



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Regeneración Ósea de la Sínfisis
Mandibular Usando Hidroxiapatita con
o sin Sinvastatina: Efectos en Ratas Sanas,
Diabéticas y Osteoporóticas**

D^a Lucía Plazas Buendía

2020

AGRADECIMIENTOS.

A Fabio, porque sin él nada de esto habría sido posible.

A Carlos, porque conocerlo ha sido uno de mis mejores regalos.

A mis padres, José y Yolanda, y mi hermana Yoli, por apoyarme en todo lo que me propongo y recordarme que tengo que creer en mí, porque ellos ya lo hacen.

A Miguel Ángel, por estar siempre, por quererme.

A mis amigos, y en especial:

A Irene, por enseñarme que la amistad va más allá del tiempo y la distancia.

A Lorena, Silvia y Marta, por acompañarme en todas mis etapas.

A Ana y María, porque personas diferentes pueden llegar a unirse.

A Nuria, Inma, Mayka y Yanira, porque, aunque hemos tomado caminos diferentes, siempre encontramos el momento para volver a juntarnos.

Y a todos aquellos que han sumado para que haya podido llegar hasta aquí.

Gracias.

*“Hoy se acaba un mundo
pero comienza uno nuevo.
No hay que tener miedo a los cambios.”*

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ABC: avidina-biotina-peroxidasa

ARN: ácido ribonucleico

bFGFs: factores básicos de crecimiento de fibroblastos

BMD: densidad mineral ósea

BMP: proteínas morfogenéticas óseas

BMSCs: células madre de médula ósea

BMU: unidades óseas multicelulares

BOS: injerto de hueso bovino inorgánico

C: carbono

Ca: calcio

Ca²⁺: catión calcio

CH: chitosan

CMH: cantidad mineral de hueso

CO₂: dióxido de carbono

Cols.: colaboradores

COS: esponja de colágeno

DFDBA: aloinjerto de *hueso* desmineralizado liofilizado

DM: diabetes mellitus

DMO: densidad mineral ósea

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGCG: epigalocatequina-3-galata

FDDBA: aloinjerto óseo liofilizado

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

FPP: farnesil pirofosfato

FTC: fosfato tricálcico

g: gramo

g/día: gramo/día

g/mL: gramo/mililitro

GGPP: geranilgeraniol pirofosfato

GH: hormona del crecimiento

GTP: guanosín trifosfato

HA: hidroxiapatita

HACS: hidroxiapatita combinada con sulfato cálcico

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

HE: Hematoxilina-Eosina

HMG-CoA: reductasa 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A

HU: unidades Hounsfield

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL: interleuquina

K⁺: catión potasio

kg: kilogramo

kN: kilonewton

kV: kilovoltio

M-CSF: factor estimulante de las colonias de macrófagos

mA: miliamperio

mg/dL: miligramo/decilitro

mg/kg: miligramo/kilogramo

mg/kg/día: miligramo/kilogramo/día

Micro-CT: microtomografía computarizada

mL: mililitro

mL/g: mililitro/gramo

mm: milímetro

MMP: metaloproteinasa

MO: microscopio óptico

mRNA: ARN mensajero

n: muestra

N: newton

Na⁺: catión sodio

OB: osteoblastos

OC: osteoclastos

OMSCSs: células madre de matriz osteogénica

ONM: osteonecrosis mandibular

OP-1: proteína osteogénica-1

OPG: osteoprotegerina

OVX: ovariectomía u ovariectomizadas

P: fósforo

PBS: tampón fosfato salino

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGE2: prostaglandina E2

PLGA: ácido poliláctico-glicólico, del inglés: *Poly Lactic-co-Glycolic Acid*

PRGF: plasma rico en factores de crecimiento

PRP: plasma rico en plaquetas

PTFEc: politetrafluoroetileno (teflón)

PTH: parathormona

RANK: receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$

RANKL: receptor activador nuclear factor $\kappa\beta$ ligando.

RD: Real Decreto

RGD: tripéptido arginina- glicina-ácido aspártico

ROG: regeneración ósea guiada

ROIs: regiones de interés, del inglés *region of interest*

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RRR: reborde residual restante

RTG: regeneración tisular guiada

S. A. Sociedad Anónima

S. L.: Sociedad Limitada

SEM: microscopio electrónico de barrido

SEM-EDX: Microscopio Electrónico de Barrido-Espectroscopio de Rayos X de Energía dispersa

SPECT: tomografía por emisión simple de fotones

SV: sinvastatina

STZ: estreptozotocina (también llamada estreptozocina)

TAC: tomografía axial computarizada

TB: azul de toluidina

TBS: tris-salino tamponado

TCP: fosfato tricálcico o fosfato de calcio

TGF: factor de crecimiento transformante

TNF: factor de necrosis tumoral

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

°C: grado centígrado

µg: microgramo

RESUMEN.

Objetivo: Comparar la nueva formación de hueso en defectos críticos en ratas sanas, diabéticas y osteoporóticas rellenos únicamente con hidroxiapatita (HA) o con HA combinada con sinvastatina (SV). **Materiales y métodos:** un total de 48 ratas hembras adultas Sprague-Dawley fueron asignadas al azar en tres grupos (n=16 por grupo): Grupo 1 sanas; Grupo 2 diabéticas; y Grupo 3 osteoporóticas. La estreptozotocina se usó para inducir diabetes tipo I en el Grupo 2, mientras que la ovariectomía bilateral se usó para inducir osteoporosis en el Grupo 3. La porción central de la sínfisis mandibular de rata se usó como defecto óseo crítico fisiológico. En cada grupo, ocho defectos se llenaron solo con HA y ocho con HA combinado con SV. Los animales se sacrificaron a las 4 y 8 semanas y las mandíbulas se procesaron para: tomografía microcomputarizada para analizar la unión radiológica y la densidad mineral ósea (DMO); análisis histológico de la unión ósea; y análisis inmunohistoquímico, que incluyó la inmunorreactividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2). **Resultados:** en todos los grupos (sanos, diabéticos y osteoporóticos), los defectos rellenos de HA + SV presentaron una mayor unión ósea radiológica, DMO, unión ósea histológica y más positividad VEGF y BMP-2, en comparación con los defectos óseos tratados únicamente con HA. **Conclusiones:** la aplicación combinada de HA y SV mejora la regeneración ósea en defectos óseos críticos mandibulares en comparación con la aplicación de HA sola en ratas sanas, diabéticas y osteoporóticas. Este estudio podría ayudar a pacientes con osteoporosis o diabetes no controlada tipo I, pero se deben realizar estudios futuros.

SUMMARY.

Objective: To compare new bone formation in critical defects in healthy, diabetic and osteoporotic rats filled with hydroxyapatite (HA) alone and HA combined with simvastatin (SV). **Materials and Methods:** A total of 48 adult female Sprague-Dawley rats were randomized into three groups (n=16 per group): Group 1 healthy; Group 2 diabetics; and Group 3 osteoporotics. Streptozotocin was used to induce type-I diabetes in Group 2, while bilateral ovariectomy was used to induce osteoporosis in Group 3. The central portion of the rat mandibular symphysis was used as a physiological critical bone defect. In each group, eight defects were filled with HA alone, and eight with HA combined with SV. The animals were sacrificed at 4 and 8 weeks and the mandibles were processed for: micro-computed tomography to analyze radiological union and bone mineral density (BMD); histological analysis of the bone union; and immunohistochemical analysis, which included immunoreactivity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). **Results:** In all groups (healthy, diabetics and osteoporotics), the defects filled with HA + SV presented greater radiological bone union, BMD, histological bone union and more VEGF and BMP-2 positivity, in comparison with bone defects treated with HA alone. **Conclusions:** Combined application of HA and SV improves bone regeneration in mandibular critical bone defects compared with application of HA alone in healthy, diabetic and osteoporotic rats. This study might help to patients with osteoporosis or uncontrolled diabetes type I, but future studies should be done.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.....	13
I.1 TEJIDO ÓSEO. BIOLOGÍA ÓSEA.....	16
I.1.1. Estructura y composición ósea.....	16
I.1.2. Tipos de tejido óseo.....	18
I.1.3. Funciones metabólicas y mecanismos de regulación ósea	19
I.1.4. Hueso osteoporótico y diabético.....	21
I.2 REGENERACIÓN ÓSEA.	30
I.2.1 Principios biológicos de la regeneración.	34
I.2.2 Métodos de estimulación de la regeneración ósea.....	36
I.3 ESTATINAS.....	45
I.3.1 Sinvastatina.....	48
I.3.2 Mecanismo de actuación de la sinvastatina en la regeneración ósea.....	49
I.3.3 Usos de la sinvastatina.....	53
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	60
II.1 JUSTIFICACIÓN.....	61
II.2 OBJETIVOS.....	64

III. METODOLOGÍA.....	65
III.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	66
III.2 ALEATORIZACIÓN.....	66
III.3 INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO I.....	67
III.4 INDUCCIÓN DE LA OSTEOPOROSIS.....	68
III.5 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	70
III.6 ANÁLISIS CON MICRO-CT (UNIÓN ÓSEA RADIOLÓGICA Y ESTUDIO DE LA BMD).....	73
III.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO (UNIÓN ÓSEA HISTOLÓGICA)	75
III.8 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.....	75
III.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	76
IV. RESULTADOS.....	77
V. DISCUSIÓN.....	84
VI. CONCLUSIONES.....	92
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	94
VIII. ANEXOS.....	129

I. INTRODUCCIÓN.

I. INTRODUCCIÓN.

La reabsorción del hueso alveolar, con la consiguiente reducción de la disponibilidad ósea tanto en altura como en anchura, es un problema cada vez más frecuente en el campo de la implantología oral. Esto conlleva una complicación a la hora de rehabilitar protésicamente y conseguir resultados estéticos y funcionales óptimos (Van der Weijden y cols., 2009; Novaes y cols., 2012; Nazirkar y cols., 2014).

La pérdida del hueso alveolar se puede atribuir a una variedad de factores como la patología endodóntica, periodontitis, traumatismo facial o maniobras agresivas durante las extracciones. Ya sea por caries, traumatismo o enfermedad periodontal avanzada, la extracción dental y la siguiente cicatrización de la cavidad comúnmente producen deformidades óseas de la cresta alveolar, incluyendo la reducción de la altura y la anchura de la cresta residual. El patrón de curación puede plantear un problema para el clínico porque crea un problema estético en la fabricación de una rehabilitación soportada por implantes o una prótesis convencional, y porque puede hacer desafiante, si no inviable, la colocación de un implante. Sin embargo, es posible minimizar tales problemas simplemente llevando a cabo procedimientos de conservación de las crestas en alveolos postextracción usando materiales de injerto con o sin membranas de barrera (Irinakis, 2006) ya que el mantenimiento postextracción de la cresta alveolar minimiza la resorción residual de la cresta y, por tanto, permite la colocación de un implante que puede satisfacer criterios estéticos y funcionales.

Debido al auge de la reposición de los dientes perdidos mediante la rehabilitación de éstas y de maxilares edéntulos con prótesis fijas, se ha aumentado la demanda de biomateriales óseos, porque no siempre nos encontramos con la cantidad de hueso adecuada y hay que rellenar pequeños defectos óseos o simplemente queremos mejorar la curación y el pronóstico de los tratamientos realizados sobre nuestros pacientes. Además de que, si se da una gran reabsorción ósea, la colocación de un implante puede llegar a ser extremadamente difícil, lo que ha convertido al tejido óseo en el segundo tejido más trasplantado, solo superado por las transfusiones de sangre (Oryan y cols., 2014); y es por todo esto que nos encontramos ante la necesidad de encontrar un buen

biomaterial óseo evitando las desventajas que supone otro tipo de materiales como el injerto de hueso autógeno, que aunque sea el estándar de oro en cuanto a materiales de relleno se refiere, tiene la desventaja de la morbilidad de la zona donante y la disponibilidad limitada del hueso que podemos obtener y utilizar. Por ello también se han combinado sustitutivos óseos aloplásticos con moléculas que mejoran y/o inducen una nueva formación ósea con el fin de desarrollar un injerto óseo con propiedades osteogénicas mejoradas (Nyan y cols., 2009; Mansour y cols., 2014).

El aumento del tejido óseo mediante técnicas regenerativas constituye una de las líneas de investigación más emergentes en la actualidad, por lo que los procedimientos de regeneración ósea han aumentado de forma considerable con el objetivo de obtener resultados más favorables en rehabilitaciones implantológicas. Para ello, se han empleado determinadas moléculas con potencial osteogénico junto con las diferentes técnicas regenerativas y materiales de injerto habituales con el fin de mejorar los resultados en la formación de hueso durante los procedimientos de regeneración (Van der Weijden y cols., 2009; Allon y cols., 2014; Nazirkar y cols., 2014).

En los últimos años, se han descrito propiedades anabólicas de las estatinas, fármacos anticolesterolémicos ampliamente utilizados. Este tipo de compuestos parecen influir sobre la función osteoblástica y osteoclástica y la formación de hueso (Mundy y cols., 1999), pudiendo ser beneficiosos sobre determinadas enfermedades catabólicas como la osteoporosis (Satyawar y cols., 2006; Ho y cols., 2009; Laurencin y cols., 2014; Zhang y cols., 2014). Parecen inducir la liberación de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), especialmente BMP-2, lo que estimularía al osteoblasto y favorecería la formación de hueso, habiéndose observado efectos positivos sobre defectos creados en animales de experimentación (Mundy y cols., 1999; Garrett y Mundy, 2002; Gutierrez y cols., 2006; Horiuchi y Maeda, 2006; Du y cols., 2008; Lee y cols., 2008; Seto y cols., 2008; Nyan y cols., 2009; Lima y cols., 2010; Handal y cols., 2011; Rojbani y cols., 2011; Wadagaki y cols., 2011; Tanabe y cols., 2012; Chang y cols., 2013; Rivera y cols., 2013; Nazirkar y cols., 2014; Papadimitriou y cols., 2015; Lin y cols., 2016; Moshiri y cols., 2016; Zhang y cols., 2016).

La capacidad regenerativa de las estatinas podría ser beneficiosa al aplicarlas junto

con otro tipo de biomateriales durante los procedimientos regenerativos óseos de los maxilares, con la finalidad de obtener un mejor resultado en la formación de hueso (Lee y cols., 2008; Seto y cols., 2008; Lima y cols., 2010; Handal y cols., 2011; Tanabe y cols., 2012; Chang y cols., 2013; Papadimitriou y cols., 2015).

I.1. TEJIDO ÓSEO. BIOLOGÍA ÓSEA.

Para poder comprender la regeneración tisular ósea, tenemos que recordar previamente cuales son las características del tejido óseo, tanto a nivel estructural como de composición, y comprender cómo ocurren los procesos de curación y remodelación ósea.

I.1.1. Estructura y composición ósea.

El hueso es una estructura compleja que sufre cambios continuamente y es capaz de adaptarse a ellos y autorrepararse (Nazirkar y cols., 2014). El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado compuesto por materia extracelular calcificada y células (matriz ósea). La matriz ósea está compuesta por una parte inorgánica (50%) y otra parte orgánica (50%). La composición inorgánica es la que aporta rigidez y la representan diferentes iones, los más abundantes son el fosfato y el calcio, encontrándose también bicarbonato, sodio, citrato, potasio y magnesio en menor proporción. La organización en cristales de los iones de calcio y fósforo generan fosfato de calcio cristalino, la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Sommerfeldt y Rubin, 2001), compuesta por moléculas de hidroxilo, fosfato y carbonato. En cuanto a la composición orgánica, su principal representante es el colágeno tipo I, que es el que proporciona la dureza al hueso para que resista mejor a la fractura, junto con factores de crecimiento, proteoglicanos y otras glicoproteínas como osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp). El conjunto hidroxiapatita-fibras colágenas es el responsable de la dureza y resistencia del tejido óseo (Garip y Severcan, 2010).

Se ha demostrado que las membranas de las células óseas, tales como

osteoblastos y osteoclastos que se encuentran en la matriz, tienen varios tipos de canales Na^+ , Ca^{2+} y K^+ controlados por voltaje. La evidencia sugiere que las alteraciones en la actividad de los canales iónicos en las membranas celulares óseas están asociadas con la activación de las células óseas, lo que resulta en nueva formación o resorción ósea (Garip y Severcan, 2010).

En cuanto a las células que forman parte de la composición orgánica del tejido óseo, encontramos:

- Células osteoprogenitoras o células madre óseas: son células indiferenciadas en reposo con capacidad de dividirse y diferenciarse a osteoblastos (Sommerfeldt y Rubin, 2001; Boyce y Xing, 2007; Downey y Siegel, 2011).
- Osteoblastos (OB): son células productoras del componente orgánico de la matriz ósea (colágeno tipo I, glicoproteínas y proteoglicanos) y participan en procesos de mineralización, principalmente concentrando el fosfato cálcico y favoreciendo su precipitación sobre la matriz orgánica que se haya formado previamente. Se denomina osteoide a la matriz ósea recién formada que rodea a los osteoblastos aun activos y que aún no está calcificada. Una vez calcificada la matriz que los rodea pasan a denominarse osteocitos. También se hallan los pericitos o células perivasculares, que son consideradas células osteoprogenitoras principales de las que se va a derivar la formación de osteoblastos en función de los factores de crecimiento y proteínas morfogénicas del medio (Sommerfeldt y Rubin, 2001; Boyce y Xing, 2007; Downey y Siegel, 2011).
- Osteocitos: son células óseas maduras que se encuentran localizadas en el interior de lagunas situadas en la matriz. Estas células mantienen comunicación entre ellas a través de canaliculos que resultan fundamentales para la manutención de la matriz ósea (Sommerfeldt y Rubin, 2001; Boyce y Xing, 2007; Downey y Siegel, 2011).
- Osteoclastos (OC), son células multinucleadas, gigantes y móviles, que

regulan la remodelación ósea coordinada por citoquinas y hormonas como la calcitonina y la hormona paratiroidea (Boyce y Xing, 2007).

Todas las superficies óseas están recubiertas en su parte interna y externa por células osteogénicas y tejido conjuntivo, constituyendo el endostio y el periostio. Ambos poseen funciones de nutrición ósea y aporte de células para el crecimiento y reparación ósea.

I.1.2. Tipos de tejido óseo.

Según su origen embrionario existe (Downey y Siegel, 2011):

- Tejido óseo de origen membranoso (mesenquimático). El proceso de formación de este tipo de hueso se origina en un tejido conjuntivo. Los huesos de la bóveda craneal y los maxilares, así como el crecimiento en grosor y parte del crecimiento de huesos cortos tienen un origen membranoso.
- Tejido óseo de origen endocondral. La formación de estos huesos tiene su origen en una placa de cartílago hialino que es característica de huesos cortos y largos.

Según sus características macroscópicas, existen dos formas fundamentales de organización ósea localizadas en casi todos los huesos del organismo (Downey y Siegel, 2011):

- Tejido óseo compacto (hueso cortical, en la zona externa).
- Tejido óseo esponjoso (hueso trabecular, localizado en el interior).

La mayoría de las cirugías que involucran maxilar y mandíbula se realizan en el proceso alveolar, que es la parte de la mandíbula que contiene los dientes, y que se compone de dos gruesas capas externas de hueso cortical en sus superficies vestibular (labial o bucal) y lingual o palatino. El interior del proceso alveolar está formado por un

hueso trabecular esponjoso con numerosos espacios medulares, con la excepción de la pared de la cavidad alveolar que se compone de hueso alveolar. El tejido óseo en esta zona está formado por pocas capas delgadas con una orientación paralela a la dirección cervicoapical de la raíz y ancla los haces de colágeno del ligamento periodontal, que también se llaman fibras de Sharpey (Figura 1). Aunque fundamentalmente es comparable a otros huesos en el cuerpo, el hueso alveolar es una parte especializada de los huesos mandibular y maxilar que forma el periodonto de apoyo de los dientes y sufre un remodelado continuo y rápido en respuesta a la masticación. Pero, a pesar de su alto potencial de renovación, el hueso alveolar y el proceso alveolar forman un todo y pueden perderse como consecuencia de diferentes factores, y es por ello por lo que el uso de fármacos que puedan estimular la regeneración alveolar es interesante en la cirugía oral (Maciel-Oliveira y cols., 2011).

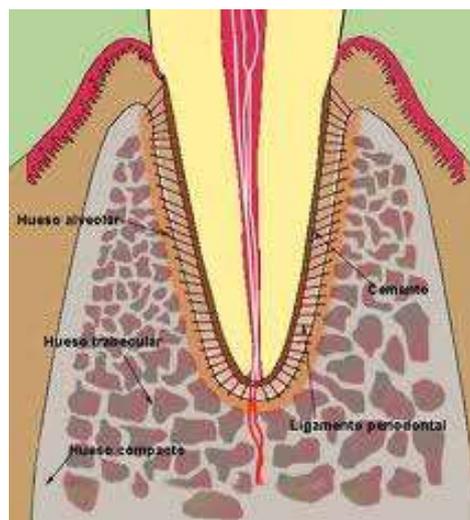


Figura 1. Tipos de hueso en el proceso alveolar.

I.1.3. Funciones metabólicas y mecanismos de regulación ósea.

Existe un continuo intercambio entre los iones óseos y los sanguíneos, fundamental para la homeostasis del organismo. Los procesos de liberación se producen desde las propias laminillas óseas del hueso trabecular, al resto de estructuras óseas,

liberando el Ca^{2+} hasta procesos de regulación hormonal (Sommerfeldt y Rubin, 2001). En este caso, la homeostasis se realiza fundamentalmente por la parathormona (PTH) y la calcitonina. La PTH favorece la reabsorción de la matriz ósea al incrementar el número de osteoclastos, aumentando la calcemia y favoreciendo la excreción renal del fosfato. Por su parte, la calcitonina inhibe la reabsorción de la matriz disminuyendo la movilización del calcio (efecto inhibitor osteoblástico) (Sommerfeldt y Rubin, 2001; Boyce y Xing, 2007; Tao y cols., 2016).

El hueso puede sufrir dos tipos de procesos, modelado y remodelado óseo. En el proceso de modelado aparecen cambios en su arquitectura inicial, en cambio, durante los procesos de remodelado, los cambios que se suceden en el interior de hueso no producen alteración concomitante de la arquitectura del tejido (Freemont, 1993). Este remodelado implica los procesos de aposición y resorción ósea y se caracteriza por la presencia de unidades óseas multicelulares (BMUs) (Satyawan y cols., 2006). Estas BMUs están formadas por un frente osteoclástico que reside en una superficie de hueso recién reabsorbido (frente de reabsorción), un compartimento con vasos y pericitos y una capa de osteoblastos sobre una matriz orgánica neoformada (frente de depósito). Estas unidades son reguladas por estímulos locales y hormonas como la PTH, la hormona del crecimiento, la calcitonina o la vitamina D, aunque también pueden verse influenciadas por los glucocorticoides, las hormonas tiroideas o los estrógenos (Horiuchi y Maeda, 2006; Downey y Siegel, 2011).

A nivel celular, la regulación de aposición-reabsorción de hueso sucede a través del mecanismo RANK-RANKL-osteoprotegerina. Existen numerosas citoquinas inflamatorias que están relacionadas con la diferenciación del osteoclasto y su activación, como el receptor activador nuclear factor kB ligando (RANKL), el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 1 y 6 (IL-1, IL-6) y el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) (Boyce y Xing, 2007). El RANKL es una proteína de la familia del TNF expresada en la superficie celular de los osteoblastos y desempeña un papel fundamental en la diferenciación osteoclástica junto con la acción del M-CSF (Boyce y Xing, 2007; Yamashita y cols., 2010; Wadagaki y cols., 2011). El RANKL se une a su receptor, localizado en el osteoclasto y denominado RANK. Éste, una vez unido

al RANKL, desencadena una cascada de señales que lleva a la diferenciación osteoclástica y, por tanto, a la estimulación de la reabsorción ósea (Figura 2). Para la activación del osteoclasto es necesaria la interacción de RANK con su ligando RANKL, estando esta relación regulada por múltiples factores locales y humorales como estrógenos, glucocorticoides, PTH, prostaglandinas, citoquinas, TNF, IL-1 e IL-6 (Boyce y Xing, 2007; Park, 2009; Allon y cols., 2014).

La osteoprotegerina es una proteína circulante generada por el osteoblasto y el preosteoblasto, aunque también es liberada por otros tejidos (Sommerfeldt y Rubin, 2001). Su expresión por los OB está regulada, en gran parte, por los factores implicados en la expresión del RANKL (Boyce y Xing, 2007; Zhao y Liu, 2014). Esta proteína bloquea o inhibe el efecto de RANK porque es un competidor de RANKL y puede, por tanto, evitar la formación osteoclástica y la reabsorción ósea (Sommerfeldt y Rubin, 2001).

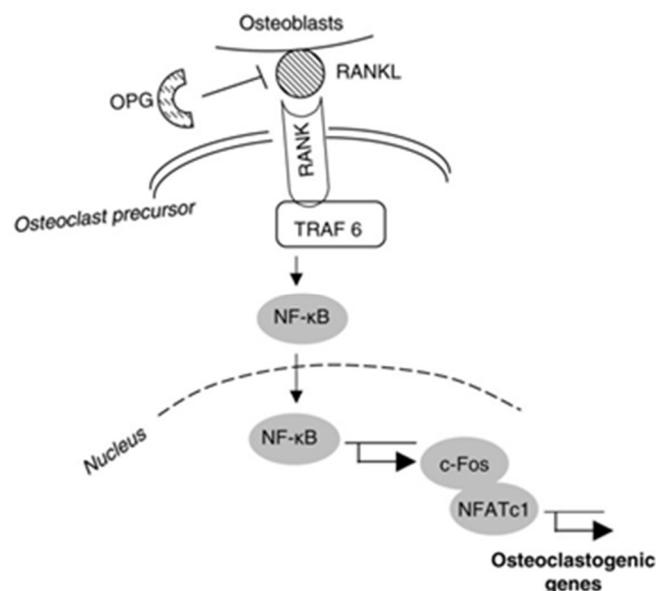


Figura 2. Vía de activación de la osteoclastogénesis; de Boyce and Xing, 2007.

I.1.4. Hueso osteoporótico y diabético.

El hueso es un órgano metabólicamente activo en el que el patrón de organización

de los componentes minerales y orgánicos determina la función mecánica exitosa del esqueleto. El recambio óseo es controlado por agentes definidos y mecanismos que regulan la formación y la resorción del hueso, que son los dos procesos principales de remodelación ósea. Dado que la nueva formación es principalmente una función del osteoblasto, los agentes que regulan la formación ósea pueden actuar aumentando / disminuyendo la replicación de células del linaje osteoblástico o modificando la función diferenciada del osteoblasto. Por lo tanto, sería beneficioso estimular la actividad osteoblástica en determinadas localizaciones del hueso por un agente anabólico oral, dando lugar a la formación ósea cuando sea necesario (Garrett y Mundy, 2002).

A su vez, el hueso es un tejido especializado con una compleja estructura que le permite realizar múltiples funciones mecánicas y metabólicas. Con el fin de mantener estas funciones del cuerpo, el hueso está en un estado constante de remodelación. Durante este proceso, también conocido como recambio óseo, los osteoclastos desmineralizan y reabsorben el hueso viejo y los osteoblastos depositan hueso nuevo para mantener una masa ósea apropiada a las tensiones a las que se somete el esqueleto. Cualquier alteración en este proceso de recambio puede alterar la densidad mineral ósea (DMO), la resistencia ósea y la microestructura ósea. Esto ocurre más comúnmente cuando hay un aumento en la actividad de los osteoclastos, lo que conduce a una mayor resorción, dando como resultado una disminución de la densidad ósea (osteopenia) (Wright y Marshall, 2009). Cuando la reabsorción de hueso es mayor que la aposición, aparece una menor cantidad de mineral en hueso (CMH) y una menor DMO (Tian y cols., 2013). Estos cambios en la arquitectura de la estructura ósea, proporcionales a la pérdida de osteoide y de mineral, crean mayor predisposición a las fracturas (Ardakani y Mirmohamadi, 2009; Carpentier y cols., 2012; Antonopoulou y cols., 2013; Xu y cols., 2014).

La osteoporosis se ha definido como una enfermedad caracterizada por una baja masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que conduce a una mayor fragilidad ósea y un consiguiente aumento del riesgo de fractura (Von Wöern, 2001). Es una enfermedad esquelética crónica, compleja y multifactorial, que progresa de forma silente durante décadas y que está caracterizada por una menor densidad ósea (Kourkoumelis y cols., 2012). Los pacientes con la enfermedad establecida pueden llegar

a perder hasta el 50% de masa ósea en lugares críticos del esqueleto, asociados con cambios de la microarquitectura ósea y la pérdida de conectividad trabecular (Yang y cols., 2014).

Estos bajos niveles pueden llevar a la aparición de osteoporosis, la cual, en gran parte de las situaciones, es tratada con un cambio en el estilo de vida junto con bifosfonatos, calcitonina, estrógenos, moduladores de receptores estrogénicos selectivos, análogos de vitamina D, suplementos de calcio e ipriflavona; los cuales actúan principalmente para estabilizar la masa ósea y no tienen efectos importantes en la formación de hueso (Garrett y Mundy, 2002; Satyawar y cols., 2006). En la actualidad, el pilar del tratamiento para la osteoporosis se basa en medicamentos sistémicos destinados a aumentar la DMO y mejorar la masa ósea como un medio para disminuir la incidencia de fracturas (Yang y cols., 2014).

Pero la osteoporosis no solo aumenta el riesgo de fractura, sino que también disminuye el rendimiento de los implantes e, incluso, aumenta la tasa de fracaso del implante asociada a una osteointegración más lenta en sujetos osteoporóticos (Du y cols., 2008; Tan y cols., 2015). El éxito de los implantes óseos en presencia de osteoporosis está limitado por la falta de osteointegración entre el implante y el hueso natural y, aunque la osteoporosis aumenta la resorción ósea alrededor de los dientes o en la cresta edéntula.

El hueso mandibular, junto con el resto del esqueleto, pasa por un proceso continuo de reducción de la densidad ósea después de los 50 años y es muy importante para los odontólogos y cirujanos comprender los cambios hormonales sistémicos en las estructuras óseas orales y, por ello, se han realizado muchos estudios en seres humanos y en animales ovariectomizados para observar los efectos de la osteoporosis en la mandíbula (Junqueira y cols., 2002).

La osteoporosis es una de las enfermedades metabólicas más frecuentes, constituyendo un problema de salud pública. Puede ser a su vez, primaria, asociada a cambios postmenopáusicos y seniles; y secundaria, asociada a enfermedades endocrinas y renales (Von Wöhrn, 2001; Ardakani y Mirmohamadi, 2009). Los estrógenos disminuyen la tasa de recambio óseo, influyendo directamente sobre la actividad

osteoclástica y alterando los efectos de la PTH, la vitamina D y la calcitonina (Downey y Siegel, 2011). En mujeres postmenopáusicas, es frecuente el uso de bifosfonatos; fármacos que limitan la actividad de los osteoclastos, para la prevención y tratamiento de la osteoporosis, incrementando a su vez el riesgo de aparición de efectos secundarios graves como la osteonecrosis maxilar (ONM) (Von Wewern, 2001; Ardakani y Mirmohamadi, 2009; Grgić y cols., 2016).

Los cambios hormonales que se producen tras la menopausia causan alteraciones hormonales que puede favorecer la aparición de enfermedad periodontal y, a su vez, la osteoporosis puede incrementar la liberación de factores inflamatorios que pueden participar en la progresión de la periodontitis. Cada vez hay más estudios que asocian la periodontitis con una serie de enfermedades crónicas, como la osteoporosis (Xu y cols., 2014). En pacientes osteoporóticos el riesgo de periodontitis puede ser mayor, teniendo en cuenta, además, que ambas situaciones clínicas presentan factores de riesgo comunes (estilo de vida, tabaco, características genéticas, malnutrición con deficiencias de vitamina D o calcio, medicación, mala higiene oral, cambios hormonales, edad avanzada...), pero tal relación no está totalmente demostrada, siendo fundamentales, en el avance de la periodontitis, factores locales como: el grado de higiene bucal, el estatus socioeconómico, la edad, la menopausia, la ingesta de hormonas, el hábito de fumar y la raza (Von Wewern, 2001; Ardakani y Mirmohamadi, 2009). La periodontitis es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar. La reabsorción del hueso de la cresta alveolar iniciada por la periodontitis puede conducir gradualmente a la pérdida de los dientes y al edentulismo, lo que a su vez provoca la pérdida continua del hueso alveolar y la reabsorción del reborde residual restante (RRR) (Xu y cols., 2014).

La alteración del balance óseo en la osteoporosis, al igual que en los huesos largos, también puede manifestarse de forma temprana en los procesos alveolares (Hildebolt, 1997; Fang y cols., 2015; Grgić y cols., 2016). En una evaluación radiográfica, el hueso mandibular, tanto cortical como esponjoso, y el hueso alveolar presentan una mayor reabsorción, y esta menor densidad mineral ósea en los procesos alveolares facilita la disminución del soporte óseo dental, lo que conlleva un aumento del riesgo de pérdida

dientes (Von Wowern, 2001; Ardakani y Mirmohamadi, 2009; Grgić y cols., 2016), aunque el aumento de la pérdida de masa ósea en los maxilares también se debe al estrés que se produce por las fuerzas de la masticación, lo que puede provocar una atrofia local del hueso sin afectación sistémica sobre todo en mandíbulas edéntulas (Klemetti, 1996), o por bruxismo.

El remodelado óseo es un proceso en el cual un área del hueso sufre una resorción ósea osteoclástica y luego es rellenada por osteoblastos. Este ciclo de remodelación ósea se sincroniza, siendo la reabsorción y la formación iguales, hasta que se producen cambios metabólicos o de estilo de vida que desequilibran el sistema (Lane y Kelman, 2003). La literatura sugiere que hay relación entre la pérdida ósea oral y la osteoporosis del resto del esqueleto (Ardakani y Mirmohamadi, 2009) y por esto debe ser considerada como uno de los factores más importantes en el fracaso de la osteointegración del implante (Du y cols., 2008). Para superar este problema se propuso la aplicación de regeneración ósea guiada; sin embargo, ninguno de estos materiales ha demostrado ser el ideal. Una alternativa puede ser el empleo local de fármacos moduladores óseos usados para tratar enfermedades óseas sistémicas, tales como calcitonina, análogos de vitamina D, estrógenos y bifosfonatos orales; estos últimos son uno de los agentes farmacológicos más investigados actualmente.

Hasta la fecha, los bifosfonatos han sido los fármacos más utilizados para mejorar la osteointegración del implante en la osteoporosis. Las investigaciones han demostrado que los bifosfonatos aumentan el contacto hueso-implante y la fuerza de unión ósea. Sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado que su administración aumenta el riesgo de sufrir ONM y, aunque el beneficio terapéutico supera el pequeño riesgo de desarrollar esta complicación, es un problema de seguridad. El tratamiento y los procedimientos apropiados para un paciente específico dependerán de la comunicación entre el paciente, el odontólogo y el resto de profesionales de la salud (Hellstein y cols., 2011).

Las terapias antirresortivas son la piedra angular del tratamiento contra la osteoporosis. Actualmente se conocen cinco clases de agentes puramente antirresortivos: bifosfonatos, estrógenos, moduladores selectivos de receptores de estrógenos, calcitonina

y anticuerpos monoclonales frente al activador del receptor del ligando del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL). Todos son inhibidores de la resorción ósea que actúan principalmente para estabilizar la masa ósea al inhibir la actividad de los osteoclastos (las células responsables de la pérdida ósea), pero la capacidad de estos fármacos para aumentar la masa ósea es relativamente pequeña ya que, como hemos dicho, todos ellos son inhibidores de la resorción ósea y de los osteoclastos y, aunque previenen la pérdida de hueso, no provocan incrementos de masa ósea verdadera (Mansour y cols., 2014), no más del 2% por año (Garret y cols., 2001; Garrett y Mundy, 2002; Reid, 2008; Miller, 2008; Chen y Sambrook, 2012; Tian y cols., 2013).

Algunos autores sugieren que el desarrollo de la terapia antirresortiva para la osteoporosis debería basarse en el desarrollo de agentes anabólicos diseñados para aumentar la DMO mediante la estimulación de la formación ósea (Rosen y Bilezikian, 2001). Por todo esto, aunque el concepto de tratamiento anabólico en osteoporosis es completamente diferente de la inhibición de la resorción ósea (fármacos antirresortivos) puesto que los agentes anabolizantes óseos estimulan directamente la formación ósea, no inhiben su resorción, los fármacos anabólicos tienen mayor potencial para aumentar la masa ósea y disminuir las fracturas osteoporóticas que los fármacos antirresortivos.

Dependiendo del caso se usan agentes resortivos, anabólicos o combinados. La tendencia actual de investigación se está centrando en desarrollar agentes anabólicos más eficaces con la expectativa de restaurar sustancialmente la masa ósea y producir mayores disminuciones en las tasas de fractura que las terapias antirresortivas simples. Sin embargo, las indicaciones actuales son que tales agentes se usen en combinación o secuencialmente con agentes antirreabsorción, no otorgándole un papel principal a los agentes anabólicos (Reid, 2008).

Entre los agentes anabólicos más usados nos encontramos: hormona paratiroidea (PTH), hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), estroncio, flúor, BMP-2 y BMP-7 (también llamada proteína osteogénica-1 [OP-1]), factores básicos de crecimiento de fibroblastos (bFGFs), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y estatinas. Todos ellos estimulan la formación de hueso

induciendo actividad osteoblástica y aumentando la masa ósea (Lane y Kelman, 2003, Canalis y cols., 2013).

La baja DMO es el factor de riesgo más importante para las fracturas osteoporóticas. La reducción de la masa ósea resulta de un desequilibrio tanto en la remodelación ósea como en el aumento de la resorción ósea, sin un aumento proporcional en la formación ósea. Existen pruebas sustanciales de que el aumento de la remodelación ósea debido a la deficiencia aguda de estrógenos, el agotamiento del calcio, el hiperparatiroidismo secundario, los glucocorticoides, las terapias inmunosupresoras y otros medicamentos; da lugar a un mayor riesgo de fractura y aunque en estos entornos la DMO cae, no es totalmente responsable del riesgo global de fractura. La razón exacta de esto no está clara, pero la pérdida ósea rápida debido al aumento de la resorción ósea puede conducir a la inestabilidad esquelética, produciéndose microperforaciones y microfracturas. Además, la inhibición de la resorción ósea por los estrógenos, las calcitoninas o los bifosfonatos reduce el riesgo de fractura por medios que son al menos parcialmente independientes del aumento de la densidad ósea (Rosen y Bilezikian, 2001).

La definición de la calidad ósea está evolucionando particularmente desde la perspectiva de que los agentes anabólicos pueden mejorar no solo la densidad mineral ósea, sino también la microarquitectura ósea, la composición, la morfología, la cantidad de microfibras y la dinámica de remodelación. La definición exacta de la calidad ósea sigue siendo difícil de alcanzar. Quizás la definición más estructurada hasta la fecha sea "las características del tejido óseo que, además de la densidad, contribuyen a la resistencia ósea" (Sibai y cols., 2011).

Se han evaluado varias combinaciones de tratamiento en pacientes con osteoporosis posmenopáusica. Una opción es combinar un agente anabólico (fluoruro, esteroide anabólico o teriparatida) y un agente anticatabólico (calcitonina, estrógeno o bifosfonatos). Por ejemplo, en la aplicación de BF y PTH, los efectos sobre la DMO y los marcadores de rotación ósea fueron intermedios entre los obtenidos con cada agente por separado y la adición de bifosfonatos disminuyó los efectos de la PTH (Audran, 2006). Hay un acuerdo general de que la combinación de antirresortivos da lugar a mayores aumentos en la DMO que la monoterapia, aunque este efecto no es ni aditivo ni sinérgico.

Sin embargo, no se ha demostrado ninguna eficacia antifractura y la administración simultánea de dos o más antirresortivos, cualesquiera que sean, no se recomienda actualmente. Los principales factores negativos para que no se lleve a cabo son una mayor prevalencia de efectos adversos, menor tolerabilidad y una reducción en la adherencia. Además, la sobresupresión de la resorción ósea puede tener efectos adversos sobre la resistencia ósea, especialmente con el tratamiento a largo plazo (Garcés y García, 2006; Pinkerton y Dalkin, 2007).

La diabetes mellitus (DM) es otra de las enfermedades metabólicas más comunes. La creciente prevalencia de la diabetes en todo el mundo, especialmente la DM-II, es indiscutible. Los pacientes diabéticos aumentaron la morbilidad y la mortalidad en comparación con sus homólogos no diabéticos, no solo debido a complicaciones vasculares, sino también debido a una mayor incidencia de fracturas (Antonopoulou y cols., 2013).

En cuanto a los dos tipos de diabetes, la DM-I se caracteriza por deficiencia de insulina, mientras que la DM-II es un estado de resistencia a la insulina en el establecimiento de niveles elevados de insulina. La DM-I y DM-II tienen diferentes fisiopatologías que también tienen distintos efectos sobre el hueso. Se ha demostrado que la presencia de complicaciones microvasculares diabéticas, incluyendo oftálmica, nefropática y neurológica, conduce a un mayor riesgo de fractura de cadera en pacientes con DM-I; y, a diferencia de estos, los pacientes con DM-II tienden a tener sobrepeso o incluso obesidad. Aunque la delgadez es un factor de riesgo para la osteoporosis y las fracturas, no está claro en este momento si la obesidad es realmente protectora. Sin embargo, se ha demostrado que los pacientes con DM-II tienen una DMO media o superior que el control de los grupos de la misma edad. Estos hechos parecen implicar que los pacientes con DM-II tienen un menor riesgo de fractura. De hecho, varios estudios han demostrado que los pacientes con DM-I tienen un riesgo mayor de fracturas de cadera, húmero proximal y pie. Por otro lado, los datos del Estudio de Observación de la Iniciativa de Salud de la Mujer indican que las mujeres posmenopáusicas con diabetes corren un mayor riesgo de fracturas de cadera, pie, columna, y fracturas en general (Kurra y Siris, 2011).

La alteración de los niveles de insulina en estos pacientes provoca una desregulación de los procesos controlados por la misma, destacando entre sus consecuencias la microangiopatía diabética y sus complicaciones asociadas (nefropatía, retinopatía, neuropatía, enfermedad coronaria aguda, infarto, claudicación intermitente) y una mayor predisposición a la osteoporosis (Kurra y Siris, 2011; Antonopoulou y cols., 2013; Starup-Linde, 2013; Oei y cols., 2015). Existen diversas asociaciones entre la aparición de osteoporosis y la diabetes, estando relacionado íntimamente el tipo de diabetes, la edad de aparición, el control de la glucemia, la medicación concomitante, el índice de masa corporal y la deficiencia de vitamina D (Kurra y Siris, 2011; Antonopoulou y cols., 2013; Starup-Linde, 2013). Cada vez hay más pruebas que corroboran que la DM influye en el metabolismo esquelético. En comparación con los sujetos control, se ha observado una disminución de la DMO en la DM-I, mientras que se ha observado una DMO mayor en la DM-II; sin embargo, ambas, como también algunos medicamentos utilizados para tratarla, se asocian con un mayor riesgo de fracturas osteoporóticas (Toneli y cols., 2011; Antonopoulou y cols., 2013; Oei y cols., 2015). Los factores más relevantes parecen ser el deterioro de la microarquitectura ósea y una distribución ineficiente de la masa ósea con insuficiencia de los mecanismos de reparación y adaptación; junto con una fisiopatología molecular altamente compleja y heterogénea subyacente a la enfermedad ósea relacionada con la diabetes, que involucra vías hormonales, inmunes y quizás genéticas. También deben agregarse a las complicaciones más conocidas de la diabetes los efectos perjudiciales de los niveles elevados de glucosa en el hueso de manera crónica (Oei y cols., 2015).

La función osteoblástica en los pacientes diabéticos se encuentra alterada principalmente por los estados hiperglucémicos que, a la larga, producen una disminución de la DMO precursora de osteoporosis, lo que se denomina osteopenia diabética. Por otro lado, se ha observado que las situaciones de hiperglucemia mantenidas disminuyen los niveles de la hormona osteocalcina, lo que repercute negativamente sobre la formación del hueso; la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) aparece inversamente relacionada a la osteocalcina (Starup-Linde, 2013; Oei y cols., 2015). A todo ello hay que añadirle los efectos de las complicaciones derivadas de la diabetes, como el fallo renal que, a su vez, genera alteraciones en el metabolismo de la vitamina D e hipoparatiroidismo funcional

con excreción aumentada de calcio en orina y disminución en el organismo (Antonopoulou y cols., 2013; Starup-Linde, 2013). Además, los productos finales derivados de la glicosilación se acumulan en diversos tejidos, incluido el óseo. Estos, junto con el estrés oxidativo, están relacionados con la inhibición de la diferenciación del OB y su apoptosis, además de que su acúmulo podría incrementar las complicaciones diabéticas como un aumento de la inflamación por la alteración de la función tisular normal con alteración celular (Starup-Linde, 2013; Oei y cols., 2015).

I.2. REGENERACIÓN ÓSEA.

El hueso humano es un tejido con capacidad de regeneración, sin embargo, tiene sus limitaciones y los defectos grandes carecen de la capacidad de curarse espontáneamente (Rodríguez y cols., 2014), estando limitados a defectos de pequeñas áreas (Montazerolghaem y cols., 2016). Cuando el tamaño del defecto es demasiado grande para la capacidad de cicatrización natural del hueso se necesitan injertos óseos para ayudar al proceso de cicatrización (Montazerolghaem y cols., 2016) y, aunque la mayoría de las fracturas óseas logran la unión mediante tratamiento conservador o quirúrgico rápido, hay una proporción significativa (5% -10%) de fracturas que siguen siendo deficientes en la reparación ósea y culminan en la no unión. Los tratamientos convencionales para estos últimos casos son en su mayoría invasivos y requieren un largo período de recuperación y es por esto que se están explorando constantemente nuevas estrategias para la reparación de fracturas (Fukui y cols., 2012).

El proceso de curación se inicia con una secuencia ordenada pero compleja de eventos que restablecen la integridad de los tejidos dañados. El organismo responde ante las agresiones con un proceso de restauración del tejido afectado mediante procesos de reparación y regeneración, la aparición de una u otra respuesta se da en función de múltiples factores (Arnás y cols., 2002). La reparación se caracteriza por la formación de un tejido fibroso que no preserva ni la arquitectura ni la función original y que puede contener tejido conectivo con células no osteocompetentes, es decir, que no son

propiamente óseas (Toneli y cols., 2011). En cambio, en los procesos de regeneración se consigue la restitución integral del tejido, generándose un tejido similar al original sin diferencias con el que lo rodea (Arnás y cols., 2002). Mencionar que mientras que una cicatriz fibrosa puede ser normal para la cicatrización del tejido blando, esta es mala en el caso de la curación ósea (Chauhan y cols., 2015).

Cuando un hueso se fractura, inicialmente se forma un coágulo sanguíneo seguido de una fase inflamatoria con edema y aparición de citoquinas y factores de crecimiento y de formación de tejido de granulación. Posteriormente, comenzará a formarse un nuevo tejido óseo que, con el tiempo, se volverá más robusto. Todo este proceso está regulado por factores de crecimiento y citoquinas como: factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α , TGF- β), VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento insulínico (IGF-1), la interleuquina 8 y 1 α (IL-8, IL-1 α), el factor de necrosis tumoral (TNF- α), factores estimulantes de colonias de los granulocitos, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), y las BMP, que son factores de crecimiento transformantes. Estas últimas son producidas por los osteoblastos y las células mesenquimales y, junto con otros factores de crecimiento (hormonas y citoquinas), favorecen la diferenciación de las células mesenquimales migradas hacia células osteogénicas (OB y OC) (Braddock y cols., 2001; Maeda y cols., 2001; Arnás y cols., 2002; Horiuchi y Maeda, 2006; Egusa y cols., 2010; Toneli y cols., 2011; Allon y cols., 2014; Du y cols., 2014; Nazirkar y cols., 2014; Tomlin y cols., 2014; Doev y cols., 2015; Lin y cols., 2016).

Un ejemplo de la regeneración y restauración de los tejidos óseos son los procesos de remodelado óseo postextracción (Figura 3) (Zhao y cols., 2014). Una vez sufridos los procesos iniciales, aproximadamente entre las 5 y 10 semanas, se ha formado un hueso inmaduro, primario o reticular, que sufrirá un proceso de modelado y remodelado entre el primer y segundo mes, que dará lugar a la formación de hueso secundario o laminar. La diferencia entre el hueso maduro e inmaduro reside en la disposición de las fibras de colágeno tipo I: en el primario el entrelazado es irregular, mientras que en el secundario existen dos tipos de ordenamiento, el compacto, que da lugar a laminillas concéntricas

llamadas osteonas comunicadas por sistemas de Havers; y el esponjoso, que está formado por trabéculas.

La reabsorción alveolar del hueso de la cresta es un fenómeno biológico que ocurre después de la extracción dental y no se puede prevenir ni evitar. Después de una extracción, la reabsorción ósea se produce en dos fases:

- En la primera fase, el hueso que ancla el diente en el proceso alveolar a través de las fibras de Sharpey se reabsorbe rápidamente y se reemplaza con tejido óseo inmaduro recién formado. Entonces este tejido comienza a ser reemplazado con hueso laminar y el defecto se rellena de hueso maduro durante unos meses, alcanzando un relleno óseo total aproximadamente a partir de las 16 semanas, o hasta 180 días (Jamjoom y Cohen, 2015), aunque el alveolo no logrará alcanzar el nivel de hueso de los dientes vecinos (Jahangiri y cols., 1998; . Irinakis, 2006).
- En la segunda fase, la superficie periosteal del hueso alveolar se remodela a través de una interacción entre la reabsorción osteoclástica y la formación osteoblástica, lo que conduce a una contracción total del tejido horizontal y vertical (Jamjoom y Cohen, 2015).

La pérdida del diente y de su hueso de soporte conduce a la creación de defectos de cresta o a una situación de atrofia maxilar porque, en cuanto se detiene el estímulo inducido por el ligamento periodontal, el hueso cortical vestibular se somete a reabsorción y el componente de médula ósea de los alveolos desaparece gradualmente (Toneli y cols., 2011). La cicatrización de la cavidad producida por la extracción del diente implica la retención del coágulo sanguíneo seguido de una secuencia de eventos que conducen a cambios en el proceso alveolar de una manera tridimensional. Este evento de cicatrización normal produce una pérdida mínima de altura vertical (alrededor de 1 mm), pero una pérdida sustancial de anchura en el plano buco-lingual (4-6 mm). Se ha demostrado que, en los tres primeros meses tras la extracción, la pérdida es significativa y puede resultar tanto en una deformidad del tejido duro como del tejido blando que puede afectar la capacidad de restaurar este lugar con una estética aceptable (Braddock y cols., 2001).

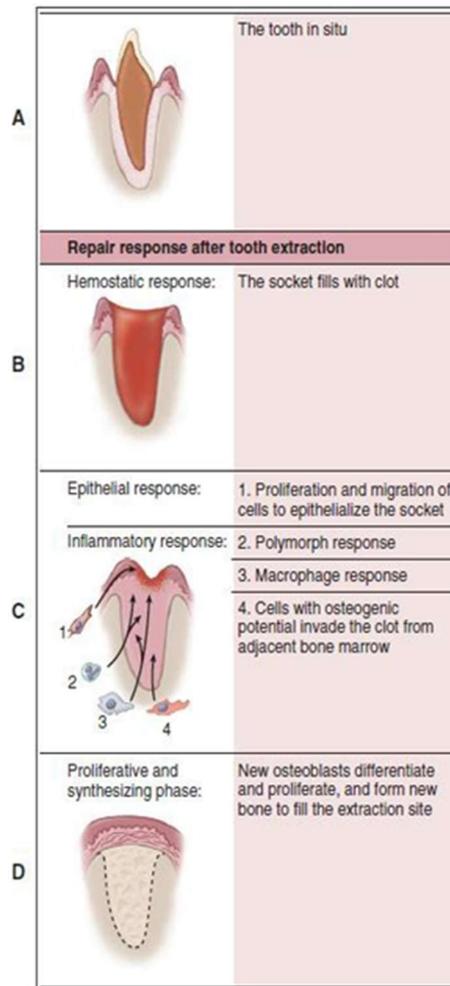


Figura 3. Ejemplo de la regeneración y restauración de los tejidos óseos son los procesos de remodelado óseo postextracción (Zhao y cols., 2014).

Hasta aquí se producirá la remodelación alveolar más agresiva, pasando después a una fase de remodelado residual que se llevará a cabo más lentamente y que se mantendrá durante toda la vida. A esto se le ha llamado reducción de la cresta residual o RRR y depende de números factores (Klemetti, 1996; Jahangiri y cols., 1998; Wu y cols., 2008; Egusa y cols., 2010). El efecto combinado de la pérdida de tejido blando con la pérdida de tejido duro sobre el ancho total de la cresta, es decir, la relación existente entre la encía y su tejido óseo de soporte subyacente es el principal problema a la hora de rehabilitar la zona funcional y, sobre todo, estéticamente (Van der Weijden y cols., 2009),

debido al cambio de la morfología de la cresta alveolar que, según el número de dientes perdidos, configura el grado del defecto alveolar, y según su extensión, condiciona que se produzca una atrofia más pronunciada.

La desaparición gradual del proceso alveolar implica la reducción del tamaño sagital y vertical de las mandíbulas (Toneli y cols., 2011). Para evitarlo, en contraste con la implantación tardía, la colocación inmediata de un implante postextracción puede ayudar a preservar la dimensión alveolar del hueso, permitiendo la colocación de implantes más anchos y largos, mejorando así la relación corona-implante y aumentando el área de superficie de contacto implante-hueso, lo que puede reducir el período de curación y aumentar el éxito del procedimiento. Aunque estos beneficios también están acompañados por un inconveniente importante: la falta de adaptación del hueso alveolar en la región cervical del implante, un defecto vertical circunferencial que altera la estabilidad inmediata del implante y que puede ser ocupado por tejidos blandos y poner en peligro la osteointegración (Mansour y cols., 2014).

Por todo esto, es importante tanto preservar el hueso como la restauración de un volumen de hueso suficiente para soportar la carga protésica y, también, la inserción del implante dental como un soporte para la prótesis, lo cual requiere el uso de protocolos quirúrgicos que permitan la regeneración ósea en localizaciones deficientes, utilizando los principios de la osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Toneli y cols., 2011).

I.2.1. Principios biológicos de la regeneración.

Se han propuesto varias estrategias regenerativas con el objetivo de preservar el proceso alveolar después de la extracción dental o para aumentar el soporte óseo de los implantes dentales (Montero y cols., 2014).

Cuando empleamos materiales para estimular la regeneración ósea, debemos tener en cuenta los principios biológicos fundamentales de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Murray y cols., 1957; Toneli y cols., 2011; Oryan y cols., 2014).

- *Osteogénesis*: permite la formación y desarrollo de hueso incluso en ausencia de células locales indiferenciadas, las osteoprogenitoras. Es un tipo de regeneración que se consigue con injertos de hueso autólogo. Las células osteoblásticas y los sistemas de Havers del injerto se reemplazarán con hueso nuevo desde la zona receptora (Koka y cols., 1993; Toneli y cols., 2011; Nazirkar y cols., 2014).
- *Osteoinducción*: permite la migración y proliferación de células indiferenciadas en la zona receptora a regenerar (Nazirkar y cols., 2014). Es la transformación de células madre mesenquimales indiferenciadas en osteoblastos o condroblastos a través de factores de crecimiento que solo existen en el hueso vivo (Koka y cols., 1993; Toneli y cols., 2011).
- *Osteoconducción*: una superficie osteoconductiva o un material osteoconductor es aquel que tiene la capacidad de generar una estructura tridimensional, una matriz física que permita el crecimiento de hueso en su superficie o en su interior a través de poros por los que penetran los vasos sanguíneos y por los cuales se facilita la migración y proliferación celular (Koka y cols., 1993; Albrektsson y Johansson, 2001; Toneli y cols., 2011; Nazirkar y cols., 2014). Es el proceso que proporciona un andamio bioinerte, o matriz física, adecuado para la deposición de hueso nuevo sobre el hueso circundante o estimular células mesenquimales diferenciadas a crecer a lo largo de la superficie del injerto (Liu y Kerns, 2014).

En resumen, la regeneración ósea requiere tres componentes esenciales: las células responsables de la formación ósea, las moléculas de señalización y un andamio que actúa como superficie osteoconductora para soportar la formación ósea osteoblástica (Nyan y cols., 2009).

La regeneración ósea se logra a través de estos tres mecanismos, pero para lograr que los implantes perduren en el tiempo tenemos que nombrar también el concepto de oseointegración, que se define como una conexión directa, estructural y funcional entre

el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional. Brånemark, desde sus estudios en 1952 (Brånemark y cols., 2001), fue quien introdujo el término de oseointegración en los implantes. Sugirió la corrección ortográfica de "oseointegración" en lugar de "osteointegración", inaugurando con ello la era de la implantología contemporánea. La oseointegración no es un fenómeno aislado, sino que depende de la osteoinducción previa y de la osteoconducción y, por tanto, los materiales que son demasiado tóxicos para permitir la osteoconducción no serán oseointegrados. Sin embargo, muchos materiales muestran al menos cierto grado de fijación ósea, lo cual ha inspirado a los patólogos del hueso a considerar la oseointegración como una simple reacción de cuerpo extraño, mientras que los investigadores más orientados a la práctica clínica han rechazado tal visión. Los implantes oseointegrados han experimentado un avance real en la implantología oral y craneofacial, dando excelentes resultados funcionales, en contraste con los implantes anclados, que generalmente han mostrado tasas de éxito muy pobres. Incluso si la oseointegración inicial depende de la inducción y la conducción ósea, el término implica que el anclaje óseo se mantiene con el tiempo.

La osteoinducción, la osteoconducción y la oseointegración son fenómenos interrelacionados, pero no idénticos. La osteoinducción es parte de la cicatrización ósea normal y es responsable de la mayoría del hueso recién formado, por ejemplo, después de una fractura o la inserción de un implante. La osteoconducción es un término que usualmente se usa ahora en conjunto con implantes porque el propio implante puede ser osteoinductivo, pero esto no es un requisito previo para la inducción ósea. La osteoconducción y la oseointegración dependen no solo de factores biológicos, sino también de la respuesta a un material extraño. La respuesta osteoconductiva puede ser de corta duración, pero la oseointegración exitosa debe mantener el anclaje óseo durante un largo período de tiempo (Albrektsson y Johansson, 2001).

I.2.2. Métodos de estimulación de la regeneración ósea.

Existen diferentes procedimientos encaminados a prevenir y/o limitar la pérdida ósea o estimular la regeneración de hueso.

a. Regeneración ósea guiada (ROG). Su aplicación a la implantología surge a partir de investigaciones precedentes en el campo de la periodoncia sobre regeneración tisular guiada (RTG), basada en una técnica quirúrgica que evita la proliferación de células epiteliales no deseadas mediante la interposición de una membrana semipermeable entre hueso, raíz dentaria y colgajo, con el objetivo de dar tiempo a las células del tejido periodontal (hueso y ligamento) de multiplicarse y colonizar el defecto tisular. Los primeros artículos científicos sobre regeneración ósea aparecen en la literatura a finales de la década de los años 50, donde Murray y cols., en 1957, demostraron crecimiento de nuevo hueso en fémur, cresta ilíaca y columna vertebral utilizando una barrera para impedir la invasión de tejidos blandos. La reconstrucción de grandes defectos óseos sigue siendo un problema importante. En este sentido, uno de los objetivos actuales de la ingeniería tisular es la regeneración de hueso. En particular, en los defectos de tamaño crítico (grandes defectos que no osifican espontáneamente) (Piskin y cols., 2008) y en los que el diseño de biomateriales para la evaluación de las respuestas celulares / tisulares desempeña un papel clave (Kunert-Keil y cols., 2009).

La ROG, por tanto, consiste en la colocación de membranas barrera situadas de forma aislada o conjuntamente con sustitutos óseos que evitan el colapso o la invaginación del tejido blando sobre la zona a regenerar con el fin de crear unas condiciones apropiadas para la regeneración ósea (Jahangiri y cols., 1998; Retzepe y Donos, 2010; Toscano y cols., 2010; Toneli y cols., 2011; Liu y Kerns, 2014). Persigue la migración de células pluripotenciales y osteogénicas desde el periostio y hueso adyacente hasta la zona del defecto óseo, excluyendo células epiteliales y fibroblastos que impedirían la formación de hueso sustituyéndolo, respectivamente, por tejido epitelial y conectivo. Para conseguir una buena regeneración resulta esencial excluir al epitelio y al tejido conectivo, mantener suficiente espacio para la formación ósea (permitiendo así la invasión de las células osteoprogenitoras), que exista estabilidad del tapón de fibrina, y que haya

un cierre primario de la herida (Liu y Kerns, 2014), promoviendo las condiciones en las que se favorezca la angiogénesis (Saghiri y cols., 2016). Para ello, existen en el mercado membranas no reabsorbibles como las de PTFEc (Gore Tex), micromallas o teflón, y reabsorbibles como el hueso cortical desmineralizado o con colágeno (Irinakis, 2006; Saghiri y cols., 2016).

b. Materiales de injerto. El hueso es el segundo tejido más trasplantado después de la sangre (Oryan y cols., 2014). Todos los materiales de injerto poseen alguno de los mecanismos de acción de osteogénesis, osteoinducción y/u osteoconducción. Estas características se derivan principalmente de su origen y composición. Este tipo de materiales, además, pueden presentarse en partículas o bloques, según lo requiera el caso clínico específico (Tomlin y cols., 2014).

Existen diferentes tipos de injertos, los cuales vamos a clasificar según su origen en:

- Hueso autólogo (autoinjerto). Procedente del mismo individuo y que es considerado el estándar de oro debido a que es el único que reúne las tres características de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Kim y cols., 2014; Tomlin y cols., 2014; Chauhan y cols., 2015). Contiene proteínas, minerales, células óseas vivas de la zona donante y sustrato óseo que favorece la regeneración y el éxito del procedimiento (Liu y Kerns, 2014). Puede obtenerse de regiones extraorales (cresta ilíaca, tibia o calota) y de regiones intraorales (crestas edéntulas, sínfisis mandibular, tuberosidad maxilar, rama ascendente de la mandíbula, torus u exostosis). La fuente del hueso intraoral también es importante porque, cuando el hueso es predominantemente de naturaleza cortical, tiene poco potencial osteogénico; mientras que el hueso esponjoso, que contiene la médula hematopoyética, como la médula ósea roja de la tuberosidad maxilar o de los dientes sanos (8 a 12 semanas después

de la extracción), proporciona un mejor potencial osteogénico. El coágulo óseo es el hueso obtenido usando fresas de alta o baja velocidad mezcladas con sangre (fresado biológico). Se pueden tomar bloques o hueso particulado, tanto trabecular o cortical, como combinado (corticotrabecular). En los bloques, cuando el hueso es predominantemente cortical tiene poco potencial osteogénico frente al trabecular o esponjoso, que tiene mejores propiedades osteogénicas porque contiene médula ósea. El hueso particulado se cosecha utilizando diferentes técnicas, por ejemplo: formar un coágulo óseo fresando el hueso a alta o baja velocidad y mezclarlo con sangre, mezclar el hueso cosechado y colocarlo en una cápsula de amalgama estéril en un vibrador y triturado durante 60 segundos o también se puede recoger hueso con instrumentos de mano como un cincel, un dispositivo de la colección ósea o una cureta.

Es fundamental considerar el origen embrionario del injerto puesto que la respuesta obtenida en la regeneración va a depender estrechamente del mismo (mayor reabsorción con diferentes características embriológicas) (Toneli y cols., 2011). El hueso cortical tiene un contenido mineral más alto que el hueso trabecular o esponjoso. Además, dada la presencia de espacios dentro de la estructura del hueso esponjoso, este último es más osteogénico que el hueso cortical. La rigidez compresiva y la resistencia del hueso cortical son mucho más altas que las del hueso esponjoso. Al seleccionar un injerto o combinación de injertos, el cirujano debe ser consciente de estas diferencias fundamentales en las estructuras óseas.

Los injertos óseos pueden ser corticales, esponjosos o cortico-esponjosos. Los injertos óseos corticales se utilizan principalmente para el soporte estructural y la resistencia, y los injertos óseos esponjosos para la osteogénesis. El apoyo estructural

y la osteogénesis pueden combinarse, lo que es una de las ventajas más importantes del uso de injertos óseos cortico-esponjosos. Los injertos óseos esponjosos se usan comúnmente en la fractura sin unión, defectos maxilofaciales y otros defectos óseos pequeños. Estos injertos carecen de resistencia mecánica, pero son fáciles de usar. Además, la estructura porosa de los injertos óseos esponjosos puede aumentar el crecimiento óseo y mejorar la cicatrización, permitiendo una revascularización más rápida. Los injertos óseos corticales se aplican con menor frecuencia y pueden utilizarse como injertos *onlay*, como el injerto sobrepuesto sobre la cresta alveolar para aumentar la dimensión vertical (el aumento contrapuesto, llamado *venner*, es el aumento de hueso obtenido al colocar un injerto óseo contra la cara vestibular de la cresta ósea para incrementar la dimensión horizontal). El injerto óseo *onlay* se utiliza para aumentar el hueso atrófico fuera de los límites anatómicos del esqueleto. Un ejemplo de un injerto *onlay* es el injerto necesario para aumentar el ancho alveolar atrófico de una futura localización para colocar un implante. Este posicionamiento tridimensional del injerto tiene un papel importante en el curso de la cicatrización y, por lo tanto, en el éxito del injerto y el resultado de la incorporación. Cuando se utiliza un injerto para llenar un defecto óseo dentro de los confines del esqueleto anatómico, el término injerto de incrustación, *inlay*, es más apropiado. Los injertos *onlay* sufren un curso de cicatrización más complicado que los injertos de *inlay*. La tasa de reabsorción de los injertos de *onlay* es más alta para los injertos *inlay* por dos razones: la primera es que los injertos de *onlay* están menos expuestos a la vascularización ósea del receptor, lo que da lugar a una remodelación ósea menor; y, la segunda, los injertos óseos *onlay* están expuestos a las fuerzas de los tejidos blandos circundantes que conducen a una mayor resorción osteoclástica en las áreas expuestas a estas fuerzas (Oryan y cols., 2014).

Pero, a pesar de la gran capacidad regenerativa de estos tipos de injerto, hay que tener en cuenta sus desventajas: la creación de una segunda zona quirúrgica y su consiguiente morbilidad, la dificultad de obtener suficiente cantidad del material de injerto y una mayor tasa de reabsorción (Salked y cols., 2001; Liu y Kerns, 2014; Nazirkar y cols., 2014; Oryan y cols., 2014; Tomlin y cols., 2014).

- Aloinjerto. Son injertos transferidos de diferentes individuos de la misma especie. Se toman de bancos de tejidos siendo su función principal osteoconductora, aportando propiedades mecánicas incluso en defectos amplios (Toneli y cols., 2011; Shendre y cols., 2012). Las ventajas de este tipo de injertos radican en la disponibilidad casi ilimitada de material de injerto, menor morbilidad para el huésped puesto que no se requiere de una segunda zona quirúrgica donante, y reducción del tiempo quirúrgico; pero presenta dos problemas principales, una menor capacidad regenerativa y la posibilidad de transmisión de enfermedades. Por esta última razón, se presentan secos, congelados y desmineralizados (DFDBA) o secos, congelados y mineralizados (FDBA). El desmineralizado expone las proteínas osteoinductivas de la matriz ósea (incluidas las BMP) que pueden ser activadas (Salked y cols., 2001; Iasella y cols., 2003; Di Bella y cols., 2010; Liu y Kerns, 2014; Nazirkar y cols., 2014; Oryan y cols., 2014; Tomlin y cols., 2014; Moshiri y cols., 2016; Sadeghiy cols., 2016).

- Xenoinjertos. Injertos tomados de una especie diferente a la del receptor. El más representativo es la hidroxiapatita natural (HA) y el hueso bovino desproteinizado. Su función principal es osteoconductora, sirviendo de matriz física para la formación de nuevo hueso. La hidroxiapatita natural se extrae de hueso animal, siendo su estructura tridimensional altamente biocompatible con los tejidos adyacentes a la zona receptora (Nazirkar y cols., 2014). En el

caso del hueso bovino, el más extensamente estudiado es el Bio-Oss[®] (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suiza) con un módulo de elasticidad, fuerza compresiva y configuración estructural muy similares al humano. Este tipo de hueso puede permanecer durante largo tiempo en el lugar del injerto debido a que provoca una respuesta antigénica mínima, lo que conlleva a un menor infiltrado inflamatorio en la zona, entre otras (Froum y cols., 2004; Liu y Kerns, 2014; Nazirkar y cols., 2014; Oryan y cols., 2014; Tomlin y cols., 2014).

- Injertos aloplásticos. Son materiales sintéticos inertes cuya función reside en su capacidad osteoconductora, sirven como andamio para la formación de hueso nuevo. Los más frecuentes son el carbonato de calcio, polímeros de vidrio bioactivo, sulfato de calcio y materiales cerámicos como la hidroxiapatita sintética y el fosfato tricálcico (TCP) (Toneli y cols., 2011; Liu y Kerns, 2014; Nazirkar y cols., 2014; Oryan y cols., 2014; Tomlin y cols., 2014). Se ha demostrado que los injertos aloplásticos dan como resultado el llenado de defectos, la estabilización de la estructura ósea restante, la ganancia de unión clínica y la disminución de las profundidades de sondaje (Tomlin y cols., 2014). Presentan algunas características que confieren aspectos negativos para su uso como el largo tiempo de curación, osificación no homogénea, posible aparición de reacción a cuerpo extraño o migración de partículas (Toneli y cols., 2011; Liu y Kerns, 2014; Nazirkar y cols., 2014; Oryan y cols., 2014; Tomlin y cols., 2014).

El hueso sano normal tiene la capacidad de regenerarse espontáneamente durante la remodelación o después de una lesión menor. Sin embargo, si el defecto excede un tamaño crítico y no se cura naturalmente, se requerirá un injerto óseo para regenerar (mediante la adición de un nuevo tejido). Como hemos descrito anteriormente, los biomateriales comunes de injerto óseo incluyen autoinjertos (hueso del

propio paciente), aloinjertos (hueso de cadáver humano), xenoinjertos (hueso animal) y biomateriales sintéticos. De éstos, los autoinjertos se utilizan como el estándar actual ya que son osteogénicos, osteoconductivos y osteoinductivos. Pero, aunque los autoinjertos producen resultados satisfactorios, tienen el riesgo de morbilidad en la zona del donante y están limitados en su disponibilidad. Con los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, cada uno de los cuales tiene su propio conjunto de inconvenientes (Tabla 1), los biomateriales sintéticos están emergiendo como sustitutos potencialmente viables para la regeneración ósea, considerando que satisfacen requerimientos tales como que son biocompatibles, biodegradables y bioactivos (Rodríguez y cols., 2014).

Compuestos tales como las BMP, factores de crecimiento y otros compuestos farmacéuticos han sido incorporados en sistemas de liberación de fármacos específicos para los huesos con el objetivo principal de apoyar la formación de nuevo hueso en el sitio de un defecto y, con esto surge una alternativa prometedora a los autoinjertos, usando sustitutos sintéticos tridimensionales con un sistema de administración de agentes bioactivos (Pullisaar y cols., 2013).

- c. Plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento.** Este tipo de tratamiento es esencialmente un método para concentrar plaquetas y sus factores de crecimiento intrínsecos en el plasma sanguíneo y así poder estimular y acelerar una respuesta de curación (Rodríguez y cols., 2014).

El contenido en factores de crecimiento presente en las plaquetas se puede obtener mediante el método de centrifugado de la propia sangre del paciente. Para ello, es extraída previamente con una aguja de calibre grande, para evitar que se rompan las plaquetas, y depositada en tubos con una solución anticoagulante. La sangre se centrifuga a 5600 rpm y se separa el plasma pobre en plaquetas. Esta se pone en otro contenedor y procesamos la muestra primaria a 2400 rpm separándose en leucocitos y plasma rico en plaquetas (PRP) y en factores de crecimiento (PRGF): esto

Injerto	Propiedades	Ventajas	Inconvenientes
Autoinjerto	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Osteogénico ✓ Osteoconductor ✓ Osteoinductor 	<ul style="list-style-type: none"> - “Gold standard” - No respuesta antigénica - No transmisión enfermedades 	<ul style="list-style-type: none"> - Dolor y morbilidad sitio donante - Cantidad limitada - Mayor tiempo operatorio
Alloinjerto	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Osteogénico ✓ Osteoconductor No osteoinductor 	<ul style="list-style-type: none"> - No morbilidad sitio donante - Alta disponibilidad - Fácil Manejo 	<ul style="list-style-type: none"> - Posible anestesia o sedación - Posible respuesta antigénica - Recursos limitados - Pérdida de propiedades biológicas y mecánicas durante el procesado - Mayor coste
Xenoinjerto	<ul style="list-style-type: none"> No osteogénico ✓ Osteoconductor ✓ Osteoinductor 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo coste - Alta disponibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Posible respuesta antigénica - Posible transmisión de enfermedades - Peores resultados

Tabla 1. Resumen de algunas de las ventajas y desventajas de los tipos de injertos de hueso (Oryan y cols., 2014).

lo convierte en una fuente autógena de factores de crecimiento muy útil al combinarlo con materiales de regeneración. Los factores de crecimiento más importantes son el TGF- β , el factor de crecimiento insulínico, los factores de crecimiento fibroblásticos o el factor de crecimiento derivado de plaquetas. El TGF- β presenta dos formas destacadas en la reparación tisular y la regeneración ósea: TGF- β 1 y TGF- β 2. Entre sus funciones, parecen estimular la osteogénesis al incrementar la angiogénesis, limitar la actividad osteoclástica y favorecer la osteoblástica (Hughes y cols., 2007; Nazirkar y cols., 2014; Rodriguez y cols., 2014; Qi y cols., 2015). El PRP ha demostrado una alta capacidad para mejorar los procesos regenerativos, acelerar la regeneración de defectos periodontales y promover la formación ósea. Entre otros, el tratamiento con PRGF después de la exodoncia del tercer molar ha demostrado tener éxito en la estimulación de la regeneración ósea. También se ha demostrado que el PRGF aumenta la velocidad de la epitelización de la herida de la mucosa oral y mejora la recuperación postoperatoria. Tanto el PRP y el PRGF actúan sobre células ya diferenciadas, tales como preosteoblastos y osteoblastos; sin embargo, no ejercen ningún efecto sobre las células madre presentes en el tejido óseo, cuya diferenciación está regulada por BMP (Rivera y cols., 2013; Nazirkar y cols., 2014).

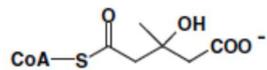
I.3. ESTATINAS.

Las estatinas son fármacos anticolesterolémicos que ejercen su acción a través de la inhibición de la reductasa 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) (Garret y cols., 2001; Maeda y cols., 2001; Jamal y cols., 2004; Baek y cols., 2005; Hughes y cols., 2007; Ahn y cols., 2008; Park, 2009; Chauhan y cols., 2015) (figura 4). Estos han sido diseñados para ser hepatoselectivos debido a que el lugar primario de síntesis de colesterol es el hígado. La enzima HMG-CoA reductasa cataliza la etapa limitante en la biosíntesis del colesterol y, mientras que el colesterol es el producto a granel de la vía

controlada por esta enzima, su producto directo, el mevalonato, es un precursor de una serie de compuestos no esteroideos que son vitales para muchas funciones celulares (Edwards y cols., 2001; Garrett y Mundy, 2002).

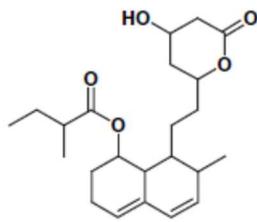
Desde el descubrimiento de la lovastatina, de origen natural, se han introducido en el mercado dos estatinas semisintéticas: la sinvastatina y la pravastatina, y cuatro sintéticas: atorvastatina, fluvastatina, pitavastatina y rosuvastatina (Garrett y Mundy, 2002; Hughes y cols., 2007; Chauhan y cols., 2015; Shah y cols., 2015) (Figura 4) (Horiuchi y Maeda, 2006). La cerivastatina, otra estatina sintética, fue retirada del mercado en el año 2001 debido a los efectos secundarios que producía (Horiuchi y Maeda, 2006; Shah y cols., 2015), entre ellos casos de rabdomiólisis, es decir, la descomposición del tejido muscular que ocasiona la liberación de los contenidos de las fibras musculares en la sangre (Jamal y cols., 2004; Wu y cols., 2009; Grover y cols., 2013; Shah y cols., 2015). Las estatinas sintéticas tienen una potencia más alta en comparación con las estatinas fermentadas (Grover y cols., 2013); la mevastatina, la lovastatina, la sinvastatina y la pravastatina son estatinas naturales derivadas de la fermentación (Horiuchi y Maeda, 2006).

Las estatinas difieren en su lipofilia/hidrofilia que determina su potencial de cruzar las membranas celulares de manera no selectiva por difusión pasiva (Horiuchi y Maeda, 2006). Las hidrófobas entran por la vena porta al hígado difundiendo rápidamente por las membranas celulares en su forma de lactona activa. Una vez en las células del hígado, el anillo de lactona se hidroliza y la forma libre del ácido del fármaco sigue siendo abundante en el hígado antes de la excreción. Las estatinas hidrófilas requieren un transporte activo a las células que se lleva a cabo a través de transportadores que se expresan predominantemente en el hígado. Las estatinas hidrófobas/lipofílicas, como la sinvastatina y la atorvastatina, atraviesan fácilmente la membrana celular para entrar en las células, pero las estatinas hidrófilas, como la pravastatina y la rosuvastatina, requieren mecanismos específicos de transporte en las células hepáticas para su entrada en estas células (Horiuchi y Maeda, 2006). Al margen de cuál sea la vía de entrada a los tejidos, tanto las estatinas hidrófobas como las hidrófilas son específicas del hígado y tienen relativamente poca perfusión en los tejidos distales (Hughes y cols., 2007).

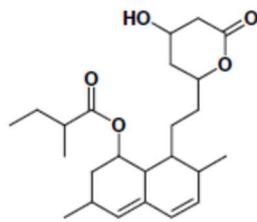


HMG-CoA : Substrate of HMG-CoA reductase

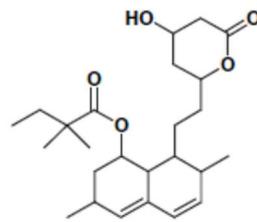
Natural Statins



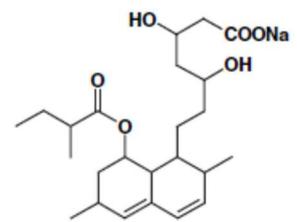
Mevastatin



Lovastatin

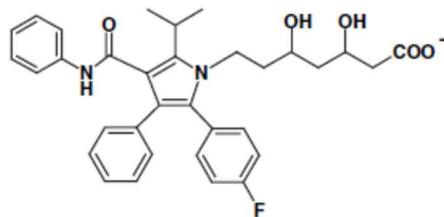


Simvastatin

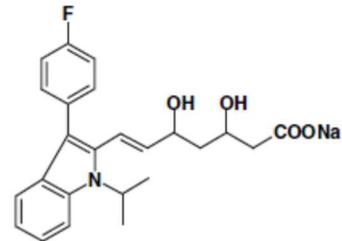


Pravastatin

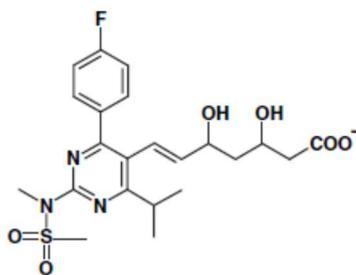
Synthetic Statins



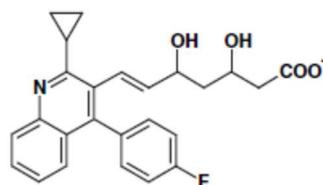
Atorvastatin



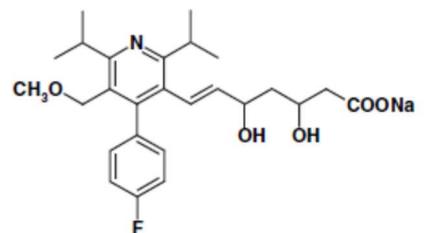
Fluvastatin



Rosuvastatin



Pitavastatin



Cerivastatin

Figura 4. Estructura química de las diferentes estatinas y HMG-CoA, el sustrato enzimático (Horiuchi y Maeda, 2006).

Dentro de este grupo de fármacos, la sinvastatina es el prescrito de forma más frecuente para el control de la hipercolesterolemia, previniendo la síntesis del colesterol (Montero y cols., 2014).

Una de las características de las estatinas es su efecto pleiotrópico (Garret y cols., 2001; Horiuchi y Maeda, 2006; Hughes y cols., 2007; Elavarasu y cols., 2012; Masadeh y cols., 2012; Grover y cols., 2013; Xu y cols., 2014; Kavalipati y cols., 2015; Papadimitriou y cols., 2015), concepto que se describe como el cambio inesperado de varias características cuando se suponía que solamente iba a cambiar una, actuando no solo a nivel cardiovascular sino también poseyendo capacidades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antioxidantes, antitrombóticas, vasodilatadoras, antimicrobianas y de regeneración ósea. En este último punto, se ha observado que es capaz de regular la regeneración ósea tanto a nivel molecular como a nivel celular (Park, 2009; Montero y cols., 2014) y las estatinas lipofílicas o de alta potencia son las que han demostrado un mayor aumento de la DMO, frente a las hidrofílicas (Hernández y cols., 2014).

I.3.1. Sinvastatina.

La sinvastatina es una estatina lipofílica derivada de metabolitos fúngicos y que tiene una semivida de eliminación de 1 a 3 horas (Kheirallah y Almeshaly, 2016). Es el resultado de una modificación química de la lovastatina, una enzima de la vía de síntesis del colesterol (Park, 2009). Es ácido butánico, 2,2-dimetil-, 1,2,3,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-(tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il)-etil]-1naftaleno éster, [1S-[1a,3a,7b,8b(2S*,4S*),-8ab]]; y su fórmula empírica es $C_{25}H_{38}O_5$ (Figura 5) (Elavarasu y cols., 2012; Chauhan y cols., 2015).

La estructura química de la sinvastatina define su solubilidad en el agua, que a su vez influye en su absorción, distribución, metabolismo y excreción (Kheirallah y Almeshaly, 2016). La sinvastatina alcanza niveles sanguíneos sistémicos menores al 5% de la dosis oral consumida debido a su baja absorción y a su gran metabolismo inicial (Satyawar y cols., 2006; Park, 2009; Yang y cols., 2014; Kheirallah y Almeshaly, 2016). Una vez absorbida, es transformada por el citocromo P450 en el hígado (Satyawar y

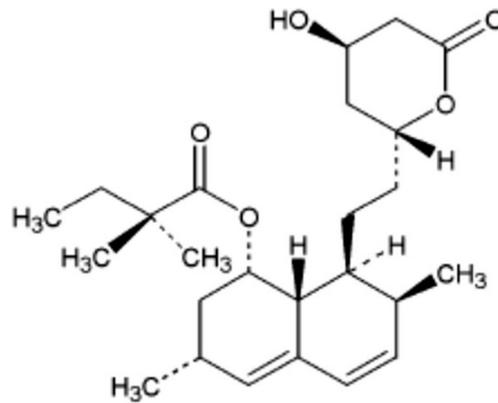


Figura 5. Estructura de la molécula de simvastatina (Elavarasu y cols., 2012; Chauhan y cols., 2015)

cols., 2006; Park, 2009): las estatinas lipofílicas son más susceptibles al metabolismo por las enzimas del sistema citocromo P450; y las hidrofílicas, como la pravastatina o la rosuvastatina, no son tan susceptibles a degradarse mediante este mecanismo (Kheirallah y Almeshaly, 2016). Cuando se administra en dosis lipolíticas, es decir, bajas; estos agentes probablemente no alcanzan concentraciones sanguíneas suficientes para causar de forma fiable aumentos sustanciales en la formación ósea en los seres humanos (Gutiérrez y cols., 2006). Por todo ello, ya que las concentraciones que alcanzan a los OB y OC son muy bajas, se deben desarrollar diferentes aplicaciones que puedan incrementar su presencia en estos tejidos y estimular el proceso regenerativo, no solo a nivel sistémico si no también locales, administrándolas en forma de inyecciones, parches transdérmicos, o aplicaciones directas intralesionales en el caso de regeneraciones óseas quirúrgicas para evitar la citotoxicidad en las células hepáticas que se produciría al administrar dosis altas (Park, 2009; Lee y cols., 2008; Ezirganl y cols., 2013).

I. 3.2 Mecanismo de actuación de la simvastatina en la regeneración ósea.

La acción anabólica de las estatinas sobre el hueso puede resumirse en tres mecanismos principales: estimulación de los OB y, por lo tanto, de la osteogénesis; supresión de la osteoclastogénesis e inhibición de la apoptosis de los osteoblastos (Figura 6) (Zhang y cols., 2014; Moshiri y cols., 2016).

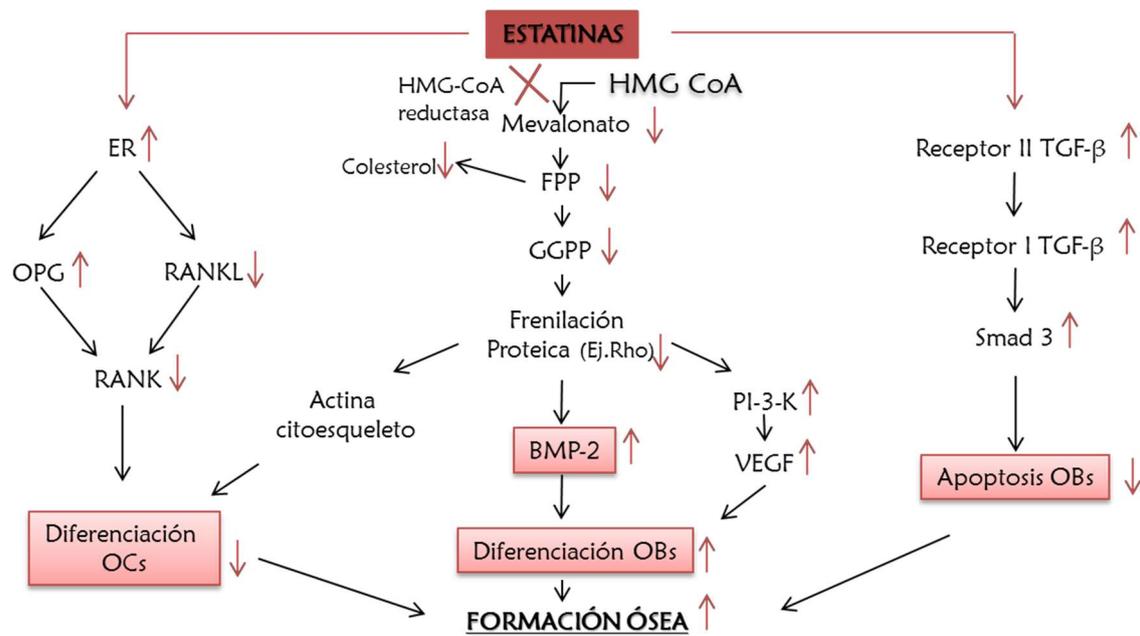


Figura 6. Mecanismos de actuación de las estatinas sobre el metabolismo óseo; de Zhang et al, 2014 (Zhang y cols., 2014).

- Estimulación de la osteogénesis.

La actuación de la sinvastatina sobre los osteoblastos ocurre principalmente a través de la estimulación de la secreción de las BMP. Esto lo consigue antagonizando o suprimiendo el efecto del factor de necrosis tumoral y previniendo la inhibición de la BMP-2 (Martin y cols., 2001; Park, 2009; Chen y cols., 2010; Egusa y cols., 2010; Moon y cols., 2011; Sibai y cols., 2011; Wadagaki y cols., 2011; Zhao y Liu, 2014; Lin y cols., 2016; Moshiri y cols., 2016).

Si partimos del efecto de la sinvastatina sobre la inhibición de la reductasa HMG-CoA, se provoca la interrupción de la cascada de la vía del mevalonato y, como consecuencia, la disminución de sus intermediarios isoprenoides, el farnesil pirofosfato (FPP) y el geranilgeraniol pirofosfato (GGPP). Esta disminución provoca un incremento en la diferenciación osteoblástica, debido a que se disminuye a su vez la frenilación de proteínas de unión al GTP como el Rho, Rac o Rab; y, por tanto, la cascada de transducción de la señal que desencadena un incremento en la expresión de BMP-2 y

osteocalcina. De esta forma, la disminución de FPP y GGPP promueve la diferenciación de los OB (Edwards y cols., 2001; Garret y cols., 2001; Garrett y Mundy, 2002; Horiuchi y Maeda, 2006; Hughes y cols., 2007; Yamashita y cols., 2008; Chen y cols., 2010; Sibai y cols., 2011; Nakashima y Haneji, 2013; Zhang y cols., 2014; Tai y cols., 2015; Moshiri y cols., 2016).

La disminución de la frenilación proteica provoca, además, un estímulo en la neovascularización debido a un aumento en la liberación del VEGF. Este, a su vez, favorece la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso (Garrett y Mundy, 2002; Takenaka y cols., 2002; Horiuchi y Maeda, 2006; Allon y cols., 2014; Zhang y cols., 2014; Chauhan y cols., 2015).

- Inhibición de la apoptosis osteoblástica.

Otro importante efecto sobre los osteoblastos es la inhibición de los fenómenos de apoptosis. Las estatinas interaccionan con los receptores del TGF- β , desencadenando un incremento en la proteína Smad3, cuya función es fundamental para el mantenimiento del hueso ya que favorece su formación e inhibe la apoptosis osteoblástica (Woo y cols., 2000; Yamashita y cols., 2008; Park, 2009; Egusa y cols., 2010; Moon y cols., 2011; Zhang y cols., 2014; Papadimitriou y cols., 2015; Moshiri y cols., 2016).

- Inhibición de la osteoclastogénesis.

Sobre los osteoclastos, las estatinas poseen un efecto inhibitorio a través de su actuación sobre la vía RANK/RANK-L/OPG. Favorece el aumento en la expresión de osteoprotegerina (OPG) y disminuye la de RANKL, provocando la inhibición de la osteoclastogénesis (Moon y cols., 2011; Nakashima y Haneji, 2013; Zhang y cols., 2014; Lin y cols., 2016). Yamashita y cols., en 2010, describieron este proceso como consecuencia del bloqueo de la señal Src intracelular y la activación de la fosforilación de ERK, JNK y AKT (Figura 7). Estos procesos son generados por la acción conjunta de RANKL y BMP-2, que facilitan la activación y diferenciación osteoclástica a través

de la activación de la señal de Src y la inhibición de MAPK y AKT (Horiuchi y Maeda, 2006; Chen y cols., 2010; Yamashita y cols., 2010). El efecto inhibitorio también es explicado por Moon y cols., en 2011, como consecuencia de la supresión en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares (Moon y cols., 2011; Zhao y cols., 2014; Montazerolghaem y cols., 2016).

Otra vía de inhibición osteoclástica es la disminución en la actina del citoesqueleto osteoclástico, con alteración de la maduración y estructuración del mismo. De nuevo, esta situación es consecuencia de la reducción en la frenilación proteica de las FPP y GGPP y conlleva la disminución de la diferenciación del OC (Woo y cols., 2000; Coxon y Rogers, 2002; Hughes y cols., 2007; Kim y cols., 2009).

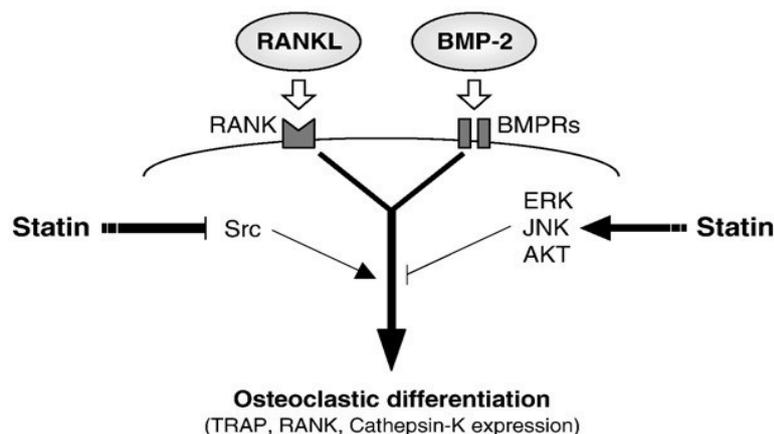


Figura 7. Acción de la sinvastatina sobre la diferenciación osteoclástica. De Yamashita et al, 2010 (Yamashita y cols., 2010).

En la vía RANK/RANKL/OPG también adquieren gran relevancia los estrógenos y sus receptores, cuya unión desencadena una reducción del RANKL y la inhibición del OC. Estos receptores parecen ser estimulados por la sinvastatina y, por tanto, refuerzan este proceso a través de los mismos (Ahn y cols., 2008; Wright y Marshall, 2009; Egusa y cols., 2010; Song y cols., 2010).

- Otros mecanismos de actuación sobre la regeneración ósea.

Otras vías que parecen favorecer la activación de la osteogénesis son: la supresión de la inducción de la matriz de metaloproteinasa-9 (MMP-9) (Egusa y cols., 2010; Kim y cols., 2009; Jin y cols. 2014; Okata y cols., 2015), la estimulación de la actividad de la fosfatasa alcalina, el incremento de la osteocalcina y el aumento de la sialoproteína ósea y colágeno de tipo I, además de poseer propiedades antiinflamatorias por la disminución de la interleuquina-1, 6 y 8 (Baek y cols., 2005; Sakoda y cols., 2006; Satyawana y cols., 2006; Park, 2009; Elavarasu y cols., 2012; Pullisaar y cols., 2013; Kocer y cols., 2014; Zhang y cols., 2014). La osteocalcina se origina de la síntesis osteoblástica y se deposita en el hueso o se libera a la circulación, donde se correlaciona con las medidas histológicas de la formación ósea. La fosfatasa alcalina sérica específica del hueso se localiza en la membrana de los osteoblastos y es el marcador de formación ósea más comúnmente utilizado (Kocer y cols., 2014).

I.3.3 Usos de la sinvastatina.

El uso clásico de la sinvastatina es su empleo como agente antihipercolesterolémico, pero, desde el descubrimiento de sus efectos pleiotrópicos, se ha estudiado su utilización como agente en diferentes aplicaciones.

Osteoporosis.

Los efectos anabólicos sobre la regeneración ósea de estos medicamentos se han estudiado para el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades que generan alteraciones del metabolismo óseo (Garret y cols., 2001; Moshiri y cols., 2016; Monteiro y cols., 2016). La deficiencia de estrógeno aumenta el nivel de colesterol en la sangre y su tratamiento con sinvastatina parece ayudar a la formación de hueso nuevo (Junqueira y cols., 2002; Nassar y cols., 2009).

El efecto de la sinvastatina sobre la vía del RANK/RANKL/OPG y, por lo tanto, sobre la inhibición de la reabsorción ósea, puede ser empleado para el tratamiento de la

osteoporosis, así como para el tratamiento de tumores óseos en los que las células tumorales generen una sobreexpresión del RANK que les facilita la diferenciación y activación tumorales (Ahn y cols., 2008; Yamashita y cols., 2008; Wright y Marshall, 2009; Egusa y cols., 2010; Song y cols., 2010).

Las estatinas se han administrado sistémicamente provocando un aumento de los volúmenes óseos trabeculares y de las tasas de formación ósea en modelos animales. Estudios recientes han demostrado que las estatinas son potentes inhibidores de la resorción ósea y del número de osteoclastos, y hay evidencias de su efecto anabólico (Miller, 1999; De leo y cols., 2003). El potencial formador de hueso de la sinvastatina se ha atribuido a una variedad de factores como antagonizar el TNF, la diferenciación de osteoclastos inducida por BMP-2 y llevarlos a la madurez, la potenciación de la actividad y mineralización de la fosfatasa alcalina, el aumento la sialoproteína, la osteocalcina y el colágeno tipo I, y la disminución de la producción de PGE2, IL-1 e IL-6, con actividad de resorción ósea. Además, la sinvastatina actúa como un inhibidor de osteoclastos y suprime la osteoclastogénesis inducida por RANKL mediante la inhibición de vías de señalización inducidas por especies reactivas de oxígeno (Mansour y cols., 2014). Con esto se explica las propiedades anabólicas y antirresortivas combinadas de las estatinas que podrían usarse en la prevención y terapia de la osteopenia postmenopáusica y la osteoporosis. Además de que el tratamiento con estatinas puede prevenir la enfermedad cardiovascular, disminuyendo los niveles de lípidos plasmáticos y la fractura ósea al aumentar la formación ósea, la asociación de terapia de reemplazo hormonal junto con las estatinas puede reducir más aun el riesgo de fractura ósea al combinar el efecto antirresortivo de la terapia hormonal junto con los efectos anabólicos y antirresortivos de las estatinas (Miller, 1999; De leo y cols., 2003). Del mismo modo, se ha observado que la DMO aumenta más en mujeres postmenopáusicas tratadas con terapia hormonal combinada con estatinas, que cuando se trata con terapia hormonal exclusivamente (De leo y cols., 2003).

Aunque el uso de las estatinas como fármacos beneficiosos en pacientes osteoporóticos aún no ha alcanzado un consenso sobre su efecto real. Hay estudios que no han conseguido probar el beneficio del uso de estatinas en la regeneración ósea

(Oxlund y cols., 2001; Sirola y cols., 2002; Von Stechow y cols., 2003; Baek y cols., 2005; Anbinder y cols., 2006; Yao y cols., 2006; Yee y cols., 2006; Ayukawa y cols., 2009; Chissas y cols., 2010; Issa y cols., 2015; Dai y cols., 2016; Long y cols., 2016; Moshiri y cols., 2016; An y cols., 2017), aunque existen tendencias positivas en la literatura, aún están presentes diversos factores de confusión, como la presencia de enfermedades concomitantes como la diabetes, el tipo de estatina empleada, la dosis utilizada a nivel sistémico, la duración del tratamiento, los hábitos de vida de los pacientes, los métodos de administración, los niveles lipídicos basales y/o las diferencias en la sensibilidad a las estatinas de los OB y OC a diferentes dosis (Satyawan y cols., 2006; Garip y Severcan, 2010; Ezirganl y cols., 2013; Liu y Kerns, 2014; Shah y cols., 2015). También se han estudiado los beneficios de hacer ejercicio como coadyuvante del tratamiento con estatinas en el hueso osteoporótico, ya que esta combinación, además de emplearse en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, aumenta el DMO y la resistencia a la fractura ósea (Skoglund y cols., 2002; De leo y cols., 2003; Lespessailles y Prouteau, 2006; Starnes y cols., 2013; Hao y cols., 2017).

Regeneración ósea.

Durante los procedimientos de regeneración ósea para la ganancia del tejido perdido en determinados tipos de cirugías, el uso de las estatinas en dosis y vías de transporte controladas puede ayudar a estimular células endógenas hacia la producción de hueso funcional (Pytlik y cols., 2003; Oxlund y Andreassen, 2004; Satyawan y cols., 2006; Anbinder y cols., 2007; Saraf y cols., 2007; Du y cols., 2009; Ho y cols., 2009; Bostan y cols. 2011; Sousa y cols., 2014; Shah y cols., 2015). También pueden tener efectos beneficiosos en la enfermedad periodontal con pérdida ósea alveolar y movilidad dentaria (Chang y cols., 2013; Grover y cols., 2013; Price y cols., 2013; Xu y cols., 2014; Zhao y Liu, 2014; Kheirallah y Almeshaly, 2016) y atenuando el daño tisular inducido por radiación, lo que parece estar relacionado con la inhibición de la apoptosis, las actividades antioxidantes, la mejora de la capacidad de transporte de oxígeno, y el aumento de las células progenitoras endoteliales circulantes (Zhao y cols., 2014).

Los efectos de la sinvastatina sobre la expresión de factores de crecimiento como el VEGF o las BMP, son útiles a la hora de favorecer la formación de hueso durante procesos regenerativos (Takenaka y cols., 2002; Horiuchi y Maeda, 2006; Ozec y cols., 2007; Egusa y cols., 2010; Zhou y cols., 2010; Allon y cols., 2014; Zhang y cols., 2014; Moshiri y cols., 2015; Shah y cols., 2015; Tan y cols., 2015; Yan y cols., 2015; Lin y cols., 2016; Montazerolghaem y cols., 2016). En cuanto a su forma de aplicación, se ha estudiado tanto en forma sistémica como local. A nivel sistémico, las concentraciones alcanzadas en la zona de interés son menores junto con una mayor toxicidad (afectación hepática y muscular) (Ho y cols., 2009; Satyawana y cols., 2006). Las estatinas tienen como blanco el hígado y tienen menor afinidad por el tejido óseo, por lo que la dosis oral sistémica necesaria para que las estatinas tengan efecto sobre el hueso es mucho más alta que para reducir los niveles de colesterol y esto se traduce en una toxicidad hepática inaceptable; de hecho, se está trabajando en buscar un transportador más eficaz (ya que el éxito en la formación de hueso se debe a concentraciones locales altas de este fármaco) (Maritz y cols., 2001; Lima y cols., 2010; Zhang y cols., 2016). Una dosis baja de sinvastatina aumenta la reabsorción y disminuye la formación ósea, mientras que las dosis altas disminuyen la resorción ósea y aumentan la formación de hueso a la vez que elevan el riesgo de insuficiencia hepática, enfermedad renal y de otros efectos secundarios (Kheirallah y Almeshaly, 2016) como la aparición de adenomas (Zhang y cols., 2016). Por todo esto, la aplicación a nivel local se muestra más apropiada, aportando una mayor dosis de liberación en el área deseada, sin las consecuencias que supone la liberación a nivel sistémico (Park, 2009; Shah y cols., 2015), y puede lograr concentraciones terapéuticas en el hueso evitando la degradación hepática de las estatinas y así reducir los efectos secundarios sistémicos (Kheirallah y Almeshaly, 2016).

Sobre la regeneración ósea, es importante considerar el efecto antiinflamatorio observado de las estatinas. Éste parece ser beneficioso en procesos de osteoartritis, disminuyendo la destrucción inflamatoria del cartílago y mejorando las condiciones clínicas del paciente, capacidad que podría favorecer los procesos de regeneración ósea (Chan y cols., 2013; Kadam y cols., 2013; Jin y cols., 2014; Funk y cols., 2016). A pesar de ello, se ha observado que, aplicadas a nivel local en determinadas concentraciones, están relacionadas con un aumento de la inflamación, especialmente la sinvastatina,

siendo mayor cuanto mayor es la dosis aplicada (Thylin y cols., 2002; Stein y cols., 2005; Nyan y cols., 2007; Park, 2009; Lima y cols., 2010; Allon y cols., 2014). Sin embargo, cuando se regula esta dosis, podrían obtenerse resultados óptimos en la regeneración ósea, sin la inducción de inflamación que iría en detrimento de la misma (Stein y cols., 2005; Nyan y cols., 2009) o se puede producir inflamación inicial y más tarde se aumenta la angiogénesis y la osteogénesis (Allon y cols., 2014).

Para conseguir promoción ósea efectiva de la sinvastatina, existen diferentes modos de aplicación y de liberación de la misma. Su transportador ha de ser el adecuado para conseguir una buena retención de la molécula en el lugar de aplicación y, por tanto, la infiltración celular en la matriz previa, obteniendo un buen sustrato para el crecimiento y diferenciación celular (Park, 2009; Kheirallah y Almeshaly, 2016). Además, esa matriz facilitará la forma resultante del hueso final y su degradación no deberá afectar al crecimiento óseo, evitando la generación de tejido fibroso encapsulado en la zona a regenerar. La modificación de determinados parámetros en los materiales empleados como medio de transporte de las estatinas pueden ayudar a alcanzar un mayor grado de actuación de las mismas: ratio de degradación, hidrofilia/hidrofobia, modo de degradación, inflamación generada y densidad de entrelazamientos generados (Shah y cols., 2015).

La principal limitación al uso clínico de las estatinas para la regeneración ósea es la falta de un vehículo efectivo para el fármaco, ya que el éxito de la formación ósea depende de altas concentraciones locales de estatinas (Lima y cols., 2010). El efecto de la administración local de las estatinas en el tejido óseo en combinación con varios sistemas de transporte ha sido estudiado por muchos investigadores (Nyan y cols., 2009). Con el fin de transportar y fijar la sinvastatina, se emplean diferentes tipos de vehículos, siendo los más utilizados los hidrogeles, tanto de colágeno como los de ácido hialurónico, gelatina o de polietilenglicol (Rosselli y cols., 2004; Stein y cols., 2005; Park, 2009; Song, 2010; Bae y cols., 2011; Calixto y cols., 2011; Chen y cols., 2011; Mukozawa y cols., 2011; Chan y cols., 2013; Gao y cols., 2013; Oka y cols., 2013; Tai y cols., 2013; Ishihara y cols., 2014; Liu y cols., 2014; Than y cols., 2014; Chang y cols., 2014; del Rosario y cols., 2015; Ferreira y cols., 2014; Fu y cols., 2015; Yan y cols.,

2015; Kheirallah y Almeshaly, 2016; Grover y cols., 2016; Liu y cols., 2016; Samiei y cols., 2016; Zhang y cols., 2016); las soluciones de sinvastatina mezcladas con xenoinjertos o injertos aloplásticos (von Knoch y cols., 2005; Lee y cols., 2008; Nyan y cols., 2009; Jiang y cols., 2013; Huang y cols., 2014; Naito y cols., 2014; Fu y cols., 2015; Papadimitriou y cols., 2015; Chou y cols., 2016; Montazerolghaem y cols., 2016; Santana y cols., 2016); las fibras y esponjas biodegradables (Wong y cols., 2003; Wong y Rabie, 2005; Jeon y cols., 2008; Wadagaki y cols., 2011; Elavarasu y cols., 2012; Kheirallah y Almeshaly, 2016); membranas (Piskin y cols., 2008) o los transportadores lipídicos (Zhou y cols., 2010; Yue y cols., 2016). Para su estudio, también se han aplicado en inyecciones locales (Skoglund y Aspenberg, 2007; Seto y cols., 2008; Kurra y Siris, 2011; Yin y cols., 2011; Elavarasu y cols., 2012; Killeen y cols., 2012; Price y cols., 2013; Yang y cols., 2014; Tan y cols., 2015; Chou y cols., 2016; Funk y cols., 2016; Jahanbin y cols., 2016; Kheirallah y Almeshaly, 2016), en solución sobre la superficie de implantes e injertos de hueso (Ma y cols., 2008; Pauly y cols., 2009; Stadlinger y cols., 2009; Akuyama y cols., 2010; Du y cols., 2011; Pauly y cols., 2012; Yueyi y cols., 2013; Mansour y cols., 2014; Fang y cols., 2015; Sendyk y cols., 2016) o alveolos postextracción (Sato y cols., 2005; Kenichi, 2008; Wu y cols., 2008; Chauhan y cols., 2015).

Es importante considerar ciertas condiciones cuando se selecciona un transportador o un sistema de suministro apropiado para los fármacos: (1) la capacidad del sistema para administrar el fármaco en el momento apropiado y en la dosis apropiada, (2) la presencia de un sustrato que mejorará las células, (3) la presencia de un espacio vacío para permitir la migración celular y promover la angiogénesis, y (4) la capacidad del sistema de administración que al biodegradarse no genere una respuesta inmune o inflamatoria y no produzca efectos tóxicos residuales que inhiban el proceso de reparación (Nyan y cols., 2009).

Propiedades antimicrobianas.

Debido a la inhibición de la reductasa HMG-CoA, las estatinas parecen tener

efectos antivirales, fungicidas y antibacterianos ya que interfieren en los componentes lipídicos de sus membranas celulares (Ikeda y Kato, 2007; Song y Chiu, 2009; Nyilasi y cols., 2010; Masadeh y cols., 2012; Butt y cols., 2015; Graziano y cols., 2015) y se podría usar como tratamiento concomitante a los retrovirales empleados en la infección por VIH (Chauvin y cols., 2013). Contra las bacterias, en algunos casos, podría influir su efecto antiinflamatorio contrarrestando a ciertas toxinas bacterianas que generan un incremento de la inflamación (Pruefer y cols., 2002; Masadeh y cols., 2012) o, incluso, su uso en el control o disminución de *Staphylococcus aureus*, principal causante de las infecciones nosocomiales (Graziano y cols., 2015).

Durante los procesos de regeneración ósea, las propiedades antimicrobianas podrían ayudar a facilitar el proceso regenerativo, disminuyendo el riesgo de complicaciones durante la curación de la lesión y en combinación con agentes antimicrobianos. Existen pocos estudios que valoren las concentraciones necesarias para alcanzar una dosis efectiva a nivel local que pudiera beneficiarse de estos efectos, aunque sería interesante estudiar el efecto sinérgico de las mismas junto con el uso de antibióticos tradicionales debido a las emergentes resistencias bacterianas frente a los antimicrobianos convencionales (Masadeh y cols., 2012; Shah y cols., 2015).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

II.1. JUSTIFICACIÓN.

Durante los últimos veinte años, el uso de los implantes dentales para rehabilitar la estética y la funcionalidad de pacientes totalmente edéntulos se ha convertido en una opción terapéutica predecible y con grandes éxitos a largo plazo (Cacaci y cols., 2019). Sin embargo, esta restauración funcional con implantes puede ser difícil en presencia de grandes defectos óseos, causados generalmente por traumatismos en la región maxilofacial, resecciones en cirugía oncológica o en casos de enfermedad periodontal severa (Guijarro-Martínez y cols., 2011; Huang y cols., 2018). En estos casos, los injertos autólogos de hueso son considerados el material de regeneración de elección, debido a sus propiedades osteogénicas y a su biocompatibilidad (Maddalone y cols., 2018). Sin embargo, los injertos óseos autólogos presentan algunos inconvenientes como son el daño iatrogénico ocasionado en la región donante del hueso autólogo, la limitada cantidad de hueso disponible y la reducción volumétrica a largo plazo del injerto de hueso (Johansson y cols., 2001; Raghoobar y cols., 2007). Para evitar estos problemas, se han desarrollado una amplia variedad de materiales de injerto que sustituyen a los injertos de hueso autólogos. Entre ellos se encuentran los aloinjertos, materiales aloplásticos y los xenoinjertos (John y Wenz, 2004).

Entre los biomateriales para la regeneración ósea basados en fosfatos cálcicos, los más comúnmente utilizados son el fosfato tricálcico (FTC) y la HA (Robani y cols., 2011). La HA es un biomaterial que contiene una proporción de calcio y fosfato en una ratio de 1:67, muy similar a la del hueso natural, mientras que la ratio del FTC es de 1:51 (Shetty y Han, 1991); por lo que la HA es uno de los biomateriales que más se asemeja a la composición mineral del tejido óseo, en términos de su cristalinidad (Rey, 1990). Cuando se usa la HA para regenerar defectos óseos maxilares, ésta se reabsorbe lentamente favoreciendo la precipitación de cristales y la formación de una capa de carbonato de fosfato de calcio que contribuyen a la biomineralización y al proceso de regeneración ósea (Heinz y cols., 2010). Aunque los materiales aloplásticos de HA pueden obtenerse a partir de algas marinas con una estructura cristalina y una

composición y morfología similar a la del hueso (Rodríguez y cols., 2003), la forma de uso más común en regeneración ósea es la de un xenoinjerto de origen natural. El método para obtener esta HA porosa consiste en el procesamiento de hueso bovino fresco, dejándolo libre de cualquier componente antigénico mediante un proceso selectivo de calentamiento a altas temperaturas, el cual no altera la cristalinidad ni la estructura del hueso (Klinge y cols., 1992).

Aunque numerosos artículos científicos han mostrado buenos resultados en estudios *in vivo* donde usaban la HA para la regeneración de defectos óseos en humanos (Rodríguez y cols., 2003) y en modelos de experimentación animal (Klinge y cols., 1992; Thaller y cols., 1994), otros investigadores no han obtenido buenos resultados con este xenoinjerto (Hallman y cols., 2001; Slotte y cols., 2003). En este contexto, los resultados clínicos podrían mejorar aumentando las propiedades osteoconductoras de la HA y, para este fin, la HA puede usarse como un andamio mineral. En este sentido, recientemente ha sido usada combinada con: plasma rico en plaquetas (Durmuşlar y cols., 2014; Taschieri y cols., 2016), células madre (Wang y cols., 2017; Wu y cols., 2018), chitosan (Iqbal y cols., 2017; Wang y cols., 2018), determinados flavonoides como la epigalocatequina-3-galata (EGCG) (Chu y cols., 2017), algunos bifosfonatos de segunda generación, como el alendronato (Ma y cols., 2016), diferentes tipos de estatinas (Pradeep y cols., 2016), siendo la SV la más utilizada (Papadimitriou y cols., 2015; Tao y cols., 2016; Yu y cols., 2017; Hao y cols., 2018; Li y cols., 2018; Shahrezaine y cols., 2018) y otras moléculas o fármacos.

La SV es la estatina semisintética más comúnmente utilizada para el tratamiento de la hipercolesterolemia, basando su acción en prevenir la síntesis de colesterol (Shah y cols., 2015). Como fármaco anticolesterolémico, actúa inhibiendo la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa) (Jamal y cols., 2004). Una de las características de la SV es su efecto pleiotrópico, actuando no solo a nivel cardiovascular sino también con propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antimicrobianas y en la regeneración ósea (Shah y cols., 2015). Con respecto a su actividad en la regeneración de hueso, estudios *in vitro* han demostrado que la SV estimula la expresión en OB del mRNA para la BMP-2 y el VEGF (Maeda y cols., 2003), y estudios con

modelos experimentales *in vivo* han corroborado que la SV promueve la regeneración de defectos óseos (Tylin y cols., 2002; Nyan y cols., 2009).

Sin embargo, el posible efecto sinérgico sobre la regeneración ósea de la combinación de HA y SV podría verse afectado en presencia de enfermedades sistémicas estrechamente ligadas con la dificultad la regeneración de hueso, tales como la DM-I o la osteoporosis (Ezirganli y cols., 2014; Zhang y cols., 2018).

Los pacientes con DM-I pueden sufrir una pérdida de la DMO y una alta predisposición a la osteoporosis (da Conha y cols., 2011; Olei y cols., 2015). La función del OB en pacientes diabéticos mal controlados está comprometida principalmente por los estados de hiperglucemia, los cuales ocasionalmente pueden producir una osteopatía diabética (Antonopoulou y cols., 2013). Al mismo tiempo, situaciones prolongadas de hiperglucemia disminuyen los niveles de osteocalcina, lo cual tiene repercusiones negativas para la regeneración y la remodelación ósea (Starup-Linde, 2013).

La osteoporosis es una de las enfermedades metabólicas más frecuentes. Esta se produce por un desequilibrio entre la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos y la formación de hueso por parte de los osteoblastos (Pacifci, 1996; von Wowern, 2001). En este sentido, la desregulación del sistema RANK/RANKL/OPG envuelta en la fisiopatología de esta desorden metabólico y mineral, puede hacer que la regeneración de defectos óseos en este tipo de pacientes sea más complicada (Liu y cols., 2016).

Los defectos óseos críticos en modelos de experimentación animal se definen como aquellos que no pueden regenerar de forma espontánea (Schmitz y Holliger, 1986). Anatómicamente, la mandíbula de la rata está formada por un par de huesos que nunca llegan a unirse (ni siquiera en la vida adulta del animal) a diferencia de lo que ocurre en otras especies; por lo que en la sínfisis mandibular de estos animales, ambos huesos están unidos exclusivamente por tejido fibroso. Esta característica, hace que la sínfisis mandibular de la rata sea un defecto óseo crítico natural, que ya ha sido utilizado previamente en dos estudios de regeneración ósea, en los que se usó la sínfisis como un modelo de falta de unión ósea congénita (Yagyuu y cols., 2015; Ueyama y cols., 2016).

Hasta la fecha, se desconoce el posible efecto sinérgico de la combinación de HA

y SV en la regeneración de defectos óseos críticos en sujetos sanos, diabéticos y osteoporóticos. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue comparar la formación de nuevo hueso en la sínfisis mandibular de rata (defecto óseo crítico) rellenada con HA con o sin SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos.

II.2. OBJETIVOS.

El **objetivo general** del presente estudio fue comparar la formación de nuevo hueso en la sínfisis mandibular de rata (defecto óseo crítico) rellenada con HA con o sin SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos.

Este puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que permiten sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea el presente estudio.

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Estudiar radiológicamente el nivel de unión ósea de la sínfisis mandibular de rata (defecto óseo crítico), a las 4 y 8 semanas de ser rellenada con HA con o sin SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos.
2. Analizar la densidad mineral ósea de la sínfisis mandibular de rata (defecto óseo crítico), a las 4 y 8 semanas de ser rellenada con HA con o sin SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos.
3. Determinar histológicamente el nivel de unión ósea de la sínfisis mandibular de rata (defecto óseo crítico), a las 4 y 8 semanas de ser rellenada con HA con o sin SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos.
4. Valorar inmunohistoquímicamente la expresión de VEGF en la sínfisis mandibular de rata (defecto óseo crítico), a las 4 y 8 semanas de ser rellenada con HA con o sin SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos.
5. Estudiar inmunohistoquímicamente la expresión de BMP-2 en la sínfisis mandibular de rata (defecto óseo crítico), a las 4 y 8 semanas de ser rellenada con HA con o sin SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos.

III. METODOLOGÍA.

III. METODOLOGÍA.

III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Las ratas utilizadas en este estudio fueron suministradas por el Servicio de Experimentación Animal (REGA ES300305440012) (Unidad de Apoyo a la Investigación) en la Universidad de Murcia (España). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité ético de experimentación animal de la Universidad de Murcia (España) (151/2015) (Anexo 1) y la autoridad competente (A13160607) (Anexo 2), y siguió las Directrices de la Unión Europea para la experimentación animal (EU/63/2010).

Un total de 48 ratas hembra Sprague-Dawley, con un peso entre 247 y 253 g (peso medio de 250 g), se incluyeron en este estudio prospectivo aleatorizado, que tuvo lugar entre noviembre de 2017 y mayo de 2018. Las ratas se alojaron en jaulas ventiladas individualmente con 12/12 horas de ciclos luz/oscuridad, con comida y agua *ad libitum*. Los animales fueron alimentados con una dieta nutricionalmente completa, rica en hidratos de carbono y diseñada para ratas y ratones experimentales (Pb Panlab, Barcelona, España), la cual fue previamente triturada (Robot Coupe[®], Bourgogne, Francia) para que fuera semiblanda. Las ratas se aclimataron durante una semana antes del inicio del estudio.

III.2. ALEATORIZACIÓN.

La aleatorización se realizó usando un servicio online (www.randomization.com). Los animales fueron aleatorizados en tres grupos (n=16 por grupo): Grupo 1 sanas, Grupo 2 diabéticas, y Grupo 3 osteoporóticas (Figura 8).

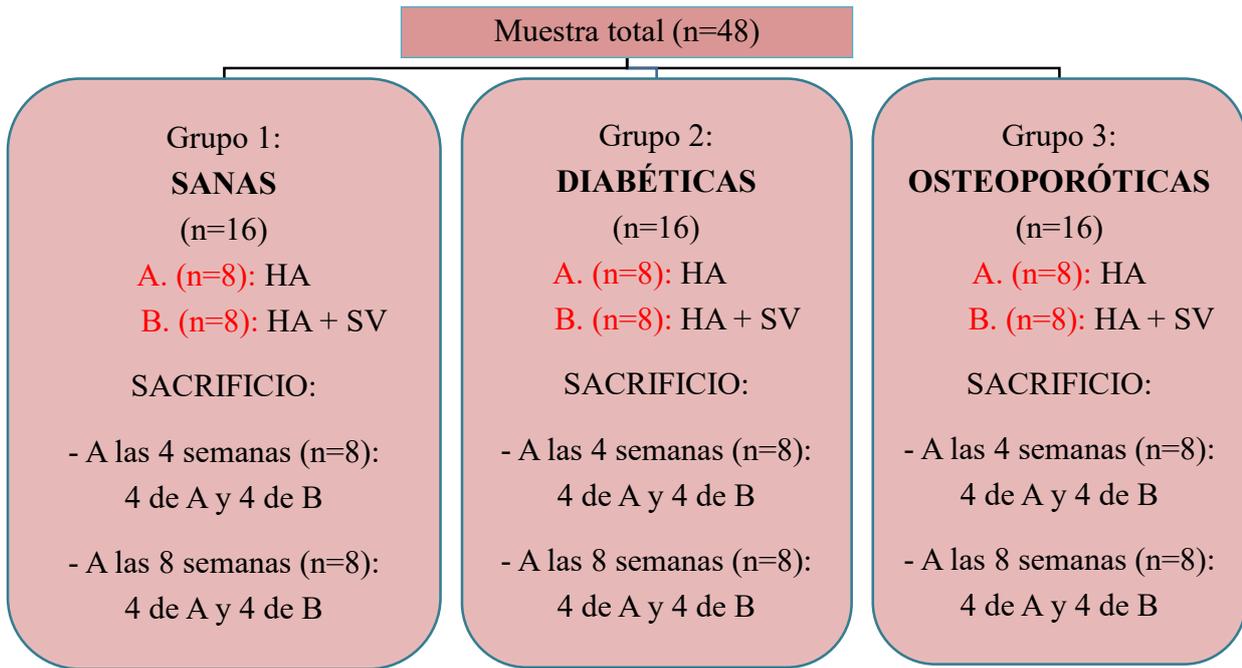


Figura 8: Diagrama de flujo.

III.3. INDUCCIÓN DE LA DM-1.

La DM-1 fue inducida en los 16 animales del Grupo 2 mediante la administración de una dosis única intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España), a una dosis de 55 mg/kg disuelta en tampón citrato (50 mM; pH 4,5), preparada y transportada en condiciones de ausencia de luz hasta su administración (Nascimento-Saba y cols., 1997) (Figura 9).



Figura 9. A: Estreptozotocina. B: Tampón citrato.
C: Preparación en condiciones de ausencia de luz.

Para prevenir la posible hipoglucemia causada por la presencia de altos niveles de insulina en sangre debido a la destrucción de las células β pancreáticas, se añadió glucosa al agua de bebida de los animales (60 g de glucosa por 500 mL de agua) durante 12 horas (Barbirato y cols., 2018). Tras 10 días de la administración intraperitoneal de la STZ, los niveles de glucosa en sangre fueron monitorizados mediante la obtención de una muestra de sangre de la cola de cada animal y procesada en un glucómetro Accu-Check® Performa Nano System (Roche, Barcelona, España). Los animales con niveles de glucosa en sangre por encima de 300 mg/dL fueron considerados diabéticos (Kidder y cols., 2009). Los niveles de glucosa fueron comprobados, una vez por semana durante todo el estudio, para asegurar que todos los animales del Grupo 2 continuaban presentando una DM-1.

III.4. INDUCCIÓN DE LA OSTEOPOROSIS.

La osteoporosis fue inducida en los 16 animales del Grupo 3 mediante la ovariectomía (OVX) bilateral (Zhang y cols., 2012). Bajo condiciones asépticas, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Ketamidor®, Richer Pharma AG, Wels, Austria) y xilacina (Xilagesic®, Laboratories Calier S.A, Barcelona, España) al 50%, administrada por vía intraperitoneal a una dosis de 0,1 mL/100 g de peso. Una vez conseguida la anestesia general, realizamos una incisión cutánea lineal de 10 mm en la línea media del abdomen. Una vez localizada la arteria ovárica en el punto entre el margen inferior de las costillas libres y la cresta ilíaca, usamos una sutura reabsorbible de 4/0 (Laboratories Normon S.S, Madrid, España) que fue anudada alrededor de la arteria y vena ovárica, y posteriormente ambos ovarios fueron extirpados. Los planos musculares fueron reposicionados usando sutura reabsorbible de 4/0 (Laboratories Normon S.A, Madrid, España) y la piel fue suturada mediante sutura no reabsorbible de 4/0 (Ethilon®, Ethicon, Lidingö, Suecia). La analgesia se realizó mediante administración subcutánea de buprenorfina (Bupac®, Richter Pharma AG, Wels, Austria) a una dosis de 0,05 mg/kg antes del procedimiento de OVX (Figura 10). El éxito de la OVX bilateral fue comprobado analizando el ciclo estral tras dos semanas del procedimiento quirúrgico y mediante la comprobación tras el sacrificio, de la atrofia de

los cuernos uterinos (Oliveira y cols., 2019). Los animales no fueron considerados osteoporóticos hasta 6 meses después de las OVX (van Houdt y cols., 2018).

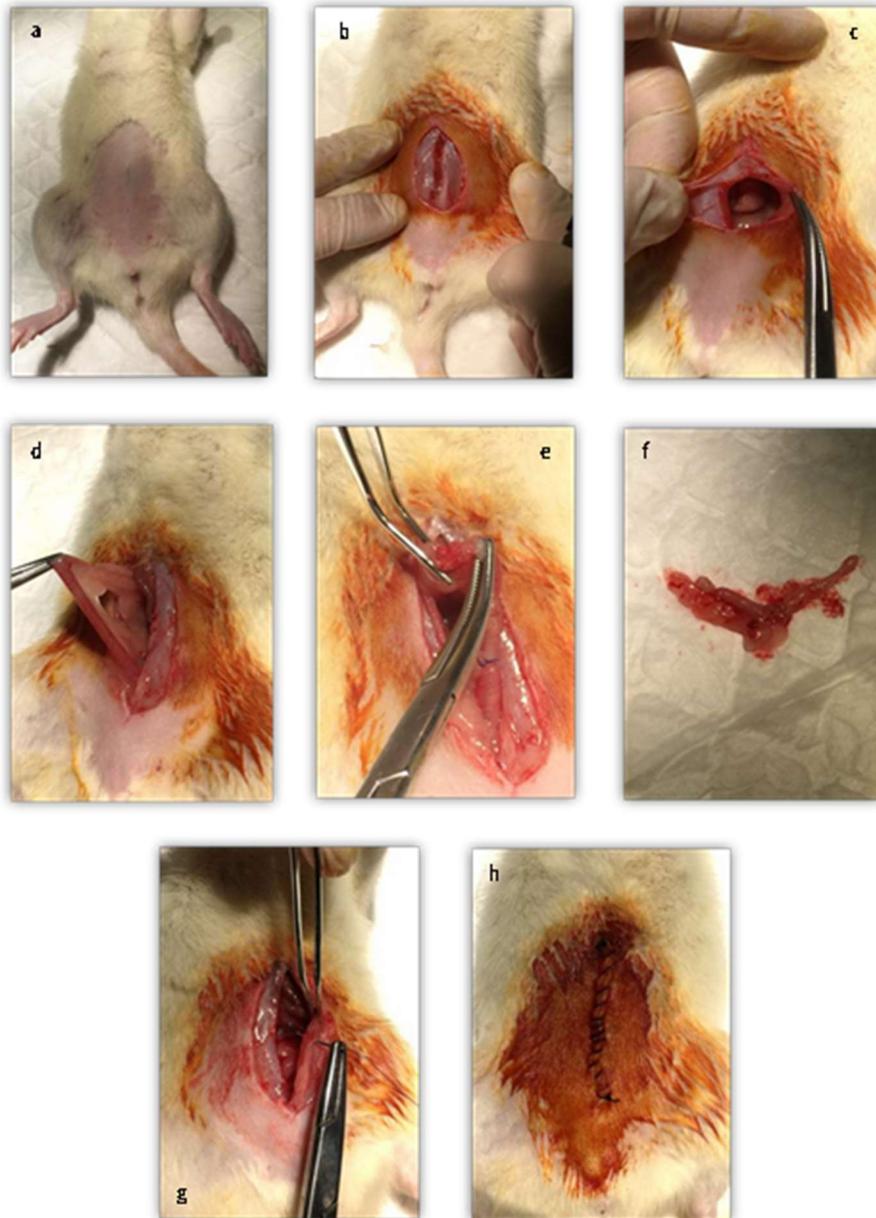


Figura 10. A: Depilación. B: Incisión cutánea. C: Apertura muscular. D: Localización de la trompa de Falopio. E: Ligadura de la arteria y vena ovárica. F: Ovariectomía. G: Sutura de planos musculares. H: Sutura de la piel.

III.5. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.

Todos los animales (n=48) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Ketamidor[®], Richer Pharma AG, Wels, Austria) y xilacina (Xilagesic[®], Laboratories Calier S.A, Barcelona, España) al 50%, administrada por vía intraperitoneal a una dosis de 0,1 ml/100 g de peso. Una vez conseguida la anestesia general, reforzamos la anestesia de la sínfisis mandibular mediante anestesia local con hidrocloreuro de articaína al 4% con epinefrina 1:100.000 (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Francia), logrando, además, un efecto vasoconstrictor para reducir el sangrado quirúrgico. El pelo del animal de la región submandibular fue rasurado, la zona fue lavada con suero fisiológico y, finalmente, aplicamos en la región una solución de povidona yodada. Realizamos una incisión de 10 mm de longitud (en forma de media luna curvada caudalmente), en el borde inferior de la mandíbula (Figura 11A). Posteriormente, la piel fue retirada hasta exponer el periostio (Figura 11B), donde realizamos una incisión adicional para exponer la sínfisis mandibular completamente (Figura 11C). Por último, el tejido fibroso localizado entre las hemimandíbulas derecha e izquierda fue cureteado, exponiendo el defecto óseo crítico natural. La dimensión media de este defecto óseo en una rata Sprague-Dawley adulta de 15 semanas de vida con un peso aproximado de 250 g es de 2 x 4 mm (Yagyuu y cols., 2015) (Figura 11D).

Los defectos óseos críticos de la sínfisis mandibular de 8 animales de cada grupo fueron rellenados con 10 mg de HA porosa inorgánica de origen bovino (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma, Wolhusen, Suiza), mientras que los defectos óseos de los otros 8 animales de cada grupo fueron rellenados con una mezcla de 10 mg de HA (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma, Wolhusen, Suiza) y 0,07 mg de SV (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España) (Figura 12A); siguiendo la dosis de SV tópica propuesta por Rojbaní y cols. (Rojbaní y cols., 2011) y Nyan y cols. (Nyan y cols., 2010), para combinarla con HA en el tratamiento de defectos óseos críticos maxilofaciales (cada mg de biomaterial debe mezclarse con 7 µg de SV). Finalmente, la sutura por planos, empezando por el periostio, se realizó usando sutura reabsorbible de 4/0 (Laboratories Normon S.A, Madrid, España) (Figura 12B). Cuando éste fue suturado, realizamos una exploración intraoral para comprobar la ausencia de dehiscencias y de comunicaciones intraorales

con la sínfisis mandibular (Figura 12C), y finalizamos suturando la piel con seda trenzada de 4/0 (Lorca Marín S.A, Murcia, España) (Figura 12D). La analgesia postoperatoria se realizó mediante administración subcutánea de buprenorfina (Bupac[®], Richter Pharma AG, Wels, Austria) a una dosis de 0,05 mg/kg antes del procedimiento quirúrgico.

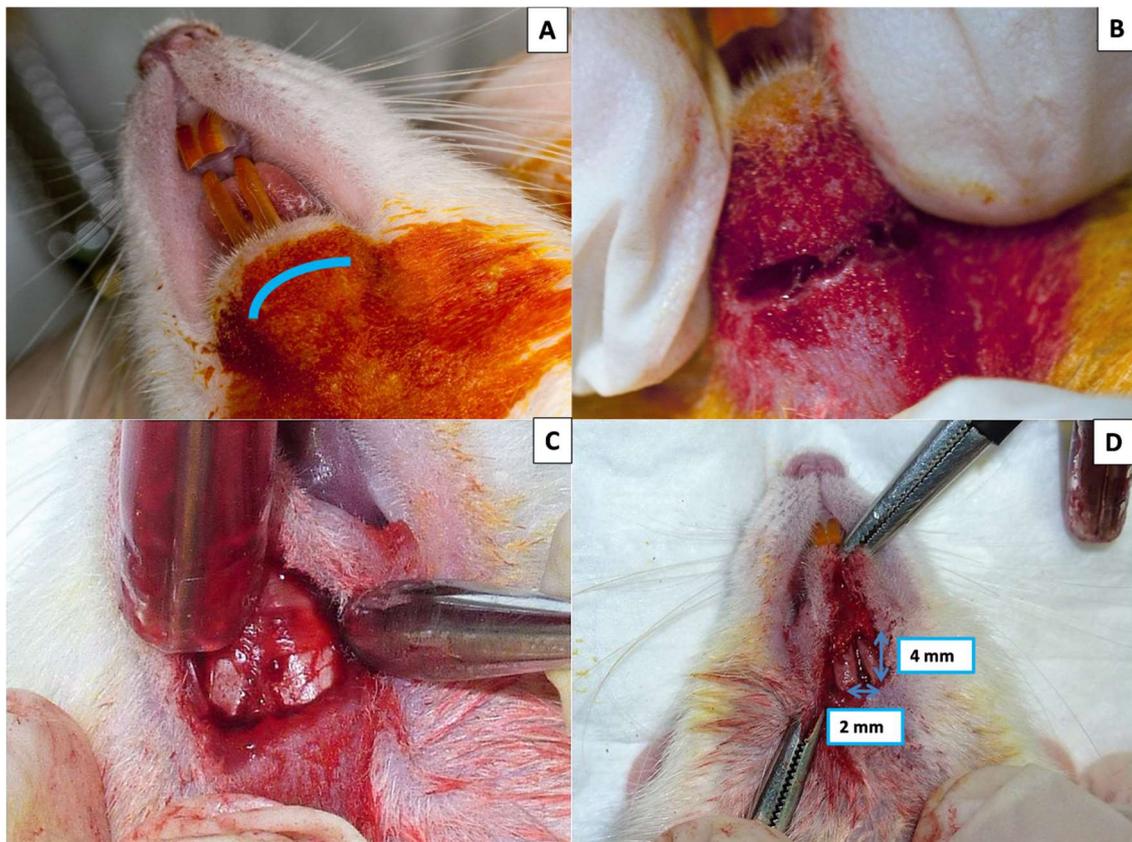


Figura 11. Creación del defecto óseo crítico en la sínfisis mandibular. A: Diseño de la incisión de 10 mm de longitud (en forma de media luna curvada caudalmente), en el borde inferior de la mandíbula. B: Apertura y separación cutánea. C: Incisión adicional en el periostio y exposición del tejido fibroso que une las dos hemimandíbulas en la rata. D: Dimensiones del tejido óseo crítico natural después de curetear el tejido fibroso.

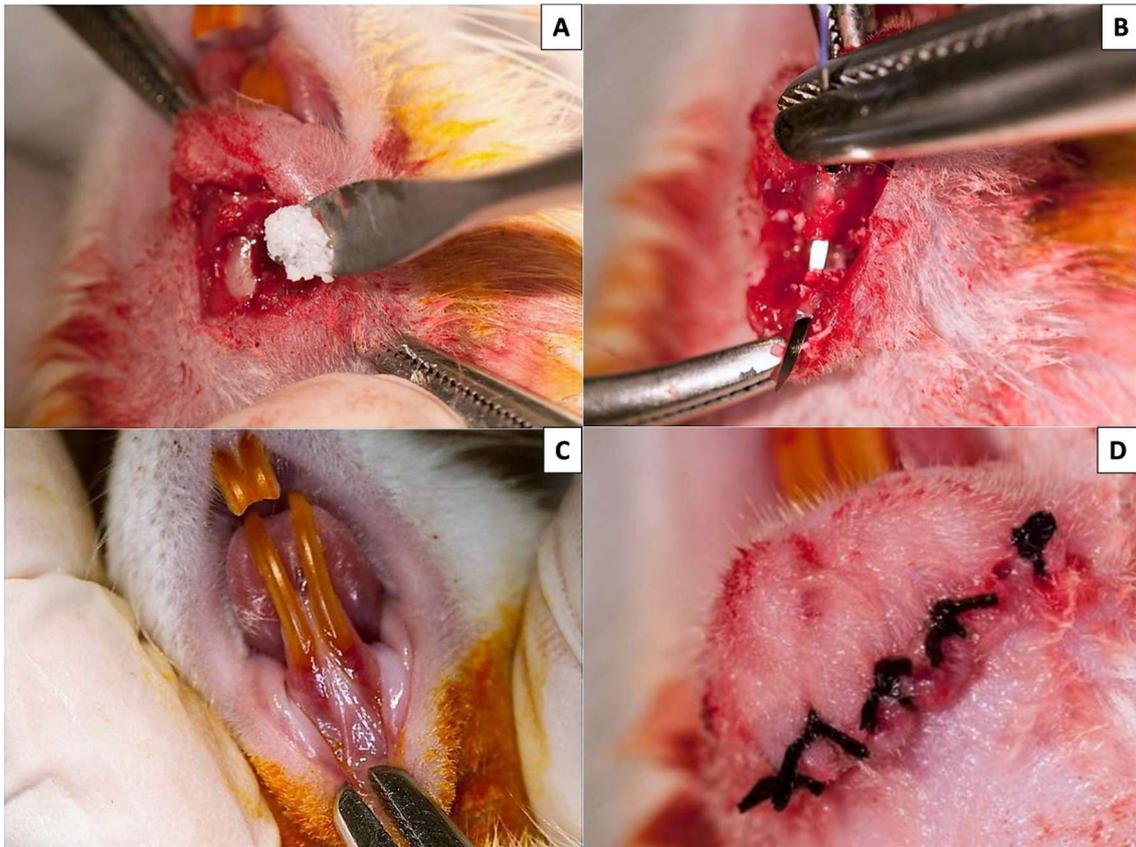


Figura 12. Relleno y cierre quirúrgico del defecto óseo crítico. A: Relleno del defecto óseo en un animal sano con mg de HA y 0,07 mg de SV. B: Sutura del periostio. C: Exploración intraoral para comprobar la ausencia de dehiscencias y de comunicaciones intraorales con la sínfisis mandibular. D: Sutura de la piel.

La mitad de los animales en cada grupo (n=8: cuatro con defectos rellenos con HA y 4 rellenos con HA + SV) (Grupo 1 sanas, Grupo 2 diabéticas y Grupo 3 osteoporóticas) fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ a las 4 semanas de la cirugía; los otros 8 animales de cada grupo (cuatro con defectos rellenos con HA y 4 rellenos con HA + SV) fueron sacrificados a las 8 semanas de la cirugía. Después del sacrificio, las mandíbulas fueron procesadas para: para el análisis radiológico de la unión ósea y de la DMO mediante microtomografía computarizada (Micro-CT), el análisis histológico de la unión ósea; y el análisis inmunohistoquímico de la inmunoreactividad de VEGF y BMP-2.

III.6. ANÁLISIS CON MICRO-CT (UNIÓN ÓSEA RADIOLÓGICA Y ESTUDIO DE LA DMO)

Las mandíbulas fueron analizadas usando un micro-CT Skyscan 1172 (Bruker[®], Konitch, Bélgica) y un escáner preclínico trimodal SPECT/PET/CT Albira (Bruker[®], Massachusetts, EEUU).

Para el micro-CT Skyscan 1172 (Bruker[®], Konitch, Bélgica) usamos los siguientes parámetros: 50 kV de voltaje, corriente de 200 μ A, las muestras fueron rotadas 180° y cada mandíbula fue escaneada a intervalos de 10 μ m, utilizando un filtro de aluminio. Utilizamos el software NRecon para reconstruir las proyecciones radiográficas obtenidas durante el escaneado. Las secciones obtenidas fueron procesadas con el software CTAn y DataViewer (Bruker[®], Konitch, Bélgica). Finalmente, usamos el software CTVox (Bruker[®], Konitch, Bélgica) para generar los modelos 3D de las muestras escaneadas.

Para el escáner preclínico trimodal SPECT/PET/CT Albira (Bruker[®], Massachusetts, EEUU) usamos el software de análisis de imagen médico AMIDE (AMIDE, UCLA University, LA, EEUU) para generar los modelos 3D de las muestras escaneadas.

Las imágenes 3D fueron obtenidas por el micro-CT Skyscan 1172 (Bruker[®], Konitch, Bélgica) y el escáner preclínico trimodal SPECT/PET/CT Albira (Bruker[®], Massachusetts, EEUU) para el análisis de la unión ósea radiológica de la sínfisis mandibular. Las imágenes fueron evaluadas usando una escala de unión radiológica propuesta por Yagyuu y cols. (Yagyuu y cols., 2015): puntuación 0 (formación de nuevo hueso no perceptible) (Figura 13A), puntuación 1 (engrosamiento de hueso cortical a lo largo de los márgenes de la sínfisis mandibular) (Figura 13B), puntuación 2 (hueso de unión con aparentes grietas/fisuras) (Figura 13C) y puntuación 3 (hueso de unión sin grietas/fisuras) (Figura 13D).

Para el estudio de la DMO utilizamos solo las imágenes obtenidas con el escáner preclínico trimodal SPECT/PET/CT Albira (Bruker[®], Massachusetts, EEUU). La DMO fue cuantificada en la línea media de la sínfisis mandibular en unidades Hounsfield (HU),

usando el software de análisis de imagen médico AMIDE (AMIDE, UCLA University, LA, EEUU). Para ello se seleccionaron en cada muestra 4 regiones de interés (ROIs) con un volumen de 1 mm^3 , situadas en la línea media de la sínfisis mandibular y, finalmente, se calculó la media de los 4 ROIs (Camacho-Alonso., 2018) (Figura 13E).

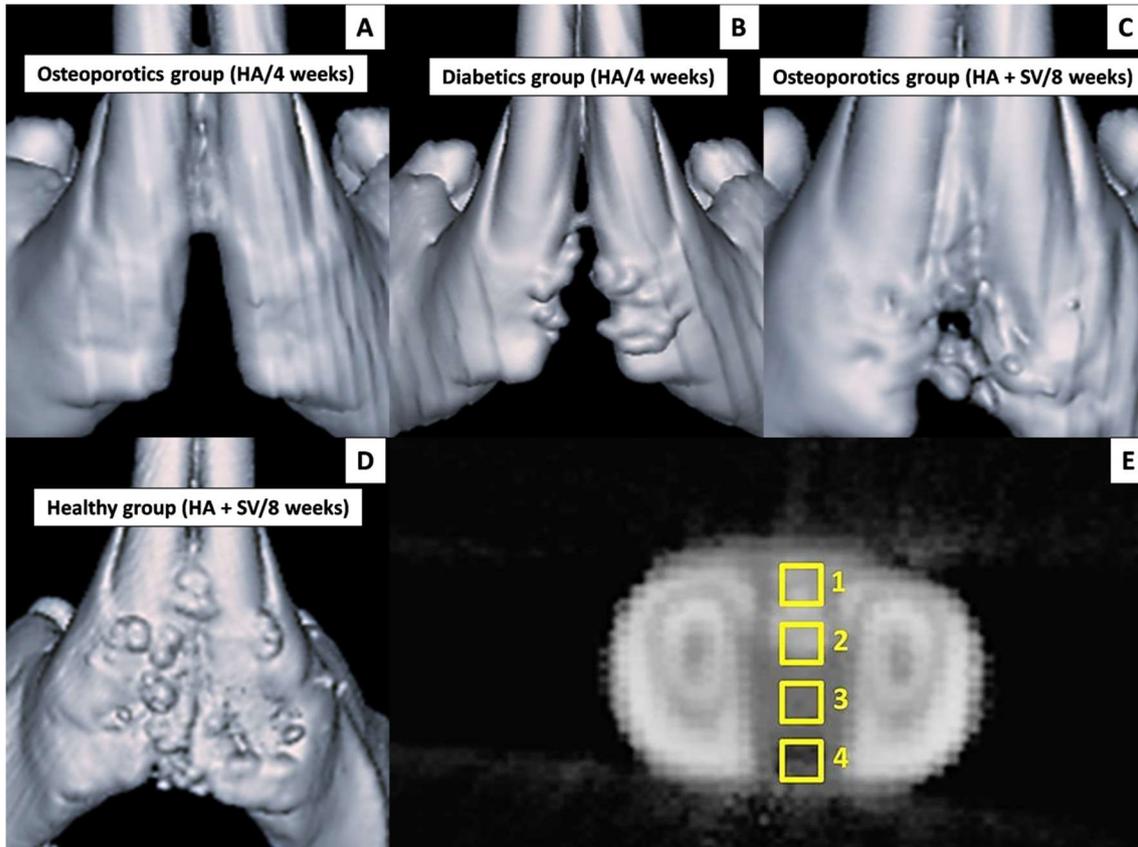


Figura 13. Análisis con micro-CT (unión ósea radiológica y estudio de la DMO). A: Puntuación 0 (formación de hueso no perceptible). B: Puntuación 1 (engrosamiento de hueso cortical a lo largo de los márgenes de la sínfisis mandibular). C: Puntuación 2 (hueso de unión con aparentes grietas/fisuras). D: Puntuación 3 (hueso de unión sin grietas/fisuras). E: Esquema de los 4 ROIs de los cuales fue obtenida la DMO media en HU.

III.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO (UNIÓN ÓSEA HISTOLÓGICA)

Después del análisis con micro-CT, todas las mandíbulas (n=48) fueron fijadas en una solución de formalina tamponada al 10% durante 72 horas. Posteriormente, se lavaron con agua destilada durante 5 minutos y se introdujeron en una solución descalcificante al 10% (W/v) de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y tampón fosfato salino (PBS) a un pH de 7,4 y 25° C. Todas las muestras permanecieron inmersas en la solución descalcificante durante 10-12 días, agitando suavemente las muestras durante todo este tiempo, y añadiendo EDTA cada 3 días. Posteriormente, fueron embebidas en parafina y cortadas con 3 µm de espesor en secciones coronales. Finalmente, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), para revelar detalles celulares, y con azul de toluidina (TB), para teñir la mineralización ósea. Las secciones histológicas fueron evaluadas usando una escala publicada por Salked y cols. (Salked y cols., 2001) y modificada posteriormente por Yaguu y cols. (Yaguu y cols., 2015): puntuación 0 (unión fibrosa con rastros de formación de nuevo cartílago/hueso), puntuación 1 (unión fibrosa con algunas áreas de nuevo cartílago/hueso), puntuación 2 (unión ósea con áreas cartilaginosas) y puntuación 3 (unión ósea completa sin áreas cartilaginosas).

III.8. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

La detección de VEGF y BMP-2 fue realizada usando dos anticuerpos policlonales desarrollados en conejos (ThermoFisher Scientific) y el método complejo de avidina-biotina-peroxidasa (ABC). Después de la rehidratación de las secciones, éstas fueron lavadas con tris-salino tamponado (TBS) a 0,05 M y pH 7.6, tratadas con H₂O₂ al 0,5% en metanol durante 20 minutos, de nuevo lavadas con TBS, y pretratadas con suero porcino (Dako, Carpinteria, California, EEUU) diluido en 100 mL de TBS durante 20 minutos para bloquear los sitios de unión no específicos. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos para VEGF y BMP-2 diluidos 1 en 50 durante 60 minutos, después se lavaron con TBS y se incubaron durante 20 minutos con un anticuerpo biotinilado porcino anti-IgG de conejo (Dako, Carpinteria, California, EEUU) diluido 1 en 250. Finalmente, las secciones fueron lavadas en TBS e incubadas con

reagente ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California, EEUU) durante 20 minutos. La detección de etiquetas se realizó por incubación con el líquido ABC + *Substrate Chromogen System* (Dako, Carpinteria, California, EEUU) y esta reacción fue interrumpida a los 5 minutos mediante agua. Los portaobjetos fueron entonces contrateñidos en hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, enjuagados después con agua y cubiertos. La expresión de VEGF y BMP-2 fue analizada mediante un análisis semicuantitativo usando una escala de 0 a 3: puntuación 0 (negativo), puntuación 1 (leve), puntuación 2 (moderado) y puntuación 3 (severo).

III.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL, EEUU). Realizamos un estudio descriptivo de cada variable. Aplicamos el test de normalidad de Komogorov-Smirnov y el test de homogeneidad de la varianza de Levene, y los datos mostraron una distribución no normal, por lo que la estadística inferencial se realizó mediante test no paramétricos. Para el análisis de las variables cuantitativas utilizamos el test U de Mann-Whitney. El nivel de significatividad estadística fue aceptado para $p \leq 0,05$.

IV.RESULTADOS.

IV. RESULTADOS.

Análisis con micro-CT (unión ósea radiológica y estudio de la DMO).

En todos los grupos, el análisis con micro-CT de la unión ósea radiológica indicó puntuaciones más altas en los defectos óseos críticos rellenos con HA + SV que en los tratados únicamente con HA, con diferencias estadísticamente significativas tanto a las 4 semanas (Grupo 1 $p=0,032$, Grupo 2 $p=0,032$ y Grupo 3 $p=0,011$) como a las 8 semanas después de la cirugía (Grupo 1 $p=0,017$, Grupo 2 $p=0,017$ y Grupo 3 $p=0,011$) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la escala de unión ósea radiológica (test U de Mann-Whitney).

ESCALA DE UNIÓN ÓSEA RADIOLÓGICA A LAS 4 SEMANAS						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	2 (50)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	4 (100)	0 (0)
1	2 (50)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	0 (0)	3 (75)
2	0 (0)	3 (75)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	1 (25)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mediana (rango)	0.50 (0.00-1.00)	2.00 (1.00-2.00)	0.00 (0.00-1.00)	1.50 (1.00-2.00)	0.00 (0.00-0.00)	1.00 (1.00-2.00)
<i>p</i> -valor	0.032		0.032		0.011	
ESCALA DE UNIÓN ÓSEA RADIOLÓGICA A LAS 8 SEMANAS						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	1 (25)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	3 (75)	0 (0)
1	3 (75)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	0 (0)
2	0 (0)	2 (50)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	4 (100)
3	0 (0)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
Mediana (rango)	1.00 (0.00-1.00)	2.50 (2.00-3.00)	0.50 (0.00-1.00)	2.00 (2.00-3.00)	0.00 (0.00-1.00)	2.00 (2.00-2.00)
<i>p</i> -valor	0.017		0.017		0.011	

Del mismo modo, en todos los grupos, la DMO fue más alta en los defectos óseos críticos rellenos con HA + SV que en los tratados únicamente con HA, con diferencias estadísticamente significativas tanto a las 4 semanas después de la cirugía (Grupo 1

$p=0,021$, Grupo 2 $p=0,021$ y Grupo 3 $p=0,021$) como a las 8 semanas (Grupo 1 $p=0,021$, Grupo 2 $p=0,021$ y Grupo 3 $p=0,021$) (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre los grupos de la DMO en HU (test U de Mann-Whitney).

BMD a las 4 semanas						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4)	HA + SV (n=4)	HA (n=4)	HA + SV (n=4)	HA (n=4)	HA + SV (n=4)
Mediana (rango)	250.28 (227.45-260.29)	430.81 (425.78-445.79)	200.58 (183.57-210.35)	340.32 (325.16-357.43)	89.37 (81.29-92.12)	205.59 (195.58-211.32)
valor	0.021		0.021		0.021	
BMD a las 8 semanas						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4)	HA + SV (n=4)	HA (n=4)	HA + SV (n=4)	HA (n=4)	HA + SV (n=4)
Mediana (rango)	482.29 (465.78-490.24)	753.31 (739.12-771.45)	373.20 (355.78-381.85)	602.37 (595.17-621.59)	211.23 (197.23-215.38)	401.29 (392.17-409.47)
p-valor	0.021		0.021		0.021	

Análisis histológico (unión ósea histológica).

En todos los grupos, el análisis de la unión ósea histológica indicó puntuaciones más altas en los defectos óseos críticos rellenos con HA + SV que en los tratados únicamente con HA, con diferencias estadísticamente significativas tanto a las 4 semanas después de la cirugía (Grupo 1 $p=0,011$, Grupo 2 $p=0,032$ y Grupo 3 $p=0,032$) como a las 8 semanas (Grupo 1 $p=0,011$, Grupo 2 $p=0,015$ y Grupo 3 $p=0,013$) (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la escala de unión ósea (test U de Mann-Whitney).

ESCALA DE UNIÓN ÓSEA HISTOLÓGICA A LAS 4 SEMANAS						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	1 (25)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	3 (75)	0 (0)
1	3 (75)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	2 (50)
2	0 (0)	4 (100)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	2 (50)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mediana (rango)	1.50 (0.00-1.00)	2.00 (2.00-2.00)	0.50 (0.00-1.00)	2.00 (1.00-2.00)	0.00 (0.00-1.00)	1.50 (1.00-2.00)
<i>p</i> -valor	0.011		0.032		0.032	
ESCALA DE UNIÓN ÓSEA HISTOLÓGICA A LAS 8 SEMANAS						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	0 (0)
1	4 (100)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	2 (50)	0 (0)
2	0 (0)	1 (25)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	4 (100)
3	0 (0)	3 (75)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
Mediana (rango)	1.00 (1.00-1.00)	3.00 (2.00-3.00)	1.50 (0.00-1.00)	2.00 (2.00-3.00)	0.50 (0.00-1.00)	2.00 (2.00-2.00)
<i>p</i> -valor	0.011		0.015		0.013	

Análisis inmunohistoquímico.

Finalmente, la expresión de VEGF fue observada en áreas de osificación en células mesenquimatosas pobremente diferenciadas con morfología fusiforme o estrellada, citoplasmas ampollosos y núcleos eucromáticos. En las áreas donde aparecía tejido óseo bien diferenciado, el etiquetado apareció en células fusiformes localizadas en el periostio y en menor medida en algunos osteoblastos. Ocasionalmente, los vasos de los conductos de Havers estaban marcados (Figuras 14A y 14B). Del mismo modo, la expresión de BMP-2 ocurría en las células localizadas en la matriz ósea (osteocitos/osteoblastos), y era especialmente evidente en áreas de osificación endocondral.

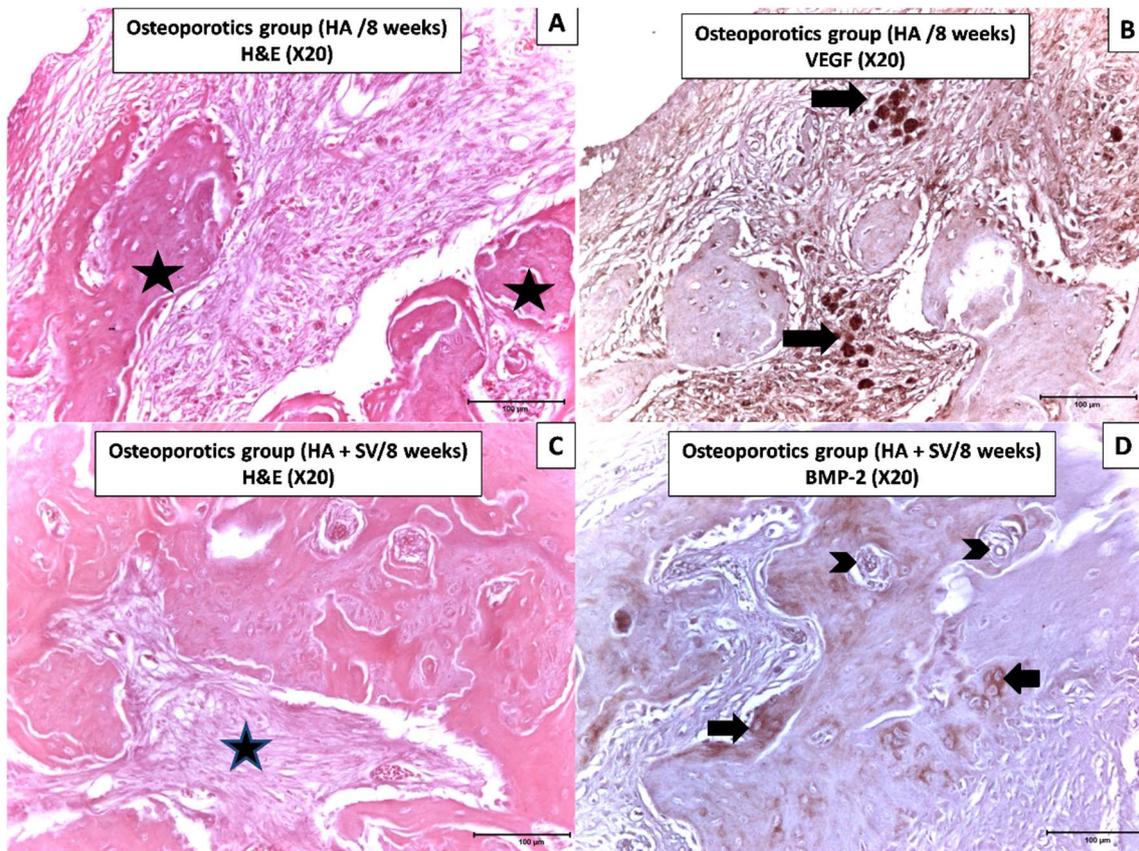


Figura 14. A: Tinción con HE a 20X donde se observa la formación de pequeñas espículas óseas (asteriscos) rodeadas por tejido mesenquimal. B: Método ABC a 20X de la sección adyacente a la de A donde la inmunopositividad para VEGF se observa en grupos de células pobremente diferenciadas (flechas) con morfología fusiforme y oval, amplio citoplasma y localizadas en la proximidad de espículas óseas en formación. C: Tinción con HE a 20X donde se observa un área tejido osificado nuevamente formado. D: Método ABC a 20X de la sección adyacente a la de C donde la inmunopositividad para BMP-2 se observa en pequeños grupos de osteoblastos rodeados por matriz osteoide (puntas de flecha), así como difusamente en áreas de matriz osteoide (flechas).

En todos los grupos, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de VEGF indicó mayor positividad en los defectos óseos críticos rellenos con HA + SV que en los tratados solamente con HA, con diferencias estadísticamente significativas a las 4 semanas después de la cirugía en el Grupo 3 ($p=0,032$), y a las 8 semanas en los Grupos 2 y 3 ($p=0,034$ y $p=0,025$ respectivamente) (Tabla 5).

Del mismo modo en todos los grupos, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de BMP-2 indicó mayor positividad en los defectos óseos críticos rellenos con HA + SV que en los tratados únicamente con HA, con diferencias estadísticamente significativas en el Grupo 3, tanto a las 4 semanas después de la cirugía ($p=0,040$) como a las 8 semanas ($p=0,032$) (Tabla 6).

Tabla 5. Resultados de la expresión de VEGF (test U de Mann-Whitney).

Puntuaciones	EXPRESIÓN DE VEGF A LAS 4 SEMANAS					
	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	3 (75)	0 (0)
1	1 (25)	0 (0)	1 (25)	2 (50)	1 (25)	2 (50)
2	3 (75)	3 (75)	1 (25)	2 (50)	0 (0)	2 (50)
3	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mediana (rango)	2.00 (1.00-2.00)	2.00 (2.00-3.00)	0.50 (0.00-2.00)	1.50 (1.00-2.00)	0.00 (0.00-1.00)	1.50 (1.00-2.00)
<i>p-valor</i>	0.186		0.222		0.032	
Puntuaciones n (%)	EXPRESIÓN DE VEGF A LAS 8 SEMANAS					
	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	0 (0)
1	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (25)	0 (0)
2	2 (50)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	1 (25)
3	2 (50)	4 (100)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	3 (75)
Mediana (rango)	2.50 (2.00-3.00)	3.00 (3.00-3.00)	1.50 (0.00-2.00)	3.00 (2.00-3.00)	0.50 (0.00-2.00)	3.00 (2.00-3.00)
<i>p-valor</i>	0.127		0.034		0.025	

Tabla 6. Resultados de la expresión de BMP-2 (test U de Mann-Whitney).

EXPRESIÓN DE BMP-2 A LAS 4 SEMANAS						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	3 (75)	0 (0)
1	3 (75)	2 (50)	2 (50)	3 (75)	1 (25)	4 (100)
2	1 (25)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mediana (rango)	1.00 (1.00-2.00)	1.50 (1.00-2.00)	0.50 (0.00-1.00)	1.00 (1.00-2.00)	0.00 (0.00-1.00)	1.00 (1.00-1.00)
<i>p</i> -valor	0.495		0.096		0.040	
EXPRESIÓN DE BMP-2 A LAS 8 SEMANAS						
Puntuaciones	Sanas		Diabéticas		Osteoporóticas	
	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)	HA (n=4) n (%)	HA + SV (n=4) n (%)
0	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	0 (0)
1	1 (25)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	2 (50)	1 (25)
2	3 (75)	4 (100)	1 (25)	3 (75)	0 (0)	3 (75)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mediana (rango)	2.00 (1.00-2.00)	2.00 (2.00-2.00)	1.00 (0.00-2.00)	2.00 (1.00-2.00)	0.50 (0.00-1.00)	2.00 (1.00-2.00)
<i>p</i> -valor	0.317		0.155		0.032	

V.DISCUSIÓN.

V. DISCUSIÓN.

A la hora de investigar los efectos de un biomaterial osteoconductor en el proceso de regeneración ósea y el posible efecto sinérgico de un fármaco con propiedades osteoinductoras sobre ese biomaterial, nos encontramos tres problemas básicos respecto a la selección del modelo animal para dicha investigación: primero, la selección del animal de experimentación; segundo, la localización anatómica del defecto óseo; y, tercero, la generación de dicho defecto (Pilia y cols., 2013; Gothard y cols., 2014; Yaguu y cols., 2015).

En relación al primer problema (selección del animal de experimentación), lo más importante es que el animal seleccionado presente unas características anatómicas, fisiológicas y fisiopatológicas análogas a los humanos (Gothard y cols., 2014). En nuestro estudio hemos seleccionado la rata como animal de experimentación para analizar el posible efecto sinérgico de la HA combinada con SV en la regeneración ósea de defectos óseos críticos. En este sentido, en una revisión de la literatura publicada por O'Loughlin y cols. (O'Loughlin y cols., 2008), en el año 2008, sobre las especies más utilizadas por los investigadores en modelos de regeneración ósea, destacaba el uso de ratas en un 38% de los estudios, seguido por los conejos en un 19%, ratones 15%, ovejas 11%, perros 9%, cabras 4% y otras especies (entre las que se incluyen *micropig*, *monkey*, etc.) el 4% restante. Quizá, la posible explicación de la preferencia del uso de ratas en modelos de regeneración ósea se deba a su elevada biodisponibilidad, bajo coste, fácil manejo en el laboratorio, baja tasa de rechazo a los biomateriales estudiados en los modelos de regeneración ósea, además de tener una composición química ósea similar a la del hueso humano (Pinheiro y cols., 2014).

Respecto al segundo problema (localización anatómica del defecto óseo), los animales de experimentación de pequeño tamaño como la rata dificultan la selección de la localización anatómica donde crear el defecto óseo crítico (Malhotra y cols., 2014). Este problema ha hecho que, en estudios de biomateriales para la regeneración ósea maxilar, se hayan seleccionado zonas extraorales para provocar el defecto óseo crítico, fundamentalmente la calota craneal (Ezirganli y cols., 2014; Barbirato y cols., 2018) y el

fémur (van Houdet y cols., 2018; Zhang y cols., 2018). Sin embargo, en el estudio de la capacidad regenerativa de hueso de biomateriales que van a ser utilizados en maxilares, lo ideal sería crear el defecto óseo en los propios maxilares para reproducir las características anatómicas del hueso, su relación con los tejidos blandos adyacentes, la vascularización de la zona, así como las condiciones de carga mecánica y de movilidad de los maxilares durante la masticación (Schortinghuis y cols., 2004; Liu y cols., 2016).

El tercer y último problema en el diseño del modelo experimental, está en la propia generación del defecto óseo crítico, ya que, aun utilizando la mandíbula del propio animal, el hecho de generar el defecto óseo mediante una trefina provoca un daño iatrogénico que puede afectar al proceso de regeneración (Yagyuu y cols., 2015). Para evitar la acción del proceso reparativo biológico que se produce tras la generación iatrogénica de un defecto óseo experimental, y que puede alterar el análisis de la eficacia del biomaterial estudiado, en nuestro estudio nosotros no hemos generado un defecto óseo, sino que hemos aprovechado que la sínfisis mandibular de la rata no presenta hueso sino tejido fibroso interpuesto entre las hemimandíbulas derecha e izquierda. Esta particularidad, convierte a la sínfisis mandibular de la rata en un defecto óseo crítico natural que ha sido empleado por varios autores como un modelo de ausencia congénita de unión ósea para estudios de regeneración ósea. Yagyuu y cols., (Yagyuu y cols., 2015), en el año 2015, describieron este modelo animal usando el defecto óseo crítico natural de la sínfisis mandibular de rata para evaluar el efecto de una terapia celular en la regeneración ósea. Al comparar en la sínfisis mandibular la aplicación de una biocerámica porosa de fosfato cálcico sola o combinada con células madre de médula ósea (BMSCs), observaron que, a las 8 semanas de la aplicación de ambos tratamientos, las sínfisis mandibulares rellenas con biocerámica y BMSCs mostraron mejores resultados en las escalas de unión ósea radiológica e histológica. Ueyama y cols., (Ueyama y cols., 2016), en el año 2016, utilizaron este mismo modelo experimental para comparar la capacidad regenerativa del defecto al aplicar células madre de matriz osteogénica (OMSCSs) y compararlo con defectos mandibulares controles sin tratamiento, observaron que a las 2, 4 y 8 semanas de la aplicación, las sínfisis rellenas con OMSCSs mostraron mejores resultados en las escalas de unión ósea radiológica e histológica.

El presente estudio es la primera investigación que compara la formación de nuevo hueso en defectos óseos críticos (usando la sínfisis mandibular de la rata como un defecto óseo crítico congénito), tratados únicamente con HA o conjuntamente con SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos. Los resultados evidenciaron que en todos los grupos de estudio (sanos, diabéticos osteoporóticos) los defectos óseos rellenados con HA combinada con SV mostraron una mayor unión ósea radiológica, BMD, unión ósea histológica y una mayor positividad para VEGF y BMP-2, al compararlos con los defectos óseos tratados con HA exclusivamente. En este sentido, en los últimos años han sido publicados diversos estudios en los que se combina la SV con la HA para estudiar su posible efecto sinérgico en la regeneración de defectos óseos críticos (Li y cols., 2018; Hao y cols., 2018; Yu y cols., 2017; Tao y cols., 2016; Papadimitriou y cols., 2015). La SV es una lactona inactiva que tras su administración oral es convertida a su forma activa como ácido abierto dihidroxi mediante la enzima intracelular citocromo P450 (isoenzima 3A4) en el hígado (Park, 2009). Sin embargo, fundamentalmente debido a su baja absorción, se estima que las dosis en circulación sistémica son inferiores al 5% de la dosis oral consumida (Gutiérrez y cols., 2006). Por este motivo, para comprobar su posible efecto potenciador sobre biomateriales osteoconductores, se suele aplicar directamente de forma tópica sobre el defecto óseo crítico (Hao y cols., 2018).

Los buenos resultados obtenidos en nuestro estudio parecen estar relacionados con la acción de la SV sobre la BMP-2 y el VEGF (Park, 2009). Por un lado, en los últimos años se ha demostrado que la SV es capaz de revertir los efectos supresores del factor de necrosis tumoral e impedir la inhibición de BMP-2 mediada por Smad 1, 5 y 8 (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols., 2006). Además, se ha comprobado que la SV estimula la expresión de VEGF en el hueso (a través de la activación de la vía p44/p42 MAP kinase) y que esta estimulación puede promover la diferenciación osteoblástica y la formación de nuevo hueso (Takenaka y cols., 2003).

Resultados similares a los nuestros han sido publicados por otros autores en animales sanos (Papadimitriou y cols., 2015; Li y cols., 2018). En el año 2015, Papadimitriou y cols. (Papadimitriou y cols., 2015) también estudiaron el posible efecto de la SV como promotor de la regeneración ósea de defectos óseos críticos de 5 mm de

diámetro creados en los fémures de 14 conejos albinos de Nueva Zelanda sanos, al combinar esta estatina con tres biomateriales: injerto de hueso bovino inorgánico (BOS), HA combinada con sulfato cálcico (HACS), y esponja de colágeno (COS). Como ocurría en nuestro estudio, tanto a las 4 como a las 8 semanas de la cirugía, la regeneración de los defectos óseos críticos fue mayor al combinar los biomateriales con la SV que al aplicarlos solos, obteniendo los mejores resultados con la combinación de BOS + SV a las 4 semanas, y la combinación de HASC + SV a las 8 semanas. Del mismo modo, en el año 2018, Li y cols. (Li y cols., 2018) también analizaron la posible acción promotora de la SV sobre la regeneración ósea de defectos óseos críticos de 5 mm de diámetro creados en la calota craneal de 20 ratas Wistar sanas, estos autores compararon la aplicación de un andamio de quitosán (CH)/nano-HA sola o combinada con SV. Al igual que en nuestro estudio, a las 8 semanas de la cirugía, los defectos óseos en los que se aplicó la SV sobre el andamio de CH/nano-HA mostraron mayores grados de regeneración ósea mediante micro-CT y el estudio histológico.

En la literatura científica existe una amplia discrepancia sobre la dosis efectiva de SV que se debe combinar con el biomaterial. La dosis de SV que nosotros hemos aplicado combinada con HA fue de 0.07 mg de SV sobre 10 mg de HA. En el año 2010, Nyan y cols. (Nyan y cols., 2010) utilizaron esta misma dosis de SV sobre alfafosfato tricálcico (α -TCP) para comparar su posible efecto potenciador frente al uso exclusivo de α -TCP en la regeneración ósea de defectos óseos críticos de 5 mm de diámetro provocados en la calota craneal de 30 ratas Wistar sanas. Como ocurría en nuestro estudio, tanto a las 4 como a las 8 semanas de la cirugía, tras el estudio de los defectos óseos a los 3, 7, 10, 14 y 21 días, obtuvieron mejores resultados al aplicar α -TCP + SV con mayor proliferación y migración de células osteoprogenitoras desde la duramadre, mayor expresión de BMP-2 y un aumento de la regulación positiva del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1). En el año 2011, Rojbani y cols. (Rojbani y cols., 2011) también compararon el potencial regenerador de diferentes biomateriales (α -TCP, β -TCP, y HA) solos o combinados, con la misma dosis de SV utilizada por nosotros, sobre defectos óseos críticos de 5 mm de diámetro creados en calota craneal de 72 ratas Wistar sanas. Al igual que nuestros resultados obtenidos, estos autores observaron que a las 6 y 8 semanas de su aplicación y de la cirugía, los defectos óseos rellenos con los diferentes biomateriales

combinados con SV mostraron una mayor regeneración ósea al compararlos con los defectos óseos tratados con los biomateriales exclusivamente.

Por otro lado, la presencia de DM-I no controlada altera la función osteoblástica de los pacientes y disminuye sus niveles de osteocalcina lo que dificulta la regeneración ósea de defectos óseos críticos en estos pacientes (Starup-Linde, 2013). A todo ello, debemos tener en cuenta los efectos derivados de las complicaciones de la diabetes, como el fallo renal, que a su vez genera alteraciones en el metabolismo de la vitamina D e hipoparatiroidismo funcional con excreción aumentada de calcio en orina (Antonopoulou y cols., 2013). Además, los productos finales derivados de la glicosilación se acumulan en diversos tejidos (incluido el óseo) y, estos, junto con el estrés oxidativo, parecen estar relacionados con la inhibición de la diferenciación de osteoblastos y su apoptosis (Olei y cols., 2015). En nuestro estudio, los defectos óseos críticos de ratas diabéticas tratadas con HA + SV mostraron mejores resultados, con diferencias estadísticamente significativas en todas las variables estudiadas tanto a las 4 como a las 8 semanas de la cirugía ($p \leq 0.05$) excepto para la expresión de VEGF (donde las diferencias significativas fueron observadas a las 4 semanas exclusivamente en el grupo de osteoporóticas $p=0.032$, y a las 8 semanas en el grupo de diabéticas $p=0.034$ y osteoporóticas $p=0.025$) y para BMP-2 (donde las diferencias significativas fueron observadas exclusivamente en el grupo de osteoporóticas, tanto a las 4 semanas $p=0.040$ como a las 8 semanas $p=0.032$). Resultados similares han sido obtenidos por otros autores como Ezirganli y cols. (Ezirganli y cols., 2014) que tras provocar defectos óseos críticos de 8 mm de diámetro en la calota craneal de 35 ratas Sprague-Dawley diabéticas, compararon el potencial regenerativo de distintas dosis de SV (0.5, 1.0, y 1.5 mg) y lo compararon con el uso exclusivo de una esponja de gelatina, y concluyeron que la aplicación local de SV mejora la regeneración ósea en ratas diabéticas, tanto histomorfométricamente como radiológicamente. Estos resultados son muy interesantes, ya que autores como Barbirato y cols. (Barbirato y cols., 2018) tras rellenar defectos óseos críticos de 8 mm de diámetro en la calota craneal de ratas Wistar diabéticas exclusivamente con HA, concluyeron que los injertos de HA en modelos de experimentación con animales diabéticos pueden ser satisfactorios en estadios iniciales. Sin embargo, la hiperglucemia compromete la calidad del hueso nuevamente formado (donde se observa reticulación de colágeno).

Finalmente, la presencia de osteoporosis, caracterizada por la pérdida de hueso, la alteración de su microestructura y la reducción de la capacidad de regeneración ósea; ha sido considerada como una posible contraindicación para la regeneración de defectos óseos con biomateriales osteoconductores y como un factor de riesgo para la colocación de implantes dentales (Mellado-Valero y cols., 2010). En nuestro estudio, los defectos óseos críticos de ratas osteoporóticas tratados con HA + SV mostraron mejores resultados, en todas las variables estudiadas, que los tratados exclusivamente con HA, tanto a las 4 como a las 8 semanas de la cirugía. Resultados positivos en la regeneración ósea con el uso de la SV han sido también obtenidos por autores como Fang y cols. (Fang y cols., 2015), en el año 2015. Estos autores, compararon el éxito en la osteointegración de implantes dentales cuya superficie fue tratada con HA-SV mediante un proceso electroquímico, con implantes cuya superficie no fue tratada con HA-SV, colocados en la tibia distal de 36 ratas Sprague-Dawley osteoporóticas. En todos los tiempos de estudio tras la cirugía (2, 4, y 12 semanas), los implantes con superficies tratadas con HA-SV presentaron mayor hueso alrededor y mayor contacto hueso-implante. Tao y cols. (Tao y cols., 2016), en el año 2016, comprobaron la osteointegración de varillas de titanio recubiertas con HA en fémures de ratas osteoporóticas. Tras colocar los implantes en un total de 40 ratas Sprague-Dawley osteoporóticas, los animales fueron incluidos en controles, tratados con SV sistémica, con hormona paratiroidea humana 1-34 (PTH) sistémica, o con la combinación de ambas: SV-PTH. Después de 12 semanas, los resultados (con micro-CT, test biomecánico y el estudio histológico) indicaron efectos aditivos de la SV y la PTH en la fijación de los implantes en las ratas osteoporóticas. Estos resultados son muy interesantes, ya que autores como Zhang y cols. (Zhang y cols., 2018) tras rellenar bilateralmente defectos óseos de 2.5 mm en fémures de un total de 48 ratas Wistar osteoporóticas con diferentes biomateriales osteoinductores como hueso mineral natural de origen bovino, aloinjerto óseo desmineralizado liofilizado y fosfato cálcico bifásico (sin combinarlos con fármacos osteoinductores), observaron que tras 3 o 6 semanas de la cirugía, los biomateriales se reabsorbían de forma rápida, debido a que en fenotipos osteoporóticos existe una mayor actividad osteoclástica.

Una de las principales limitaciones del presente estudio fue la imposibilidad de comparar nuestros resultados con los de la literatura científica ya que es la primera vez

que se compara la formación de nuevo hueso en defectos óseos críticos (usando la sínfisis mandibular de la rata como un defecto óseo crítico congénito), tratados exclusivamente con HA o con SV en animales sanos, diabéticos y osteoporóticos. Otra limitación del presente estudio fue el uso de una única dosis de SV combinada con HA, ya que en la literatura científica existe una amplia discrepancia sobre la dosis efectiva de SV que se debe combinar con el biomaterial.

VI. CONCLUSIONES.

VI. CONCLUSIONES.

1. El estudio mediante micro-CT de la unión ósea radiológica en todos los grupos (sanas, diabéticas y osteoporóticas) indicó puntuaciones más altas en la sínfisis mandibular (defectos óseos críticos) de ratas tratadas con HA + SV que, en las tratadas únicamente con HA, a las 4 y 8 semanas del tratamiento.
2. La densidad mineral ósea fue mayor en todos los grupos (sanas, diabéticas y osteoporóticas) al tratar la sínfisis mandibular (defecto óseo crítico) con HA + SV que cuando se trataba únicamente con HA, a las 4 y 8 semanas del tratamiento.
3. La unión ósea histológica mostró puntuaciones más altas en la sínfisis mandibular (defectos óseos críticos) de ratas tratadas con HA + SV que, en las tratadas únicamente con HA, a las 4 y 8 semanas del tratamiento, en todos los grupos (sanas, diabéticas y osteoporóticas).
4. El análisis inmunohistoquímico de VEGF indicó en todos los grupos (sanas, diabéticas y osteoporóticas), una mayor inmunopositividad en la sínfisis mandibular (defectos óseos críticos) de ratas tratadas con HA + SV que, en las tratadas únicamente con HA, a las 4 y 8 semanas del tratamiento.
5. En todos los grupos de estudio (sanas, diabéticas y osteoporóticas), el análisis inmunohistoquímico de BMP-2 indicó una mayor inmunopositividad en la sínfisis mandibular (defectos óseos críticos) de ratas tratadas con HA + SV que, en las tratadas únicamente con HA, a las 4 y 8 semanas del tratamiento.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Ahn KS, Sethi G, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand through modulation of NF-kappaB pathway. *Int J Cancer* 2008; 123:1733-40.

Akesson A, Grynblas MD, Hancock RGV, Odselius R, Obrant KJ. Energy-dispersive X-ray microanalysis of the bone mineral content in human trabecular bone: a comparison with ICPEs and Neutron activation analysis. *Calcif Tissue Int* 1994; 55:236-9.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10:96-101.

Allon I, Anavi Y, Allon DM. Topical simvastatin improves the pro-angiogenic and pro-osteogenic properties of bioglass putty in the rat calvaria critical-size model. *J Oral Implantol* 2014; 40:251-8.

An T, Hao J, Sun S, Li R, Yang M, Cheng G, Zou M. Efficacy of statins for osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2017; 28:47-57.

Anbinder AL, Junqueira JC, Mancini MN, Balducci I, Rocha RF, Carvalho YR. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. *Braz Dent J* 2006; 17:267-73.

Anbinder AL, Prado Fde A, Prado Mde A, Balducci I, Rocha RF. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. *Braz Oral Res* 2007; 21:247-52.

Antonopoulou M, Bahtiyar G, Banerji MA, Sacerdote AS. Diabetes and bone health. *Maturitas* 2013; 76:253-9.

Audran M. Drug combination strategies for osteoporosis. *Joint Bone Spine* 2006; 73:374-8.

Ardakani FE, Mirmohamadi SJ. Osteoporosis and oral bone resorption: a review. *J Maxillofac Oral Surg* 2009; 8:121-6.

Arnás M, Ballester JF, Molinos JR, Álvarez A. Factores de crecimiento: estado del conocimiento actual. *Rev Esp Odontoestomat de Implantes* 2002; 10:202-8.

Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M et al. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *J Oral Rehabil* 2010; 37:123-30.

Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I et al. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107:336-42.

Bae MS, Yang DH, Lee JB, Heo DN, Kwon YD, Youn IC, et al. Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin as a bone tissue regeneration scaffold. *Biomaterials* 2011; 32:8161-71.

Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci* 2005; 20:438-44.

Barbirato DDS, Fogacci MF, Gusman H, Takiya CM, Carvalho DP, Samsone C. Hydroxyapatite calvaria graft repair in experimental diabetes mellitus in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2018; 46:1576-85.

Bostan B, Güneş T, Aşçı M, Sen C, Keleştemur MH, Erdem M, et al. Simvastatin improves spinal fusion in rats. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2011; 45:270-5.

Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:S1.

Braddock M, Houston P, Campbell C, Ashcroft P. Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci* 2001; 16:208-13.

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O et al. Osseointegrated titanium implants in the treatment of the edentulous jaw. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1977; 11:S1-175.

Butt AA, Yan P, Bonilla H, Abou-Samra AB, Shaikh OS, Simon TG et al. Effect of addition of statins to antiviral therapy in hepatitis C virus-infected persons: Results from ERCHIVES. *Hepatology* 2015; 62:365-74.

Cacaci C, Ackermann KL, Barth T, Kistler S, Stiller M, Schlee M. A non-interventional multicenter study to document the implants success and survival rates in daily dental practices of the CONELOG screw-line implant. *Clin Oral Investig* 2019; 23:2609-16.

Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; 39:215-20.

Camacho-Alonso F, Davia-Peña RS, Vilaplana-Vivo C, Tudela-Mulero MR, Merino JJ, Martínez-Beneyto Y. Synergistic effect of photodynamic therapy and alendronate on alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res* 2018; 53:306-14.

Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357:905-16.

Carpentier VT, Wong J, Yeap Y, Gan C, Sutton-Smith P, Badiei A, et al. Increased proportion of hypermineralized osteocyte lacunae in osteoporotic and osteoarthritic human trabecular bone: implications for bone remodeling. *Bone* 2012; 50:688-94.

Chang CH, Hsu YM, Chen YC, Lin FH, Sadhasivam S, Loo ST, et al. Anti-inflammatory effects of hydrophilic and lipophilic statins with hyaluronic acid against LPS-induced inflammation in porcine articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2013; 32:557-65.

Chang PC, Chong LY, Dovban AS, Lim LP, Lim JC, Kuo MY, et al. Sequential platelet-derived growth factor-simvastatin release promotes dentoalveolar regeneration. *Tissue Eng Part A* 2014; 20:356-64.

Chang PC, Dovban AS, Lim LP, Chong LY, Kuo MY, Wang CH. Dual delivery of PDGF and simvastatin to accelerate periodontal regeneration in vivo. *Biomaterials* 2013; 34:9990-7.

Chauhan AS, Maria A, Managutti A. Efficacy of Simvastatin in Bone Regeneration After Surgical Removal of Mandibular Third Molars: A Clinical Pilot Study. *J Maxillofac Oral Surg* 2015; 14:578-85.

Chauvin B, Drouot S, Barrail-Tran A, Taburet AM. Drug-drug interactions between HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and antiviral protease inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2013; 52:815-31.

Chen JS, Sambrook PN. Antiresorptive therapies for osteoporosis: a clinical overview. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 8:81-91.

Chen PY, Sun JS, Tsuang YH, Chen MH, Weng PW, Lin FH. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr Res* 2010; 30:191-9.

Chen S, Yang JY, Zhang SY, Feng L, Ren J. Effects of simvastatin gel on bone regeneration in alveolar defects in miniature pigs. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124:3953-8.

Chissas D, Stamatopoulos G, Verettas D, Kazakos K, Papalois A, Agrogiannis G et al. Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. *Injury* 2010; 41:687-92.

Chou J, Ito T, Otsuka M, Ben-Nissan B, Milthorpe B. The effectiveness of the controlled release of simvastatin from β -TCP macrosphere in the treatment of OVX mice. *J. Tissue Eng Regen Med* 2013; 10:e195-203.

Christiansen BA. Effect of micro-computed tomography voxel size and segmentation method on trabecular bone microstructure measures in mice. *Bone Rep* 2016; 5:136-40.

Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y. Evaluation of nanohydroxyapatite (nano-HA) coated epigallocatechin-3-gallete (EGCG) cross-linked collagen membranes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 78:258-64.

Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 2003; 72:80-4.

Da Cunha MR, Gushiken Vo, Mardegan Issa JP, Iatecola A, Pettian M, Santos AR Jr. Osteoconductive capacity of hydroxyapatite implanted into the skull of diabetics. *J Craniofac Surg* 2011; 22:2048-52.

Dai L, Xu M, Wu H, Xue L, Yuan D, Wang Y, et al. The functional mechanism of simvastatin in experimental osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2016; 34:23-32.

De Leo V, Morgante G, la Marca A, Lanzetta D, Cobellis L, Petraglia F. Combination of statins and hormone replacement therapy in postmenopausal women is associated with increased bone mineral density. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17:329-32.

Del Rosario C, Rodríguez-Évora M, Reyes R, Simões S, Concheiro A, Évora C, et al. Bone critical defect repair with poloxamine-cyclodextrin supramolecular gels. *Int J Pharm* 2015; 495:463-73.

Deev RV, Drobyshev AY, Bozo IY, Isaev AA. Ordinary and activated bone grafts: applied classification and the main features. *Biomed Research International* 2015; 2015:365050-68.

Di Bella C, Aldini NN, Lucarelli E, Dozza B, Frisoni T, Martini L, et al. Osteogenic protein-1 associated with mesenchymal stem cells promote bone allograft integration. *Tissue Eng Part A* 2010; 16:2967-76.

Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 2006; 86:77-91.

Du G, Song Y, Zhang T, Ma L, Bian N, Chen X, et al. Simvastatin attenuates TNF- α -induced apoptosis in endothelial progenitor cells via the upregulation of SIRT1. *Int J Mol Med* 2014; 34:177-82.

Du Z, Chen J, Yan F, Doan N, Ivanovski S, Xiao Y. Serum bone formation marker correlation with improved osseointegration in osteoporotic rats treated with simvastatin. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24:422-7.

Du Z, Chen J, Yan F, Xiao Y. Effects of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20:145-50.

Durmuşlar MC, Alpaslan C, Alpaslan G, Çakır M. Clinical and radiographic evaluation of the efficacy of platelet-rich plasma combined with hydroxyapatite bone graft substitutes in the treatment of intra-bony defects in maxillofacial region. *Acta Odontol Scand* 2014; 72:948-53.

Edwards CJ, Russell RG, Spector TD. Statins and bone: myth or reality? *Calcif Tissue Int* 2001; 69:63-6.

Elavarasu S, Suthanthiran TK, Naveen D. Statins: A new era in local drug delivery. *J Pharm Bioallied Sci* 2012; 4:S248-51.

Egusa H, Saeki M, Doi M, Fukuyasu S, Matsumoto T, Kamisaki Y, et al. A small molecule approach to bone regenerative medicine in dentistry. *J Oral Biosci* 2010; 52:107-118.

Estanislau IM, Terceiro IR, Lisboa MR, Teles P de B, Carvalho R de S, Martins RS, et al. Pleiotropic effects of statins on the treatment of chronic periodontitis--a systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 2015; 79:877-85.

Ezirganlı Ş, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın MŞ, Sharifov R, Alkan A. The effect of local SV application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25:969-76.

Fang W, Zhao S, He F, Liu L, Yang G. Influence of simvastatin-loaded implants on osseointegration in an ovariectomized animal model. *Biomed Res Int* 2015; 2015:831504-10.

Faraco-Schwed FN, Manguiera LM, Ribeiro JV, Antao Ada S, Shibli JA. Removal torque analysis of implants in rabbit tibia after topical application of simvastatin gel. *J Oral Implantol* 2014; 40:53-9.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:E47-51.

Freemont AJ. Basic bone cell biology. *Int J Exp Pathol* 1993; 74:411-6.

Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl* 2015; 29:965-76.

Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 275:1081-101.

Froum S, Cho SC, Elian N, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Extraction sockets and implantation of hydroxyapatites with membrane barriers: a histologic study. *Implant Dent* 2004; 13:153-64.

Fu YC, Wang YH, Chen CH, Wang CK, Wang GJ, Ho ML. Combination of calcium sulfate and simvastatin-controlled release microspheres enhances bone repair in critical-sized rat calvarial bone defects. *Int J Nanomedicine* 2015; 10:7231-40.

Fukui T, Ii M, Shoji T, Matsumoto T, Mifune Y, Kawakami Y, et al. Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. *J Bone Miner Res* 2012; 27:1118-31.

Funk JL, Chen J, Downey KJ, Clark RA. Bone protective effect of simvastatin in experimental arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35:1083-91.

Gao S, Shiota M, Fujii M, Chen K, Shimogishi M, Sato M, et al. Combination of simvastatin and hydroxyapatite fiber induces bone augmentation. *Open J Reg Med* 2013; 2:53-60.

Garcés C, García LE. Combination of anabolic and antiresorptive agents for the treatment of osteoporosis. *Maturitas* 2006; 54:47-54.

Garip S, Severcan F. Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52:580-8.

Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Curr Pharm Des* 2001; 7:715-36.

Garrett IR, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res* 2002; 4:237-40.

Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, et al. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 2014; 28:166-207.

Graziano TS, Cuzzullin MC, Franco GC, Schwartz-Filho HO, de Andrade ED, Groppo FC, et al. Statins and antimicrobial effects: simvastatin as a potential drug against staphylococcus aureus biofilm. *PLoS One* 2015; 10:e0128098-115.

Grgić O, Kovačev-Zavišić B, Veljović T, Novaković-Paro J, Maravić T, Bajkin B. The influence of bone mineral density and bisphosphonate therapy on the determinants of oral health and changes on dental panoramic radiographs in postmenopausal women. *Clin Oral Investig* 2017; 21:151-7.

Grover HS, Kapoor S, Singh A. Effect of topical simvastatin (1.2 mg) on gingival crevicular fluid interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 levels in chronic periodontitis – A clinicobiochemical study. *J Oral Biol Craniofac Res* 2016; 6:85-92.

Grover HS, Luthra S, Maroo S, Maroo N. The pleotropic role of statins: Could it be the imminent host modulation agent in periodontics? *Dent Res J* 2013; 10:143-8.

Guijarro-Martínez R, Miragall Alba L, Marqués Mateo M, Puche Torres M, Pascual Gil JV. Autologous fat transfer to the cranio-maxillofacial region: updates and controversies. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; 39:359-63.

Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, Rossini G, Mundy GR. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. *Osteoporosis Int* 2006; 17:1033-42.

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

Handal JA, John TK, Goldstein DT, Khurana JS, Saing M, Braitman LE, et al. Effect of atorvastatin on the cortical bones of corticosteroid treated rabbits. *J Orthop Res* 2012; 30:872-6.

Hao J, Chou J, Kuroda S, Otsuka M, Kasugai S, Lang NP. Injectable SV gel for minimally invasive periosteal distraction: In vitro and in vivo studies in rat. *Clin Oral Implants Res* 2018; 29:227-34.

Heinz B, Kasaj A, Teich M, Jepsen S. Clinical effects of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of intrabony periodontal defects: a randomized clinical study. *Clin Oral Investig* 2010; 14:525-31.

Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, Jacobsen PL, Kalmar JR, Koka S, et al. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis. *J Am Dent Assoc* 2011; 142:1243-51.

Hernández JL, Olmos JM, Romaña G, Martínez J, Castillo J, Yezerska I, et al. Bone mineral density in statin users: a population-based analysis from a Spanish cohort. *J Bone Miner Metab* 2014; 32:184-91.

Ho ML, Chen YH, Liao HJ, Chen CH, Hung SH, Lee MJ, et al. Simvastatin increases osteoblasts and osteogenic proteins in ovariectomized rats. *Eur J Clin Invest* 2009; 39:296-303.

Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. *Oral Dis* 2006; 12:85-101.

Huang YF, Chang CT, Muo CH, Hong HH, Shen YF, Lin CC. The association of variables of fibular reconstructed mandible and bite force in oral cancer patients with dental implant rehabilitation. *J Craniomaxillofac Surg* 2018; 46:1979-83.

Huang X, Huang Z, Li W. Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. *Mol Med Rep* 2014; 9:2152-8.

Hughes A, Rogers MJ, Idris AI, Crockett JC. A comparison between the effects of hydrophobic and hydrophilic statins on osteoclast function in vitro and ovariectomy-induced bone loss in vivo. *Calcif Tissue Int* 2007; 81:403-13.

Iasella JM, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Drisko C, Bohra AA, et al. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol* 2003; 74:990-9.

Ikeda M, Kato N. Lifestyle-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-hepatitis C virus (HCV) reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J Pharmacol Sci* 2007; 105:145-50.

Iqbal H, Ali M, Zeeshan R, Mutahir Z, Iqbal F, Nawaz MAH. Chitosan/hydroxyapatite (HA)/hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) spongy scaffolds-synthesis and evaluation as potential alveolar bone substitutes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 160:553-63.

Irinakis T. Rationale for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement. *J Can Dent Assoc* 2006; 72:917-22.

Issa JP, Ingraci de Lucia C, Dos Santos Kotake BG, Gonçalves Gonzaga M, Tocchini de Figueiredo FA, Mizusaki Iyomasa D, et al. The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. *Growth Factors* 2015; 33:139-48.

Ishihara Y, Ueki K, Sotobori M, Marukawa K, Moroi A. Bone regeneration by statin and low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in rabbit nasal bone. *J Craniomaxillofac Surg* 2014; 42:185-93.

Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58:3-18.

Jahanbin A, Abtahi M, Namdar P, Heravi F, Sadeghi F, Arab H, et al. Evaluation of the effects of subgingival injection of Simvastatin on space re-opening after orthodontic space closure in adults. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2016; 10:3-7.

Jahangiri L, Devlin H, Ting K, Nishimura I. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. *J Prosthet Dent* 1998; 80:224-37.

Jamal SM; Eisenberg MJ, Christopoulos S. Rhabdomyolysis associated with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Am Heart J* 2004; 147:956-65.

Jamjoom A, Cohen RE. Grafts for ridge preservation. *J Funct Biomater* 2015; 6:833-48.

Jeon JH, Piepgrass WT, Lin YL, Thomas MV, Puleo DA. Localized intermittent delivery of simvastatin hydroxyacid stimulates bone formation in rats. *J Periodontol* 2008; 79:1457-64.

Jiang L, Sun H, Yuan A, Zhang K, Li D, Li C, Shi C, et al. Enhancement of osteoinduction by continual simvastatin release from poly(lactic-co-glycolic acid)-hydroxyapatite-simvastatin nano-fibrous scaffold. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9:1921-8.

Jin J, Zhang X, Lu Z, Li Y, Lopes-Virella MF, Yu H, et al. Simvastatin inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis and reduces alveolar bone loss in experimental periodontal disease. *J Periodontol* 2014; 49:518-26.

Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol* 2001; 30:157-61.

John HD, Wenz B. Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:199-207.

Junqueira LC, Carneiro J. Tejido óseo. En: Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica. Texto y atlas*. 6ªEd. Barcelona: Elsevier Masson; 2006. 136-53.

Junqueira JC, Mancini MN, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci* 2002; 44:117-24.

Kadam UT, Blagojevic M, Belcher J. Statin use and clinical osteoarthritis in the general population: a longitudinal study. *J Gen Intern Med* 2013; 28:943-9.

Kavalipati N, Shah J, Ramakrishan A, Vasawala H. Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab* 2015; 19:554-62.

Kheirallaha M, Almeshalyb H. Simvastatin, dosage and delivery system for supporting bone regeneration, an update review. *J Oral Maxillofacial Surg Med Pathol* 2016; 28:205-9.

Killeen AC, Rakes PA, Schmid MJ, Zhang Y, Narayana N, Marx DB, et al. Impact of local and systemic alendronate on simvastatin-induced new bone around periodontal defects. *J Periodontol* 2012; 83:1463-71.

Klemetti E. A review of residual ridge resorption and bone density. *J Prosthet Dent* 1996; 75:512-4.

Kidder LS, Chen X, Schmidt AH, Lew WD. Osteogenic protein-1 overcomes inhibition of fracture healing in the diabetic rat: a pilor study. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467:3249-56.

Kim SE, Thanh-Thuy TT, Lee JH, Ro JY, Bae YA, Kong Y, et al. Simvastatin inhibits induction of matrix metalloproteinase-9 in rat alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract. *Exp Mol Med* 2009; 41:277-87.

Kim YK, Yun PY, Um IW, Lee HJ, Yi YJ, et al. Alveolar ridge preservation of an extraction socket using autogenous tooth bone graft material for implant site development: Prospective case series. *J Adv Prosthodont* 2014; 6:521-7.

Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson J. Osseous response to implanted natural bone and synthetic hydroxyapatite ceramic in the repair of experimental skulls bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50:241-9.

Koçer A, Öner M, Karaman İ, Koçer D, Kafadar İH, Güney A, et al. The effects of locally applied simvastatin on an experimental mouse femur nonunion model. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2014; 48:679-84.

Kourkoumelis N, Balatsoukas I, Tzaphlidou M. Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. *J Biol Phys* 2012; 38:279-91.

Kourkoumelis N, Tzaphlidou M. Spectroscopic assessment of normal cortical bone: differences in relation to bone site and sex. *ScientificWorldJournal* 2010; 10:402-12.

Kunert-Keil Ch, Gredrange T, Mai R, Spassov A, Lucke S, Klinke T, et al. Morphological evaluation of bone defect regeneration after treatment with two different forms of bone substitution materials on the basis of BONITmatrix. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60:S57-60.

Lane NE, Kelman A. A review of anabolic therapies for osteoporosis. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:214-222.

Laurencin CT, Ashe KM, Henry N, Kan HM, Lo KW. Delivery of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential clinical applications. *Drug Discov Today* 2014; 19:794-800.

Lee LT, Kwan PC, Chen YF, Wong YK. Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells. *J Chin Med Assoc* 2008; 71:66-73.

Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, Beatty MW, Cullen DM, et al. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. *Biomaterials* 2008; 29:1940-9.

Lespessailles E, Prouteau S. Is there a synergy between physical exercise and drug therapies for osteoporosis? *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24:191-5.

Li X, Song QS, Wang JY, Leng HJ, Chen ZQ, Liu ZJ, et al. Simvastatin induces estrogen receptor-alpha expression in bone, restores bone loss, and decreases ER α expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2011; 29:396-403.

Li Y, Zhang Z, Zhang Z. Porous Chitosan/Nano-Hydroxyapatite Composite Scaffolds Incorporating SV-Loaded PLGA Microspheres for Bone Repair. *Cells Tissues Organs* 2018; 205:20-31.

Lima CE, Calixto JC, Anbinder AL. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Braz Oral Res* 2011; 25:42-8.

Lin S, Svoboda KK, Feng JQ, Jiang X. The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. *Bone Res* 2016; 4:16005-14.

Liu H, Li W, Liu YS, Zhou YS. Bone micro-architectural analysis of mandible and tibia in ovariectomised rats: A quantitative structural comparison between undecalcified histological sections and micro-CT. *Bone Joint Res* 2016; 5:253-62.

Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J* 2014; 8:56-65.

Liu X, Bao C, Xu HHK, Pan J, Hu J, Wang P, et al. Osteoprotegerin gene-modified BMSCs with hydroxyapatite scaffold for treating critical-sized mandibular defects in ovariectomized osteoporotic rats. *Acta Biomater* 2016; 42:378-88.

Liu X, Zhang Y, Li S, Wang Y, Sun T, Li Z, et al. Study of a new bone-targeting titanium implant-bone interface. *Int J Nanomedicine* 2016; 11:6307-24.

Liu YS, Ou ME, Liu H, Gu M, Lv LW, Fan C, et al. The effect of simvastatin on chemotactic capability of SDF-1 α and the promotion of bone regeneration. *Biomaterials* 2014; 35:4489-98.

Long T, Tang T, Hao Y, Zhu Z, Shao L, Liu M. Effect of simvastatin on osteogenesis of the lumbar vertebrae in ovariectomized rats. *Exp Ther Med* 2016; 12:3951-7.

Ma B, Clarke SA, Brooks RA, Rushton N. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. *Acta Biomater* 2008; 4:149-55.

Ma X, He Z, Han F, Zhong Z, Chen L, Li B. Preparation of collagen/hydroxyapatite/alendronate hybrid hydrogels as potential scaffolds for bone regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 142:81-7.

Maciel-Oliveira N, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112:170-9.

Maddalone M, Mirabelli L, Venimo PM, Karanxha L, Porcaro G, Del Fabbro M. Long-term stability of autologous bone graft of intraoral origin after lateral sinus floor elevation with simultaneous implant placement. *Clin Implant Dent Relat Res* 2018; 20:713-21.

Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein penylation. *Endocrinology* 2003; 144:681-92.

Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Christou C, Walsh WR. A sheep model for cancellous bone healing. *Front Surg* 2014; 1:37.

Mansour G, Al-Ashwah A, Koura A. Evaluation of simvastatin grafting around immediate dental implants in dogs. *Implant Dent* 2014; 23:195-9.

Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1636-41.

Masadeh M, Mhaidat N, Alzoubi K, Al-Azzam S, Alnasser Z. Antibacterial activity of statins: a comparative study of atorvastatin, simvastatin, and rosuvastatin. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012; 11:13-7.

Matin K, Nakamura H, Irie K, Ozawa H, Ejiri S. Impact of recombinant human bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16:400-11.

Mellado-Valero A, Ferrer-García JC, Calvo-Catalá J, Labaig-Rueda C. Implant treatment in patients with osteoporosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15:e52-7.

Miller PD. Anti-resorptives in the management of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22:849-68.

Miller PD. Management of Osteoporosis. *Dis Mon* 1999; 45:24-57.

Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993; 2:158-67.

Montazerolghaem M, Ning Y, Engqvist H, Karlsson Ott M, Tenje M, Mestres G. Simvastatin and zinc synergistically enhance osteoblasts activity and decrease the acute response of inflammatory cells. *J Mater Sci Mater Med* 2016; 27:23-31.

Montazerolghaem M, Rasmusson A, Melhus H, Engqvist H, Karlsson Ott M. Simvastatin-doped pre-mixed calcium phosphate cement inhibits osteoclast differentiation and resorption. *J Mater Sci Mater Med* 2016; 27:83-91.

Monteiro LO, Macedo AP, Shimano RC, Shimano AC, Yanagihara GR, Ramos J, et al. Effect of treatment with simvastatin on bone microarchitecture of the femoral head in an osteoporosis animal model. *Microsc Res Tech* 2016; 79:684-90.

Montero J, Manzano G, Albaladejo A. The role of topical simvastatin on bone regeneration: A systematic review. *J Clin Exp Dent* 2014; 6:286-90.

Moon HJ, Kim SE, Yun YP, Hwang YS, Bang JB, Park JH, et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. *Exp Mol Med* 2011; 43:605-12.

Moshiri A, Shahrezaee M, Shekarchi B, Oryan A, Azma K. Three-Dimensional Porous Gelatin-Simvastatin Scaffolds Promoted Bone Defect Healing in Rabbits. *Calcif Tissue Int* 2015; 96:552-64.

Moshiri A, Sharifi AM, Oryan A. Role of Simvastatin on fracture healing and osteoporosis: a systematic review on in vivo investigations. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016; 43:659-84.

Mukozawa A, Ueki K, Marukawa K, Okabe K, Moroi A, Nakagawa K. Bone healing of critical-sized nasal defects in rabbits by statins in two different carriers. *Clin Oral Implants Res* 2011; 22:1327-35.

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; 286:1946-9.

Murray G, Holden R, RoschlaU W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg* 1957; 93:385-7.

Nakashima Y, Haneji T. Stimulation of osteoclast formation by RANKL requires interferon regulatory factor-4 and is inhibited by simvastatin in a mouse model of bone loss. *PLoS One* 2013; 8:e72033-42.

Naito Y, Terukina T, Galli S, Kozai Y, Vandeweghe S, Tagami T, et al. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. *Int J Pharm* 2014; 461:157-62.

Nanci A. Repair and regeneration of oral tissues. En: Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. 9ªEd. China: Elsevier Inc; 2013. 389.

Nascimento-Saba CC, Breitenbach MM, Rosenthal D. Pituitary-thyroid axis in short- and long-term experimental diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30:269-74.

Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2009; 44:479-88.

Nazirkar G, Singh S, Dole V, Nikam A. Effortless effort in bone regeneration: a review. *J Int Oral Health* 2014; 6:120-4.

Nishimura, K. Local application of simvastatin to rat incisor sockets augments bone. *Kokubyo Gakkai zasshi* 2008; 75:49-54.

Novaes AB Jr, Suaid F, Queiroz AC, Muglia VA, Souza SL, Palioto DB, et al. Buccal bone plate remodeling after immediate implant placement with and without synthetic bone grafting and flapless surgery: radiographic study in dogs. *J Oral Implantol*. 2012; 38:687-98.

Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, et al. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of SV combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 93:65-73.

Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of combination with alpha-tricalcium phosphate and SV on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20:280-7.

Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci* 2007; 104:384-6.

Nyilasi I, Kocsubé S, Krizsán K, Galgóczy L, Pesti M, Papp T, et al. In vitro synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 307:175-84.

Olei L, Rivadeneira F, Zillikens MC, Oei EH. Diabetes, diabetic complications, and fracture risk. *Curr Osteoporos Rep* 2015; 13:106-15.

Oliveira GR, Vargas-Sanchez PK, Fernandes RR, Ricoldi MST, Semeghini MS, Pitol DL, et al. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2019; 37:658-67.

O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90:79-84.

Oka S, Matsumoto T, Kubo S, Matsushita T, Sasaki H, Nishizawa Y, et al. Local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng Part A* 2013; 19:1233-43.

Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi S, Mikami Y, Shimauchi H, et al. Calcification during bone healing in a standardized rat calvarial defect assessed by microCT and SEM-EDX. *Oral Dis* 2015; 21:74-82.

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014; 9:18-44.

Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone* 2004; 34:609-18.

Oxlund H, Dalstra M, Andreassen TT. Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. *Calcif Tissue Int* 2001; 69:299-304.

Ozeç I, Kiliç E, Gümüş C, Göze F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *J Craniofac Surg* 2007; 18:546-50.

Pacifici R. Estrogen cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1043-51.

Papadimitriou K, Karkavelas G, Vouros I, Kessopoulou E, Konstantinidis A. Effects of local application of SV on bone regeneration in femoral bone defects in rabbit. *J Craniomaxillofac Surg* 2015; 43:232-7.

Park JB. The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14:485-8.

Pauly S, Luttsch F, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone* 2009; 45:505-11.

Pauly S, Back DA, Kaeppler K, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Influence of statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 13:208-15.

Pilia M, Guda T, Appleford M. Development of composite scaffolds for load-bearing segmental bone defects. *Biomed Res Int* 2013;458253.

Pinheiro FA, Mourão CF, Diniz VS, Silva PC, Meirelles L, Santos Junior E, et al. In vivo bone response to titanium screw implants anodized in sodium sulfate. *Acta Cir Bras* 2014; 29:376-82.

Pinkerton JV, Dalkin AC. Combination therapy for treatment of osteoporosis: A review. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:559-65.

Pişkin E, Işoğlu IA, Bölgen N, Vargel I, Griffiths S, Cavuşoğlu T, et al. In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90:1137-51.

Pradeep AR, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K, Rajau A, Singh P. Rosuvastatin 1.2 mg In Situ Gel Combined With 1:1 Mixture of Autologous Platelet-Rich Fibrin and Porous Hydroxyapatite Bone Graft in Surgical Treatment of Mandibular Class II Furcation Defects: A randomized Clinical Control Trial. *J Periodontol* 2016; 87:5-13.

Prasanna K, Belliappa V, Ghousia F. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci* 2013;5:S125-S127.

Price U, Le HO, Powell SE, Schmid MJ, Marx DB, Zhang Y, et al. Effects of local simvastatin-alendronate conjugate in preventing periodontitis bone loss. *J Periodontal Res* 2013; 48:541-8.

Pruefer D, Makowski J, Schnell M, Buerke U, Dahm M, Oelert H, et al. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 2002; 106:2104-10.

Pullisaar H, Tiainen H, Landin MA, Lyngstadaas SP, Haugen HJ, Reseland JE, et al. Enhanced in vitro osteoblast differentiation on TiO₂ scaffold coated with alginate hydrogel containing simvastatin. *J Tissue Eng* 2013; 4:2041731413515670-81.

Pytlik M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, Gubała I. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol* 2003; 55:63-71.

Qi Y, Niu L, Zhao T, Shi Z, Di T, Feng G, et al. Combining mesenchymal stem cell sheets with platelet-rich plasma gel/calcium phosphate particles: a novel strategy to promote bone regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6:256-71.

Raghoobar GM, Meijndert L, Kalk WW, Vissink A. Morbidity of mandibular bone harvesting: a comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22:359-65.

Reid IR. Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19:473-80.

Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:567-76.

Rey C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. *Biomaterials* 1990; 11:13-5.

Rivera C, Monsalve F, Salas J, Morán A, Suazo I. Platelet-rich plasma, plasma rich in growth factors and simvastatin in the regeneration and repair of alveolar bone. *Exp Ther Med* 2013; 6:1543-9.

Rodríguez A, Anastasov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and palatet rich plasma with simultaneous insertion of endosseus implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:157-63.

Rodriguez IA, Growney-Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA. Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. *Biomed Res Int* 2014; 2014:392-8.

Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without SV in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A* 2011; 98:488-98.

Rosen CJ, Bilezikian P. Anabolic therapies for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:957-964.

Rosselli JE, Martins DM, Martins JL, Oliveira CR, Fagundes DJ, Taha MO. The effect of simvastatin on the regeneration of surgical cavities in the femurs of rabbits. *Acta Cir Bras* 2014; 29:87-92.

Sadeghi R, Babaei M, Miremadi SA, Abbas FM. A randomized controlled evaluation of alveolar ridge preservation following tooth extraction using deproteinized bovine bone mineral and demineralized freeze-dried bone allograft. *Dent Res J (Isfahan)* 2016; 13:151-9.

Saghiri MA, Asatourian A, Garcia-Godoy F, Sheibani N. The role of angiogenesis in implant dentistry part II: The effect of bone-grafting and barrier membrane materials on angiogenesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2016; 21:e526-37.

Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, Liao JK, Node K, Izumi Y. Simvastatin decreases il-6 and il-8 production in epithelial cells. *J Dent Res* 2006; 85:520-23.

Salked SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joing Surg Am* 2001; 83:803-16.

Samiei M, Aghazadeh M, Alizadeh E, Aslaminabadi N, Davaran S, Shirazi S et al. Osteogenic/odontogenic bioengineering with co-administration of simvastatin and hydroxyapatite on poly caprolactone based nanofibrous scaffold. *Adv Pharm Bull* 2016; 6:353-65.

Santana WMD, Sousa DND, Ferreira VM, Duarte WR. Simvastatin and biphasic calcium phosphate affects bone formation in critical-sized rat calvarial defects. *Acta Cirurgica Brasileira* 2016; 31:300-7.

Saraf SK, Singh A, Garbyal RS, Singh V. Effect of simvastatin on fracture healing--an experimental study. *Indian J Exp Biol* 2007; 45:444-9.

Sasaki T, Debari K, Garant PR. Ameloblast modulation and changes in the Ca, P, and S content of developing enamel matrix as revealed by SEM-EDX. *J Dent Res* 1987; 66:778-86.

Sato D, Nishimura K, Ishioka T, Kondo H, Kuroda S, Kasugai S. Local application of simvastatin to rat incisor socket: carrier dependent effect on bone augmentation. *J Oral Tiss Engine* 2005; 2:81-5.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 205:299-308.

Schortinghuis J, Ruben JL, Raghoobar GM, Stegenga B. Ultrasound to stimulate mandibular bone defect healing: a placebo-controlled single-blind study in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:194-201.

Sendyk DI, Deboni MC, Pannuti CM, Naclério-Homem MG, Wennerberg A. The influence of statins on osseointegration: a systematic review of animal model studies. *J Oral Rehabil* 2016; 43:873-82.

Seto H, Ohba H, Tokunaga K, Hama H, Horibe M, Nagata T. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2008; 43:261-7.

Shah SR, Werlang CA, Kasper FK, Mikos AG. Novel applications of statins for bone regeneration. *Natl Sci Rev* 2015; 2:85-99.

Shahrezaine M, Moshiri A, Shekarchi B, Oryan A, Maffulli N, Parvizi J. Effectiveness of tissue engineered three-dimensional bioactive graft on bone healing and regeneration: an in vivo study with significant clinical value. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12:936-60.

Shetty V, Han TJ. Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dent Clin North Am* 1991; 35:521-30.

Sibai T, Morgan EF, Eihhorn TA. Anabolic agents and bone quality. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469:2215-24.

Sirola J, Sirola J, Honkanen R, Kröger H, Jurvelin JS, et al. Relation of statin use and bone loss: a prospective population-based cohort study in early postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2002; 13:537-41.

Skoglund B, Aspenberg P. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:98-103.

Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 2002; 17:2004-8.

Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogenic bone chips or bovine one mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18:795-806.

Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001; 10:S86-95.

Sousa DN, Santana WM, Ferreira VM, Duarte WR. Behavioural and cognitive effects of simvastatin dose used in stimulation of bone regeneration in rats. *Acta Cir Bras* 2014; 29:151-7.

Stadlinger B, Korn P, Tödtmann N, Eckelt U, Range U, Bürki A, et al. Osseointegration of biochemically modified implants in an osteoporosis rodent model. *Eur Cell Mater* 2013; 25:326-40.

Starup-Linde J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:21-36.

Stanes JW, Neidre DB, Nyman JS, Roy A, Nelson MJ, Gutierrez G, et al. Synergic effect of exercise and statins on femoral strength in rats. *Exp Gerontol* 2013; 48:751-5.

Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol* 2005; 76:1861-70.

Tai IC, Fu YC, Wang CK, Chang JK, Ho ML. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine* 2013; 8:3895-905.

Tai IC, Wang YH, Chen CH, Chuang SC, Chang JK, Ho ML. Simvastatin enhances Rho/actin/cell rigidity pathway contributing to mesenchymal stem cells' osteogenic differentiatio. *Int J Nanomedicine* 2015; 10:5881-94.

Takenaka M, Hirade K, Tanabe K, Akamatsu S, Dohi S, Matsuno H, et al. SV stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biphys Commun* 2003; 301:198-203.

Tan J, Yang N, Fu X, Cui Y, Guo Q, Ma T, et al. Single-dose local simvastatin injection improves implant fixation via increased angiogenesis and bone formation in an ovariectomized rat model. *Med Sci Monit* 2015; 21:1428-39.

Tanabe K, Nomoto H, Okumori N, Miura T, Yoshinari M. Osteogenic effect of fluvastatin combined with biodegradable gelatin-hydrogel. *Dent Mater J* 2012; 31:489-93.

Tao ZS, Zhou WS, Bai BL, Cui W, Lv YX, Yu XB, et al. The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and simvastatin treatment on the interface of hydroxyapatite-coated titanium rods implanted into osteopenic rats femurs. *J Mater Sci Mater Med* 2016; 27:43-50.

Taschieri S, Corbella S, Weinstein R, Di Giancamillo A, Mortellaro C, Del Fabbro M. Maxillary sinus floor elevation using platelet-rich plasma combined with either biphasic calcium phosphate or deproteinized bovine bone. *J Craniofac Surg* 2016; 27:702-7.

Thaller SR Hoyt J, Dart A, Bojerson K, Tesluk H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1994; 5:242-6.

Than KD, Rahman SU, Wang L, Khan A, Kyere KA, Than TT, et al. Intradiscal injection of simvastatin results in radiologic, histologic, and genetic evidence of disc regeneration in a rat model of degenerative disc disease. *Spine J* 2014; 14:1017-28.

Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol* 2002; 73:1141-8.

Tian F, Liu Zhang L, Zhang H, Zheng J, Han D, Yang F. Histomorphometric analysis: effects of simvastatin on bone mass, microarchitecture and turnover in normal rat. *Appl Mech and Mater* 2013; 302:26-30

Tomlin EM, Nelson SJ, Rossmann JA. Ridge preservation for implant therapy: a review of the literature. *Open Dent J* 2014; 8:66-76.

Tonelli P, Duvina M, Barbato L, Biondi E, Nuti N, Brancato L, et al. Bone regeneration in dentistry. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2011; 8:24-8.

Toscano N, Holtzclaw D, Mazor Z, Rosen P, Horowitz R, Toffler M. Horizontal ridge augmentation utilizing a composite graft of demineralized freeze-dried allograft, mineralized cortical cancellous chips, and a biologically degradable thermoplastic carrier combined with a resorbable membrane: a retrospective evaluation of 73 consecutively treated cases from private practices. *J Oral Implantol* 2010; 36:467-74.

Tylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I, et al. Effects of SV gels on murine calvarial bone. *J Periodontol* 2002; 73:1141-8.

Ueyama Y, Yagyuu T, Maeda M, Imada M, Akahane M, Kawate K. Maxillofacial bone regeneration with osteogenic matrix cell sheets: An experimental study in rats. *Arch Oral Biol* 2016; 72:138-45.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.

Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Effects of statins on bone mineral density: a meta-analysis of clinical studies. *Bone* 2007; 40:1581-7.

Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2009; 36:1048-58.

Van Houdt CIA, Ulrich DJO, Jansen JA, van den Beuchen JJJP. The performance of CPC/PLGA and Bio-Oss[®] for bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018; 106:131-42.

Von Knoch F, Wedemeyer C, Heckelei A, Saxler G, Hilken G, Brankamp J, et al. Promotion of bone formation by simvastatin in polyethylene particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 2005; 26:5783-9.

Von Stechow D, Fish S, Yahalom D, Bab I, Chorev M, Müller R, et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskelet Disord* 2003; 28:8-17.

Von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Investig* 2001; 5:71-82.

Wadagaki R, Mizuno D, Yamawaki-Ogata A, Satake M, Kaneko H, Hagiwara S, et al. Osteogenic induction of bone marrow-derived stromal cells on simvastatin-releasing, biodegradable, nano- to microscale fiber scaffolds. *Ann Biomed Eng* 2011; 39:1872-81.

Wang G, Roohani-Esfahani SI, Zhang W, Lv K, Yang G, Ding X, et al. Effects of Sr-HT-Gahnite on osteogenesis and angiogenesis by adipose derived stem cells for critical-sized calvarial defect repair. *Sci Rep* 2017; 20:41135.

Wang M, Sa Y, Li P, Guo Y, Du Y, Deng H, et al. A versatile and injectable poly(methyl methacrylate) cement functionalized with quaternized chitosan-glycerophosphate/nanosized hydroxyapatite hydrogels. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018; 90:264-72.

Welsh A-M, Kruger P, Faoagali J. Antimicrobial action of atorvastatin and rosuvastatin. *Pathology* 2009; 41:689-91.

Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009;2:56-64.

Wong RW, Rabie AB. Histologic and ultrastructural study on statin graft in rabbit skulls. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:1515-21.

Wong RW, Rabie AB. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003; 41:244-8.

Woo JT, Kasai S, Stern PH, Nagai K. Compactin suppresses bone resorption by inhibiting the fusion of pre-fusion osteoclasts and disrupting the actin ring in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2000; 15:650-62.

Wu J, Song Y, Li H, Chen J. Rhabdomyolysis associated with fibrate therapy: review of 76 published cases and a new case report. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65:1169-74.

Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37:170-6.

Wu S, Xiao Z, Song J, Li M, Li W. Evaluation of BMP-2 Enhances the Osteoblast Differentiation of Human Amnion Mesenchymal Stem Cells Seeded on Nano-Hydroxyapatite/Collagen/Poly(L-Lactide). *Int J Mol Sci* 2018; 25:19:E2171.

Xu XC, Chen H, Zhang X, Zhai ZJ, Liu XQ, Qin A, et al. Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. *J Transl Med* 2014; 12:284-92.

Yagyuu T, Kirita T, Hattori K, Tadokoro M, Ohgushi H. Unique and reliable rat model for the assessment of cell therapy: bone union in the rat mandibular symphysis using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9:276-85.

Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor-alpha inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol* 2008; 196:601-13.

Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Yamanaka R, Otani H, Matsumoto Y, et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 and RANKL through regulating MAPK, AKT and Src signaling. *Regul Pept* 2010; 162:99-108.

Yan Q, Xiao LQ, Tan L, Sun W, Wu T, Chen LW, et al. Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration: in vitro and in vivo characteristics. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103:3580-9.

Yang N, Cui Y, Tan J, Fu X, Han X, Leng H, et al. Local injection of a single dose of simvastatin augments osteoporotic bone mass in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2014; 32:252-60.

Yao W, Farmer R, Cooper R, Chmielewski PA, Tian XY, Setterberg RB, et al. Simvastatin did not prevent nor restore ovariectomy-induced bone loss in adult rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6:277-83.

Yee AJ, Bae HW, Friess D, Roth SM, Whyne C, Robbin M, et al. The use of simvastatin in rabbit posterolateral lumbar intertransverse process spine fusion. *Spine J* 2006; 6:391-6.

Yin H, Li J, Yu X, Fu Z. Effects of simvastatin on osseointegration in a canine total hip arthroplasty model: an experimental study. *J Arthroplasty* 2011; 26:1534-9.

Yu WL, Sun TW, Qi C, Zhao HK, Ding ZY, Zhang ZW. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived SV sustained release system for superior bone regeneration. *Sci Rep* 2017; 7:44129.

Yue X, Niu M, Zhang T, Wang C, Wang Z, Wu W, et al. In vivo evaluation of a simvastatin-loaded nanostructured lipid carrier for bone tissue regeneration. *Nanotechnology* 2016; 27:115708-18.

Yueyi C, Xiaoguang H, Jingying W, Quansheng S, Jie T, Xin F, et al. Calvarial defect healing by recruitment of autogenous osteogenic stem cells using locally applied simvastatin. *Biomaterials* 2013; 34:9373-80.

Zhang J, Wang H, Shi J, Wang Y, Lai K, Yang X, et al. Combination of simvastatin, calcium silicate/gypsum, and gelatin and bone regeneration in rabbit calvarial defects. *Sci Rep* 2016; 6:23422-33.

Zhang Q, Jing D, Zhang Y, Miron RJ. Histomorphometric study of Study of New Bone Formation Comparing Defect Healing with Three Bone Grafting Materials: The Effect of Osteoporosis on Graft Consolidation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2018; 33:645-52.

Zhang Y, Bradley AD, Wang D, Reinhardt RA. Statins, bone metabolism and treatment of bone catabolic diseases. *Pharmacol Res* 2014; 88:53-61.

Zhang Y, Cheng N, Miron R, Shi B, Cheng X. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibriin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials* 2012; 33:6698-708.

Zhang Y, Jia Z, Yuan H, Dusad A, Ren K, Wei X, et al. The evaluation of therapeutic efficacy and safety profile of simvastatin prodrug micelles in a closed fracture mouse model. *Pharm Res* 2016; 33:1959-71.

Zhao BJ, Liu YH. Simvastatin induces the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Fundam Clin Pharmacol* 2014; 28:583-92.

Zhao S, Wen F, He F, Liu L, Yang G. In vitro and in vivo evaluation of the osteogenic ability of implant surfaces with a local delivery of simvastatin. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014; 29:211-20

Zhao X, Yang H, Jiang G, Ni M, Deng Y, Cai J, et al. Simvastatin attenuates radiation-induced tissue damage in mice. *J Radiat Res* 2014; 55:257-64.

Zhou Y, Ni Y, Liu Y, Zeng B, Xu Y, Ge W. The role of simvastatin in the osteogenesis of injectable tissue-engineered bone based on human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2010; 31:5325-35.

Zhu J, Song Q, Wang J, Han X, Yang Y, Liao J, et al. Study on local implantation of simvastatin for repairing rabbit radial critical size defects. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2010; 24:465-71.

VIII. ANEXOS.

VIII. ANEXOS.

Anexo I.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA | Vicerrectorado de
Investigación

CEEA Comité Ético de
Experimentación
Animal

CMN
CAMPUS MARE NOSTRUM

Código CEEA: 151/2015

INFORME DE COMITÉ ÉTICO

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

DATOS DEL CENTRO

Nombre: **CEEA Universidad de Murcia**

Número de Registro del Centro: **REGA ES300305440012**

Título del procedimiento: *"Efectos de la sinvastina tópica y sistémica sobre la hidroxiapatita para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas y osteoporóticas"*

Responsable: D. Fabio Camacho Alonso

Fondos Propios

Aspectos que han sido considerados para su evaluación:

- Capacitación del personal investigador
- Idoneidad del procedimiento en relación a los objetivos del estudio.
- Metodología empleada
- Posibilidad de conseguir conclusiones válidas con el menor nº posible de animales
- Consideraciones de métodos alternativos
- Idoneidad de las especies seleccionadas
- Supervisión, Criterios de Punto Final y Finalización del Procedimiento

Una vez evaluado el procedimiento antes mencionado, atendiendo a los puntos indicados y de conformidad con lo acordado el día 14 de mayo de 2015¹, el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, INFORMA **FAVORABLEMENTE** sobre la realización de dicho procedimiento.

Murcia, 15 de mayo de 2015

D^a. Carmen Lagares Martínez



Secretaria CEEA

D. Antonio Juan García Fernández



Presidente CEEA

¹ A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

Anexo II.



Región de Murcia
Consejería de Agua,
Agricultura y Medio Ambiente

Dirección General de Agricultura,
Ganadería, Pesca y Acuicultura

Servicio de Producción Animal
Plaza Juan XXIII s/n
30008 Murcia

T. 012
T. 968.375825
F. 968.362863
www.carm.es/cagric

Región de Murcia Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente REGISTRO SALIDA
Fecha 30 JUN 2016
N° 14232/2016

D. FABIO CAMACHO ALONSO
CLÍNICA ODONTOLÓGICA UNIVERSITARIA
AVDA. MARQUÉS DE LOS VELEZ S/N
30008 MURCIA

RESOLUCION

Vista la solicitud presentada con fecha 13/10/2015 y nº de registro de entrada 201500698083, para la autorización de la realización de un proyecto de investigación con animales presentada por D. Fabio Camacho Alonso, como responsable del mismo.

Vista la subsanación de deficiencias con fecha 20/06/2016 y registro de entrada 201600349188.

Vista la propuesta del proyecto denominado: "Efectos de la sinvastatina tópica y sistémica sobre la hidroxiapatita para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas y osteoporóticas".

Visto el informe favorable del comité ético del establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

Visto el resumen no técnico del proyecto.

Visto el resultado favorable de la evaluación del proyecto por el órgano habilitado "Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad de Murcia".

Visto que en dicha evaluación se clasifica el proyecto como Tipo II y se indica que es necesario llevar a cabo la evolución retrospectiva del proyecto al finalizar el primer año del mismo.

Visto que en la evaluación del proyecto se indica que hay personal que va a participar en el mismo y no posee la capacitación previa adecuada pero que será supervisado por D. Fabio Camacho Alonso, que sí dispone de capacitación.

Visto el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el Informe emitido por el Jefe del Servicio de Producción Animal el 28 de junio de 2016.

Considerando la competencia que tiene atribuida esta Dirección General sobre la base de lo dispuesto en el Decreto nº 106/2015, de 10 de julio, por el que se establecen los Órganos Directivos de la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente, y con independencia de otras actuaciones que esta u otra Administración puedan emprender,

Proyecto de investigación A13160607

Firmante: MOJALEX GUINCA CAMBRY
 Este es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado por la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de Murcia, en cumplimiento de lo establecido en el artículo 40.1 de la Ley 39/2015, de 30 de septiembre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.
 Su autenticidad puede ser comprobada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.carm.es/verificadores/verificador.asp?codigo=1402710-a0b342b-94568279917>





Región de Murcia
 Consejería de Agua,
 Agricultura y Medio Ambiente

Dirección General de Agricultura,
 Ganadería, Pesca y Acuicultura

Servicio de Producción Animal
 Plaza Juan XXIII s/n
 30008 Murcia

T. 012
 T.968.375825
 F. 968 362863
 www.carm.es/cagric

RESUELVE

Conceder autorización a D. Fabio Camacho Alonso, para la realización del proyecto solicitado, como responsable y usuario del mismo, asignándole el código de identificación **Nº A13160607**, teniendo esta autorización una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho procedimiento, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

El proyecto se llevará a cabo en el establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

Se autoriza al personal mencionado en la memoria del proyecto, sin capacitación suficiente, a participar en los procedimientos dentro del marco del proyecto citado siempre que se trabaje bajo la supervisión de D. Fabio Camacho Alonso, que sí dispone de la capacitación.

Se debe realizar la evaluación retrospectiva del proyecto, al finalizar el primer año del mismo, debiendo ser presentada a la autoridad competente a más tardar a los diez días de su realización. Para ello, toda la información referida a los protocolos de supervisión, tratamientos administrados a los animales durante los procedimientos, bajas imprevistas y fechas y métodos de eutanasia, deberá estar a disposición del personal del "Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia.

Lo que en cumplimiento del Art. 58 de la Ley de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Común (Ley 30/1992, de 26 de noviembre) se le NOTIFICA, significándole que contra dicha RESOLUCIÓN cabe Recurso de Alzada ante la Excm. Sra. Consejera de Agua, Agricultura y Medio Ambiente, en el plazo de un mes desde la recepción de la presente notificación, sin perjuicio de poder ejercitar, en su caso, cualquier otro que se estime pertinente.

Murcia, a 28 de junio de 2016

La Directora General de Agricultura, Ganadería, Pesca y Acuicultura
 Fdo. Electrónicamente al margen: Carmen T. Morales Cuenca



Firmante: MORALES CUENCA, CARMEN T. 28/06/2016 11:38:41
 Este es una copia electrónica imprimible de un documento electrónico archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según el artículo 39.2 de la Ley 1/2007, de 27 de junio.
 Su autenticidad puede ser comprobada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.carm.es/verificadocumentos> e introduciendo el código seguro de verificación (CSV) 9448741e-ead3-2626-65566370912



Proyecto de investigación A13160607