc. Igualmente se han hecho estudios clínicos combinándolo con membranas de colágeno así como con otros factores osteoinductores.

**Hockers y cols** en 1999, utilizaron hueso bovino (Bio-Oss<sup>®</sup>) de forma individualizada y combinado con hueso autólogo y membrana de colágeno para la regeneración ósea de defectos óseos periimplantarios

observando resultados similares de integración y regeneración ósea entre el hueso autólogo y el Bio-Oss<sup>®</sup>; asimismo la regeneración ósea era mayor cuando se utilizaban membranas y un injerto de soporte con una reabsorción lenta en el tiempo, como es el caso del Bio-Oss<sup>®</sup>.

**Van Steenberghe y cols** en 2000, utilizaron el Bio-Oss<sup>®</sup> como material de relleno del gap residual entre el implante y el alveolo en implantes inmediatos postextracción obteniendo resultados muy beneficiosos en la osteointegración del implante.

**Hising y cols** en 2001, realizaron un estudio clínico sobre 61 pacientes que presentaban una cresta alveolar severamente reabsorbida tratándola mediante implantes dentales y hueso mineralizado bovino mezclado con hueso autólogo de mentón en el 73% de los casos, para su reconstrucción. Realizaron la regeneración ósea de la cresta alveolar en anchura, en altura, mediante elevación de seno maxilar y en elevación de suelo de la cavidad nasal. Después de 12 meses de integración del xenoinjerto, se insertaron 231 implantes colocando la prótesis al año; se estimó una supervivencia de los implantes del 80.5 %.

**Norton y cols** en 2003, demostraron la eficacia del hueso mineralizado bovino en el aumento del reborde alveolar en humanos considerándola una técnica predecible y exitosa. Otros autores combinaron el xenoinjerto con membranas de titanio para evitar el colapso y la reabsorción del injerto en el tiempo (**Artzi y cols** 2003).

Otros autores como **Cornelini y cols** en 2004, utilizaron Bio-Oss<sup>®</sup> con membranas de colágeno (Biogide<sup>®</sup>) para mejorar la cicatrización del defecto óseo alrededor del implante colocado en alvéolos postextracción

comparándolo con la colocación de la membrana de colágeno (Biogide®) individual sobre el implante insertado en el alveolo. Los resultados demostraron que el uso de hueso mineral desproteinizado bovino con una membrana de colágeno sobre el defecto entre el implante y el alveolo residual postextracción ofrece ventajas significativas en zonas donde existan demandas estéticas en términos de soporte de tejidos blandos.

El xenoinjerto óseo bovino también ha sido ampliamente utilizado en periodoncia. **Houser y cols** en 2001, realizaron un estudio comparativo en el tratamiento de lesiones de furca clase II en molares mandibulares usando Bio-Oss® con una membrana de colágeno (Biogide®) comparándolo con el tratamiento convencional de desbridamiento quirúrgico de la lesión con colgajo a “cielo abierto”. El tratamiento con Bio-Oss® y Biogide® ofrecía mejores resultados de regeneración ósea que el tratamiento convencional.

**Sculean y cols** en 2003, realizaron un estudio similar comparando dos tipos de tratamiento de defectos intraóseos mediante el uso de xenoinjerto bovino más una membrana de colágeno o bien mediante desbridamiento quirúrgico convencional de la lesión obteniendo resultados similares.

Estos mismos autores, **Sculean y cols** en 2004, realizaron posteriormente el estudio histológico en pacientes con enfermedad periodontal realizando regeneración tisular guiada sobre dientes en los que estaba indicada la exodoncia. La regeneración la realizaron de dos modos, mediante xenoinjerto bovino más membrana de colágeno y mediante xenoinjerto bovino mezclado con colágeno más membrana de

colágeno. Pasados 6 meses del tratamiento, realizaron la exodoncia de los dientes tratados junto con tejidos blandos y duros periodontales para realizar el estudio histológico. Comprobaron que ambos tipos de tratamiento conseguían unos resultados adecuados de regeneración periodontal, observando formación de nuevo hueso y cemento, con la inclusión de partículas del xenoinjerto en el hueso autólogo remanente.

En casos de maxilares atróficos con rebordes alveolares posteriores severamente reabsorbidos y senos maxilares pneumatizados, es necesario realizar la elevación de la mucosa sinusal con la colocación de un injerto de hueso para poder insertar los implantes dentales.

Existen múltiples estudios sobre los diferentes injertos que se utilizan para regenerar estos rebordes, desde el uso de injertos autólogos particulados o en bloque, hasta el uso de xenoinjertos individuales o mezclados con hueso autólogo.

**Yildirim y cols** en 2000, evaluaron la formación de nuevo hueso usando Bio-Oss<sup>®</sup> mezclado con sangre venosa en elevaciones de seno. Comprobaron que se produce tejido óseo nuevo, observando los gránulos del xenoinjerto dentro del nuevo tejido óseo así como la presencia de puentes entre las trabéculas neoformadas y los gránulos de Bio-Oss<sup>®</sup>. También observaron escasa actividad osteoclástica lo que indica la lenta reabsorción del xenoinjerto que actuaría como un andamiaje para la formación ósea sin que se origine un colapso sobre la zona injertada. El éxito de los implantes colocados sobre el injerto fue del 89,5% siendo por tanto una técnica fiable y predecible.

En esa misma línea de investigación, **Yildirim y cols en 2001**, realizaron otro estudio en humanos, en el que valoraron histológicamente la nueva formación de tejido óseo en elevación de seno utilizando nuevamente Bio-Oss<sup>®</sup>, pero aquí lo mezclaron con hueso autólogo obtenido de la región retromolar, sínfisis y de la tuberosidad maxilar. A los 7 meses colocaron los implantes y tomaron biopsias. El análisis histológico demostró que el Bio-Oss<sup>®</sup> se integró muy bien en el nuevo hueso formado. La combinación del Bio-Oss<sup>®</sup> con hueso autólogo osteoinductor constituye por tanto una técnica de elección de eficacia probada para la elevación de seno maxilar.

Otros autores como **Tawil y Mawla en 2001**, compararon el porcentaje de éxito de implantes dentales colocados tras la elevación del seno maxilar usando xenoinjerto bovino combinado con membrana o sin ella, colocando los implantes en el mismo momento de la elevación o de manera diferida cargando el implante antes de los nueve meses o bien después. Obtuvieron un mayor porcentaje de éxito en aquellos casos en los que el xenoinjerto se colocó con una membrana de barrera, cuando los implantes se colocaron de manera diferida a la elevación de seno maxilar y en aquellos casos en que se realizó la colocación de la prótesis transcurridos más de nueve meses después de la colocación de los implantes.

Otros autores como **Schlegel y cols en 2003**, realizaron el estudio histológico en perros comparando dos modalidades de injerto en elevaciones de seno; para ello utilizaron en un grupo, chips de hueso autólogo y en otro, hueso mineralizado desproteinizado bovino.

Comprobaron que a corto plazo, la reabsorción ósea era mayor en las elevaciones de seno con el xenoinjerto; no obstante, a largo plazo observaron menor disminución del volumen del injerto óseo en las elevaciones de seno realizadas con Bio-Oss<sup>®</sup> debido al lento remodelado óseo que sufre, siendo por tanto una elección de injerto recomendable en la técnica de elevación de seno maxilar.

**Hatano y cols** en 2004, realizaron un estudio similar en elevaciones de seno maxilar utilizando como injerto una combinación de hueso autólogo con xenoinjerto bovino con una relación de 2:1 y la colocación simultánea de los implantes dentales. Del mismo modo valoraron la importancia de la elevada estabilidad que presenta el xenoinjerto óseo bovino en el tiempo para disminuir al máximo la reabsorción del volumen injertado.

Existen pocos estudios sobre xenoinjertos óseos de origen porcino en la literatura aplicados en cirugía bucal. **Voza y cols** en 2004, realizaron el estudio clínico e histológico en la elevación del seno maxilar con xenoinjerto de hidroxiapatita y colágeno porcino, colocando los implantes simultáneamente. A los 6 meses rehabilitaron protéticamente los implantes y realizaron biopsias de la zona injertada observando una integración completa del biomaterial sin evidencia de pérdida de hueso cresta alveolar, afirmando que el xenoinjerto óseo de origen porcino en la elevación de seno maxilar y colocación simultánea de los implantes dentales era una técnica exitosa y predecible en el tiempo.

En la misma línea, **Barone y cols** 2005, compararon histológicamente en la técnica de elevación de seno maxilar, el injerto

óseo autólogo con una combinación de injerto óseo autólogo con xenoinjerto óseo corticoesponjoso de origen porcino en una proporción 1:1. Realizaron las biopsias a los 5 meses de la inserción del injerto, no encontrando diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, afirmaron que el xenoinjerto óseo corticoesponjoso de origen porcino en combinación con el hueso autólogo en la elevación de seno maxilar, es una técnica predecible y exitosa en aquellos casos de atrofas maxilares severas.

Otros autores como **Arcuri y cols** en 2005, realizaron un estudio clínico e histológico de hueso y colágeno porcino en pasta rellenando alvéolos postextracción. Realizaron las biopsias a los tres meses de la implantación y observaron sustitución completa del injerto por tejido óseo cortical sobre una matriz osteoide. Sin embargo, afirmaron que este tipo de injerto está indicado en aquellos defectos óseos no superiores a 2 mm así como en regeneración periodontal, pero no en defectos óseos muy importantes.

**Cardaropoli D y Cardaropoli G** en 2008, en otro estudio clínico e histológico realizaron la implantación de un xenoinjerto de origen porcino en forma granulada cubierto por una membrana de colágeno en alveolos postextracción para comprobar su preservación. Tras 4 meses los resultados confirman la probabilidad de mantener la forma original de la cresta, permitiendo la colocación de los implantes sobre unos niveles óptimos de hueso y tejido gingival.

**Nannmakan y Sennerby** en 2008, evaluó la respuesta del hueso ante un xenoinjerto de origen porcino mezclado con un gel colágeno, para

comprobar la influencia del gel sobre la respuesta ósea, llegando a la conclusión de que esta mezcla aumentaría el manejo clínico no interfiriendo en el proceso de osteoconducción y siendo reabsorbida con el tiempo.

### **Asociación de biomateriales y células osteogénicas:**

A lo largo de la revisión bibliográfica, ha quedado reflejado que la mayoría de los biomateriales de fosfato calcio e hidroxiapatita tienen propiedades osteoconductoras, pero ninguno de ellos es capaz de inducir la formación de hueso, limitándose por ello su utilización en rellenos de pequeño tamaño.

Con objeto de mejorar esta deficiencia, se han diseñado diferentes asociaciones de biomateriales y células de estirpe osteogénica, para conseguir la rápida colonización de las mismas. Para el desarrollo de este material deben darse dos condiciones, que las células que se unan al elemento fosfocálcico produzcan tejido óseo lo más rápidamente posible y que el biomaterial tenga unas características físicas que pueda acoger a las células para que estas desarrollen y conserven su actividad.

Se suelen utilizar dos tipos principales de células osteogénicas, osteoblastos diferenciados procedentes de explantes del hueso que muestran escaso potencial proliferativo, así como dificultad para mantener su fenotipo "in vitro"; y células de origen mesenquimal derivadas de la médula ósea como osteoblastos, fibroblastos y adipocitos, que muestran gran capacidad de proliferación y poder osteogénico. El empleo de células procedentes de la médula ósea permite además aportar al punto de

implantación, células implicadas en la degradación de la hidroxiapatita, como osteoclastos, monocitos-macrófagos o precursores de células hematopoyéticas.

Diversos estudios han utilizado células progenitoras asociadas a biomateriales constituidos por cerámicas fosfocálcicas, tales como los de **Ohgushi y cols** en 1992, quienes utilizaron células mesenquimales de médula ósea; posteriormente **Faucheux y cols** en 1994, experimentaron con clones de precursores osteoblásticos; **Petite y cols** en 1996, trabajaron con células madre de la médula ósea y **Jaiswai y cols** en 1997, utilizaron el cultivo policlonal de progenitores osteoblásticos. A pesar de que todos utilizaron distintas células así como diversos materiales, observaron crecimiento de tejido óseo superior al observado tras el implante de la cerámica sin células, lo que indicaba una capacidad osteogénica y de osteoinducción que alentaba a proseguir los experimentos.

**Yoshikawa y cols** en 1998, emplearon células cultivadas de médula ósea combinadas con cerámica porosa de hidroxiapatita en presencia de dexametasona y glicerofosfatos, realizando el estudio "in vitro" e "in vivo" mediante el implante intraperitoneal de estas cerámicas en ratones. Observaron crecimiento de tejido óseo en todos los casos, lo que parece demostrar el potencial osteogénico de las células cultivadas sobre la cerámica de hidroxiapatita. Sin embargo, **Bruder y cols** en 1998, trabajaron con células mesenquimales cultivadas a las que impregnaron cerámicas bifásicas de hidroxiapatita porosa (65%) y fosfato tricálcico (35%) que posteriormente eran introducidas en defectos óseos segmentarios realizados en fémures de perros. Comprobaron mayor

formación ósea en los defectos óseos rellenados con cerámicas provistas de células que en aquellos rellenados sólo con la cerámica.

Los estudios de **Anselme y cols** en 1999, demostraron la capacidad osteoinductiva de la combinación de una cerámica de hidroxiapatita sobre la que se habían implantado células óseas cultivadas, tras la colocación de este material híbrido en una zona muscular de conejo. También **Kon y cols** en 2000, utilizaron células madre de médula ósea sobre cerámica de hidroxiapatita implantadas en defectos creados en huesos largos de oveja, comprobando un potencial osteogénico mayor que cuando utilizaban la hidroxiapatita de forma individualizada, recomendando este procedimiento para su utilización en el tratamiento de defectos de huesos largos. Posteriormente **Bareille y cols** 2000, utilizaron técnicas inmunohistoquímicas para demostrar crecimiento celular sobre los bloques de hidroxiapatita, a los que se les había añadido células de médula ósea humana para implantarlas después subcutáneamente en ratones.

En los trabajos desarrollados por **Akahane y cols** en 2002, utilizaron la hidroxiapatita como transportador de células de médula ósea, a las que infectaron con un retrovirus y observaron crecimiento óseo con osteoblastos y osteocitos normales, sin que el retrovirus impidiera la formación de tejido óseo, por lo que consideraron a la hidroxiapatita como un método ideal para el transporte de células de la médula ósea. En el mismo año, **Cerroni y cols** en 2002, realizaron el estudio del crecimiento celular "in vitro" introduciendo dos líneas celulares de fibroblastos sobre dos bloques de hidroxiapatita sintética con volumen poroso de 30-40% y

50-60% respectivamente y también sobre una hidroxiapatita natural procedente del coral. En todas las cerámicas se produjo proliferación celular sin alteraciones morfológicas.

Recientemente **Chouteau y cols** en 2003, realizaron un estudio "in vitro" del crecimiento de osteoblastos y fibroblastos sobre una cerámica fosfocálcica macropórica (70% hidroxiapatita y 30% fosfato tricálcico) concluyendo que el material fosfocálcico presentaba características osteoconductoras pero no osteoinductivas, que podrían desarrollarse mediante la asociación híbrida de cerámica fosfocálcica y células osteogénicas.

De igual modo, **Uemura y cols** 2003, en su trabajo, utilizaron como material de andamiaje para el crecimiento celular, dos clases de cerámicas porosas de hidroxiapatita y fosfato tricálcico  $\beta$ -poroso y un nuevo colágeno. Mediante un sistema de presión baja y de perfusión que facilitaba el crecimiento celular sobre las cerámicas dando lugar a la regeneración de defectos óseos.

**Fischer y cols** en 2003, variaron el tamaño del gránulo y la microporosidad de las partículas de hidroxiapatita, usando hidroxiapatita densa e hidroxiapatita microporosa, con dos tamaños de gránulo, 212-300  $\mu\text{m}$  y 500-706  $\mu\text{m}$ . A continuación cultivaron células madre mesenquimales en condiciones de diferenciación osteoblástica sobre los dos tipos de hidroxiapatita durante una semana, observando una mayor diferenciación, proliferación y actividad osteoblástica en la hidroxiapatita de rango menor (212-300  $\mu\text{m}$ ).

En otros estudios como los de **Takahashi y cols** en 2005, consiguieron cultivar y diferenciar osteoblastos sobre un biomaterial de  $\beta$ -fosfato tricálcico con un tamaño de gránulo de 180-200  $\mu\text{m}$ . Asimismo, en un estudio “in vitro” realizado por **Weissenboeck y cols** 2006, cultivaron células madre mesenquimales bajo condiciones de diferenciación osteoblástica sobre partículas de hidroxiapatita de distinto tamaño, observando que con un tamaño de gránulo de 10-100  $\mu\text{m}$  observaban un mayor crecimiento osteoblástico así como una mayor actividad celular a los 9 días del cultivo; sin embargo, cuando el tamaño de partícula era mayor, entre 600 y 1000  $\mu\text{m}$ , se producía una mayor producción de colágeno tipo I. También demostraron que el tamaño del gránulo no variaba la secreción de osteocalcina y osteopontina.

#### **Asociación de biomateriales y principios activos:**

Las sustancias farmacológicas administradas por vía oral o parenteral presentan a menudo una vida media excesivamente corta y conllevan riesgos de toxicidad sistémica para alcanzar el efecto local deseado. Con el fin de atenuar tales inconvenientes se han ideado sistemas de liberación de principios activos denominados Drug Delivery Systems (DDS). El principio fundamental de los DDS consiste en liberar productos farmacológicamente activos "in situ" de forma prolongada y constante, en concentraciones suficientes y no tóxicas.

Estas asociaciones ya han sido experimentadas utilizando una cerámica de fosfato cálcico como matriz. Permiten conseguir dos acciones sinérgicas "in situ": una acción terapéutica mediante la liberación

prolongada de un principio activo, y otra de soporte, mediante la formación de hueso nuevo a través de la cerámica. Diversos trabajos muestran que este tipo de liberación puede emplearse para conferir al biomaterial propiedades osteoinductoras (asociadas con proteínas osteogénicas) o para el tratamiento de determinadas patologías óseas (infecciones, tumores, osteoporosis) (**Urist y cols** 1984, 1987; **Shinto y cols** 1992; **Uchida y cols** 1992; **Yamamura y cols** 1992; **Ohgushi y cols** 1992; **Faucheux y cols** 1994; **Arm y cols** 1996; **Lind y cols** 1996; **Petite y cols** 1996; **Denissen y cols** 1997; **Guicheux y cols** 1997 ; **Jaiswai y cols** 1997; **Hallman y cols** 2001,2002).

**Urist y cols** en 1984, 1987, describieron el aumento del crecimiento óseo cuando utilizaban proteína morfogenética junto con cerámicas de fosfato tricálcico.

Posteriormente **Fang y cols** en 1996, desarrollaron un nuevo concepto, según el cual se considera a la cerámica fosfocálcica como un sistema de liberación de ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico que codifica factores osteogénicos de la proteína morfogenética ósea (BMP) y paratohormona (PTH). Observaron que tras su implantación en diáfisis femoral de rata era posible transferir células mesenquimatosas "in situ" y de este modo, desarrollar una población celular genéticamente modificada y dispuesta a producir proteínas con capacidad osteogénica.

**Lind y cols** en 1996, utilizaron factor de crecimiento Beta-1 sobre cerámicas de fosfato tricálcico y las implantaron en defectos óseos desarrollados en perros, demostrando la capacidad osteogénica así como crecimiento celular en los lugares de implante.

**Guicheux y cols** en 1997, observaron en su estudio la capacidad osteogénica de las hormonas de crecimiento.

**Koempel y cols** en 1998, demostraron que la proteína morfogenética-2 (BMP-2) puede ser adsorbida sobre una cerámica de hidroxiapatita e incluso promover el crecimiento de tejido óseo tras su colocación en bolsillos subperiósticos de cráneo en conejos, por lo que concluyeron que la unión de la BMP-2 y cerámica de hidroxiapatita era biocompatible, presentaba capacidad osteoconductiva y fácil osteointegración con una gran fijación ósea, recomendando su empleo en cirugía cráneo-maxilofacial y de reconstrucción.

También **Takahashi y cols** en 1999, utilizaron cerámica de hidroxiapatita junto con BMP-2 para realizar la fusión espinal anterior en cabras observando un 100% de fusión cuando utilizaban dosis elevadas (50  $\mu\mu$ ) de BMP-2 frente al 50% cuando no la utilizaban o en las dosis bajas (5  $\mu\mu$ ), demostrando de esta manera la gran capacidad osteogénica y osteoinductora de la BMP-2.

Los estudios experimentales desarrollados por **Zambonin** demostraron la potenciación de la actividad osteoblástica sobre cubiertas de hidroxiapatita a las que añadían IGF1 (insulin-like growth factor 1) (**Zambonin y cols** 1999, 2000).

**Lind y cols** en 2000, estudiaron la interposición de relleno con OP-1 (osteogenic protein) sobre transportador colágeno con buenos resultados.

En la investigación llevada a cabo por **Noshi y cols** en 2000, utilizando un compuesto de hidroxiapatita porosa a la que unían células mesenquimales y proteína morfogenética procedente de hueso bovino que

se implantaba de forma subcutánea en ratas machos, demostraron una capacidad osteogénica mayor cuando se combinaban los tres elementos que cuando se colocaban solo las células mesenquimales sobre la cerámica o la proteína morfogenética, indicando los importantes beneficios que presentaba unir la proteína morfogenética a células mesenquimales y cerámica de hidroxiapatita; no obstante, concluyeron que eran necesarios más estudios "in vivo" antes de poder ser utilizados en la clínica diaria.

Recientemente, **Abiraman y cols** en 2002, han demostrado la capacidad de osteoinducción de la "cola" de fibrina en la formación y reparación ósea, al utilizarla junto con cerámicas de hidroxiapatita, biovidrio y silicato de fosfato cálcico, al observar crecimiento del tejido óseo en todas las cerámicas tras su implantación en músculo, por lo que consideraron a la fibrina como el pegamento biológico con potencial osteoinductivo.

Por su parte, **Cheng y cols** en 2002, demostraron la capacidad osteoinductora de la PMB-4 que combinada con hidroxiapatita y fosfato tricálcico provocaban una fusión lumbar posterior, ya que se necesitaban dosis diez veces más bajas que las proteínas morfogenéticas 2 y 7.

Por otra parte, además de las cerámicas, también se ha investigado con xenoinjertos óseos como transportadores de distintos principios activos. **Terheyden y cols** en 1999, realizan un estudio histológico en cerdos realizando técnicas de elevación de seno maxilar y posterior injerto de hueso bovino mineralizado desproteinizado (Bio-Oss<sup>®</sup>) mezclado con una proteína osteoinductiva (proteína humana recombinada osteogénica,

rh OP-1) y colocación simultánea de los implantes dentales. Analizaron el grado de osificación y el contacto implante-hueso (BIC) a los seis meses, comprobando que la osificación y el BIC habían sido mayores en aquellos casos en los que se usó el Bio-Oss<sup>®</sup> mezclado con la rhOP-1.

**Pietruska** en 2001, realizó el estudio comparativo clínico y radiográfico de dos modalidades de tratamiento de regeneración ósea de defectos periodontales mediante Bio-Oss<sup>®</sup> o bien usando un derivado de la matriz de proteínas de esmalte (Emdogain<sup>®</sup>). Realizó exámenes clínicos y radiográficos antes y un año después del tratamiento. Todos los parámetros clínicos y radiográficos mejoraron significativamente en ambos grupos de tratamiento sin que existieran diferencias significativas entre las dos modalidades de tratamiento demostrando la capacidad del xenoinjerto bovino para la regeneración ósea.

Posteriormente, **Sculean y cols** en 2003 y 2004, combinaron ambos tipos de tratamiento valorando parámetros clínicos e histológicos en pacientes con defectos óseos periodontales. Compararon dos modalidades de tratamiento, una mediante una mezcla de Bio-Oss<sup>®</sup> y Emdogain<sup>®</sup> y otra usando Bio-Oss<sup>®</sup> solamente. Comprobaron una mejora significativa de los parámetros clínicos e histológicos en ambos tipos de tratamiento sin diferencias significativas entre ellos. Observaron además la formación de nuevo tejido conectivo de inserción a partir de cementoblastos y fibras colágenas, además de la formación de nuevo tejido óseo periodontal, pero como demostró en otros estudios, no existía contacto directo entre las partículas del xenoinjerto y la superficie radicular (dentina o cemento). Estos mismos autores en un estudio posterior de 2004, compararon los

resultados sobre el tratamiento de defectos óseos periodontales usando una combinación de Bio-Oss<sup>®</sup>, Emdogain<sup>®</sup> y membrana de colágeno, observando unos valores similares de regeneración de nuevo tejido óseo, cemento y ligamento periodontal.

**Vasilic y cols** en 2003, realizaron la regeneración ósea de rebordes alveolares postextracción mediante hueso poroso mineralizado bovino, combinado con una membrana de colágeno o bien mezclado con el sistema fibrinógeno/fibronectina autólogo (plasma rico en factores de crecimiento). Compararon ambos tipos de tratamiento llegando a una serie de conclusiones; observaron una mayor regeneración ósea estadísticamente significativa en los alvéolos tratados con Bio-Oss<sup>®</sup> y membrana que en aquellos tratados con Bio-Oss<sup>®</sup> mezclado con plasma rico en factores de crecimiento; sin embargo no observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la reabsorción alveolar en altura pero sí en los valores de reabsorción alveolar en sentido horizontal, que era menor en los casos tratados con Bio-Oss<sup>®</sup> y membrana de colágeno. Por tanto estos autores defendían que la regeneración ósea de los alvéolos postextracción mediante Bio-Oss<sup>®</sup> y membrana de colágeno suponía una preservación mayor de las dimensiones del reborde alveolar que aquellos tratados con xenoinjerto mezclado con plasma rico en factores de crecimiento, en los que observaron solo una cicatrización más rápida de los tejidos blandos. Sin embargo (**Wojtowick y cols** 2003; **Rodríguez y cols** 2003; **Hanna y cols** 2004), obtienen resultados muy favorables en el tratamiento del proceso alveolar atrófico, en elevación del seno maxilar y en el relleno de defectos óseos periodontales

respectivamente, mediante Bio-Oss combinado con plasma rico en factores de crecimiento.

**Scabbia y cols** en 2004, realizaron el estudio de regeneración ósea comparando el tratamiento de los defectos óseos usando Bio-Oss<sup>®</sup> con el tratamiento mediante una combinación de hidroxiapatita sintética más colágeno tipo I de origen equino y condroitin sulfato (Biostite<sup>®</sup>). No encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de tratamiento en los distintos parámetros estudiados, profundidad de bolsa periodontal, nivel de inserción clínica y en la profundidad del defecto óseo radiológicamente. Ambos tipos de tratamiento demostraron ser exitosos y predecibles en la regeneración ósea de defectos periodontales.

**Philippart y cols** en 2005, llevan a cabo elevaciones de seno maxilar injertando de 5 a 10 ml de una pasta compuesta de hueso autólogo obtenido de la calota con un diámetro de partícula < 1 mm, un 50% de hueso bovino inorgánico mineralizado (PepGen P-15), plasma rico en plaquetas ( $1.8 \times 10^6$  plaquetas/mm<sup>3</sup> de plasma) y alrededor de 1 microgramo de rhTF (factor tisular humano recombinado). Realizaron estudios histológicos a los 6 y 10 meses después del injerto. Demostraron histológicamente una elevada integración de las partículas del xenoinjerto en el nuevo tejido óseo formado, observando colonización de osteocitos y osteoblastos circundantes. El uso de xenoinjertos óseos en pasta de hueso, supone una alternativa fácil y cómoda para el paciente consiguiendo un óptimo resultado en la capacidad de regeneración ósea a lo largo del tiempo. El injerto sinusal demostró una intensa formación de tejido óseo a

los 6 meses de su colocación y un incremento en el tiempo del crecimiento óseo a los 10 meses.

Las perspectivas de los compuestos que incorporan células osteogénicas o principios activos específicos (factores de crecimiento, antibióticos, antimicóticos) a los materiales ya conocidos servirán para abrir campos de aplicación, tanto más si tenemos en cuenta que estos compuestos activos serán introducidos por técnicas quirúrgicas poco invasivas.

Así aplicado al campo de la implantología diversos autores intentan potenciar la osteointegración, a través del perfeccionamiento o aumento de los mecanismos intrínsecos de la respuesta celular, por ejemplo, la incorporación de FGF-2 y la melatonina (**Takechi y cols** 2008) utilizó esta mezcla para promover la osteogénesis alrededor de los implantes. Basándose en dichos estudios y otros anteriores como son los de (**Reiter**, 1991), el cual demostró que la melatonina podía estimular la diferenciación primaria de osteoblastos en cultivo, (**Roth y cols** 1999), demostraron la capacidad de la melatonina para promover la diferenciación celular y mineralización en cultivos de preosteoblastos. Asimismo, la melatonina incrementa la producción de colágeno tipo I, y puede modular in vitro la expresión de sialoproteína así como aumentar la expresión de otros marcadores óseos incluida la fosfatasa alcalina, la osteopontina, y la osteoclastona (**Nakade y cols** 1999) reconoció que la melatonina por sí sola podría incrementar el volumen óseo in vivo.

## **Fisiología de la melatonina**

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina descrita por (**Mc Cord y Allen 1917**) y aislada por (**Lerner y cols 1958**), al buscar un factor que pudiese ser responsable del vitíligo en humanos, descubrieron que dicha molécula aclaraba la piel y le dieron el nombre de melatonina al relacionar su función con el pigmento melanina y su estructura con la serotonina. Se trata de un cristal orgánico, de color blanco, cuyo peso molecular es de 232,38 Da y un punto de fusión entre 116 y 118 °, altamente liposoluble (**Smuszkovicz y cols 1960**).

## **Biosíntesis de la melatonina**

La melatonina se sintetiza a partir del triptófano, aminoácido aromático esencial, en la glándula pineal. (**Fig. 2**) Además de ser sintetizada en los pinealocitos, la melatonina también es sintetizada en otros tejidos como la retina, (**Grace y cols 1991**), cuerpo ciliado del iris (**Aimoto y cols 1985**), glándula lacrimal (**Mhatre y cols 1988**), médula ósea (**Tan y cols 1999**), aparato digestivo (**Huether y cols,1992**), ovario(**Itoh y cols 1997**), sistema inmune (**Guerrero y Reiter 2002**), resultando mayores los niveles de melatonina a nivel tisular que en el plasma (**Reiter y Tan 2003**).

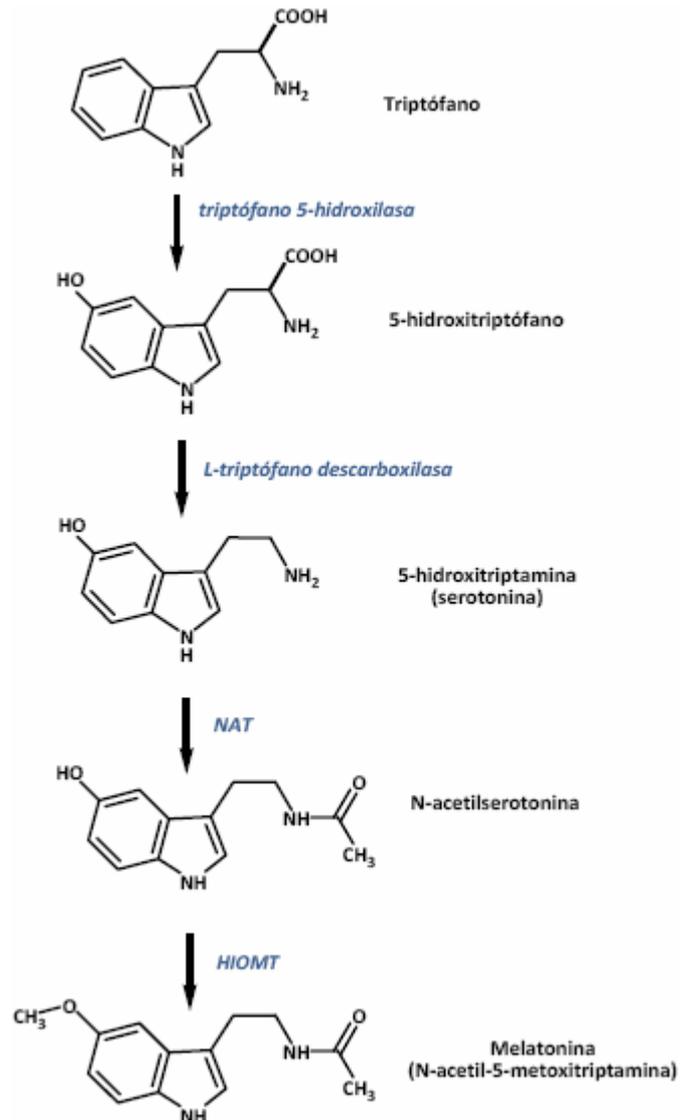


Fig 2.- Biosíntesis de la melatonina a partir del triptófano. Tomada de (Fuentes-Broto L 2008).

La biosíntesis pineal comienza con la captación del triptófano a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico. Dentro de la célula el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano por la

enzima triptófano hidrolasa. La enzima 5-hidroxitriptofano hidrolasa (5-HT) o serotonina.

La serotonina tiene dos vías principales de metabolización en la glándula pineal, puede desaminarse por la acción de la MAO o convertirse en melatonina por la acción de dos enzimas que actúan sucesivamente:

Primero la N-acetil-transferasa NAT que presenta un marcado ritmo circadiano y le transfiere a la serotonina un grupo acetilo del cofactor acetil coenzima A dando lugar a la N-acetil-5-hidroxitriptamina o N-acetil-serotonina. A continuación la enzima hidroxidol-O-metil-transferasa (HIOMT) va a transferir a la N-acetil-serotonina un grupo metilo de un cofactor de S-adenosil-melatonina y convertirla en **N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina**.

La actividad de la NAT determina el ritmo de producción de la hormona y puede regularse mediante su expresión génica o mediante la activación y estabilidad de la enzima (**Hardeland y Poeggeler 2007**).

La expresión de la enzima se puede regular por una vía nerviosa controlada por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Comienza en la retina y continúa a través de los axones de las células ganglionares. (**Lewy y cols 1980**). En el quiasma óptico estas fibras se separan del tracto óptico principalmente para dirigirse al núcleo supraquiasmático, de ahí se proyectan al núcleo paraventricular del hipotálamo desde donde se dirigen a la columna intermediolateral de la médula espinal torácica, origen de las terminaciones preganglionares que alcanzan al ganglio cervical superior, finalmente las fibras postganglionares se introducen en el parénquima pineal y llegan a los pinealocitos. El estímulo lumínico

durante el día mantiene hiperpolarizados los fotorreceptores, lo cual impide la liberación de noradrenalina, en ausencia de luz los fotorreceptores generan potenciales de acción que son conducidos por esta vía neuronal hasta los terminales sinápticos que liberan noradrenalina que se unen a los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$   $\beta_1$  del pinealocito (**Reiter** 1991).

Esta reacción se traduce en un incremento de la expresión y actividad de la NAT, aumentando como consecuencia las concentraciones de melatonina (**Hardeland y cols** 2003,2005, 2007).

Recientemente se ha demostrado la presencia de los genes que codifican las enzimas NAT y HIOMT claves para la síntesis de la melatonina, por lo que cada tejido es capaz de producir la melatonina que necesita en cada momento independiente de la melatonina circulante. **Stefuji y cols** 2001.

### **Metabolismo de la melatonina**

La degradación de la melatonina se produce en primer lugar en el hígado y secundariamente en el riñón. En el hígado sufre una 6-hidroxilación gracias a la acción de las enzimas del citocromo P<sub>450</sub> siendo excretada en la orina en forma de compuestos sulfatados y glucoronados. (**Ma y cols** 2005).

La melatonina puede seguir otra vía catabólica en la que es desacetilada a 5-metoxitriptamina, la cual es desaminada por la MAO que produce 5-metoxiindol-3-acetaldehído, convirtiéndose este por la aldehído deshidrogenasa en ácido-5-metoxiindolacético y por la acción del la alcohol deshidrogenasa a 5-metoxitriptofol (**Grace y cols** 1991).

### Regulación de la secreción de melatonina

La glándula pineal es un órgano neuroendocrino que convierte la información externa, fotoperiodo, en un mensaje interno hormonal para la regulación de los sitios diana periféricos. (Fig. 3)

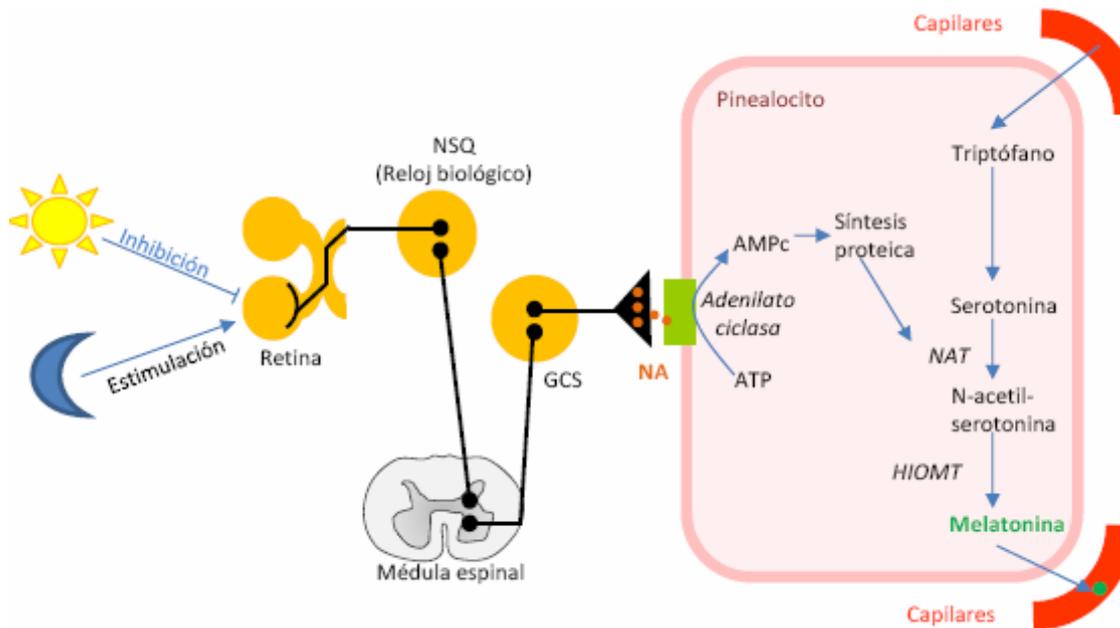


Fig 3.-Vía nerviosa de la regulación de la síntesis de melatonina.Tomada de (Fuentes-Broto L 2008).

La síntesis de la melatonina se caracteriza por incrementarse nocturnamente o durante la oscuridad. La magnitud y duración en el incremento nocturno es dependiente de la longitud de la fase de oscuridad del ciclo fotoperiodo y actúa como un reloj para la regulación de las actividades biológicas. Siendo este un mensaje de oscuridad y no de periodo de sueño. La síntesis pineal de la melatonina es conducida por un oscilador circadiano en el núcleo supraquiasmático hipotalámico a través de una vía neural multisináptica que incluye terminales nerviosos sinápticos que se proyectan desde el ganglio cervical superior a la glándula pineal (Reiter 1991).

## Mecanismos de Acción

Pueden dividirse en dos, aquellos mediados por su unión a un receptor tanto de membrana como nuclear y aquellos que se realizan de forma independiente del receptor. (Fig. 4)

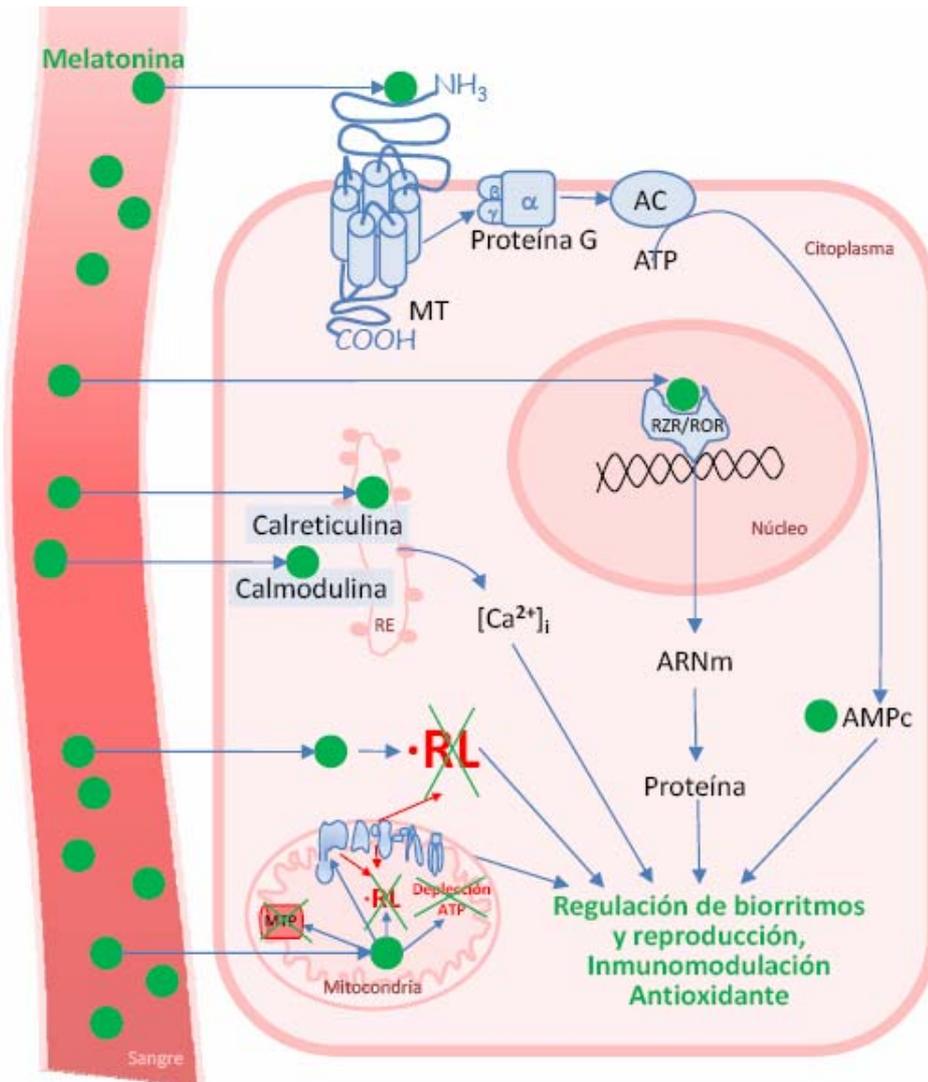


Fig 4.- Principales mecanismos de acción de la melatonina. Tomada de (Fuentes-Broto L 2008).

## **Mecanismos mediados por receptor**

Los efectos de la melatonina están mediados por receptores de alta afinidad. Estos receptores se ha identificado en diversos tejidos diana sobre los que la melatonina ejercería algunas de sus funciones fisiológicas. Podemos distinguir dos receptores: de alta afinidad  $MT_1$   $MT_2$  y receptores de baja afinidad  $MT_3$ .

Los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  son receptores de membrana acoplados a proteínas G inhibitoras. Debido a que estos receptores están localizados en la membrana plasmática, la melatonina regula la función celular a través de segundos mensajeros intracelulares, disminuyendo la concentración intracelular de  $AMP_c$  y también se ha encontrado efectos sobre otros segundos mensajeros como el  $Ca^{2+}$ ,  $GMPc$ , proteína Kinasa.

El receptor  $MT_3$  no acoplado a proteína G, cuando es activado estimula la hidrólisis de fosfoinositol (**Dubocovich y Markowsky 2005**).

Por otro lado la melatonina por ser una molécula pequeña y de naturaleza lipofílica, también es capaz de atravesar la membrana celular y de unirse a nivel intracelular, citosólico y nuclear. Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Estas proteínas regularían la actividad de la ARNpolimerasa II. Se ha descrito la unión de la melatonina con proteínas intracelulares, como la calmodulina, calreticulina y PKC.

La calmodulina es una proteína cuya función principal es quelar el calcio, lo que permite modular la actividad de muchas enzimas. Entre las enzimas que regula se encuentra la fosfodiesterasa de los nucleótidos

cíclicos y adenilatociclasa necesaria para la formación de AMPc intracelular.

Cuando la melatonina interactúa con la calmodulina, inhibe la actividad fosfodiesterasa de forma concentración dependiente, lo cual permite modular directamente las señales intracelulares del calcio.

La calreticulina es una proteína del retículo endoplasmático que también se une al calcio. Se trata de una proteína que regula la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión de la melatonina a la calreticulina es altamente específica y se produce con una afinidad en rango molar (**Macías y cols** 2003).

La PCK es una quinasa de serina y treonina activada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta enzima fosforila diversos sustratos y modifica la estructura del citoesqueleto. La melatonina activa la PCK (**Benitez** 1996).

Los resultados obtenidos de la interacción de la melatonina con la calmodulina, calreticulina y PCK respaldan la idea de que la melatonina puede contribuir a modular el citoesqueleto. Como las tres proteínas son dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  es posible que otras proteínas con dominios de unión al calcio puedan estar influenciadas por la melatonina.

Otro lugar de unión de la melatonina parece encontrarse en la mitocondria (**Hardeland y Poggeler** 2007) La proteína de unión se localiza en la rampa anfipática del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (**Hardeland** 2008).

### **Mecanismos no mediados por receptor**

La unión de la melatonina no mediada a través de receptores, permite explicar por qué la melatonina a pesar de ser capaz de atravesar todas las membranas biológicas no se libera en grandes cantidades al torrente circulatorio, sino que permanece en los tejidos a mayor concentración que en el plasma (**Hardeland 2008**).

### **Funciones de la Melatonina**

La melatonina fue conocida inicialmente por su función como mediadora de los ritmos reproductivos circanuales, así como de los ciclos circadianos, **Takahashi y cols 2002**. Todos los efectos cronobióticos están regulados por receptores de membrana MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> (**Dubocovich y Markowka 2005; Hardeland 2008**).

Seguidamente se mostró que sin embargo la melatonina tenía efectos oncostáticos (**Blask y cols 2002; Reiter 2004**), estimulación del sistema inmune (**Guerrero y Reiter 2002; Carillo-vico 2005; Hardeland 2008**) y funciones antiinflamatorias (**Cuzzocrea y Reiter 2002; Mayo y cols 2005; Escames y cols 2006; Hardeland 2008**). Así más recientemente la melatonina fue identificada como un potente secuestrador de radicales libres y antioxidante directo (**Acuña-Castroviejo y cols 2001, 2002,2003; Tan y cols 2002,2007; Rodriguez y cols 2004; Reiter y cols 2000,2003, 2005, 2007, 2008**), resaltan la eficacia de la melatonina como protector contra las especies reactivas del oxígeno ROS y especies reactivas del nitrógeno RNS.

### **Radicales libres y estrés oxidativo**

Un radical libre es cualquier átomo o molécula que contenga uno o más electrones no apareados. Los radicales libres son por lo general muy reactivos ya que desencadenan reacciones en cadena que pueden dañar los diferentes constituyentes de los organismos vivos. Los radicales o prorradicales más abundantes y reactivos de los sistemas biológicos son el oxígeno molecular  $O_2$  y los productos de su reducción tetravalente en agua,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$ .

Se definen los antioxidantes como cualquier sustancia que en bajas concentraciones comparando con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato.

Desde el punto de vista bioquímico, los antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos, los cuales son proteínas de alto peso molecular, que minimizan el daño oxidativo catalizando reacciones químicas y los no enzimáticos, que son moléculas pequeñas que reaccionan directamente con los radicales libres, evitando que ejerzan su acción tóxica sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La melatonina puede ser clasificada como un antioxidante no enzimático (**Halliwell 1994**).

### **Radicales libres y procedimientos quirúrgicos**

Existe una asociación de los procedimientos quirúrgicos con un aumento del estrés oxidativo como consecuencia de un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno debido a la inflamación (**Brennan y cols 2003**). Se demostró como entre las 24-48 horas después de una extracción dentaria se produce una reacción

inflamatoria con un intenso infiltrado de polimorfonucleares los cuales provocaban un aumento de formas reactivas tales como ROS, RNS (Cutando y cols 2007). Minczykowski y cols 2001 encontraron una relación entre la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  por los polimorfonucleares después de una cirugía apical. Aghabeigi y cols 2003 demostraron un aumento en la producción de óxido nítrico después de una cirugía aspirativa de ATM.

### **Acción de la melatonina a nivel de la cavidad oral**

A nivel de la cavidad oral se han realizado estudios principalmente sobre los efectos de la melatonina en el periodonto, el hueso y la respuesta inflamatoria después de las intervenciones quirúrgicas, además de del efecto protector de la mucosa del tracto gastrointestinal.

Los estudios de Naguib y cols en 2007, establecen relación entre la enfermedad periodontal y los niveles de melatonina. Para valorar el estado periodontal se utilizó el índice periodontal comunitario, los niveles de melatonina en plasma sanguíneo y saliva se determinaron mediante radioinmunoensayo. Los pacientes con enfermedad periodontal tenían niveles más bajos de melatonina en saliva y plasma. Confirmado con este estudio que la melatonina tenía un papel protector frente a la enfermedad periodontal.

Cutando y cols en 2007, demostraron que la melatonina disminuía cuando existía enfermedad periodontal en un estudio en paciente con diferentes grados de afectación periodontal. Dado las propiedades de la melatonina para promover la actividad de los fibroblastos y la

regeneración ósea se consideró útil para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Dentro de las funciones potenciales de la melatonina dentro de la cavidad oral recientemente se han descrito su papel protector frente al estrés oxidativo y daño de los tejidos. La aplicación de la melatonina en alveolos postextracción de perros disminuyó el estrés oxidativo (**Gómez-Moreno y cols** 2007). Asimismo, la melatonina a nivel del trato gastrointestinal protegía a la mucosa del efecto de irritantes y ayudaba a la cicatrización de las lesiones de tipo mucositis, esofagitis y úlcera péptica en el resto de trato (**Konturek y cols** 2007).

#### **Acción de la melatonina en la regeneración ósea**

**Roth** 1999 basándose en los estudios previos sobre la *Drosophila* SL3, estudió el efecto de la melatonina sobre la modulación de la expresión de la sialoproteína ósea BSP en la línea celular de preosteoblastos procedentes de ratas, demostrando que incrementaba la expresión genérica de la sialoproteína ósea y otras proteínas marcadoras ósea, incluyendo la fosfatasa alcalina ALP, la osteopontina y la osteocalcina, en una concentración dependiente molar.

**Nakade y cols** 1999, demostraron que la melatonina a concentraciones micromolares estimulaba la proliferación y síntesis de colágeno tipo I en los cultivos de osteoblasto humanos in vitro.

**Ladizesky y cols** 2006, observaron el efecto de la aplicación de la melatonina sobre el metabolismo óseo de ratas que había sido

ovarictomizadas, concluyendo que la melatonina aumentaba los efectos del estradiol sobre el hueso.

**Koyama y cols** en 2002, evaluaron los efectos de la melatonina sobre la masa ósea en un estudio sobre ratones. Observaba como la melatonina a dosis farmacológicas de 5 a 500 $\mu$ M disminuía de manera dosis dependiente la expresión de mRNA de OPG en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E<sub>1</sub> inhibiendo la reabsorción ósea e incrementando la masa ósea a través de la regulación de la osteoclastogénesis.

**Ostrowska y cols** en 2002, demostraron como la oscilación a lo largo del día de ciertas hormonas como la PTH, GH, IGF-1 inclusive la melatonina y las hormonas tiroideas jugaban un papel muy importante en la expresión de los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo.

**Ostrowska y cols** en 2003, manifestaron la influencia de las fluctuaciones de los periodos de luz oscuridad podía influir en el metabolismo óseo a través de ciertos marcadores óseos como la fosfatasa alcalina dependiendo estos de las concentraciones endógenas de melatonina.

Dentro de la regulación del metabolismo óseo por parte de la melatonina, esta acción puede ser explicada a través de la acción antioxidante de la melatonina, depurando los radicales libres y actuando así sobre el osteoclasto ya que estos utilizan los radicales del oxígeno, incluido el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH y H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> para iniciar la reabsorción de la matriz.  
**Cardinali y cols** 2003.

**Ladizesky y cols** 2006, demostraron como el efecto de la melatonina a concentraciones micromolares 25 microg/mL en ratas tratadas con metilprednisolona disminuía la reabsorción ósea, teniendo un efecto protector óseo.

Otra de las acciones de la melatonina era la regeneración del hueso alveolar a través de la estimulación de la producción de fibras de colágeno tipo I y la modulación de la actividad osteoblástica y osteoclástica (**Cutando y cols** 2006).

En un reciente estudio de casos-control se evaluó el efecto de la aplicación tópica de 1,2 mg de polvo liofilizado de melatonina en los alveolos post-extracción de premolares en perros beagle, a las dos semanas se incrementó del perímetro de hueso que estaba en contacto con los implantes que recibieron melatonina, aumentó la densidad ósea, y la formación de hueso nuevo, así como hueso interespiras, comparándolos con los controles (**Cutando y cols** 2007).

**Cutando y cols** 2008, evaluaron en un estudio el efecto de la aplicación tópica de melatonina sobre la osteointegración de implantes dentales en perros. Después de dos semanas se incrementó el perímetro de hueso en contacto con el implante, la densidad ósea así como del hueso interrosca en comparación con los implantes.

**Takechi y cols** 2008, realizaron un estudio histomorfométrico de implantes de titanio a nivel tibial en ratas aplicando una inyección intraperitoneal de melatonina junto con una inyección local EFG-2 alrededor de los implantes, demostrando que la melatonina promovía la formación ósea alrededor de los implantes dentales.

El objetivo de nuestro estudio experimental fue analizar el comportamiento de distintos tipos de implantes: hueso autólogo también llamado “gold estándar”, dos xenoinjertos de distinto origen porcino (MP3®) y bovino (Endobon®), así como de una hormona, la melatonina, en relación a la respuesta ósea. Además determinar si estos biomateriales cumplen los requisitos de biocompatibilidad y biofuncionalidad para su utilización como posibles sustitutos en defectos óseos.



### **3. OBJETIVOS**



Nuestro trabajo realizado en conejos Nueva Zelanda pretendía establecer unas directrices útiles para la obtención de un injerto óptimo para su utilización en la práctica clínica. Lo ideal sería la posible utilización del hueso autólogo “gold estandar”, pero la dificultad para su obtención bien por problemas de disponibilidad ósea como por el aumento de la morbilidad, lleva a la búsqueda de posibles sustitutos de origen porcino ó bovino así como de ciertos factores promotores óseos.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la respuesta biológica del huésped a los implantes de: hidroxiapatita y colágeno de origen porcino (MP3®), granulado de hidroxiapatita derivada de bovino (Endobon®), hueso autólogo y melatonina, a través del un estudio radiológico y microscopía óptica, a 60 días.
2. Evaluar histomorfométricamente las características del defecto óseo creado y del grosor de la cortical neoformada en el transcurso del experimento, en los diferentes materiales utilizados a 60 días.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **Animales de Experimentación**

En nuestro trabajo hemos utilizado el conejo como animal de experimentación por su elevada disponibilidad, fácil acceso quirúrgico a la tibia, buena tolerancia a los medicamentos empleados y escasos riesgos anestésicos.

Utilizamos 20 conejos albinos Nueva Zelanda con un peso de 3.000 a 4.000 gramos y 15-18 semanas (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 (**Harkness 1980**) (**Fig. 5**)



**Fig 5.** – Animal de experimentación -Conejos raza New Zealand White (N.Z.)

El estudio experimental cumple las condiciones éticas y legales establecidas en el R.D. 223/1988 de 14 de Marzo y la Orden de 13 de

Octubre de 1988 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y se ha realizado en el servicio de animales de laboratorio del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia (REGAES 300305440012). **(Fig. 6)**



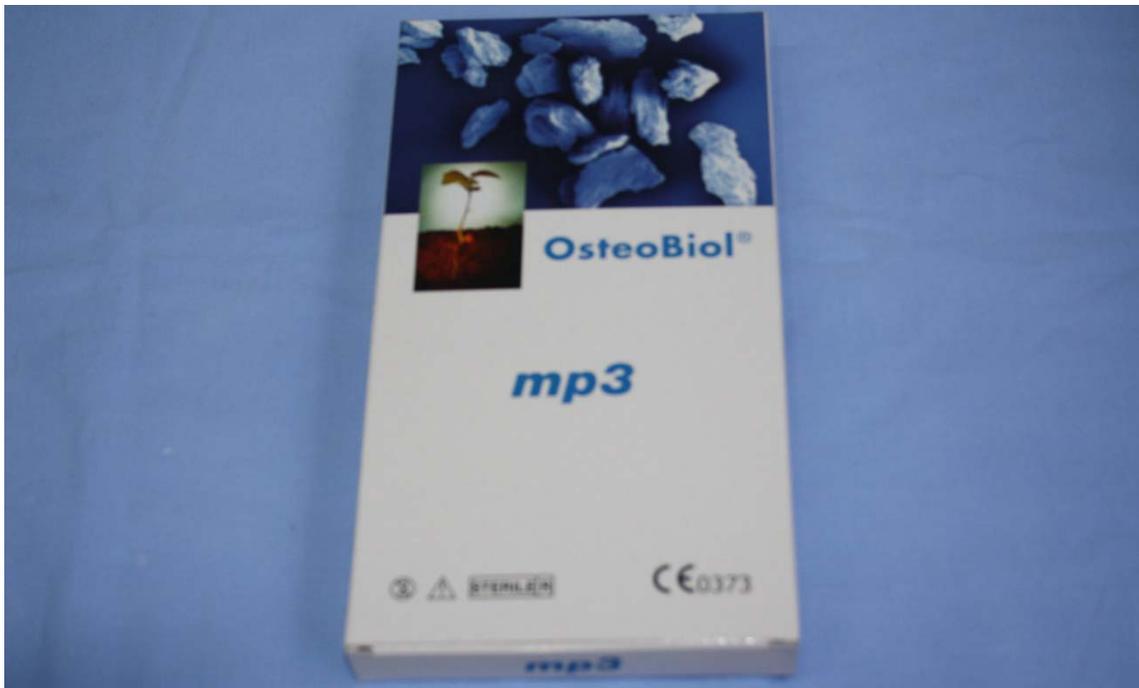
**Fig 6.-** Imagen del estabulario de los animales de experimentación.

La intervención quirúrgica de los animales se realizó en un quirófano de Cirugía Experimental del SAI de la Universidad de Murcia.

## **Materiales de Injerto**

### **1. MP3®**

Hueso liofilizado granulado y colágeno puro (OsteoBiol, Tecnos srl, Turín, Italia). Mezcla de hueso esponjoso y cortical de origen natural porcina, libre de antígenos compuesta por un 90% de hidroxiapatita en forma granulada, con un tamaño de gránulo entre 600-1000 $\mu$ m y un 10% de colágeno puro tipo I. (**Fig. 7, 8**)



**Fig7.-**Material de sustitución ósea- MP3® Tecnos (Osteobiol®)



**Fig. 8-** Imagen microscopía de mp3®.

## 2. ENDOBON®

Gránulos estériles de xenoinjerto bovino un producto (RegenerOss™, BIOMET3i. Palm Beach, FL,USA). Hidroxiapatita original de hueso bovino, desproteinizada y cuyo tamaño de partícula es de 500-1000µm. (Fig. 9,10)



Fig. 9- Material de sustitución ósea-Endobon® Xenograft Granules (BIOMET 3i®)

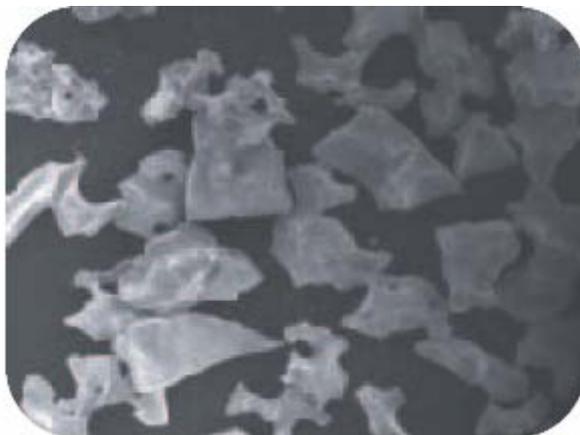


Fig.10- Imagen microscopía Endobon®Xenoinjerto Granulado-20x

### 3. MELATONINA

Melatonina de Sigma-Aldrich,

Química S.A. (Sigma-Aldrich Logistik, Germany) en forma de polvo.

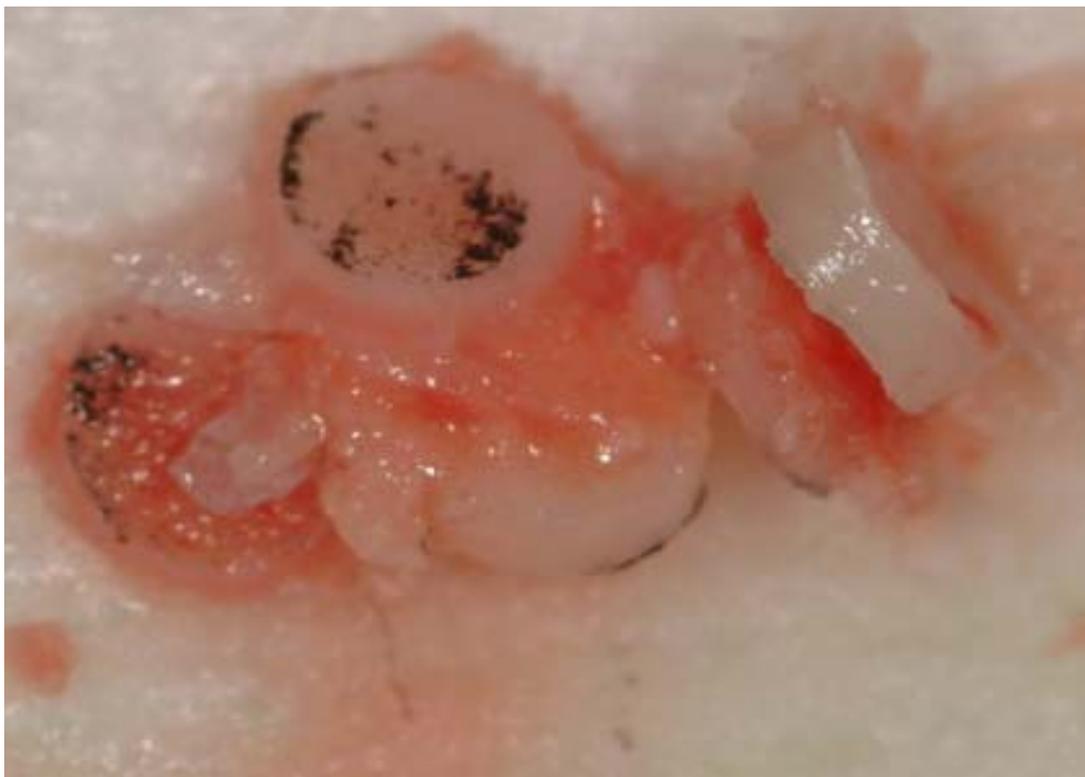
Referencia: M5250-250mg. **(Fig. 11)**



**Fig.11**-Polvo de Melatonina sigma-Aldrich <sup>TM</sup> (M5250)

### 4. HUESO AUTOLOGO

El hueso autólogo en forma de cilindros de cortical ósea de 4mm. de diámetro fue obtenido del propio conejo a través de fresa trefina y micromotor a baja velocidad e irrigación con suero fisiológico tras la realización de los defectos óseos cavitarios en ambas tibias del conejo. **(Fig. 12)**



**Fig.12-** Imagen de hueso autólogo procedente de las corticales óseas.

## - MÉTODOS

### **Procedimiento Experimental**

Para la identificación de los animales se realizó una numeración en la oreja con un tatuador Dermotrón, quedando guardado 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 y las incidencias.

### **Grupos de trabajo**

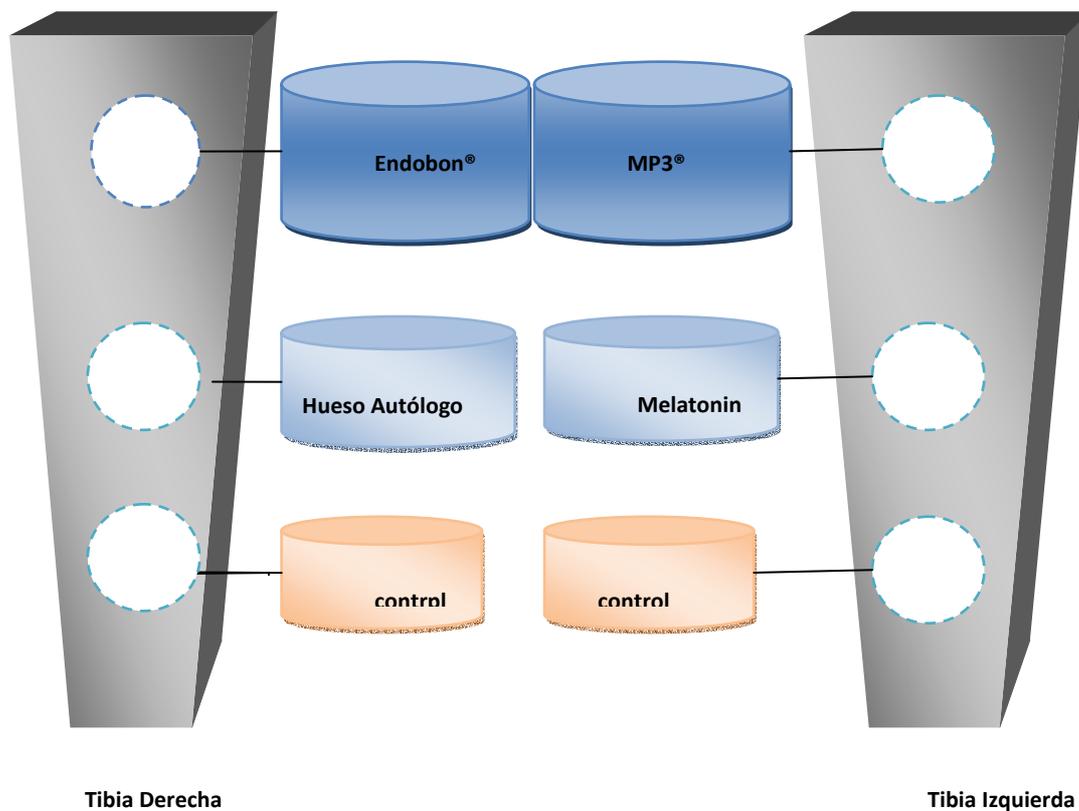
Los animales fueron divididos en 4 grupos de (n=4) según el periodo de implantación del material. Hemos utilizado las dos tibias de las patas traseras para el estudio, con un total de treinta y dos patas implantadas en el experimento. (**Tabla 5**).

GRUPOS EXPERIMENTALES	TIEMPO DE SACRIFICIO	NÚMERO DE PATAS	IDENTIFICACIÓN
I	15	8	4121,4128,4129,4133
II	30	8	4122,4125,4131,4132
III	45	8	4126,4127,4123,4134
IV	60	8	4119,4130,4124,4120

**Tabla 5-**Clasificación de los grupos experimentales según periodo de implantación del material.

### Diseño Experimental

En la presente tesis doctoral se realizó la prueba creando tres defectos óseos cavitarios de 4 mm de diámetro centrados en la metáfisis proximal de la tibia de los conejos, separados entre sí unos 5mm. (**Fig. 13**)



**Fig.13-** Representación del diseño experimental.

## **Manejo preoperatorio**

Tres semanas antes de la intervención, se depositaron en el Servicio de Animales de Laboratorio (SAI) de la Universidad de Murcia, individualmente en jaulas de 45 x 65 x 45 cm. con el fin de permitirles adaptarse al medio. Se mantuvieron a 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/m<sup>2</sup>.

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

Las intervenciones se realizaron en un quirófano de cirugía experimental convencional de 20 m<sup>2</sup> 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.

### **Método Anestésico**

El método anestésico se basó en conseguir una 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).

### **Profilaxis antibiótica:**

Amoxicilina (Clamoxyl LA® laboratorios Pfizer), administrando una dosis de ,0.1 ml/k vía im, media hora antes del inicio de la operación.

### **Premedicación:**

-Sulfato de Atropina (0.3 mg/k, vía im.): útil para la reducción de 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.

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.

### **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, su acción se ve potenciada que 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.

## **Método quirúrgico**

Al ser intervenido el animal de las dos patas, elegimos la zona proximal antero-interna de la tibia para colocar el implante ya que esta vía de abordaje es poco traumática y sangrante, y así, evitamos hemorragias profusas y descensos importantes de la volemia, que pudieran ocasionar la formación de grandes hematomas con la posibilidad de infección local consiguiente o en el peor de los casos su muerte. (Popesko, 1981).

La asepsia del campo quirúrgico se consiguió aplicando polividona yodada al 10% (Betadine®). A continuación 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 en la pata derecha una incisión 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 cuidadosa, 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 trefina 4.0 mm de diámetro 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.

De dichas perforaciones obtuvimos injertos óseos autólogos que

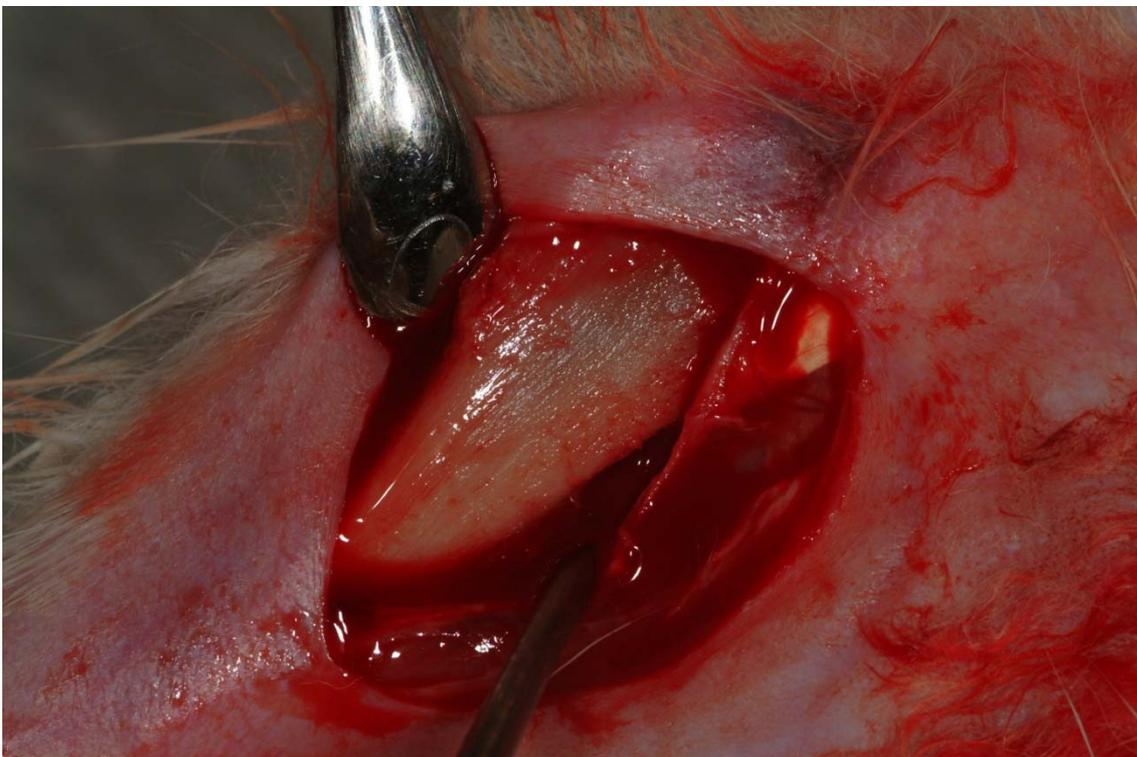
fueron conservados en suero fisiológico. Posteriormente lavamos abundantemente las perforaciones con suero fisiológico arrastrando todas las partículas óseas producidas durante el fresado del hueso. En la tibia derecha se colocó en el primer defecto un xenoinjerto de origen bovino (Endobon®) rehidratado con suero fisiológico, compactando el implante hasta la cortical. En el segundo defecto se colocó hueso autógeno obtenido de las perforaciones de ambas tibias. El tercer defecto se dejó vacío como control. En la tibia izquierda se colocó en el primer defecto un xenoinjerto de origen porcino (MP3®) aplicado con jeringa y compactando el implante hasta la cortical. En el segundo defecto se colocaron 5mg. de polvo de melatonina compactando el implante hasta la cortical. El tercer defecto se dejó vacío como control.

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

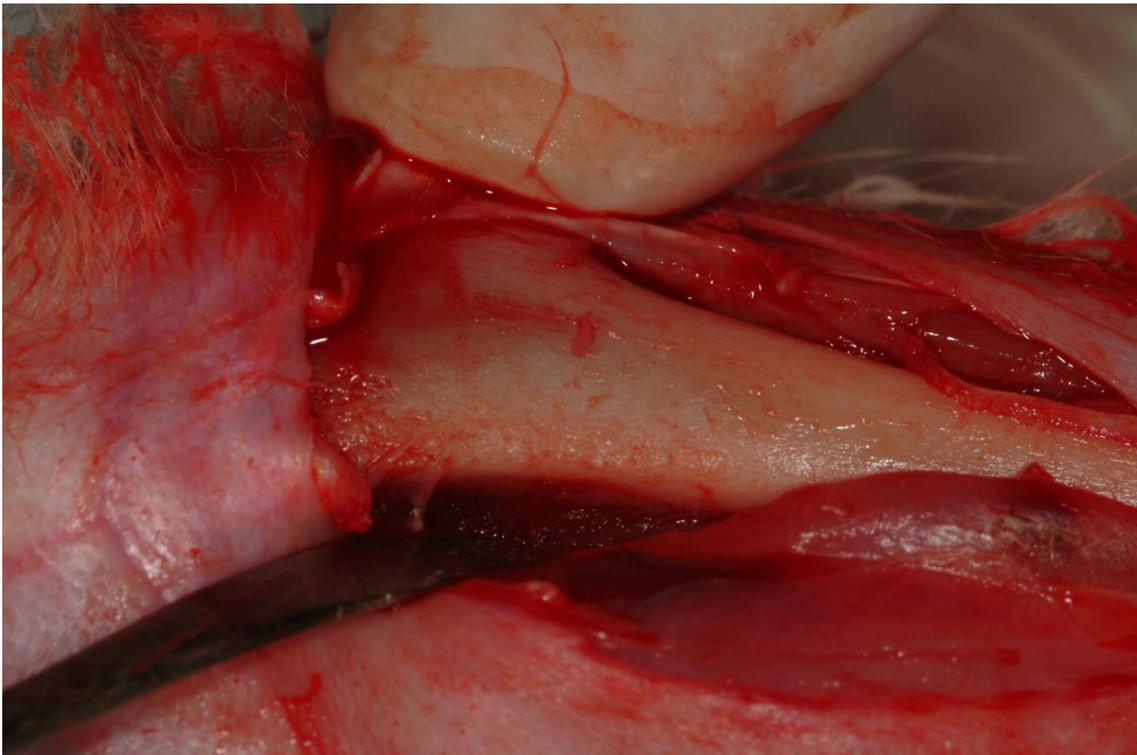
Finalmente, tras el lavado de la herida quirúrgica con suero fisiológico, se aplicó un apósito plástico en spray del tipo Novecután®.



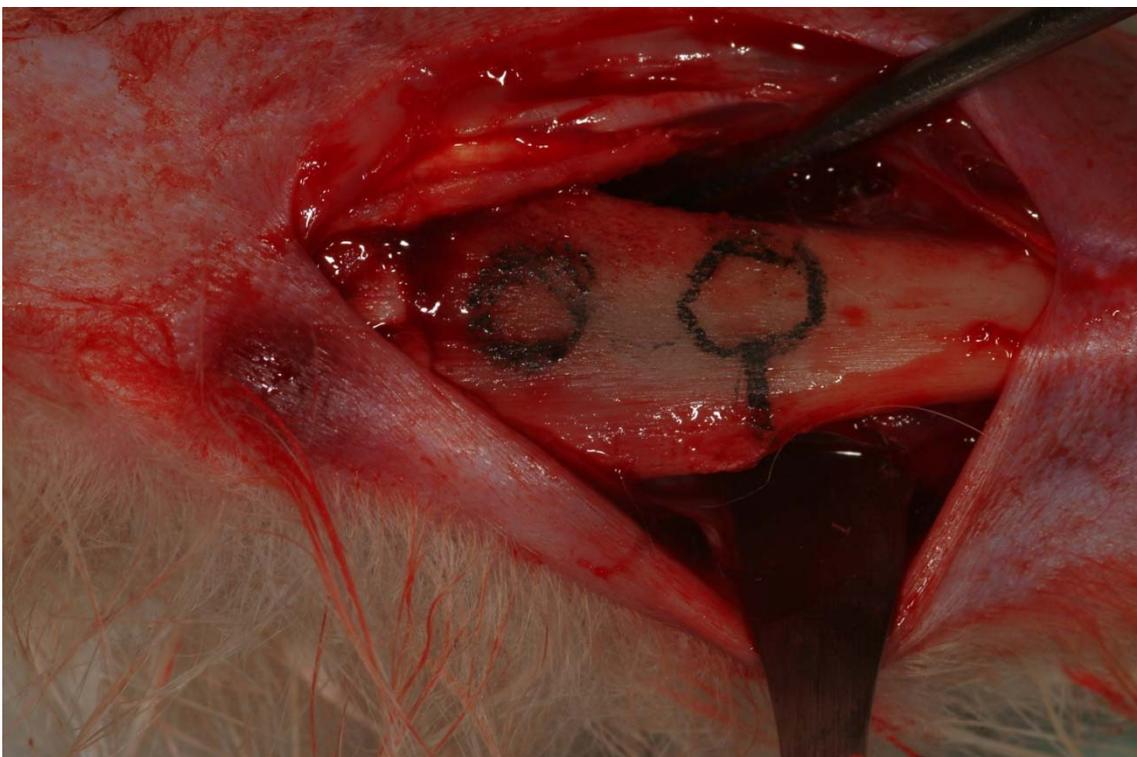
**Fig. 14-** Exposición de la zona proximal antero-interna de la tibia.



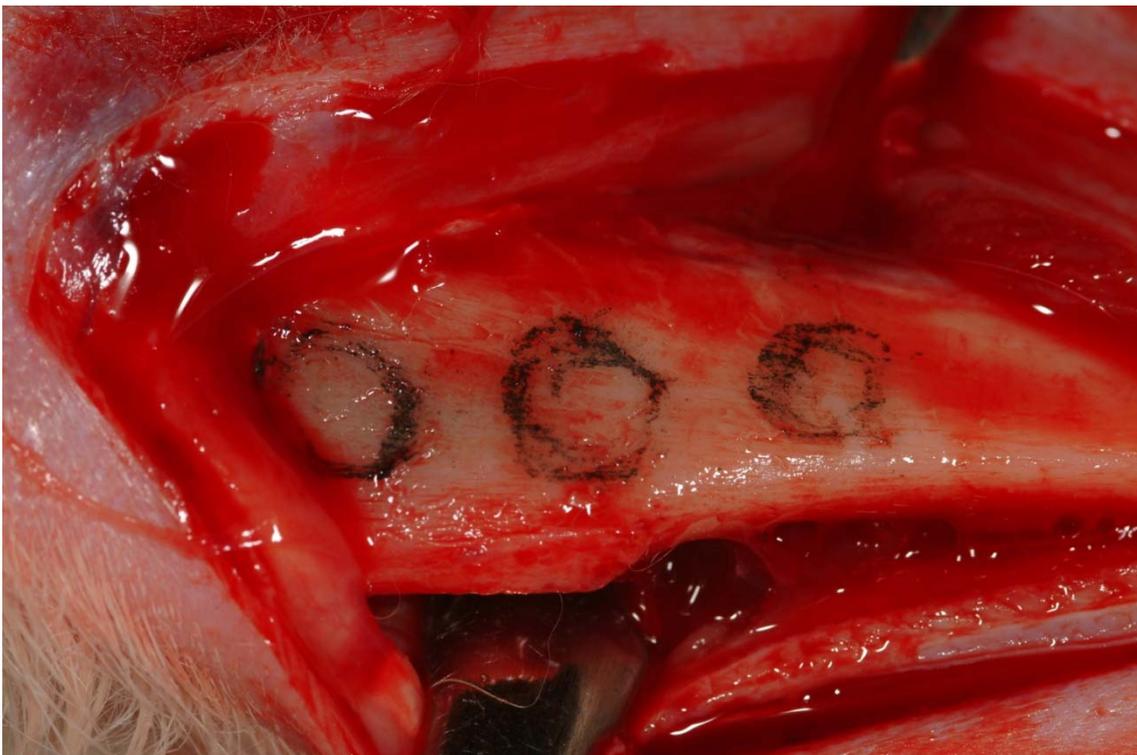
**Fig.15-** Incisión quirúrgica tomando como referencia los relieves óseos proximal y distal de la tuberosidad tibial



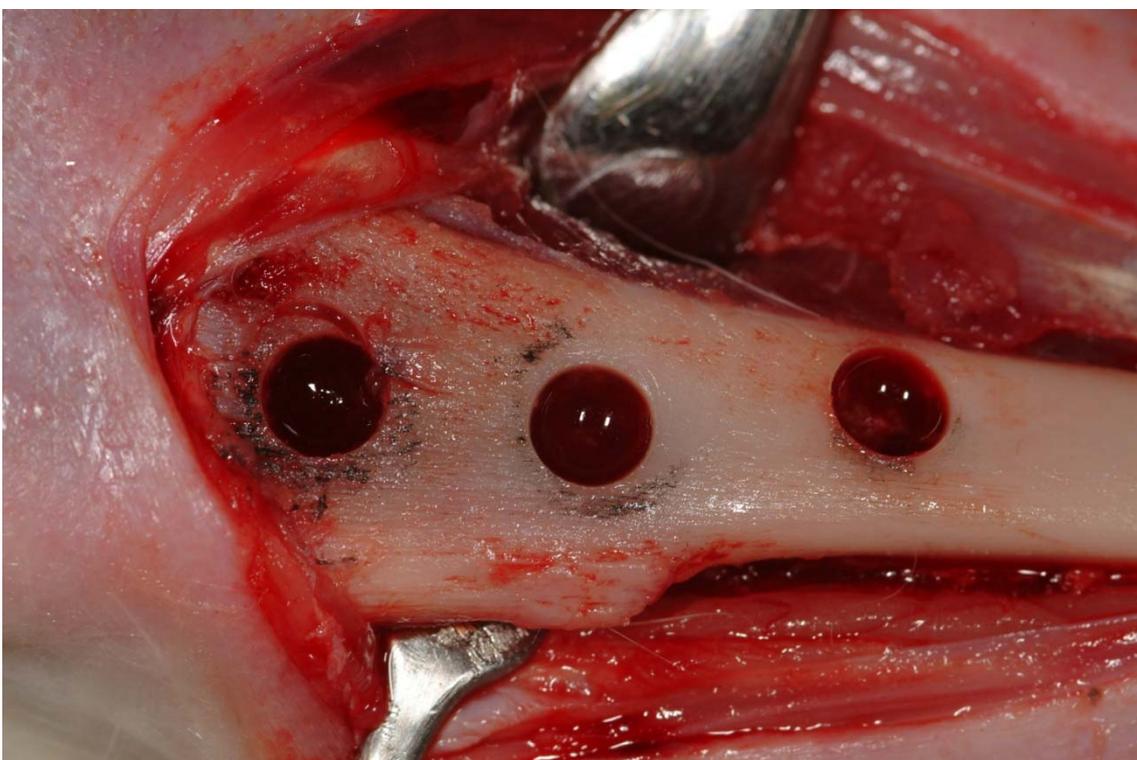
**Fig.16-** Desperiostización y localización de la meseta tibial anterior.



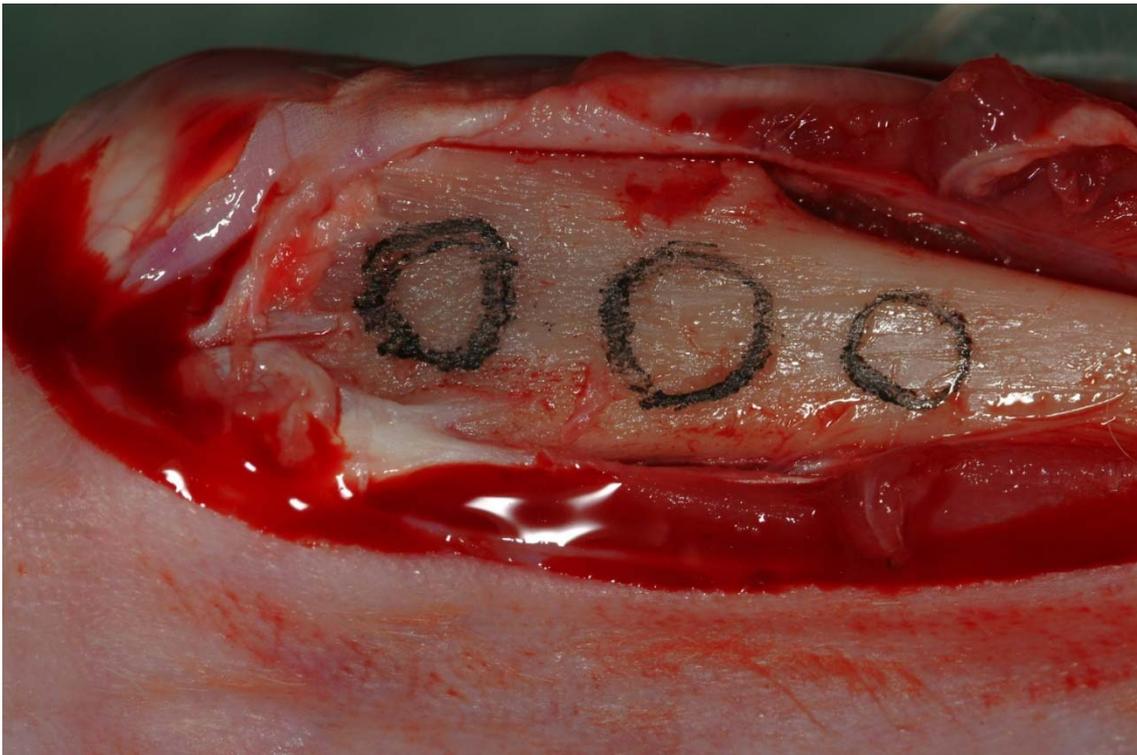
**Fig.17-** Marcaje con punta de grafito de la localización de los implantes.



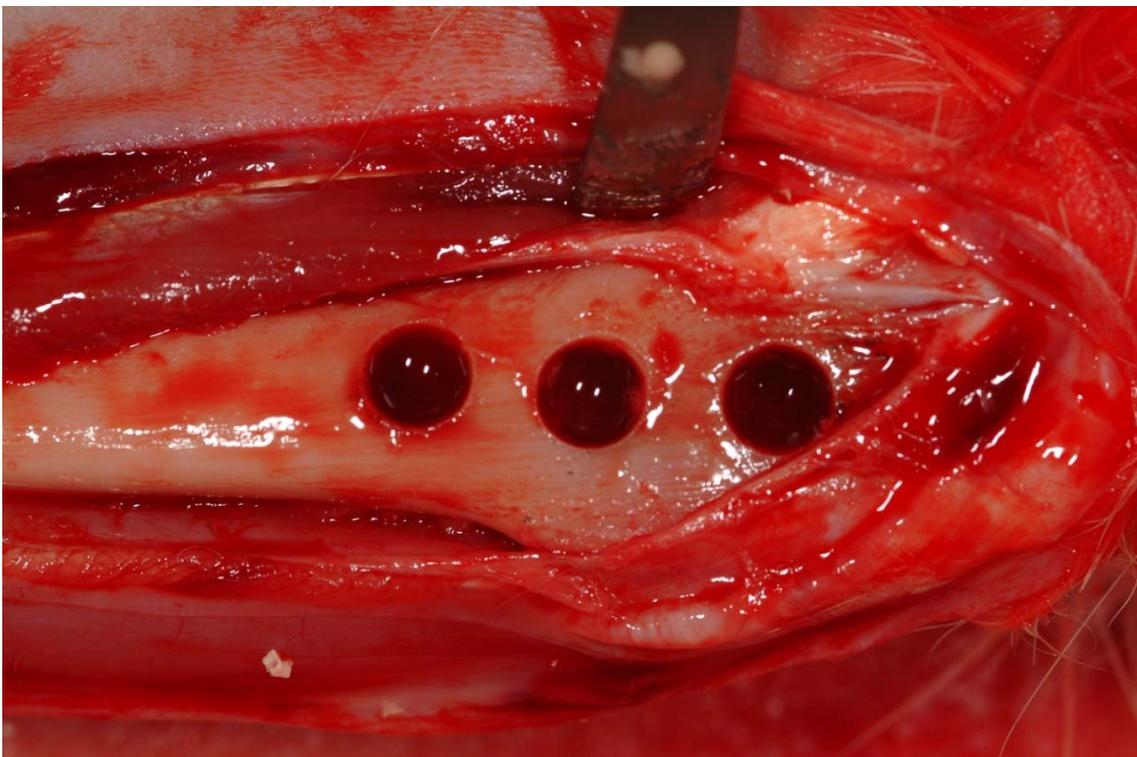
**Fig.18-** Identificación de las zonas de implante



**Fig.19-** Perforación con fresa trefina de 4mm. de diámetro de la cortical hasta la medular tibia derecha.



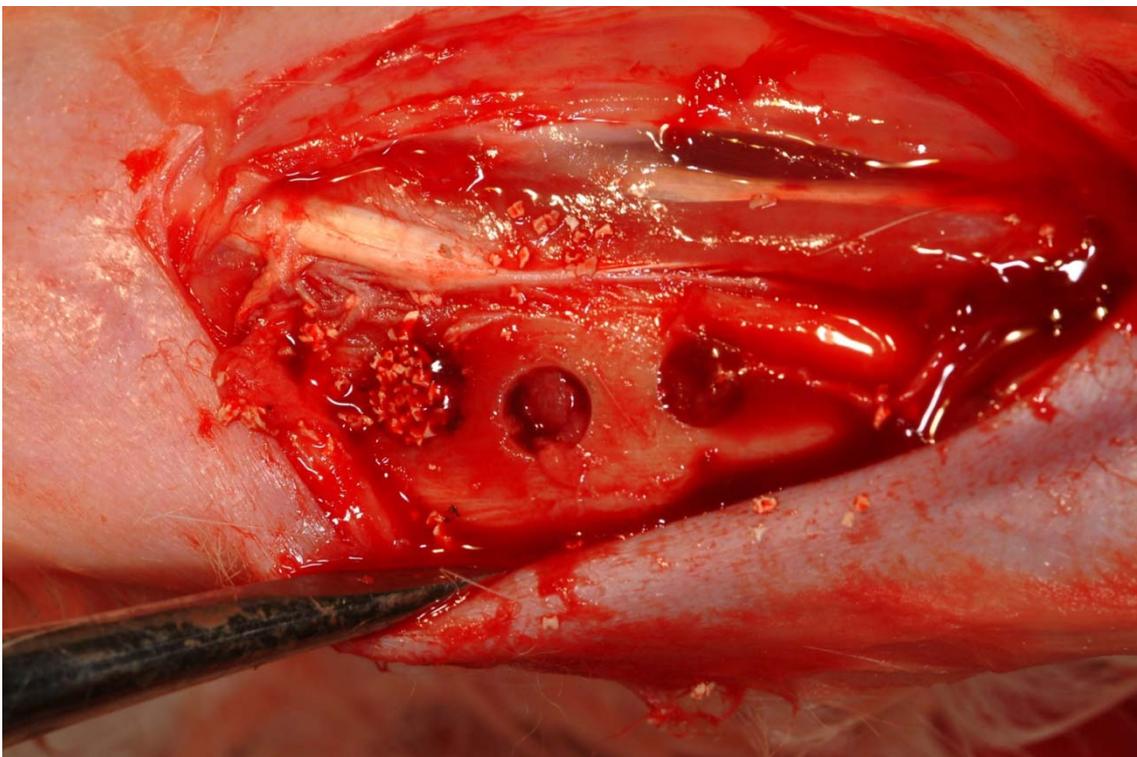
**Fig.20-** Marcaje con punta de grafito de la localización de los implantes en la tibia izquierda.



**Fig.21-** Perforación con fresa trefina de 4mm. de diámetro de la cortical hasta la medular tibia izquierda.



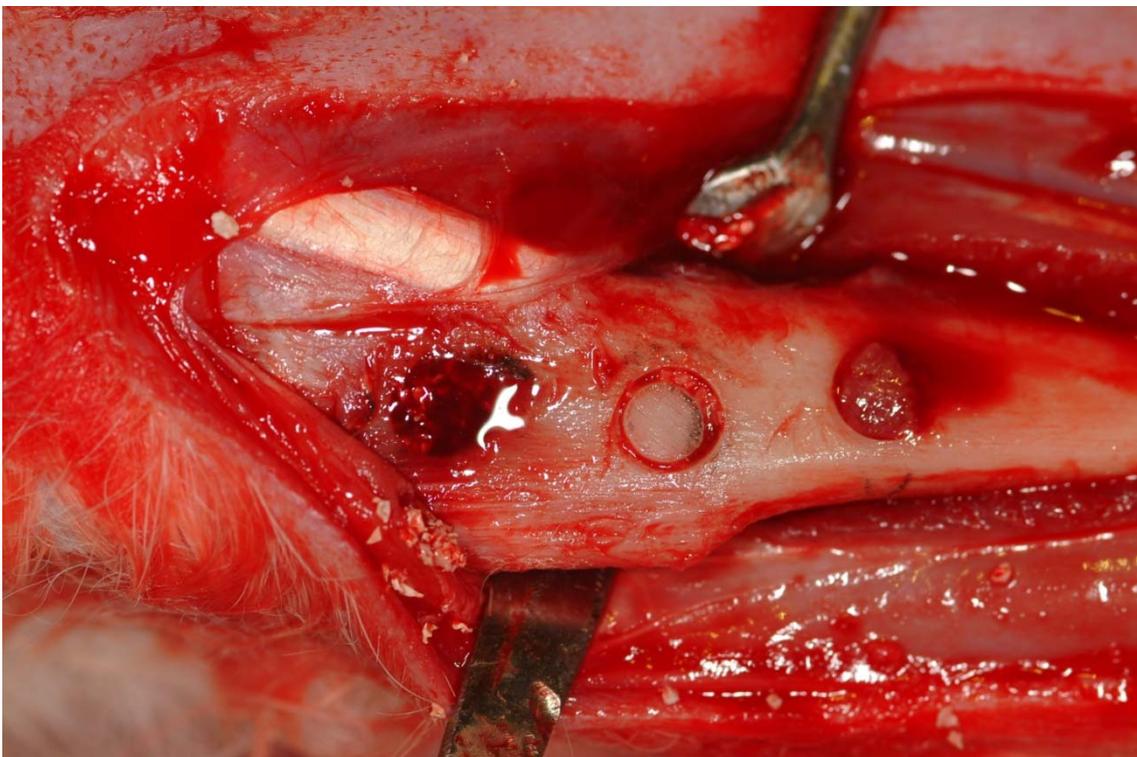
**Fig.22-** Gránulos de xenoinjerto de origen bovino (Endobon®)



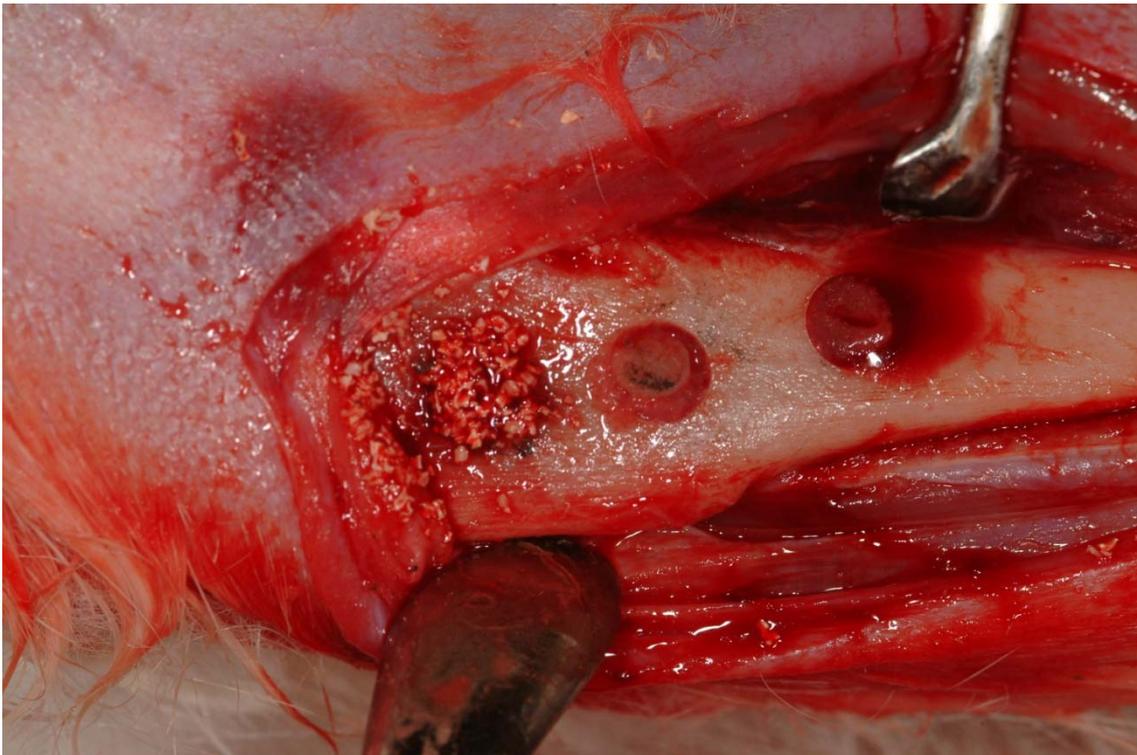
**Fig.23-** Colocación en el 1<sup>er</sup> defecto un xenoinjerto de origen bovino (Endobon®) rehidratado con suero fisiológico, compactando el implante hasta la cortical.



**Fig.24-** Hueso autólogo obtenido de la perforación de las corticales óseas.



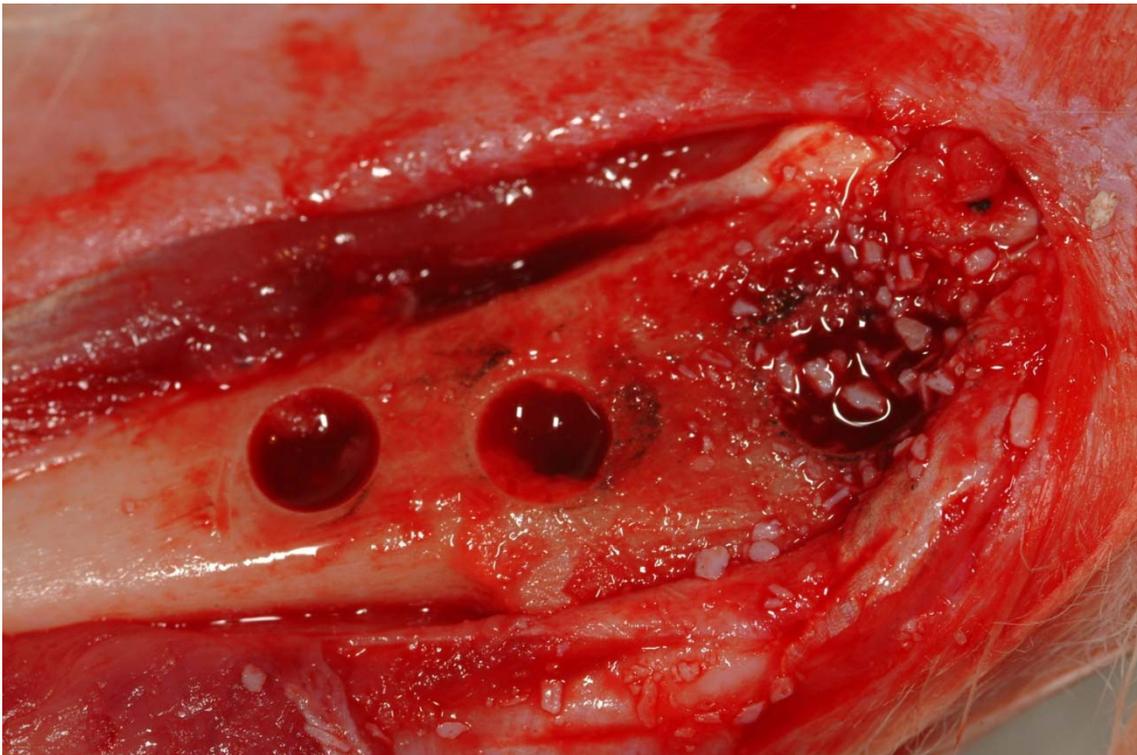
**Fig.25-** Colocación en el 2º defecto de hueso autógeno cortical obtenido de las perforaciones de ambas tibias.



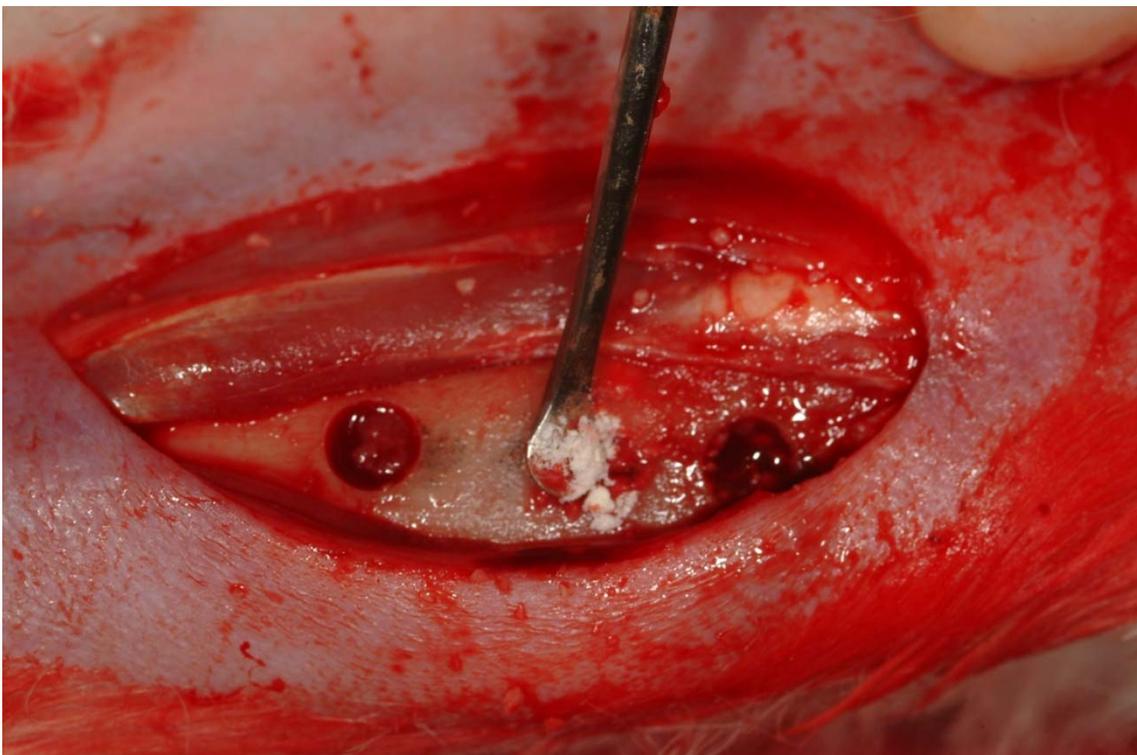
**Fig.26-** Imagen del 3<sup>er</sup> defecto óseo sin cubrir actuando como control en la tibia derecha.



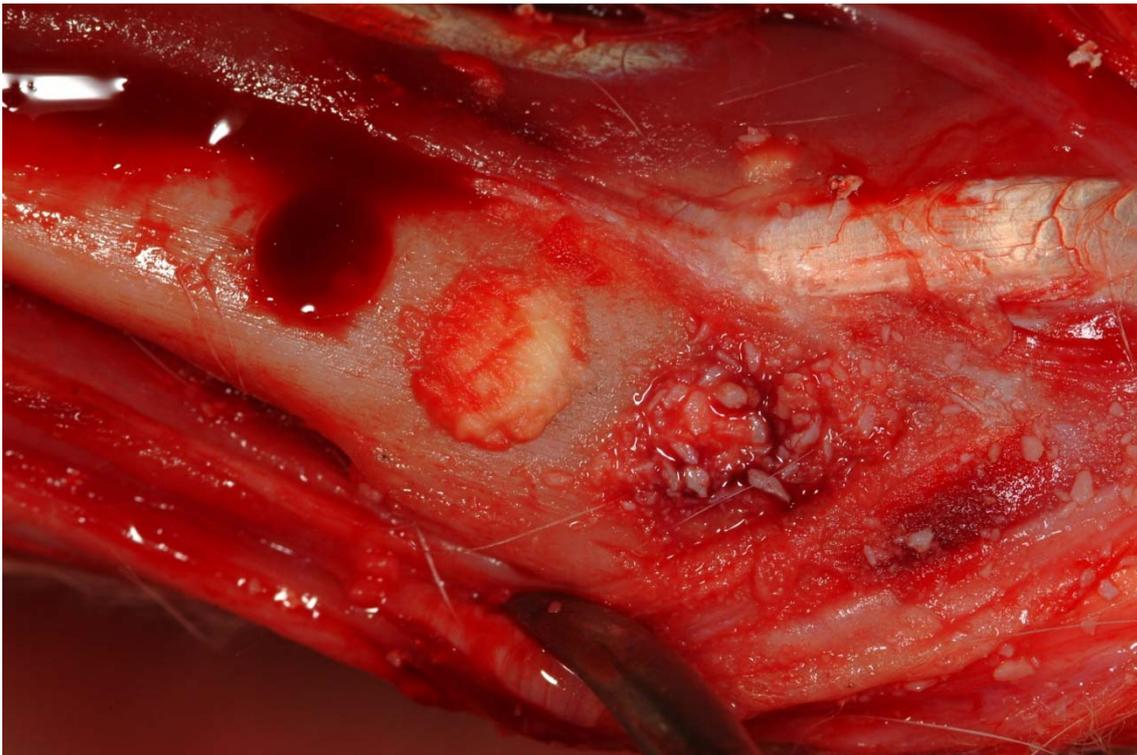
**Fig.27-** Jeringa de mp3 –Material de injerto del 1<sup>er</sup> defecto óseo de la tibia izquierda.



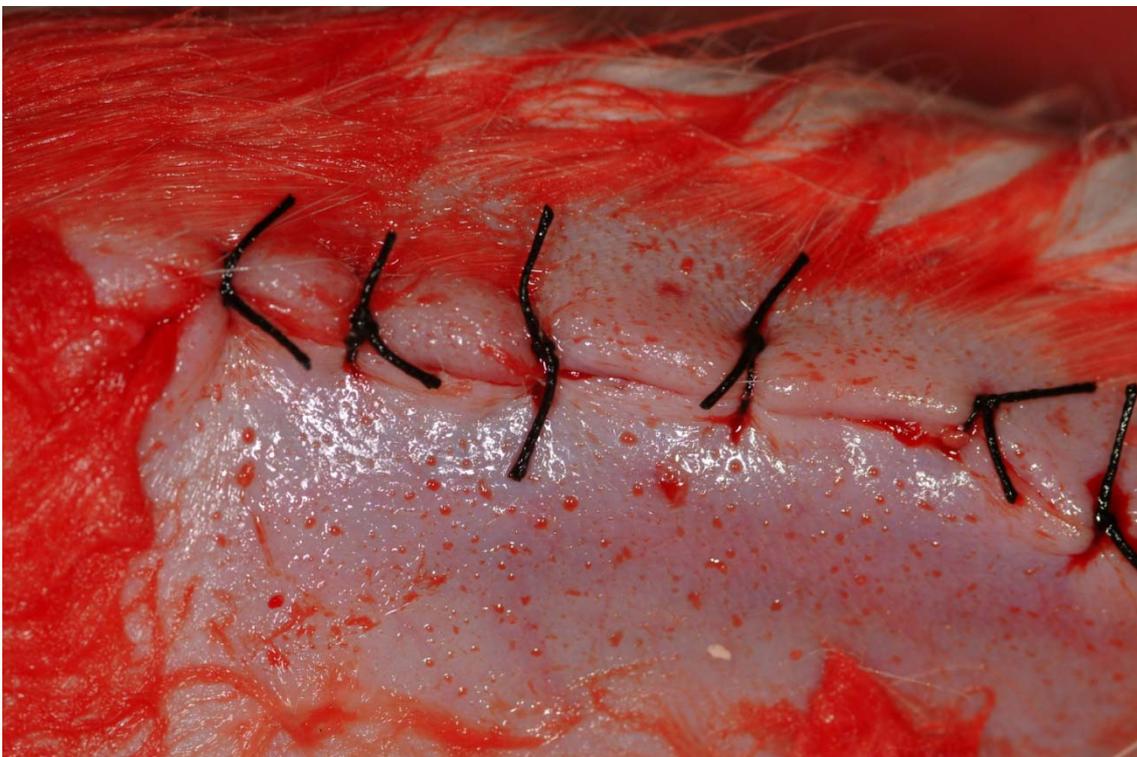
**Fig.28-** Colocación en el 1<sup>er</sup> defecto de un xenoinjerto de origen porcino (MP3®) aplicado con jeringa y compactando el implante hasta la cortical.



**Fig. 29-** En el 2<sup>o</sup> defecto óseo de la pata izquierda se colocaron 5 mg. de polvo de melatonina compactando el implante hasta la cortical.



**Fig. 30-** Imagen del 3<sup>er</sup> defecto óseo sin cubrir actuando como control en la tibia izquierda.



**Fig.31-** Sutura por planos de la herida. El periostio y el plano muscular profundo con puntos sueltos de vicryl® 4/0. El plano cutáneo se afrontó por medio de una sutura de puntos simples con Seda 3/0.

### **Reversión o despertar:**

Los animales fueron depositados en las jaulas para evitar posibles daños así como reacciones incontroladas por parte del animal al despertar de la operación. Esta fase se realiza de forma suave y espontánea, no requiriéndose pues 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.

### **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 cardiorrespiratorio.

### **Recogida de las Muestras:**

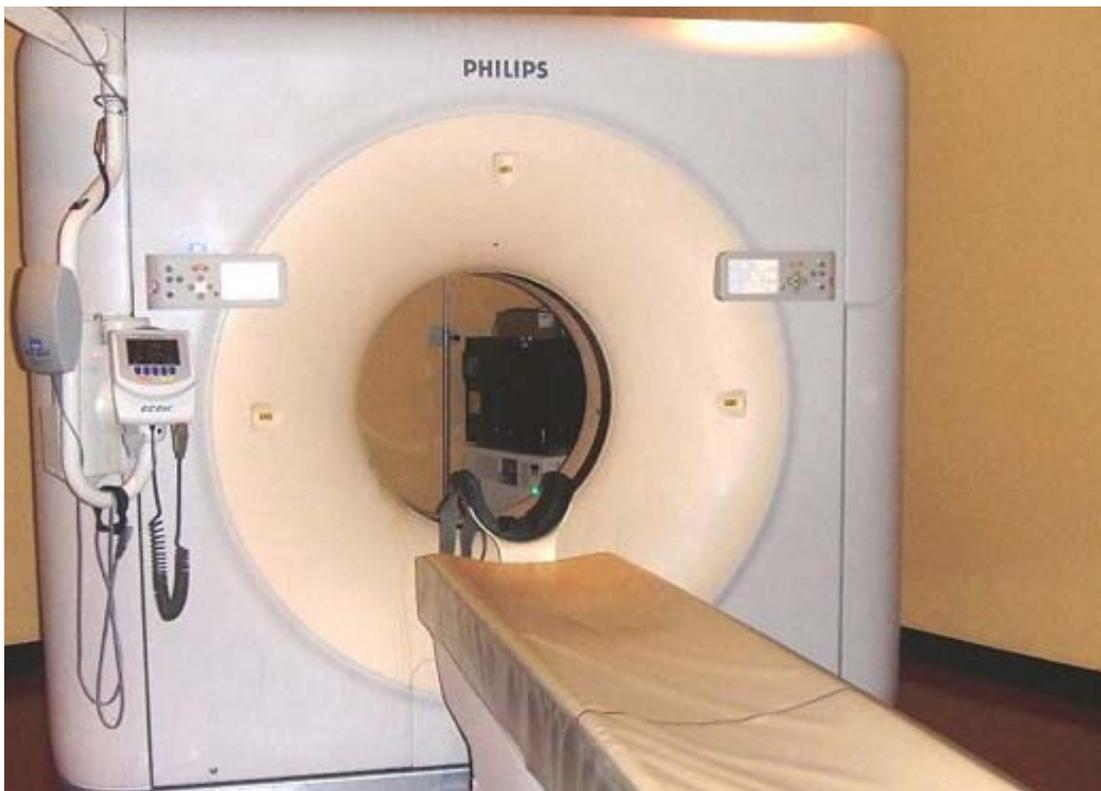
Para la obtención de las muestras óseas se realizó un abordaje lateral longitudinal de la pata del conejo, extrayendo completamente la tibia por desarticulación a nivel de la rodilla y el tobillo. Las piezas se almacenaban en formol, en frascos separados y debidamente rotulados para su identificación.

## **Método radiológico**

Las imágenes radiológicas fueron obtenidas con el equipo TC del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia, Philips Brilliance (Philips, Madrid) de 16 cortes en modo helicoidal, FOV 120, 90Kv y ángulo de 180°. **(Fig. 32)**

La secuencia de imágenes fueron procesadas mediante un programa de tratamiento de imágenes que permitía el análisis de este tipo de secuencias, facilitando la reconstrucción tridimensional de las muestra.

Así mismo antes de realizar los cortes para el estudio histomorfométrico realizamos controles con radiovisuografía, utilizando un sistema de radiología digital Kodak RVG 6100 **(Fig. 33)**. Estos consistían en la toma de radiografías en dos proyecciones ortogonales (ML) medio-lateral y posteroanterior (PA) de cada una de las piezas anatómicas.



**Fig.32-** Escaner TC de 64 capas "Brilliance" de Philips



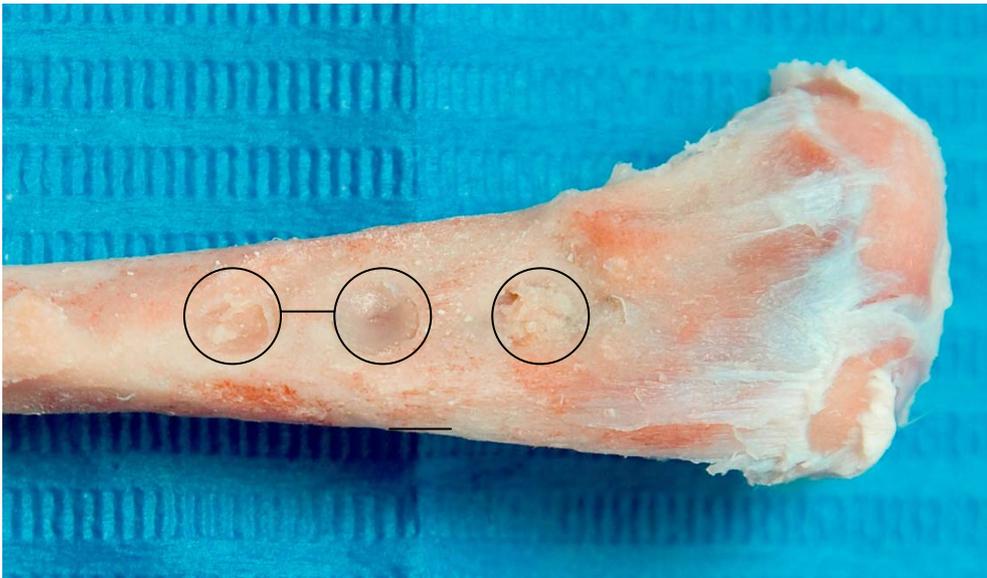
**Fig.33-** Sistema de radiología digital Kodak 6100.

Con objeto de facilitar la visualización radiológica de todo el implante se realizaron radiovisuografías a través de aparato kodak 6100 a cada uno de los cortes transversales de la tibia a nivel del implante.

### **Metodo anatomico-patológico**

#### **Obtención de las muestras:**

Tras la identificación del área de implante 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. 34,35).**



**Fig.34**-Detalle de las perforaciones para el corte transversal mediante sierra oscilante en 1/3 proximal de la tibia.



**Fig. 35** - Detalle de uno de los cortes de tibia transversal de 5 mm de espesor en la zona del implante

### **Procesado de las muestras:**

Las muestras obtenidas se fijaron en formol neutro tamponado al 10% hasta su proceso de decalcificación. Para la decalcificación hemos utilizado Osteomol® Merck KbaA (Germany) que contiene HCl - 10% y CH<sub>2</sub>O - 4%. Las muestras fueron sumergidas en Osteomol durante 15 días. Posteriormente las muestras fueron lavadas con agua destilada y seguidamente fueron deshidratadas mediante alcoholes a concentraciones crecientes continuando con los pasos habituales de este proceso hasta su inclusión en parafina.

De los bloques de parafina se realizaron secciones de 3 $\mu$  mediante un microtomo de rotación Minot Leitz, eligiendo una de cada 14 secciones hasta obtener 3 secciones a distintos niveles de cada implante. Las muestras fueron teñidas mediante técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E.) y Tricrómico de Masson (T.M.) y estudiadas y valoradas al MO Orthoplan FSA (Leitz) por los observadores.

### **Estudios morfométricos mediante Análisis de Imagen**

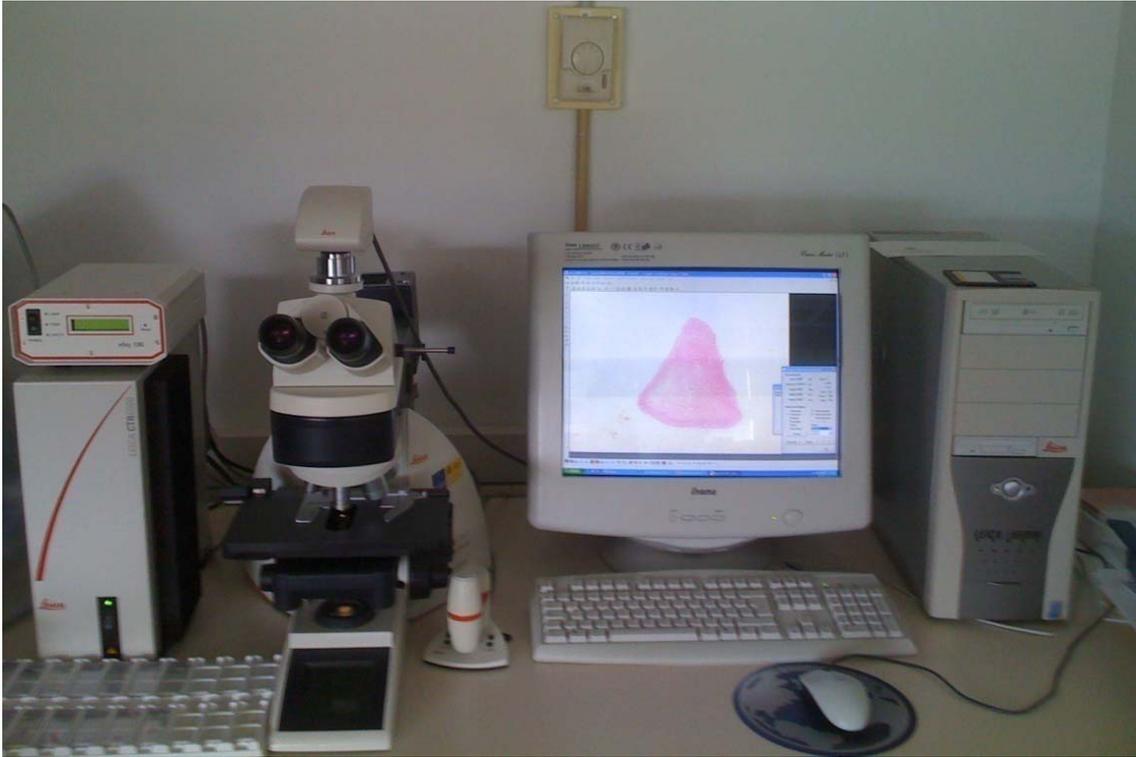
Las preparaciones histológicas de las secciones transversales de cada una de las muestras experimentales de las tibias a nivel del defecto óseo cavitario ocasionado se estudiaron mediante análisis de imagen evaluándose los siguientes parámetros:

- 1.- El porcentaje de defecto óseo cavitario cubierto por hueso neoformado
- 2.- La relación entre el grosor del hueso cortical residual y el grosor del hueso neoformado en la zona del defecto óseo cavitario.

Para calcular el porcentaje de defecto cavitario cubierto, las imágenes se obtuvieron de 3 secciones seriadas en un macroscopio Leica Z6 APO conectado a una cámara digital Leica DC 500 (Barcelona, España) (**Fig. 36**) obteniendo imágenes a una magnificación 23x, mientras que las imágenes para estimar el grosor del hueso cortical residual y el hueso neoformado se capturaron en un microscopio Leica DM 6000 B conectado a una cámara Leica DFC 280 (Barcelona, España) a una magnificación 273x (**Fig. 37**). Se tomaron 12 mediciones en tres zonas distintas de la cortical ósea normal y 8 mediciones en dos zonas distintas de la cortical neoformada para obtener las medias.



**Fig.36-** -Macroscopio LeicaZ6-APO conectado a cámara digital Leica DC500.



**Fig. 37-** Microscopio Leica DM 6000 B conectado a cámara Leica DFG 280

Tras la digitalización de las imágenes de la zona del defecto cavitario en las condiciones anteriormente indicadas y calibración del sistema se obtuvieron medidas interactivas de las líneas de interés empleando el programa de análisis de imagen Leica QWin V3 (Barcelona, España). Finalmente se aplicaron las siguientes fórmulas para el cálculo de los parámetros indicados.

**Porcentaje de la Longitud del defecto cubierto**= Longitud del defecto cubierto de hueso neofomado/ Longitud del defecto total x100

**Porcentaje del Grosor de la Cortical Neoformada**= Grosor hueso neofomadol/grosor hueso cortical normal x 100

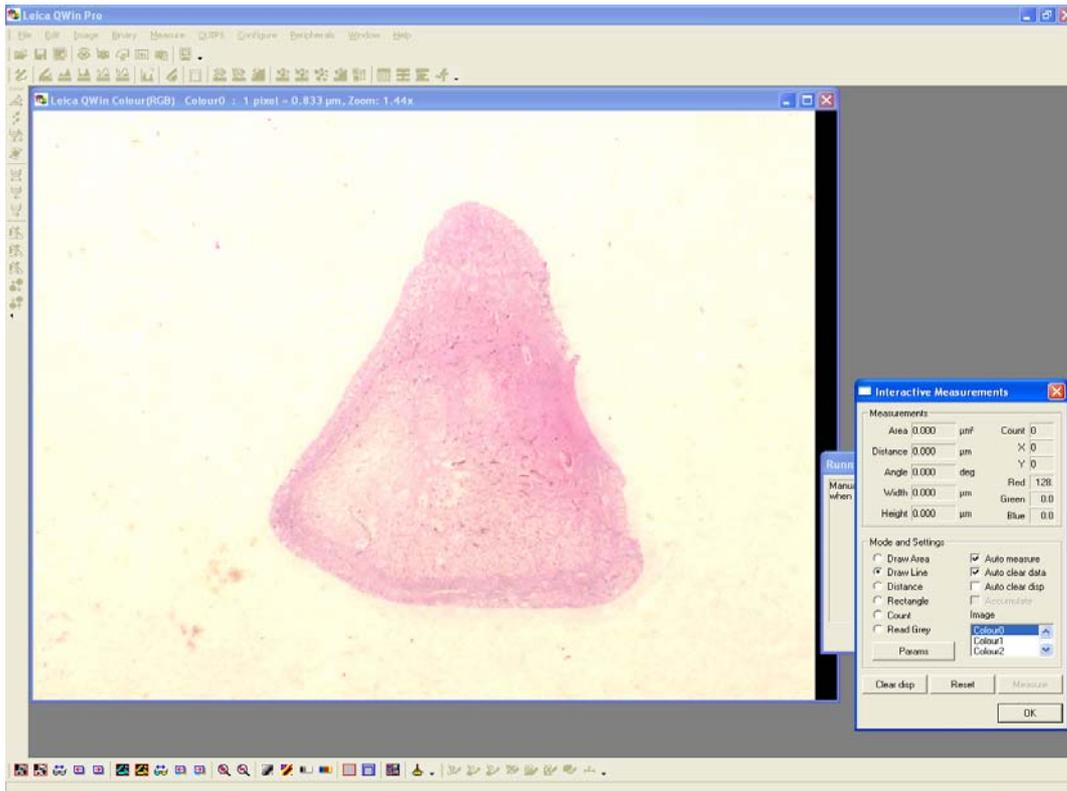


Fig. 38-Imagen de la sección histológica capturada con macroscopio Leica Z6 APO conectado a una Cámara digital Leica DC 500.

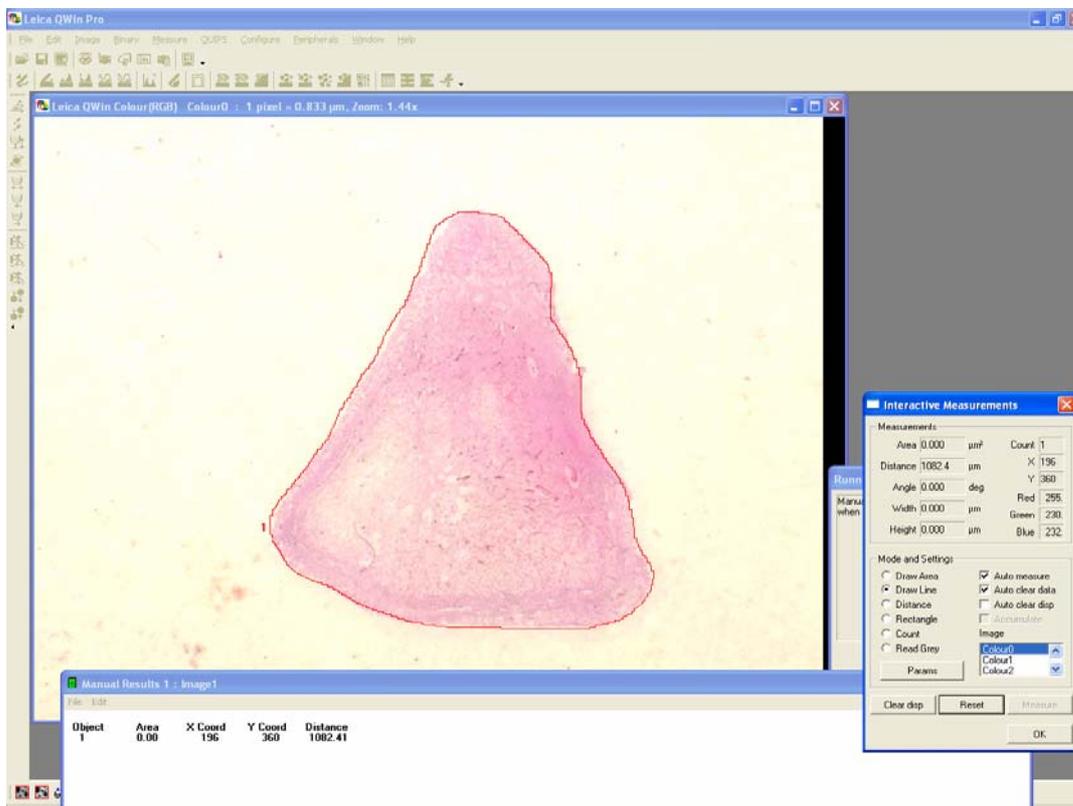


Fig. 39- Selección Interativa del Perímetro de la Sección Histológica.

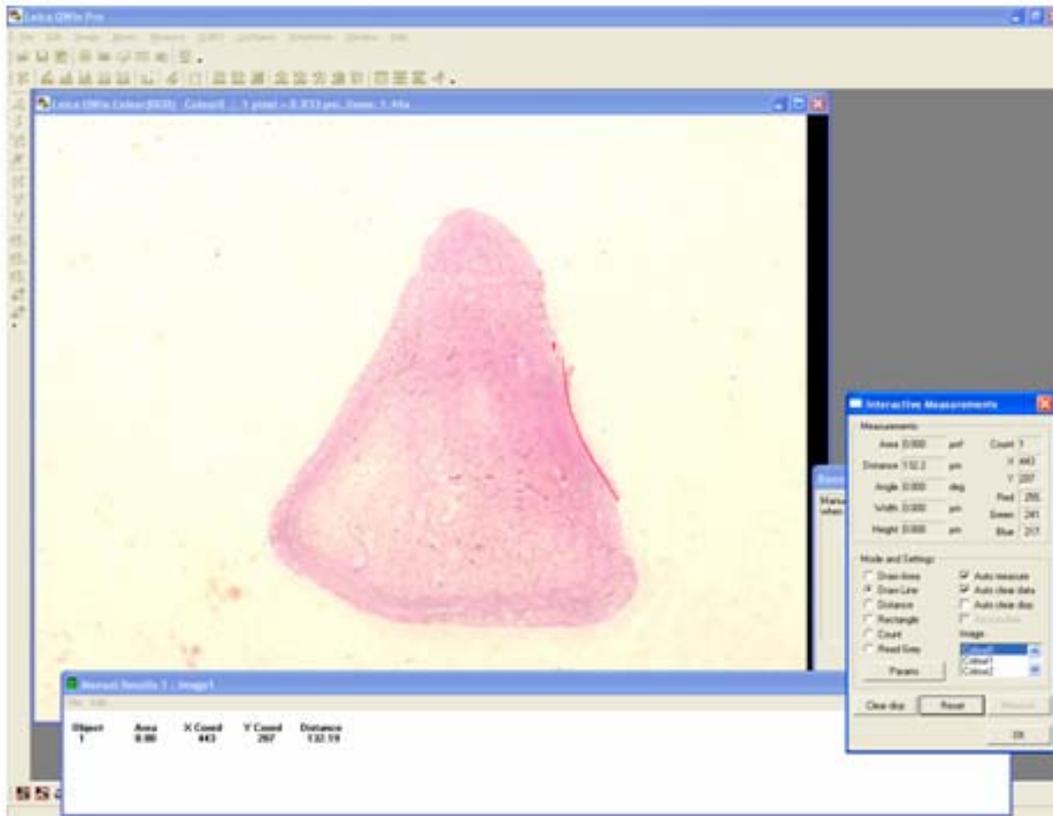


Fig. 40-Medición de la longitud el Defecto Creado.

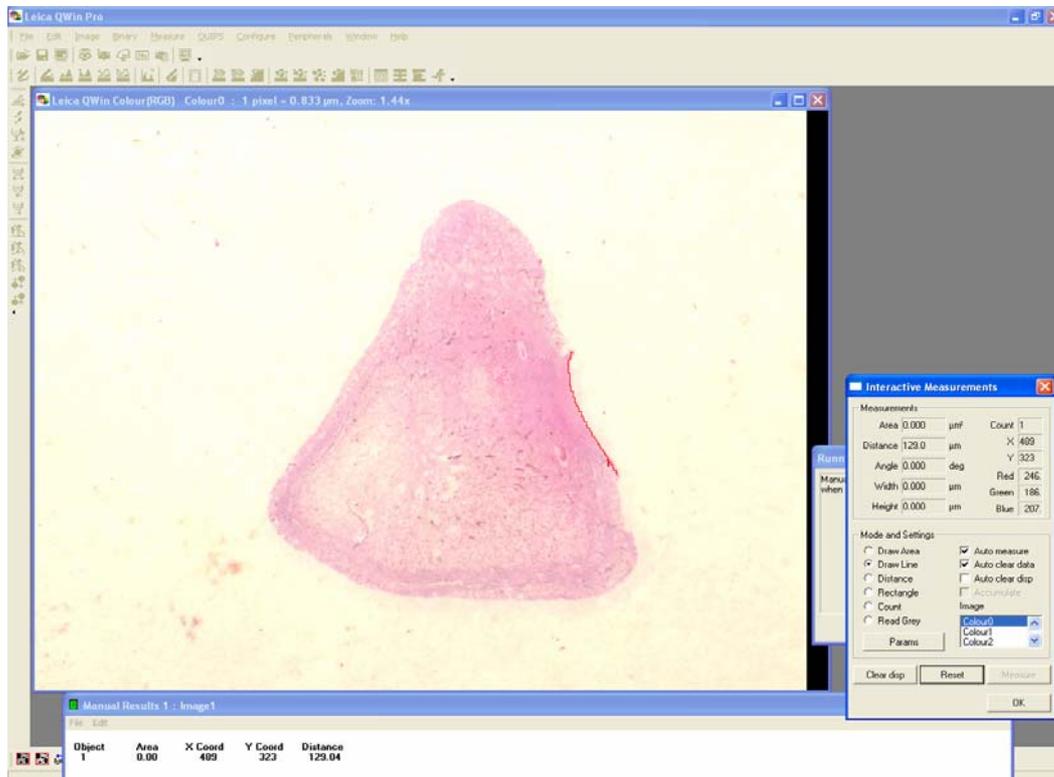
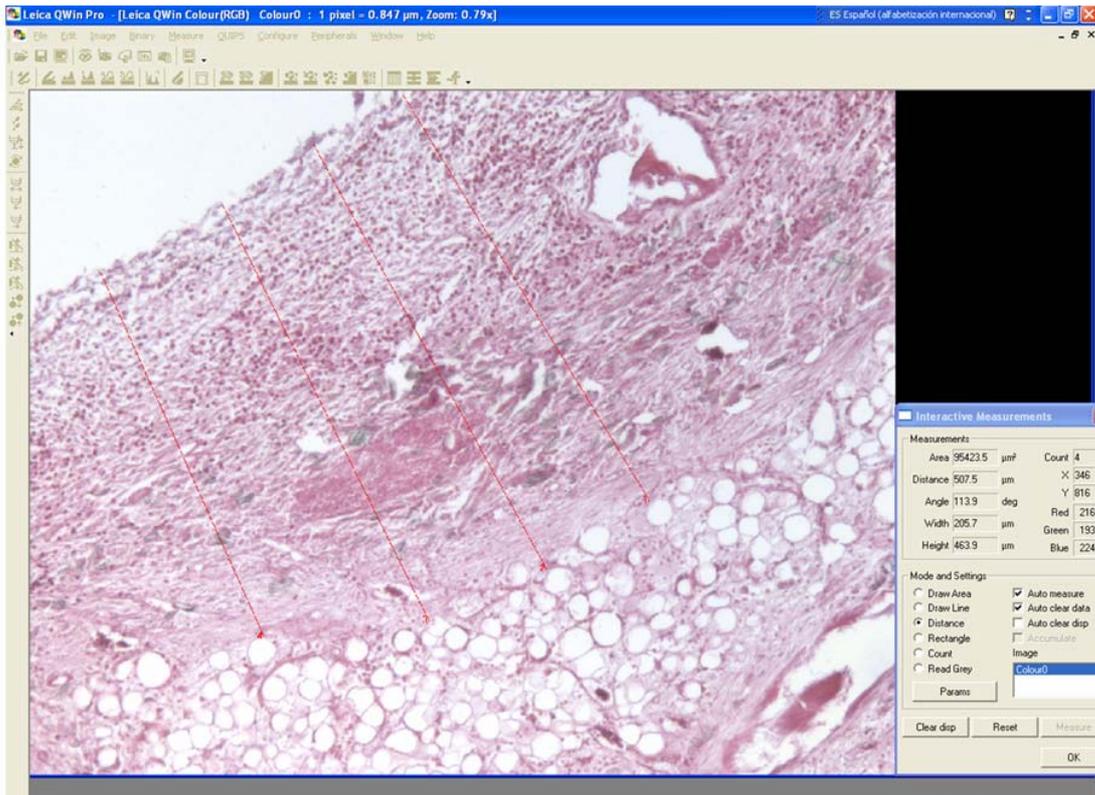
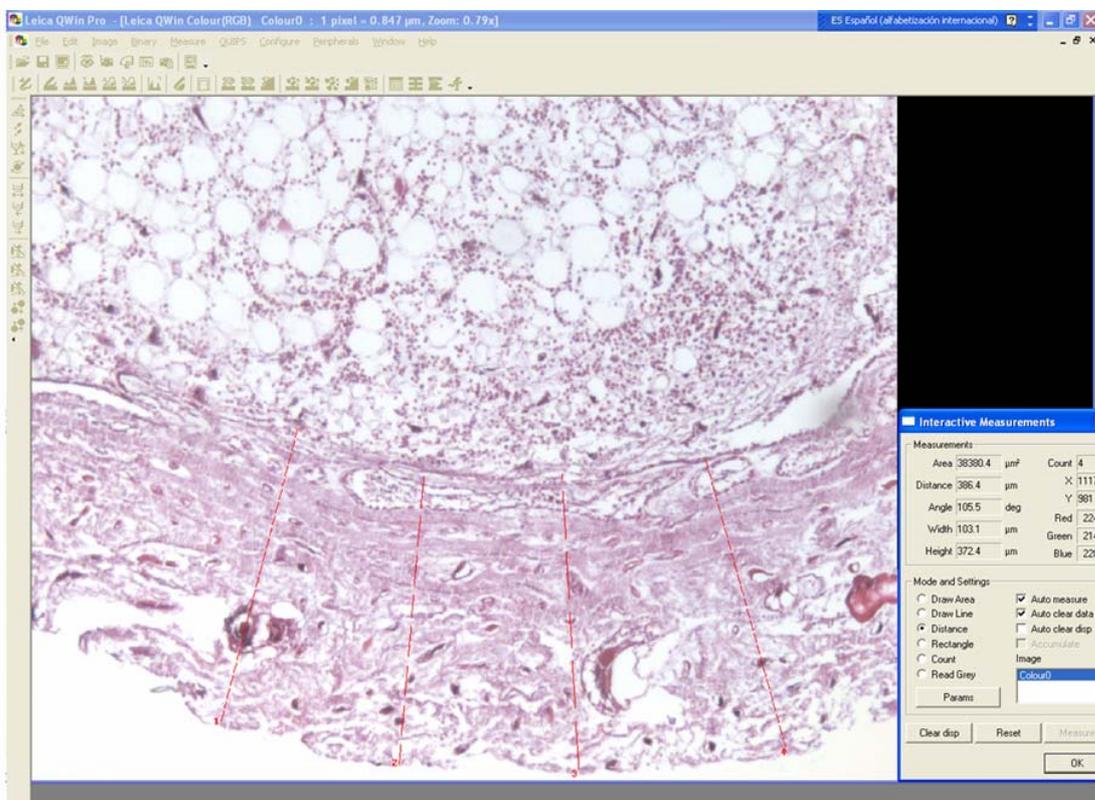


Fig. 41- Medición de la Longitud del Defecto Cubierto.



**Fig.42-** Medición del grosor de la cortical neoformada, imagen capturada con microscopio Leica DM 6000 B conectado a una cámara Leica DFC 280.



**Fig.43-** Medición del Grosor de la Cortical Normal, imagen capturada con microscopio Leica DM 6000 B conectada a una cámara Leica DFC 280.

Estos parámetros quedan almacenados en archivos definidos de memoria del ordenador y son exportados a un programa de cálculo (Excel) para realizar las determinaciones estadísticas.

### **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 ( $p < 0,05$ ).



## **5. RESULTADOS**



## **GRUPO I (15 días): Estudio Radiológico**

### **CONTROL**

En la radiografía simple de hueso se aprecia 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.

La imagen de TC muestra la discontinuidad del hueso cortical, con la comunicación entre el exterior y la zona medular del hueso, que puede observarse, de igual forma, en la imagen radiológica obtenida del corte transversal de la pieza quirúrgica. **(Fig.44)**

### **ENDOBON**

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 radiopacas, 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.

La imagen de TC confirma estos resultados debido a la elevada atenuación radiológica que provoca el implante en comparación con las estructuras óseas adyacentes. **(Fig.45)**

### **HUESO AUTÓLOGO**

Las características radiológicas del material implantado corresponde a la imagen de un elemento irregular, de aspecto algodonoso y densidad radiológica homogénea ligeramente superior a la del hueso circundante que permite individualizarlo sin dificultad. Su densidad cálcica es homogénea, y presenta unos bordes lisos pero irregulares adaptándose a la laguna ósea artificial que se ha practicado.

Se observa una solución de continuidad en la cortical de la zona epifisaria utilizada para la introducción del material. La estructura radiológica ósea del resto de la tibia no presenta alteraciones ocasionadas por la del implante.

En la imagen radiológica del corte transversal puede observarse estas características del implante que ocupa prácticamente toda la cavidad medular del hueso estudiado aunque destaca la diferente densidad ósea que presenta el implante en su interior.

La imagen de TC confirma estos resultados mostrando una superficie de gran irregularidad en las zonas de contacto con el hueso adyacente.

**(Fig. 46)**

### **MP3**

Las características radiológicas del material implantado corresponde a la imagen de un elemento cilíndrico con estructura rectangular 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 radiopacas de pequeño tamaño y aspecto redondeado que le confiere un aspecto granular, denso pero heterogéneo. Por esta razón, los bordes del implante aparecen irregulares, aunque formados por estos gránulos que se observan bien delimitados 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 presentando una morfología más radiopaca y de aspecto granular.

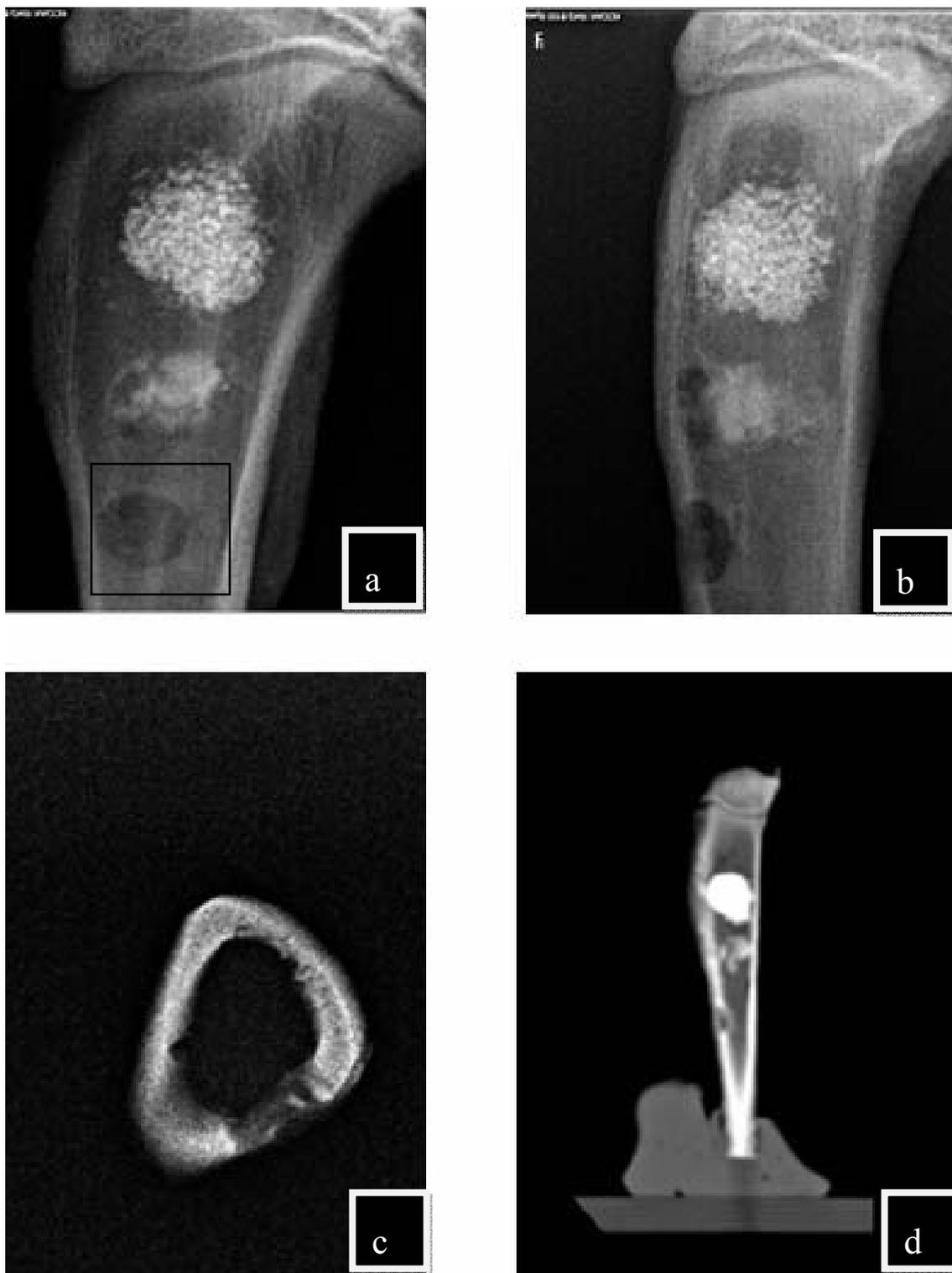
En la imagen radiológica del corte transversal puede observarse todas estas características del implante que ocupa toda la cavidad medular del hueso estudiado al nivel de la laguna ósea practicada.

La imagen de TC confirma estos resultados con igual claridad debido a la elevada atenuación que provoca el implante en comparación con las estructuras óseas adyacentes. **(Fig.47)**

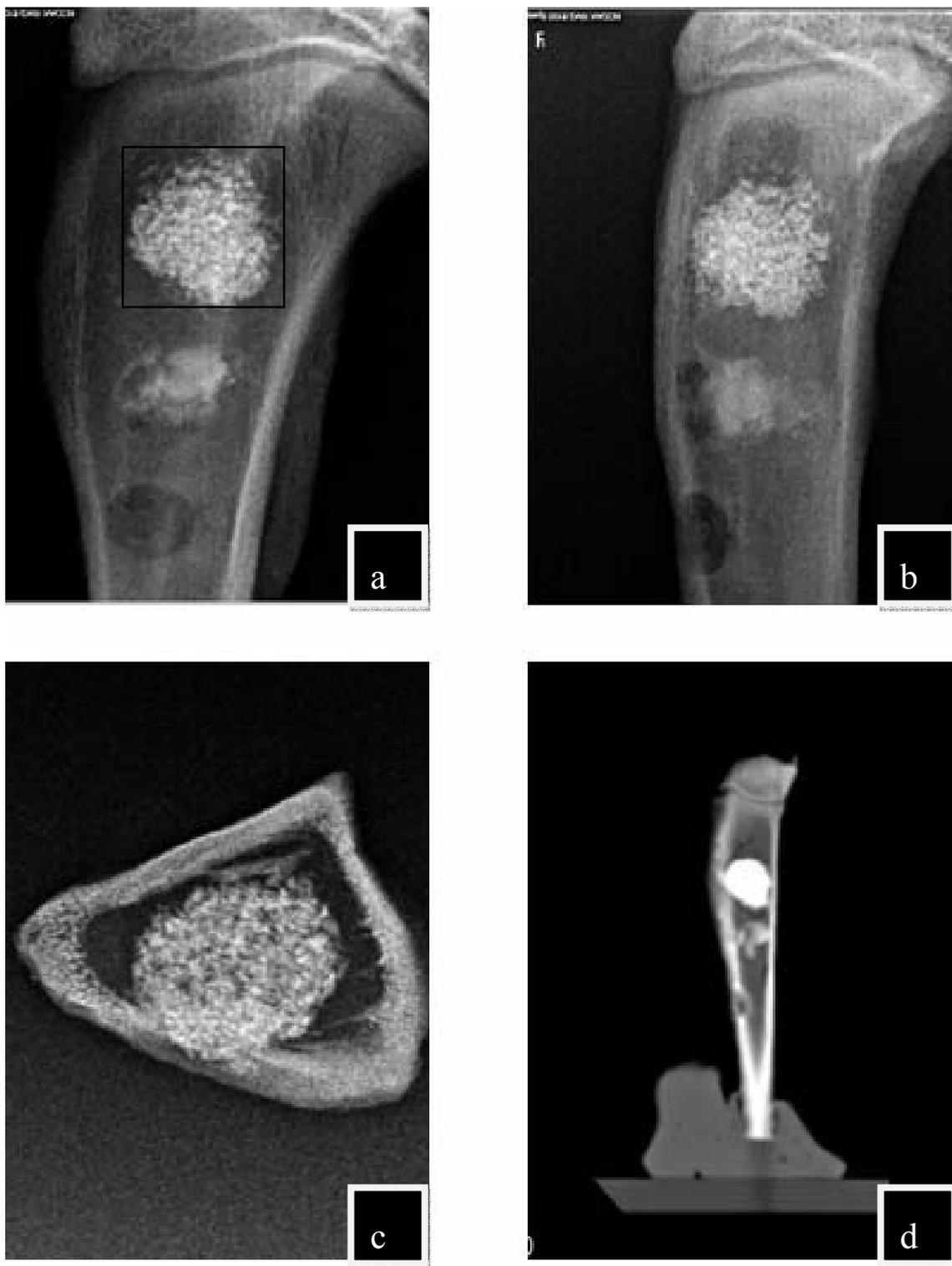
### **MELATONINA**

Los implantes de melatonina son radiotransparentes en la radiografía simple de hueso y en la micro TC. Por ello, a los 15 días sólo se observa la laguna radiotransparente artificial que aparece prácticamente “vacía” en su interior, pudiéndose apreciar la rotura cortical de la tibia realizada para la introducción del implante en la micro TC.

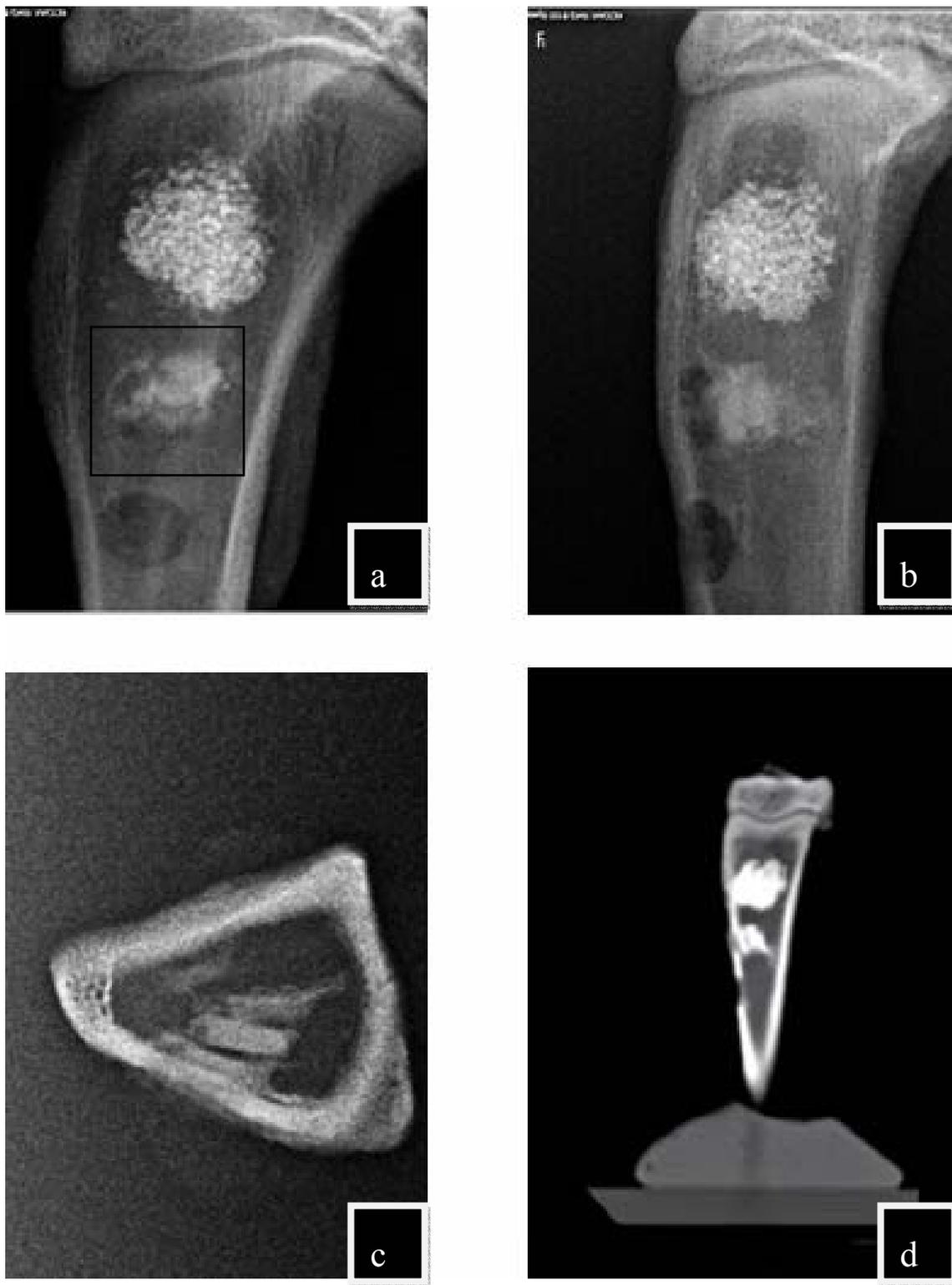
En la radiografía transversal de la pieza quirúrgica puede observarse un ligero aumento de la densidad radiológica de la melatonina que permite observarla individualizadamente en el interior del hueso. Puede observarse la pérdida de la cortical ósea realizada artificialmente para la introducción del implante que aparece como una imagen de pérdida de densidad cálcica en la zona abierta quirúrgicamente. **(Fig.48)**



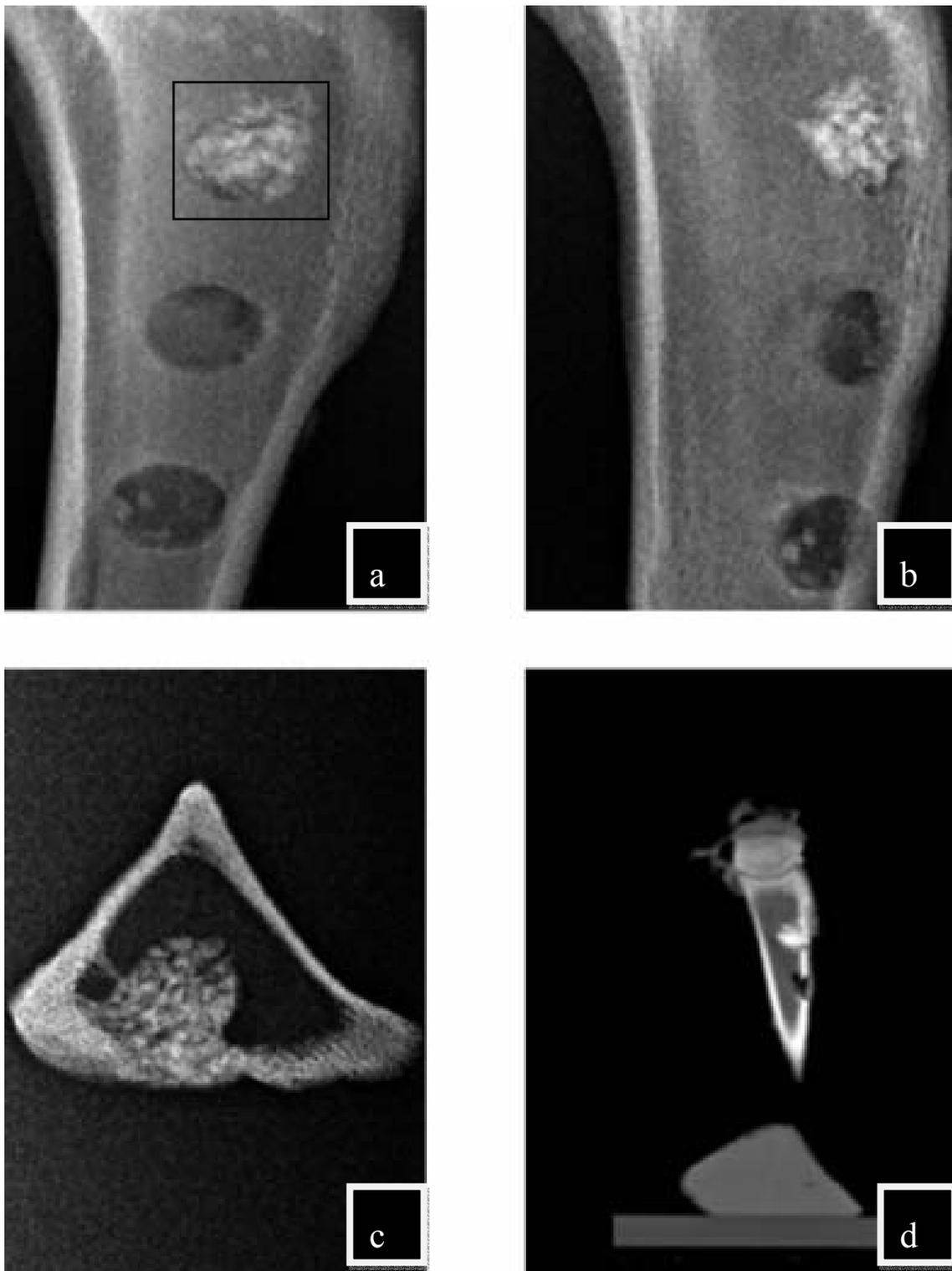
**Fig. 44-** Imagen radiológica Tibia Derecha-15 días (a) Radiología Digital Antero-Posterior (b) Radiología Digital Lateral (c) Radiovisiografía corte transversal de la pieza quirúrgica (CONTROL) (d) Tomografía Computerizada .



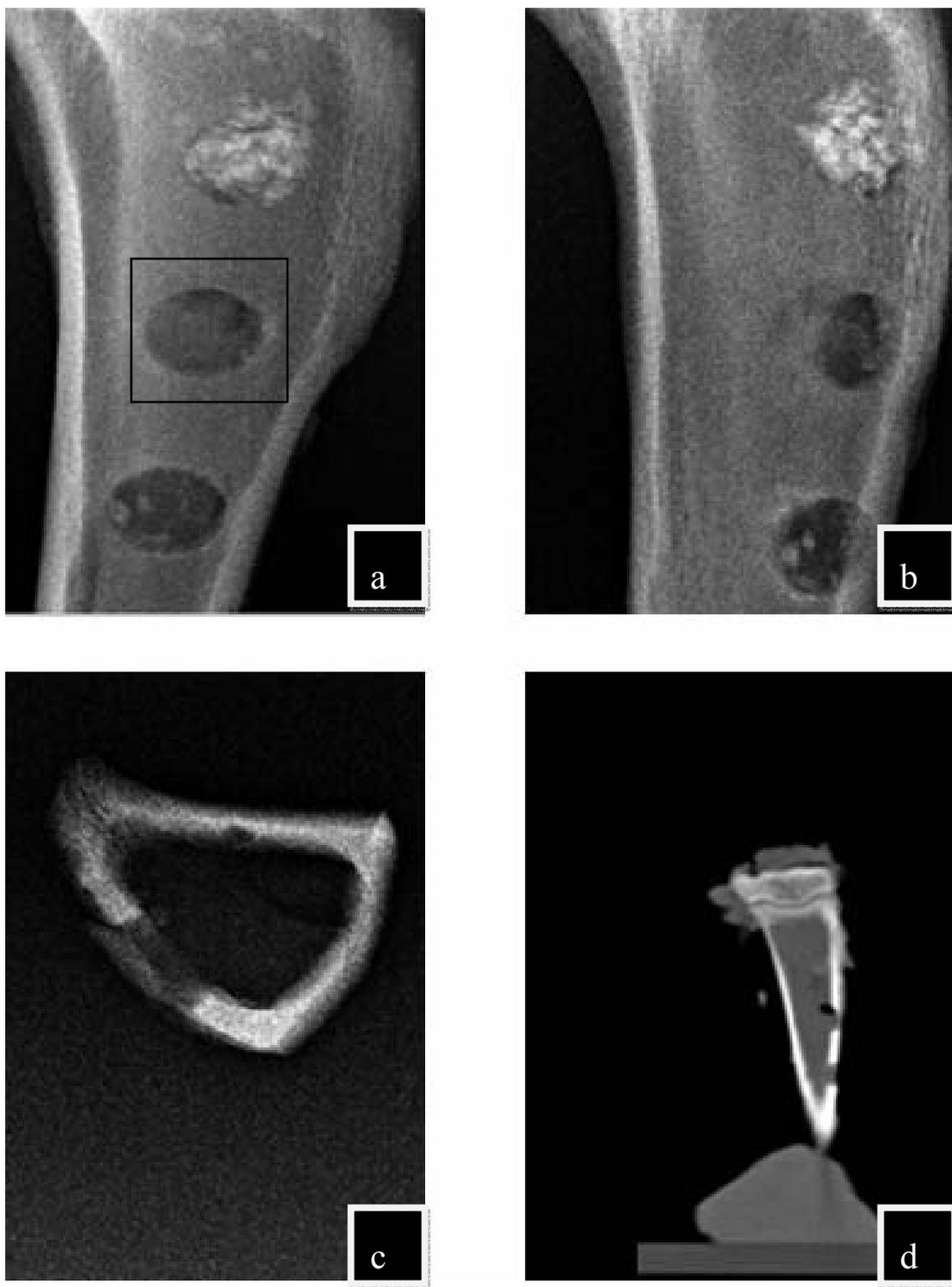
**Fig. 45-** Imagen radiológica Tibia Derecha-15 días (a) Radiología Digital Antero-Posterior (b) Radiología Digital Lateral (c) Radiovisiografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (ENDOBON) (d) Tomografía Computerizada.



**Fig. 46-** Imagen radiológica Tibia Derecha-15 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisiografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (H. AUTÓLOGO) **(d)** Tomografía Computerizada.



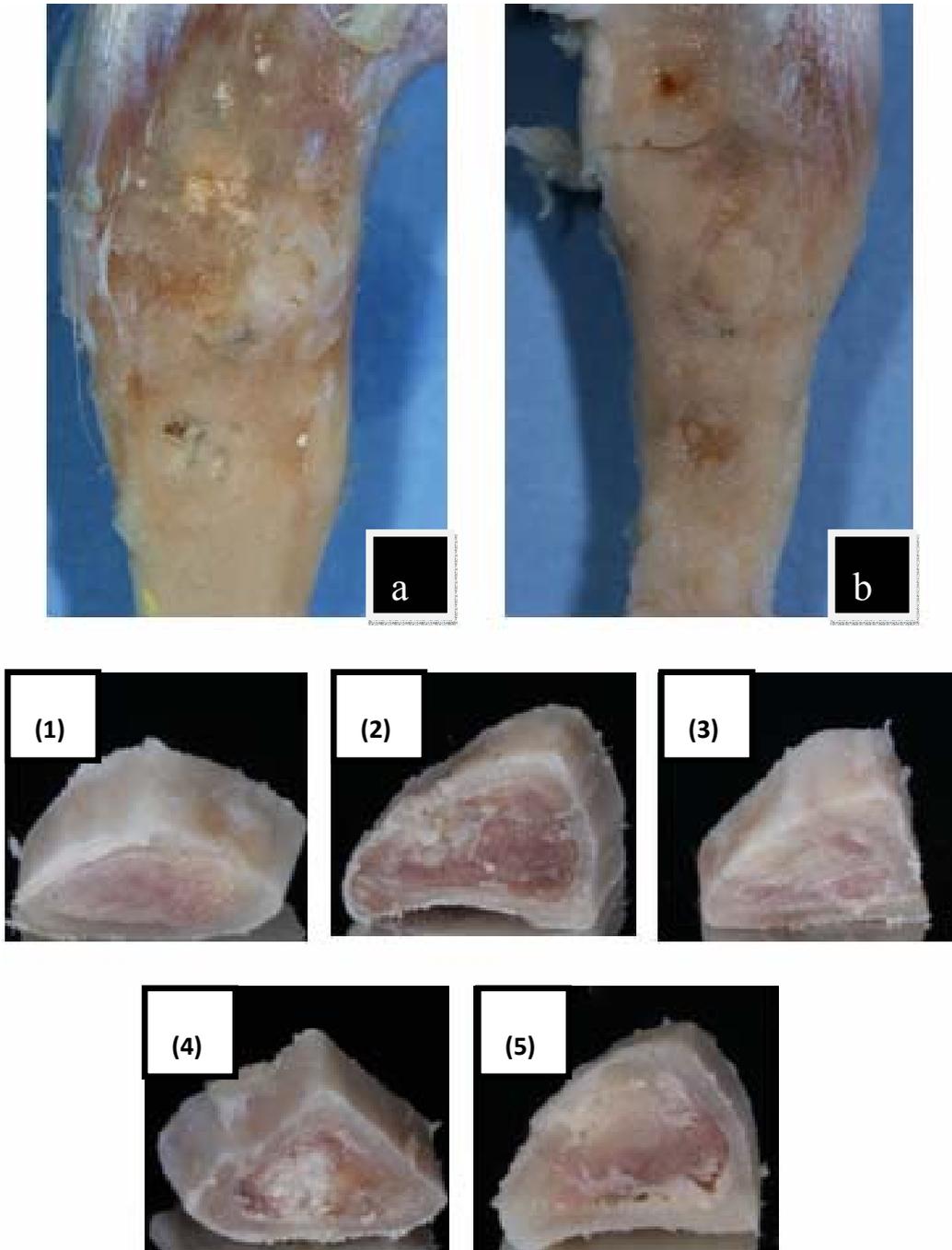
**Fig. 47-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-15 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisiografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MP3) **(d)** Tomografía Computerizada.



**Fig. 48-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-15 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisiografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MELATONINA) **(d)** Tomografía Computerizada.

## Estudio Anatomopatológico: Estudio Macroscópico

### GRUPO I (15 días)



**Fig. 49-** Imagen macroscoscópica tibia diseccionada-15 días (a) Tibia Derecha (b) Tibia izquierda. Imagen macroscópica corte transversal de las tibias a nivel del implante (1) Control (2) Endobon (3) H. Autólogo (4) MP3 (5) Melatonina.

## **Grupo I (15 días): Estudio Microscópico**

### **CONTROL**

Los cambios microscópicos más relevantes observados correspondían a: el área del defecto creado a nivel cortical ósea para la introducción de los implantes, destacaba la presencia de una costra fibrinohemática que tapizaba la zona más externa del orificio realizado. En este periodo de estudio se observan numerosos focos de tejido de granulación joven constituido por abundantes yemas endoteliales y vasos sanguíneos de calibre capilar así como células mesenquimales de morfología irregular con citoplasmas amplios, numerosos fibroblastos dispuestos al azar entre abundante sustancia intercelular con fibras colágenas dispuestas de forma irregular, así como frecuentes macrófagos y linfocitos de distribución dispersa. **(Fig. 53, 55)**

### **H. AUTÓLOGO**

A nivel del defecto óseo, se observaba en el seno de la médula ósea, la presencia de múltiples focos de hueso cortical maduro correspondiente a los chips de hueso autólogo obtenido de la perforación de las corticales. El implante presenta un aspecto de hueso laminar. Algunas trabéculas se encontraban aisladas y otras unidas a la superficie externa de la cortical, observándose a mayor detalle la actividad osteoblástica, con una hilera de osteoblastos que comienzan la neoformación del tejido óseo. **(Fig.60)**

### **MP3**

Destacaba la gran cantidad de partículas de xenoinjerto porcino (MP3®) repartidas por todo el área de la muestra. Las partículas presentan lagunas vacías de osteocitos, pudiendo existir algunas trabéculas neoformadas entre fragmentos del material implantado. Entre ellas existían numerosos focos de tejido de granulación joven de características similares a las descritas en el grupo control. **(Fig.51, 56)**

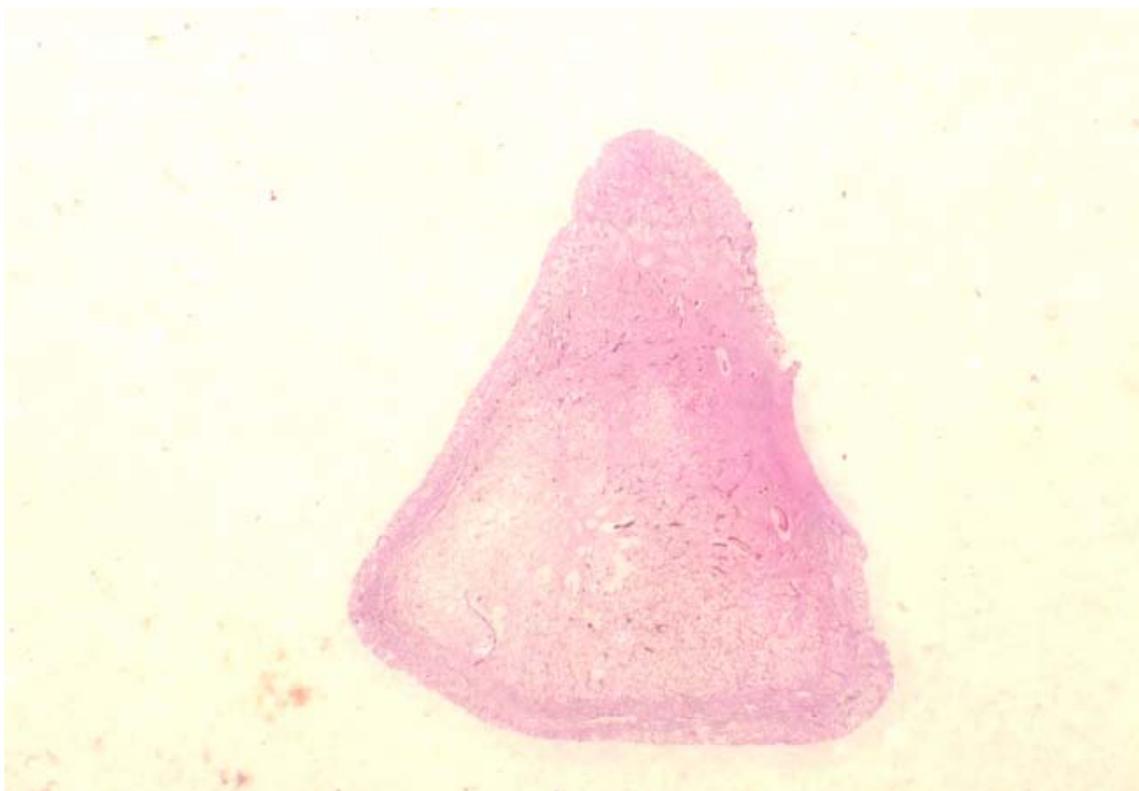
### **ENDOBON**

La zona correspondiente al material implantado se caracterizaba por presentar pequeños acúmulos de material finamente granular e intensamente basófilos. En el seno del tejido de granulación en contacto con la cortical así como en el seno del material implantado se observaban numerosos depósitos de material osteoide. El orificio de entrada está formado por una fina capa de tejido fibrinohemático interrumpido en su mayoría por gránulos del material implantado. Los bordes lisos y claramente artificiales lo diferencian de trabéculas óseas que pudiera haber a su alrededor (Detalle del biomaterial colonizado por osteoblastos). **(Fig. 57)**

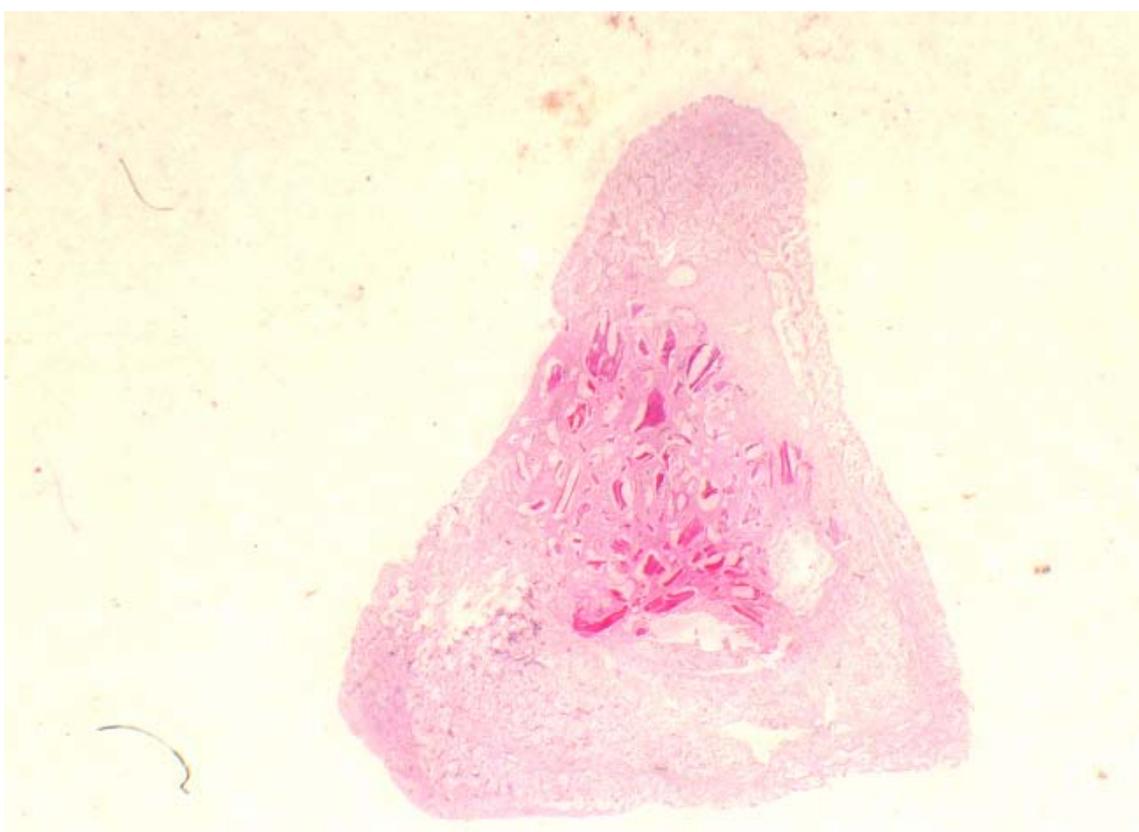
### **MELATONINA**

A nivel cortical observamos la costra fibrinohemática tapizando la entrada del defecto óseo creado para la introducción de los implantes, quedando este cubierto en todo su espesor. No observamos fenómenos inflamatorios relevantes, aunque en el seno del tejido de granulación

existen algunos macrófagos e infiltrados linfocitarios dispersos que penetraban de forma irregular en el seno de la médula ósea hematopoyética adyacente. **(Fig. 50, 52, 54, 58)**



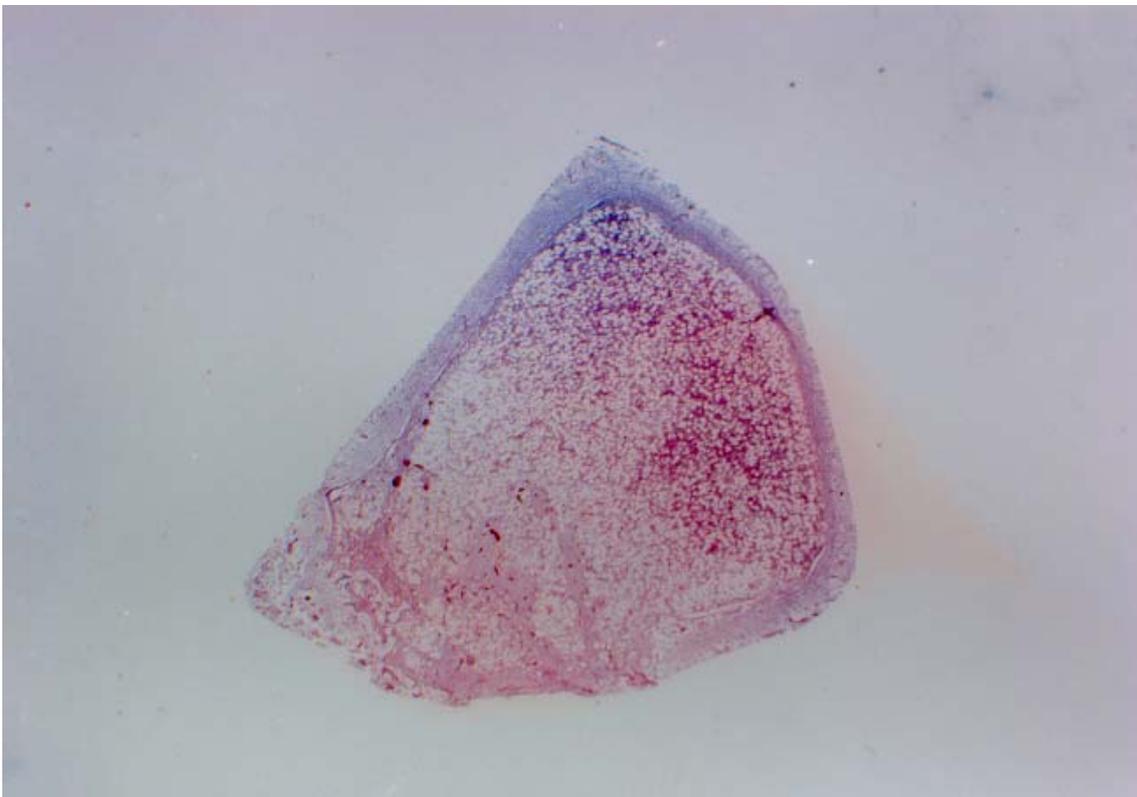
**Fig.50**-Melatonin-15días. Imagen panorámica (H.E.-23x). Zona de actividad histica. Cierre completo de la entrada al defecto óseo creado.



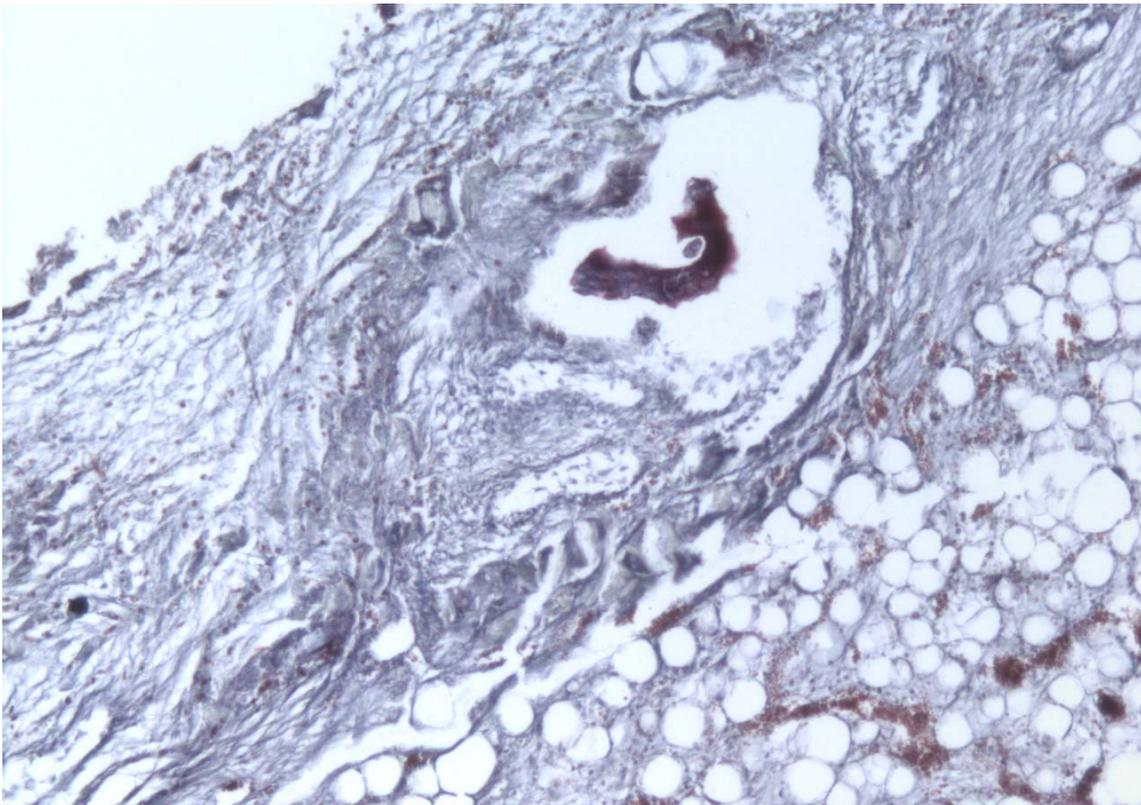
**Fig.51**- MP3®- 15 días. Imagen panorámica (H.-E.-23x). Área implantada, cierre incompleto de la cortical a nivel del defecto creado.



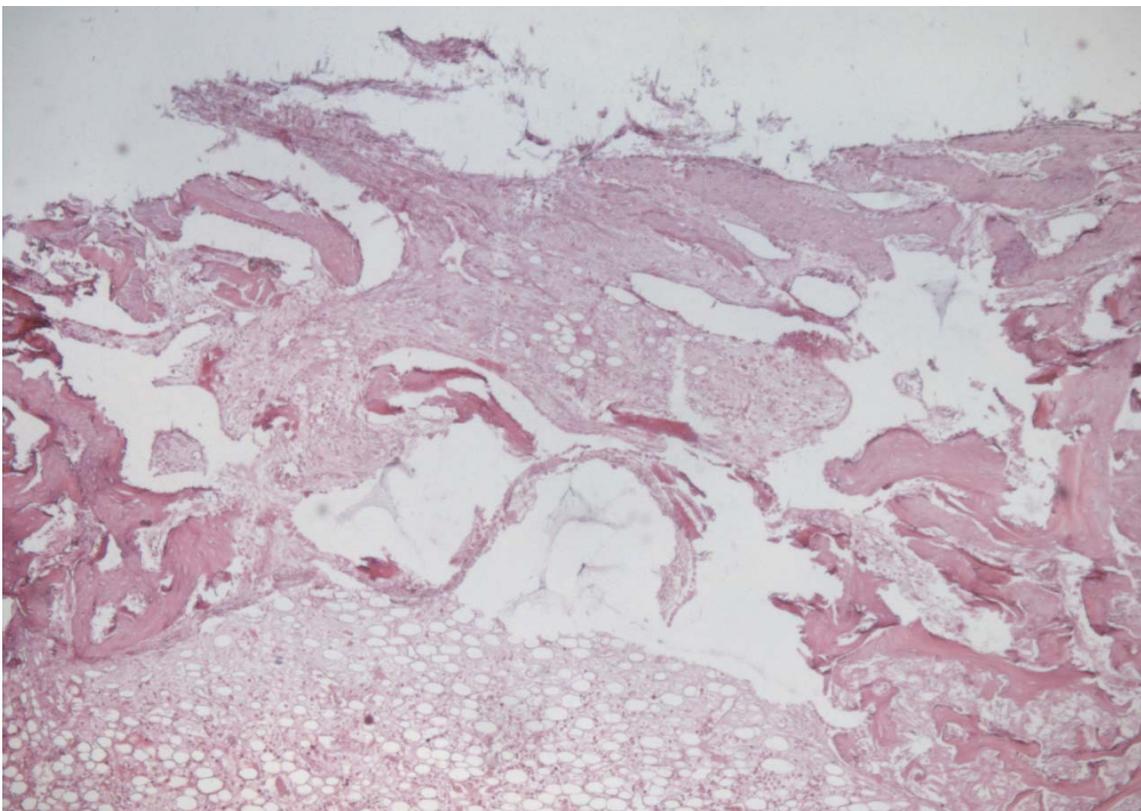
**Fig. 52-** Melatonina- 15 días. Imagen panorámica (T. M.-23x). Aumento de la angiogénesis.



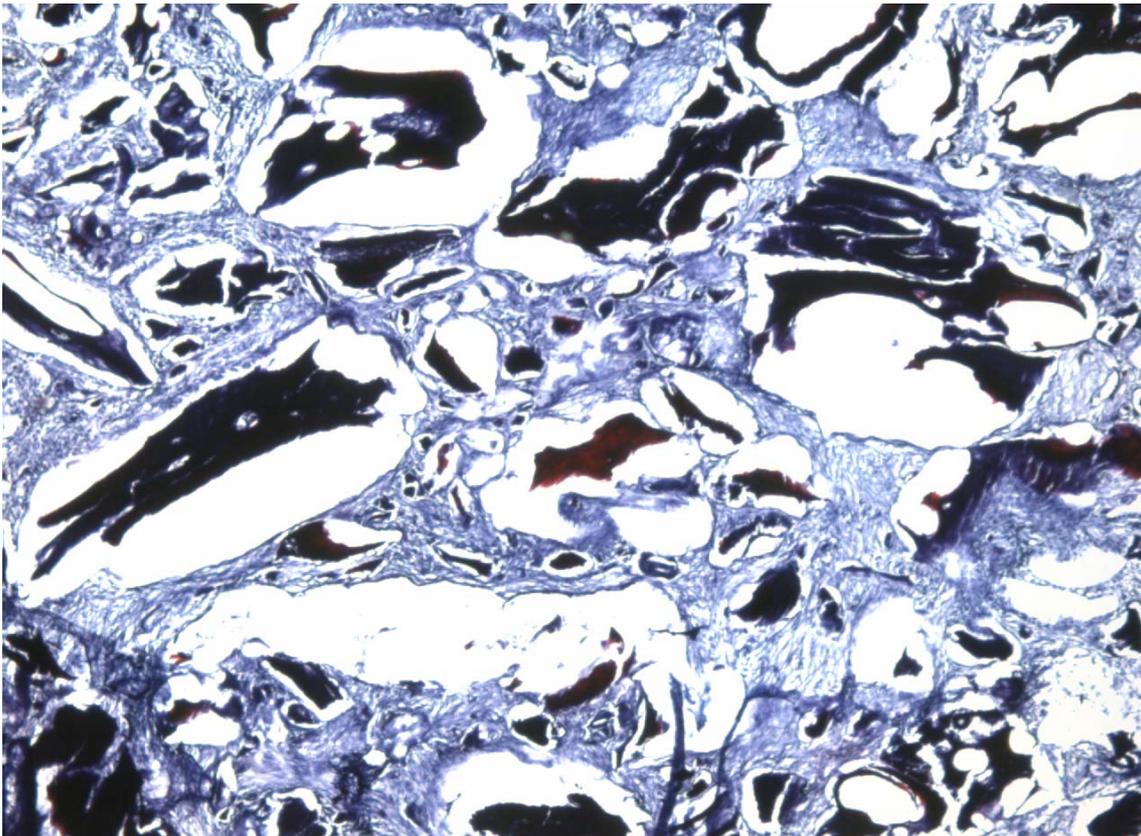
**Fig.53-** Control- 15 días. Imagen panorámica (T.M.-23x).Tejido de granulación joven.



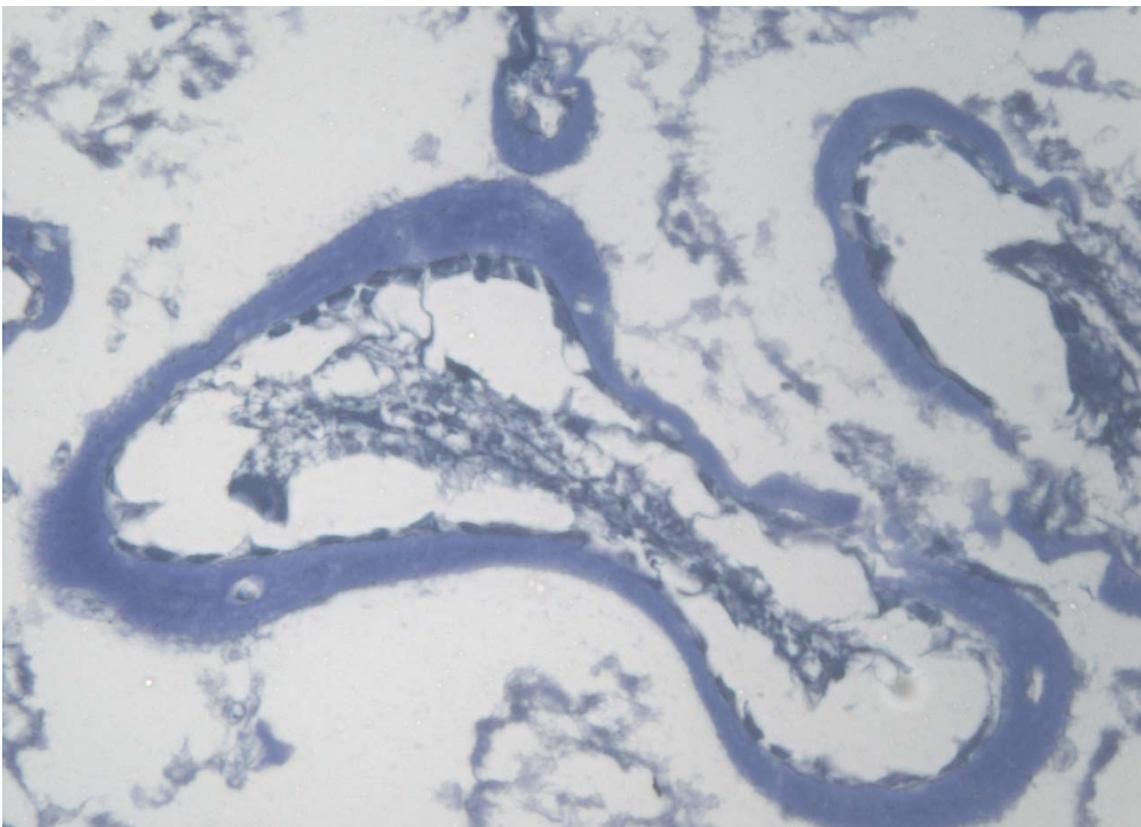
**Fig.54-** Melatonina-15 días. Detalle microscopía (T.M.-250x). Concha fibrinohemática que tapiza completamente la entrada del defecto óseo creado.



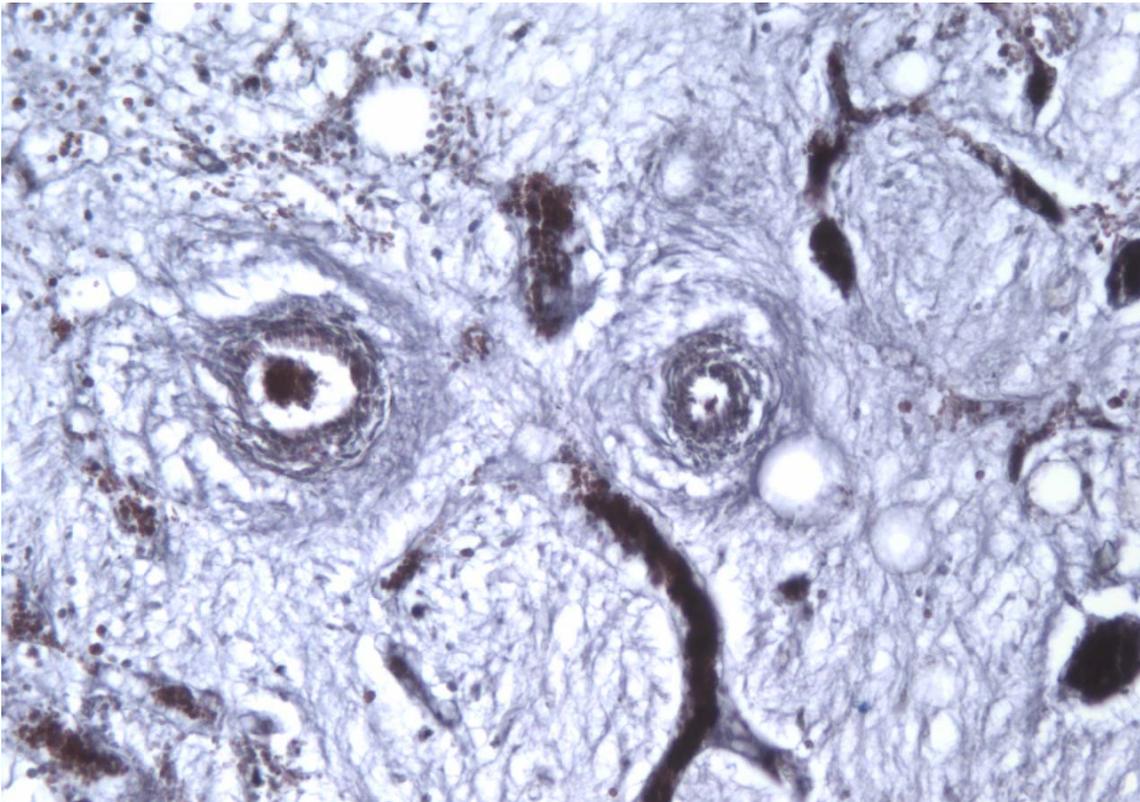
**Fig.55-** Control-15 días. Detalle microscopía (H.E.-125x). Costra fibrinohemática poco densa con tejido de granulación a nivel de la médula ósea y formación de trabéculas óseas en la proximidad de la cortical.



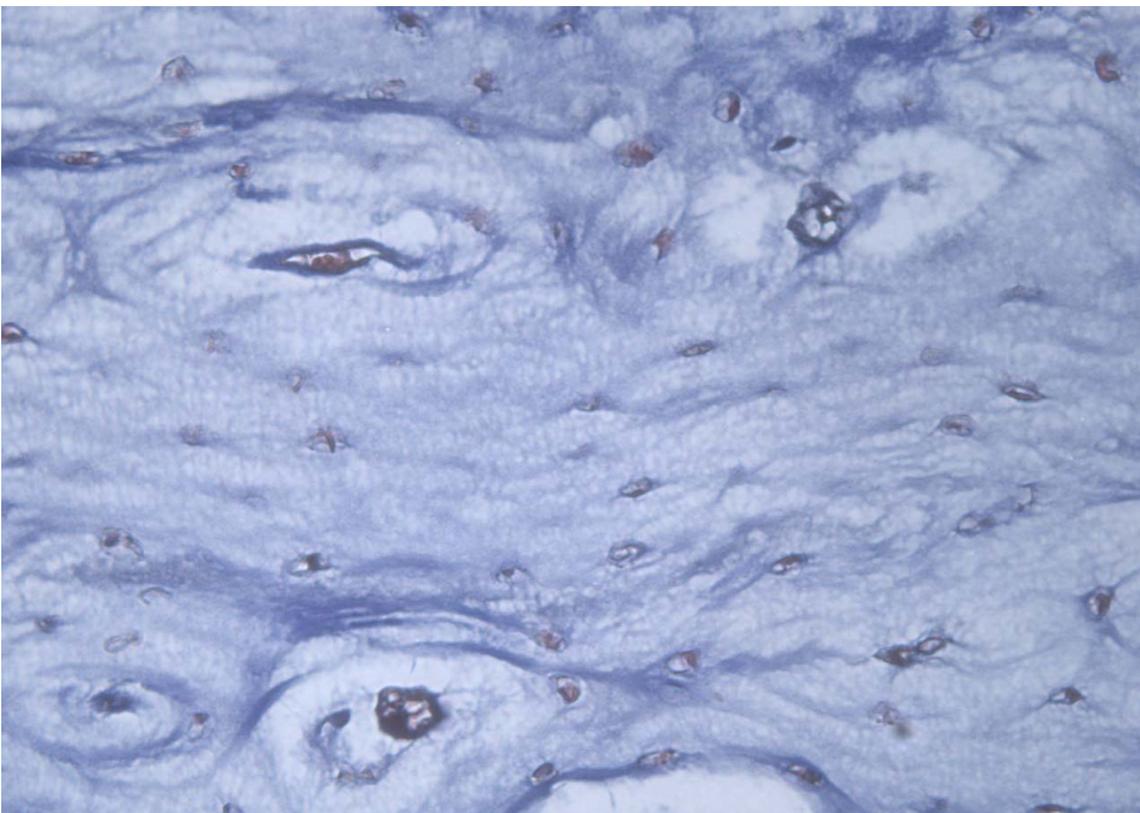
**Fig.56-** MP3®-15 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Depósito de tejido osteoide en el seno del tejido de granulación que envuelve al implante con trabéculas neoformadas dispersas.



**Fig.57-** Endobon®-15 días. Detalle microscopía (T. M. -1000x). Material colonizado por una hilera de osteoblastos.



**Fig.58-** Melatonina-15 días. Detalle microscopía (T. M.-500x). Numerosas yemas endoteliales y vasos sanguíneos de calibre capilar.



**Fig.59-** Hueso Autólogo-15 días. Detalle microscopía (T.M.-1000x). Hueso maduro de aspecto laminar.

## **GRUPO II (30 días): Estudio Radiológico**

### **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 puede observarse 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.

La imagen de TC muestra la discontinuidad del hueso cortical que muestra la comunicación entre el exterior y la zona medular, presentando las mismas características que el hueso circundante, apreciándose, según el corte realizado, una laguna radiológica de igual densidad que la del hueso que tiene a su alrededor en donde ya no se aprecian imágenes de densidad inferior a la del hueso circundante. **(Fig. 60)**

### **ENDOBON**

A los 30 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. La imagen de TC confirma estos mismos hallazgos. **(Fig.61)**

## **HUESO AUTÓLOGO**

El implante de hueso autólogo presenta un menor tamaño, una menor densidad radiológica y un aumento de las irregularidades de su superficie que se encuentran en contacto con el hueso normal circundante. Se observan líneas radiopacas similares a las trabéculas óseas introduciéndose desde el hueso adyacente hacia el interior del implante.

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 ligeramente inferior y más heterogénea que la presentada por la cortical del resto del hueso, de forma similar a la descrita en los huesos controles. La imagen de TC confirma estos mismos hallazgos. **(Fig. 62)**

## **MP3**

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. **(Fig 63)**

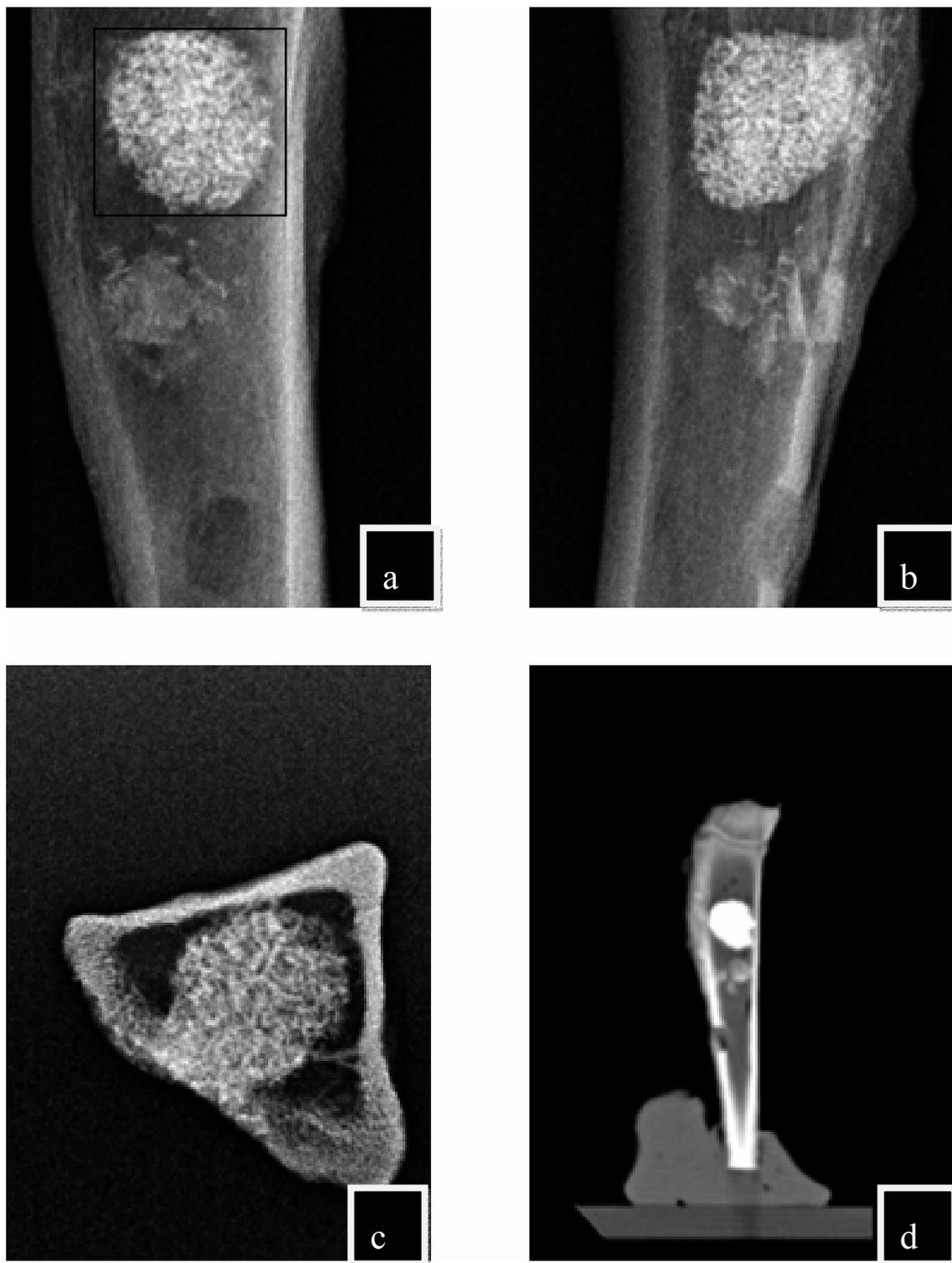
## **MELATONINA**

El orificio cortical para la introducción del implante se encuentra completamente cerrado por una imagen densa de hueso presentando un aspecto de menor densidad radiológica que el hueso cortical circundante pero completamente reparado. La TC muestra una imagen cortical ósea muy delgada pero que cierra completamente la cortical externa del hueso.

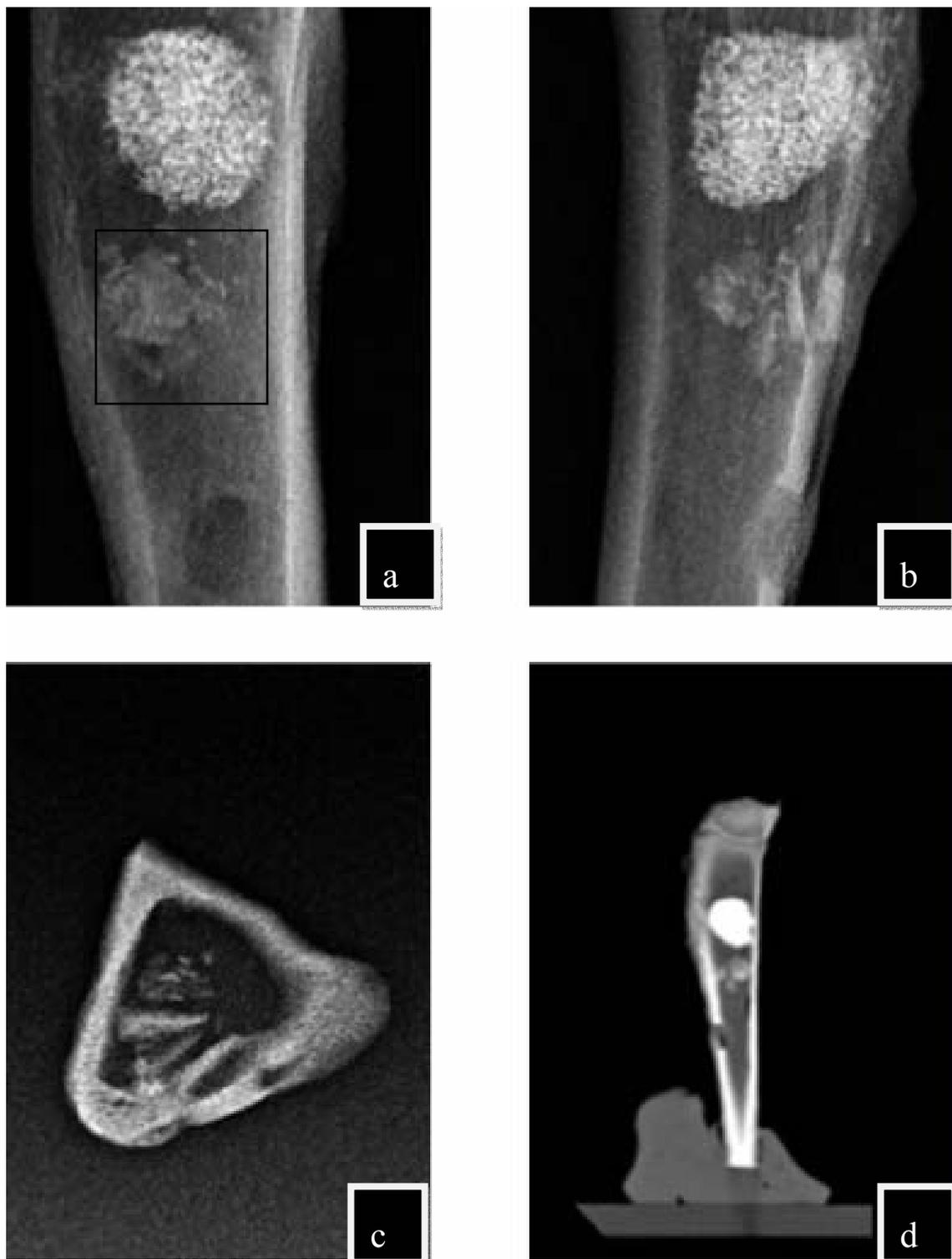
**(Fig. 64)**



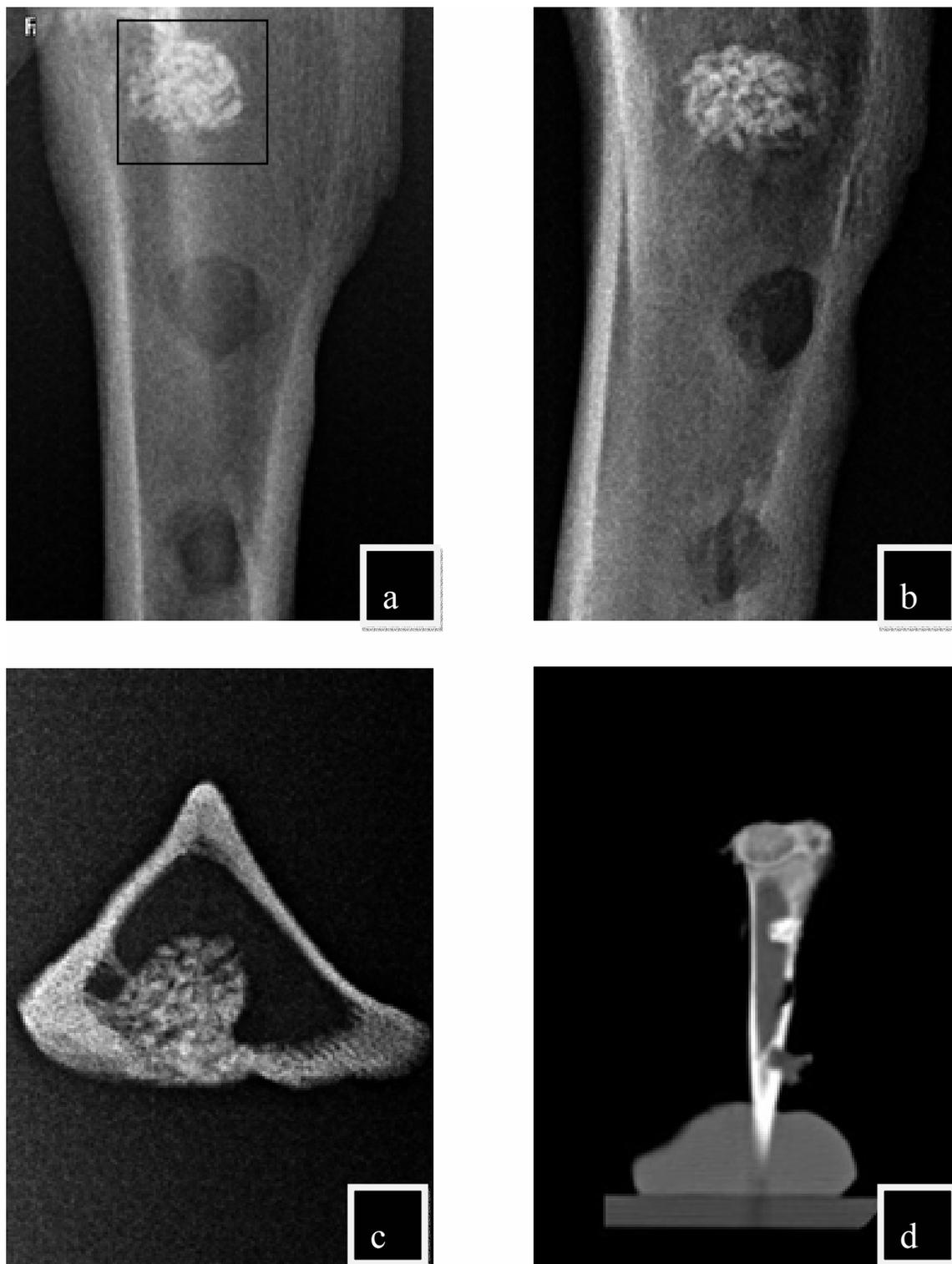
**Fig.60-** Imagen radiológica Tibia Derecha-30 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (CONTROL) **(d)** Tomografía Computerizada .



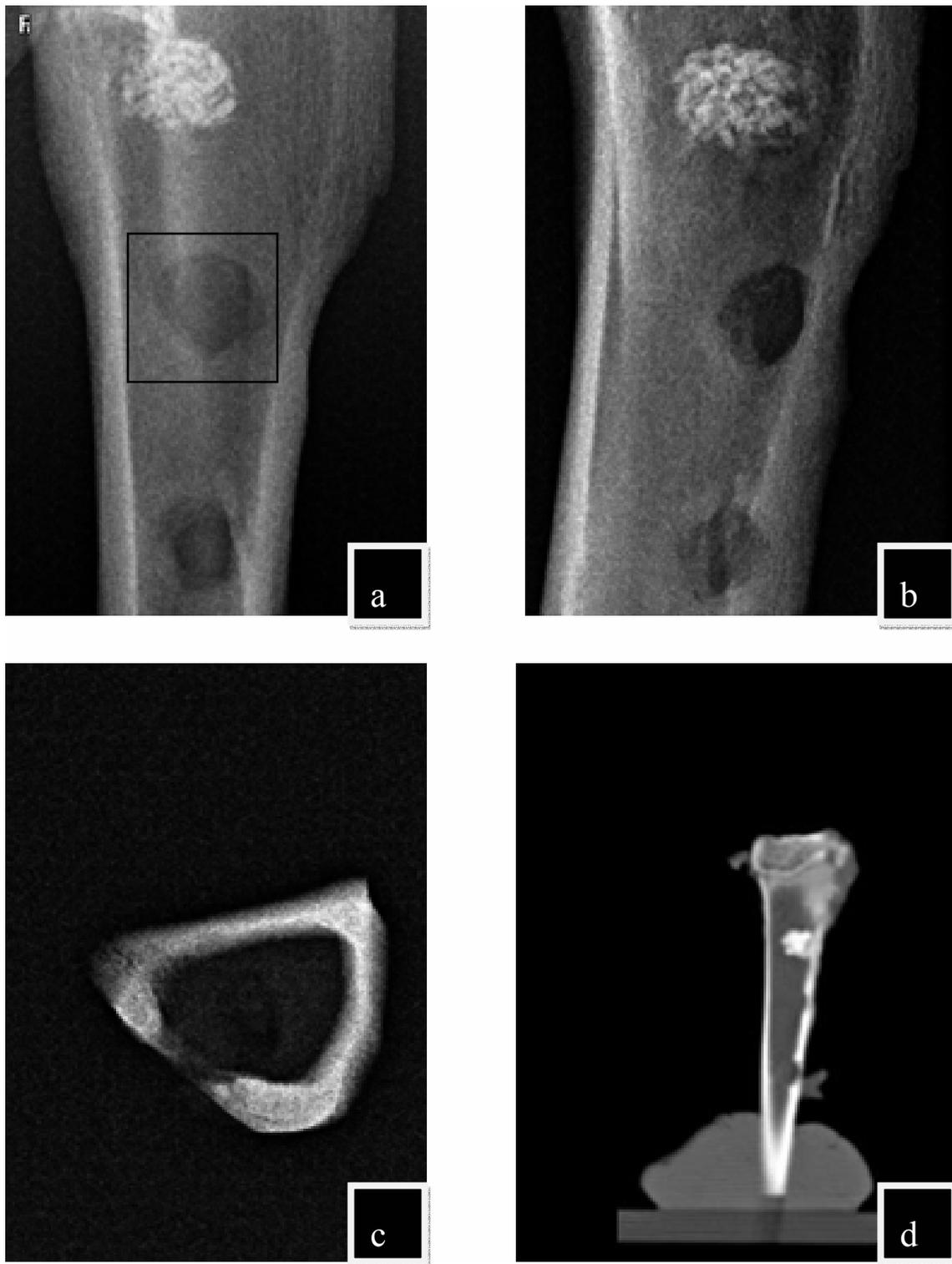
**Fig. 61-** Imagen radiológica Tibia Derecha-30 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (ENDOBON) **(d)** Tomografía Computerizada.



**Fig.62-** Imagen radiológica Tibia Derecha-30 días (a) Radiología Digital Antero-Posterior (b) Radiología Digital Lateral (c) Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (H.AUTÓLOGO) (d) Tomografía Computerizada.

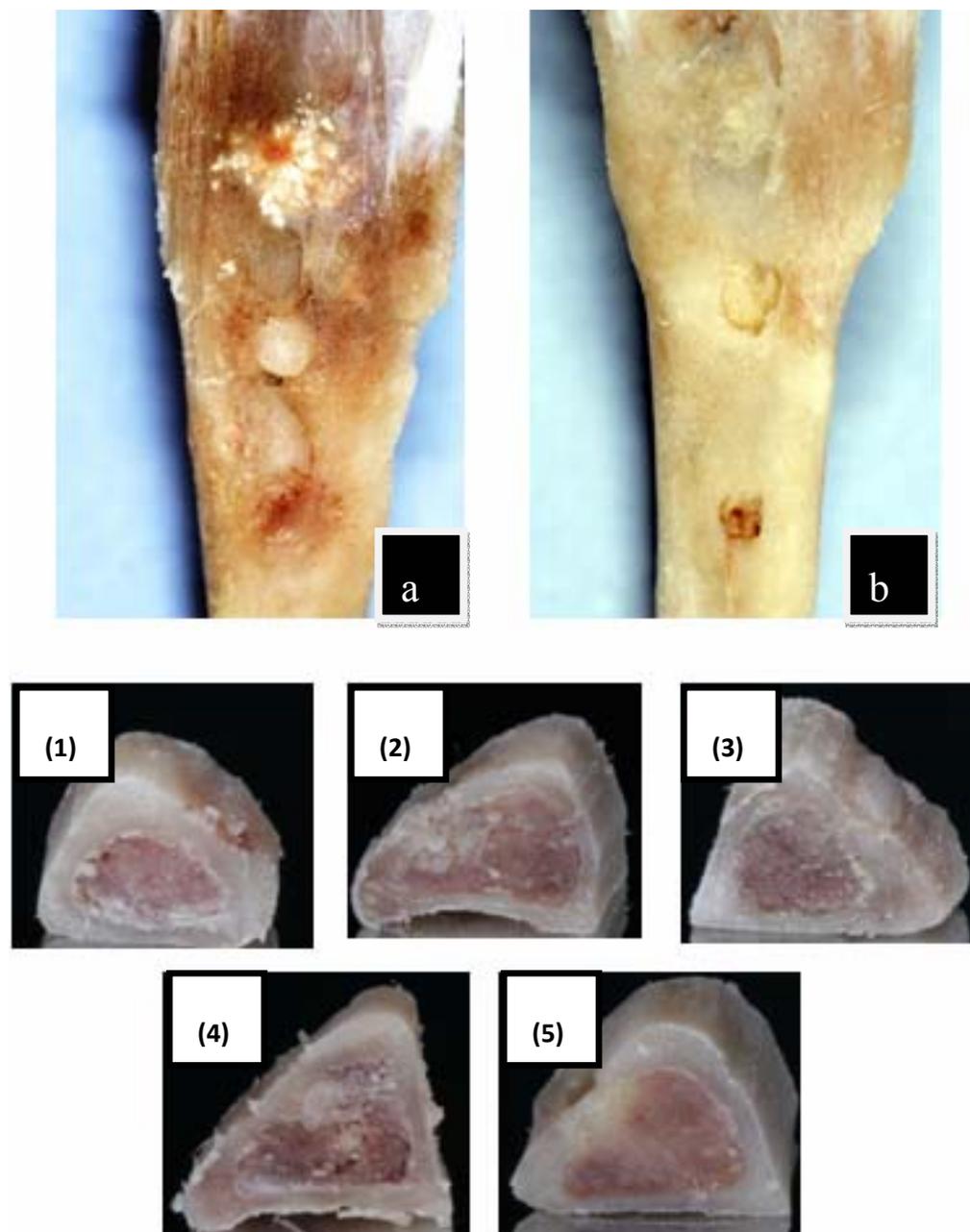


**Fig.63-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-30 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MP3) **(d)** Tomografía Computerizada.



**Fig.64-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-30 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MELATONINA) **(d)** Tomografía Computerizada.

## GRUPO II (30 DÍAS): Estudio Macroscópico



**Fig.65-** Imagen macroscópica tibia diseccionada-30 días (a) Tibia Derecha ( b) Tibia izquierda. Imagen macroscópica corte transversal de las tibias a nivel del implante (1) Control (2) Endobon (3) H. Autólogo (4) MP3 (5) Melatonina.

## **Grupo II (30 días): Estudio Microscópico**

### **CONTROL**

En este periodo destacaba el aumento de los fenómenos de regeneración ósea en la periferia del implante y en la proximidad de la médula ósea adyacente. A mayor aumento se observaba en algunas preparaciones como el área de la cortical neofomada no cubría la longitud del defecto en su totalidad dejando algunos gap de unión entre el hueso de la cortical neoformada y la cortical adyacente. **(Fig. 70)**

### **ENDOBON**

En el seno del tejido de granulación en contacto con la cortical se observaban numerosos depósitos de material osteoide e incluso pequeñas trabéculas óseas neoformadas, irregulares respecto a su tamaño y disposición, que eran más abundantes en las zonas adyacentes a la cortical. Entre las partículas se observaba como la médula ósea era sustituida por material osteoide que adoptaba una forma trabéculas. **(Fig. 66,75)**

### **H.AUTÓLOGO**

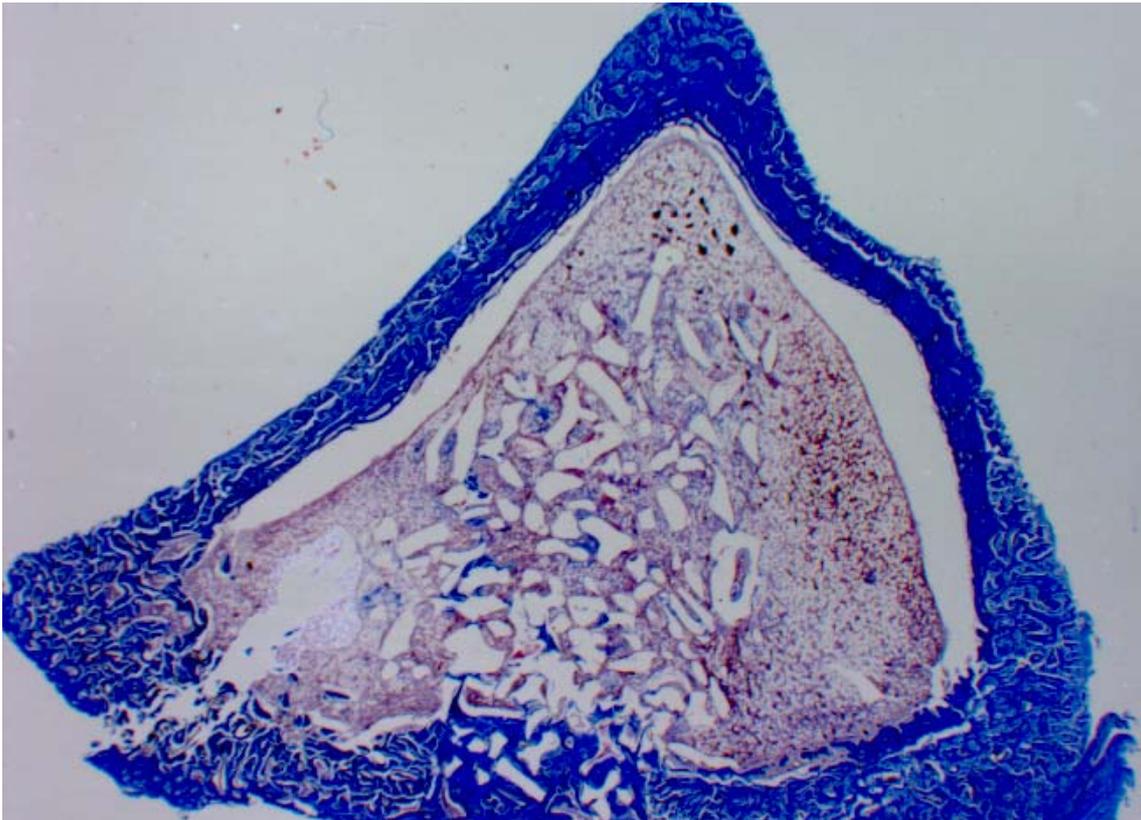
Destacaba el aumento de la formación de trabéculas óseas en continuidad con la cortical, alrededor de los focos de material injertado y del tejido medular. Asimismo empezaban a mostrarse signos de osificación del material osteoide neoformado entre las trabéculas de hueso maduro. La neoformación ósea seguía una distribución tanto centrípeta como centrífuga desde el interior de la médula que le da un aspecto a modo de doble cono invertido. **(Fig. 68)**

### **MP3**

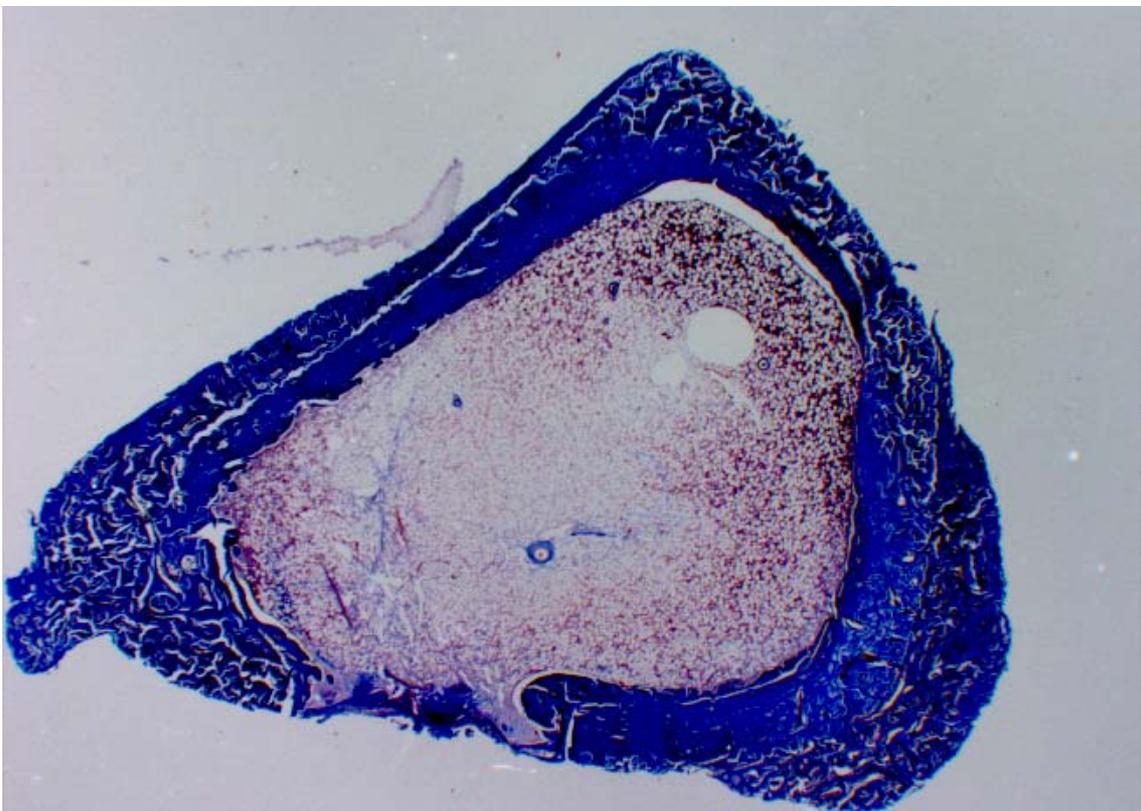
En la zona límite entre la cortical y la zona del implante existía abundante tejido de granulación entre islotes del material con múltiples focos de osteoide. A mayor aumento se observaba alrededor del material numerosas trabéculas neoformadas y depósitos de osteoide en el seno del tejido de granulación. Asimismo se evidenciaban signos de reabsorción del biomaterial. **(Fig. 69,74)**

### **MELATONINA**

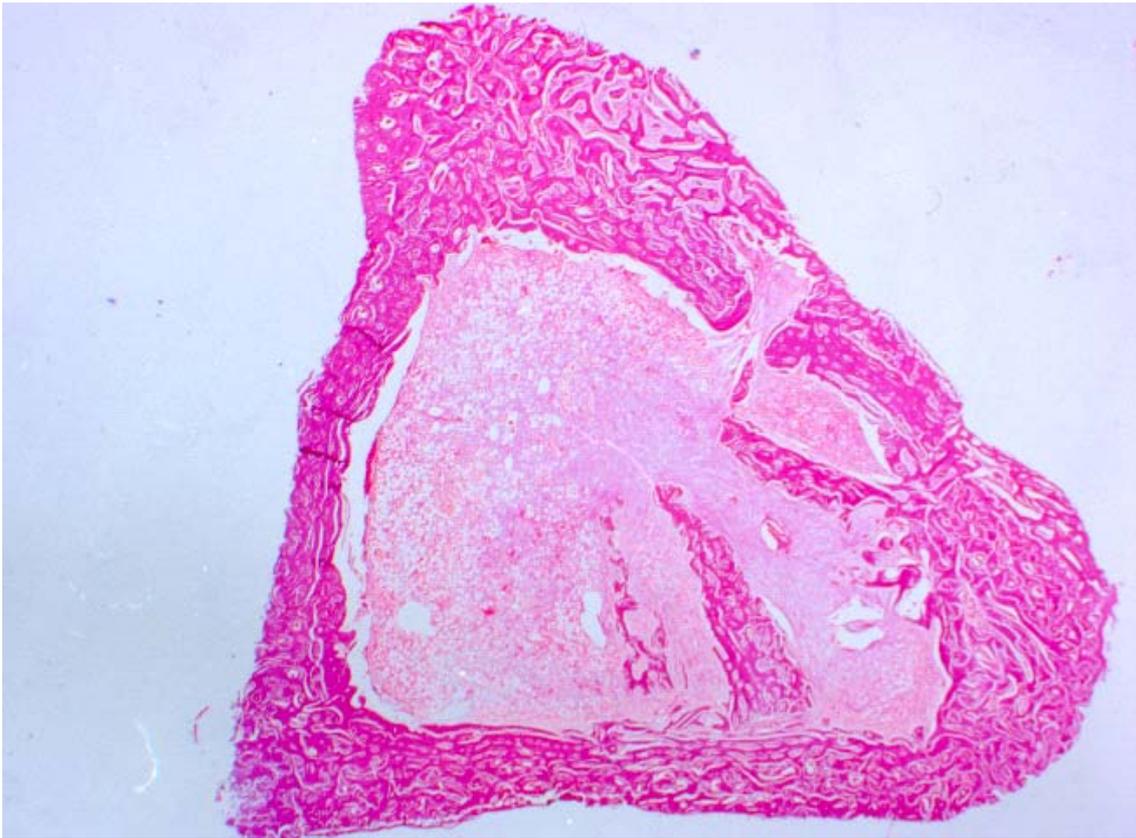
Observamos en el seno del tejido de granulación, de la costra fibrinohemática, abundantes focos de material osteoide que se proyectaba desde los bordes del defecto a modo de dedo de guante, cubriendo la longitud del defecto en su práctica totalidad. **(Fig. 67, 71, 72, 73)**



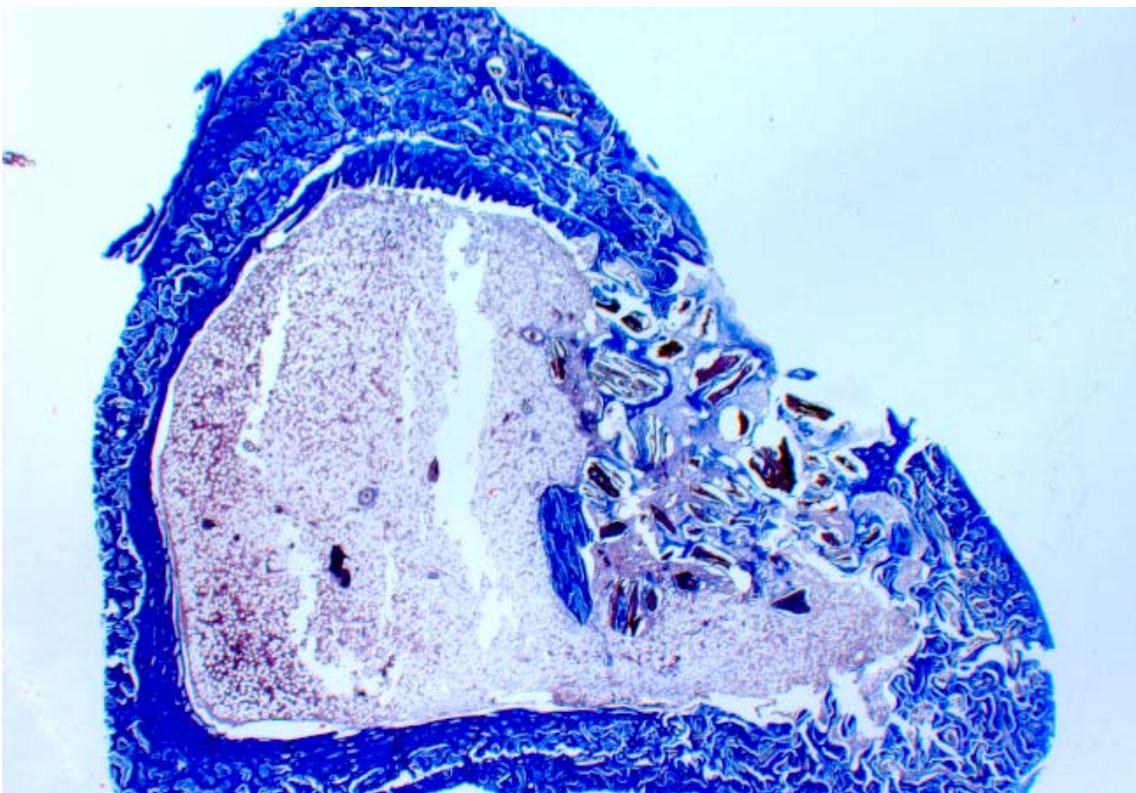
**Fig.66-** Endobon®-30 días. Imagen panorámica (T.M.-23x). Depósito de osteoide en el seno del tejido de granulación.



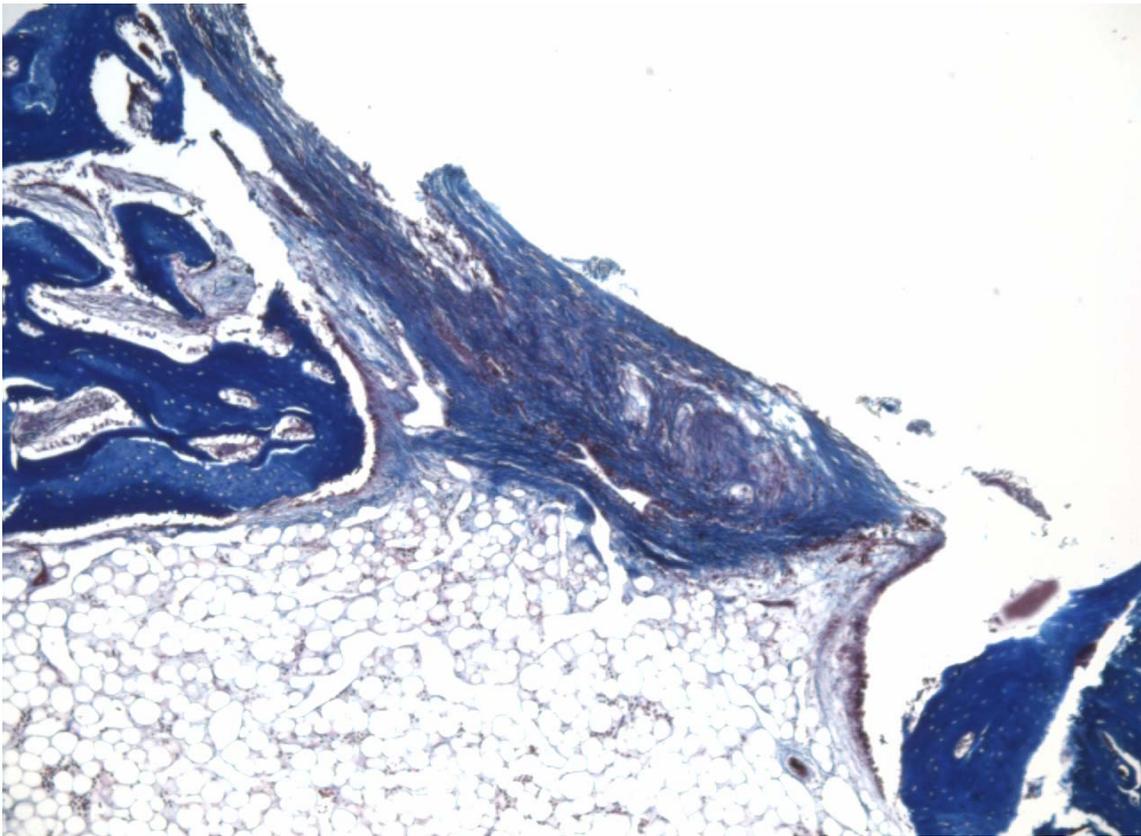
**Fig.67-** Melatonina 30 días. Imagen panorámica (T.M.-23x).Tendencia a la reconstrucción del defecto. Tejido inmaduro calcificado vascular



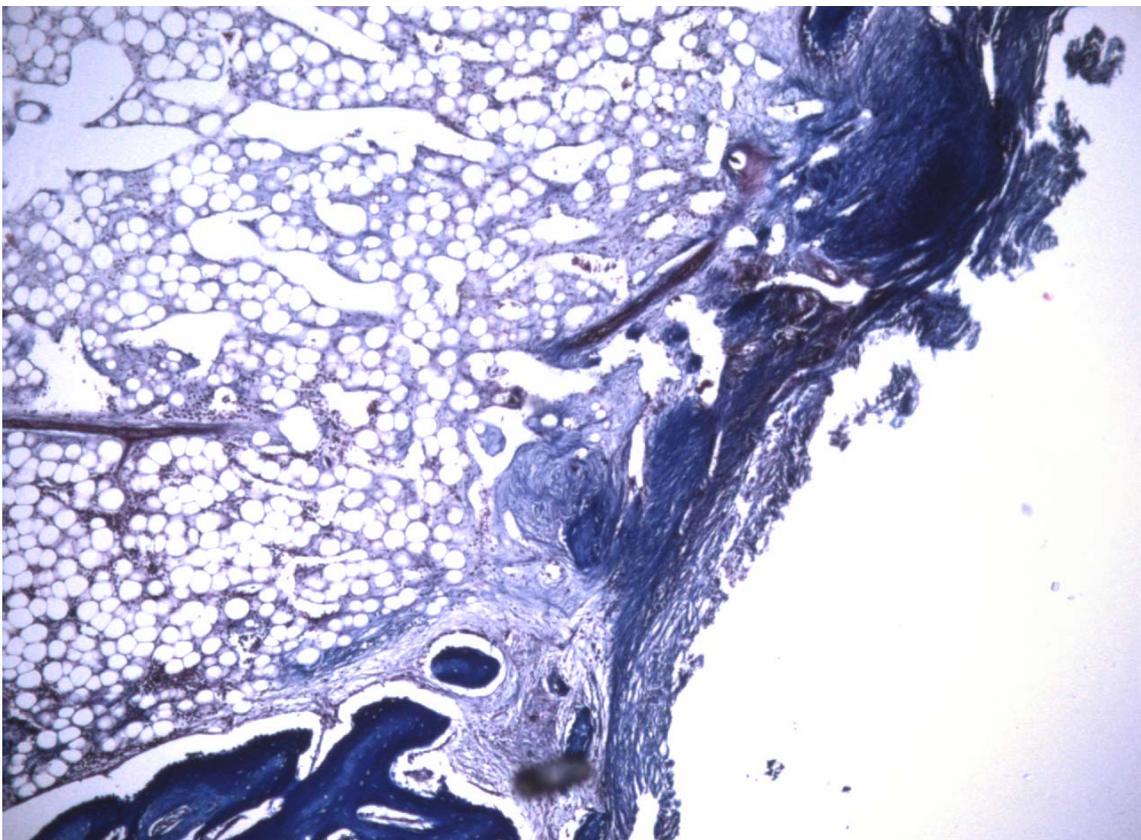
**Fig. 68-** H. autólogo-30 días. Imagen panorámica (H.E.-23x). Aumento de la formación de trabéculas óseas en continuidad con la cortical, alrededor de los focos de material injertado y del tejido medular.



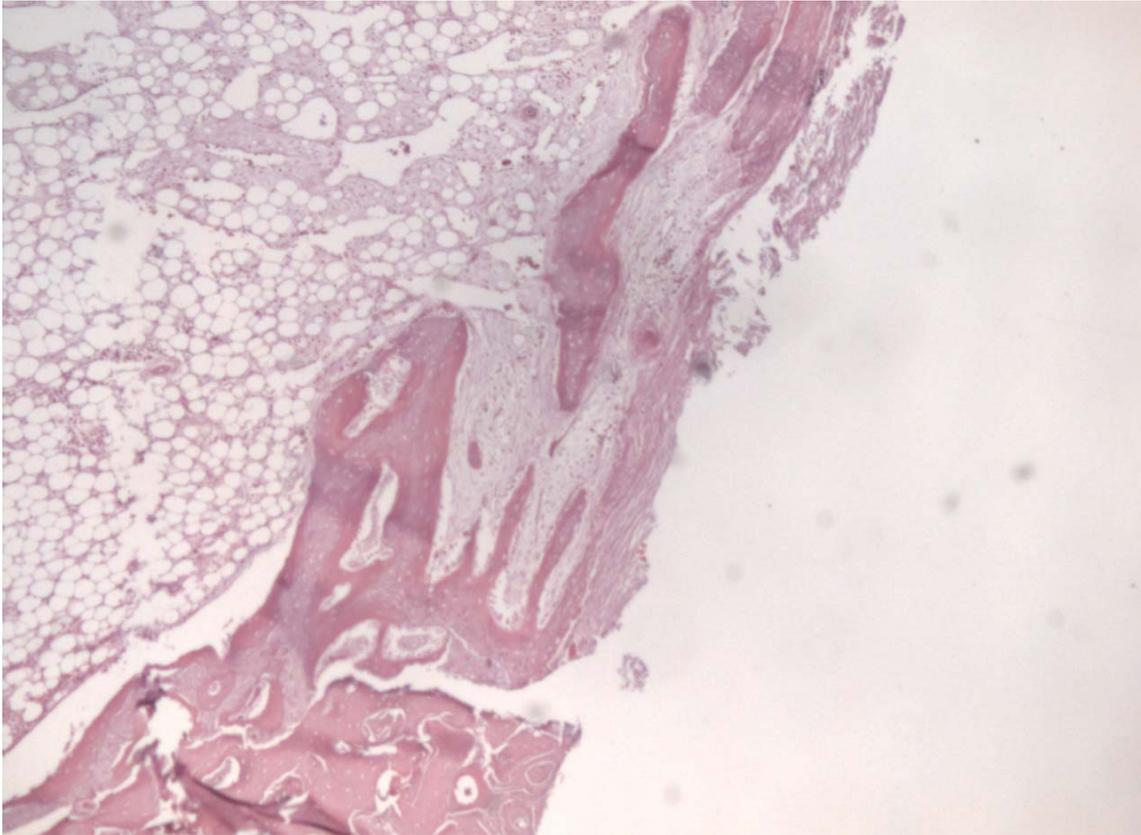
**Fig. 69-** MP3® -30 días. Imagen panorámica (T.M.-23x). Abundante depósito de tejido osteoide.



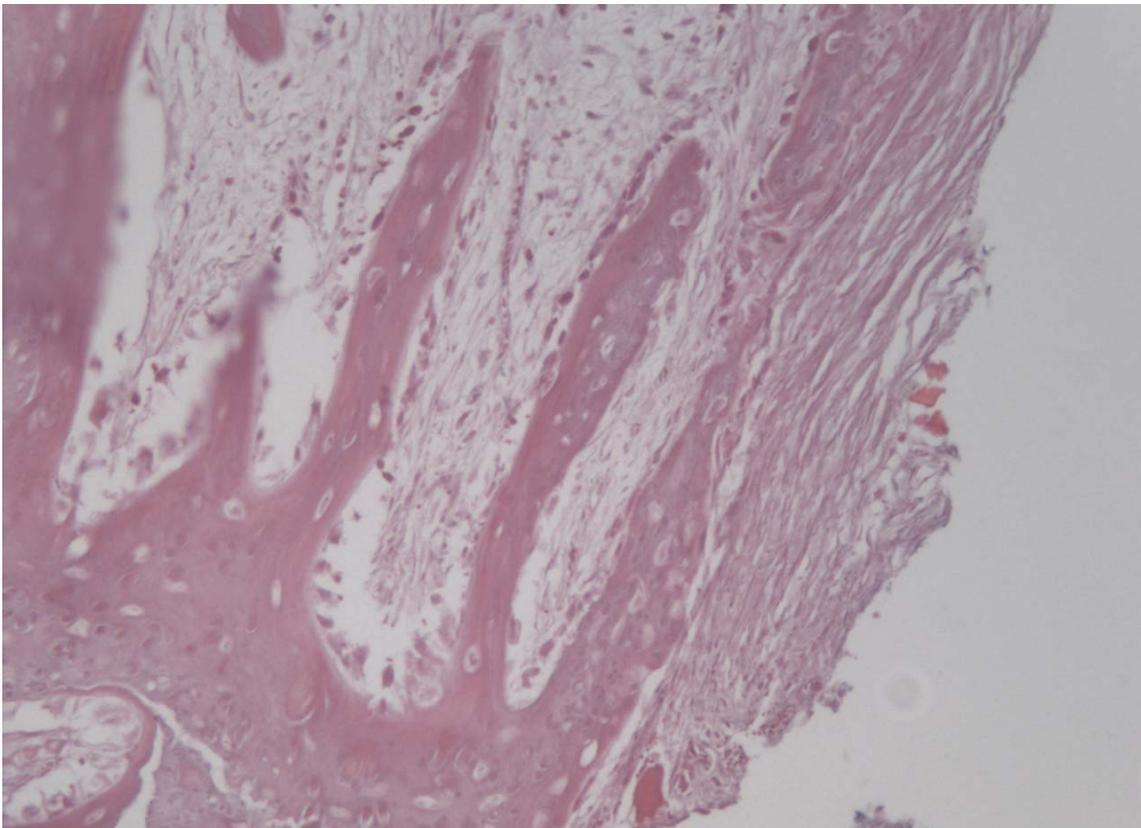
**Fig. 70-** Control-30 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Gap de unión entre el hueso de la cortical neoformada y la cortical adyacente.



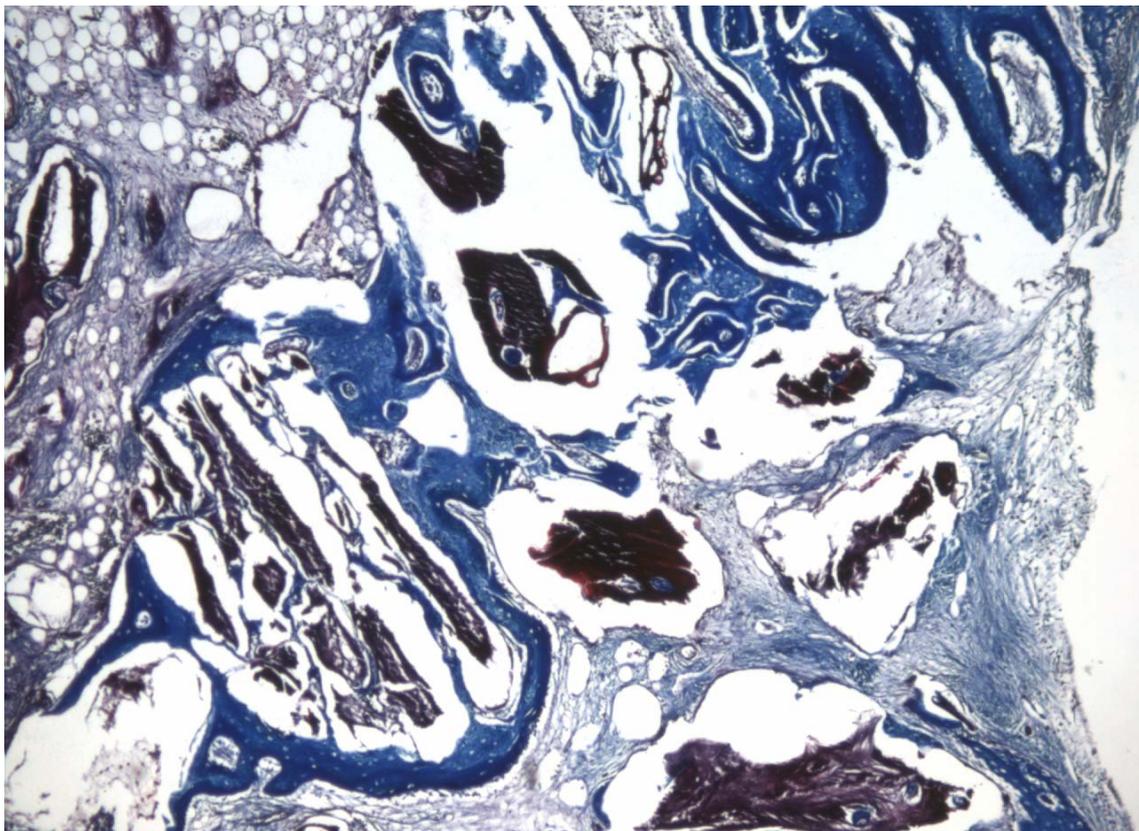
**Fig. 71-** Melatonina-30 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Tejido de granulación con formación trabeculas óseas en la proximidad y en continuidad con la cortical.



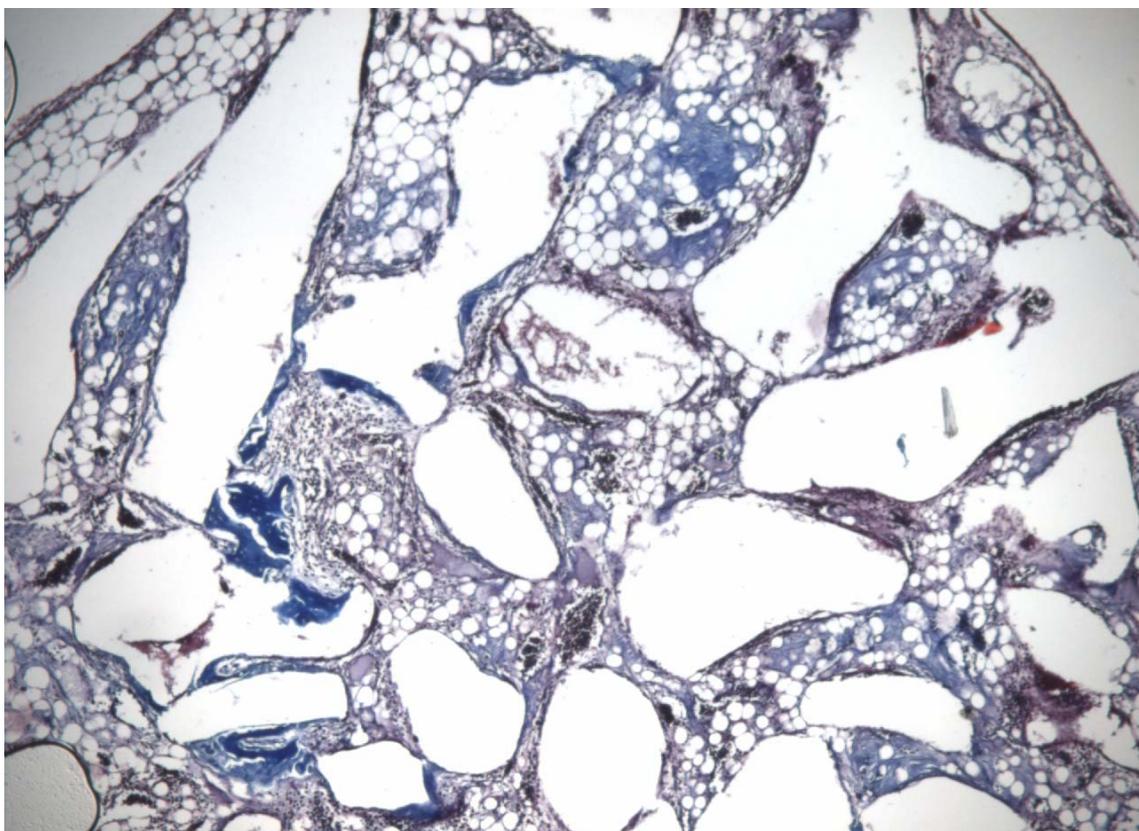
**Fig. 72-** Melatonina-30 días. Detalle microscopía (H.E.-125x). Zona adyacente al defecto cortical con trabéculas neoformadas.



**Fig. 73-** Melatonina-30 días. Detalle microscopía (H.E.-500x). Abundantes focos de material osteoide que se proyectaba desde los bordes del defecto a modo de dedo de guante.



**Fig. 74-** MP3®-30 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Material osteoide que envuelve al implante con trabéculas neoformadas de distribución dispersa.



**Fig. 75-** Endobon®-30 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Implante con tejido de granulación con células gigantes multinucleadas y trabéculas óseas.

### **GRUPO III (45 días): Estudio Radiológico**

#### **CONTROL**

La imagen lacunar radiotransparente todavía puede observarse en la diáfisis del hueso aunque presenta un tamaño menor y unos bordes ligeramente menos diferenciados que en los estadios anteriores. En el corte radiológico transversal, aunque el defecto cortical aparece completamente reparado, sus características de menor espesor y menor radiopacidad permiten localizar el lugar de rotura cortical que se realizó artificialmente hace 45 días. El defecto parece completamente cubierto tanto a nivel longitudinal como en grosor aunque éste presenta, en este estadio, una densidad radiológica inferior a la cortical adyacente que permite identificar la zona del defecto sin dificultad.

La imagen de TC muestra la reparación completa de la cortical ósea en la zona de la laguna artificial practicada con características de hueso normal, indiferenciable al de las zonas de hueso normal circundante.

**(Fig.76)**

#### **ENDOBON**

En este período el implante presenta una ligera disminución de su tamaño con una mayor disminución de su radiopacidad, fundamentalmente debido al incremento de espacios radiotransparentes en su interior. De igual forma, esta disminución de gránulos radiopacos en su interior se observa, en las zonas externas del implante en contacto con el hueso, como un aumento de las irregularidades en las zonas de contacto. La cortical, en la zona de introducción del implante se encuentra completamente reparada,

presentando características radiológica similares a la cortical del resto del hueso. **(Fig. 77)**

## **H. AUTÓLOGO**

Se observan restos radiopacos irregulares y pequeños pertenecientes al implante que aparecen fragmentados en el interior del hueso de la tibia. Estas imágenes irregulares ya no se observan en los cortes radiológicos transversales pero sí ni en la mayoría de los cortes de TC que todavía ponen de manifiesto la persistencia del implante confirmando las imágenes de la radiología simple. **(Fig. 78)**

## **MP3**

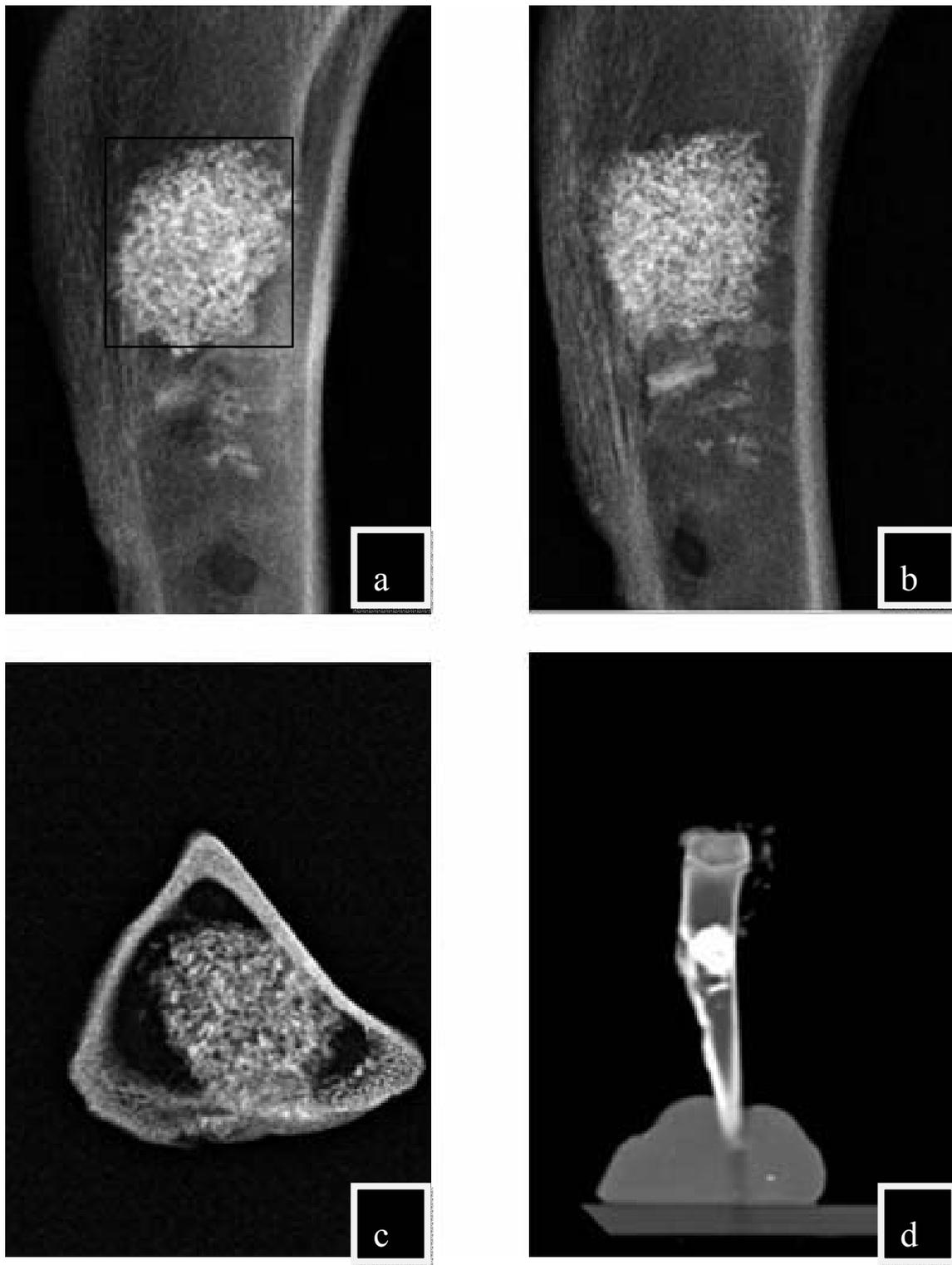
En este período el implante presenta características similares al estadio anterior. Se puede destacar el aumento del aspecto granular en el interior del implante y la reparación completa de la cortical externa que se produjo artificialmente para la colocación del mismo. **(Fig.79)**

## **MELATONINA**

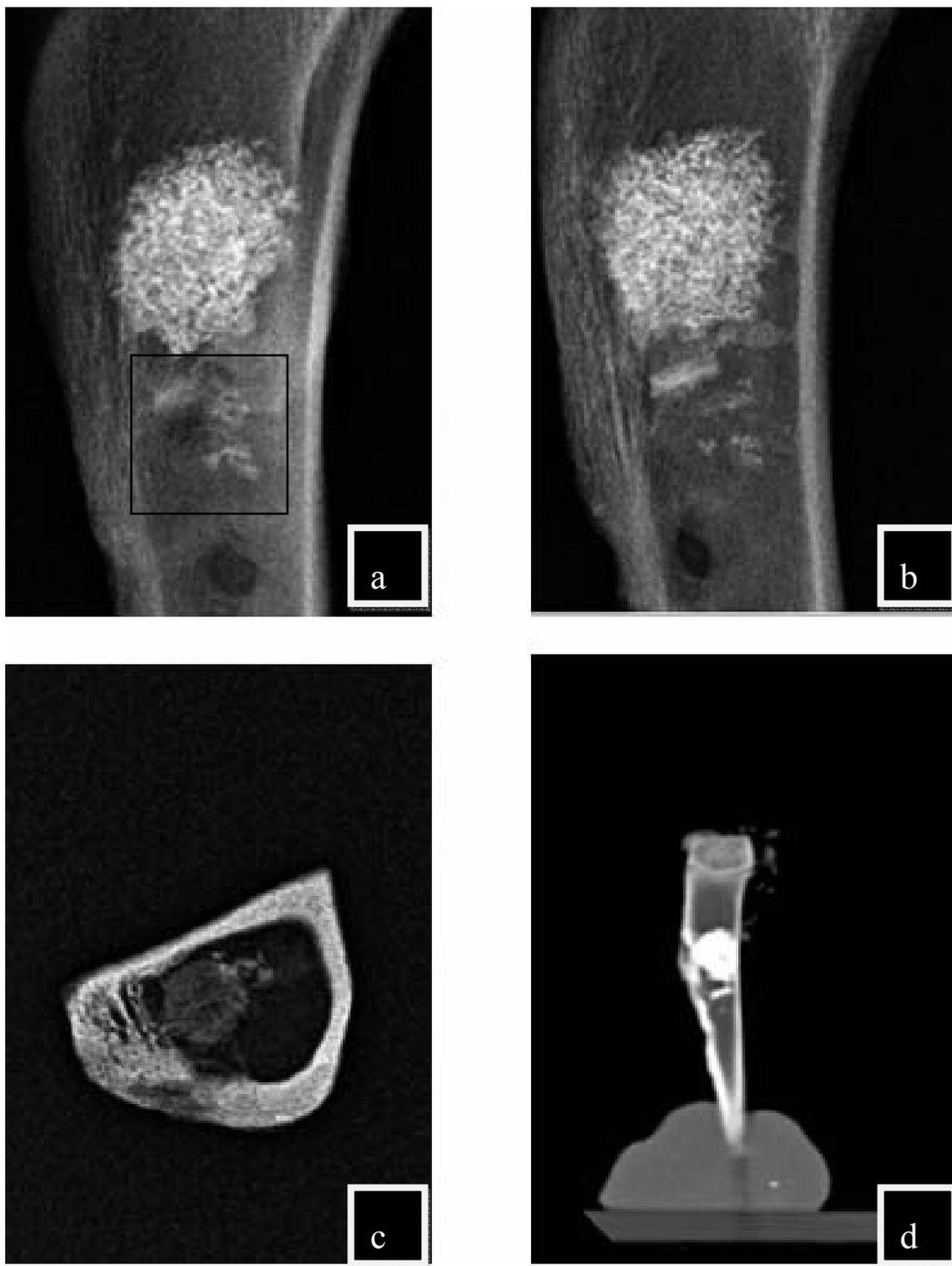
La radiografía simple muestra un hueso de aspecto normal. En la zona del implante pueden observarse unas pequeñas imágenes radiotransparentes en el lugar donde se realizó el implante de melatonina. La cortical del hueso esta reparada. En la radiografía del corte transversal del implante la cortical ha aumentado de grosor y densidad presentando un aspecto casi normal, muy similar al de hueso cortical circundante. **(Fig. 80)**



**Fig. 76-** Imagen radiológica Tibia Derecha-45 días (a) Radiología Digital Antero-Posterior (b) Radiología Digital Lateral (c) Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica (CONTROL) (d) Tomografía Computerizada.



**Fig. 77-** Imagen radiológica Tibia Derecha-45 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (ENDOBON) **(d)** Tomografía Computerizada.



**Fig. 78-** Imagen radiológica Tibia Derecha-45 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (H.AUTÓLOGO) **(d)** Tomografía Computerizada.

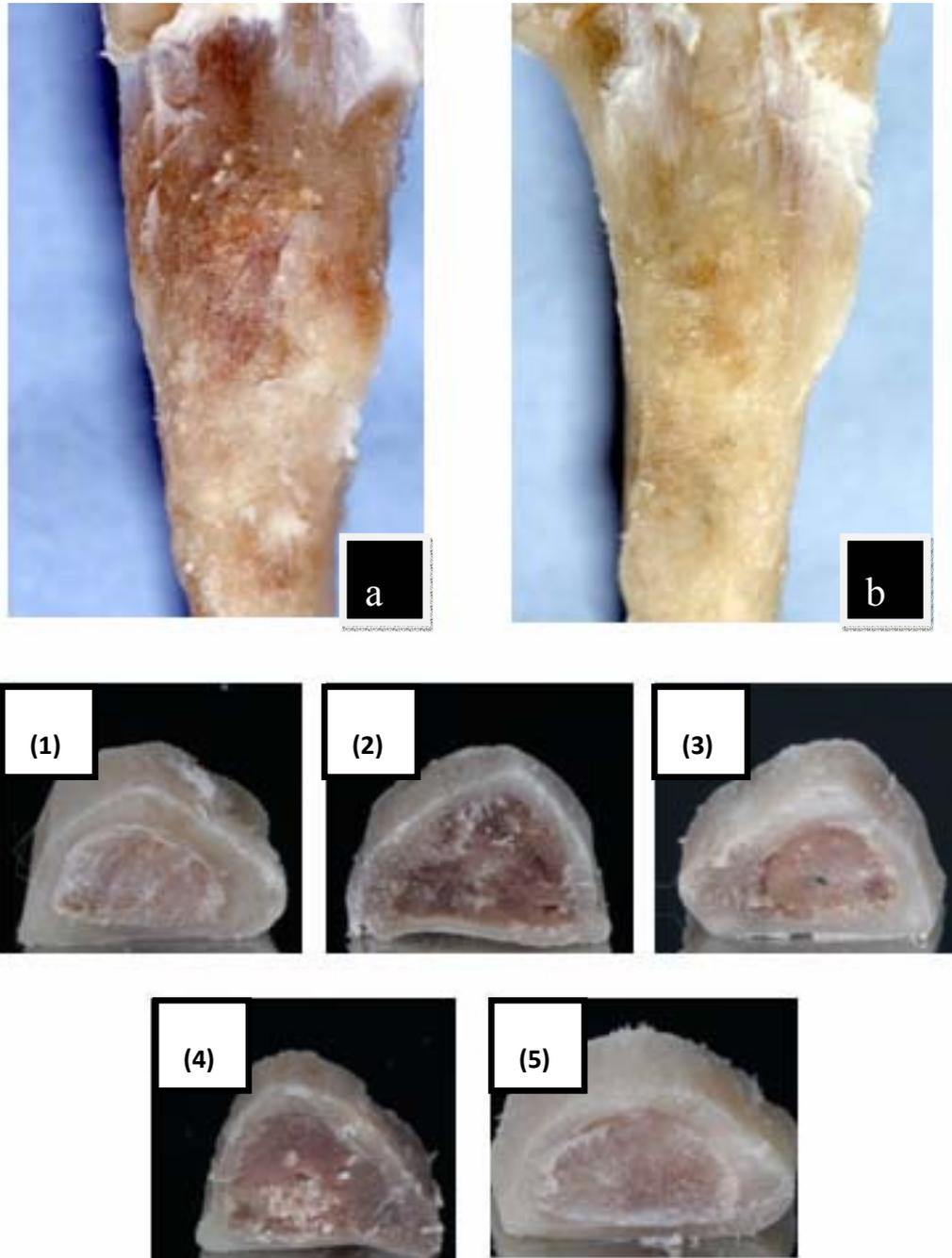


**Fig. 79-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-45 días (a) Radiología Digital Antero-Posterior (b) Radiología Digital Lateral (c) Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MP3) (d) Tomografía Computerizada .



**Fig. 80-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-45 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MELATONINA) **(d)** Tomografía Computerizada.

### GRUPO III (45 DÍAS): Estudio Macroscópico



**Fig. 81-** Imagen macroscópica tibia diseccionada-45 días (a) Tibia Derecha ( b) Tibia izquierda. Imagen macroscópica corte transversal de las tibias a nivel del implante (1) Control (2) Endobon (3) H. Autólogo (4) MP3 (5) Melatonina.

## **Grupo III (45 días): Estudio Microscópico**

### **CONTROL**

En este periodo destacaba la maduración del material osteoide que tapizaba la totalidad de la entrada al defecto óseo creado y adoptando un aspecto más ordenado de hueso más ordenado.

### **H. AUTÓLOGO**

Asimismo destacaba la mejor ordenación de las trabéculas óseas neoformadas que conectaban el exterior de la cortical con el interior de la cavidad medular disponiéndose bajo la forma de tejido óseo trabecular reticulado cada vez más ordenado.

### **MP3**

El xenoinjerto porcino presentaba signos de reabsorción en el interior a modo de imagen en forma de panal de abeja, existiendo lagunas de material osteoide en el seno de las mismas (Fig.). Asimismo presentaba signos de neoformación externa al material quedando el biomaterial rodeado por tejido óseo, en fase de reabsorción y sustitución. **(Fig. 83)**

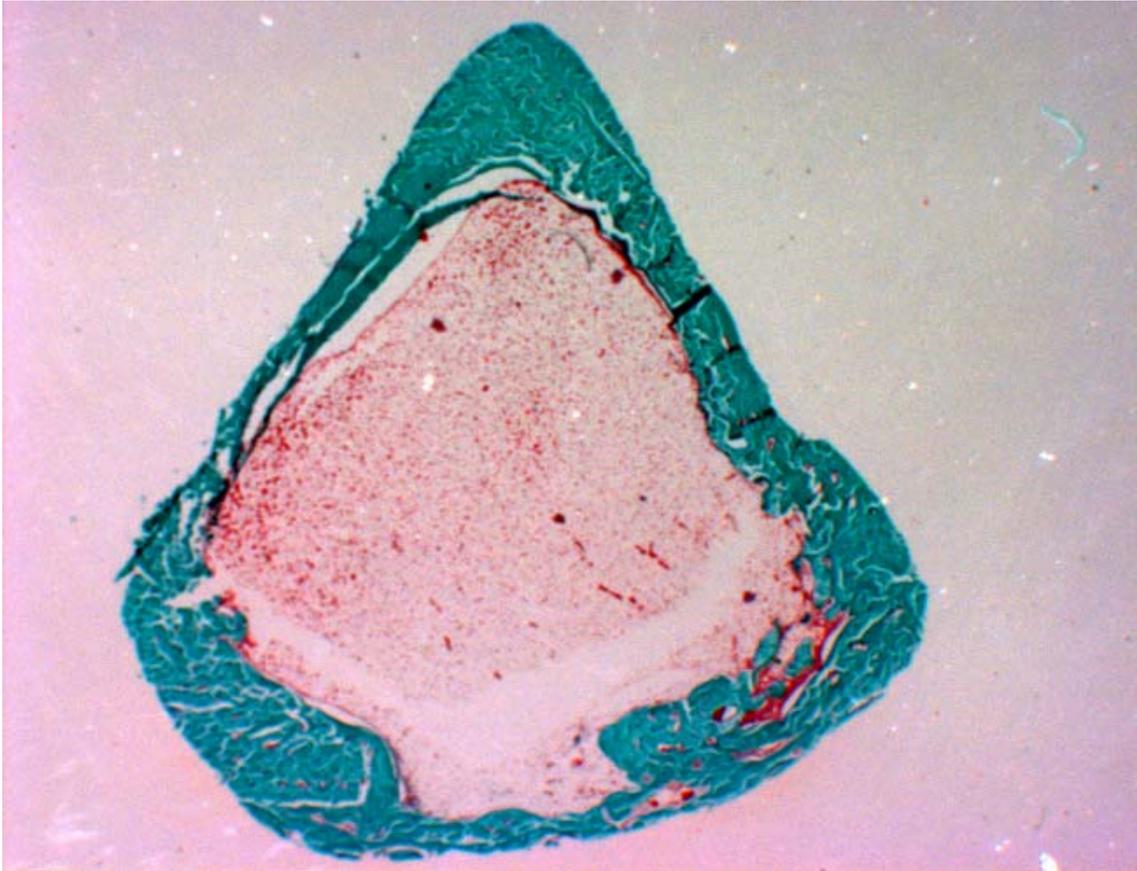
### **ENDOBON**

No se observaban fenómenos de reabsorción del xenoinjerto bovino aunque si destacaban los fenómenos de regeneración ósea caracterizados por trabéculas neoformadas de características irregulares en continuidad con la médula ósea y ocasionales depósitos del material implantado. En los bordes se observaba la presencia de tejido óseo neoformado en continuidad con la cortical que penetraba en la médula ósea adyacente. **(Fig. 84)**

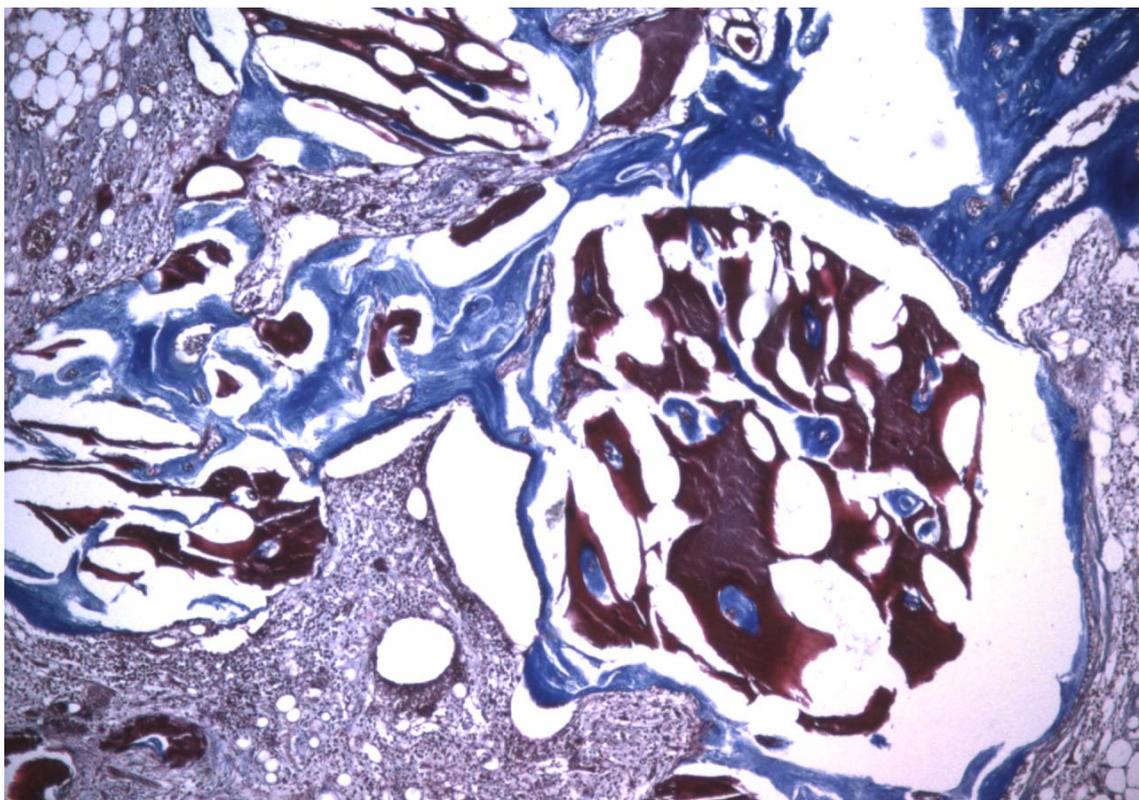
### **MELATONINA**

Observábamos ocasionales trabéculas óseas en el seno de la médula ósea en relación con pequeñísimos restos de material implantado. Tanto el hueso

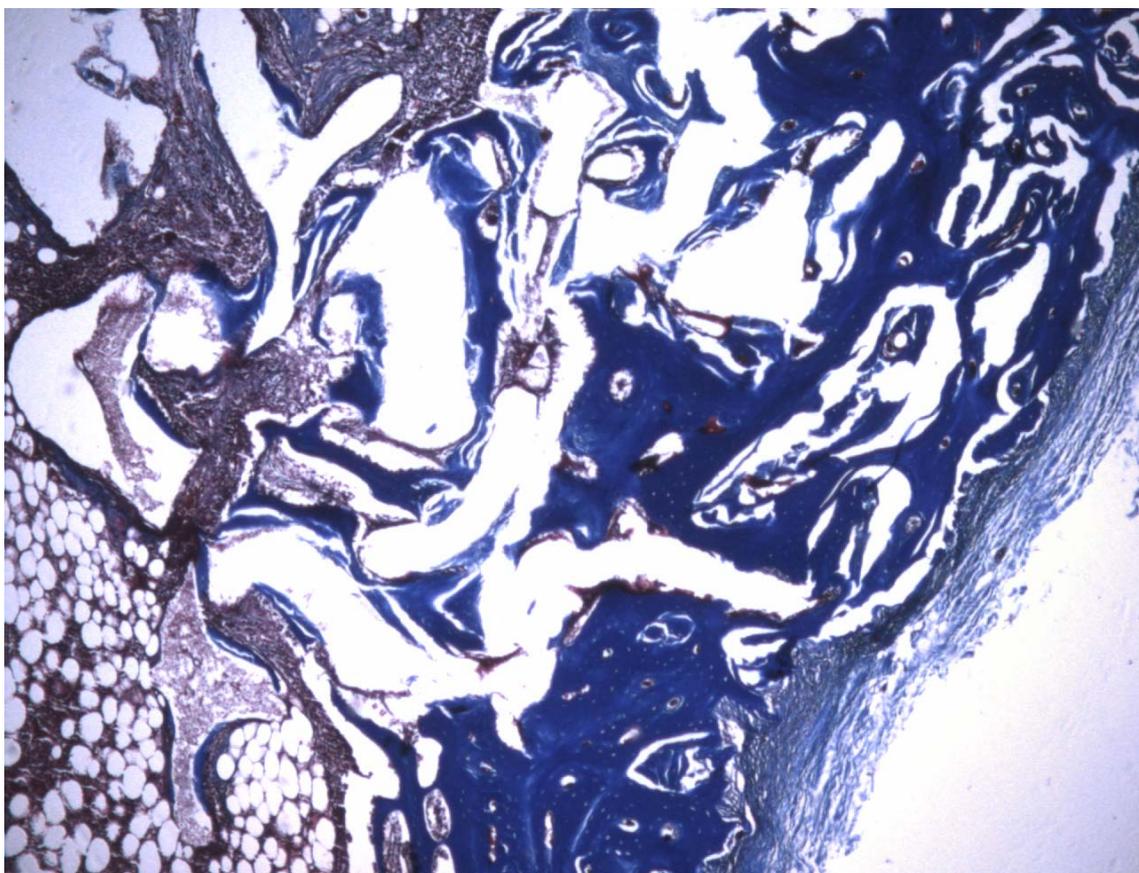
cortical como las trabéculas descritas en el seno de la médula ósea mostraban características normales con disposición haversiana tapizadas por una hilera continua de osteoblastos que convertían poco a poco el tejido medular inmerso entre ellas en un tejido óseo de características normales. (Fig.82, 85, 86)



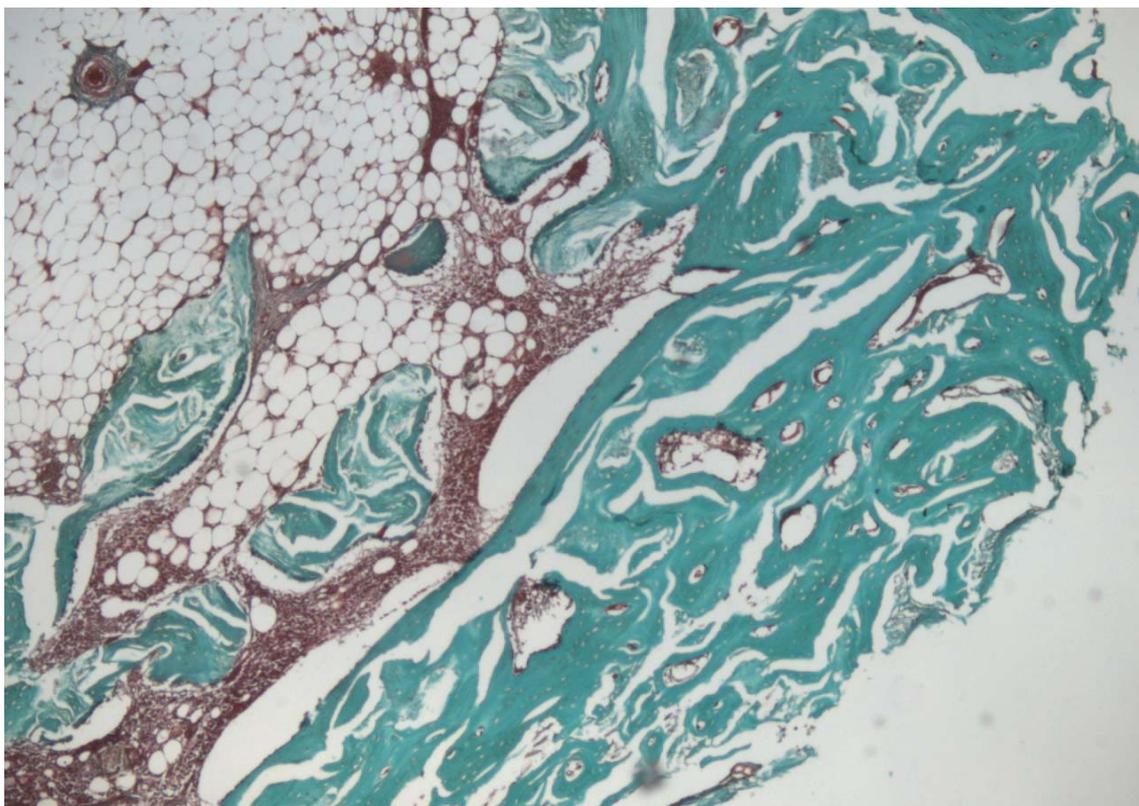
**Fig.82-** Melatonina-45 día. Imagen panorámica (T. M.-23x). Cortical regenerada en fase de remodelación con características normales con una disposición haversiana. Escasos restos de tejido de granulación en la zona medular adyacente.



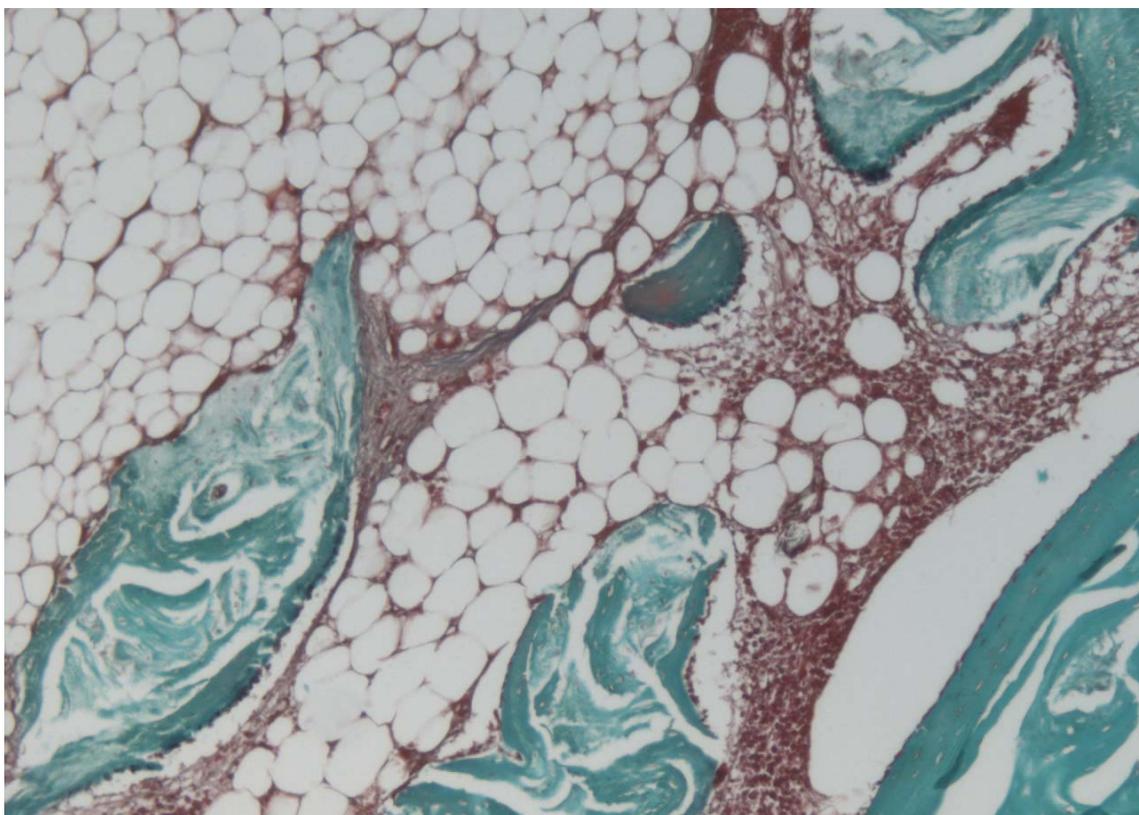
**Fig.83-** MP3®- 45 días. Detalle microscopía (T. M.-125x). Trabéculas neoformadas y pequeños islotes en el interior y alrededor del material implantado.



**Fig.84-** Endobon®- 45 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Trabéculas irregulares anastomosadas con aspecto de encaje en las áreas próximas a la cortical.



**Fig.85-** Melatonina-45 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Tejido óseo neoformado en continuidad con la cortical que penetraba en la médula ósea adyacente.



**Fig.86-** Melatonina-45 días. Detalle microscopía (T.M.-250x). Ocasionales trabéculas óseas en el seno de la médula ósea.

## **GRUPO IV (60 días): Estudio Radiológico**

### **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.

Los cortes tomográficos muestran una zona de hueso normal sin ninguna diferencia de las zonas de hueso que lo rodean.

No se ha observado ninguna deformación, zona de infección o anomalía asociada a la evolución del defecto óseo realizado. **(Fig. 87)**

### **ENDOBON**

El material implantado presenta un tamaño menor y una disminución de su densidad radiológica pero permanece perfectamente individualizado en el interior del hueso. **(Fig. 88)**

### **H. AUTÓLOGO**

Todavía se observan algunos restos radiopacos irregulares y pequeños pertenecientes al implante que aparecen fragmentados en el

interior del hueso de la tibia. Estas imágenes no se observan en los cortes radiológicos transversales ni en la mayoría de los cortes de TC que presentan un aspecto óseo normal con la cortical perfectamente reparada.

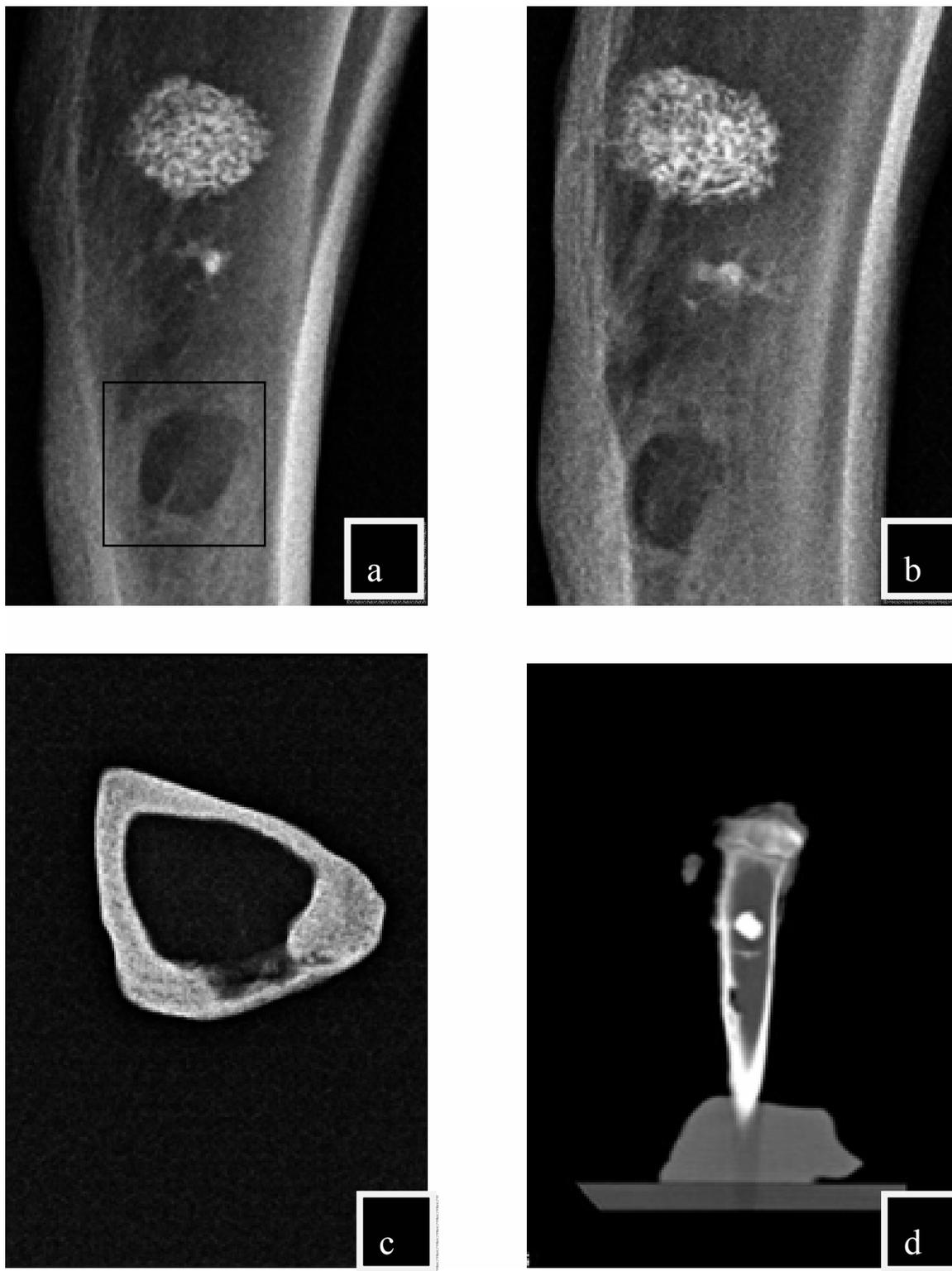
**(Fig. 89)**

### **MP3**

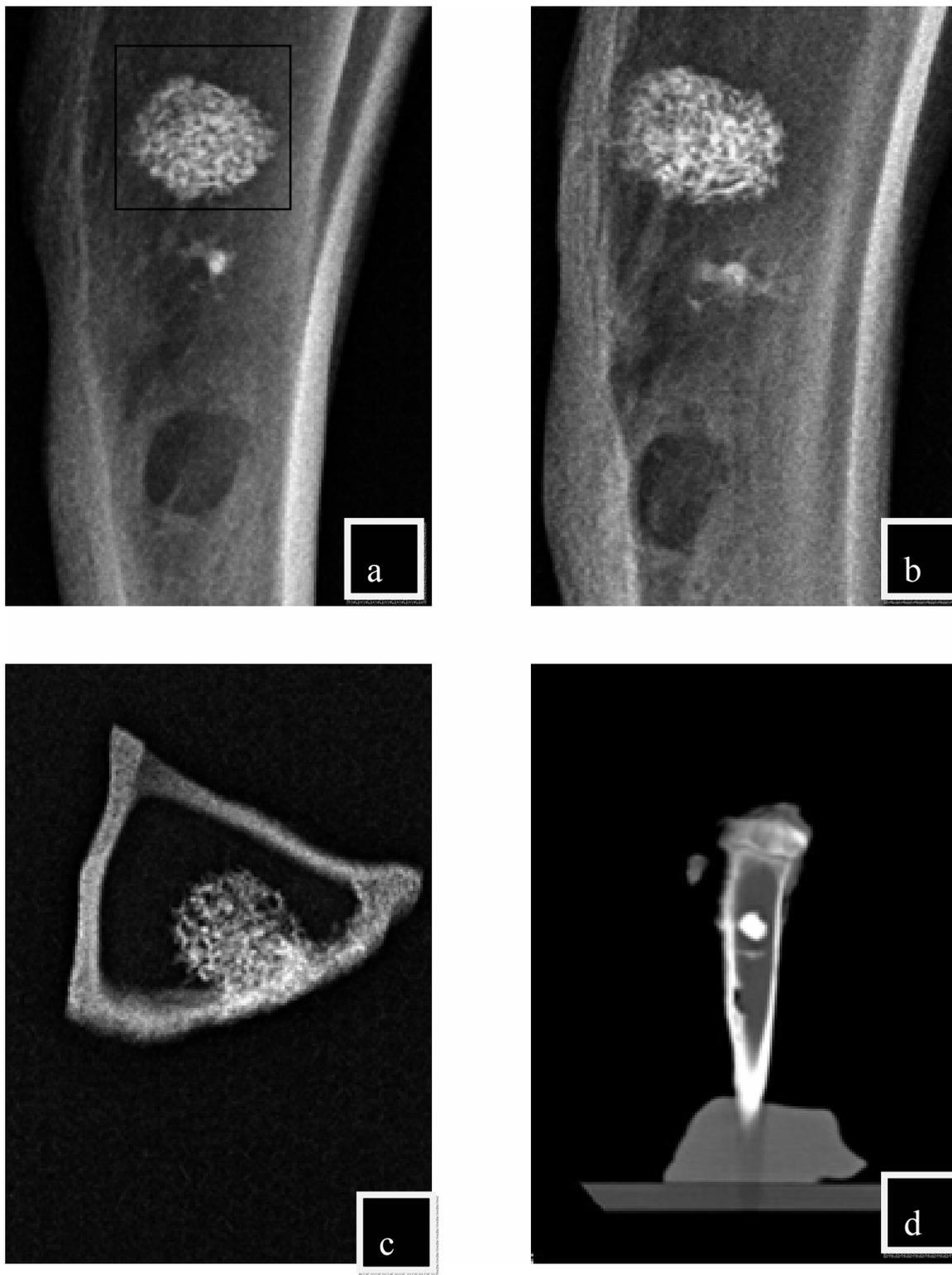
En este período se puede observar la disminución significativa del tamaño del implante junto con una disminución importante de la densidad cálcica del mismo. También se aprecia un aumento de las irregularidades superficiales del implante en las zonas en contacto con el hueso circundante en donde se pueden apreciar líneas densas trabeculares dirigiéndose hacia el interior del implante. **(Fig. 90)**

### **MELATONINA**

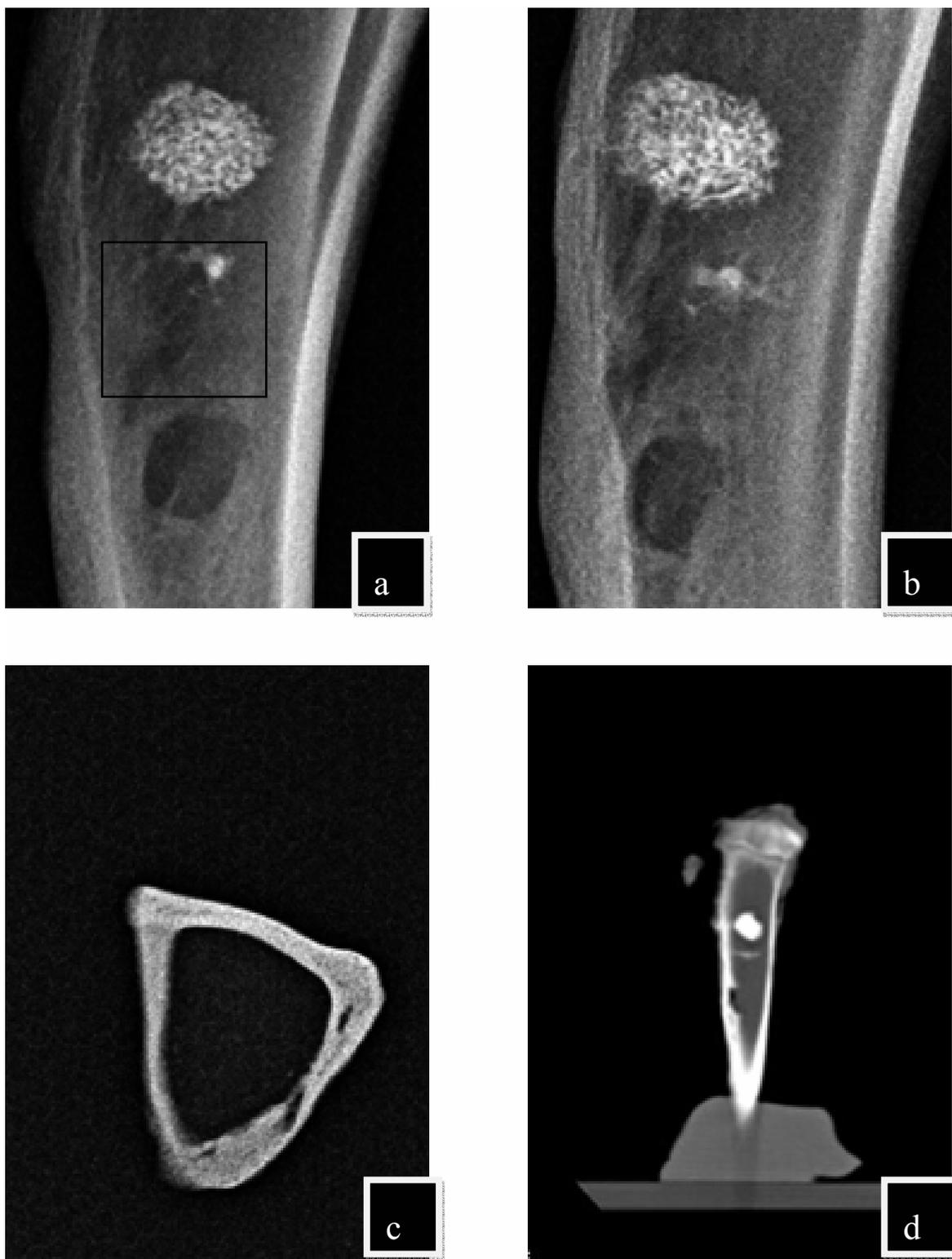
En la radiografía simple ni en la TC se puede apreciar ningún resto del implante utilizado ni de la laguna ósea practicada, presentando una densidad radiológica completamente normal y observándose la continuidad de las trabéculas óseas atravesando el lugar donde se encontró el defecto óseo siguiendo las líneas de carga habituales en el hueso. **(Fig. 91)**



**Fig. 87-** Imagen radiológica Tibia Derecha-60 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica (CONTROL) **(d)** Tomografía Computerizada.



**Fig.88-** Imagen radiológica Tibia Derecha-60 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (ENDO BON) **(d)** Tomografía Computerizada.



**Fig.89-** Imagen radiológica Tibia Derecha-60 días **(a)** Radiología Digital Antero-Posterior **(b)** Radiología Digital Lateral **(c)** Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (H. AUTÓLOGO) **(d)** Tomografía Computerizada.

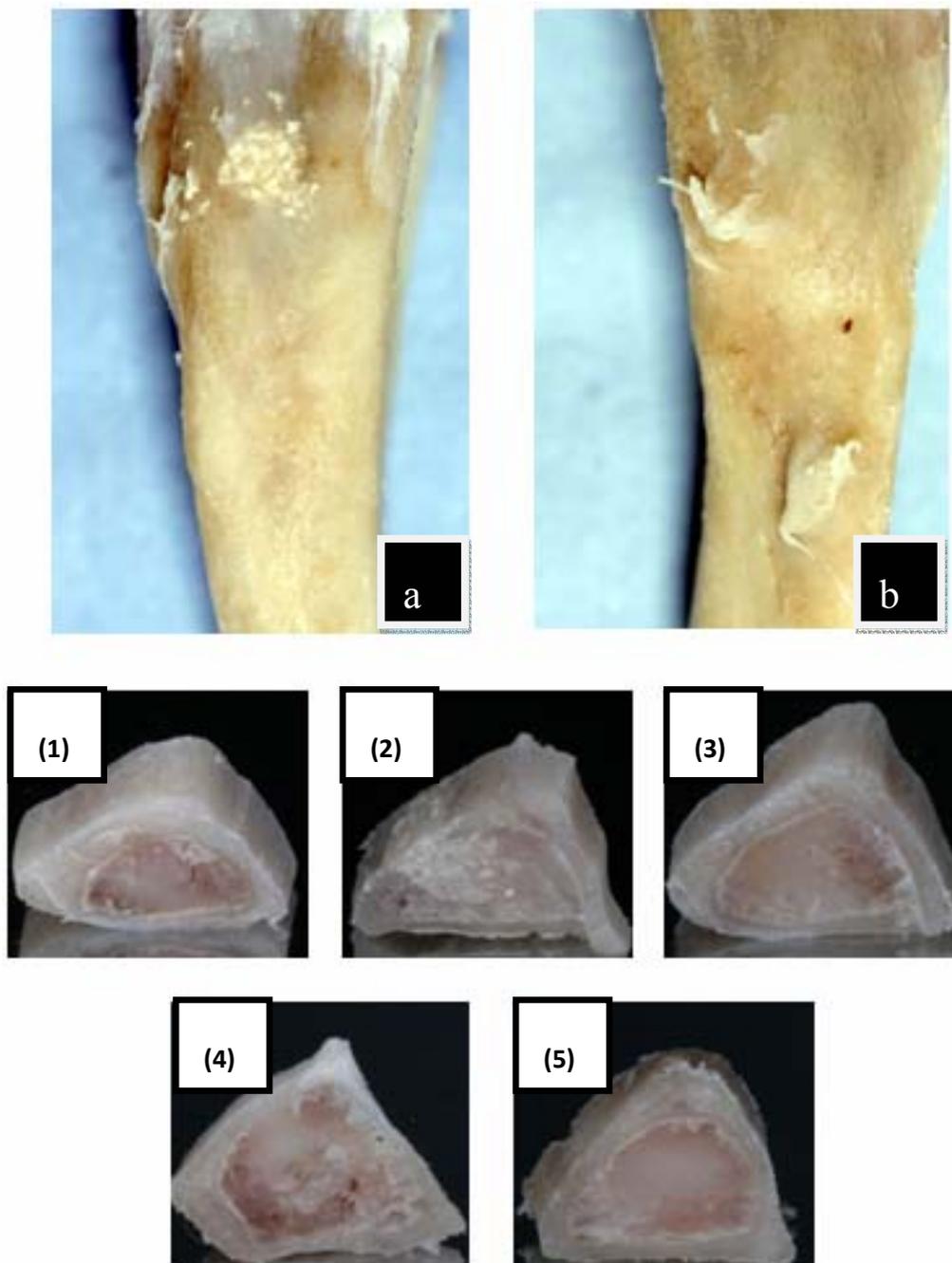


**Fig. 90-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-60 días (a) Radiología Digital Antero-Posterior (b) Radiología Digital Lateral (c) Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MP3) (d) Tomografía Computerizada .



**Fig. 91-** Imagen radiológica Tibia Izquierda-60 días (a) Radiología Digital Antero-Posterior (b) Radiología Digital Lateral (c) Radiovisuografía corte transversal de la pieza quirúrgica, material implantado (MELATONINA) (d) Tomografía Computerizada.

## GRUPO IV (60 DÍAS): Estudio Macroscópico



**Fig. 92-** Imagen macroscópica tibia diseccionada-60 días (a) Tibia Derecha ( b) Tibia izquierda. Imagen macroscópica corte transversal de las tibias a nivel del implante (1) Control (2) Endobon (3) H. Autólogo (4) MP3 (5) Melatonina.

## **Grupo IV (60 días): Estudio Microscópico**

### **CONTROL**

Durante este periodo destacaba la remodelación ósea casi total a nivel del orificio realizado para la colocación de los implantes.

### **ENDOBON**

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.

### **MP3**

En la zona cortical todavía se observaban fenómenos de regeneración ósea caracterizados por numerosas trabéculas neoformadas de características irregulares en continuidad con la médula ósea y ocasionales depósitos del material implantado. El material implantado presentaba signos de reabsorción en su interior hasta la práctica sustitución ósea. **(Fig. 95,96)**

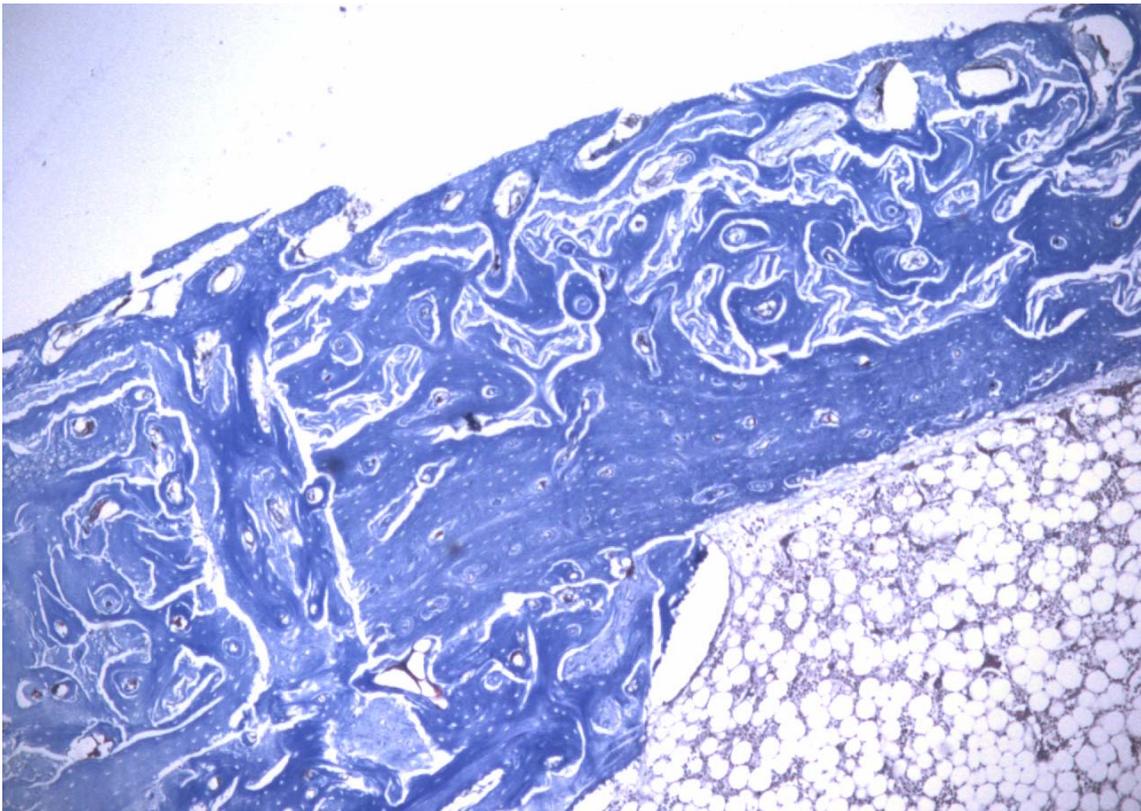
### **H.AUTÓLOGO**

Microscópicamente destacaba la reparación completa de la cortical externa con extensos fenómenos de regeneración ósea que sobrepasaban el límite inferior de la cortical adyacente. **(Fig. 93,94)**

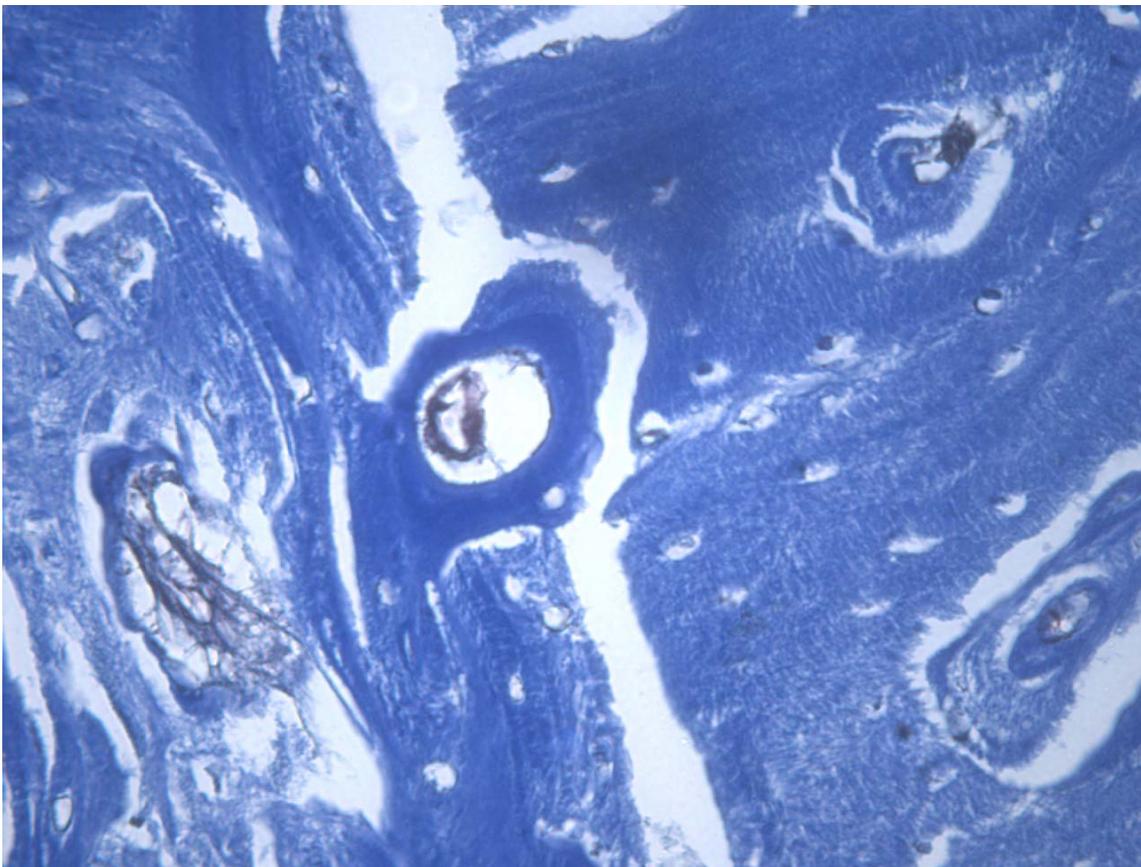
## **MELATONINA**

La zona del implante destacaba por la sustitución casi total del tejido de granulación que tapizaba el defecto óseo por tejido óseo de características compacta. Así como una recuperación perfecta del la cavidad medular.

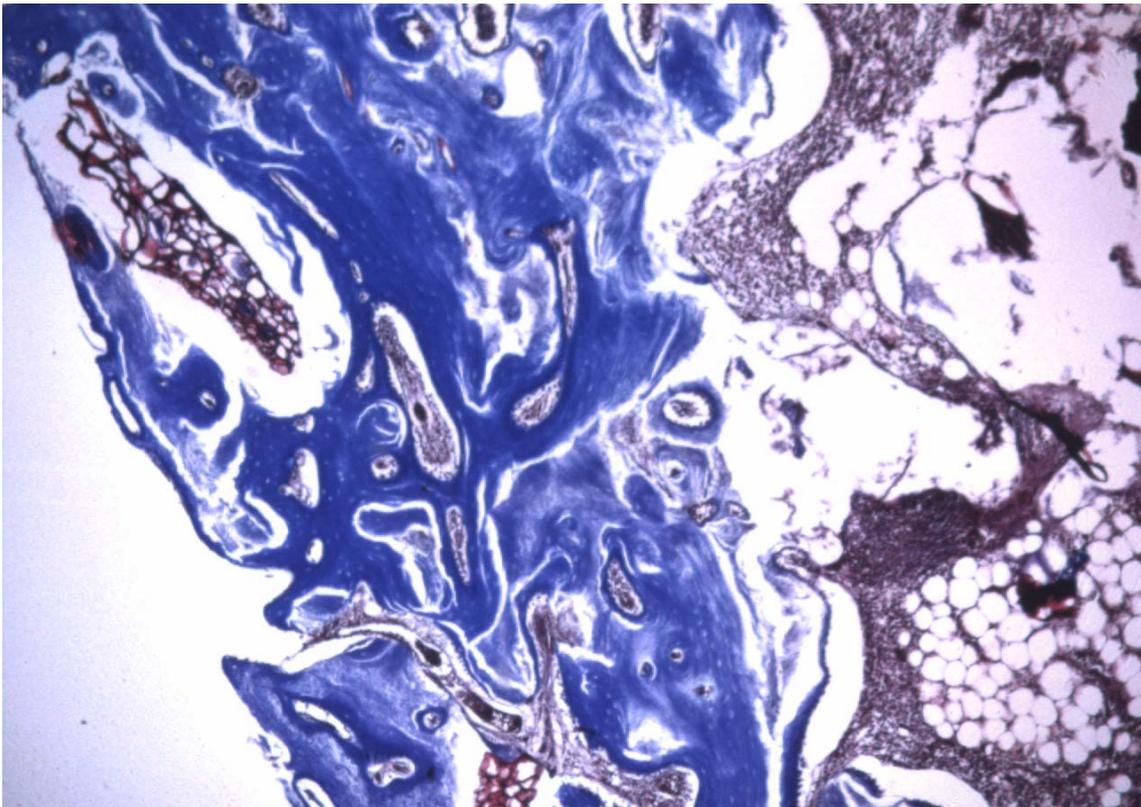
**(Fig. 97,98)**



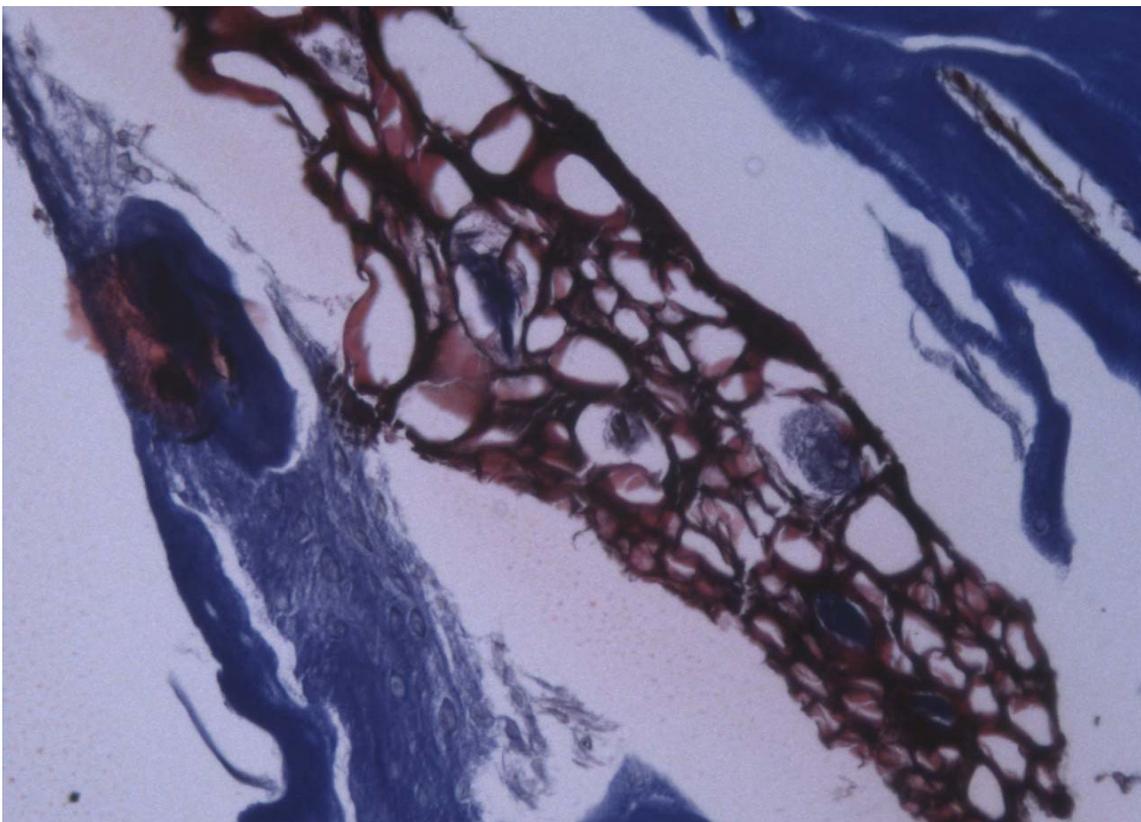
**Fig. 93-** H.Autólogo-60 días. Detalle microscopía (T.M.-125x). Hueso compacto maduro.



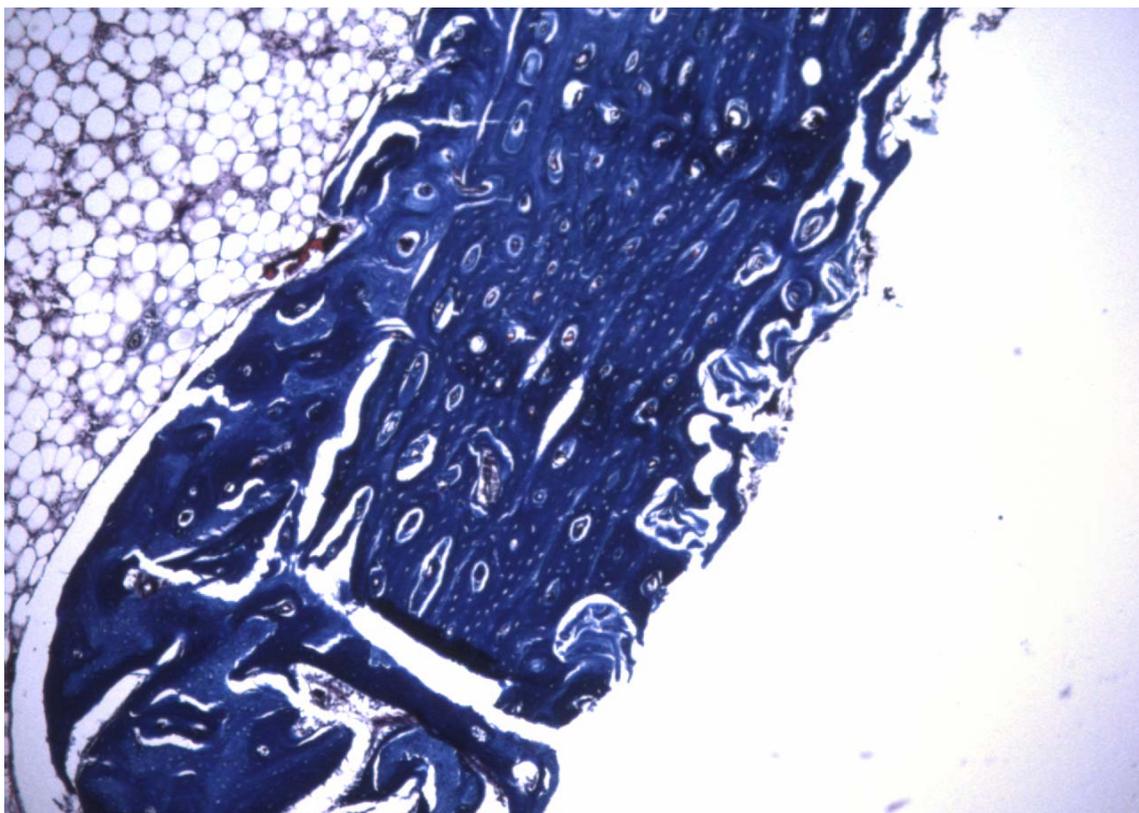
**Fig. 94-** H.Autólogo-60 días. Detalle microscopía (T. M.-500x). Sistemas de Havers de nueva formación.



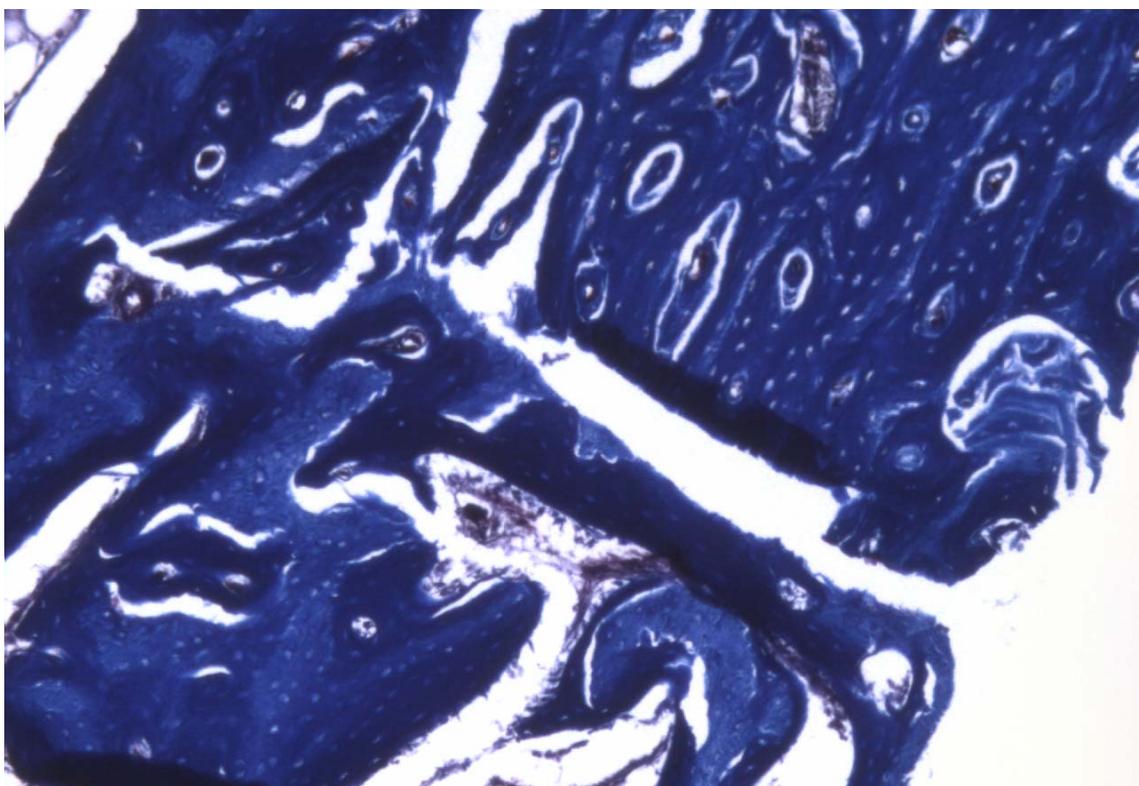
**Fig. 95-** MP3®-60 días. Detalle microscopía (T.M.- 125x). Partícula de biomaterial rodeada por tejido óseo en fase de reabsorción y sustitución ósea.



**Fig.96-** MP3®-60 días. Detalle microscopía (T. M.-500x). Partícula ósea en fase de reabsorción con pequeños islotes de osteoide e el interior.



**Fig.97-** Melatonina- 60 días. Detalle microscopía (Tricrómico de Masson-125x). Reparación completa de la cortical externa.



**Fig.98-** Melatonina- 60 días. Detalle microscopía (T.M.-250x). Remodelación del hueso cortical en uno de los bordes de defecto creado.



## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**



## ANÁLISIS DE GROSOR DE LA CORTICAL NEOFORMADA

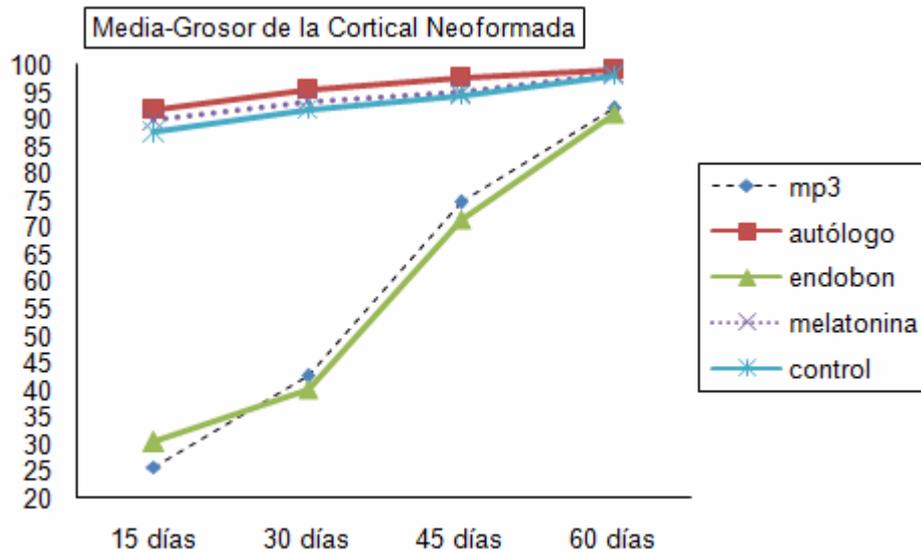


Gráfico 1. Representación de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada.

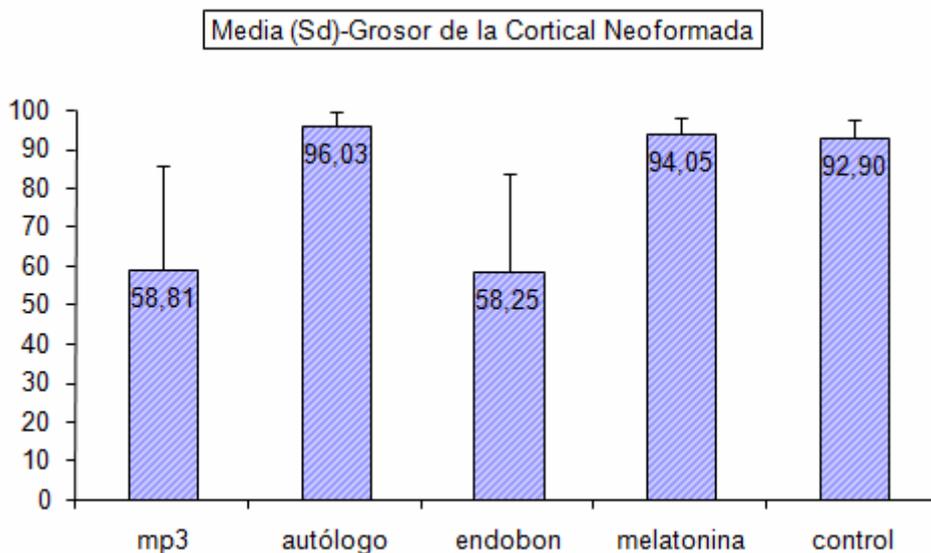


Gráfico 2. Representación Media- Desviación Estandar de la Media para la variable Grosor de la cortical Neoformada.

Tiempo	15días	30días	45días	60 días
	Media±Sd	Media±Sd	Media±Sd	Media±Sd
MP3	25,86±3,31	42,62±2,74	74,71±5,66	92,05±1,03
H.Autólogo	91,84±0,94	95,34±2,23	97,69±2,23	99,26±0,26
Endobon	30,32±4,18	40,14±2,02	71,59±5,63	90,96±0,62
Melatonina	89,72±0,84	93,23±2,95	94,89±3,14	98,35±1,14
Control	87,48±1,73	91,68±2,47	94,42±2,69	98,00±1,43

**Tabla 6.** Grosor de la Cortical Neoformada expresado Media±Desviación Estandar de la Media (Sd) %

	F	gl 1	gl 2	Significación
MP3	2,498	3	12	0,109
H.Autólogo	2,556	3	12	0,104
Endobon	1,765	3	12	0,207
Melatonina	2,172	3	12	0,144
Control	,819	3	12	0,508

**Tabla 7.** Contraste de Levene sobre igualdad de las varianzas.

	Suma cuadrados tipoIII	gl	Media cuadrática	F	Significación
Materiales	24684,26	4	6171,06	1095,80	0,0005
Materiales Tiempo/ sacrificio	9363,45	12	780,29	138,56	0,0005
Error	270,32	48	5,63		

**Tabla 8.** Análisis de la varianza de medidas repetidas para el Grosor de la Cortical Neoformada.

El análisis de la varianza de medidas repetidas detectó diferencias significativas entre los biomateriales en los distintos tiempos de implantación para la variable grosor de la cortical.

	Suma cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	512148,811	1	512148,811	313227,624	0,005
Tiempo sacrificio	11401,084	3	3800,361	232,464	0,005
Error	196,178	12	16,348		

**Tabla 9.** Análisis de la varianza (Tiempo sacrificio) para el grosor de la cortical neoformada

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

Tiempo sacrificio(I)	Tiempo sacrificio(J)	Diferencias entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
15	30	-7,558*	1,279	0,005
	45	-21,618*	1,279	0,005
	60	-30,681*	1,279	0,005
30	15	7,558*	1,279	0,005
	45	-14,060*	1,279	0,005
	60	-23,123*	1,279	0,005
45	15	21,618*	1,279	0,005
	30	14,060*	1,279	0,005
	60	-9,063*	1,279	0,005
60	15	30,681*	1,279	0,005
	30	23,123*	1,279	0,005
	45	9,063*	1,279	0,005

\*La diferencia de las medias es significativa al nivel 0,05

a. Ajuste para comparaciones múltiples

**Tabla 10.** Comparaciones múltiples (Método de la LSD) entre los distintos periodos de experimentación en relación a la variable Grosor de la Cortical Neoformada.

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

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
15 días	MP3	H.Autólogo	-65,988*	1,886	0,005
		Endobon	-4,463*	1,329	0,006
		Melatonina	-63,863*	2,286	0,005
		Control	-63,625*	2,053	0,005
	H.Autólogo	MP3	65,988*	1,886	0,005
		Endobon	61,525*	1,812	0,005
		Melatonina	2,125*	0,879	0,032
		Control	4,363*	0,881	0,005
	Endobon	MP3	4,463*	1,329	0,006
		H.Autólogo	-61,525*	1,812	0,005
		Melatonina	-59,400*	2,167	0,005
		Control	-57,163*	1,919	0,005
	Melatonina	MP3	63,863*	2,286	0,005
		H.Autólogo	-2,125*	0,879	0,032
		Endobon	59,400*	2,167	0,005
		Control	2,238*	0,427	0,005
Control	MP3	61,625*	2,053	0,005	
	H.Autólogo	-4,363*	0,881	0,005	
	Endobon	57,163*	1,919	0,005	
	Melatonina	-2,238*	0,427	0,005	

\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla 11.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Grosor de la Cortical Neoformada.

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre las medias de todos los implantes utilizados, comportándose todos los materiales de manera distinta en este primer tiempo de experimentación.

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
30 días	MP3	H.Autólogo	-52,723*	1,886	0,005
		Endobon	2,483	1,329	0,086
		Melatonina	-50,615*	2,286	0,005
		Control	-49,060*	2,053	0,005
	H.Autólogo	MP3	52,723*	1,886	0,005
		Endobon	55,205*	1,812	0,005
		Melatonina	2,108*	0,879	0,034
		Control	3,663*	0,881	0,001
	Endobon	MP3	-2,483	1,329	0,086
		H.Autólogo	-55,205*	1,812	0,005
		Melatonina	-53,098*	2,167	0,005
		Control	-51,543*	1,919	0,005
	Melatonina	MP3	50,615*	2,286	0,005
		H.Autólogo	-2,108*	0,879	0,034
		Endobon	53,098*	2,167	0,005
		Control	1,555*	0,427	0,003
Control	MP3	49,060*	2,053	0,005	
	H.Autólogo	-3,663*	0,881	0,001	
	Endobon	51,543*	1,919	0,005	
	Melatonina	-1,555*	0,427	0,003	

\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla 12.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Grosor de la Cortical Neoformada.

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre el comportamiento de todos los implantes a excepción del MP3 y el Endobon entre los cuales no existían diferencias significativas para este periodo.

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
45 días	MP3	H.Autólogo	-22,980*	1,886	0,005
		Endobon	3,118*	1,329	0,037
		Melatonina	-20,178*	2,286	0,005
		Control	-19,713*	2,053	0,005
	H.Autólogo	MP3	22,980*	1,886	0,005
		Endobon	26,098*	1,812	0,005
		Melatonina	2,803*	0,879	0,008
		Control	3,268*	0,881	0,003
	Endobon	MP3	-3,118*	1,329	0,037
		H.Autólogo	-26,098*	1,812	0,005
		Melatonina	-23,295*	2,167	0,005
		Control	-22,830*	1,919	0,005
	Melatonina	MP3	20,178*	2,286	0,005
		H.Autólogo	-2,803*	0,879	0,008
		Endobon	23,295*	2,167	0,005
		Control	0,465	0,427	0,298
Control	MP3	19,713*	2,053	0,005	
	H.Autólogo	-3,268*	0,881	0,003	
	Endobon	22,830*	1,919	0,005	
	Melatonina	-0,465	0,427	0,298	

\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla 13.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable grosor de la cortical neoformada.

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

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
60 días	MP3	H.Autólogo	-7,208*	1,886	0,002
		Endobon	1,093	1,329	0,427
		Melatonina	-6,298*	2,286	0,017
		Control	-5,953*	2,053	0,013
	H.Autólogo	MP3	7,208*	1,886	0,002
		Endobon	8,300*	1,812	0,001
		Melatonina	0,910	0,879	0,321
		Control	1,255	0,881	0,180
	Endobon	MP3	-1,093	1,329	0,427
		H.Autólogo	-8,300*	1,812	0,001
		Melatonina	-7,390*	2,167	0,005
		Control	-7,045*	1,919	0,003
	Melatonina	MP3	6,298*	2,286	0,017
		H.Autólogo	-0,910	0,879	0,321
		Endobon	7,390*	2,167	0,005
		Control	0,345	0,427	0,435
Control	MP3	5,953*	2,053	0,013	
	H.Autólogo	-1,255	0,881	0,180	
	Endobon	7,045*	1,919	0,003	
	Melatonina	-0,345	0,427	0,435	

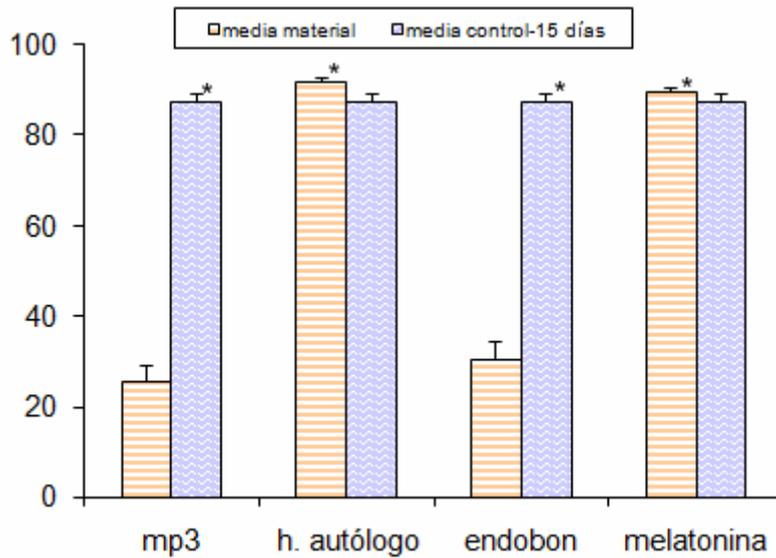
\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla14.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable grosor de la cortical neoformada.

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre los xenoinjertos de MP3 y Endobon con el resto de implantes de H.Autólogo, Melatonina y Control.

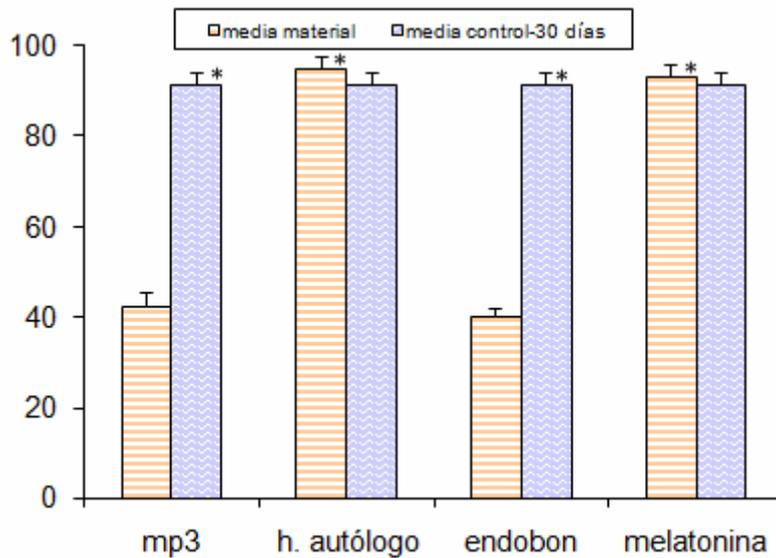
### Grupo I (15 días)



**Gráfico3.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada-Grupo I (15 días). \*La diferencia de las medias es significativa nivel a 0,05.

Para la variable Grosor de la Cortical Neoformada a los 15 días existen diferencias significativas entre el Control y los implantes de MP3, H Autólogo, Endobon y Melatonina. El H. Autólogo se comporta mejor que el resto de los implantes. Asimismo la Melatonina se comporta mejor que el control en este periodo. La diferencia entre los implantes de Endobon y el MP3 es significativa en este primer periodo, siendo mejor el comportamiento Endobon.

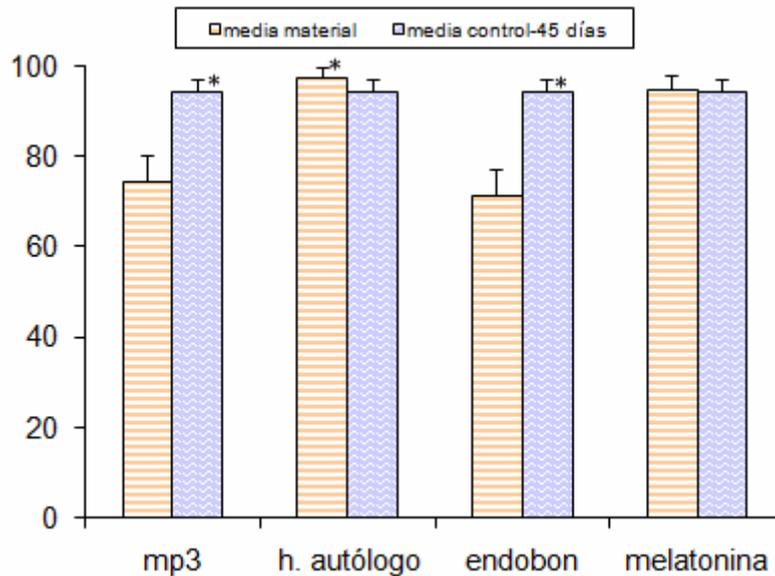
## Grupo II (30 días)



**Gráfico 4.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada-Grupo II (30 días). \*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

Para la variable Grosor de la Cortical Neoformada a los 30 días existen diferencias significativas entre el Control y los implantes de MP3, H Autólogo, Endobon y Melatonina. En este periodo el H.Autólogo se sigue comportando mejor que el resto de los implantes. Así mismo existen diferencias significativas entre La Melatonina y el Control, comportándose mejor la Melatonina que el control. Y estos a su vez mejoran a los implantes de Endobon y MP3. En este periodo no existen diferencias significativas entre Endobon y el MP3.

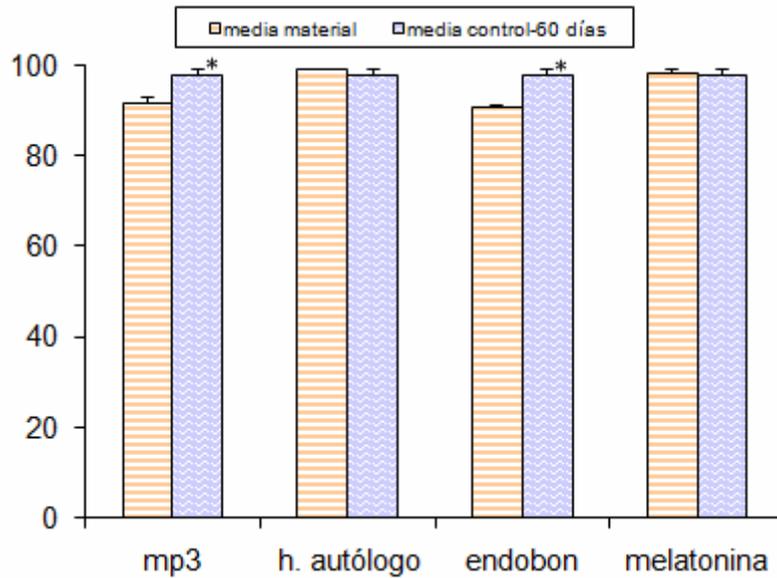
### Grupo III (45 días)



**Gráfico 5.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada-Grupo III (45 días). \*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

Para la variable Grosor de la Cortical Neoformada a los 45 días existen diferencias significativas entre el Control y los implantes de MP3, H Autólogo, Endobon. En este periodo el H.Autólogo se sigue comportando mejor que el resto de los implantes. No existen diferencias significativas entre control y Melatonina, comportándose ambos de forma similar, aunque mejor que el Endobon y El MP3. Estos últimos presentan diferencias significativas en este periodo resultando mejor el comportamiento del MP3.

### Grupo IV (60 días)



**Gráfico 6.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Media del Grosor de la Cortical Neoformada Grupo IV (60días). \*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

Para la variable Grosor de la Cortical Neoformada a los 60 días no existen diferencias significativas entre el Control y los implantes de H.Autólogo y Melatonina, comportándose estos de forma similar. Sí que existen diferencias significativas entre estos y los implantes de Endobon y MP3, entre los cuales no existen diferencias significativas para este periodo.

## ANÁLISIS DE LA LONGITUD DEL DEFECTO CUBIERTO

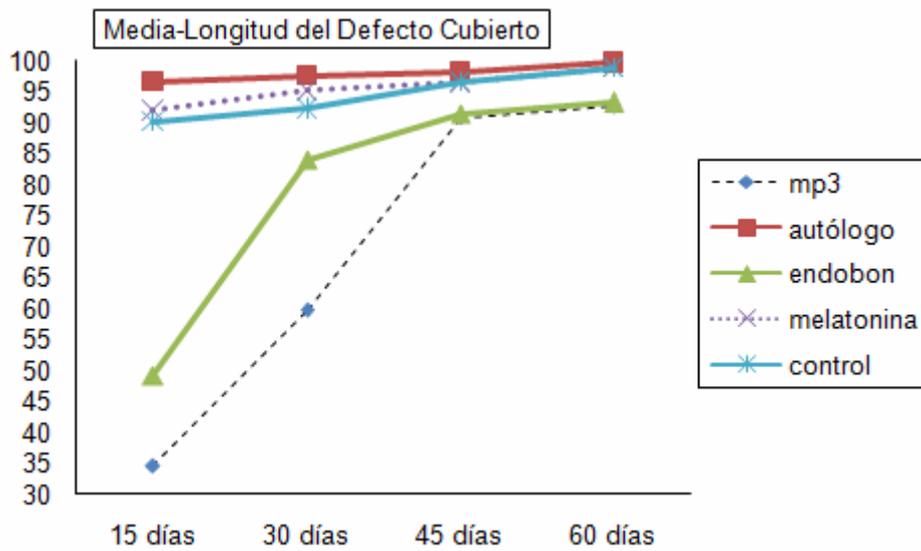


Gráfico 7. Representación de la Media de la Longitud del Defecto Cubierto.

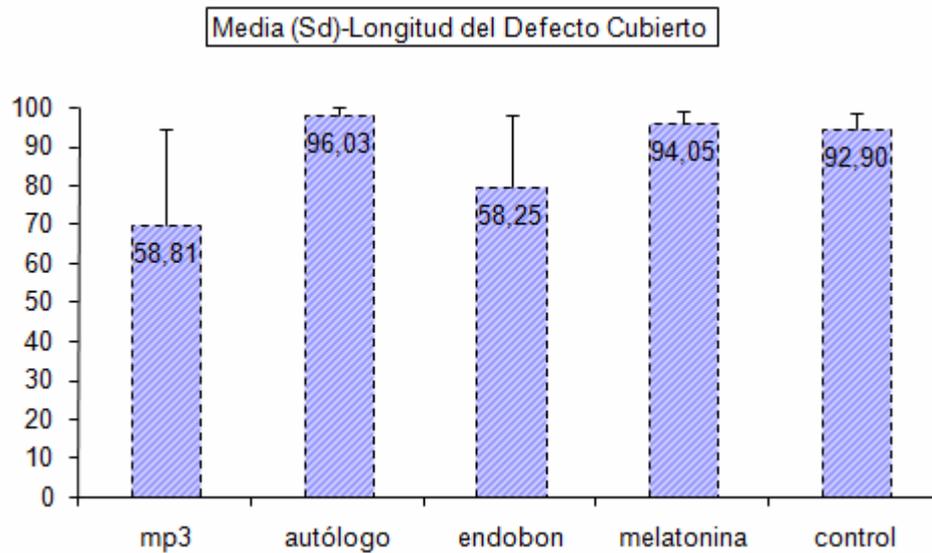


Gráfico 8. Representación Media- Desviación Estandar de la Media para la variable Longitud del Defecto Cubierto.

Tiempo	15 días	30 días	45 días	60 días
	Media±Sd	Media±Sd	Media±Sd	Media±Sd
Mp3	34,65±3,60	59,73±3,76	90,96±0,31	92,73±1,08
H.Autólogo	96,74±1,58	97,58±0,78	98,27±2,19	99,73±0,54
Endobon	49,19±3,91	84,12±2,75	91,52±1,55	93,30±1,25
Melatonina	91,98±1,44	95,23±3,43	96,55±2,03	99,03±0,66
Control	90,16±0,78	92,29±1,93	96,67±2,08	98,92±0,82

**Tabla 15.** Longitud del Defecto Cubierto expresado en Media ± Desviación Estandar de la Media(Sd) %.

	F	gl 1	gl 2	Significación
MP3	2,472	3	12	,112
H.Autólogo	2,674	3	12	,094
Endobon	2,457	3	12	,113
Melatonina	4,733	3	12	,021
Control	2,850	3	12	,082

**Tabla 16.** Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas.

	Suma cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Materiales	9839,598	4	2459,9	623,4	0,005
Materiales Tiempo/ sacrificio	7351,09	12	612,59	155,24	0,005
Error	189,407	48	3,946		

**Tabla 17.** Análisis de la Varianza de medidas repetidas para la longitud del defecto cubierto.

Para la variable longitud del defecto cubierto el análisis de la varianza detectó diferencias significativas en el comportamiento de los biomateriales en los distintos tiempos de experimentación.

	Suma cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	612034,588	1	612034,588	86725,195	0,005
Tiempo sacrificio	7303,857	3	2434,619	344,985	0,005
Error	84,686	12	7,057		

**Tabla 18.** Análisis de la Varianza de medidas repetidas para la longitud del defecto cubierto.

El análisis de la varianza detectó diferencias significativas entre los distintos periodos de experimentación para la variable longitud del defecto cubierto.

Tiempo sacrificio(I)	Tiempo sacrificio(J)	Diferencias entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
15	30	-13,245*	,840	0,005
	45	-22,248*	,840	0,005
	60	-24,198*	,840	0,005
30	15	13,245*	,840	0,005
	45	-9,003*	,840	0,005
	60	-10,953*	,840	0,005
45	15	22,248*	,840	0,005
	30	9,003*	,840	0,005
	60	-1,950*	,840	0,039
60	15	24,198*	,840	0,005
	30	10,953*	,840	0,005
	45	1,950*	,840	0,039

\*La diferencia de las medias es significativa al nivel 0,05

a. Ajuste para comparaciones múltiples

**Tabla 19.** Comparaciones múltiples (Método de la LSD) entre los distintos periodos de experimentación en relación a la variable Longitud del Defecto Cubierto.

Existen diferencias significativas entre las medias de los periodos de experimentación cuando los comparamos por pares.

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
15 días	MP3	H.Autólogo	-62,088*	1,367	0,005
		Endobon	-14,543*	1,914	0,005
		Melatonina	-57,328*	1,546	0,005
		Control	-55,513*	1,718	0,005
	H.Autólogo	MP3	62,088*	1,367	0,005
		Endobon	47,545*	1,478	0,005
		Melatonina	4,760*	1,215	0,002
		Control	6,575*	0,849	0,005
	Endobon	MP3	14,543*	1,914	0,005
		H.Autólogo	-47,545*	1,478	0,005
		Melatonina	-42,785*	1,135	0,005
		Control	-40,970*	1,389	0,005
	Melatonina	MP3	57,328*	1,546	0,005
		H.Autólogo	-4,760*	1,215	0,002
		Endobon	42,785*	1,135	0,005
		Control	1,815	1,122	0,132
Control	MP3	55,513*	1,718	0,005	
	H.Autólogo	-6,575*	0,849	0,005	
	Endobon	40,970*	1,389	0,005	
	Melatonina	-1,815	1,122	0,132	

\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla 20.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto-Grupo I (15 días).

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre las medias de todos los implantes, a excepción de la Melatonina y el control para los cuales la diferencia de las medias no era significativa.

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
30 días	MP3	H.Autólogo	-37,850*	1,367	0,005
		Endobon	-24,390*	1,914	0,005
		Melatonina	-35,495*	1,546	0,005
		Control	-32,560*	1,718	0,005
	H.Autólogo	MP3	37,850*	1,367	0,005
		Endobon	13,460*	1,478	0,005
		Melatonina	2,355	1,215	0,077
		Control	5,290*	0,849	0,005
	Endobon	MP3	24,390*	1,914	0,005
		H.Autólogo	-13,460*	1,478	0,005
		Melatonina	-11,105*	1,135	0,005
		Control	-8,170*	1,389	0,005
	Melatonina	MP3	35,495*	1,546	0,005
		H.Autólogo	-2,125	1,215	0,077
		Endobon	11,105*	1,135	0,005
		Control	2,935*	1,122	0,023
Control	MP3	32,560*	1,718	0,005	
	H.Autólogo	-5,290*	0,849	0,005	
	Endobon	8,170*	1,389	0,005	
	Melatonina	-2,935*	1,122	0,023	

\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla 21.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto-Grupo II (30 días)

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencia significativas entre la media de todos los implantes para este periodo, a excepción de los implantes de H. Autólogo y Melatonina, para los cuales la diferencia de las medias en este periodo no era significativa.

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
45 días	MP3	H.Autólogo	-7,303*	1,367	0,005
		Endobon	-0,558	1,914	0,776
		Melatonina	-5,585*	1,546	0,004
		Control	-5,703*	1,718	0,006
	H.Autólogo	MP3	7,303*	1,367	0,005
		Endobon	6,745*	1,478	0,001
		Melatonina	1,718	1,215	0,183
		Control	1,600	0,849	0,084
	Endobon	MP3	0,558	1,914	0,776
		H.Autólogo	-6,745*	1,478	0,001
		Melatonina	-5,028*	1,135	0,001
		Control	-5,145*	1,389	0,003
	Melatonina	MP3	5,585*	1,546	0,004
		H.Autólogo	-1,718	1,215	0,183
		Endobon	5,028*	1,135	0,001
		Control	-0,118	1,122	0,918
Control	MP3	5,703*	1,718	0,006	
	H.Autólogo	-1,600	0,849	0,084	
	Endobon	5,145*	1,389	0,003	
	Melatonina	0,118	1,122	0,918	

\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla 22.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto-Grupo III (45 días).

El análisis de comparaciones múltiples detectó diferencias significativas entre los implantes de MP3 y Endobon con los implantes de H. Autólogo, Melatonina y control.

Tiempo sacrificio	Material(I)	Material(J)	Diferencia entre medias(I-J)	Error Típico	Significación <sup>a</sup>
60 días	MP3	H.Autólogo	-6,998*	1,367	0,005
		Endobon	-0,573	1,914	0,770
		Melatonina	-6,298*	1,546	0,002
		Control	-6,193*	1,718	0,004
	H.Autólogo	MP3	6,998*	1,367	0,005
		Endobon	6,425*	1,478	0,001
		Melatonina	0,700	1,215	0,575
		Control	0,805	0,849	0,362
	Endobon	MP3	0,573	1,914	0,770
		H.Autólogo	-6,425*	1,478	0,001
		Melatonina	-5,725*	1,135	0,005
		Control	-5,620*	1,389	0,002
	Melatonina	MP3	6,298*	1,546	0,002
		H.Autólogo	-0,700	1,215	0,575
		Endobon	5,725*	1,135	0,005
		Control	0,105	1,122	0,927
Control	MP3	6,193*	1,718	0,004	
	H.Autólogo	-0,805	0,849	0,362	
	Endobon	5,620*	1,389	0,002	
	Melatonina	-0,105	1,122	0,927	

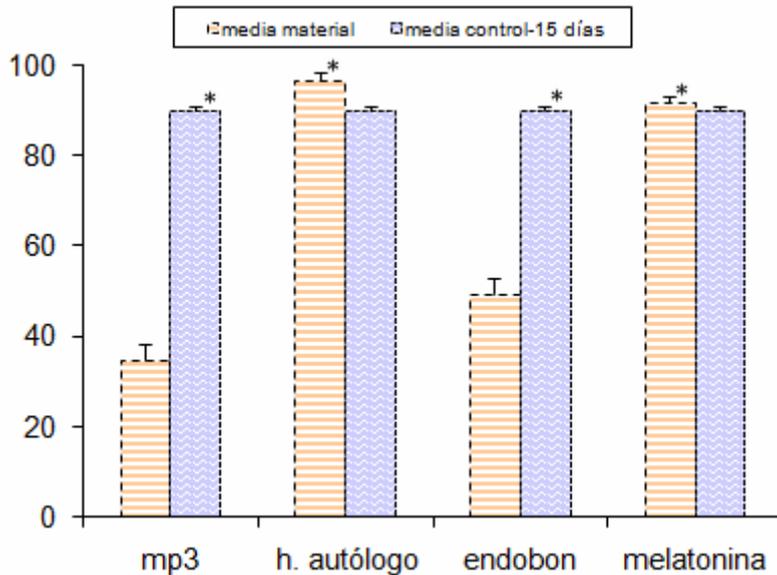
\*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples : Diferencia mínima significativa.

**Tabla 23.** Comparaciones Múltiples (Método LSD) para la variable Longitud del Defecto Cubierto-Grupo IV (60 días).

En el análisis de comparaciones múltiples no existen diferencias significativas entre las medias de los xenoinjertos de origen bovino Endobon® y porcino MP3® en este periodo. Asimismo cuando comparamos por pares no existe diferencia significativa entre la media de los implantes de H. Autólogo, Melatonina y control. El análisis detectó diferencias significativas entre estos y los implantes de MP3 y Endobon.

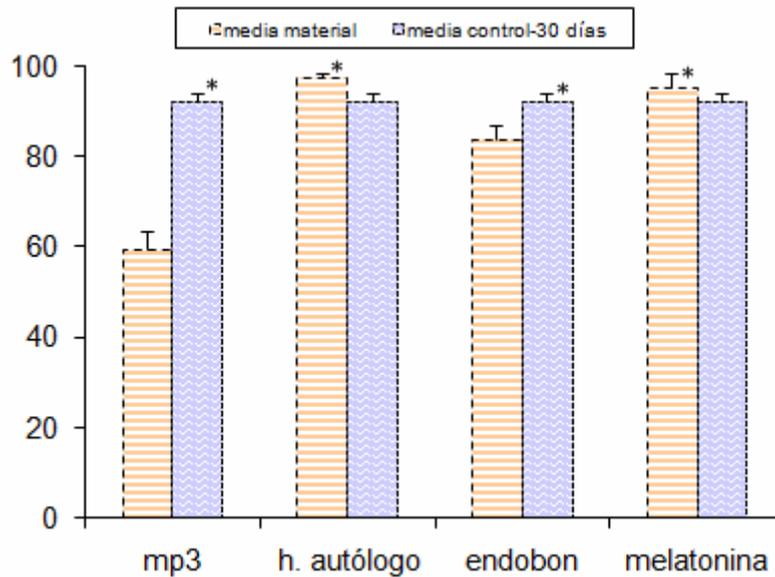
## Grupo I (15 días)



**Gráfico 9.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Longitud del Defecto Cubierto-Grupo I (15 días). \*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

Para la variable Longitud del Defecto Cubierto a los 15 días existen diferencias significativas entre el Control con los implantes H. Autólogo, MP3 y Endobon. El H. Autólogo se comporta mejor que los demás implantes incluido el control. No se encontraron diferencias significativas entre el control y la melatonina en este primer periodo, ambas de comportan de un modo similar. Asimismo estas se comportan mejor que el MP3 y el Endobon, entre los cuales existen diferencias significativas que indican un mejor comportamiento para el Endobon.

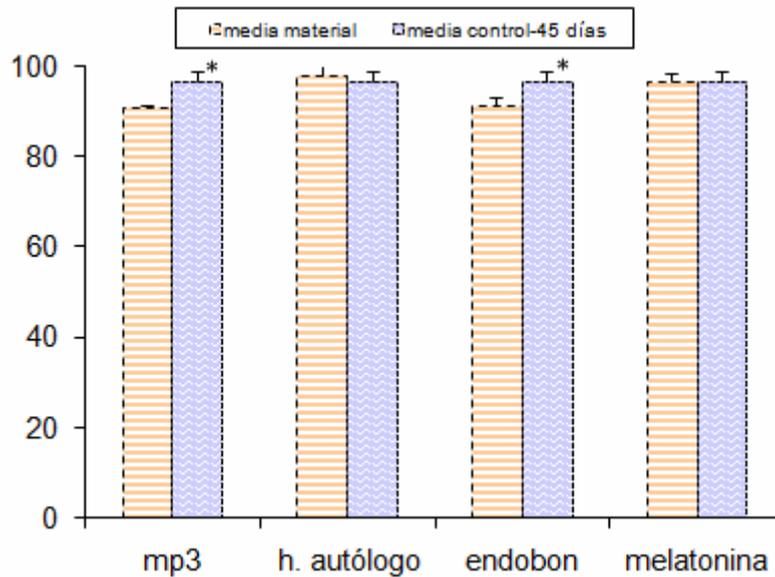
## Grupo II (30 días)



**Gráfico 10.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Longitud del Defecto Cubierto-Grupo II (30 días). \*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

Para la variable Longitud del Defecto Cubierto a los 30 días existen diferencias significativas entre el control y los implantes de H.Autólogo, Melatonina, Endobon y MP3. El H. Autólogo se comporta mejor que el control, pero no existen diferencias significativas entre este y la Melatonina. La melatonina supera al control de manera significativa en este periodo. Ambos Endobon y MP3 se comportan peor que el control, mejorando el Endobon al MP3 en relación a la longitud del defecto cubierto.

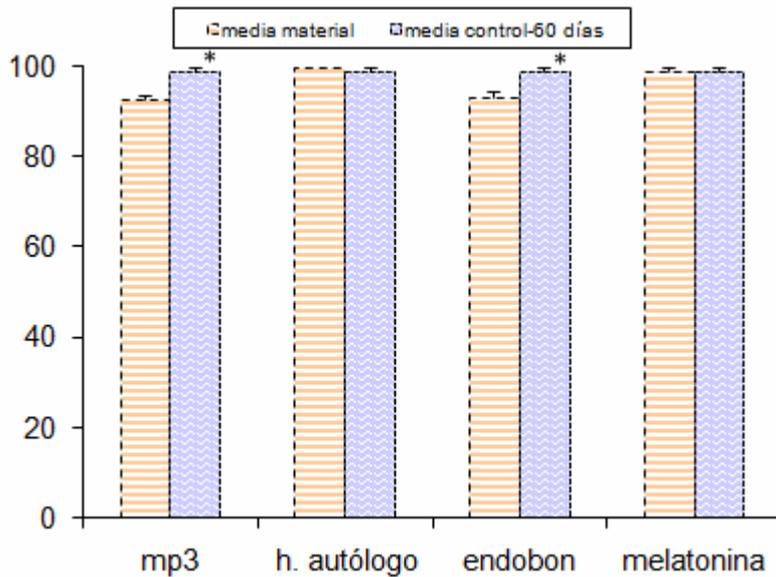
### Grupo III (45 días)



**Gráfico 11.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Longitud del Defecto Cubierto-Grupo III (45 días). \*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

Para la variable Longitud del Defecto Cubierto a los 45 días existen diferencias significativas entre el control y los implantes de MP3 y Endobon, comportándose mejor el control que ambos xenoinjertos entre los cuales no existía diferencias significativas. Asimismo no existían diferencias significativas entre el control y los implantes de H. Autólogo y Melatonina, comportándose estos de un modo similar.

### Grupo IV (60 días)



**Gráfico 12.** Comparaciones múltiples (Método LSD) de la Longitud del Defecto Cubierto-Grupo IV(60 días). \*La diferencia de las medias es significativa a nivel 0,05.

Para la variable Longitud del Defecto Cubierto a los 60 días no existen diferencias significativas entre el control y los implantes de H. Autólogo y Melatonina, comportándose estos de un modo semejante. Aunque si existen diferencias significativas entre el control con los implantes de MP3 y Endobon, los cuales se comportan peor. Asimismo no existen diferencias significativas del comportamiento de MP3 y Endobon para este grupo de estudio.

## RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Grupos Experimentales	Tiempo sacrificio	Material	Grosor de la Cortical Neoformada	Longitud del Defecto Cubierto
			Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD
I	15días	MP3	<b>25,86 <math>\pm</math> 3,31*</b>	<b>34,65 <math>\pm</math> 3,60*</b>
		H.Autólogo	<b>91,84 <math>\pm</math> 0,94*</b>	<b>96,74 <math>\pm</math> 0,78*</b>
		Endobon	<b>30,32 <math>\pm</math> 4,18*</b>	<b>49,19 <math>\pm</math> 3,91*</b>
		Melatonina	<b>89,72 <math>\pm</math> 0,48*</b>	91,98 $\pm$ 1,44
		Control	87,48 $\pm$ 1,73	90,16 $\pm$ 0,78
II	30días	MP3	<b>42,62 <math>\pm</math> 2,74*</b>	<b>59,73 <math>\pm</math> 3,76*</b>
		H.Autólogo	<b>95,34 <math>\pm</math> 2,23*</b>	<b>97,58 <math>\pm</math> 0,78*</b>
		Endobon	<b>40,14 <math>\pm</math> 2,02*</b>	<b>84,12 <math>\pm</math> 2,75*</b>
		Melatonina	<b>93,23 <math>\pm</math> 2,95*</b>	<b>95,23 <math>\pm</math> 3,43*</b>
		Control	91,68 $\pm$ 2,47	92,29 $\pm$ 1,93
III	45días	MP3	<b>74,71 <math>\pm</math> 5,66*</b>	<b>90,96 <math>\pm</math> 0,31*</b>
		H.Autólogo	<b>97,69 <math>\pm</math> 2,23*</b>	98,27 $\pm$ 2,19
		Endobon	<b>71,59 <math>\pm</math> 5,63*</b>	<b>91,52 <math>\pm</math> 1,55*</b>
		Melatonina	94,89 $\pm$ 3,14	96,55 $\pm$ 2,03
		Control	94,42 $\pm$ 2,69	96,67 $\pm$ 2,08
IV	60días	MP3	<b>92,05 <math>\pm</math> 1,03*</b>	<b>92,73 <math>\pm</math> 1,08*</b>
		H.Autólogo	99,26 $\pm$ 0,26	99,73 $\pm$ 0,54
		Endobon	<b>90,96 <math>\pm</math> 0,62*</b>	<b>93,30 <math>\pm</math> 1,25*</b>
		Melatonina	98,35 $\pm$ 1,14	99,03 $\pm$ 0,61
		Control	98,00 $\pm$ 1,43	98,92 $\pm$ 3,82

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

**Tabla 24.** % Media-DS de las variables Grosor de la cortical Neoformada y Longitud del Defecto Cubierto para cada uno de los grupos experimentales.

### Porcentaje del Grosor de la Cortical Neoformada

**GRUPO I (15 días):** En relación a esta variable destaca el mejor comportamiento del hueso autólogo, con un porcentaje de grosor de la cortical del 91,84% muestra diferencias significativas respecto a los demás implantes. Por su parte la melatonina con un porcentaje de grosor de la cortical neoformada del 89,72%, se comporta mejor que el control y

los xenoinjertos porcinos y bovinos. Comportándose mejor el Endobon® con un porcentaje del 30,32% que supera al 25,86% del MP3®.

**GRUPO II (30 días):** Durante este periodo el hueso autólogo con un porcentaje del 95,34% sigue superando en el porcentaje del grosor de la cortical neoformada al resto de implantes, incluido el control. De igual forma que la melatonina con un porcentaje del 93,23% se comporta mejor que el control 91,68% y los xenoinjertos porcino 42,62% y bovino 40,14%, entre ambos xenoinjertos no existen diferencias significativas de formación ósea para este periodo.

**GRUPO III (45 días):** Para este periodo el hueso autólogo con un porcentaje del 97,69% sigue comportándose mejor que el resto de los implantes, aunque ya no encontramos diferencias significativas entre la melatonina con un 94,89% y el control 94,42%. Ambos se comportan mejor que los xenoinjertos porcino y bovino, de los cuales el MP3® con un 74,71% presenta mejores resultados que Endobon® con un 71,59%.

**Grupo IV (60 días):** En este periodo las diferencias entre el hueso autólogo 99,26%, la melatonina con un 98,35% y el control 98,00% respecto al grosor de la cortical neofomada, dejan de ser significativas, comportándose estos de forma similar en la formación ósea. Asimismo estos superan a los xenoinjertos porcino con un 92,05% y bovino 90,96%, los cuales obtienen porcentajes similares en relación a la variable grosor de la cortical neoformada.

## **Porcentaje de la Longitud del Defecto Cubierto**

**GRUPO** (15 días): En este primer periodo destaca significativamente el comportamiento del hueso autólogo, respecto de los demás implantes con un porcentaje del 96,74% de la longitud del defecto cubierto. La melatonina con un 91,98% no se diferencia del control 90,16%, aunque ambos se comportan mejor que los xenoinjertos porcino y bovino. Entre ellos el Endobon® con un 49,19% se comporta mejor que el MP3® con 34,65%.

**GRUPO II** (30 días): El hueso autólogo en este periodo con un porcentaje del 97,58% se comporta mejor que el control 92,29% y los xenoinjertos porcino 59,73% y bovino 84,12%, pero no mejor que la melatonina. La melatonina con un 95,23% se comporta de forma similar al hueso y obtienen mejores resultados que el control. Estos superan a los xenoinjertos porcino y bovino, obteniendo mejores resultados con el Endobon®.

**GRUPO III** (45 días): En este periodo dejan de existir diferencias significativas entre los implantes de hueso autólogo 98,27%, control 96,67% y melatonina 96,55%. Aunque estos se comportan mejor que los xenoinjertos porcino 90,96% y bovino 91,52%, los cuales no se diferencian.

**GRUPO IV** (60 días): Al igual que en el periodo anterior no se encuentra diferencias entre los implantes de hueso autólogo 99,75%, melatonina 99,03% y control 98,92%, comportándose estos de una forma parecida, siempre mejor que los xenoinjertos porcino 92,73% y bovino 93,30% entre los cuales no existen diferencias significativas.



## **7. DISCUSIÓN**



El hueso al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original. De esta manera cuando el hueso presenta soluciones de continuidad, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para la reconstrucción de defectos no críticos, no obstante en pérdidas mayores de masa tisular se hace necesario recurrir al aporte de sustitutos óseos para evitar la reparación fibrosa.

La sustitución o reemplazo del tejido óseo ha sido objeto de investigación durante muchos años por su alto interés en el campo de la cirugía bucal y maxilofacial, dada la evidente necesidad de sustituir el tejido óseo en determinadas situaciones como: alteraciones óseas secundarias a traumatismos, infecciones, tumores, malformaciones, etc. Usualmente dichos procesos suponen graves problemas tanto para el paciente como para el especialista que los tiene que tratar. De ahí, la necesidad de la existencia de un material que sea compatible y reemplazable en el nuevo tejido óseo.

El biomaterial “ideal” debería ser el resultado de la combinación de matrices osteoconductoras, células osteogénicas y/o materiales o agentes osteoinductivos, con el fin de proporcionar los tres elementos fundamentales para la regeneración ósea: una matriz osteoconductora capaz de proporcionar el andamiaje adecuado para el crecimiento del tejido óseo en su interior; factores osteoinductores que aporten los componentes físicos y/o químicos capaces de inducir las diferentes fases del proceso de reparación ósea y por último células osteogénicas que se

diferenciarán según los distintos estadios de la regeneración ósea (**Anitua 2000**).

El tejido óseo autólogo es el material de elección para la regeneración ósea, como pudimos comprobar en nuestro trabajo, ya que es el que presenta los mejores resultados desde el inicio de la regeneración, debido a diversas ventajas como su capacidad de angiogénesis y la presencia de células osteogénicas vitales y de factores de crecimiento (**Cancian y cols 2004**). Sin embargo, presenta la desventaja de la escasa cantidad que se puede obtener de zonas donantes intraorales, así como las complicaciones vinculadas a la toma de injertos autólogos extraorales, que están cifradas entre el 6 y 20 % (**Nkenke y cols 2002; Cricchio y Lundgren 2003; Lax 2004; Nather 2005; Sutherland y Brostrom 2005; Sasso y cols 2005; Cutter y Mehrara 2006**).

En contraposición a los estudios de **Barone y Covani** en 2007, los cuales encuentran una baja morbilidad y sólo el 10% de los pacientes refieren dolor moderado anterior al tercer día.

Una alternativa a los injertos autólogos la constituyen los aloinjertos, que no obstante presentan riesgos de carácter infeccioso e inmunológico (hepatitis, virus de la inmunodeficiencia humana, priones, etc.) como ha sido señalado por **Andrew y Crenshaw** en 1998, así como los problemas relacionados con su disponibilidad, adquisición y elevado coste económico (**Choi y cols 2004; Vance y cols 2004**). Todo ello ha impulsado la búsqueda de alternativas como son los xenoinjertos, destacando en este sentido los estudios realizados por **Rodríguez y cols 1997; Hockers y**

**cols 1999; van Steenbergne y cols 2000; Yildirim y cols 2000; Hising y cols 2001; Lax 2004; Stavropoulos y cols 2004; Barone y cols 2005)**

El análisis de los resultados clínicos y la difusión comercial de los distintos tipos de productos desarrollados por la industria biomédica, demuestran la neta superioridad de los sustitutos óseos de origen natural respecto de los de derivados sintéticos (**Santos y cols 2008**).

Los xenoinjertos porcino y bovino utilizados en nuestro estudio necesitan un periodo mínimo de osteointegración que alarga los tiempos de tratamiento. La demanda actual en la clínica odontológica obliga a buscar materiales o sustancias que ayuden a acelerar los procesos de osteointegración. Los pacientes desean acortar los tiempos de tratamiento debido a sus requerimientos funcionales y estéticos, ya que la boca forma parte del sistema estomatognático cuya función principal es la masticación.

Numerosos estudios in vitro han demostrado que la melatonina es un importante mediador de la formación ósea, promoviendo la diferenciación osteoblástica (**Satomura y cols 2007; Jockers y cols 2008**).

Esta indolamina es un importante modulador del metabolismo del calcio, previniendo la osteoporosis y la hipocalcemia en ciertos casos (**Suzuki 2008**), probablemente debido a su relación con otros factores reguladores óseos como la paratohormona, la calcitonina o las prostaglandinas (**Ostrowska y cols 2003; Macías y cols 2003**). Basándonos en estos resultados y en los recientes trabajos de (**Cutando y cols 2003,2007, 2008**), hemos basado nuestra investigación sobre el posible efecto inductor de la melatonina en el metabolismo óseo.

La melatonina presenta su acción inductora sobre el metabolismo óseo a corto plazo. Su máxima acción se realiza sobre las primeras semanas como demuestran los trabajos de (**Cutando y cols.** 2006,2007; **Takechi y cols** 2008), una vez pasado este tiempo las diferencias dejan de ser significativas. Estos resultados están relacionados con los nuestros, en los cuales la melatonina mejoraba respecto al control en las primeras semanas. Esto se puede explicar por diversos mecanismos, parece que la melatonina aumenta el número de células en la zona que rodea al implante, al tiempo que esta aceleración de la diferenciación celular, aumenta considerablemente la síntesis y mineralización de la matriz osteoide. Esto puede explicar la gran cantidad de matriz mineralizada alrededor del implante de melatonina en toda la longitud del defecto creado después de cuatro semanas. La melatonina parece contribuir a la neoformación de hueso en la zona del defecto estimulando la diferenciación de preosteoblastos los cuales son transportados desde el la médula hasta la zona por la circulación vascular. Otra posible acción de la melatonina a nivel de los preosteoblastos es debida a la estimulación de la expresión genética de ciertas proteínas de la matriz ósea (**Radio y cols** 2006).

Esta aumentaría la expresión de ciertos genes que contienen la presencia de determinadas proteínas a nivel de la matriz osteoide. De esta forma se ha demostrado que la melatonina es capaz después de un periodo comprendido entre 5 y 9 días de estimular la presencia de osteocalcina sialoproteína y de fosfatasa alcalina; dichas proteínas contienen la

secuencia de bases RGGTC, necesaria para que el factor nuclear RZR de la melatonina pueda ejercer su acción.

El rápido incremento en la formación de hueso que cubre el defecto óseo cavitario sugiere que la melatonina actúa simultáneamente a dos niveles diferentes en el proceso de la remodelación. Se sabe los osteoclastos, células responsables de la reabsorción ósea contienen superóxido dismutasa y producen especies reactivas del oxígeno durante el metabolismo óseo, esto puede contribuir a la degradación de los componentes estructurales de la matriz como el colágeno o el ácido hialurónico los cuales son susceptibles del daño oxidativo provocado por los radicales libres (**Garrett y cols** 1990). Además los osteoclastos secretan otra enzima, la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), la cual en presencia de hierro puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno a través de una reacción de Fenton y producir el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) uno de los más tóxicos (**Halleen cols** 1999). La melatonina actúa a nivel de los osteoclastos, debido a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para neutralizar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno inhibiendo la reabsorción ósea (**Reiter y cols** 2007).

Después de la inserción de los implantes por muy cuidadosa que será la técnica, se produce un necrosis de los bordes de la herida y una reacción inflamatoria consecuencia directa de la cirugía. Los macrófagos y los leucocitos procedentes de los vasos sanguíneos provocan un incremento de los radicales libres los cuales estimulan la reabsorción a través de los osteoclastos (**Bai y cols** 2005; **Lee y cols** 2005).

La melatonina a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias puede atenuar esta reacción y disminuir la producción de especies reactivas (**Cutando** 2007) y como consecuencia la reabsorción ósea. Esta inhibición de la reabsorción ósea puede ser explicada por otra acción inducida por la melatonina sobre el proceso de la osteoclastogénesis. De acuerdo con algunos autores, la aplicación de melatonina a concentraciones de 5 a 500  $\mu\text{m}$ , de manera dosis dependiente, disminuye la expresión de mRNA del RANK e incrementa los niveles de ambas OPG así como del mRNA del OPG en líneas celulares de preosteoblastos MC3T3-E<sub>1</sub> (**Koyama y cols** 2002). Esto indica que la melatonina puede provocar una reducción de la reabsorción y un aumento de la masa ósea debido a su acción sobre el sistema OPG-RANK-RANK-L (**Cardinally y cols** 2003).

Otra de las posibles explicaciones del proceso de aceleración de la curación se puede deber al efecto de la melatonina sobre la angiogénesis, incrementando la formación de nuevo vasos y aumentando los niveles la expresión de proteínas del factor de crecimiento del endotelio vascular durante la formación del tejido de granulación (**Pugazhenti y cols** 2008)

El proceso de regeneración depende de la angiogénesis, incrementando la melatonina el número de vasos sanguíneos y aumentando la expresión de VEGF<sub>165</sub>, la más potente proteína angiogenética, con un pico de expresión entre el 3 y 7 día. Estos resultados también están de acuerdo con los expuestos por (**Soybir y cols** 2003), el cual destacó como la melatonina aumentaba la proliferación de los fibroblastos.

Los estudios de Pugazhenthí atribuyeron a la melatonina una inhibición selectiva de la actividad de la enzima iNOS, disminuyendo su actividad durante la fase inflamatoria y aumentándola durante la fase de proliferación. También concluyó que la melatonina incrementaba la actividad del COX durante la primera fase, relacionada esta con la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno. Asimismo la melatonina aumentaba la actividad de la arginasa el primer día después de la cirugía, lo cual resultaba beneficioso para la curación del proceso.

**Mayo y cols** 2005, en este sentido destacaban la acción antiinflamatoria de la melatonina y de sus metabolitos, N1-acetil-N2-formil-5methoxiquinuramina (AFMK) y N1-Acetil-5-methoxiquinuramina (AMK). Esta como sus metabolitos previene la activación del COX-2 inducida por la LPS, sin afectar los niveles de COX-1. Del mismo modo previenen la activación del iNOS y reduce la concentración de los productos de dichas enzimas, PGE (2) y óxido nítrico. Todas estas investigaciones sugieren que el uso de esta indolamina no tóxica puede ser utilizada sólo o combinada con otros tratamientos en la práctica clínica (**Korkmaz y cols** 2009).

Las acciones de la melatonina sobre el hueso resultan de interés clínico y sugieren su posible utilización como agente biomimético en los procesos de regeneración ósea así como en implantología donde se pretenda acelerar el proceso de regeneración y reducir de esta manera el periodo de osteointegración (**Cutando y cols** en 2008). En esta línea de investigación presentamos los resultados de (**Calvo-Guirado y cols** 2009), en cuyo estudio se utiliza la melatonina como agente inductor del

metabolismo óseo junto a un xenoinjerto de origen porcino, que actuaría como andamio y permitiría la osteoconducción, arrojando resultados altamente esperanzadores en el campo de la regeneración ósea e implantología.

La regeneración ósea ha estado sujeta a una amplia investigación para aplicar dichos avances en la práctica clínica, esta se ha basado en el uso de materiales de origen natural o sintético que replacen el daño provocado sobre el tejido y aceleren el proceso de la regeneración. El uso de células progenitoras, materiales osteoconducentes y factores de crecimiento o agentes bioactivos, combinados de tal modo que se controle el soporte estructural y celular es la llave para un adecuado proceso de regeneración.

El hueso corticoesponjoso bovino ha sido durante muchos años el xenoinjerto de elección en el campo de la cirugía bucal y maxilofacial por su gran capacidad osteoconducente demostrado por los estudios de **Terheyden y cols 1999; Hockers y cols 1999; Yildirim y cols 2000; Van Steenberghe y cols 2000; Tawil y cols 2001; Pietruska y cols 2001; Hising y cols 2001; Houser y cols 2001; Norton y cols 2003; Schlegel y cols 2003; Vasilic y cols 2003; Sculean y cols 2003, 2004; Hatano y cols 2004; Ersanli y cols 2004; Scabbia y cols 2004; Cornelini y cols 2004; Philippart y cols 2005; Worth y cols 2005; Schwarz y cols 2006; Galindo y cols 2008; Cordado 2008**). No obstante, presenta un riesgo potencial de contagio de la encefalopatía espongiiforme, aunque existen pocos casos publicados según (**Sogal y Tofe 1999**).

Por otra parte, existen especies animales con un genotipo más cercano al humano (**Borie y cols 1998**); por este motivo nuestro grupo de

investigación ha dirigido los estudios durante los últimos años, hacia los xenoinjertos de origen porcino como potenciales sustitutos de los injertos óseos, puesto que, diversos estudios previos han demostrado en los experimentos realizados, su eficacia tanto como matrices osteoconductoras como para el crecimiento de células de estirpe osteoblástica (**Briem D**, 2002; **Kin y cols** 2004; **Barone y cols** 2005; **Arcuri y cols** 2005; **Orsini y cols** 2006; **Nannmark y Sennerby** 2008).

En relación a los xenoinjetos utilizados en nuestro estudio estos tienen un comportamiento similar, aunque podemos definir ciertas diferencias si comparamos sus propiedades físico-químicas.

En cuanto a la otra propiedad que debe presentar un biomaterial, la capacidad osteoconductora, en el caso de la hidroxiapatita ha quedado comprobada por otros autores en los numerosos estudios realizados con distintas HA (naturales y sintéticas) tras su implantación en diferentes animales de experimentación e incluso en humanos (**Jarcho** 1981; **Winter y cols** 1981; **Katthagen y Mittelmeier** 1984; **Ono y cols** 1990; **Caja y cols** 1992; **Meseguer y cols** 1994; **Thomas** 1994; **Galian** 1995; **Korkusuz y cols** 1995; **Cornell y Lane** 1998; **Boyde y cols** 1999; **Ikeda y cols** 1999; **Denissen y cols** 2000; **Walsh y cols** 2003; **Jun y cols** 2003; **Lax** 2004). Cuando hace dos décadas (**Dahners y cols** 1984), señalaba que la hidroxiapatita no posee capacidad osteoconductora.

El colágeno tiene un papel fundamental en el proceso de osteoconducción en cuánto que actúa como sustrato válido para la activación y la agregación plaquetaria y porque es capaz de atraer y de estimular las diferentes células madre mesenquimales presentes en la médula ósea según

el trabajo de (**Salasznyk y cols** 2004); además aumenta 2 a 3 veces los niveles de proliferación de los osteoblastos según (**Hsu y cols** 1999), y estimula la activación de las plaquetas, de los osteoblastos y de los osteoclastos en el proceso de curación del tejido. Se han diseñado nuevos materiales en los que se establece inicialmente una matriz colágena en red tridimensional, a la que se recubre con una fina capa de hidroxiapatita, resultando finalmente una red de gránulos completamente interconectados.

En relación con el biomaterial (MP3®) que hemos utilizado en nuestro trabajo, el exclusivo proceso de producción permite neutralizar todas las moléculas antigénicas presentes en el hueso al mismo tiempo que mantiene la matriz de colágeno dentro de cada gránulo del biomaterial. Por otra parte, la estructura atómica de la hidroxiapatita natural no es alterada de modo significativo gracias a la limitación de la temperatura máxima en el proceso productivo. Estas características garantizan una consistente neo- formación ósea así como una significativa reabsorción pocos meses después del injerto. La presencia de colágeno dentro de cada gránulo le confiere características higroscópicas facilitando las sucesivas mezclas con colágeno puro.

Los estudios previos de (**Hsu y cols** 1999,2005; **Wu y cols** 2004), consiguieron sintetizar un biomaterial de partículas de hidroxiapatita dispersas y amalgamadas en fibras de colágeno de un diámetro de 30 a 90 nm que injertaron en ratas y observaron un incremento de la densidad celular de los osteoblastos de  $2 \times 10^4$  hasta  $3.2 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$  a los 8 días del implante respecto a las muestras control. Estos resultados indican que los osteoblastos son capaces de proliferar, diferenciarse y mineralizar

la matriz de hidroxiapatita y colágeno, hecho que también hemos observado en nuestro estudio experimental.

Otros autores como (**Chapman y cols** 1997), han utilizado el colágeno como matriz de sostén del componente mineral del biomaterial; en su estudio utilizaron un composite de colágeno puro de origen bovino además de fosfato cálcico y médula ósea autóloga, para el tratamiento de fracturas óseas con unos resultados que no diferían significativamente con los obtenidos cuando utilizaban injerto autólogo de cresta iliaca. Asimismo los estudios de (**Grimes y cols** en 2006), en los que rellenaron defectos óseos tras resecciones de tumores usando un composite de hidroxiapatita, fosfato tricálcico y colágeno bovino, obtuvieron resultados excelentes en los que demostraban que el sustrato de colágeno y fosfato tricálcico favorece la regeneración ósea.

El colágeno añadido al MP3® le otorga unas excepcionales características, mejorando su maleabilidad y su plasticidad. Lo cual le convierte en un material de fácil aplicación en la clínica, a diferencia del xenoinjerto bovino utilizado Endobon® utilizado en nuestro trabajo, el cual necesita ser mezclado con médula ósea o hueso esponjoso para su aplicación.

Además de la importancia de la presencia de colágeno en el xenoinjerto, uno de los principales factores que influyen en la osteoconducción es el tamaño de gránulo del biomaterial que en la hidroxiapatita porcina contenida en el MP3® varía entre 600 y 1000  $\mu\text{m}$  y en el caso del Endobon® la granulometría está entre 500 y 1000  $\mu\text{m}$ ; también depende del grado de interconexión entre los gránulos, así como

de una serie de factores químicos, físico-químicos y biológicos descritos por diversos autores (**Meseguer 1993; Galian 1995; Zyman y cols 1998; Cornell y Lane 1998; Hsu y cols 1999; Wu y cols 2004; Grimes y cols 2006**).

La microporosidad juega un papel importante en el proceso de reabsorción del material, mientras que la macroporosidad está estrechamente ligada a la osteoconducción. En términos generales se ha considerado que la macroporosidad óptima para permitir el crecimiento óseo en el interior del biomaterial se encontraba en el rango de los 150-500  $\mu\text{m}$ , que coinciden con los requisitos propuestos en los estudios clásicos de (**Klawitter y Hulbert 1971**). Según estos autores los implantes porosos de fosfato cálcico debían presentar poros interconectados para poder favorecer el crecimiento óseo en su interior.

A este tipo de porosidad se le denomina "abierta", con la que se obtiene una presión parcial de oxígeno en el interior del implante igual a la del exterior del mismo, condición que actuaría favoreciendo el crecimiento de tejido óseo en su interior.

En este sentido, los resultados de nuestro estudio difieren con los descritos por otros autores como (**Eggli y cols 1988**), quienes observaron mejores resultados con materiales con gránulos de 50-100  $\mu\text{m}$  respecto a los de 200 a 400  $\mu\text{m}$ . Así como con los de (**Frayssinet y cols 1998**), que observaron crecimiento óseo más importante en materiales con gránulos de diámetro inferior a 200  $\mu\text{m}$  respecto a otros materiales con diámetros de 300 a 400  $\mu\text{m}$  y mayores de 600  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, nuestros resultados no concuerdan con los publicados por autores como (**Uchida y cols** 1984,1985), en los distintos experimentos desarrollados, describieron que el tamaño de gránulo apropiado para considerar un material como sustituto del hueso debía estar comprendido en un rango de 210-300  $\mu\text{m}$ . Sin embargo si coincide nuestro estudio con lo observado por (**Shimazaki y Mooney** 1985), quienes describieron un crecimiento óseo mayor cuando los gránulos del material utilizado eran superiores a 500  $\mu\text{m}$  en comparación con gránulos de tamaño inferior. Asimismo, (**Van Blitterswijk** 1991), observaba un elevado porcentaje de crecimiento del tejido óseo (96%) con tamaños de gránulo superiores a 276  $\mu\text{m}$  respecto al 17% obtenido cuando utilizaban gránulos de tamaño comprendido entre 100 y 160  $\mu\text{m}$ ; por lo que propusieron que el tamaño del gránulo no debía reducirse demasiado, ya que tanto el gránulo como las interconexiones tienen un efecto significativo sobre el tipo y el volumen de tejido óseo neoformado.

En este sentido, los estudios realizados por (**Gouin y cols** 1995; **Gauthier y cols** 1998), demostraron que los gránulos de tamaño superior a 500  $\mu\text{m}$  permitían obtener mayor respuesta de tejido óseo en comparación con los gránulos de menor tamaño, igual a lo que hemos observado en nuestro estudio.

Otros autores como (**Klawitter y Hulbert** 1971; **Schepers y cols** 1991) consideraron que la existencia de interporo facilita el crecimiento óseo en su interior. Nuestro estudio confirma los resultados anteriores respecto al MP3® puesto que con este material observamos crecimiento óseo no solo en la superficie sino también en el interior del implante,

hecho comprobado mediante el estudio con el microscopio óptico, que de forma similar también ha sido descrito por **(Tamai y cols 2002)**, cuando utilizaron nuevos biomateriales de hidroxiapatita. Sin embargo a pesar de la porosidad abierta del Endobon® no encontramos crecimiento en el interior de implante.

Estudios más recientes han demostrado que según el tamaño del gránulo se obtendrán resultados distintos respecto a la actividad osteoblástica y consecuentemente en la regeneración ósea. **(Fischer y cols en 2003)**, variaron el tamaño del gránulo y la microporosidad de las partículas de hidroxiapatita, usando hidroxiapatita densa e hidroxiapatita microporosa, con dos tamaños de gránulo, 212-300  $\mu\text{m}$  y 500-706  $\mu\text{m}$ . A continuación cultivaron células madre mesenquimales en condiciones de diferenciación osteoblástica sobre los dos tipos de hidroxiapatita durante una semana, observando una mayor diferenciación, proliferación y actividad osteoblástica en la hidroxiapatita de rango menor (212-300  $\mu\text{m}$ ).

Estudios “in vitro” de **(Takahashi y cols en 2005)**, consiguieron cultivar y diferenciar osteoblastos sobre un biomaterial de  $\beta$ -fosfato tricálcico con un tamaño de gránulo de 180-200  $\mu\text{m}$ . Asimismo, en un estudio “in vitro” realizado por **(Weissenboeck y cols 2006)**, cultivaron células madre mesenquimales bajo condiciones de diferenciación osteoblástica sobre partículas de hidroxiapatita de distinto tamaño, observando que con un tamaño de gránulo de 10-100  $\mu\text{m}$  observaban mayor crecimiento osteoblástico así como mayor actividad celular a los 9 días del cultivo; sin embargo cuando el tamaño de partícula era mayor, entre 600 y 1000  $\mu\text{m}$ , se producía mayor producción de colágeno tipo I.

También demostraron que el tamaño del gránulo no variaba la secreción de osteocalcina y osteopontina. Estos resultados concuerdan con los nuestros, ya que está establecida la relación de la melatonina con ciertos marcadores del metabolismo óseo.

Sin embargo, otros estudios recientes como los de (**Mangano y cols** 2006), quienes utilizaron hidroxiapatita con un tamaño de partícula entre 200 y 800  $\mu\text{m}$  como injerto en elevaciones de seno maxilar, observaron migración, adhesión y proliferación osteoblástica en el gránulo así como angiogénesis en la red de gránulos.

En este sentido, existe un problema que corresponde a la dificultad para poder interpretar correctamente los resultados de los estudios publicados, ya que existe una gran variabilidad respecto a las características de los materiales utilizados en los distintos estudios publicados, respecto a sus propiedades físicas como químicas. Además de que dichas características suelen estar poco especificadas e incluso en ocasiones son desconocidas. Por este motivo, los resultados entre los distintos estudios no pueden ser comparables, cuando consideramos el tamaño de gránulo como único parámetro considerado en el estudio.

En relación con las interacciones sistémicas de un material con el tejido receptor, se pueden distinguir tres grados diferentes de biocompatibilidad en los materiales: inerte, bioactivos y biodegradables. El xenoinjerto porcino es considerado como un material bioactivo, debido a su capacidad de combinarse con el hueso vivo (**Rodríguez y cols** 1997; **Yildirim y cols** 2000, 2001; **Artzi y cols** 2001, 2003, 2004; **Norton y**

**cols 2003; Ersanli y cols 2004; Nannmarky Sennerby 2008)** frente a otros materiales a los que se denomina bioinertes, que solo poseen la capacidad de entrar en contacto con el hueso sin interactuar entre ellos. Asimismo, el xenoinjerto de origen bovino Endobon® utilizado por nosotros ha demostrado ser un sustituto óseo muy biocompatible, con escasa reacción inflamatoria, no mostrando signos de mutagenicidad ni genotoxicidad.

La mayoría de los experimentos en los que se han utilizado xenoinjertos, demuestran que la incorporación de estos implantes al tejido óseo huésped tiene lugar sin reacción a cuerpo extraño y sin signos de toxicidad local o sistémica, por lo que diversos estudios previos han llevado a considerar al xenoinjerto como un material biocompatible (**Rodríguez y cols 1997; Hockers y cols 1999; Yildirim y cols 2000; Van Steenbergne y cols 2000; Artzi y cols 2001; Houser y cols 2001; Hising y cols 2001**).

La biocompatibilidad del xenoinjerto también se pone de manifiesto por la presencia de una interfase implante-huésped con ausencia de cápsula fibrosa, en la que se establece una íntima unión entre las partículas del biomaterial y el hueso huésped para ambos xenoinjertos utilizados. De esta forma se demuestra su capacidad de osteointegración como ha sido definida por distintos autores en estudios sucesivos (**Rodríguez y cols 1997; Yildirim y cols 2001; Norton y cols 2003; Ersanli y cols 2004; Barone y cols 2006; Orsini y cols 2006**). Dicha propiedad también ha sido definida por otros autores como “enlace químico” o “unión bioactiva”

(**Cook y cols** 1988 y 1991 y **Oonishi y cols** 1989; **Pietruska y cols** 2001; **Tapety y cols** 2004).

Por el contrario no ha podido demostrarse la osteointegración cuando se utilizaban materiales diferentes a la hidroxiapatita bovina, pues distintos autores han observado la presencia de una capa fibrosa entre el biomaterial y el hueso huésped (**Bell y Beirne** 1988; **Collins** 1989; **Gatti y cols** 1990).

Nuestro estudio experimental ha confirmado la biocompatibilidad de ambos xenoinjertos utilizados, puesto que hemos observado la existencia de respuesta inflamatoria poco relevante y sólo durante los primeros períodos del estudio, que creemos debida a una reacción frente a la agresión que supone la perforación ósea y colocación del implante; dicha respuesta a las dos semanas quedaba representada exclusivamente por escasos macrófagos y linfocitos. Tampoco hemos observado, en ninguna de las secciones estudiadas, presencia de fibrosis entre el implante y el hueso huésped por lo que creemos que se confirma la capacidad de osteointegración de ambos biomateriales. En relación a la melatonina esta presenta características de biocompatibilidad, pues no sólo no presenta signos citotóxico (**Korkmaz y cols** en 2009), sino más bien se comporta como un agente antiinflamatorio (**Mayo y cols** en 2005) y antiinfeccioso, impidiendo el crecimiento de patógenos (**Cutando y cols** en 2007).

La disminución del volumen trabecular alrededor y en el interior del implante que observamos en las radiografías demuestran la existencia de un fenómeno de reabsorción progresiva del MP3®, observado desde los primeros períodos del estudio. Dicho proceso de reabsorción se realiza mediante un mecanismo de fagocitosis celular a través de macrófagos que

se observaban en la periferia del implante. Microscópicamente destacaba la existencia de una reacción inflamatoria leve caracterizada por macrófagos y linfocitos dispuestos de forma dispersa sin formación de granulomas. Este hecho contrasta con lo descrito en los estudios realizados por autores como (**Klein y cols** 1983; **Gumaer y cols** 1986; **Eggl y cols** en 1988), quienes concluyen en que no observaron modificaciones en los biomateriales de hidroxiapatita utilizados en sus estudios durante el tiempo de implantación.

Esta reabsorción también queda claramente demostrada en los estudios de (**Nannmark y Sennerby** 2008), que explican la reabsorción del hueso porcino MP3® gracias a la presencia del colágeno, el cual induce la adhesión de los osteoclastos a la superficie del material. Estos resultados se suman a los del grupo de (**Barone y cols** 2005), quien confirma a través del estudio de las biopsias tomadas en humanos 5 meses después de la elevación del seno maxilar. A pesar de ello, los resultados del estudio con microscopía electrónica de transmisión en biopsias tomadas de un aumento de seno maxilar utilizando el MP3® por (**Orsini y cols** 2006) no mostraban signos de reabsorción.

Existe controversia sobre la reabsorción en el tiempo del injerto bovino, los resultados de anteriores estudios lo definen como un material no reabsorbible en el sentido estricto de que no es reabsorbido en un periodo inferior a un año (**Hallman y cols** 2001). Así, en investigaciones con animales se ha demostrado el incremento de la reabsorción osteoclástica (**Klinge y cols** 1992; **Hurzeler y cols** 1997; **Carmagnola y cols** 2002) mientras que en investigaciones con humanos utilizando

sucesivas biopsias durante 6 años de seguimiento se han hallado grandes cantidades de material remanente con pocos o ningún signo de reabsorción (**Schlegel y Donath** 1998; **Piatelli** y cols 1999; **Hallman** y cols 2001).

La melatonina no presenta gran radiopacidad por lo que no se puede observar radiológicamente su degradación, pero sí que debido a capacidad lipofílica esta es rápidamente solubilizada.

En resumen, los xenoinjertos porcino y bovino utilizados, se han comportado en nuestro estudio, como materiales biocompatible puesto que sólo provocaron respuesta inflamatoria leve y durante las dos primeras semanas del estudio; también han demostrado ser biomateriales osteoconductores al permitir la formación de tejido de granulación que es sustituido por tejido óseo trabecular, no genotóxicos ni citotóxicos. Si embargo la melatonina produjo un rápida inducción del proceso de regeneración que superaba al control y a ambos xenoinjertos. Si bien esta no cumple algunas características de los biomateriales como puede ser la resistencia a la compresión y estabilidad del implante, se puede plantear su uso en combinación con biomateriales osteoconductores que sirvan de andamiaje, utilizando así las propiedades biomiméticas de la melatonina sobre el hueso. Los estudio de **Calvo-Guirado y cols** en 2009, ya confirman dichos resultados, cuando mezcla las propiedades de un xenoinjerto de origen porcino con melatonina.



## **8. CONCLUSIONES**



1. El xenoinjerto de origen porcino MP3® puede ser considerado como un material, biodegradable, biocompatible y osteoconductor para la regeneración de defectos óseos. Este sufre un proceso de reabsorción progresiva durante los 60 días, llevada a cabo por mecanismos celulares de fagocitosis sin que se originen productos intermedios.
2. El xenoinjerto de origen bovino Endobon® puede ser considerado como un material, biocompatible, osteoconductor y no reabsorbible.
3. El hueso autólogo se comporta como un un material osteogénico, osteoconductor, reabsorbible y debido a sus propiedades osteogénicas sigue considerándose el “gold estándar” de la regeneración.
4. La hormona melatonina actúa como un agente biomimético, reduciendo la inflamación y favoreciendo la regeneración en los primeros periodos de estudio. Este implante puede ser considerado como promotor y estimulador de la formación ósea.



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



**Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A.** Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials* 2002; 2: 3023-31.

**Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ.** Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial related diseases. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 133-155.

**Acuña-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A, Khaldy H.** Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 549-557.

**Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ.** Melatonina, mitochondria and cellular bionergetics. *J Pineal Res* 2001; 30: 65-74.

**Aghabeigi B, Cintra N, Meghji S, Reher P, Evans AV, Hopper C.** Measurement of nitric oxide in temporomandibular joint saline aspirates. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 401-403.

**Adriaens PA.** Preservation of bone sites. Lang NP, Karring T, Lindhe J(eds). *Proceedings of the 3° European workshop on periodontology. Implant dentistry* Berlin: Quintessence, 1999: p. 266-280.

**Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC, Lauber JK.** “N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens”. J Ocul Pharmacol 1985; 1: 149-160.

**Akahane M, Ohgushi H, Kuriyama S, Akahane T, Takakura Y.** Hydroxyapatite ceramics as a carrier of gene-transduced bone marrow cells. J Orthop Sci 2002; 7: 677-82.

**Alexander A.** Técnica quirúrgica en animales. 3<sup>a</sup> Ed. México: Interamericana; 1974; p. 23-29.

**Andrade JC, Camilli JA, Kawachi EY, Bertran CA.** Behavior of dense and porous hydroxyapatite implants and tissue response in rat femoral defects. J Biomed Mater Res 2002; 62: 30-6.

**Andrew H, Crenshaw, JR.** Técnicas y vías de abordaje quirúrgicas. En: Ferry Canales S, editor. Campbell Cirugía Ortopédica. Tomo I. Madrid: Harcourt Brace SA, 1998; 43-47.

**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.

**Anselme K, Noel B, Flautre B, Blary MC, Delecourt C, Descamps M, Hardouin P.** Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration Bone 1999; 25(2 Suppl): 51-54.

**Arcuri C, Cecchetti F, Germano F, Motta A, Santacroce C.** Clinical and histological study of a xenogenic bone substitute used as a filler in postextractive alveolus. *Minerva Stomatol* 2005; 54: 351-62.

**Arm DM, Tencer AF, Bain SD, Celino D.** Effect of controlled of platelet derived growth factor from a porous hydroxyapatite implant on bone ingrowth. *Biomaterials* 1996; 17: 703-09.

**Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA-** Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop* 1996; 329: 300-309.

**Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H.** Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21(4): 395-405.

**Artzi Z, Dayan D, Alpern Y, Nemcovsky CE.** Vertical ridge augmentation using xenogenic material supported by a configured titanium mesh: clinicohistopathologic and histochemical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(3): 440-6.

**Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H.** Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19 (3): 357-68.

**Bai XC, Lu D, Liu AL, et al.** Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NK-KappaB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem* 2005; 280: 17497-17506.

**Bancks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ.** Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurement and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77(6): 956-964.

**Bareille R, Lafage-Proust MH, Faucheux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amedee J.** Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials* 2000; 21: 1345-52.

**Barnes G, Kostenuik P, Gerstenfeld L, Einhorn TA.** Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Min Res* 1999; 14(11): 1805-1815.

**Barone A, Covani U.** Maxillary alveolar Ridge Reconstruction with nonvascularized autógenous Block bone: clinical results. J oral Maxillofac Surg 2007; 65: 2039-2046.

**Barone A, Crespi R, Nicoli N, Fini M, Giardino R, Covani U.** Maxillary sinus augmentation: histologic and histomorphometric análisis. Int J Oral Maxillofac Implants 2005; 20: 519-525.

**Barone A, Santini S, Sbordone L, Crespi R, Covani U.** A clinical study of the outcomes and complications associated with maxillary sinus augmentation. Int J Oral Maxillofac Implants 2006; 21(1): 81-5.

**Barone R.** Anatomie comparée des mammifères domestiques. (2<sup>a</sup> Edición) París: Vigot; 1980; p.28-33.

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

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

**Bell R, Beirne OR.** Effect of hydroxyapatite, tricalcium phosphate, and collagen on the healing of defects in the rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 1988; 46: 589-94.

**Benitez-King G, Rios A, Martinez A, et al.** In vitro inhibition of CA<sup>2+</sup>/calmodulin- dependent Kinasa II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290: 191-196.

**Bianchi A.** Prótesis Implantosoportada: Bases biológicas, Biomecánica, Aplicaciones clínicas. 1<sup>a</sup> Ed. Caracas-Venezuela: Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica, C.A. 2001; p. 19-155.

**Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT.** Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2):113-32.

**Bolufer P.** Factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Oncología* 1998; 11(1): 1-7.

**Borie DC, Cramer DV, Phan-Thanh L, Vaillant JC, Bequet JL, Makowka L, Hannoun L.** Microbiological hazards related to xenotransplantation of porcine organs into man. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19(5): 355-65.

**Bostrom MPG, Yang X, Koutras I.** Biologics in bone healing. *Curr OP Orthop* 2000; 11: 403-412.

**Boyne PJ.** Preprosthetic surgery for the older patient. *J Am Dent Assoc* 1987; 17.

**Boyne PJ.** Maxillofacial surgery. En: Habal MB, Reddi AH, editor. *Bone grafts and bone substitutes.* Penssylvania: Saunders Co, 1993; p. 291-298.

**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.

**Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD.** The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 2003; 48: 93-100.

**Briem D, Linhart W, Lehmann W, Meenen NM, Rueger JM.** Long-term outcomes after using porous hydroxyapatite ceramics (Endobon®) for surgical management of fractures of the head of the tibia. *Unfallchirurg* 2002; 105(2): 128-133.

**Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S.** The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 985-96.

**Bucholz RW.** Development and clinical use of coral-derived hydroxyapatite bone graft substitutes. En: Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG, editor. *Bone grafts, derivatives and substitutes*. 1<sup>a</sup> ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994; p. 260-270.

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

**Calvo-Guirado JL, López L, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A, Barone A, Alcaraz M, Chiva F.** Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surface stimulates osteointegration in dental implants. *J Pineal Res* 2009 (Epub ahead of print)

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

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

**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.

**Cardaropoli D, Cardaropoli G.** Preservation of the postextraction alveolar ridge: A clinical and histologic study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008; 28: 469-477.

**Cardinali DP, Ladizesky Mg, Boggio V, et al.** Melatonin effects on bone experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003; 34: 81-87.

**Carmagnola D, Berglund T, Lindhe J.** The effect of fibrin glue on the integration of Bio-Oss with bone Tissue. An experimental study in Labrador dogs. *J Clin Periodont* 2002; 29: 377-383.

**Carrillo y Vico A Reiter RJ, Lardone PJ, Fernández -Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D.** The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drug* 2006; 7(5): 423-31.

**Cerroni L, Filocamo R, Fabbri M, Piconi C, Caropreso S, Condo SG.** Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. *Biomol Eng* 2002; 19: 119-24.

**Chaiyarit P, Ma N, Hiraku Y, et al.** Nitrate and oxidative DNA damage oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96(9): 553-559.

**Chapman MW, Bucholz R, Cornell C.** Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79(4): 495-502.

**Cheng JC, Guo X, Law LP, Lee KM, Chow DH, Rosier R.** How does recombinant human bone morphogenetic protein-4 enhance posterior spinal fusion? *Spine* 2002; 27: 467-74.

**Chouteau J, Bignon A, Chavassieux P, Chevalier J, Melin M, Fantozzi G, et al.** Cellular culture of osteoblasts and fibroblasts on porous calcium- phosphate bone substitutes. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2003; 89: 44-52.

**Choi BH, Lee SH, Huh JY, Han SG.** Use of the sandwich osteotomy plus an interpositional allograft for vertical augmentation of the alveolar ridge. *J Craniomaxillofac Surg* 2004; 32(1): 51-4.

**Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geitst ST, Steinberg TH.** Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993; 91: 1888-96.

**Collins TA.** Use of collagen tubes containing particulate hydroxyapatite for augmentation of the edentulous atrophic maxilla. *J Oral Maxillofac Surg* 1989; 47: 137-141.

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

**Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M.** Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as orthopaedic biologic attachment system. *Clin Orthop* 1988; 230: 302-312.

**Cook SD; Thomas KA, Kay FJ.** Experimental coating defects in hydroxyapatite-coated implants. *Clin Orthop* 1991; 265: 280-290.

**Cordaro L, Bosshardt DD, Palatella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M.** Maxillary sinus grafting with Bio-Oss® or Straumann® Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Impl Res* 2008; 19: 796-803.

**Cornellini R, Cangini F, Martuscelli G, Wennstrom J.** Deproteinized bovine bone and biodegradable barrier membranes to support healing following immediate placement of transmucosal implants: a short-term controlled clinical trial. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004; 24(6): 555-63.

**Cornell CN, Lane JM.** Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop* 1998 ; (355 Suppl): 267-73.

**Cricchio G, Lundgren S.** Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003; 5: 161-9.

**Cutando A, Arana C, Gomez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D.** Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol* 2007; 78(3): 576-583.

**Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL.** Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77(9): 1533-1538.

**Cutando A, Gómez Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ.** Melatonin: potential functions in the oral cavity. *J Periodontol* 2007; 78: 1094-1102.

**Cutando A, Gomez G, Arana C, et al.** Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal. *J Pineal Res* 2007; 42: 419-420.

**Cutando A, Gomez G, Arana C, Muñoz F, López-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ.** Melatonina stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 2008; 45: 174-179.

**Cutter CS, Mehrara BJ.** Bone grafts and substitutes. Journal of long term effects of Medical Implants 2006; 16: 607-618.

**Cuzzocrea S, Reiter RJ.** Pharmacological Actions of Melatonin in acute and chronic inflammation. Curr Topics Med Chem 2002; 2: 153-165.

**Daculsi G, le Geros RZ, Nery EB, Lynch KL, Kereber B.** Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. J Biomed Mat Res 1989; 23: 883-894.

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

**Denissen H, Van Beek E, Van Den Bos T, Deblieck J, Klein C, Van Den Hoof A.** Degradable bisphosphonate alkaline phosphatase complexed hydroxyapatite implants in vitro. J Bone Miner Res 1997; 12: 290-297.

**Denissen H, Martinetti R, van Lingen A, van den Hooff A.** Normal osteoconduction and repair in and around submerged highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. J Periodontol 2000; 71: 272-78.

**Doncel A, Roig JL, Majo J, Redo J.** Banco de huesos. Rev Ortop Traum 1989; 33: 151-54.

**Dubocovich ML, Markowska M.** Functional MT1 and MT2 melatonina receptors in mammals. Endocrine 2005; 27: 101-110.

**Eggl PS, Müller W, Schenk RK.** Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone in growth and implant substitution. Clin Orthop 1988; 232: 127-38.

**Einhorn TA, Simon G.** The osteogenic response to distant skeletal injury. J Bone Jt Surg 1990; 72: 1374-1378.

**Ersanli S, Olgac V, Leblebicioglu B.** Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. J Periodontol 2004; 75(5): 750-56.

**Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Radriguez MI, Acuña-Castroviejo D.** Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. J Pineal Res 2006; 40: 71-78.

**Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA.** Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 5753-5758.

**Faucheux C, Bareille R, Rouais F, Amédée J, Lebendörfer A, Dard M.** Biocompatibility testing of a bovine hydroxyapatite ceramic material with the use of osteo-progenitor cells isolated from human bone marrow. J Mater Sci Mater Med 1994; 5: 635-39.

**Fernández JM, Leon C, García F, Marco F, Moriega M.** Nuestra metódica en la organización y control del banco de huesos del hospital de S. Carlos. Rev Ortop Traum 1989; 33: 155-60.

**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.

**Fernández-Tresguerres I, Clemente C, Donado M, Gómez – Pellico L, Alobera MA.** Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in anosteoporotic rabbit model. Clin Oral Implant Res 2002; 13(6): 631-6.

**Finkelman RD, Hardesty R, Rakijan et al.** Increased IGF-II and TGF- $\beta$  in calvarian bone: Graft survival implications. J Dent Res 1992; 71: 116-120.

**Fischer EM, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD.** Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxiapatite particles. Tissue Eng. 2003; 9(6): 1179-88.

**Frayssinet P, Mathon D, Azimus E, Autefave A.** Céramiques phosphocalciques: influence de leurs caractéristiques sur leur osteoconductivité. En: Actualités en biomatériaus. Vol 4. Paris: éditions Romillat, 1998; p. 121-25.

**Fuentes Broto L.** Melatonina com protector frente a los radicales libres en la hepatotoxicidad por ácidos biliares (Tesis Doctoral), Universidad de Zaragoza, 2008.

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

**Galindo P, Ávila G, Fernández –Barbero JE, Mesa F, O'Valle-Ravassa F, Wang HL.** Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial. Clin Oral Implant Res 2008; 19: 755-759.

**García FG, García JM, Pérez-Caballer AJ.** Fundamentos de los procesos de reparación tisular factores de crecimiento. Rev Ortop Traumatol 2005; 49(1): 5-16.

**Garrett IR, Boyce BF, Oreo RO, et al.** Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. J Clin Invest 1990; 85: 632-639.

**Gatti AM, Zaffe D, Poli GP.** Behavior of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. Biomaterials 1990; 11: 513-17.

**Gauthier O, Bouploer JM, Agudado E, Pilet P, Daculsi G.** Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. Biomaterials 1998; 19: 133-39.

**Gierse H, Donath K.** Reactions and complications after the implantation of Endobon including morphological examination of explants. Arch OrthopTrauma Surg 1999; 119(5-6): 349-355.

**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.

**Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL.** Melatonin expression in periodontal disease. *J Periodontal Res* 2007; 42: 536-540.

**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.

**Gotcher JE, Gerard DA.** Fracture repair in the facial skeleton. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 1998; 10(4): 519-530.

**Gouin F, Delécrin J, Passuti N, Touchais S, Poirier P, Binvel JV.** Comblement osseux par céramique phosphocalcique biphasée macroporeuse. *Rev Chir Orthop* 1995; 81: 59-65.

**Grace MS, Cahill GM, Besharse JC.** Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus leavis* tissue distribution. *Brain Res* 1991; 559: 56-63.

**Grimes JS, Bocklage TJ, Pitcher JD.** Collagen and biphasic calcium phosphate bone graft in large osseous defects. *Orthopedics* 2006; 29(2): 145-48.

**Guerrero JM, Reiter RJ.** Melatonin - Immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 167-179.

**Guicheux J, Heymann D, Trecant M, Gautier H, Faivre A, Daculsi G.** Association of human growth hormone and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro biocompatibility and bioactivity. *J Biomed Mater Res* 1997; 36: 258-64.

**Gumaer KI, Sherer AD, Slighter RG, Rothstein SS, Drobeck HP.** Tissue reponse in dogs to dense HA implantation in the femur. *J Oral Maxillofac Surg* 1986; 44: 618-27.

**Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA.** Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999; 274(33): 22907-10.

**Halliwell B.** Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 1994; 344: 721-724.

**Hallman M, Lundgren S, Sennerby L.** Histologic analysis of clinical biopsies taken after 6 months and 3- years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001; 2: 87-96.

**Hallman M, Nordin T.** Sinus floor augmentation with bovine hydroxyapatite mixed with fibrin glue and later placement of nonsubmerged implants: a retrospective study in 50 patients. *J Oral Maxillofac Implant* 2001; 19(2): 222-27.

**Hallman M, Sennerby L, Lundgren S.** A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80mixture. *Int J. Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 635-643.

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

**Hanna R, Trejo PM, Weltman RL.** Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *J Periodontol* 2004; 75(12): 1668-77.

**Hardeland R.** Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27: 119-130.

**Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B.** Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* 2003; 20: 921-962.

**Hardeland R, Pandi-Perumal SR.** Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab* 2005; 2: 22.

**Hardeland R, Poeggeler B.** Actions of melatonin, it's structural and functional analogs in the Central Nervous System and the significance of metabolism. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2007; 7: 289-303.

**Hardeland R.** Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(13): 2001-2018.

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

**Hatano N, Shimizu Y, Ooya K.** A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15(3): 339-45.

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

**Hising P, Bolin A, Branting C.** Reconstruction of severely resorbed alveolar ridge crests with dental implants using a bovine bone mineral for augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(1): 90-7.

**Hockers T, Abensur D, Valentini P, Legrand R, Hammerle CH.** The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10(6): 487-98.

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

**Holmes R, Mooney V, Bucholz R, Tencer A.** A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. *Clin Orthop* 1984; 188: 252-62.

**Houser BE, Mellonig JT, Brunsvold MA, Cochran DL, Meffert RM, Alder ME.** Clinical evaluation of anorganic bovine bone xenograft with a bioresorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001; 21(2): 161-69.

**Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A.** Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992: 945-953.

**Hurzeler MB, Quiñones CR, kirsh A.** Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine –derived bone matrix. Clin Oral Implants Res 1997; 8: 476-486.

**Hsu FY, Chueh SC, Wang YJ.** Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. Biomaterials 1999; 20(20): 1931-36.

**Hsu FY, Tsai SW, Lan CW, Wang YJ.** An in vivo study of a bone grafting material consisting of hydroxyapatite and reconstituted collagen. J Mater Sci Mater Med 2005; 16(4): 341-45.

**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.

**Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, AMeminaya A, Sumi Y.** Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hidroxyindole -O-Methyltransferase activities in rat ovary. Moll Cell Endocrinol 1997; 136: 7-13.

**Jaiswai N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP.** Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 1997; 64: 295-312.

**Jarcho M.** Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop 1981; 157: 259-78.

**Jockers R, Maurice P, Boutin J.A. et al.** Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: What's new?. British Journal of Pharmacology 2008; 154: 1182-1195.

**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.

**Karsenty G.** The genetic transformation of bone biology. Genes and Development 1999; 13: 3037-3051.

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

**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.

**Khodadadyan –Klosterman C, Liebig T, Melcher I, Raschke M, Haas NP.** Osseous integration of hydroxiapatite grafts in metaphyseal bone defects of the proximal tibia (CT- study). Acta Chir Orthop Traumatol Cech 2002; 69(1): 16-21.

**Kin SH, Shin JW, Park SA.** Chemical, structural properties and osteoconductive effectiveness of bone block derived from porcine cancellous bone. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 2004; 68 B: 69-74.

**Klawitter JJ, Hulbert SF.** Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopaedic applications. J Biomed Mater Res 1971; 2: 161- 229.

**Klawitter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW, Pruitt JR.** An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. J Biomed Mater Res 1976; 10: 311-23.

**Klein CPAT, Driessen AA, de Groot K, van den Hooff A.** Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. J Biomed Mater Res 1983; 17: 769- 84.

**Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson J.** Osseous response to implanted natural bonemiral and synthetic hydroxiapatite ceramics in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 80: 241-249.

**Koempel JA, Patt BS, O'Grady K, Wozney J, Toriumi DM.** The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxyapatite implants with bone. *J Biomed Mater Res* 1998; 41: 359-63.

**Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al.** Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 328-37.

**Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, et al.** Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58(6): 23-52.

**Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX.** Melatonin : an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15(1-2): 43-50.

**Korkusuz F, Karamete K, Irfanoglu B, Yetkin H, Hastings GW, Akkas N.** Do porous calcium hydroxyapatite ceramics cause porosis in bone? A bone densitometry and biomechanical study on cortical bones of rabbits. *Biomaterials* 1995; 16: 537-43.

**Koyama H, Nakade O, Takada Y, et al.** Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1219-1229.

**Kühne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M.** Bone formation in Coralline Hidroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1994; 65: 246-52.

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

**Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mondelo N, Mastaglia S, Somoza J, Cardinali DP.** Melatonin effects on bone metabolism in rats treated with methylprednisolone. *J Pineal Res* 2006; 40(4): 297-304.

**Lanyon L.** Osteocyte, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int* 1993; 53: 102-7.

**Lee NK, Choi YG, Baik JY, et al.** A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005; 106: 852-859.

**Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, et al.** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*; 1958; 80: 2587-2587.

**Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP.** Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 1980; 210: 1267-1269.

**Lind M, Overgaard S, Soballe K, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Bunger C.** Transforming growth factor beta 1 enhances bone healing to unloaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Orthop Res* 1996; 14: 343-50.

**Lind M, Overgaard S, Song Y, Goodman SB, Bunger C, Soballe K.** Osteogenic protein 1 device stimulates bone healing to hydroxyapatite-coated and titanium implants. *J Arthropl* 2000; 15: 339-46.

**Ma X, Idle JR, Krausz KW, et al.** Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 489-494.

**Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Castroviejo D.** Calreticulin- melatonin. An unexpected relationship. Eur J Biochem 2003; 270: 832-840.

**Malinin TI.** Acquisition and banking of bone allografts. En: Habal MD, Reddi AH, editor. Bone grafts and bone substitutes. Pennsylvania: Saunders Co, 1993; p. 206-26.

**Mangano C, Scarano A, Iezzi G, Orsini G, Perrotti V, Mangano F, Montini S, Piccirilli M, Piatelli A.** Maxillary sinus augmentation using an engineered porous hydroxyapatite: a clinical, histological, and transmission electron microscopy study in man. J Oral Implantol 2006; 32(3): 122-31.

**Manolagas SC.** Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications of the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev 2000; 21: 115-37.

**Marie PJ, Debiais F, Cohen-solal M, De Vernejoul MC.** New Factors controlling bone remodeling. Joint Bone Spine 2000; 67: 150-156.

**Marie PJ.** Fibroblast growth factor signalling controlling osteoblast differentiation. Gene 2003; 316: 23-32.

**Martin RB.** Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone* 2000; 26(1): 1-6.

**Marx RE.** Platelet rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. En: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering. Applications i maxilofacial surgery and periodontics.* Illinois: Quintessence, 1999; 71-82.

**Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ.** Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1 acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; 165(1-2): 139-149.

**McAllister BS, Haghghat K.** Bone augmentation techniques. *J Periodontol* 2007; 78: 377-396.

**McCarthy TL, Ji C, Centrella M.** Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(4): 409-22.

**McCord CP, Allen FB.** Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; 23: 207-24.

**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

**Meseguer L, Alcaraz M, Vicente Ortega V, Clavel-Sáinz M, Galian A.** Respuesta ósea al implante del compuesto  $\beta$ -fosfato tricálcico-colágeno. Estudio "in vivo" en conejos. Rev Esp Cir Osteoar 1994; 29: 125-32.

**Mhatre MC, van Jaarsveld AS, Reiter RJ.** Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation. Biochem Biophys Res Commun 1988; 153: 1186-1192.

**Minczykowski A, Woszczyk M, Szcapanik A, Lewandowski L, Wysocki H.** Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. Clin Oral Invest 2001; 5: 6-10.

**Minkin C, Marinho VC.** Role of the osteoclast at the bone implant interface. Adv Dent Res 1999; 13: 49-56

**Misch CE.** Divisions of Available Bone. En: Contemporary Implant Dentistry 1ª Ed. España: Elsevier-Mosby 2006; p.89-108.

**Mistry P, Deacon K, Mistry S, Blank J, Patel R.** NK-Kappa $\beta$  promotes survival during mitotic cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2004; 279: 1482-1490.

**Naguib M, Gottumukkala V, Goldstein P.** Melatonin and anesthesia: A clinical Perspective. *J Pineal Res* 2007; 42(1): 12-21.

**Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, KaKu T.** Melatonina stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res* 1999; 27: 106-110.

**Nannmark U, Sennerby L.** The bone tissue responses to prehydrated and collagenated cortico-cancellous porcine bone grafts: A study in rabbit maxillary defects. *Clin Implant Dent Related Res* 2008; 10: 264-270.

**Nather A.** Bone grafts and bone substitutes. Basic Science and Clinical Applications. New Jersey: World Scientific. (Eds) 2005

**Nkenke E, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J.** Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: A prospective Study. *Clin Oral Implant Res* 2002; 13: 514-20.

**Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ.** Efficacy of bovine mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14(6): 775-83.

**Noshi T, Yoshikawa T, Ikeuchi M, Dohi Y, Ohgushi H, Horiuchi K, Sugimura M, Ichijima K, Yonemasu K.** Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 621-30.

**Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K, Senpuku N, Tamai S.** Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 885-95.

**Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y.** Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003; 469: 145-152.

**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.

**Oonishi H, Yamamoto M, Ishimaru H, Tsuji E, Kusthitani S, Aono M.** The effect of hydroxyapatite coating on bone growth into porous titanium alloy implants. *J Bone Jt Surg Br* 1989; 71 (2): 213-16.

**Orsini G, Scarano A, Piatelli M, Piccirilli M, Caputi S, Piattelli A.**

Histologic and ultrastructural analysis of the regenerated bone in maxillary sinus augmentation using a porcine bone derived biomaterial. *J Periodontol* 2006; 77: 1984-1990.

**Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielska-**

**Kopacz N.** The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormone secretion in rats under physiological conditions. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23(5-6): 417-25.

**Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowka E, Marek**

**B, Gorski D, Kajdaniuk K.** The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endocr Regul* 2003; 37: 211-224.

**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.

**Parrfit AM.** Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship

to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002; 30(1): 5-7.

**Petite H, Kacem K, Triffit JT.** Adhesion, growth and differentiation of human bone marrow stromal cells on non-porous calcium carbonate and plastic substrata: effects of dexamethasone and 1, 25 dihydroxyvitamin D3. *J Mater Sci Mater Med* 1996; 7: 665-671.

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

**Philippart P, Daubie V, Pochet R.** Sinus grafting using recombinant human tissue factor, platelet-rich plasma gel, autologous bone, and anorganic bovine bone mineral xenograft: histologic analysis and case reports. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2): 274-81

**Piatelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piatelli A.** Bone reactions to anorganic bovine bone used I sinus augmentation procedures: a histologic long- term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 835-840.

**Pietruska MD.** A comparative study on the use of Bio-Oss and enamel matrix derivate (Emdogain) in the treatment of periodontal bone defects. *Eur J Oral Sci* 2001; 109(3): 178-81.

**Pollick S, Shors EC, Holmes RE, Kraut RA.** Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53: 915-23.

**Popesko P.** Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos. Barcelona: Salvat 1981; p. 54-59.

**Prolo DJ, Rodrigo JJ.** Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop* 1985; 200: 322-42.

**Pugazhenthii P, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I.** Melatonin accelerates the process of wound repair in full –thickness incisional wounds. *J Pineal Res* 2008, (epub-ahead of print).

**Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA.** Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J. Pineal Res* 2006; 40: 332-342.

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

**Reiter RJ.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12: 151-180.

**Reiter RJ.** Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *New Physiol Sci* 2000; 15: 246-250.

**Reiter RJ.** Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res* 2004; 37(3): 213-4.

**Reiter RJ.** Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29: 391-398.

**Reiter RJ, Tan DX.** What constitutes physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res* 2003; 34: 79-80.

**Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, López-Burillo S, Sáinz RM, Mayo JC.** Melatonin detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 539-548.

**Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC.** Medical implications of melatonin: receptor mediated and receptor- independent actions. *Adv Med Sci* 2007; 52: 11-28.

**Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sáinz RM, León J, Czarnocki Z.** Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1129-1146.

**Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z.**

Melatonin and its metabolites: new finding regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 1-9.

**Riancho JA, Gutierrez GE.** Factores reguladores de la resorción

ósea. *Rev Metabol Oseo Min* 2003; 1(2): 51-66.

**Rodman GD.** Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev*

1996; 17: 308-332.

**Rodríguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wetan H.**

Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61(2):157-63.

**Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin**

**V et al.** Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.

**Rodriguez Baena R, Zaffe D, Brusotti C, Marchetti C, Botticelli**

**A, Rizzo S.** Osteoconductive materials: animal experiments and instrumental analysis II. *Minerva Stomatol.* 1997; 46(12): 635-47.

**Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF.** The biology of platelet-

derived growth factor. *Cell* 1986; 46(29): 155-69.

**Roth JA, kim BG, Lin WL, Cho MI.** Melatonin promotes osteoblasts differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274: 22041-7.

**Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE.** Adhesion to vitronectin and collagen I promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotechnol* 2004; 1: 24-34.

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

**Santos FA, Pochaspski MT, Martins MC, Zenóbio EG, Spolidoro LC, Marcantonio E.** Comparison of biomaterial implants in the dental socket: Histological analysis in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008 sep 9 (ahead of print).

**Sanz M, Bascones A, Kessler A, García Núñez J, Newman MG, Robertson MA, et al.** Implantación de partículas de hidroxiapatita-colágeno. Estudio clínico-histológico en humanos. *Avances* 1989; 1: 1-17.

**Sasso RC, Lehuac JC, Shaffrey C:** Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: A prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech* 2005; 18: 77-89.

**Satomura K, Toblume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kdoh K, Maeda E, Nagayama M.** Melatonina at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vitro. *J Pineal Res* 2007; 42: 231-239.

**Scabbia A, Trombelli L.** A comparative study on the use of a HA/collagen/Chondroitin sulphate biomaterial (Biostite) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss) in the treatment of deep intra-osseous defects. *J Clin Periodontol* 2004; 31(5): 348-55.

**Schwartz Z, Somers A, Melloning JT.** Ability of commercial demineralised freeze-dried bone allograft to induce new formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol* 1998; 69: 470-47.

**Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J.** Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide). A case series. *J Clin Periodontol* 2006; 33(7): 491-9.

**Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R.** Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabilitation* 1991; 18: 439-52.

**Schlegel KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J.** Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18(1): 53-58.

**Schlegel AK, Donath K.** Bio Oss a resorbable bone substitute?. Long-term effects. *Med Implants* 1998; 8: 201-209.

**Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J.** *J Clin Periodontol* 2006; 33(7): 491-99.

**Sculean A, Berakdar M, Chiantella GC, Donos N, Arweiler NB, Brex M.** Healing of intrabony defects following treatment with a bovine-derived xenograft and collagen membrane. A controlled clinical study. *J Clin Periodontol* 2003; 30(1): 73-80.

**Sculean A, Stavropoulos A, Windisch P, Keglevich T, Karring T, Gera I.** Healing of human intrabony defects following regenerative periodontal therapy with a bovine-derived xenograft and guided tissue regeneration. *Clin Oral Investig* 2004; 8(2): 70-74.

**Sculean A, Windisch P, Chiantella GC.** Human histologic evaluation of an intrabony defect treated with enamel matrix derivative, xenograft, and GTR. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004; 24(4): 326-33.

**Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Chiantella GC, Gera I, Donos N.** Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with a an enamel matrix protein derivate combined with a bovine-derived xenograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23(1): 47-55.

**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.

**Shimazaki K, Mooney V.** Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *J Orthop Res* 1985; 3: 301-10.

**Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K.** Calcium hydroxiapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J Bone Joint Surg Br* 1992; 74 (4): 600-605.

**Smiler DG, Jonson PW, Lozada JL.** Injertos para elevación sinusal e implantes endoóseos. *Clin Odontol North Am* 1992; 1: 155-92.

**Sogal A, Tofe AJ.** Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol* 1999; 70(9): 1053-63.

**Soybir G, Topuzlu C, Odabas O, et al.** The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today* 2003; 33(12): 896-901.

**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.

**Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann PM.** Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; 30: 243-247.

**Sutherland D, Bostrom M.** Grafts and bone grafts substitutes. In: Liebermann , Friedlaender GE, eds. Bone regeneration and repair. Biology and Clinical Application 2005: 133-156.

**Suzuki N, Somei M, Kitamura K, Reiter RJ, Hattori A.** Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: implications for the treatment of bone diseases. *J Pineal Res* 2008; 44(3): 326-34.

**Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A.** Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J Pineal Res* 2008; 45(3): 229-34.

**Szmuszkovicz J, Anthony W, Heinzelman R.** Notes Synthesis of N-Acetyl-5- methoxytryptamine. *J Org Chem* 1960; 25: 857-859.

**Takahashi T, Sasaki M, Itoh H, Yamadera W, Ozone M, Obuchi K, Hayashida K, Matsunaga N, Sano H.** Melatonin alleviates jet lag symptoms caused by a 11 hour eastward flight. *Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 56: 301-302.

**Takahashi T, Tominaga T, Watabe N, Yokobori AT Jr, Sasada H.** Use of porous hydroxyapatite graft containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cervical fusion in a caprine model. *J Neurosurg* 1999; 90 (4 suppl): 224-30.

**Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y.** Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005; 26(17): 3587-96.

**Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M.** Effect of FGF-2 and melatonina on implant bone healing: a histomorphometric study. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 2949-2952.

**Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H.** Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 110-17.

**Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ.** High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 1999; 65: 2523-2529.

**Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ.** One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. *J Pineal Res* 2007; 42: 28-42.

**Tan DX, Reiter RJ, Manchester CL, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM et al.** Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2: 181-97.

**Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T.** A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implant Res* 2004; 15(3): 315-24.

**Tawil G, Mawla M.** Sinus floor elevation using a bovine bone mineral (Bio-Oss) with or without the concomitant use of a bilayered collagen barrier (Bio-Gide): a clinical report of immediate and delayed implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(5): 713-21.

**Teitelbaum SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(1): 1504-1508.

**Terheyden H, Jepsen S, Moller B, Tucker MM, Rueger DC.** Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10(6): 510-21.

**Thomas KA.** Hidroxyapatite coatings. *Orthopedics* 1994; 17: 267-78.

**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.

**Uchida A, Nade SML, McCartney RE, Ching W.** The use of ceramics for bone replacement: a comparative study of three different porous ceramics. *J Bone Joint Surg Br* 1984; 66 (2): 269-75.

**Uchida A, Nade SML, McCartney RE, Ching W.** Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits. *J Orthop Res* 1985; 3: 65-77.

**Uchida A, Shinto Y, Araki N, Ono K.** Slow release of anticancer drugs from porous hydroxyapatite ceramic. *J Orthop Res* 1992; 10: 440-45.

**Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Lejima D, et al.** Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials* 2003; 24: 2277-86.

**Urist MR, Lietze A, Dawson E.**  $\beta$ -tri calcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1984; 187: 277-80.

**Urist MR, Nilsson O, Rasmussen J, Hirota W, Lovell T, Schmalzreid T.** Bone regeneration under influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop* 1987; 214: 295-304.

**Van Blitterswijk CA, Bakker D.** Reactions of cells at implant surfaces. *Biomaterials* 1991; 12:187-93.

**Vance GS, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Johnston H, Scheetz JP.** Comparison of an allograft in an experimental putty carrier and a bovine-derived xenograft used in ridge preservation: a clinical and histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19(4): 491-97.

**Van Steenberghe D, Callens A, Geers L, Jacobs R.** The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clin Oral Implant Res* 2000; 11(3): 210-16

**Vasilic N, Henderson R, Jorgenson T, Sutherland E, Carson R.** The use of bovine porous bone mineral in combination with collagen membrane or autologous fibrinogen/fibronectin system for ridge preservation following tooth extraction. *J Oral Dent Assoc* 2003; 93(4): 33-38.

**Vozza 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.

**Weissenboeck M, Stein E, Undt G, Ewers R, Lauer G, Turhani D.**

Particle size of hydroxyapatite granules calcified from red algae affects the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs* 2006; 182(2): 79-88.

**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.

**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.

**Wojtowicz A, Chaberek S, Kryst L, Urbanowska E, Ciechowicz**

**K, Ostrowski K.** Fourier and fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32(1): 84-6.

**Worth A, Mucalo M, Home G, Bruce W, Burbidge H.** The

evaluation of processed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16(3): 379-86.

**Wu TJ, Huang HH, Lan CW, Lin CH, Hsu FY, Wang YJ.** Studies

on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. *Biomaterials* 2004; 25(4):651-58.

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

**Yamamura K, Iwata H, Yotsuyanagi T.** Sintesis of antibiotic-loaded hidroxyapatite beds and in vitro release testing. *J Biomed Mat Res* 1992; 26: 1053-64.

**Yasuda H, Shima N, Nakagawa, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomayasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 3597-3602.

**Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, Edelhoff D.** Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11(3): 217-29.

**Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D.** Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(1): 23-33.

**Yoshikawa T, Ohgushi H, Uemura T, Nakajima H, Ichijima K, Tamai S, et al.** Human marrow cells-derived cultured bone in porous ceramics. *Biomed Mater Eng* 1998; 8: 311-20.

**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 Periodotol* 1990; 61: 633-642.

**Zambonin G, Grano M, Greco G, Oreffo RO, Triffit JT.** Hydroxyapatite coated with insulinlike growth factor 1 (IGF-1) stimulates human osteoblast activity in vitro. *Acta Orthop Scand* 1999; 70: 217-20.

**Zambonin G, Camerino C, Greco G, Patella V, Moretti B, Grano M.** Hydroxyapatite coated with hepatocyte growth factor (HGF) stimulates human osteoblasts in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82(2): 457-60.

**Zyman Z, Ivanov I, Glushko V, Dedukh N, Malyshkina S.** Inorganic phase composition of remineralisation in porous Ca P ceramics. *Biomaterials* 1998; 19: 1269-73.

