



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Estudio del efecto de la adición de silicio al beta-fosfato
tricálcio e hidroxapatita en la neoformación ósea en
defectos críticos en calotas de conejo

Autor:

Eduard Ferrés Amat

Director:

Dra. María Piedad Ramírez Fernández

Murcia, Junio de 2017

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr.Dña. María Piedad Ramírez Fernández como Director de la Tesis Doctoral titulada **Estudio del efecto de la adición de silicio al beta-fosfato tricálcico e hidroxapatita en la neoformación ósea en defectos críticos en calotas de conejo**.realizada por D. Eduard Ferrés Amat en el Departamento de Ciencias de Salud **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 17 de Maro de 2017



(1) Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.

UCAM



EIDUCAM
Escuela Internacional
de Doctorado

RESUMEN:

Objetivo: Evaluar la influencia en el comportamiento biológico de la adición de un ion bioactivo, el silicio, a un biomaterial cerámico bifásico compuesto por HA/ β -TCP, en la cicatrización de un defecto crítico en calota de conejo de Nueva Zelanda.

Materiales y métodos: Se utilizaron veintidós conejos de Nueva Zelanda en este estudio. Se crearon dos defectos de tamaño crítico en los huesos parietales. La muestra se dividió en tres grupos experimentales: Grupo A (14 defectos críticos rellenos de gránulos de 4BONE® - HA / β -TCP 60/40), Grupo B (14 defectos críticos rellenos de gránulos de 4BONE® + 3% de silicio), Grupo Control (14 defectos críticos se dejaron sin cubrir como controles). Los animales se sacrificaron a las 8 y a las 12 semanas. La evaluación de los resultados se realizó mediante análisis de μ CT e histomorfometría.

Resultados: La evaluación de μ CT mostró una mayor reducción de volumen del biomaterial en el Grupo A, en comparación con el Grupo B ($P < 0,05$). El Grupo B mostró los valores más altos de cierre del defecto óseo cortical y formación de hueso alrededor de las partículas, seguido por el Grupo A y el Grupo Control ($P < 0,05$).

Conclusiones: Teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio en animales, se puede concluir que HA / β -TCP + 3% de silicio aumenta la formación de hueso en defectos de tamaño crítico en calotas de conejo. La incorporación de 3% de silicio reduce la tasa de reabsorción del HA / β -TCP.

ABSTRACT:

Objective: To evaluate the influence on the biological behavior of the addition of a bioactive ion, silicon, to a biphasic ceramic biomaterial composed by HA / β -TCP, in the healing of a critical defect in New Zealand rabbit.

Materials and methods: Twenty-one New Zealand rabbits were used in this study. Two critical defects were created in parietal bones. The sample was divided in three experimental groups: Group A (14 critical defects filled with 4BONE® granules - HA / β -TCP 60/40), Group B (14 critical defects filled with 4BONE® granules + 3% silicon) , Control Group (14 critical defects were left uncovered as control). Animals were sacrificed at 8 and 12 weeks. The evaluation of the results was performed by "CT analysis and histomorphometry.

Results: The evaluation of "CT showed a greater reduction of biomaterial volume in Group A, compared to Group B (P <0.05). Group B showed the highest values of cortical bone defect closure and bone formation around the biomaterial's particles, followed by Group A and Control Group (P <0.05).

Conclusions: Given the limitations of this study, it can be concluded that HA / β -TCP + 3% silicon increases bone formation in critical-size defects in rabbits. The incorporation of 3% silicon reduces the rate of reabsorption of HA / β -TCP.

Key Words: Silicon, β -TCP, HA, graft, biomaterial, regeneration.

*“... on ne voit bien qu’avec le coeur.
L’essentiel est invisible pour les yeux.”*

Le Petit Prince, XXI.
Antoine de Saint-Exupéry (1943).

Agradecimientos

A la Profesora María Piedad Ramírez Fernández, directora de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Silvana Loana de Oliveira Sousa, tutora de esta Tesis Doctoral.

Al Profesor José Luis Calvo Guirado, constante inspirador de este estudio.

Al Profesor José E. Maté Sánchez de Val, por su inestimable ayuda en todo este camino.

Al Profesor Carlos Pérez Albacete, Dr. Jorge E. Delgado Peña y Dra. Patricia Jara López López, por sus consejos y ánimos.

A todos los miembros del Murcia Biomaterial & Implant Research Group (MBIRG) por su apoyo, soporte y ayuda.

Al Profesor Maher Atari, por iniciarme en el mundo de la investigación biomédica.

Al Profesor Javier Mareque Bueno y al resto de miembros del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital de Nens de Barcelona.

A Sabine Wüstemann Aronica, por su apoyo constante.

A la Dra. Elvira Ferrés Amat, por abrir el camino y acompañarme en él.

A Maria Ferrés Amat y Núria Ferrés Amat por su ánimos desde la distancia.

A Elvira Amat de Broto, por ser la base de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Eduard Ferrés Padró, por que sin él nada de esto habría sido posible.

ABREVIATURAS:

BCP: Fosfato Cálculo Bifásico

BMP 2-4-6-7: Proteínas morfogenéticas: 2-4-6-7

BMU: Unidad Multicelular Básica

CDC: Cierre del defecto óseo (*Critical Defect Closure*)

CT: Tejido conectivo (*Connective Tissue*)

C₃Si: Silicato Dicálcico

Ca: Calcio

DFDBA: Aloinjerto desmineralizado de hueso liofilizado -*Demineralized freeze-dried bone allograft*

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FFB: Hueso Congelado -*Free Frozen Bone*-

FDBA: Aloinjerto de hueso liofilizado -*Freeze-dried bone allograft*-

FGF: Factores de Crecimiento de los Fibroblastos

GAG: glicosaminoglicanos

GF: Growth Factors – Factores de Crecimiento

GH: Hormona del crecimiento

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

HA: Hidroxiapatita

HA/ β TCP 60-40 + 3% Si: Hidroxiapatita 60%, Beta-Fosfato Tricálcico 40% + 3% de Silicio

HU: Unidades Hounsfield

IGF-I: Factores de crecimiento análogo a insulina I

IGF-II: Factores de crecimiento análogo a insulina II

IL: Interleuquina

Kg: Kilogramos

MEC: Membrana extracel·lular

MBIRG: Murcia Biomaterial and Implant Research Group

Mg: Magnesio

mg: Miligramos

mm: Milímetros

MSC: células madre mesenquimales

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

NB: Formación de hueso nuevo (*New Bone*)

O: Oxígeno

OPG: Osteoprotegerina

OSX: Osterix

P: Fósforo

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*Platelet derived Growth Factors*)

PG: Prostaglandinas

PLGA: polyactivecoating

PTH: Parathormona

RANKL: activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa-B

RM: Material de injerto residual (*Residual Material*)

ROG/GBR: Regeneración Ósea Guiada (*Guided Bone Regeneration*)

ROI: Regiones de interés

r.p.m.: Revoluciones por minuto

Si: Silicio

TCP: Fosfato Tricálcico

TGF β : Factor transformante del crecimiento β

TNF: Factor de necrosis tumoral

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

4BONE®: Biomaterial formado por un 60% de Hidroxiapatita (HA) y un 40% de beta-Fosfato Tricálcico (β -TCP).

°C: Grados centígrados

β TCP: Beta-Fosfato Tricálcico

β -TCP + C,Si: Beta-Fosfato Tricálcico + Silicato Dicálcico

μ -CT: Tomografía Computarizada micrométrica

μ m: Micrometro

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Esquema del remodelado óseo. (Riancho et al., 2011)	Página 34
Figura 2: Osteoblastos sobre capa de matriz oteioide en fase de neoformación ósea (Khuory et al., 2010)	Página 35
Figura 3: Osteoblastos (a) y Osteoclastos (b). (Khuory et al., 2010)	Página 37
Figura 4: (a) Osteoclasto y hueso reabsorbido. (b) Osteoclastos y nucleones (Khuory et al 2010)	Página 38
Figura 5: Cortes teñido con azul de toluidina que muestra una parte de un trabécula ósea (B). Los osteoblastos (OB) y células óseas de revestimiento (BLC) están presentes en la superficie del hueso, mientras que los osteocitos (OT) se observan atrapados en la matriz ósea. BV: los vasos sanguíneos. Barra de escala: 15 micras. (Florencio-Silva et al., 2015)	Página 38
Figura 6: Imagen de micrografía electrónica de barrido (scalling electron micrograph). Muestra dos osteocitos (OT) rodeadas por la matriz ósea (B). Tambien se observan los procesos citoplásmicos (flechas) entre los osteocitos (OT) que forman una red interconectada. Barra de escala: 2 micras. (Florencio-Silva et al., 2015)	Página 40
Figura 7: Resumen esquemático de tejido óseo que muestra células óseas y las relaciones entre ellas y con la matriz ósea (Florencio-Silva et al., 2015)	Página 40
Figura 8: Estructura anatómica de los procesos alveolares. A. Tabla vestibular o lingual. B. Tabique interdentario. C. Tabique interradicular. (Gomez de Ferraris et al., 2009)	Página 42
Figura 9: Curación del alveolo postextracción. (Lindhe, 2009).	Página 46
Figura 10: Elevación de seno sinusal del maxilar izquierdo mediante la técnica de Cadwell-Luc, con inserción simultánea de tres implantes osteointegrados	Página 49

Figura 11: Resumen gráfico del remodelado óseo. (Crocket et al., 2011)	Página 56
Figura 12: Clasificación de los materiales de injerto óseo (Modificado de Jensen et al., 2005)	Página 59
Figura 13: Obtención de un bloque de hueso autólogo, cortical y esponjosa de la sínfisis mandibular	Página 61
Figura 14: Obtención de un bloque de hueso autólogo, cortical de la rama mandibular	Página 62
Figura 15: Osteotomía horizontal posterior mandibular con injerto de interposición de biomaterial sintético particulado de HA/ β TCP (Imagen cortesía del Prof. Mareque)	Página 64
Figura 16: Osteotomía de pared lateral de seno maxilar derecho. Tras la elevación de la membrana sinusal, se rellena con biomaterial particulado de HA/ β -TCP. Posteriormente, se reposiciona el colgajo mucoperióstico	Página 66
Figura 17: Reconstrucción de un defecto alveolar. (A) Defecto alveolar en 36. (B) Injerto autólogo de rama mandibular fijado con microtornillo de titanio. (C) Injerto particulado de HA/ β TCP que fue recubierto con una membrana de colágeno reabsorbible. (D) Rx periapical de control a los seis meses de colocar la corona sobre implante	Página 67
Figura 18: Resumen de los cuatro atributos clave en términos de similitud entre el animal y el hueso humano. Resumen Tabla modificada de Pearce et al., 2007	Página 73
Figura 19: Conejo de Nueva Zelanda.....	Página 76
Figura 20: Fotografía del biomaterial y protocolo de uso según el fabricante. A y B: biomaterial 4BONE®, envasado en el dispensador, previo a ser hidratado. C:	

Hidratación del biomaterial con suero fisiológico. D, E y F: expulsión del suero fisiológico sobrante	Página 77
Figura 21: Imágenes de SEM del biomaterial bifásico usado en el estudio	Página 78
Figura 22: Animalario de la Universidad de Murcia	Página 79
Figura 23: Estabulario del Animalario de la Universidad de Murcia	Página 79
Figura 24: Esquema del diseño de los defectos en la calota de los conejos de Nueva Zelanda	Página 80
Figura 25: Procedimiento quirúrgico de la creación de defectos críticos de 12mm. Colgajo mucoperiostivo, exposición del hueso parietal del conejo. Dibujo del defecto mediante lápiz de grafito del diseño del defecto	Página 83
Figura 26: Marcas de la región del defecto usando una fresa de cono invertido de carburo de tungsteno	Página 84
Figura 27: Defecto circular de 12mm realizado con trefina (Hu-FriedyMgf Co. Chicago, Ill, USA)	Página 84
Figura 28: Defectos rellenados con el biomaterial (HA/ β TCP 60-40 + 3% Si)	Página 85
Figura 29: Evaluación histomorfométrica del defecto .Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo	Página 88
Figura 30: Evaluación histomorfométrica del defecto .Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo	Página 89
Figura 31: Región de interés. Cada defecto fue identificado mediante dos orificios marcados con amalgama. La región de interés tiene forma de polígono delimitado por las paredes laterales del defecto en ambos cortes, coronalmente por la cortical superior	

e inferiormente por la cortical basal. CD (Cortical Defect – Defecto Cortical), NB (New Bone – Hueso Nuevo), MB (Mature Bone – Hueso Maduro), CT (Connective Tissue – Tejido Conectivo, RM (Residual Material – Material residual) y Dura (densificación fibrosa del tejido conectivo correspondiente a la duramadre). (Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo)Página 90

Figura 32: Volumen residual de injerto. Azul: 8 semanas; Verde: 12 semanas. Grupo A: 4BONE*, Grupo B: 4BONE*+ 3% silicio. Valores expresados en %Página 96

Figura 33: Evaluación mediante μ -CT de los grupos de estudio a las 8 y a las 12 semanas. Cuadro de la relación píxeles- μ m y leyenda de colores de la imagenPágina 96

Figura 34: Figura resumen de la Evaluación Histomorfométrica a las 8 semanas: Cierre del defecto, Material Residual, Neoformación Ósea y Tejido Conectivo. Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 98

Figura 35: Evaluación Histomorfométrica del Grupo Control a las 8 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 100

Figura 36: Evaluación Histomorfométrica del Grupo A (4BONE*) a las 8 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 100

Figura 37: Evaluación Histomorfométrica del Grupo B (4BONE* + 3% Si) a las 8 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los

resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 101

Figura 38: Figura resumen de la Evaluación Histomorfométrica a las 12 semanas: Cierre del defecto, Material Residual, Neoformación Ósea y Tejido Conectivo. Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 102

Figura 39: Evaluación Histomorfométrica del Grupo Control a las 12 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 104

Figura 40: Evaluación Histomorfométrica del Grupo A (4BONE®) a las 12 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 104

Figura 41: Evaluación Histomorfométrica del Grupo B ((4BONE® + 3% Silicio) a las 12 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 105

Figura 42: Comparación mediante histomorfometria: Grupo B (4BONE® + 3% Silicio) a las 8 semanasPágina 105

Figura 43: Comparación mediante histomorfometria: Grupo B (4BONE® + 3% Silicio) a las 12 semanasPágina 106

Figura 44: Comparación mediante histomorfometria: Grupo A (4BONE®) a las 8 semanasPágina 106

Figura 45: Comparación mediante histomorfometria: Grupo A (4BONE®) a las 12 semanasPágina 107

Figura 46: Comparación mediante histomorfometria: Grupo Control a las 12 semanasPágina 107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Calidad del tejido óseo. A mayor número de unidades Hounsfield, mayor densidad. Cuadro modificado de Misch et al 2005Página 70

Tabla 2: Caracterización de los tejidos. A mayor número de unidades Hounsfield, mayor densidad. Cuadro modificado de Misch et al 2005Página 70

Tabla 3: Volumen residual del material de injerto. Grupo A: 4BONE®, Grupo B: 4BONE® + 3% silicio. Media \pm DM (SD); Mediana. *P <valor 0,005. Se aplicó el Test de Kruskal-Wallis para grupos independientes para comparar los resultados de los obtenidos en los mismos grupos en tiempos del estudio distintosPágina 97

Tabla 4: Evaluación Histomorfométrica a las 8 semanas: Grupo A (4BONE®); Grupo B (4BONE® + 3% Silicio). Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados como Valor Medio \pm Desviación Media (DM) y Mediana. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 98

Tabla 5: Evaluación Histomorfométrica a las 12 semanas: Grupo A (4BONE®); Grupo B (4BONE® + 3% Silicio). Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados como Valor Medio \pm Desviación Media (DM) y Mediana. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientesPágina 102

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. OBJETIVOS.....	25
3. ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	29
3.1. El hueso como unidad básica: formación y biología...	31
3.2. Partes del tejido óseo.....	33
3.3. Estudio del hueso alveolar, el hueso maxilar y el hueso mandibular.....	43
3.4. Fundamentos biológicos de la cicatrización ósea.....	47
3.5. Imágenes óseas radiográficas para la valoración del hueso y la regeneración.....	71
3.6. Silicio.....	73
3.7. Modelos de estudio de regeneración ósea.....	74
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
4.1. Material.....	79
4.2. Métodos.....	83
5. RESULTADOS.....	95
5.1. Evaluación μ CT.....	97
5.2. Evaluación histomorfométrica.....	99
6. DISCUSIÓN.....	111
7. CONCLUSIONES.....	123
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN:

La cirugía de reconstrucción ósea de los maxilares se ha convertido en un procedimiento rutinario, predecible y con resultados clínicos probados. Nuestros pacientes empiezan a considerar estas técnicas de cirugía reparadora o reconstructiva como algo ya integrado en la odontología actual, especialmente utilizadas en la rehabilitación oral con prótesis fijas implantoportadas.

En los últimos años se han desarrollado distintas técnicas y materiales para la reconstrucción de los defectos óseos del proceso alveolar, entre ellos injertos óseos autólogos, aloinjertos, xenoinjertos y aloinjertos. La investigación científica continua obteniendo avances en la comprensión de los procesos biológicos implicados en la curación, regeneración y remodelado óseos, combinados con las técnicas de injerto y los nuevos biomateriales. (Chiapasco et al., 1999; Aghaloo y Moy, 2007; Khuory, 2006; McAllister y Haghghat, 2007).

La introducción de los implantes dentales endoóseos en la odontología permitió realizar rehabilitaciones protésicas fijas, incluso en casos de pérdida de varios dientes, evitando así la utilización de prótesis removibles en muchos casos (Adell et al., 1981; Albrektsson et al. 1986). En los inicios de la implantología la cantidad y la calidad del hueso remanente limitaban el tipo de restauración implantoportada. Poco después de la extracción de los dientes se inicia un proceso de reabsorción del hueso alveolar, primero en anchura y más tarde en altura. (Cawood y Howell, 1991; Cardaropoli et al., 2003; Cardaropoli et al., 2005).

Posteriormente se desarrollaron numerosos procedimientos destinados a regenerar y reparar el hueso perdido en el proceso alveolar de los maxilares, con el objeto de poder insertar los implantes, estos pusieron de manifiesto la importancia que tenía el conocimiento de la anatomía y fisiología del hueso en la incorporación y posterior éxito de este tipo de técnicas reconstructivas (Aghaloo y Moy, 2007; Khuory, 2006; Chiapasco et al., 2009).

Wang y Boyapati, (2006) describieron los cuatro principios biológicos necesarios para una regeneración ósea predecible: 1. Cierre primario de la herida para asegurar una curación ininterrumpida y segura de la misma, 2. Angiogénesis para proporcionar el necesario aporte sanguíneo y de células mesenquimales indiferenciadas, 3. Mantenimiento/creación de espacio para facilitar el suficiente y adecuado ambiente para la neoformación ósea, y finalmente 4. Estabilidad de la herida y el implante para favorecer la formación del coágulo y un proceso de curación/reparación sin incidentes (Wang y Boyapati, 2006).

El clínico, según el tamaño, la forma y la localización del defecto en los maxilares deberá seleccionar el material o materiales y la técnica quirúrgica que va a utilizar con el fin de obtener el mejor resultado posible en la reconstrucción del hueso alveolar del paciente para poder asegurar una rehabilitación a largo plazo. (Aghaloo y Moy, 2007; Chiapasco et al. 2009). En los recientes estudios clínicos los autores no encuentran diferencias entre los resultados de los implantes insertados en hueso natural y los insertados en hueso regenerado (Simion et al., 2001; Zitzmann et al., 2001; Buser et al., 2002; Cangini et al., 2005).

La pérdida de hueso alveolar se manifiesta clínicamente con una pérdida vertical-alura y horizontal-anchura, siendo fundamental el estado de la cortical vestibular, ésta pérdida está relacionada generalmente con la enfermedad periodontal, exodoncias traumáticas, malformaciones óseas y a la reabsorción fisiológica relacionada con la extracción dental (Garber & Rosenberg., 1981; McCarthy et al., 2003).

La hidroxiapatita (HA) sintética ha proporcionado buenas soluciones en la reparación ósea, debemos tener en cuenta que la HA es el principal componente inorgánico del hueso animal, sin embargo no posee capacidad osteogénica, que es el factor ideal de los biomateriales actuales de reparación-regeneración ósea. El β -Fosfato Tricálcico (β -TCP), posee unas características similares pero presenta una reabsorción más rápida (Qiu et al., 2012; Velasquez et al., 2013).

El silicio (Si) es un oligoelemento, esencial en el tejido óseo y se ha demostrado que es capaz de promover la neoformación ósea. Por todo esto la hidroxiapatita- β -Fosfato Tricálcico modificados con silicio (Si-HA ; β -TCP-HA), puede ser un prometedor

biomaterial para la reparación ósea y para favorecer la regeneración ósea en la reparación (Velasquez et al., 2013; Qiu et al., 2012)

Los estudios de regeneración ósea y de estos biomateriales utilizados en traumatología y cirugía ortopédica y cirugía oral e implantología dental se realizan desde hace muchos años y tienen como objetivo determinar si el nuevo material o implante cumple los requisitos necesarios de biocompatibilidad, estabilidad mecánica y seguridad, para ello se inician con rigurosos estudios “in vitro” e “in vivo”. Los resultados de los estudios “in vitro” pueden ser difíciles de extrapolar a una situación “in vivo”. Por esta razón el uso de modelos animales de experimentación, es frecuentemente, un paso previo esencial a los estudios clínicos en humanos. (Urban et al., 2000; Pearce et al., 2007).

Se realiza este estudio experimental, histológico/histomorfométrico y con imágenes de μ -CT, para evaluar el efecto de las nanopartículas de cristales bioactivos de Silicio añadidas a la superficie de partículas de Fosfato Cálculo Bifásico (BCP), que es una mezcla 60/40 de Hidroxiapatita (HA) y Fosfato β -Tricálcico (β -TCP), cuando las utilizamos como andamio “scaffold”, en la neoformación ósea por sustitución lenta, “creeping substitution”, en defectos óseos críticos realizados para el estudio, en calota de conejo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la influencia en el comportamiento biológico de la adición de un ion bioactivo, el silicio, a un biomaterial cerámico bifásico compuesto por HA/ β -TCP, en la cicatrización de un defecto crítico en calota de conejo de Nueva Zelanda.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Evaluar el cierre del defecto crítico usando un biomaterial formado por 60% de Hidroxiapatita, 40% de β -TCP y 3% de nanopartículas de Silicio; comparándolo con un biomaterial formado solamente por 60% de Hidroxiapatita y 40% de β -TCP.
2. Estudiar la neoformación ósea que se produce en el defecto crítico en calota de conejo al utilizar 60% de Hidroxiapatita + 40% de β -TCP y 60% de Hidroxiapatita + 40% de β -TCP + 3% de Silicio.
3. Estudiar el proceso de reabsorción del biomaterial que se produce en el defecto crítico en calota de conejo usando 60% de Hidroxiapatita + 40% de β -TCP y 60% de Hidroxiapatita + 40% de β -TCP + 3% de Silicio.

3. ESTADO DE LA CUESTIÓN

3. ESTADO DE LA CUESTIÓN:

El hueso, junto al cartílago, forman parte de los tejidos de sostén del organismo, Son tejidos conectivos especializados, como en otros tejidos conectivos, los elementos intercelulares conforman su aspecto microscópico.

El tejido óseo está formado por hueso compacto descalcificado y hueso compacto no descalcificado, al mismo tiempo, también encontramos hueso esponjoso descalcificado.

El hueso compacto descalcificado lo forman el periostio, los sistemas laminares, el endostio, diferentes tipos de células óseas y capilares que vascularizan y aportan nutrientes a éstas células.

El hueso compacto no descalcificado está formado por sistemas laminares y el hueso esponjoso descalcificado lo forman sistemas laminares y células óseas (Crockett et al., 2011; Chatakun et al., 2014).

3.1. EL HUESO COMO UNIDAD BÁSICA: FORMACIÓN Y BIOLOGÍA

3.1.1 Fisiología del tejido óseo

El tejido óseo está compuesto por dos componentes principales, la parte inorgánica (65%) y la parte orgánica (35%). La parte inorgánica está compuesta por iones de Ca, P, O, Si, Mg, etc. Los cuales se estructuran en forma de fosfatos de calcio que son denominados cristales de hidroxiapatita (HA). La parte orgánica está compuesta por células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) y por proteínas de las cuales el 90% son colágeno tipo I y el resto son otras proteínas de cadena larga como el colágeno tipo III, la osteocalcina, la osteopontina y la sialoproteína ósea, entre otras (Crockett et al., 2011; Chatakun et al., 2014).

Por lo tanto, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado, que contiene capilares que nutren las células óseas y, además, está innervado. El tejido óseo se encuentra estructurado en laminillas de matriz osteoide y la distribución de estas laminillas será la que determinará si el hueso es cortical o esponjoso.

Los conductos de Havers son característicos del hueso cortical: se encuentran recubiertos por las laminillas, en posición concéntrica, donde se sitúan los osteocitos. El hueso trabecular, o esponjoso, está formado por un entramado, las laminillas óseas se ordenan formando una red que delimitan las cavidades areolares, en su interior se encuentra la médula ósea.

Durante la embriogénesis los huesos largos se forman inicialmente como cartílago que será reemplazado gradualmente por hueso, este proceso se conoce como osificación endocondral, los huesos planos como los del cráneo se forman por osificación intramembranosa, condensación de células mesenquimales. Durante la infancia el modelado-formación óseo y el remodelado óseo (reemplazar y renovar) coinciden, una vez finalizado el crecimiento el remodelado óseo es prácticamente el mantenimiento de la integridad del esqueleto, con la excepción de la neoformación ósea que se produce después de una fractura.

La mayoría de huesos están formados por una densa cortical externa y una estructura ósea trabecular interna (esponjosa), dando en su conjunto el equilibrio entre el peso y la resistencia. La esponjosa es un reservorio de la médula ósea y actúa como un reservorio de minerales.

Los osteoblastos son las células óseas que se encargan de producir hueso mediante la síntesis y la secreción dirigida de colágeno tipo I, el que conforma más del 90% de la proteína de la matriz orgánica del hueso. Ésta conjuntamente con otros tipos de colágeno, proteoglicanos, fibronectina y proteínas específicas del hueso como la osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina conforman la sustancia osteoide, no mineralizada y flexible, donde reside el osteoblasto (Crockett et al., 2011; Chatakun et al., 2014).

La mineralización ósea se consigue por la deposición de fosfato que es generado por las

fosfatasa presentes en las membranas derivadas de los osteoblastos, que conforman vesículas en el interior de la sustancia osteoide. El contacto con el abundante calcio del líquido extracelular da como resultado la formación y aposición-crecimiento de cristales de hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]. La rigidez del hueso la proporcionan sus minerales, característica que lo distingue de otras matrices de colágeno. La proporción entre matriz orgánica y mineral (en el adulto: 60% mineral, 20% orgánico, 20% agua) es crucial para asegurar el balance ideal entre la resistencia y la flexibilidad del esqueleto (Buser et al., 1998; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006; Crockett et al., 2011)

3.2. PARTES DEL TEJIDO ÓSEO:

3.2.1 Matriz Orgánica o Sustancia Osteoide

3.2.1.1 Colágeno

El colágeno es una proteína que se encuentra en todos los animales. Es la proteína más abundante en el cuerpo humano y forma fibras que resisten las fuerzas de cizalla. Esta es la principal proteína de los huesos, los tendones y la piel. En la Membrana Extracelular (MEC), el colágeno se dispone en formato gel, y proporciona resistencia y sostén. Aunque existen 28 tipos de proteínas, más del 90% son los tipo I, II, III y IV. Esta proteína es el componente más abundante en la piel y los huesos (Mathews et al., 1999).

3.2.1.2 Glicoproteínas

Las glicoproteínas son moléculas compuestas: se componen de una proteína unida a uno o varios glúcidos, ya sean simples o compuestos.

Se trata de una molécula integrada normalmente por uno o más oligosacáridos unidos de modo covalente a cadenas laterales específicas de polipéptidos (Curtis et al., 1996; Mathews et al., 1999).

3.2.1.3 Proteoglicanos

Son un tipo de Glicoproteinas altamente glicosadas. Las moléculas se encuentran formadas por un núcleo proteico que se encuentra unido covalentemente a

glicosaminoglicanos (GAG). (Curtis et al., 1996; Mathews et al., 1999)

Los proteoglicanos se encuentran unidos al aparato de golgi. Actúan como moduladores de señales en procesos de comunicación entre la célula y su entorno. Dan a las articulaciones elasticidad, amortiguación y resistencia a la compresión. (Curtis et al., 1996; Mathews et al., 1999)

3.2.1.4 Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento (Growth Factor - GF) realizan una importante función en la comunicación intercelular. Su función principal es el control externo del ciclo celular, estimulando la proliferación celular e iniciando la mitosis; además, los GF también estimulan la migración celular, la diferenciación celular y la apoptosis. También, inhiben la degradación de proteínas y otras macromoléculas (Curtis et al., 1996; Mathews et al., 1999; Alberts et al., 2005)

3.2.1.5 Proteínas procedentes del plasma (Factores de crecimiento derivados de las plaquetas (Platelet derived Growth Factors – PDGFs)

Éstas proteínas regulan el crecimiento y la división celular, jugando un papel significativo en la angiogénesis. Por lo tanto, desempeñan un rol importante en la embriogénesis, la migración y la proliferación celular. (Curtis et al., 1996; Mathews et al., 1999).

Cuando se provoca una herida, un coágulo sanguíneo invade la lesión, entonces, las plaquetas liberan PDGFs (Alberts et al., 2005).

3.2.2 Matriz inorgánica o mineralizada

3.2.2.1 Células Óseas

3.2.2.1.1 Osteoblastos

Los osteoblastos se sitúan a lo largo de la superficie del hueso, formando el 4-6% de las células óseas totales. Su función es la formación de hueso. Secretan la matriz osteoide. Son células derivadas de las células madre mesenquimales (MSC), aunque también se han encontrado precursores osteoblásticos circulando en la sangre periférica. Es de suponer

que la mayor parte de estos precursores se haya en el estroma. Éstas células pueden diferenciarse a mioblastos, fibroblastos, condrocitos, adipocitos y osteoblastos.

Una de las características de los osteoblastos es su incapacidad para migrar o dividirse, por lo tanto, no son capaces de proliferar en los defectos. La presencia de células precursoras de la osteogénesis en el hueso o en el tejido blando circundante es básica para la cicatrización ósea.

La diferenciación celular de las MSC hacia el linaje osteoblástico requiere la expresión de genes específicos como: Runt, Distal-less homeobox 5 (Dlx5) y Osterix (OSX). Además, se debe destacar al gen Runx2 como una de las claves para la diferenciación de las MSC. Se ha demostrado que regula genes relacionados con las células osteoblásticas como CollA1, ALP, BSP, BGLAP, y OCN.

Después de que las células progenitoras de los osteoblastos hayan expresado los genes Runx2 y CollA1, comienza la fase de proliferación, en esta fase, se activa la Fosfatasa Alcalina y las células que se encuentran en ella se consideran células pre-osteoblásticas.

La evolución de pre-osteoblastos a osteoblastos maduros se caracteriza por un incremento en la expresión del gen *Osx* y de la secreción de proteínas como la Osteocalcina, la sialoproteína ósea I/II y el Colágeno Tipo I. Los osteoblastos, además, modifican su forma volviéndose alargados y cuboidales. Los Factores de Crecimiento de los Fibroblastos (FGF), microRNAs y la Conexina 43 también tienen un papel importante en la diferenciación del linaje osteoblástico.

La síntesis de la matriz ósea que realizan los osteoblastos consta de dos partes principales: la deposición de la matriz orgánica y su posterior mineralización. Cuando se produce la deposición de la matriz orgánica, los osteoblastos segregan proteínas colágenas, principalmente el Colágeno Tipo I; también secretan proteínas no colágenas como la Osteocalcina, la Osteonectina, la Sialoproteína Ósea II y la Osteopontina; y proteoglicanos como el decorin y el biglicano. Entonces, comienza la mineralización de la matriz ósea, que tiene lugar en dos fases: vesicular y fibrilar.

La fase vesicular tiene lugar cuando las matrices vesiculares (de 30 a 200nm de tamaño) de

los osteoblastos migran de la porción apical de éstas células hacia la matriz ósea neoformada uniéndose a proteoglicanos y otros componentes orgánicos. Gracias a su carga negativa, los proteoglicanos sulfatados inmovilizan a los iones de Calcio que se almacenan en las vesículas de la matriz. Una vez que los osteoblastos han segregado enzimas que degradan los proteoglicanos, los iones de Calcio quedan libres y atraviesan los canales de Calcio de la membrana de las vesículas de la matriz. Las anexinas son las proteínas que forman éstos canales. La Fosfatasa Alcalina degrada los compuestos que contienen fosfato, liberándolo dentro de la matriz vesicular. A continuación, los iones de fosfato y de calcio dentro de las vesículas se unen formando los cristales de hidroxiapatita.

La fase fibrilar ocurre cuando se produce una sobresaturación de iones de Calcio y Fosfato dentro de la matriz vesicular, haciendo que se rompa la matriz liberando los cristales de hidroxiapatita e invadiendo la matriz circundante.

Los osteoblastos maduros aparecen como una única capa de células cúbicas que contienen un retículo endoplasmático rugoso y un gran aparato de Golgi. En este punto, los osteoblastos maduros pueden someterse a la apoptosis o convertirse en osteocitos o células óseas de revestimiento (*Bone Lining Cells*) (Khoury et al., 1985, 2004, 2006, 2010; Boyce B. F. et al., 2008; Lindhe et al., 2009; Fink-Eriksen E. et al., 2010; Riancho et al., 2011; Florencio-Silva et al., 2015). (Fig. 1, 2, 3 y 5)

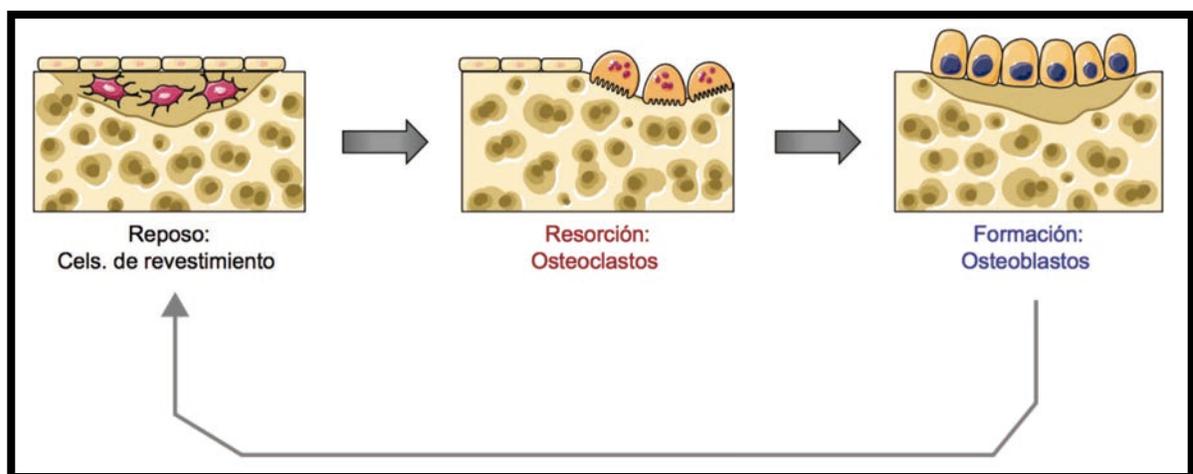


Fig. 1: Esquema del remodelado óseo. Riancho et al., 2011

3.2.2.1.2 Células Óseas de Revestimiento (*Bone Lining Cells*):

Las Células Óseas de Revestimiento son osteoblastos quiescentes que cubren la superficie del hueso. Poseen un perfil nuclear delgado y plano y su citoplasma se extiende a lo largo de la superficie del hueso. En función del estado o necesidad fisiológica del hueso en el que se encuentran estas células, pueden reactivar su actividad secretora, aumentando su tamaño y adoptando forma cuboidal. Aunque las funciones de éstas células no se conocen completamente, se ha demostrado que previenen la interacción directa entre los osteoclastos y la matriz ósea cuando la reabsorción ósea no tiene que tener lugar. Además, participan en la diferenciación celular de los osteoclastos, produciendo Osteoprotegerina (OPG) y el activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL). Por otra parte, las Células Óseas de Revestimiento forman parte de la unidad multicelular básica (BMU), estructura presente durante la remodelación ósea (Flores-Silva et al., 2015). (Fig. 5, 6 y 7)

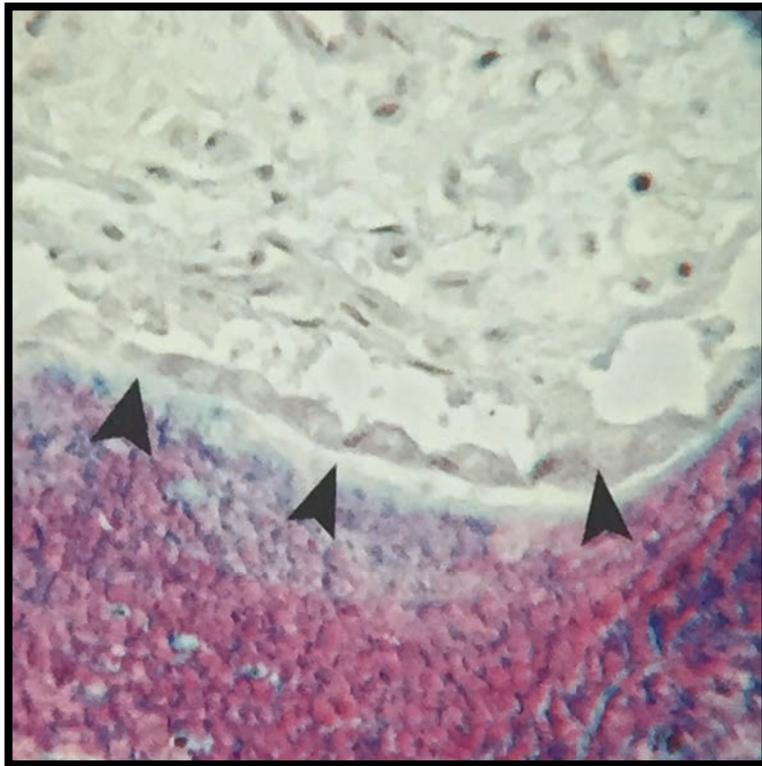


Fig. 2: osteoblastos sobre capa de matriz oteioide en fase de neof ormación ósea (Khoury et al., 2010).

3.2.2.1.3 Osteoclastos:

Los osteoclastos son células multinucleadas originadas a partir de células mononucleares del linaje de células madre hematopoyéticas, concretamente de la línea monocito-macrófago. Conforman un grupo de células gigantes especializadas en descomponer el tejido descalcificado. Por tanto, se sospecha que la mayoría de los precursores osteoclásticos indiferenciados se encuentran en la médula ósea hematopoyética. Sin embargo, existen otros precursores que se encuentran circulando por la sangre periférica y en las trabéculas óseas, las células osteoclásticas quiescentes.

Entre los factores que influyen en la formación de los osteoclastos destacan el factor estimulante de colonias monocito-macrófagos (M-CSF), secretado por las células osteoprogenitoras mesenquimales y los osteoblastos; y el ligando RANK, secretado por los osteoblastos, osteocitos, y células del estroma. Juntos, promueven la activación de factores de transcripción y expresión de genes en los osteoclastos.

El M-CSF se une a su receptor presente en los precursores de los osteoclastos, que estimula su proliferación e inhibe su apoptosis. RANKL es un factor crucial para la osteoclastogénesis y es expresado por los osteoblastos, los osteocitos y las células estromales. Cuando se une a su receptor RANK en los precursores de los osteoclastos, se induce la formación de osteoclastos.

Otro factor denominado osteoprotegerina (OPG), que es producido por una amplia variedad de células, incluyendo los osteoblastos, las células estromales y los fibroblastos gingivales y periodontales; se une a RANKL, impidiendo la interacción RANK / RANKL y, en consecuencia, dando lugar a la inhibición de la osteoclastogénesis. Por lo tanto, el sistema de RANKL / RANK / OPG es un mediador clave de la osteoclastogénesis.

Recientemente se ha demostrado que el potencial osteoclastogénico puede diferir dependiendo del hueso estudiado. Los osteoclastos de huesos largos se forman más rápido, en comparación a la mandíbula. Ésta dinámica, podría ser debida a la composición celular de la médula ósea específica del hueso en el que se encuentran los osteoclastos.

La integridad del esqueleto requiere una actuación coordinada entre los osteoblastos y los

osteoclastos. Éstas células deben actuar en el lugar y la secuencia temporal adecuadas y con una eficiencia parecida.

Durante la remodelación ósea, los osteoclastos se polarizan. Entonces aparecen cuatro tipos de dominios de la membrana de los osteoclastos:

La zona de sellado o “sealing zone” y el borde con volantes o “ruffled border” que están en contacto con la matriz ósea, así como los dominios de secreción basolaterales y funcionales, que no están en contacto con la matriz ósea.

La polarización de los osteoclastos durante la resorción ósea implica la reorganización del actincytoskeleto, en el que se forma un anillo de F-actina que comprende una zona podosómica continua y densa altamente dinámica y un área de membrana aislada que se desarrolla en el “ruffled border”. Es importante mencionar que estos dominios solamente se forman cuando los osteoclastos están en contacto con la matriz mineralizada extracelular.

El crecimiento anormal de la formación de células osteoclásticas conlleva la aparición de algunas enfermedades óseas como la osteoporosis, en la que la reabsorción del hueso es superior a su formación, provocando una disminución de la densidad ósea y aumentando el riesgo de fractura (Boyce B. F. et al., 2008; Fink-Eriksen E. et al., 2010; Khoury et al., 2010; Riancho et al., 2011; Florencio-Silva et al., 2015). (Fig. 3, 4 y 5)

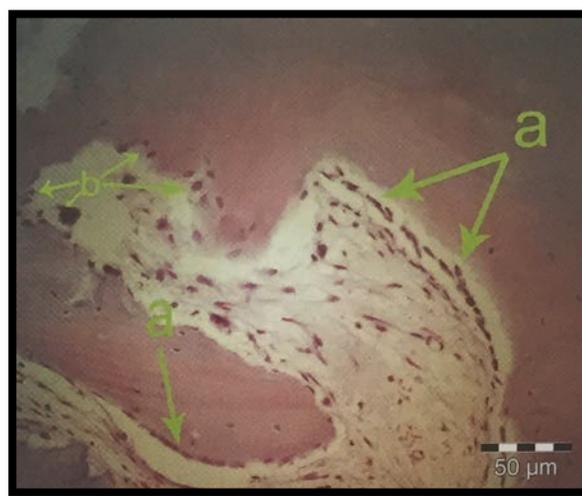


Fig. 3: Osteoblastos (a) y Osteoclastos (b). (Khoury et al., 2010)

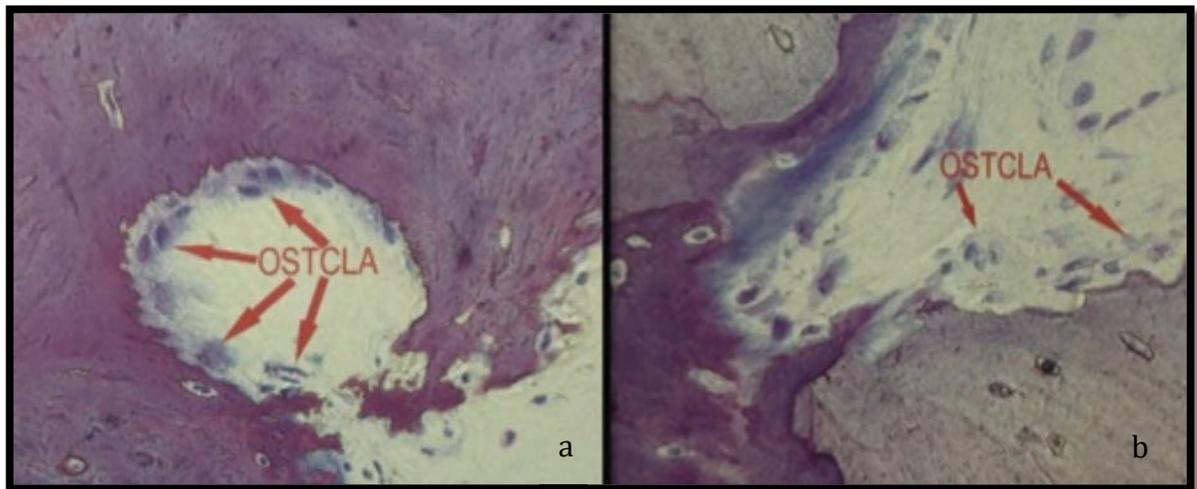


Fig. 4: (a) Osteoclasto y hueso reabsorbido. (b) Osteoclastos y nucleones (Khoury et al., 2010)

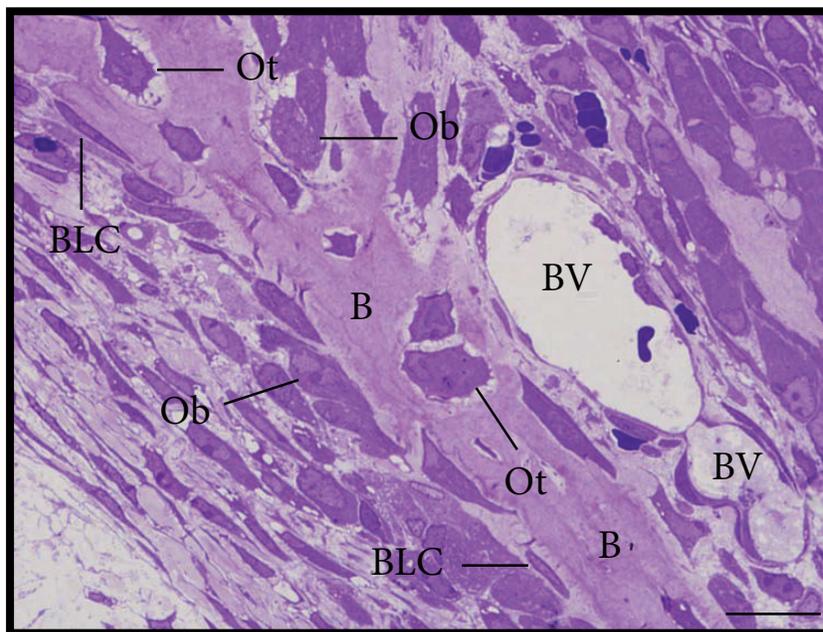


Fig. 5: Cortes teñido con azul de toluidina que muestra una parte de un trabécula ósea (B). Los osteoblastos (OB) y células óseas de revestimiento (BLC) están presentes en la superficie del hueso, mientras que los osteocitos (OT) se observan atrapados en la matriz ósea. BV: los vasos sanguíneos. Barra de escala: 15 micras (Florencio-Silva et al., 2015).

3.2.2.1.4 Osteocitos:

Los osteocitos forman el 90-95% de todas las células óseas, además, son las células más longevas, con una esperanza de vida superior a los 25 años. Se encuentran dentro de lagunas rodeadas por matriz ósea mineralizada y poseen una morfología dendrítica.

Éstas células derivan de las células madre mesenquimales (MSCs) a través de su diferenciación a osteoblastos. Durante el proceso de formación de los osteocitos existen cuatro estadios: osteoide-osteocito, preosteocito, osteocito joven y osteocito maduro. Al final de la formación ósea, algunos osteoblastos se convierten en osteocitos en la matriz ósea. Ésta transformación viene acompañada por cambios en la estructura y la forma de los osteoblastos, que pasan a disminuir su tamaño y el número de orgánulos presentes en la célula. Además, el ratio núcleo-citoplasma aumenta y la síntesis y secreción de proteínas disminuye.

Los osteocitos poseen un sistema canalículo-lacunar que proporciona a estas células la capacidad de detectar presión mecánica. Los osteocitos actúan como mecanosensores gracias a su red interconectada. Éste sistema ayuda al hueso a adaptarse a las fuerzas mecánicas que se producen en él. Parece que de ésta manera los osteocitos actúan como reguladores del remodelado óseo, controlando la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos. La apoptosis de los osteocitos es una señal química para la reabsorción ósea osteoclástica; se ha demostrado que durante la fase de reabsorción, los osteocitos son engullidos por los osteoclastos. (Boyce B. F. et al., 2008; Fink-Eriksen E. et al., 2010; Riancho et al., 2011; Florencio-Silva et al., 2015) (Fig. 6 y 7)

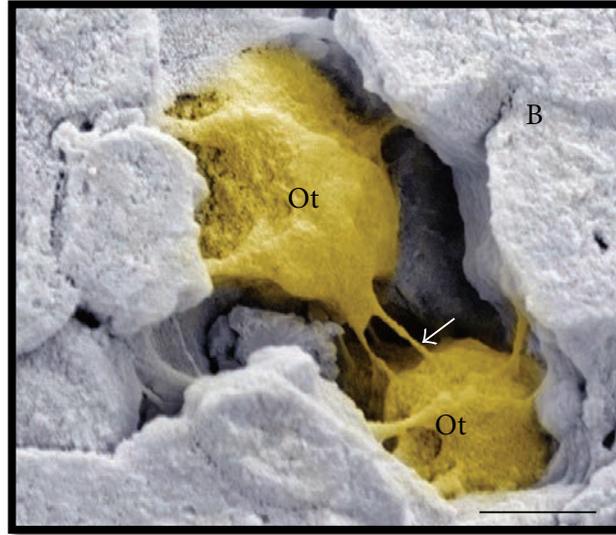


Fig. 6: Imagen de micrografía electrónica de barrido (scanning electron micrograph). Muestra dos osteocitos (OT) rodeadas por la matriz ósea (B). También se observan los procesos citoplásmicos (flechas) entre los osteocitos (OT) que forman una red interconectada. Barra de escala: 2 micras. (Florencio-Silva et al., 2015)

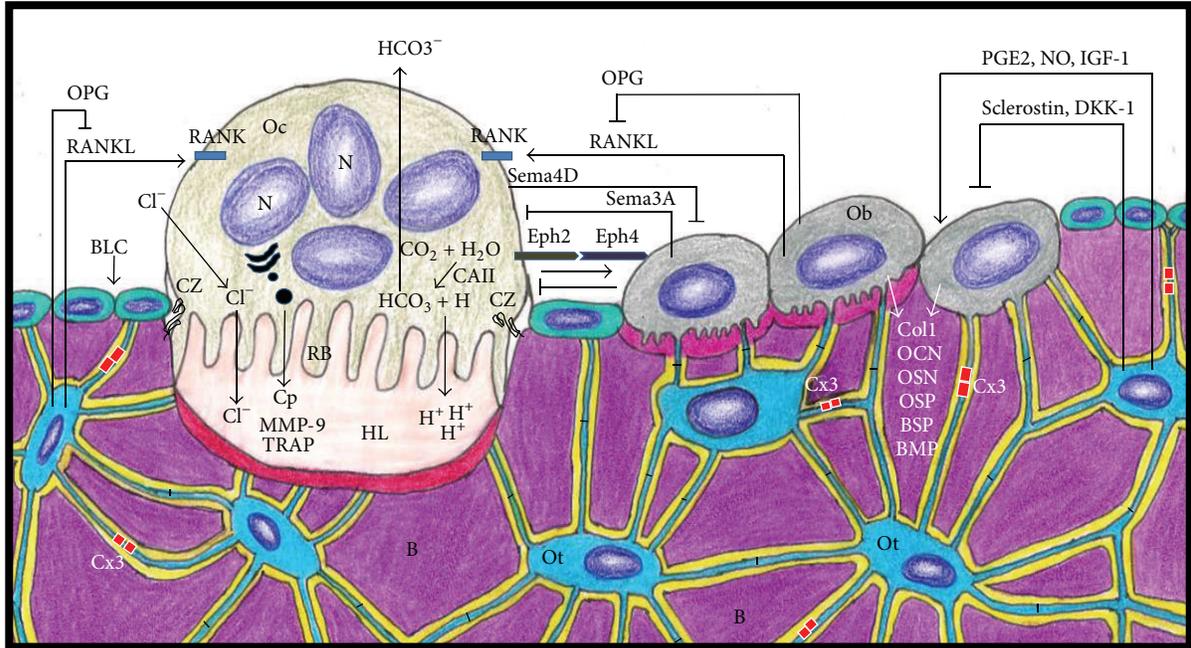


Fig. 7: Resumen esquemático de tejido óseo que muestra células óseas y las relaciones entre ellas y con la matriz ósea (Florencio-Silva et al., 2015)

3.3. ESTUDIO DEL HUESO ALVEOLAR, EL HUESO MAXILAR Y EL HUESO MANDIBULAR

3.3.1 Hueso alveolar:

Las apófisis alveolares, también denominadas procesos o bordes alveolares, forman parte de los huesos maxilares, maxilar superior o maxilar y maxilar inferior o mandíbula. No existe un límite anatómico preciso entre la porción basal o cuerpo del maxilar y mandíbula y los procesos alveolares propiamente dichos, aunque existen diferencias en el origen y la funcionalidad de ambas estructuras. El alveolo dental se forma conjuntamente con el desarrollo y la erupción del órgano dental y se reabsorbe gradualmente cuando el diente se pierde.

Los procesos alveolares corresponden a las porciones de los huesos maxilares que rodean y contienen los receptáculos o alveolos dentarios. Estos alveolos son cavidades cónicas que alojan la o las raíces de los elementos dentarios. Junto con el ligamento periodontal y el cemento radicular forman el aparato de inserción de los dientes; su función principal es la de distribuir y reabsorber las fuerzas recibidas por la masticación y otros contactos (Lindhe et al., 2009; Gomez de Ferraris et al., 2010).

3.3.1.1 El órgano dentario

El diente se aloja en el alveolo dentario, el ligamento periodontal une el cemento radicular y la cortical alveolar-periodóncica que conforma el alveolo uni o multi radicular, ésta pertenece al periodonto de inserción y también conforma el septum interradicular, hueso interdentario o interseptum.

Los tabiques interdentarios e interradiculares siempre presentan una abundante cantidad de tejido óseo esponjoso, revestido por dos corticales compactas, ambas periodóncicas, que se unen en la cresta del tabique. La zona crestal interdientaria está tapizada por encía (Gomez de Ferraris et al., 2010). (Fig. 8)

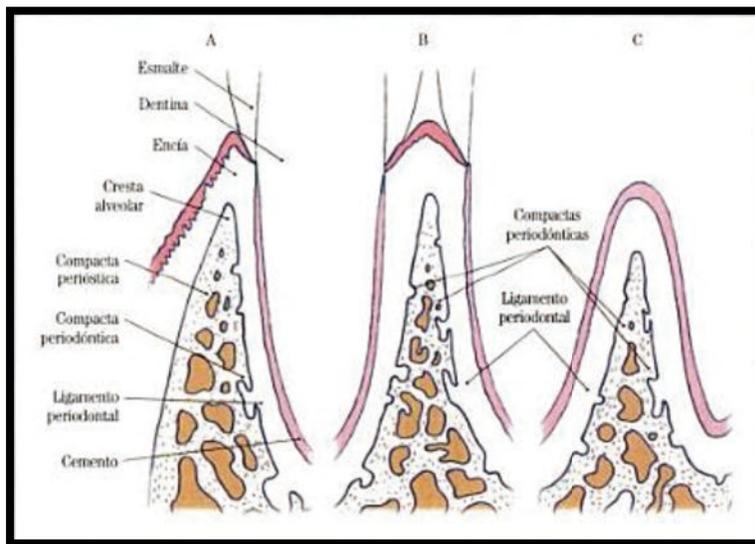


Fig. 8: Estructura anatómica de los procesos alveolares. A. Tabla vestibular o lingual. B. Tabique interdentario. C. Tabique interradicular. (Gomez de Ferraris et al., 2009)

3.3.2 Estudio del hueso maxilar y mandibular

El tipo de osificación a la que se ven sometidas los huesos depende de la futura función que desarrollaran. En aquellas zonas de crecimiento en las que se expone el hueso a tensión, el mecanismo es intramembranoso, ya que el hueso tolerará mejor la tensión, ya que crece por aposición. Por otro lado, la osificación endocondral se da en zona bajo presión. El cartílago, al ser rígido y flexible, soporta mejor la presión, su crecimiento es intersticial y por aposición (Merida-Velasco JA et al., 1993).

3.3.2.1 Hueso maxilar

El hueso maxilar se forma mediante osificación intramembranosa, realizada a expensas del mesénquima. Existen abundantes capilares, fibras de colágeno y osteoblastos que elaboran la sustancia osteoide.

La sustancia osteoide forma trabéculas que se organizan formando una red esponjosa tridimensional. En estos espacios tridimensionales, el mesénquima se transforma en médula ósea. El resto de tejido mesenquimatoso que se encuentra alrededor el tejido osificado se diferencia en periostio, a partir del cual se formaran nuevas trabéculas. Éste es un tejido óseo primario no laminar, y es substituido, después del nacimiento del individuo, por tejido óseo secundario laminar.

En las zonas periféricas del hueso, éste se dispone como tejido óseo compacto y forman las dos corticales o tablas interna y externa.

El hueso maxilar es un hueso esponjoso con unas corticales muy finas, con una imagen radiológica de densidad variable. Tanto la parte anterior como la posterior contienen una cortical porosa y una trabécula fina. Las trabéculas se encuentran revestidas por endostio, están compuestas por tejido óseo laminar con fibras de colágeno, aunque las más anchas puedan contener sistemas de Havers (Merida-Velasco JA et al., 1993; Misch et al., 2008).

3.3.2.2 Hueso mandibular

El mecanismo de formación-osificación de la mandíbula es distinto al hueso maxilar. La mandíbula tiene su origen en una osificación mixta:

Por un lado, el cuerpo mandibular se ve sometido a la osificación intramembranosa, similar al maxilar superior. Por el otro lado, la rama mandibular es sometida a osificación endocondral.

En la osificación endocondral, el cartílago hialino es el que guía el proceso de osificación. Poco a poco, aparecen cambios histológicos como la proliferación e hipertrofia celular, calcificación de la matriz cartilaginosa, invasión vascular del cartílago, formación del tejido osteoide y mineralización. En la osificación mandibular aparecen cuatro cartílagos secundarios que son clave para el desarrollo del hueso: el cartílago coronoideo, el incisivo (sinfisal o mentoniano), el condíleo y el angular.

El cartílago condíleo es el que tiene mayor tamaño y el que desempeña una mayor función, ya que formará la rama ascendente mandibular.

Es muy importante señalar que la aparición de estos cartílagos secundarios marca la inserción de los músculos masticatorios. Dicha inserción guiará el desarrollo de las estructuras musculo-nerviosas y óseas: cada estructura estimula el crecimiento de sus tejidos adyacentes.

Los cartílagos condíleo y angular desaparecen en el feto a término, pero el sinfusal se mantiene hasta los dos años de edad.

El hueso mandibular es un hueso más compacto con anchas corticales, con una imagen radiológica densa; la mayoría de las trabéculas contienen sistemas de Havers. (Merida-Velasco JA et al., 1993; Misch et al., 2005)

3.3.3 Histomorfometría ósea

La histomorfometría ósea es una técnica ampliamente utilizada en el campo de las ciencias médicas. Se ha utilizado como método de diagnóstico para la práctica clínica y como herramienta en la investigación biomédica.

Ésta técnica se define como la evaluación cuantitativa de la remodelación, el metabolismo y la microestructura ósea. Evalúa "in vivo" el metabolismo óseo y puede ser de utilidad en el diagnóstico de las patologías asociadas al hueso.

En cuanto a su aplicación clínica para el diagnóstico, el análisis histomorfométrico de la microarquitectura ósea se ha utilizado para detectar enfermedades óseas metabólicas como la osteomalacia, osteodistrofia renal y osteoporosis. Las mediciones de recambio óseo, la mineralización y el volumen ayudan a clasificar las diferentes enfermedades, ya que muestra diferentes perfiles histomorfométricos. Además, mide algunos aspectos de la calidad del hueso, como la microarquitectura, la textura de la matriz osteoide y la presencia de cambios en el proceso de mineralización de la superficie y las capas intersticiales del hueso. (Vidal et al., 2012)

3.4. FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE LA CICATRIZACIÓN ÓSEA

3.4.1 Curación de pequeños defectos y del alveolo post-exodoncia. Cambios óseos durante la curación:

Un traumatismo en el tejido óseo conlleva la lesión parcial de los vasos sanguíneos y su posterior limitación en el aporte sanguíneo del defecto. Después de la extracción dental se produce la reparación o cicatrización de los tejidos. Las células osteoprogenitoras que migran hacia el coágulo que ocupa el alveolo forman un tejido osteoide que paulatinamente se mineraliza.

Una vez realizada la exodoncia, las células sanguíneas, el plasma y la saliva invaden el alveolo de forma inmediata. A las 24 h de la exodoncia, se observan fibroblastos y fibrina en la periferia y algunos osteoblastos cubriendo los límites óseos. El coágulo comienza su disolución dada la presencia de linfocitos y leucocitos. Pasadas las 48 h. aparece el tejido de granulación en la periferia del alveolo. Cuando el período de cicatrización llega a los cuatro días, el coágulo se ha diluido por completo dejando un entramado de hilos de fibrina que cubre el coágulo. En este momento, se está gestando una red vascular nueva y bien definida. A los siete días, se observa un infiltrado inflamatorio que rodea la herida; un 90% de la zona cicatricial está formada por fibroblastos, fibras de colágeno y vasos sanguíneos; las áreas interradiculares se comienzan a remodelar y el epitelio prolifera por encima de la red de fibrina respetando el tejido de granulación que se encuentra en el interior del alveolo dental. A los veintiún días se observa que la porción apical del alveolo se está reabsorbiendo y el alveolo ha quedado completamente cubierto por epitelio. También se observa la red de vasos neoformados en el interior de la herida. La reabsorción ósea comienza en las paredes adyacentes al alveolo y en el hueso interradicular, el alveolo comienza a rellenarse de hueso neoformado en su región periapical. Entre las cinco y las siete semanas las nuevas trabéculas son visibles. A los dos meses los alveolos están completamente cicatrizados, la mucosa oral queratinizada cubre el defecto y el tejido conectivo subyacente está bien diferenciado. El defecto se rellena por completo de hueso neoformado, éste hueso madura y se remodela. El defecto óseo o alveolo postextracción nunca llegará a mismo nivel, ni en altura ni en anchura, que el hueso previo a la agresión.

El tejido óseo tiene una capacidad de curación extraordinaria, pese a esto, la regeneración completa del hueso se ve limitada por los siguientes factores: escaso riego sanguíneo, inestabilidad mecánica, tamaño del defecto, competición con tejidos altamente proliferativos. Todos los procesos de curación del tejido óseo se fundamentan en tres principios: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. (Lindhe et al., 2009; Khoury et al., 2010) (Fig. 9)

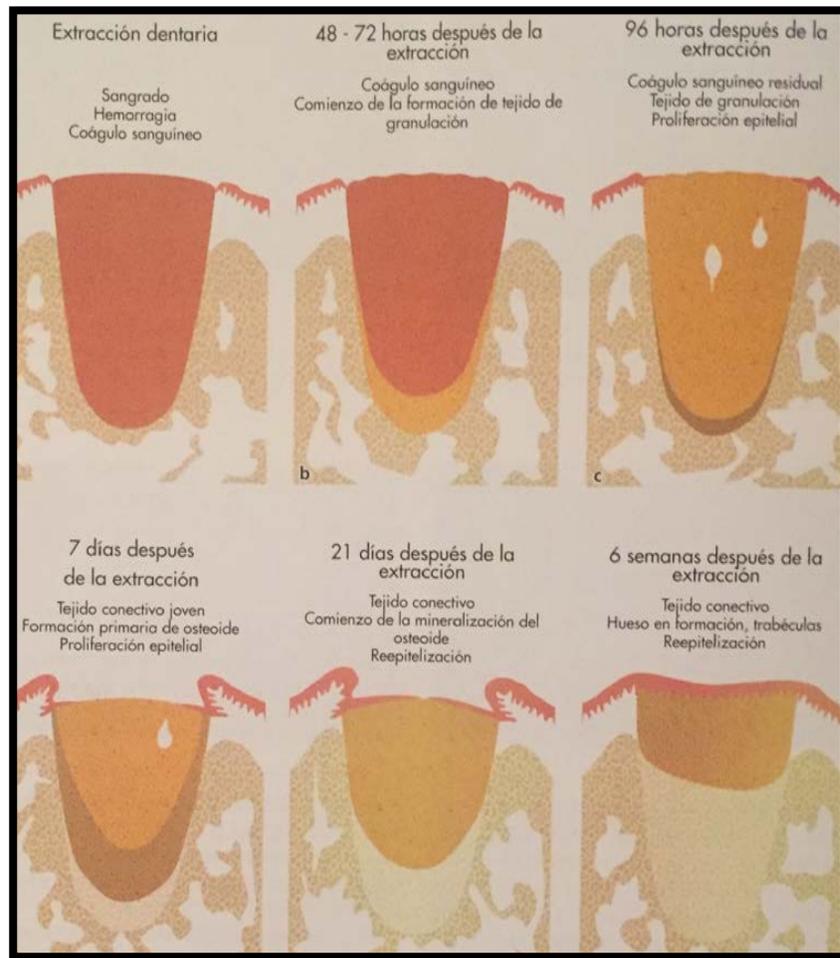


Fig. 9: Curación del alveolo postextracción. (Lindhe et al., 2009).

3.4.2 Osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. procedimientos para la restauración del defecto óseo

Las bases de la osteointegración de los injertos de hueso orales son tres: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción.

Osteogénesis:

Se define la osteogénesis como el proceso de formación de hueso a partir de células osteoprogenitoras. Consiste en transplantar células óseas capaces de formar hueso nuevo junto con el material implantado. El hueso autólogo es el único que tiene ésta característica.

Osteoinducción:

Corresponde a la estimulación de las células osteoprogenitoras a través de los tejidos que rodean la lesión. Se estimula la división, diferenciación y secreción de células óseas y mesenquimales indiferenciadas mediante sustancias que hacen de mensajeras para la regeneración.

Osteoconducción:

Es el proceso mediante el que se facilita la neoangiogénesis. Instalando un patrón para que las nuevas células óseas puedan desarrollarse. La osteoconducción promueve el relleno óseo de los grandes defectos. Debe tratarse de un material bioinerte o bioactivo, además, el biomaterial debería ser degradable o absorbible para ser sustituido por tejido óseo neoformado. (Khoury et al., 2010; Calvo-Guirado et al., 2012a; Calvo-Guirado et al., 2012b; Maté-Sánchez de Val et al., 2014).

Finalmente, definiremos la osteointegración de un injerto como la unión íntima entre el hueso del huésped y el biomaterial (Calvo-Guirado et al., 2012a; Calvo-Guirado et al., 2012b; Maté-Sánchez de Val et al., 2014). Además, los sustitutos óseos deben ser biocompatibles, biodegradables, estructuralmente similares al hueso, fáciles de manejar y económicos (Khoury et al., 2010; Calvo-Guirado et al., 2012a; Calvo-Guirado et al., 2012b; Maté-Sánchez de Val et al., 2014).

3.4.3 Procedimientos para la restauración del defecto óseo

3.4.3.1 Procedimiento de Elevación del suelo sinusal

La elevación de suelo sinusal nos permite rehabilitar los sectores posteriores maxilares con implantes dentales osteointegrados. Después de la exodoncia de uno o varios dientes maxilares posteriores, se produce un adelgazamiento del hueso maxilar que compromete la posibilidad de realizar este tipo de tratamiento ya que en esta zona aparece una importante estructura anatómica que limita la posibilidad de colocar implantes: el seno maxilar.

La elevación de suelo sinusal puede realizarse mediante dos técnicas: por un lado, si la cantidad de hueso perdida es pequeña se puede realizar una elevación de seno con técnica interna o atraumática, elevando la membrana sinusal o de Schneider a través del lecho del implante mediante osteótomos, colocando el material regenerador debajo de la membrana y por encima del ápice del implante, dando una imagen similar a la de una tienda de campaña.

Por el otro lado, si la cantidad de hueso requerida es mayor, se realiza la técnica de elevación lateral de seno maxilar. Se abre una ventana en la pared lateral del seno y se disecciona la membrana sinusal empujándola hacia el interior del seno maxilar, el espacio que queda entre la membrana y el hueso maxilar se rellena con material de relleno óseo.

Durante la elevación de seno maxilar se puede usar material autólogo, sintético, de origen animal o una combinación de dos o más tipos de biomaterial. Si se usa hueso autólogo, la regeneración será más rápida. Éste material actuará de forma osteoconductiva y osteogénica. Pese a esto, la mayoría de intervenciones se realizan mezclando hueso autólogo con biomaterial sintético o de origen animal, ya que la cantidad de hueso requerida para esta cirugía es muy grande. (Khoury et al., 2010) (Fig. 10)



Fig. 10: Elevación de seno sinusal del maxilar izquierdo mediante la técnica de Cadwell-Luc, con inserción simultánea de tres implantes osteointegrados

3.4.3.2 Procedimiento de Regeneración Ósea Guiada

La Regeneración Ósea Guiada o “Guided Bone Regeneration (GBR)” se caracteriza por el recubrimiento del injerto mediante una membrana (ya sea reabsorbible o no reabsorbible) para que el biomaterial quede aislado del tejido blando que cubre el defecto después de suturar el colgajo. De este modo, se evita el crecimiento de tejido no osteogénico hacia el interior del defecto. El biomaterial que se injerta en el interior del defecto puede ser autólogo, sintético o de origen bovino, aunque, como en la elevación de seno, es común mezclar distintos biomateriales para conseguir una regeneración óptima.

La formación ósea comienza en la base y las zonas periféricas del defecto. Las claves de esta técnica son la formación de un coágulo sanguíneo y la estabilidad de la membrana y del biomaterial. Si esto ocurre, el defecto se rellenará de hueso neoformado. (Khoury et al., 2010)

3.4.3.3 Procedimiento de Osteodistracción: Osificación Osteomembranosa

La osteodistracción consiste en la elongación del callo óseo que se produce en una fractura de manera lenta y dinámica. Ésta inducción controlada permite una síntesis guiada de la matriz ósea.

Ésta técnica es controlada básicamente por dos mecanismos biológicos: la presión mecánica y la vascularización.

La inducción de la creación del callo óseo se produce a partir de una fina línea de osteotomía. Durante los siguientes siete días a la osteotomía tiene que haber inactividad mecánica, así se forma el callo blando. A continuación se produce la distracción ósea, aplicando tensión sobre los fragmentos óseos.

La última fase de la distracción es la consolidación, en la que se produce la mineralización completa del tejido neoformado, uniendo los fragmentos divididos por la osteotomía. (Khoury et al., 2010)

3.4.3.4 Procedimiento de Injerto con bloque de hueso autólogo

Khoury define el injerto de hueso en bloque como “el injerto de un trozo de hueso de un área donante en una receptora del mismo organismo”. Los bloques se obtienen de la línea oblicua de la rama mandibular y la sínfisis mandibular, aunque alguna vez se obtiene hueso de zonas donantes extraorales, como la cresta ilíaca, la calota y la tibia. Aunque el hueso que tiene osificación membranosa tiene menos reabsorción que el de reabsorción endocondral.

Al principio, el organismo trata al injerto como un cuerpo extraño al que tiene que destruir, los macrófagos tratan de eliminar el injerto. Al mismo tiempo, la lesión producida libera factores de crecimiento de plaquetas (PDGF) que induce a la proliferación celular y a la neoangiogénesis. Simultáneamente, las PDGF activan los α -Factores de Crecimiento y Transformación (TGF- α), que repercute en la formación del tejido conectivo. Cuando se han agotado los factores de crecimiento plaquetarios, los macrófagos comienzan la reparación. Con la revascularización finalizada, se inhibe la acción de los macrófagos. Consecuentemente, se requiere una rápida vascularización para que el injerto sobreviva. La revascularización del injerto proviene del hueso receptor. Dado que esta técnica requiere del uso de membranas, la vascularización proveniente del tejido blando circundante no es posible.

La reacción que se produce en el hueso receptor es similar a la que ocurre cuando se realiza la técnica de distracción ósea. Aunque en este caso los tejidos no se unen, sino que el tejido receptor acaba “cubriendo” al injerto. De nuevo, es clave la inmovilización del injerto y su rápida revascularización para que el injerto funcione correctamente, si esto ocurre, el injerto aportará muchas células vivas y podrá aprovecharse su potencial osteogénico.

Si el bloque no se compone únicamente de hueso cortical, la revascularización es más rápida. Por este motivo, el hueso obtenido de la cresta ilíaca tiene una mejor revascularización, pero también se reabsorbe más rápidamente por su osificación endocondral. Por su parte, el hueso mandibular, que ofrece hueso cortical con poco componente esponjoso, se reabsorbe de manera más lenta. Para conseguir reunir las características de ambos tipos de hueso se desarrolló la técnica de reconstrucción tridimensional: se fija un bloque de rama o sínfisis mandibular en la zona vestibular del defecto mediante de uno o varios microtornillos (en función del tamaño del defecto y del bloque obtenido), después, se rellena el defecto con hueso particulado, que es revascularizado más rápidamente. (Khoury et al., 2010)

3.4.4. Biología de la regeneración ósea:

3.4.4.1 Remodelación ósea:

La regeneración/reconstrucción de los defectos óseos es actualmente un tratamiento quirúrgico muy común. La predictibilidad de estos tratamientos y su estabilidad a largo plazo han hecho aumentar su aceptación en los últimos años (Aghaloo y Moy, 2007).

El tejido óseo es un órgano dinámico en constante regeneración. Las células encargadas de eliminar el tejido óseo viejo (reabsorción ósea) son los osteoclastos; los osteoblastos son las células encargadas de la fabricación de hueso. Este proceso es conocido como remodelación ósea. Los osteoclastos provienen de la estirpe celular de los monocitos, en cambio, los osteoblastos derivan de las células estromales de la médula ósea, provenientes de células madre mesenquimales pluripotentes (Crockett et al., 2011; Beck et al., 2012).

3.4.4.2 Regeneración ósea:

Entre las patologías del tejido óseo que podemos tratar encontramos los defectos óseos que se definen como la discontinuidad o ausencia de tejido óseo, pueden ser de origen congénito o adquirido.

A lo largo de la vida la pérdida de tejido óseo en la cavidad oral y la región cráneo maxilofacial puede darse por cualquiera de los siguientes motivos: por una infección odontógena, debido a un acto quirúrgico (como una exodoncia) en el que se produce una reabsorción y atrofia del hueso alveolar del maxilar o de la mandíbula, debido a un traumatismo, por la aparición de un quiste, por el tratamiento de un tumor, ya sea benigno o maligno, o por una necrosis ósea, entre otras causas (Dumas et al., 2012).

Cuando se produce una agresión en el hueso, el mecanismo de regeneración ósea da comienzo: se modifica la estructura interna y externa del hueso y da como resultado la reducción de la cantidad y la calidad de hueso remanente (Seeman et al., 2006; Chiapasco et al., 2009). La cicatrización de las fracturas óseas es un complejo proceso biológico que sigue un patrón muy específico (Rentsch et al., 2014). Ésta cicatrización está directamente relacionada con el tiempo transcurrido desde el momento del traumatismo; cuanto más tiempo haya transcurrido, mayor será la cicatrización ósea y, por lo tanto, el hueso será mucho más maduro y de más calidad (Delgado-Ruiz et al., 2015).

El proceso biológico de sustitución, lenta y progresiva: “creeping substitution” está aceptado por la comunidad científica, en este mecanismo de neoformación ósea las trabéculas de los injertos óseos y/o el biomaterial sintético se reabsorben simultáneamente a la aposición de nuevo hueso que va a reemplazar el injerto insertado quirúrgicamente en el defecto óseo, manteniendo la forma y el volumen de éste.

En este proceso las células osteoprogenitoras del tejido óseo periférico (de alrededor) del defecto creado, primero “sobreviven”, luego migran hacia el biomaterial y coágulo sanguíneo que actúan como andamio (“scaffold”), esto lo hacen simultánea y conjuntamente con los vasos neoformados (neovangiogénesis) los cuales van a asegurar el

aporte nutricional y celular necesario en la zona que se regenera y así podrán diferenciarse en pre-osteoblastos (cels. mesenquimatosas) y pre-osteoclastos (monocitos) que se transformarán en osteoblastos y osteoclastos. Éstos realizarán respectivamente la aposición de sustancia osteoide y la reabsorción del biomaterial, así se forma el nuevo hueso reticular (inmaduro) que progresivamente se ordenará y calcificará conformando el hueso maduro (ordenado, calcificado, poco elástico y estructurado). (Albrektsson T., 1980; Buser et al., 1998; Greenwald et al., 2001; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006; Volkmann et al., 2007; Phemister et al., 2008) (Fig. 11)

3.4.4.3 Factores reguladores del mecanismo de remodelado óseo:

El mecanismo de remodelado óseo se ve regulado por diferentes factores: existen factores genéticos, mecánicos, nutricionales, factores locales y factores hormonales. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I. et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.1 Factores hormonales:

Entre los factores hormonales encontramos la Parathormona, la Calcitonina, la vitamina D3 o calcitriol, la Hormona del crecimiento (GH) y los Estrógenos. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I. et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.1.1 Parathormona

La parathormona es segregada por la glándula paratiroidea cuando disminuye la concentración de Ca en sangre. Ésta hormona estimula la formación osteoclástica. Liberan moléculas de Ca al torrente sanguíneo, promoviendo una mayor concentración de éste en sangre. La calcitonina, por su parte, es segregada por las células C de la glándula tiroides, provoca el efecto inverso a la parathormona, inhibiendo la reabsorción ósea. Disminuye la concentración de Ca en el líquido extracelular, es decir, evita los excesos o carencias agudas de Ca a corto plazo ya que es un sistema de retroalimentación: el aumento de Ca en sangre provoca el aumento de la secreción de calcitonina. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I. et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce

BF et al., 2008)

3.4.4.3.1.2. Calcitriol o Vitamina D3:

El Calcitriol o la Vitamina D3, se sintetiza en la piel por la acción de la radiación ultravioleta y favorece la reabsorción ósea. Favorece absorción Ca en intestino, en presencia de la Parathormona, estimula diferenciación de los osteoclastos y favorece reabsorción ósea y promueve la reabsorción de Ca en el riñón. Su déficit en mujeres postmenopáusicas provoca hiperparatiroidismo. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.1.3. Hormona del Crecimiento:

La hormona del crecimiento favorece la osteogénesis de manera directa e indirecta: Estimula directamente la actividad del osteoblasto aumentando la síntesis de colágeno, fosfatasa alcalina y osteocalcina. Indirectamente aumenta la síntesis de factor de crecimiento análogo a la insulina I y II y favorece la diferenciación y proliferación de osteoblastos. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.1.4. Estrógenos:

Los estrógenos favorecen la reabsorción ósea suprimiendo la síntesis de interleuquinas IL-1 y IL-6 y prostaglandinas. Además son factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos y necrosis tumoral.

En la menopausia, se disminuye el nivel de estrógenos, lo que produce osteoporosis. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.2 Factores Locales:

Los factores locales corresponden a los factores de crecimiento, las citoquinas y las proteínas de la matriz. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.2.1 Factores de crecimiento:

Entre los factores de crecimiento que estimulan la formación ósea podemos destacar:

- Proteínas morfogenéticas (BMPs): 2-4-6-7
- Factores de crecimiento análogo a insulina I y II (IGF-I y IGF-II)
- Factor transformante del crecimiento β (TGF β)
- Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)
- Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Entre los factores de crecimiento que estimulan la reabsorción ósea podemos destacar:

- Factor de necrosis tumoral (TNF)
 - Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
 - Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)
 - Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
 - Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)
 - Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)
- (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I. et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.2.2 Citoquinas:

Las citoquinas son estimuladores de la reabsorción ósea. Entre ellas, las más importantes son: la Interleuquina 1 (IL-1); la Interleuquina 6 (IL-6), producida en respuesta a PTH, IL-1 y Vitamina D3; la Interleuquina 11 (IL-11) y la Prostaglandinas (PG): participan en la destrucción ósea en la enfermedad periodontal. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I. et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

3.4.4.3.2.3 Proteínas de la matriz:

Las principales proteínas son el Colágeno tipo I y tipo V, que contribuyen a la mineralización ósea, los Proteoglicanos, Glucoproteínas multiadhesivas: sialoproteínas y osteonectina; cuya función es la adhesión de colágeno y células óseas a la matriz ósea, Proteínas dependientes de la vitamina K: osteocalcina, que capta el Ca de la circulación y estimula la actividad osteoclástica y las Proteínas Ósea Morfogenéticas (BMPs). (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I. et al 2006; Navarro-Moreno MA et al., 2006; Guyton et al., 1989; Boyce BF et al., 2008)

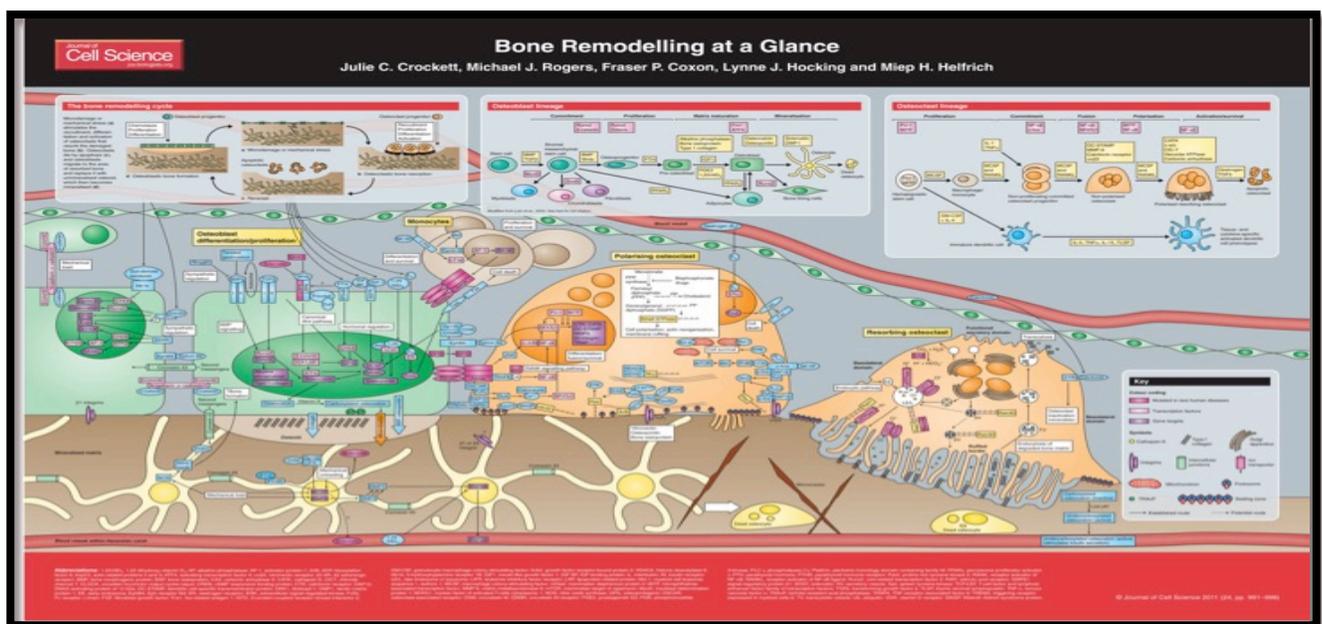


Fig. 11: Resumen gráfico del remodelado óseo (Crocket et al., (2011).

3.4.4.4 Injertos óseos

Los injertos óseos abarcan tanto los “trasplantes” como los “implantes”. Por un lado, los trasplantes son los “traslados” quirúrgicos de tejido vivo. Por el otro lado, se consideran implantes todos aquellos injertos en los que se aplica un biomaterial “externo” al donante.

En la actualidad tenemos varias opciones reconstructivas del hueso, éstas incluyen injertos óseos y materiales de sustitución, los biomateriales tienen, cada vez más, un papel importante en los procedimientos de regeneración ósea, siendo ampliamente utilizados desde pequeñas fenestraciones en el hueso alveolar a grandes defectos del esqueleto facial. (Albrektsson T., 1980; Buser et al., 1998; Greenwald et al., 2001; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006; Volkmann et al., 2007; Phemister et al., 2008).

3.4.4.5 Sustitución del injerto por hueso neoformado:

El proceso de sustitución del injerto por hueso neoformado consiste en la sustitución del injerto autólogo o el biomaterial por tejido óseo. Mientras el injerto se va reabsorbiendo, se produce aposición de hueso neoformado.

El injerto y el coágulo sanguíneo hacen el papel de andamio sobre el que las células osteoprogenitoras comenzaran la regeneración. Simultáneamente a la llegada de las células se produce la neoangiogénesis, se aportan los suficientes nutrientes y células básicas para la regeneración.

Éste proceso permite que las células mesenquimales se diferencien al lineaje osteoblástico y los monocitos al lineaje osteoclástico. Después de que las células osteoblásticas y osteoclásticas hayan realizado su función, se produce la aposición de sustancia osteoide y la consecuente reabsorción del material injertado. De este modo, promueve la formación ósea en forma de retícula (inmaduro) que poco a poco será mineralizada y ordenada formando el tejido óseo maduro. (Albrektsson T., 1980; Buser et al., 1998; Greenwald et al., 2001; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006; Volkmann et al., 2007; Phemister et al., 2008).

3.4.4.6 Tipos de injertos óseos

La regeneración ósea mediante injertos ha evolucionado mucho en los últimos años. Se han usado y estudiado materiales como los autoinjertos (hueso que proviene del mismo paciente), los aloinjertos (hueso de cadáver humano), los xenoinjertos (hueso de origen animal) y los aloplásticos (sustitutivos óseos sintéticos) (Buser et al., 1998; Greenwald et al., 2001; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006; Aghaloo y Moy, 2007) (Fig. 12).

La vascularización de los injertos sigue siendo uno de los mayores retos en ingeniería tisular, se precisa una red vascular suficiente para hacer circular nutrientes, desechos y células progenitoras; recientemente se están desarrollando estudios para determinar la micro-geometría ideal asociada a las características de degradación de los injertos “scaffold” óseos utilizados (Mehdizadeh et al., 2015; Roux et al., 2015).

La microestructura de los injertos óseos debe favorecer la neoangiogénesis, ya que el aporte sanguíneo en el interior del biomaterial es crucial para la neoformación ósea. Eso significa que el biomaterial no solo debe ser poroso, sino que también debe contener microporos que a su vez se interconecten. Ésta porosidad es más importante en los injertos en bloque, ya que se supone que en los injertos particulados el crecimiento vascular es más probable entre las partículas del biomaterial. Por lo tanto, es muy importante no compactar demasiado el hueso particulado dentro del defecto durante la cirugía. (Buser et al. 1998; Jensen et al. 2005; Jensen et al. 2006). Sin embargo, otros autores han publicado recientemente que obtenemos más formación de hueso nuevo, una mayor densidad y un mayor porcentaje de relleno del defecto óseo si el biomaterial está compactado (Romanos et al., 2015).

Las características de la superficie de los gránulos o los bloques de los injertos de hueso vienen determinados por el grado de cristalización y el tamaño de sus cristales, la rugosidad de la superficie, la microporosidad y la composición química. Estas características de la superficie del biomaterial son de gran importancia para la absorción inicial de proteínas, la unión de los osteoblastos y osteoclastos, y la deposición osteoide y, como consecuencia, de la aposición de hueso neoformado en la superficie del material injertado. (Buser et al., 1998; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006).

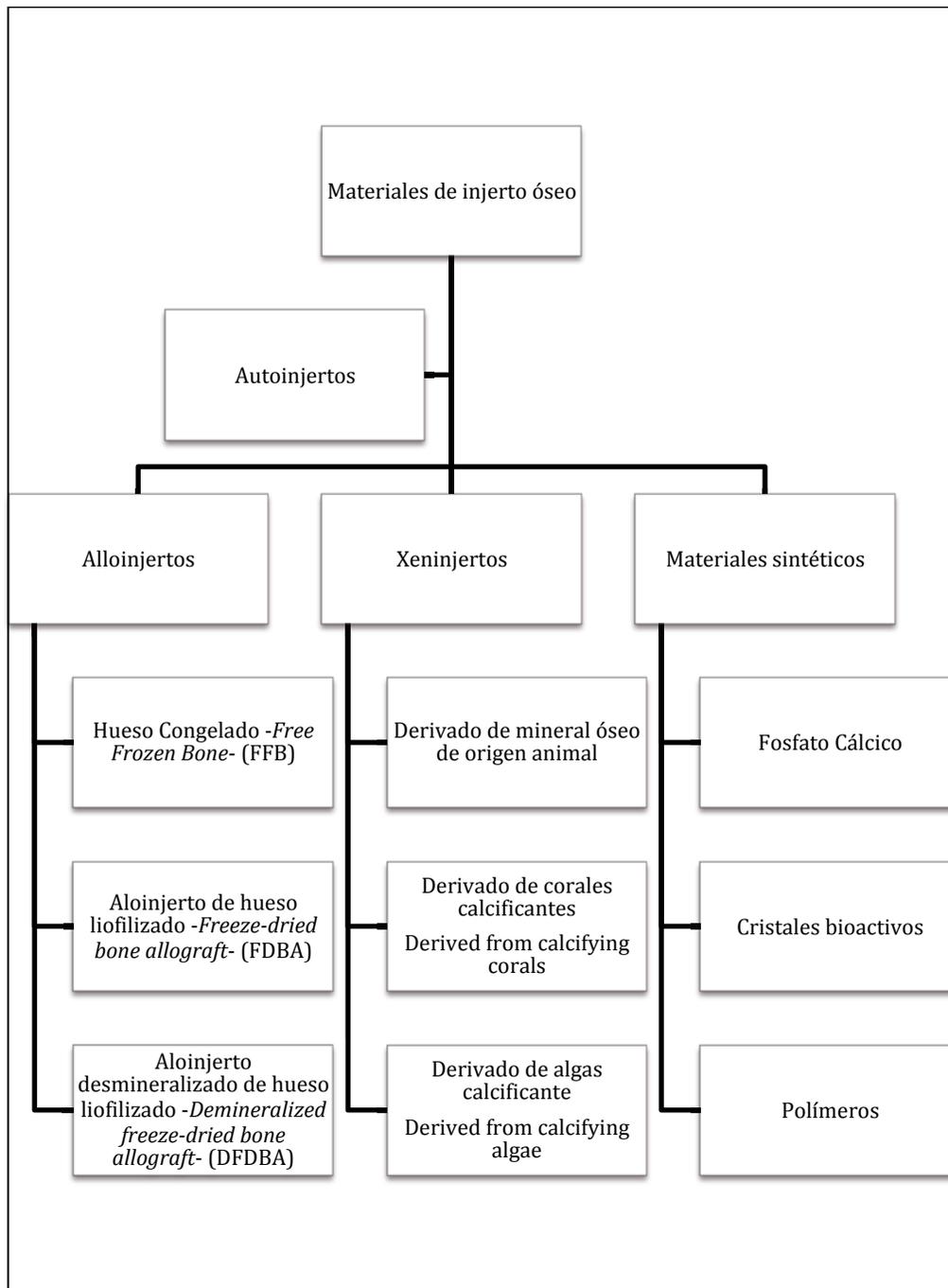


Fig. 12: Clasificación de los materiales de injerto óseo (Modificado de Jensen., et al.2005)

Tanto los biomateriales sintéticos como los naturales tienen una función muy específica: desencadenar una cascada de señales a nivel celular que promueva la proliferación de células formadoras de hueso para así comenzar la regeneración del tejido duro óseo a nivel local (Ramírez-Fernández et al., 2011; Calvo-Guirado et al., 2014).

Se debe tener en cuenta que cada biomaterial tiene su indicación clínica, por ejemplo, si se aplica un biomaterial en un alveolo post-extracción, interesará que el biomaterial se reabsorba completamente en un periodo relativamente corto de tiempo. En otras ocasiones, se puede necesitar que la tasa de reabsorción sea más lenta o incluso puede ser beneficioso que nunca se reabsorba del todo, en casos donde necesitemos estética, con la ayuda del biomaterial se podría restablecer la forma del proceso alveolar, dándole volumen y soporte a los tejidos blandos. (Buser et al., 1998; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006).

Los materiales de injerto óseo pueden proceder tanto de la persona que está siendo tratada (injertos de hueso autógeno o autoinjertos) como de una fuente externa (materiales de sustitución ósea). Ambos tipos se pueden usar en forma de bloques o en forma de injerto particulado. Un material de regeneración ósea debe ser seguro y biocompatible para evitar el riesgo de transmisión de enfermedades o reacciones inmunológicas. Esto no es un problema con los autoinjertos, a no ser que sean manejados inadecuadamente durante la cirugía (Buser et al., 1998; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006) (Fig. 12).

3.4.4.6.1 Injertos de hueso autólogo:

Los injertos de hueso autólogo pueden ser extraídos de zonas intra o extraorales, históricamente, la zona de la que se ha obtenido el hueso, cortical y esponjosa, ha sido la cresta ilíaca (Cornell et al., 1991; Buser et al., 1998; Le Guehennec et al., 2004; Jones et al., 2005; Leupold et al., 2006; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006). En los últimos años, la tendencia general de los cirujanos ha cambiado dado que se ha comenzado a usar la rama, el cuerpo o la sínfisis mandibular como área donadora de hueso (Fig. 13-14). Sin embargo, la zona favorita de la que se obtiene el injerto es la rama mandibular (Fig. 14). El hueso obtenido en estas áreas es básicamente cortical y posee una gran capacidad de adaptación

al lecho receptor con tiempos de cicatrización relativamente cortos. (Cornell et al., 1991; Buser et al., 1998; Le Guehennec et al., 2004; Jones et al., 2005; Leupold et al., 2006; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006).

Además, otra ventaja es que tanto la zona dadora como la receptora se encuentran en el mismo campo quirúrgico, lo cual reduce sustancialmente los tiempos quirúrgicos y de anestesia. El postoperatorio también es más suave y la morbilidad es menor, si lo comparamos con injertos extraorales (Misch et al., 2000; Aghaloo y Moy, 2007).



Fig. 13: Obtención de un bloque de hueso autólogo, cortical y esponjosa de la sínfisis mandibular

Jensen et al (2006) explicaron que el grado de revascularización de los injertos autólogos en bloque dependen de la forma del bloque y, por lo tanto, de la zona donante. Por ejemplo, los injertos obtenidos de la rama mandibular (mayoritariamente cortical ósea) muestran menor revascularización que los obtenidos de la cresta ilíaca (hueso cortico-esponjoso). Otro punto a tener en cuenta es el grado de reabsorción, los injertos de cresta ilíaca muestran un 60% de reabsorción a los seis meses de la cirugía, mientras que los que

proviene del macizo facial no se reabsorben tanto. El hueso receptor se ve estimulado por los factores de crecimiento presentes en el injerto, lo cual aumenta el remodelado óseo. Los injertos autólogos en formato particulado tiene un mayor potencial osteoinductor y osteoconductor debido a que se exponen más factores de crecimiento. Aunque el potencial osteogénico del hueso particulado sea mayor, la cantidad total de células osteogénicas se reduce debido a la manipulación del injerto. Además, la reabsorción del tejido injertado aumenta considerablemente (Buser et al. 1998; Jensen et al. 2005; Jensen et al. 2006). En esta línea de opinión, Atari en un estudio sobre la viabilidad celular del hueso humano particulado recogido con un raspador óseo, instrumental rotatorio e instrumental piezoeléctrico, concluyen que las partículas óseas autólogas obtenidas no constituyen una fuente viable de células óseas (Atari et al., 2011).

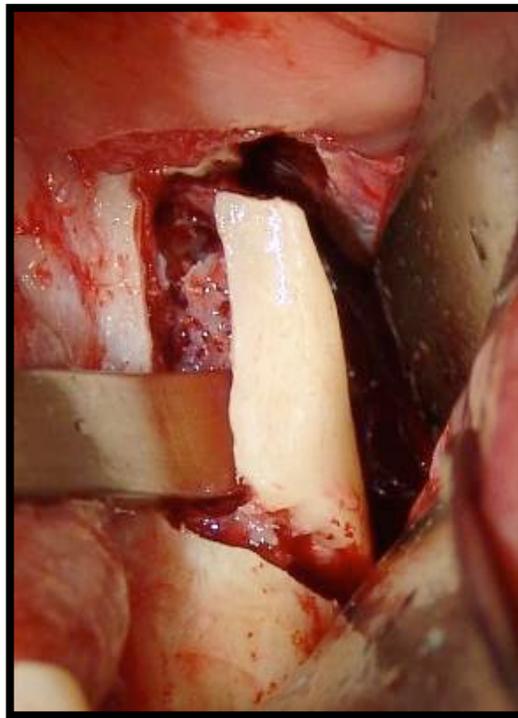


Fig. 14: Obtención de un bloque de hueso autólogo, cortical de la rama mandibular

Los injertos autólogos son considerados todavía el “gold standard” de las reconstrucciones óseas. Como se ha visto, éste tipo de injerto tiene una gran capacidad osteoinductiva. Los autoinjertos guían el desarrollo de los osteoblastos, responsables de la aposición ósea en la

matriz del hueso, desde los tejidos adyacentes a la lesión hasta el lugar del defecto, este proceso es conocido como osteoconducción.

Además, el hueso autólogo induce la formación de hueso mediante la diferenciación de células progenitoras indiferenciadas en el linaje osteogénico (Buser et al. 1998; Jensen et al. 2005; 2006; Yuan et al. 2010). A pesar de esto, se sabe que el uso de material autólogo conlleva una serie de desventajas: la cantidad del material que podemos recoger es limitada, la morbilidad de la zona de la que se obtiene el injerto, la larga duración de la cirugía y las molestias que se ocasionan durante el postoperatorio y su impredecible ratio de reabsorción (que podría llegar a ser del 60%) (Yaszemski et al., 1996; Buser et al., 1998; Jensen et al., 2005; Jensen et al., 2006; Choi et al., 2013; Hooper et al., 2013; Nather et al., 2013; Yang et al., 2013). Por estos motivos, se ha incrementado en los últimos años, el interés en otros tipos de injertos: los xenoinjertos, aloinjertos y materiales aloplásticos, aunque los xenoinjertos y los aloinjertos pueden provocar respuestas inmunitarias no deseadas en el huésped (Yang et al., 2014; Monje et al., 2016).

Se han estudiado gran cantidad de biomateriales para la regeneración ósea. Aloinjertos, Xenoinjertos e injertos sintéticos han sido usados como sustitutos de hueso durante mucho tiempo (Aghaloo y Moy, 2007; Pérez-Sánchez et al., 2010; Ramírez-Fernández et al., 2011).

El biomaterial debe ser biocompatible con el receptor, no debe provocar respuestas inflamatorias anormales en el huésped, que puede ir acompañada de la ausencia y/o regeneración ósea incorrecta, dando lugar a tejido conectivo cicatricial y formación osteoide (Maté-Sánchez de Val et al., 2014).

Por lo tanto, las propiedades esenciales del biomaterial perfecto son: aceptabilidad biológica (biocompatibilidad), predictibilidad, viabilidad clínica, mínimas complicaciones quirúrgicas y postquirúrgicas y aceptación (consentimiento) del receptor (Rokn et al., 2012).

Un importante punto a tener en cuenta en la elección del injerto es la morfología del defecto óseo. Existen muchas técnicas descritas en la literatura que así lo confirman (Aghaloo y Moy, 2007; Calvo-Guirado et al., 2014) (Fig. 15).

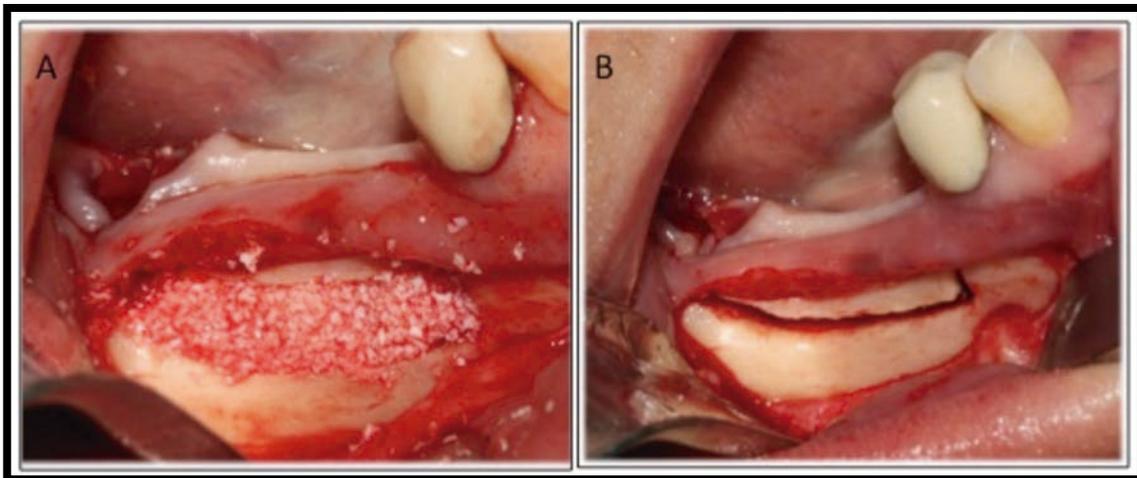


Fig. 15: Osteotomía horizontal posterior mandibular con injerto de interposición de biomaterial sintético particulado de HA/ β TCP (Imagen cortesía del Prof. Mareque).

3.4.4.6.2 Biomateriales alogénicos

Los aloinjertos son aquellos materiales obtenidos de un donante de la misma especie que el paciente receptor.

Los aloinjertos se almacenan, por lo general, en bancos de hueso, y se pueden usar en forma de hueso fresco congelado (FFB), aloinjerto liofilizado óseo (FDBA), o hueso alogénico desmineralizado liofilizado (DFDBA).

Los injertos FFB rara vez se usan en los procedimientos de Regeneración Ósea Guiada (Guided Bone Regeneration) GBR a causa de su alto riesgo de rechazo inmunológico y transmisión de enfermedades; el secado mediante congelación de FDBA y DFDBA reduce la inmunogenicidad del material, mejorando el resultado clínico. Los aloinjertos están disponibles como bloques o en forma de partículas procedentes tanto de origen cortical o esponjoso.

FDBA y DFDBA han demostrado ser biocompatibles, además, contienen moléculas osteoinductoras como las BMPs. Con la desmineralización de los aloinjertos se pretende

exponer las BMPs y aumentar el potencial osteoinductivo de manera inmediata. Sin embargo, durante el proceso de desmineralización, el FDBA pierde parte de su estabilidad mecánica; el DFDBA debe utilizarse en combinación con material mantenedor de espacio. Se ha demostrado que el DFDBA contiene concentraciones muy diferentes de BMPs, y la osteoinductividad por lo tanto, puede variar (Jensen et al., 2005).

3.4.4.6.3 Biomateriales heterólogos xenogénicos

Los xenoinjertos son materiales minerales de hueso procedentes de animales o minerales óseos derivados de corales o algas calcificados de las que el componente orgánico se ha eliminado para evitar el riesgo de reacciones o transmisiones de enfermedades inmunogénicas.

Los xenoinjertos derivados de hueso animal han sido investigados ampliamente en el mundo de la biomedicina. Concretamente, el hueso bovino esponjoso ha sido ampliamente usado como biomaterial de relleno para la regeneración de defectos óseos dada su similitud al hueso esponjoso humano.

El hueso bovino mineral desproteinizado (DBBMs) es biocompatible y osteoinductivo. Sus métodos de producción tienen un importante efecto en su comportamiento biológico. Existen dos clases de sustitutos óseos derivados del hueso bovino esponjoso: uno desproteinizando mediante altas temperaturas y el otro método es la extracción química, ambos tienen propiedades osteoconductoras y reabsortivas distintas. Así, se elimina el riesgo de la respuesta inmune y la transmisión de enfermedades (Jensen et al., 2005).

3.4.4.6.4 Biomateriales aloplásticos

A pesar de la gran cantidad de alternativas, los biomateriales sintéticos granulados pueden ser la mejor solución para la regeneración de defectos óseos. Características como su composición y el ratio de degradación hacen de estos materiales una alternativa a tener en cuenta como material de elección en regeneraciones óseas. Éstas y otras características (ratio de degradación, propiedades mecánicas, porosidad y composición) pueden ser modificadas en función de las necesidades del cirujano (Dutta-Roy et al., 2003).

Uno de los biomateriales de uso más extendido son los materiales biocerámicos de Calcio con base de Fosfato (Ca-P), éstos ofrecen una composición y estructura similar a la parte mineral del hueso y son osteoconductivos. Entre la gama de materiales probados en los últimos años, el fosfato tricálcico (TCP) ha mostrado resultados prometedores, tanto en experimentos con animales como en estudios clínicos. Un material sustitutivo óseo debe permitir que las células osteoprogenitoras (células madre mesenquimales) se diferencien y se conviertan en osteoblastos; al mismo tiempo, deben construir puentes entre si usando como andamio los diferentes gránulos del biomaterial. Todo este engranaje requiere que los biomateriales contengan diferentes tamaños de poros: nanoporos, microporos y macroporos, todos ellos involucrados en la adhesión, la absorción y la deposición de células óseas intercaladas y sobre el material de regeneración (Maté-Sánchez de Val et al., 2014).

Los sustitutos óseos con base de Fosfato Cálculo, como la Hidroxiapatita (HA), el Fosfato Tricálcico (TCP) y el Fosfato Cálculo Bifásico, ofrecen gran biocompatibilidad y son ampliamente usados como sustitutos de los injertos óseos autólogos (Tadic & Epple, 2004; Calvo-Guirado et al., 2012; Calvo-Guirado et al., 2014; Calvo-Guirado et al., 2015c) (Fig. 16 y 17). Concretamente, el Fosfato Cálculo Bifásico (BCP), que consiste en la mezcla de Hidroxiapatita (HA) y Fosfato β -Tricálcico (β -TCP), ha sido muy utilizado y ampliamente estudiado en los últimos años (Calvo-Guirado et al., 2012b).



Fig. 16: Osteotomía de pared lateral de seno maxilar derecho. Tras la elevación de la membrana sinusal, se rellena con biomaterial particulado de HA/ β -TCP. Posteriormente, se reposiciona el colgajo mucoperiostico.

Éstas cerámicas, de mayor porosidad y baja densidad, proporcionan una mayor superficie para la neoangiogénesis y la neoformación ósea. Además, la morfología de los gránulos de HA y β -TCP facilitan la proliferación y la diferenciación celular. Las células osteoides utilizan los gránulos de HA y β -TCP como andamios "scaffold", provocando el fenómeno antes descrito como osteoconducción. De este modo, se genera una atmósfera favorable para la regeneración ósea, sin ninguna interfaz de tejido blando. Otro punto a tener en cuenta es la degradación de éste material: En el caso del β -TCP, el biomaterial se reabsorbe por completo. El HA, en cambio, sufre una biodegradación mínima y nunca llega a desaparecer del todo (Calvo-Guirado et al., 2012a; Maté-Sánchez de Val et al., 2014, Calvo-Guirado et al., 2014; Calvo-Guirado et al., 2015c).

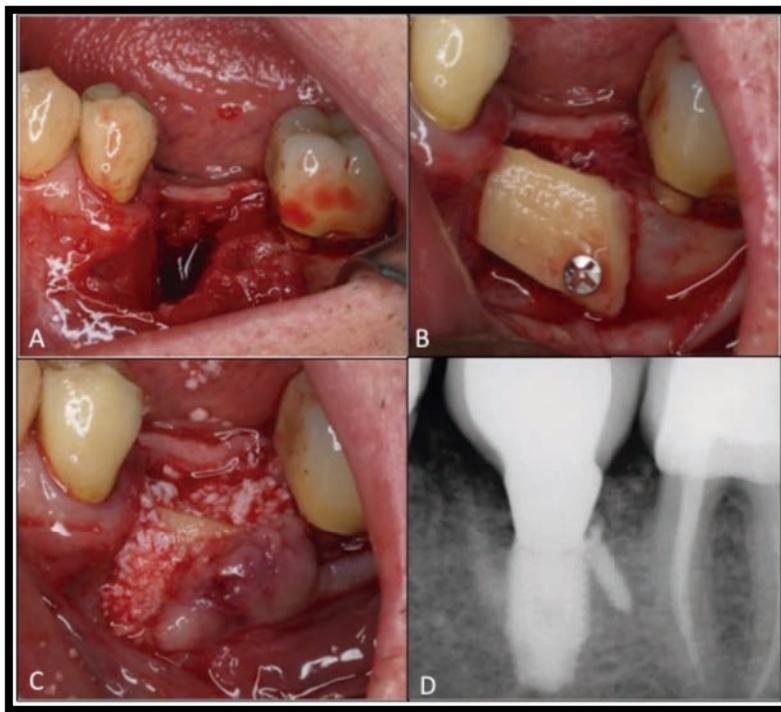


Fig. 17: Reconstrucción de un defecto alveolar. (A) Defecto alveolar en 36. (B) Injerto autólogo de rama mandibular fijado con microtornillo de titanio. (C) Injerto particulado de HA/ β TCP que fue recubierto con una membrana de colágeno reabsorbible. (D) Rx periapical de control a los seis meses de colocar la corona sobre implante.

Se observan diferencias sustanciales entre la HA y el β -TCP. Un claro ejemplo de ello es que la β -TCP se reabsorbe de tres a doce veces más que el HA. En ocasiones el β -TCP llega a desaparecer del todo, justo al contrario que la HA, cuya reabsorción es mínima (Klein et al., 1985; Korhi, 1993; Calvo-Guirado et al., 2012a).

La hidroxiapatita (HA) es químicamente comparable a los cristales de apatita, pero es la menos bioactiva de las cerámicas de fosfato cálcico (Gauthier et al., 1999; Maté-Sánchez de Val et al., 2012; Calvo-Guirado et al., 2015c).

Por contra, el β -TCP posee mayor biocompatibilidad y mayor poder de degradación, comparado con HA en estudios tanto in vivo como in vitro. La clave de este biomaterial radica en la estabilidad de sus componentes: el β -TCP es mucho más bioactivo, mientras que el HA se comporta de una manera mucho más estable. Este proceso permite una reabsorción y sustitución de los gránulos cerámicos de manera controlada y escalonada (Calvo-Guirado et al., 2012; Maté-Sánchez de Val et al., 2013; Calvo-Guirado et al., 2015c).

Una de las principales características de estos biomateriales cerámicos es la microestructura de la matriz del biomaterial (Lemcomte et al., 2008). La porosidad de los gránulos del biomaterial y las interconexiones de los mismos poros afectan directamente al ratio de degradación del biomaterial, lo cual tiene un efecto directo en la neoformación ósea, la angiogenesis y la estabilidad del injerto (Calvo-Guirado et al., 2012a; Calvo-Guirado et al., 2015b).

Además, la porosidad de los gránulos del biomaterial utilizado es de vital importancia para la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células osteoprogenitoras (Calvo-Guirado et al., 2012a; Choi et al., 2013; Maté-Sánchez de Val et al., 2014).

Los biomateriales sintéticos bifásicos como el *4Bone*® (60% HA y 40% β -TCP) son biocompatibles, parcialmente reabsorbibles y osteoconductivos. (Calvo-Guirado et al., 2012a; Choi et al., 2013; Maté-Sánchez de Val et al., 2014).

3.5. IMÁGENES ÓSEAS RADIOGRÁFICAS PARA LA VALORACIÓN DEL HUESO Y LA REGENERACIÓN

Las técnicas de diagnóstico por imagen ayudan al clínico en el diagnóstico de enfermedades, en el plan de tratamiento y el control post operatorio.

El objetivo básico de estas técnicas es complementar la información que se obtiene en la exploración clínica. (Misch et al., 2008)

Las distintas modalidades de radiodiagnóstico engloban la radiografía analógica o la digital y la radiografía bidimensional o tridimensional. Actualmente, la odontología moderna va encaminada hacia la radiografía digital, además, no se admite ninguna terapia basada en la implantología o la regeneración de defectos óseos en la que no se realicen pruebas de diagnóstico en 2D y 3D. (Misch et al., 2008)

3.5.1 Radiología 2D

Las técnicas de radio-diagnóstico más utilizadas en odontología son la radiografía periapical, la aleta de mordida, la radiografía oclusal, la teleradiografía lateral de cráneo y la ortopantomografía. (Misch et al., 2008)

Estas técnicas nos dan una información limitada sobre el estudio del hueso sobre el que se colocará el implante o el injerto, ya que pueden sufrir distorsión y no tenemos una imagen completa del tejido óseo ya que falta la tercera dimensión. (Misch et al., 2008)

3.5.2 Radiología 3D: Tomografía Computarizada

La Tomografía computarizada (TC), inventada por Sir Hounsfield en 1972, marcó un punto de inflexión importantísimo para el diagnóstico y el tratamiento en la medicina moderna.

Esta técnica nos permite diferenciar y cuantificar entre tejidos blandos y duros. Además, las reconstrucciones en 3D nos dan la oportunidad de diagnosticar, planificar y tratar a los

pacientes de forma mucho más precisa. Ya que podremos conocer la cantidad de hueso que hay en el área observada y también su densidad en unidades Hounsfield. (Misch et al., 2008) (Tabla 1 y 2)

Densidad	Unidades Hounsfield
D1	1250
D2	850-1250
D3	350-850
D4	150-350
D5	<150

Tabla 1: Calidad del tejido óseo. A mayor número de unidades Hounsfield, mayor densidad. Cuadro modificado de Misch et al 2008.

Tejido	Unidades Hounsfield
Aire	-1000
Agua	0
Músculo	35-75
Tejido fibroso	60-90
Cartílago	80-130
Hueso trabecular	150-900
Hueso cortical	900-1500
Dentina	1600-2400
Esmalte	2500-3000

Tabla 2: Caracterización de los tejidos. A mayor número de unidades Hounsfield, mayor densidad. Cuadro modificado de Misch et al., 2008.

3.5.3 Micro TC (μ -TC)

Mediante la técnica de μ -TC se estudia el tejido óseo. Se estudia el hueso neoformado y nos permite conocer su estructura y el volumen total de hueso formado, así como el biomaterial estudiado y, también, la densidad ósea mediante unidades Hounsfield.

3.6. SILICIO

El silicio es un ion bioactivo reconocible por las células osteoblásticas que sintetizan colágeno. Los iones de silicio se unen al colágeno y desencadenan la respuesta ósea. Añadir silicio al TCP mejora su estabilidad, sus propiedades estructurales y estimula la neoformación ósea en estudios sobre animales (Schmitt et al., 1997; George et al., 2012; Beck et al., 2012; Maté-Sanchez de Val et al., 2012).

Carlisle, en 1970, describe la presencia de Si en áreas del hueso de calcificación activa en ratas y ratones. Además, comenta que el silicio puede estar relacionado con los primeros estadios de la mineralización ósea. (Carlisle et al., 1970)

En los últimos años, los biomateriales cerámicos bifásicos han sido modificados con silicio. El silicio tiene gran importancia en el tejido conectivo, especialmente en hueso y cartílago. La adición del silicio a estos biomateriales mejora las condiciones osteoconductoras del biomaterial. No se ha observado toxicidad (Gibson et al., 1999; Zou et al., 2009; Beck et al., 2012), ni provoca ningún efecto adverso en estudios realizados en ratas (Schmitt et al., 1997; Furlaneto et al., 2007; Martin et al., 2007; Beck et al., 2012).

Bohner argumenta que los iones de silicio que se encuentran en la HA de los injertos se ve “localizada” por las células. A partir de ese momento, la presencia del Si promueve cambios químicos y topográficos en la zona que acaban desencadenando la respuesta biológica de la regeneración. (Bohner, 2009).

3.7. MODELOS DE ESTUDIO DE REGENERACIÓN ÓSEA

Los modelos animales permiten el estudio de materiales en situaciones de carga o bien sin ella, en períodos de tiempo variados y en diferentes situaciones de los tejidos y edades. Hemos de tener en cuenta que aunque el modelo animal representa muy bien las situaciones clínicas, fisiológicas y mecánicas de los humanos, hay que recordar siempre que es sólo una aproximación y que cada modelo animal tiene ventajas y desventajas únicas. Actualmente utilizamos varios modelos para estudiar los materiales “in vivo” yendo desde la cuantificación de la adsorción de proteínas y adhesión a los tejidos blandos hasta la integración en el hueso y la diseminación de partículas del implante en diferentes órganos. (Urban et al., 2000; Pearce et al., 2007).

Actualmente se utilizan perros, ovejas, cabras, cerdos, “mini-pigs” y conejos para los estudios “in vivo” en animales, cada una de estas especies tiene diferentes características, ventajas y desventajas para ser utilizados como modelos para el estudio de la respuesta “in vivo”, Pearce las resume en 4: Macroestructura, Microestructura, Composición ósea y Remodelado óseo (Pearce et al., 2007). (Fig. 18)

	Canine	Sheep/Goat	Pig	Rabbit
Macrostructure	++	+++	++	+
Microstructure	++	+	++	+
Bone Composition	+++	++	+++	++
Bone Remodelling	++	++	+++	+

+ least similar, ++ moderately similar, +++ most similar.

Fig. 18: Resumen de los cuatro atributos clave en términos de similitud entre el animal y el hueso humano. Resumen Tabla modificada de Pearce et al., 2007

Los conejos, por sus características, son considerados como el primer modelo animal para el estudio de biomateriales, antes de continuar con cerdos o perros.

3.7.1 Defecto óseo crítico

Históricamente, los defectos óseos críticos, como modelo experimental, están relacionados a su tamaño y han sido definidos como las lesiones intraóseas (ausencia/discontinuidad de hueso), de menor tamaño, en un hueso concreto de una especie animal que han tenido una regeneración menor al 10%, en la vida del animal, es decir no se regeneran espontáneamente. (Schmitz y Hollinger, 1986; Hollinger y Kleinschmidt, 1990; Bosch et al., 1998). Cooper redefinió los defectos críticos como “aquellos defectos que no curan espontáneamente sin recibir tratamiento durante un cierto período de tiempo”. (Cooper et al., 2010).

La mayoría de los estudios publicados se hacen en defectos de 15 mm aunque, sigue habiendo mucha discrepancia entre los diferentes autores a la hora de definir un defecto crítico como tal. (Delgado-Ruiz et al., 2014).

La realización de investigaciones en conejos de Nueva Zelanda permite un rápido y reproducible modelo de ensayo in vivo en el mundo de la bioingeniería de los

materiales. La creación de defectos mayores de 12 mm nos permite controlar apropiadamente la bioactividad del biomaterial, dado que está demostrado que estos defectos no se regeneran espontáneamente. Esto nos permite controlar adecuadamente la actividad del biomaterial, dado que no interfiere en el proceso de neoformación ósea, logrando una adecuada absorción.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

Este trabajo de investigación es un estudio experimental prospectivo, aleatorizado y controlado en conejos neozelandeses a 8 y 12 semanas.

4.1 MATERIAL:

4.1.1 Animales del estudio

La muestra de esta investigación la constituyen veintiún conejos albinos de Nueva Zelanda de edades de entre 30 y 35 semanas. Su peso oscila entre los 3.900 y 4.500 g y no presentan ninguna patología o enfermedad. (Fig. 19)



Fig 19: Conejo de Nueva Zelanda

Los animales fueron alimentados con una dieta diaria de “pellets” de pienso y agua *ad libitum* durante todo el período de estudio y seguidos por un veterinario y personal auxiliar veterinario para controlar su estado de salud.

4.1.2 Biomateriales

El biomaterial usado en este estudio es el 4BONE® (MIS Implants Technologies Ltd, Shlomi, Israel). Manufacturado por Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). Éste sustituto óseo, disponible en el mercado, es un material de injerto completamente sintético formado por un 60% de Hidroxiapatita (HA) y un 40% de beta-Fosfato Tricálcio (β -TCP). Además, cuenta con un 70% de interconexión entre los micro y los macroporos. La forma comercial está disponible en partículas de 0,5 a 1 mm y está envasado en jeringas.

Según las instrucciones del fabricante, antes de aplicar el biomaterial fue hidratado con suero fisiológico (Fig. 20-21).

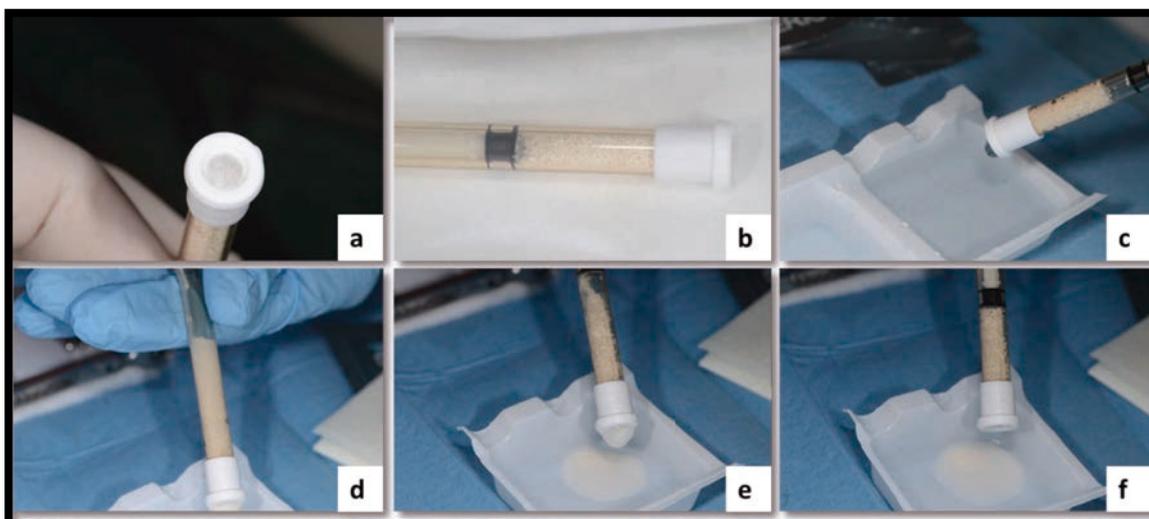


Fig 20: Fotografía del biomaterial y protocolo de uso según el fabricante. A y B: biomaterial 4BONE®, envasado en el dispensador, previo a ser hidratado. C: Hidratación del biomaterial con suero fisiológico. D, E y F: expulsión del suero fisiológico sobrante.

En este trabajo se estudiaron dos tipos de 4BONE®: el 4BONE ya mencionado, tal como lo comercializa el fabricante y el 4BONE modificado con 3% de silicio (*4BONE + 3% silicio*).

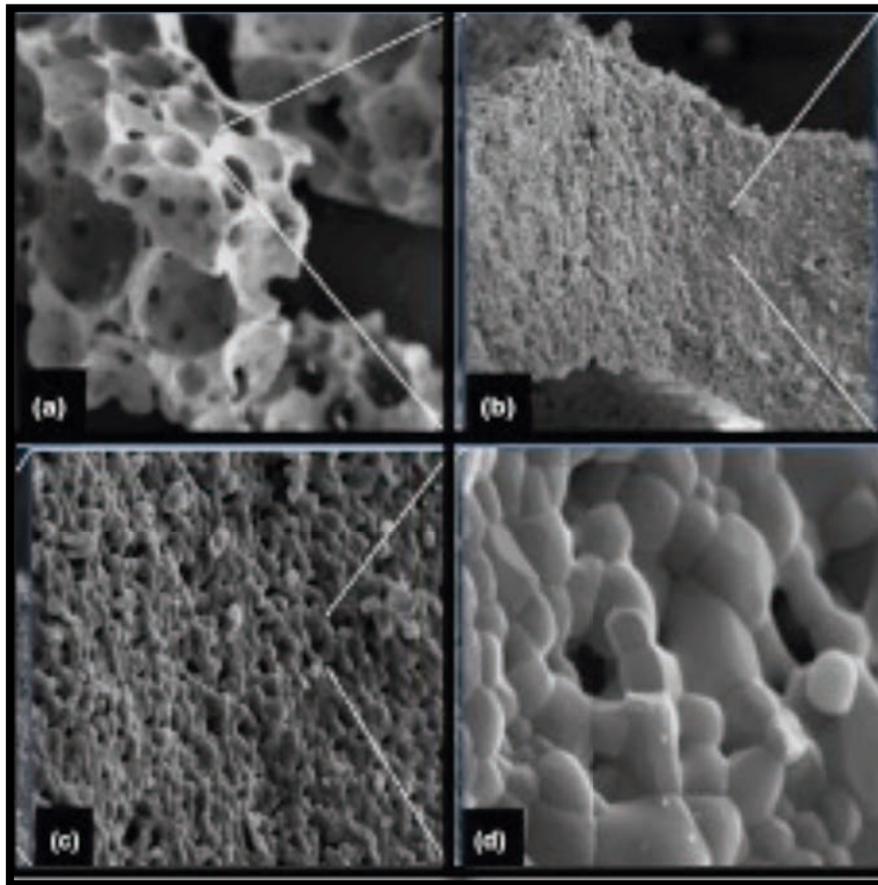


Fig. 21: Imágenes de SEM del biomaterial bifásico usado en el estudio. (a)Macroporosidad – tamaño del macroporo: 150-300 μ m (magnificación: 50X). (b) Puentes de biomaterial alrededor de los poros (magnificación: 650X). (c) Microporosidad (magnificación: 2,000X). (d) Nanoporos, tamaño: 50–150 μ m (magnificación: 10,000X).

El 4BONE + 3% silicio se prepara sumergiendo 50g. de 4BONE en una solución líquida que contiene un 3% de nanopartículas de silicio durante dos horas. Después, los gránulos hidratados que se obtienen se secan y esterilizan mediante calor seco a 134°C durante una hora.

4.1.3 Estabulario y animalario:

El estabulario y el animalario de la Universidad de Murcia son los lugares donde los animales han sido criados y seguidos por el equipo veterinario de la universidad. (Fig. 22-23)



Fig. 22: Animalario de la Universidad de Murcia.



Fig. 23: Estabulario del Animalario de la Universidad de Murcia

4.2 MÉTODOS:

4.2.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio experimental caso-control y aleatorizado. Se han creado 42 defectos óseos, dos en cada conejo, de tamaño crítico de 12mm de diámetro en los huesos parietales de 21 conejos de Nueva Zelanda. (Fig. 24)

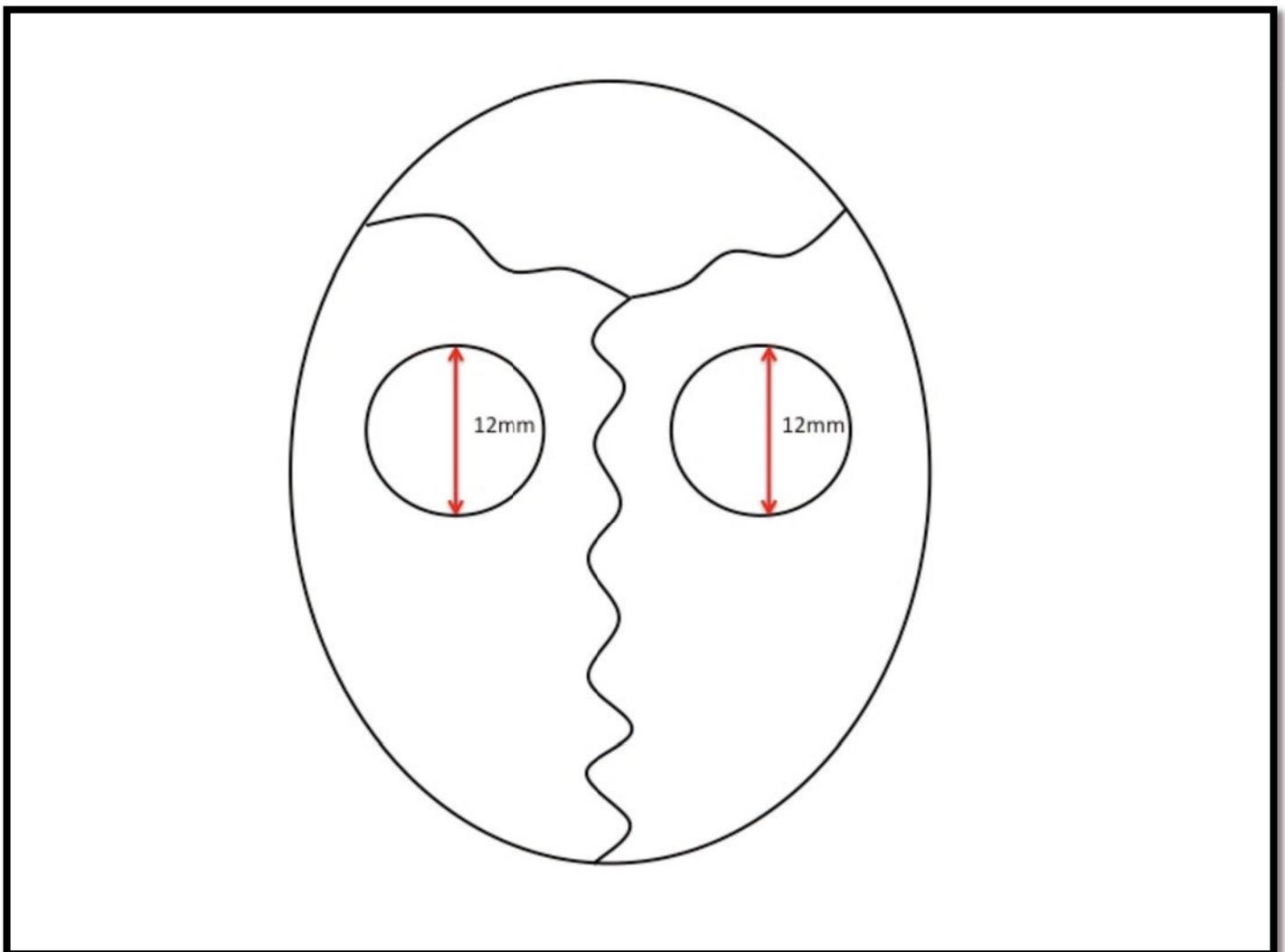


Fig 24: Esquema del diseño de los defectos en la calota de los conejos de Nueva Zelanda.

Las muestras se dividen en tres grupos experimentales:

- Grupo A: 14 defectos críticos rellenos del biomaterial A (gránulos de 4BONE).
- Grupo B: 14 defectos críticos rellenos de biomaterial B (gránulos de 4BONE + 3% de silicio).
- Grupo Control: 14 defectos críticos se dejaron sin cubrir como controles.

Las muestras han sido asignadas a los grupos de prueba utilizando el software de la aleatorización (Research Randomizer, Versión 4.0, 22 de febrero de 2012; <http://www.randomization.org>). El proceso de aleatorización se realizó equilibradamente y el material se distribuyó mediante el programa informático.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia, España (05/09/2012), que siguió las pautas establecidas por la Directiva del Consejo de la Unión Europea (53/2013;1 de Febrero de 2013).

4.2.2 Procedimiento quirúrgico:

El procedimiento quirúrgico fue realizado por el equipo de investigación Murcia Biomaterial and Implant Research Group (MBIRG), en el quirófano del animalario de la Universidad de Murcia, Murcia.

4.2.3 Anestesia:

Las extremidades inferiores, a la altura de la tibia de los conejos operados, fueron afeitadas y desinfectadas con digluconato de clorhexidina al 1,5% en solución acuosa. Después, los animales recibieron una inyección intramuscular de 0.5 a 1 mg/kg de maleato de acepromazina. Quince minutos más tarde, se administró por vía endovenosa la anestesia general: 5-8 mg de ketamina/kg más clorbutol con 0,05 mg/kg de atropina como coadyuvante.

4.2.4 Cirugía:

La cabeza de los animales fue afeitada y desinfectada, y se hizo una incisión en la piel en la línea media anteroposterior de la cabeza del conejo. Se realizaron colgajos mucoperiostivos, dejando al descubierto el hueso parietal. Entonces se realizaron dos defectos bicorticales, preservando la duramadre, de 12mm de diámetro con una trefina circular de 12mm de acero inoxidable (Hu-FriedyMgf. Co. LLC. Chicago, Illinois, USA) a 6000 r.p.m., con abundante irrigación con suero fisiológico. (Fig. 25-26-27)



Fig. 25: Procedimiento quirúrgico de la creación de defectos críticos de 12mm. Colgajo mucoperiostivo, exposición del hueso parietal del conejo. Dibujo del defecto mediante lápiz de grafito del diseño del defecto.

Para dejar marcada la región del defecto para el estudio de las muestras se realizaron unas cavidades con una fresa de cono invertido de carburo de tungsteno (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Confederación Helvética) y se rellenaron con amalgama de plata.

Después de la aleatorización, cada defecto se rellenó de acuerdo a su asignación a los grupos de ensayo (Grupo A, Grupo B, y el Grupo de Control) (Figura 28).



Fig. 26: Marcas de la región del defecto usando una fresa de cono invertido de carburo de tungsteno

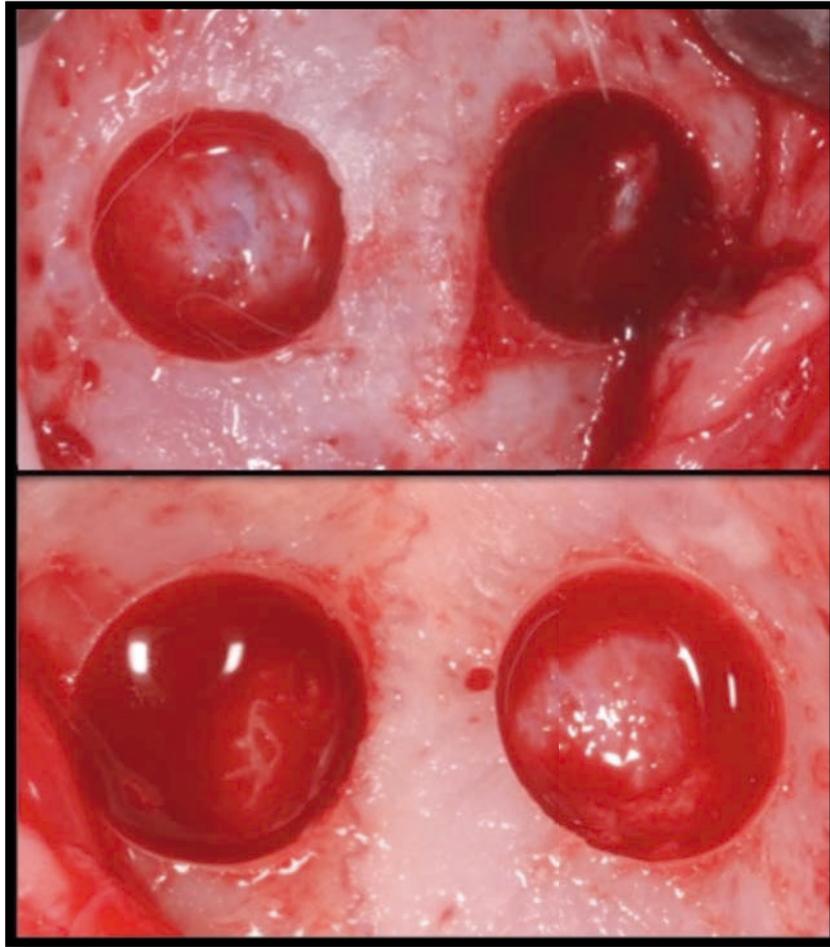


Fig. 27: Defecto circular de 12mm realizado con trefina (Hu-FriedyMgf Co. Chicago, Ill, USA).

En este estudio no se usaron membranas para cubrir los defectos para limitar las variables y poder estudiar el material de injerto sin interferencias. Así se podrá observar el cierre del defecto, la cantidad de hueso neoformado, la cantidad de tejido conectivo y el biomaterial remanente sin otras variables que puedan influir en la regeneración del defecto.

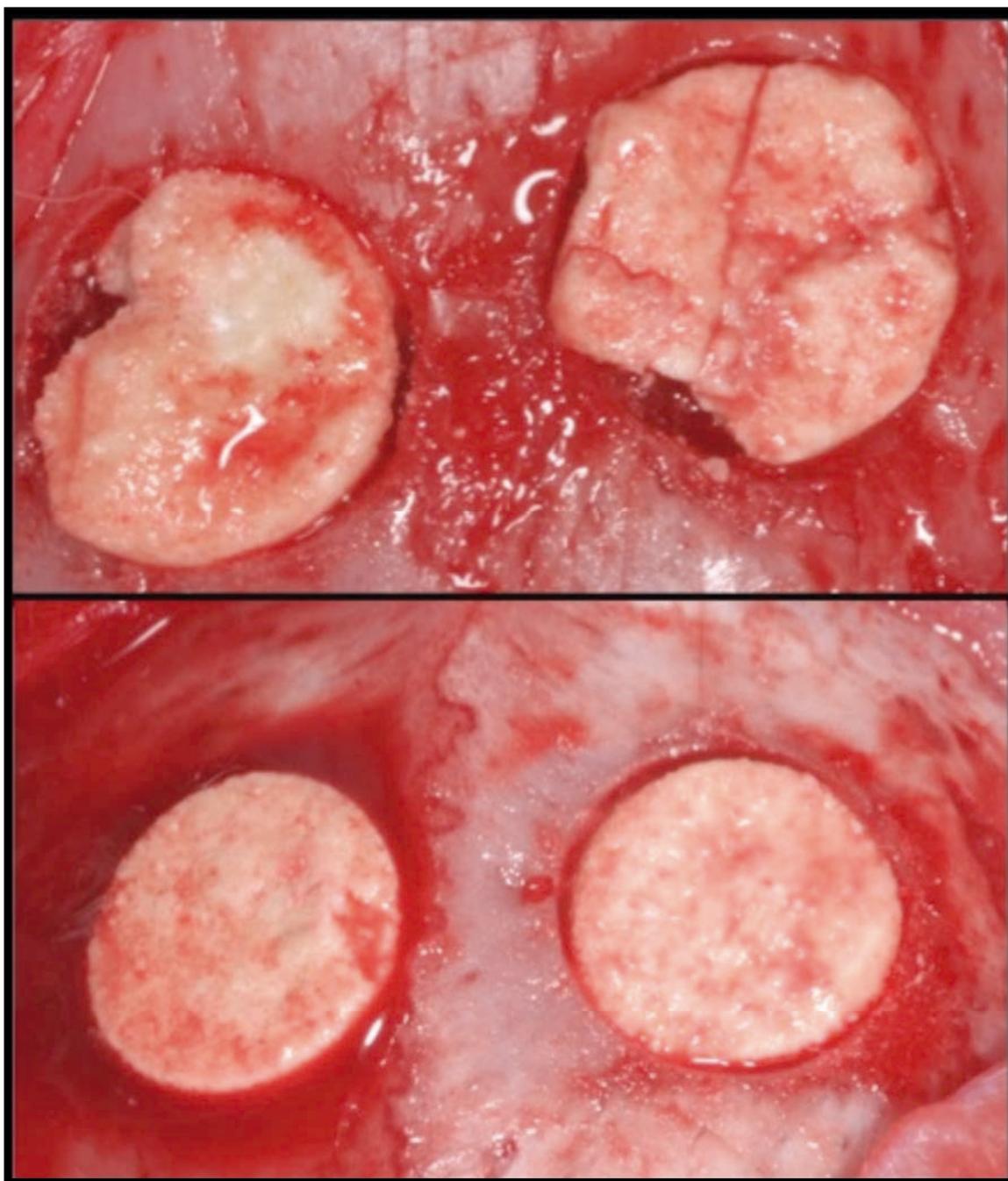


Fig. 28: Defectos rellenos con el biomaterial (HA/ β TCP 60-40 + 3% Si)

Se suturó el periostio y los tejidos subcutáneos con ácido poliglicólico (Vicryl®Ethicon Inc., Johnson & Johnson LLC, Somerville, New Jersey, USA) 3/0 y la piel con sutura de seda 3/0. Se administró buprenorfina subcutánea a dosis de 0,02mg/kg cada 8-12 h. durante 3 días.

Después de la cirugía, los animales fueron cuidados por el equipo veterinario del centro animalario. Se controló, durante el período de cicatrización, que las suturas se mantuvieran en buen estado y las heridas intactas.

4.2.5 Eutanasia

Todos los animales fueron sacrificados por un veterinario experto mediante una sobredosis de tiopental intracardíaca a las ocho (10 animales) y a las doce (11 animales) semanas. La aleatorización de los animales sacrificados fue realizada mediante el programa informático randomization.org.

4.2.6 Procesado de las muestras

Los especímenes fueron deshidratados mediante el uso de etanol al 70%, 90%, 95% y etanol puro. Después, se les aplicó la resina fotopolimerizadora Technovit 7200 VLC (Kulzer, Wehrheim, Germany) durante 21 días. Luego, las muestras fueron embebidos y fotopolimerizadas con el sistema EXAKT 520 polymerizator (EXAKT Technologies, Oklahoma City, OK, EE.UU.). Se realizaron cortes coronales usando la EXAKT 310 CP (EXAKT Technologies). Las secciones obtenidas tenían un grosor aproximado de 200µm, pero el grosor final después del pulido manual fue de 30-50µm. Las muestras se tiñeron con tinción Levai-Laczko.

4.2.7 Evaluación μ CT

μ -CT (Tomografía Computarizada micrométrica):

La μ -TC nos permitió estudiar la estructura ósea de las muestras. Esta evaluación nos ayuda a conocer la estructura y el volumen del hueso neoformado, de los biomateriales y también la densidad de los mismos en unidades Hounsfield.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, a las ocho o a las doce semanas, se realizó la evaluación mediante μ CT para valorar el volumen restante de material de injerto. Cada muestra se colocó en la plataforma de exploración de un GE eXplore Locus micro-CT (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU.) y se recogieron proyecciones de 360 Rx (80 kVp, 500 mA; 26 minutos de tiempo total de exploración). Las imágenes fueron procesadas y reconstruidas en 3D (resolución: 20 μ m). Cada imagen registrada fue transformada a unidades Hounsfield (HU) utilizando un fantoma de plástico como calibrador. Dentro del fantoma de plástico, se inserta HA como referencia (*hueso sinóptico - mimético*) para los cálculos de la relación mineral / densidad ósea.

Se procesaron y generaron los datos mediante MicroView (GE Healthcare). Los registros se importaron a Matlab (R2009b; Mathworks, Crystal Glen Oficina Centro de Novi, MI, EE.UU.) para el análisis automatizado de los grupos de imágenes. Cada muestra fue rodeada por un círculo de puntos, llamado VOI (volumen de interés standard), de 14 mm de diámetro y 5mm de altura. Como que cada volumen se calibró usando un patrón fijo, el contenido de la imagen se determinó usando límites predefinidos en Unidad Hounsfield (>3,000, 2,000–3,000, 750–2,000, and 300–750, respectivamente) (Kim et al., 2013).

La cantidad residual de hueso injertado se calculó como un volumen que resultó de la relación: $\text{Injerto} / \text{Volumen del total de hueso} \times 100$, expresado como porcentaje a las ocho y a las doce semanas para todos los grupos de estudio.

4.2.8 Evaluación histomorfométrica:

Se fotografiaron las muestras usando una cámara digital con un microscopio óptico motorizado de 20x (BX51, Olympus, Tokyo, Japón). Estas fotografías se combinaron mediante un programa informático (SenseCellDimensions, Olympus, Tokyo, Japón) para obtener imágenes de alta resolución de todas las muestras. Las regiones de interés (ROI) se delimitaron manualmente para facilitar la identificación de los diferentes tejidos presentes en cada muestra. (Fig. 29-30)

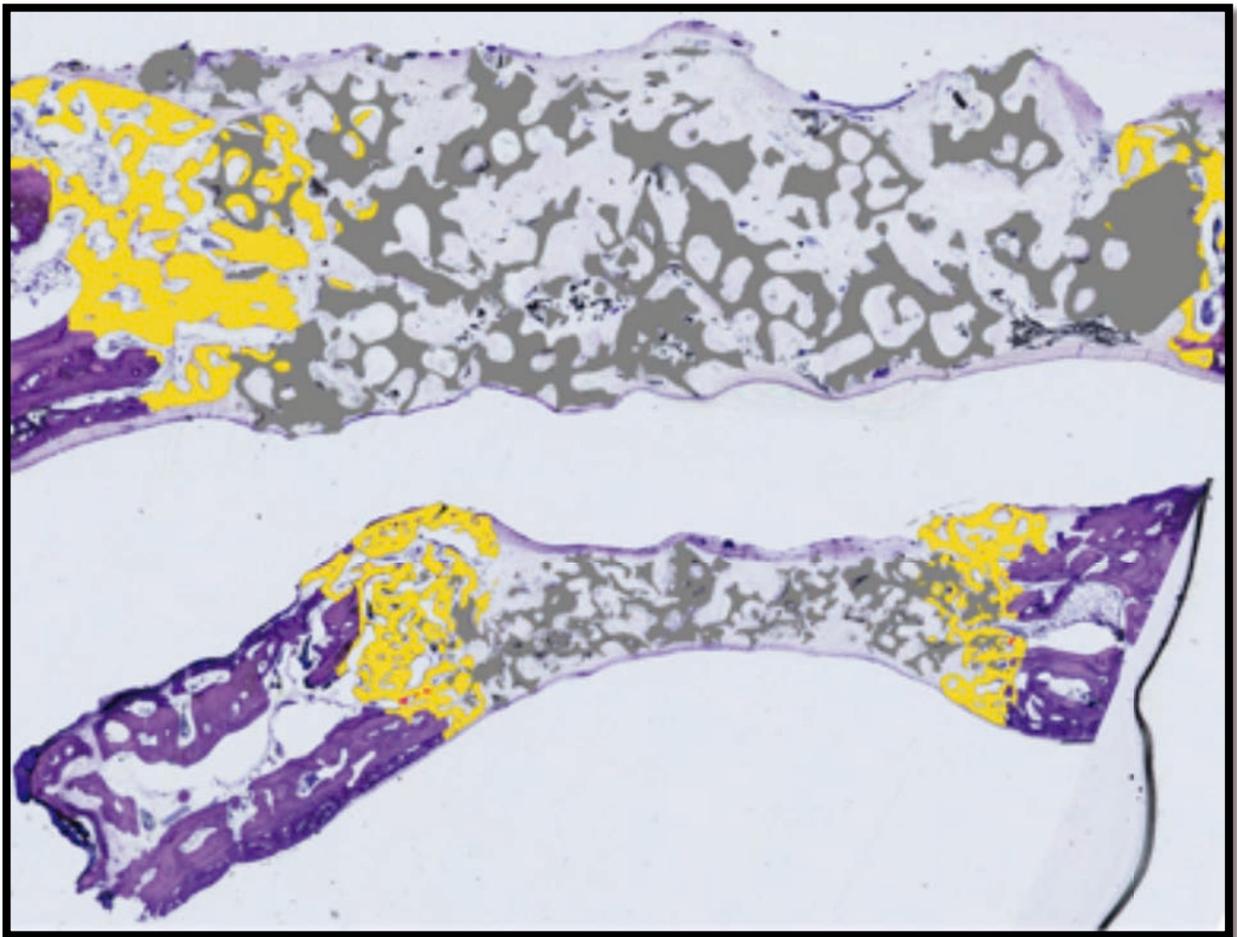


Fig. 29: Evaluación histomorfométrica del defecto. Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo

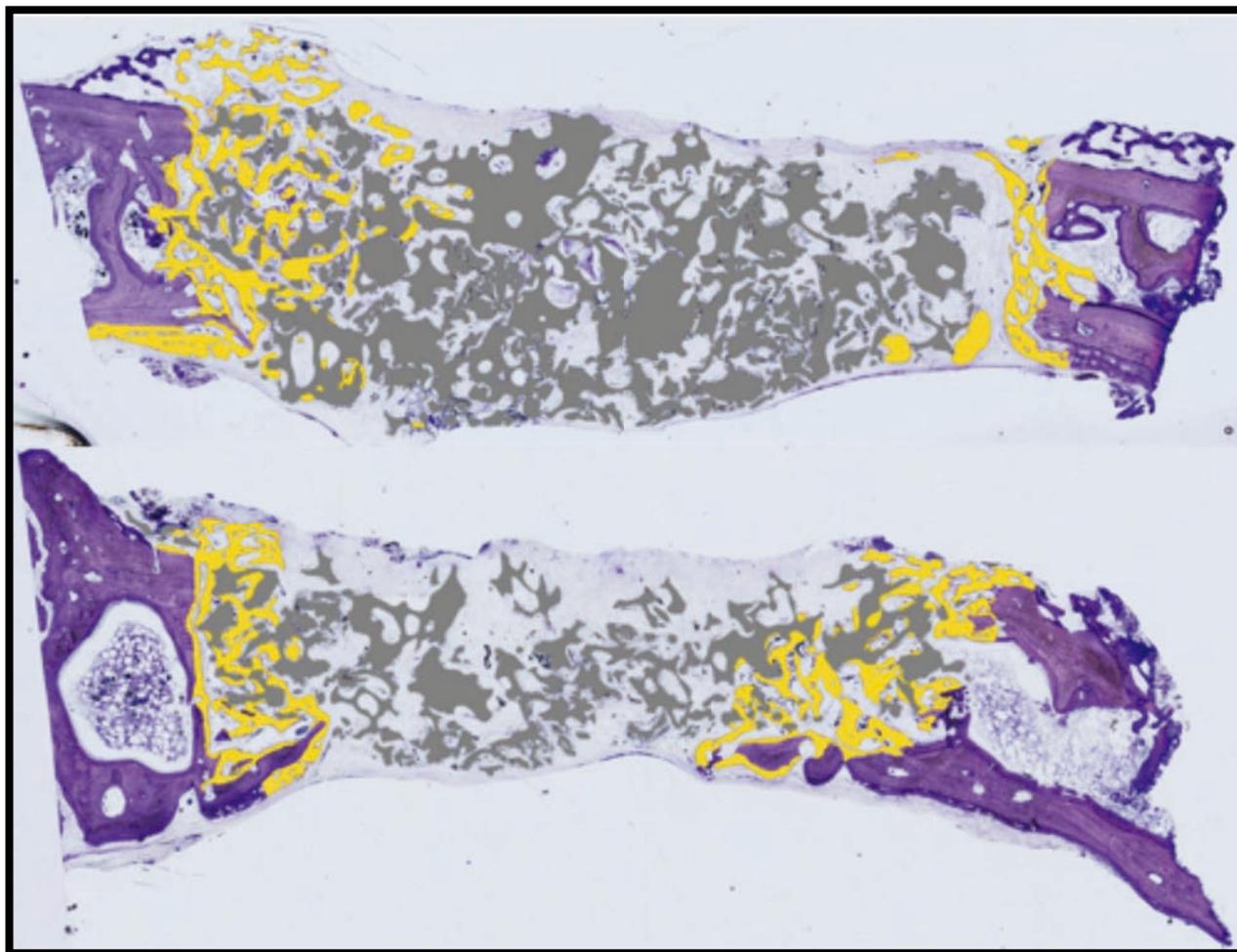


Fig. 30: Evaluación histomorfométrica del defecto. Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo

4.2.8.1 Histología e histomorfometría ósea: Nos permite observar los tejidos de las muestras obtenidos. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

Cierre del defecto óseo (Cortical DefectClosure - CDC)

Formación de hueso nuevo (New Bone – NB)

Tejido conectivo (ConnectiveTissue – CT)

Material de injerto residual (Residual Material – RM/Residual Graft)

A las 8 y a las 12 semanas se registraron las siguientes variables:

- *Cierre del defecto óseo cortical* (Cortical Defect Closure - CDC): porcentaje de tejido óseo neoformado presente entre las paredes del ROI.
- *Hueso Nuevo* (New Bone – NB): Porcentaje de nuevo hueso dentro del espacio medular y entre las partículas PTG en la ROI.
- *Tejido Conectivo* (ConnectiveTissue – CT): Porcentaje de tejido conectivo que se encuentra dentro del ROI.
- *Material Residual* (Residual Material – RM): Porcentaje de partículas presentes en la ROI en relación al total del área. (Figura 10).

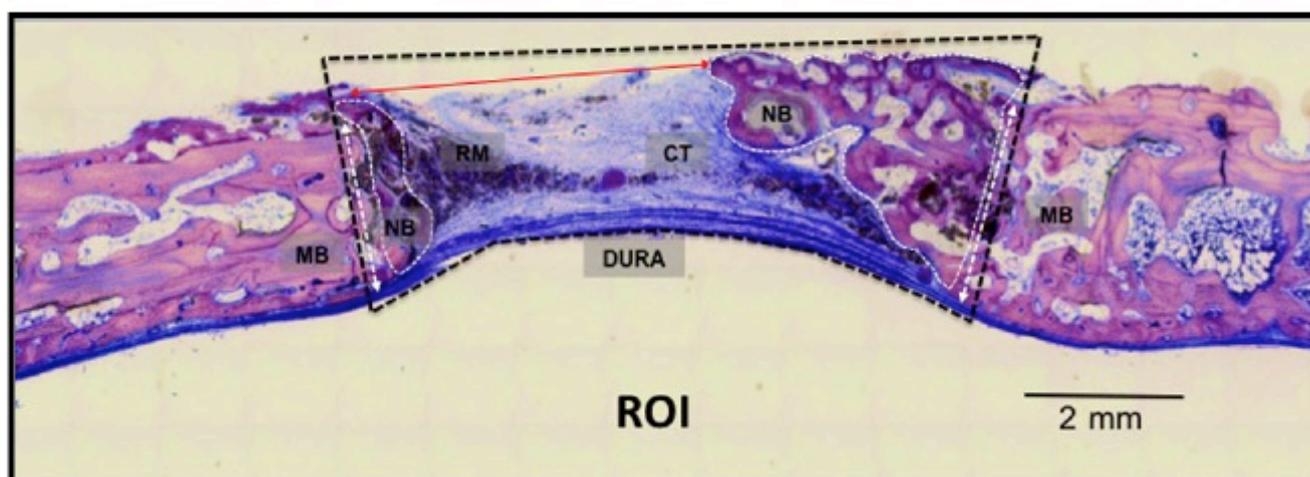


Fig. 31: Región de interés. Cada defecto fue identificado mediante dos orificios marcados con amalgama. La región de interés tiene forma de polígono delimitado por las paredes laterales del defecto en ambos cortes, coronalmente por la cortical superior e inferiormente por la cortical basal. CD (Cortical Defect – Defecto Cortical), NB (New Bone – Hueso Nuevo), MB (Mature Bone – Hueso Maduro), CT (Connective Tissue – Tejido Conectivo), RM (Residual Material – Material residual) y Dura (densificación fibrosa del tejido conectivo correspondiente a la duramadre). (Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo).

4.2.9 Análisis estadístico:

Se llevo a cabo un análisis estadístico descriptivo en el que se calcularon la media y la desviación estándar de los parámetros estudiados (cierre del defecto óseo cortical, hueso nuevo, tejido conectivo, material residual).

Después de realizar el análisis estadístico descriptivo, se llevó a cabo un análisis estadístico comparativo con un valor de $\alpha=0.05$.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa PASW Statistics v. 18.0.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Después de realizar el análisis descriptivo, se usó el test de Kruskal–Wallis para evaluar la significación de las diferencias entre el grupo A (partículas de 4BONE) y el grupo B (4BONE + 3% silicio) en los resultados obtenidos. El test Mann–Whitney U-test se utilizó para evaluar las diferencias entre el material del injerto y el hueso craneal original. Se tomó el P valor < 0.05 para definir los resultados estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS:

Durante el estudio no hubo incidencias con respecto al protocolo diseñado, no se perdió ningún individuo de estudio y todos los materiales se integraron sin que hubiera ningún proceso infeccioso o de rechazo del material.

5.1. Evaluación μ -CT

A las 8 semanas, el Grupo B mostró más volumen residual del material de injerto ($74,41 \pm 6,5\%$) en comparación con el Grupo A ($60,12 \pm 7,9\%$). Esta prueba también muestra que el volumen total del injerto encontrado en el Grupo B se ha reducido en menor cantidad y de manera estadísticamente significativa en comparación al Grupo A.

A las 12 semanas, los resultados obtenidos muestran diferencias no significativas, siendo $56,75 \pm 5,1\%$ para el Grupo B y $42,64 \pm 3,2\%$ para el Grupo A.

La incorporación de 3% de Silicio al 4BONE® estabiliza la fase de TCP, por lo que disminuye la reabsorción del biomaterial pero la vuelve más efectiva, es decir, la osificación producida en el biomaterial se vuelve más ordenada y estable, lo cual se traduce en mayor osificación, pese a que el biomaterial se reabsorba menos (Fig. 32-33, Tabla 3).

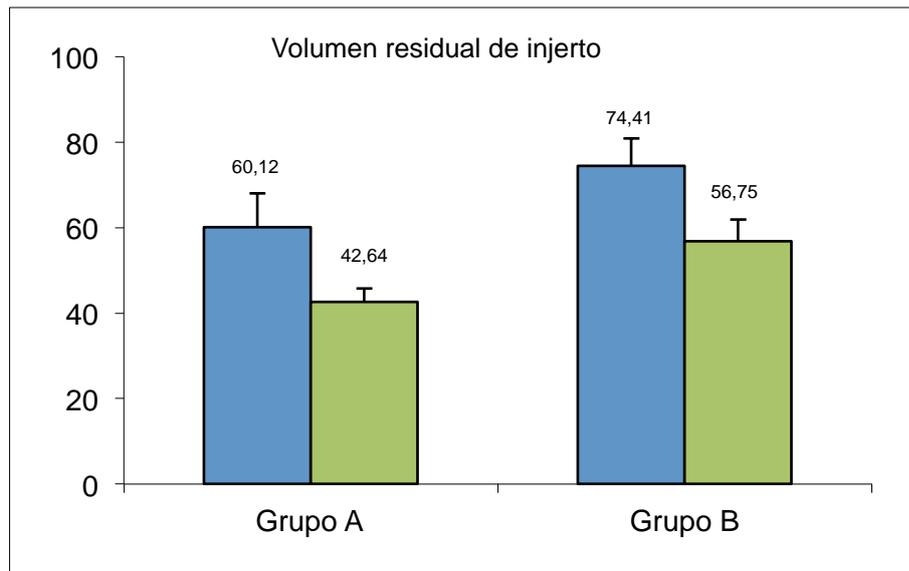
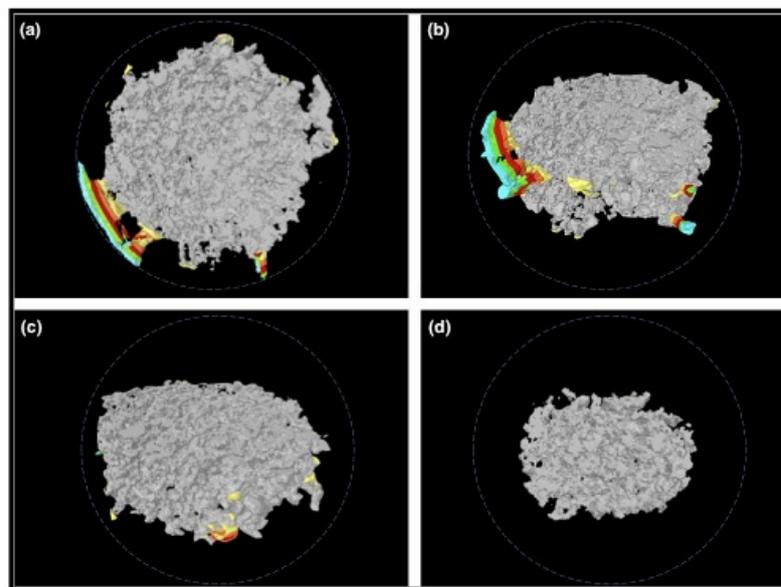


Fig. 32: Volumen residual de injerto. Azul: 8 semanas; Verde: 12 semanas. Grupo A: 4BONE[®], Grupo B: 4BONE[®]+ 3% silicio. Valores expresados en %.



Distancia (pixels)	Distancia (μ m)
0-20	0-351
20-40	351-702
40-60	702-1053
60-80	1053-1404
80-100	1404-1755

■	Injerto
■	Hueso de 0-20 píxeles
■	Hueso de 20-40 píxeles
■	Hueso de 40-60 píxeles
■	Hueso de 60-80 píxeles
■	Hueso de 80-100 píxeles

Fig. 33: Evaluación mediante μ -CT de los grupos de estudio a las 8 y a las 12 semanas. Cuadro de la relación píxeles- μ m y leyenda de colores de la imagen: a) Grupo B, 8 semanas. b) Grupo B, 12 semanas. c) Grupo A, 8 semanas. d) Grupo A, 12 semanas.

Volumen residual del material de injerto	8 semanas	8 semanas	12 semanas	12 semanas
Grupo A	60,12 ± 7,9%	60,11	42,64 ± 3,2%	42,65
Grupo B (3%)	74,41 ± 6,5%*	74,41	56,75 ± 5,1%	56,75

Tabla 3: Volumen residual del material de injerto. Grupo A: 4BONE[®], Grupo B: 4BONE[®] + 3% silicio. Media ± DM (SD); Mediana. *P <valor 0,005. Se aplicó el Test de Kruskal- Wallis para grupos independientes para comparar los resultados de los obtenidos en los mismos grupos en tiempos del estudio distintos.

5.2. Evaluación histomorfométrica:

5.2.1 Resultados a las ocho semanas:

Los resultados histomorfométricos obtenidos a las ocho semanas muestran que, por un lado, el uso de 4BONE[®] y 4BONE[®] con 3% Silicio aumenta considerablemente la neoformación ósea y el cierre del defecto comparado con el grupo control. Además, en estos dos grupos, el material residual en el defecto es similar. Por otro lado, la invasión del tejido conectivo en el defecto aumenta mucho cuando no se usa ningún biomaterial. (Fig. 34-Tabla 4)

8 semanas	CDC	RM	NB	CT
Grupo Control	14,54 \pm 3,2% (14,54)	-	13,39 \pm 4,5% (13,39)	86,61 \pm 3,7%* (86,62)
Grupo A	57,56 \pm 6,3% (57,63)	43,62 \pm 5,8% (43,62)	41,54 \pm 5,2%* (41,54)	14,54 \pm 3,2% (14,54)
Grupo B (3% Si)	65,51 \pm 2,4%* (65,50)	47,54 \pm 2,1%* (47,53)	39,33 \pm 1,7%* (39,32)	13,13 \pm 1,3% (13,12)

Tabla 4: Evaluación Histomorfométrica a las 8 semanas: Grupo A (4BONE®); Grupo B (4BONE® + 3% Silicio). Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados como Valor Medio \pm Desviación Media (DM) y Mediana. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

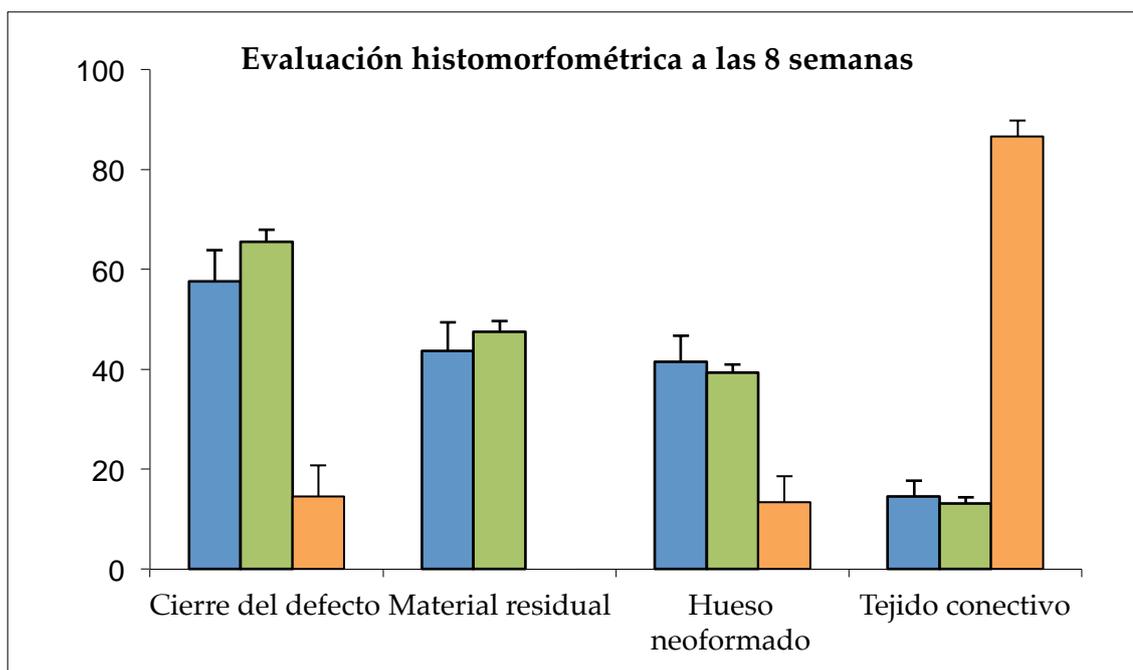


Fig. 34: Figura resumen de la Evaluación Histomorfométrica a las 8 semanas: Cierre del defecto, Material Residual, Neoformación Ósea y Tejido Conectivo. Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

Cierre del Defecto (*Cortical Defect Closure - CDC*):

En todos los grupos se observó aproximación de los márgenes de la lesión y reducción del tamaño del defecto. El Grupo B, que contiene silicio al 3%, mostró el cierre del defecto más elevado: $65.51 \pm 2.4\%$; resultado estadísticamente significativo. Los defectos del Grupo A mostraron un cierre del $57.62\% \pm 6.3\%$, y el Grupo de Control mostró el cierre del defecto más bajo: $14.54\% \pm 3.2\%$. Los dos grupos de ensayo mostraron un cierre del defecto significativamente mayor en comparación al Grupo Control ($p < 0.05$) (Fig. 34, 35, 36, 37 - Tabla 4).

Material Residual (*Residual Material - RM*):

El Grupo B mostró mayor porcentaje significativo de material residual ($47.54 \pm 2.1\%$) comparado con el Grupo A ($43.63 \pm 5.8\%$) (Tabla 1, Fig. 12). El Grupo C no aparece en la gráfica ni la tabla porque los defectos carecían de biomaterial. (Fig. 34, 35, 36, 37 - Tabla 4).

Hueso Neoformado (*New Bone - NB*):

En todos los grupos hubo neoformación ósea en los márgenes de los defectos. En los grupos de estudio, se encontró tejido óseo neoformado alrededor y dentro de las partículas del biomaterial. No obstante, la mayor cantidad de hueso neoformado la encontramos en el Grupo A ($41.54 \pm 5.2\%$), seguido del Grupo B ($39.33 \pm 1.7\%$), ambos grupos con resultados estadísticamente significativos. Finalmente, el Grupo Control mostró el resultado más bajo, con un $13.39 \pm 4.5\%$. (Fig. 34, 35, 36, 37 - Tabla 4).

Tejido conectivo (*Connective Tissue - CT*):

Se encontró más cantidad de CT en el Grupo Control ($86.61\% \pm 3.7\%$) y menos en los Grupos A ($14.54 \pm 3.2\%$) y B (13.13 ± 1.3). Este resultado, estadísticamente significativo, muestra que la ausencia de biomaterial en el defecto provoca que el tejido blando se invagine, ya que no tiene ningún sostén que lo soporte. (Fig. 34, 35, 36, 37 - Tabla 4).

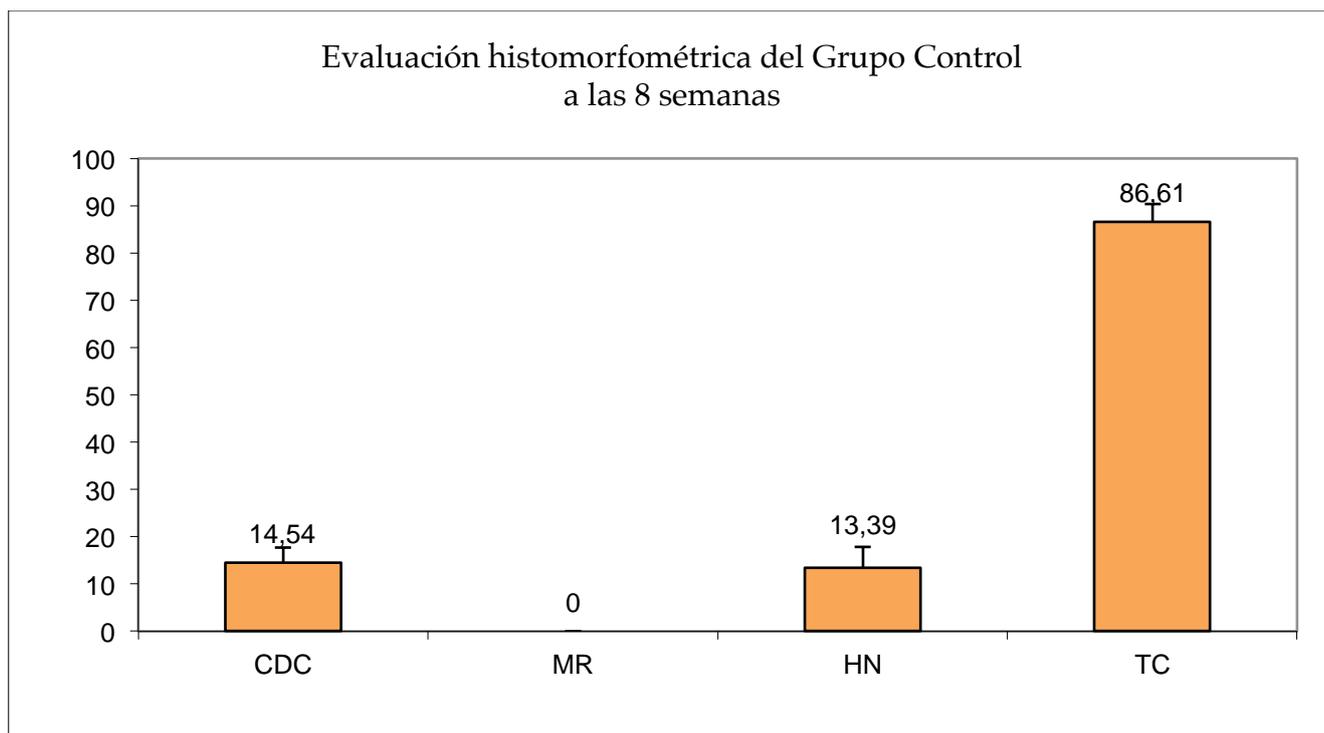


Fig. 35: Evaluación Histomorfométrica del Grupo Control a las 8 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

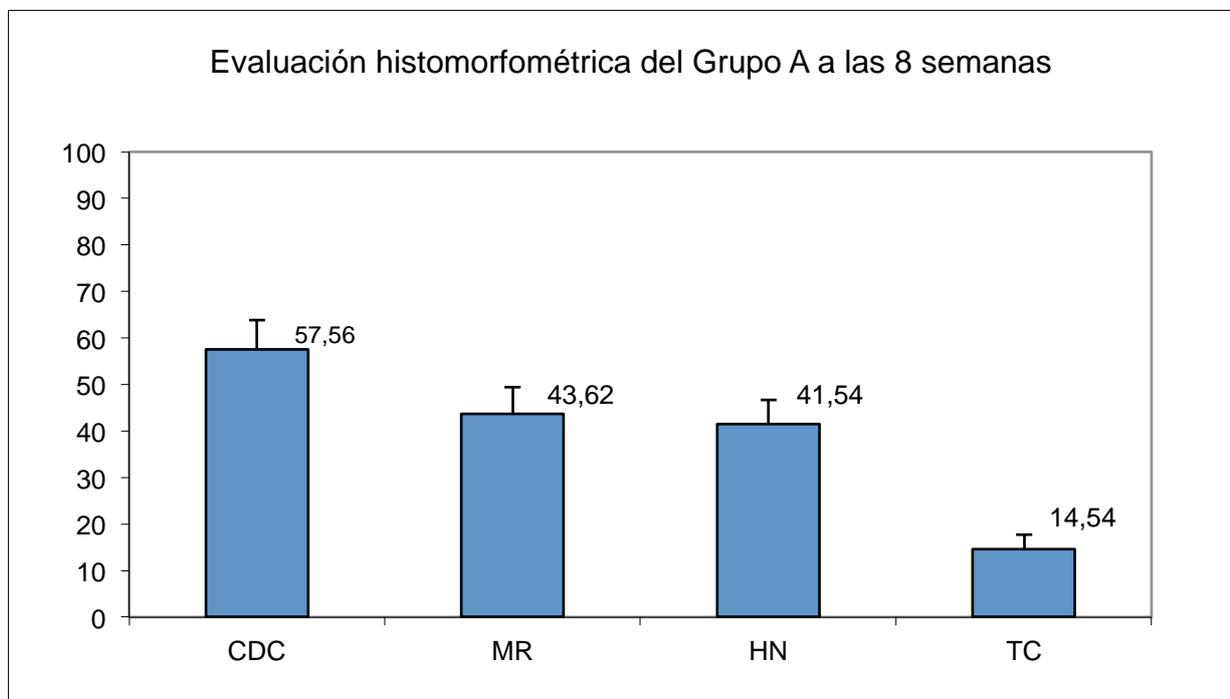


Fig. 36: Evaluación Histomorfométrica del Grupo A (4BONE[®]) a las 8 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

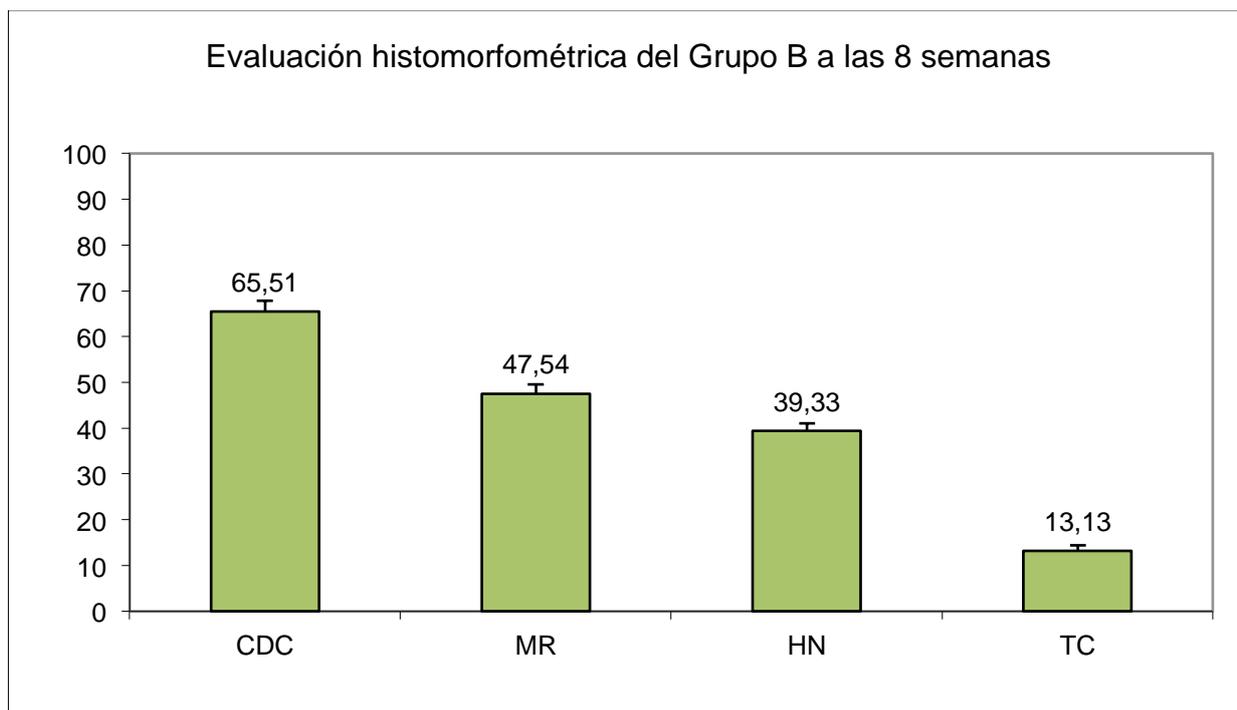


Fig. 37: Evaluación Histomorfométrica del Grupo B (4BONE[®] + 3% Si) a las 8 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

5.2.2 Resultados a las doce semanas:

Los resultados histomorfométricos obtenidos a las doce semanas confirman los resultados mostrados en el análisis de las ocho semanas. Los defectos cubiertos con 4BONE[®] y 4BONE[®] con 3% Silicio aumentaron considerablemente la neoformación ósea y el cierre del defecto, si se compara con el grupo control.

El material residual encontrado fue similar en ambos grupos. De nuevo, la invaginación del tejido blando encontrado en el Grupo Control fue muy superior a los grupos estudio. (Fig. 38 – Tabla 5)

12 semanas	CDC	RM	NB	TC
Grupo Control	27,31 \pm 4,5% (27,31)	-	29,39 \pm 3,8%	70,61 \pm 3,7%*
Grupo A	75,62 \pm 3,3% (75,61)	35,78 \pm 2,9% (35,77)	52,06 \pm 2,6%* (52,06)	12,16 \pm 1,1%
Grupo B	83,59 \pm 1,2%* (83,59)	39,41 \pm 1,3% (39,40)	54,09 \pm 0,7%* (54,08)	9,31 \pm 1,0% (9,31)

Tabla 5: Evaluación Histomorfométrica a las 12 semanas: Grupo A (4BONE®); Grupo B (4BONE® + 3% Silicio). Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados como Valor Medio \pm Desviación Media (DM) y Mediana. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

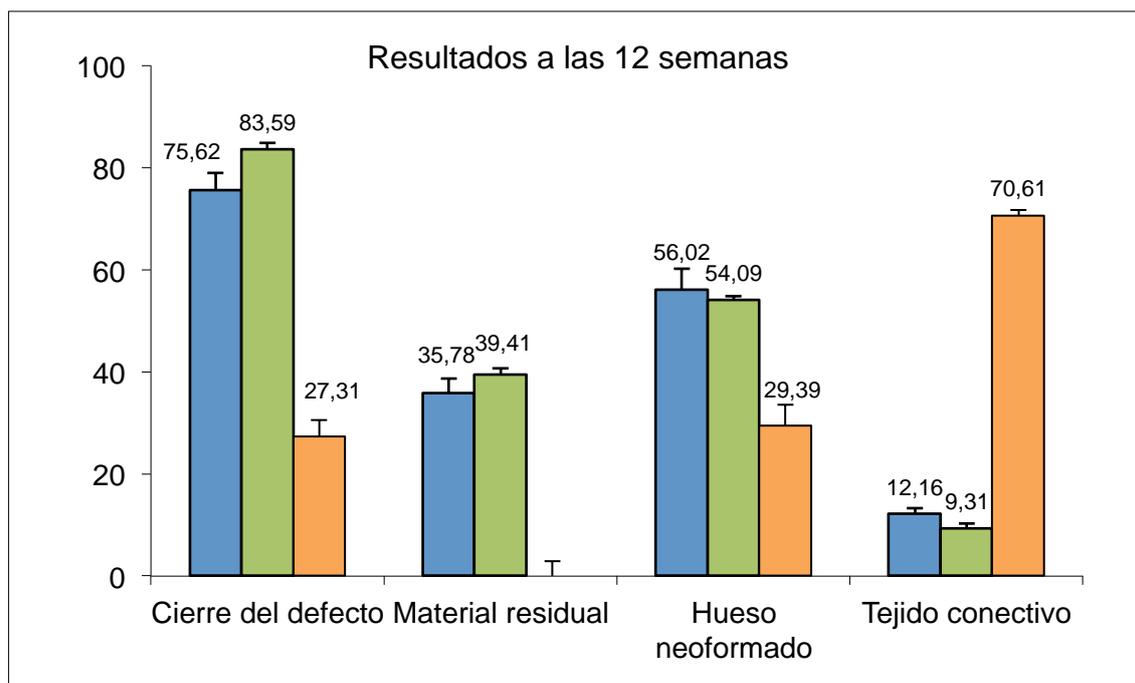


Figura 38: Figura resumen de la Evaluación Histomorfométrica a las 12 semanas: Cierre del defecto, Material Residual, Neoformación Ósea y Tejido Conectivo. Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

Cierre del Defecto (*Cortical Defect Closure - CDC*):

Todos los grupos mostraron mayor aproximación de los márgenes de la lesión si los comparamos con los resultados obtenidos a las 8 semanas. El Grupo B, que contiene silicio al 3%, mostró el cierre de defectos más alto ($83,59 \pm 1,2\%$), resultado estadísticamente significativo. En el Grupo A se obtuvieron resultados que indicaban un aumento del cierre del defecto ($75,62\% \pm 3,3\%$) en comparación con las 8 semanas, pero siendo más bajo que el Grupo B. El defecto del Grupo Control fue el que menos cierre del defecto obtuvo ($27,31\% \pm 4,5\%$). (Fig. 38, 39 , 40 - Tabla 5)

Material Residual (*Residual Material - RM*):

El Grupo B mostró un mayor porcentaje de material residual ($39,41 \pm 1,3\%$) en comparación al Grupo A ($35,78 \pm 2,9\%$). El Grupo C no aparece en la gráfica ni la tabla porque los defectos carecían de biomaterial. (Fig. 38, 39 , 40 - Tabla 5)

Hueso Neoformado (*New Bone - NB*):

En el análisis de neoformación ósea se observó crecimiento de tejido óseo tanto en el centro como en los márgenes del defecto en los Grupos A y B. Además, se encontró tejido óseo neoformado alrededor y dentro de las partículas del biomaterial. En el Grupo Control, el tejido óseo neoformado solo se observó en los márgenes del defecto. El mayor porcentaje de hueso neoformado se encontró en el Grupo B ($54,09 \pm 0,7\%$) y el Grupo A ($52,06 \pm 2,6\%$), resultados estadísticamente significativos. En el Grupo Control se contabilizó un $29,39 \pm 3,8\%$ de hueso neoformado (Fig. 38, 39 , 40 - Tabla 5)

Tejido conectivo (*Connective Tissue - CT*):

CT encontrado fue mayor en el Grupo Control ($70,61\% \pm 3,7\%$), seguido del Grupo A ($12,16 \pm 1,1\%$) y, después, por el Grupo B ($9,31 \pm 1,0\%$). ($p < 0,05$) Éste resultado, estadísticamente significativo, prueba que la ausencia del soporte que da el hueso particulado, hace que tejido blando se invagine de forma más acentuada (Fig. 38, 39 , 40 - Tabla 5)

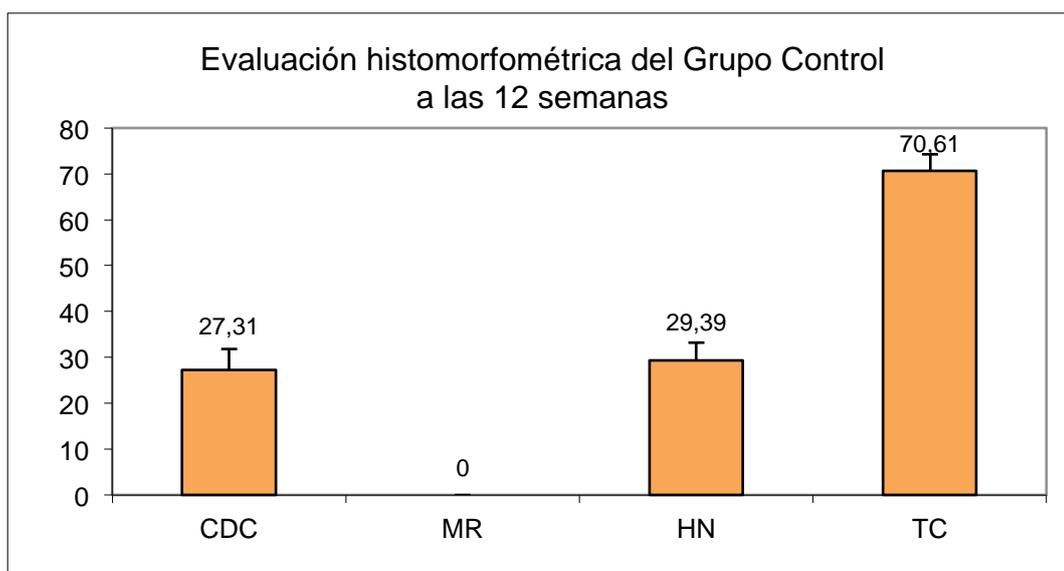


Fig. 39: Evaluación Histomorfométrica del Grupo Control a las 12 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

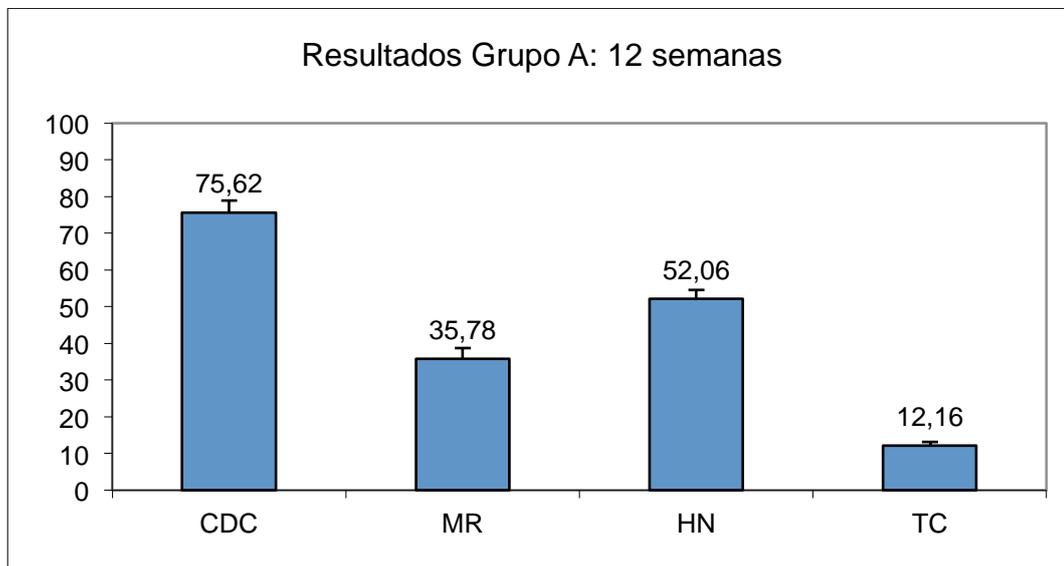


Fig. 40: Evaluación Histomorfométrica del Grupo A (4BONE®) a las 12 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

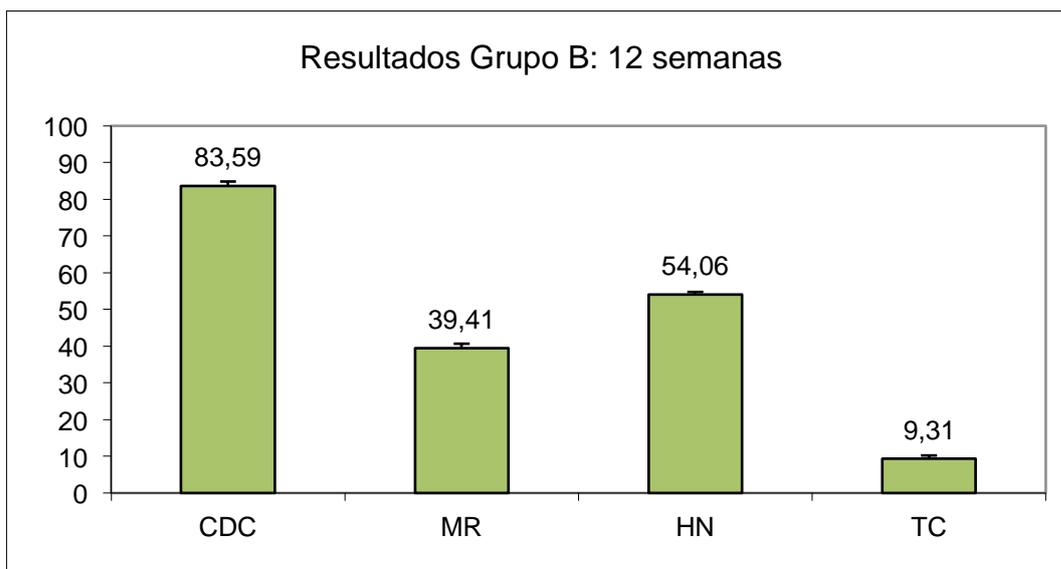


Fig. 41: Evaluación Histomorfométrica del Grupo B ((4BONE® + 3% Silicio) a las 12 semanas: Cierre del defecto (CDC), Material Residual (RM), Tejido Conectivo (CT) y Neoformación Ósea (NB). Valores expresados en %. P valor < 0,05 para delimitar los resultados estadísticamente significativos. Test de Mann-Whitney para valorar los grupos independientes.

5.3 Imágenes Histomorfométricas:

Las imágenes histomorfométricas del Grupo B, a las ocho semanas, muestran el inicio de la neoformación ósea alrededor de las partículas del injerto. Una nueva cortical se forma sobre las partículas del injerto en la zona basal. (Fig. 42) En el mismo grupo, a las 12 semanas, se observa la reducción del tamaño del injerto, aumentando el hueso neoformado alrededor y en el interior de las partículas del injerto (Fig. 43).

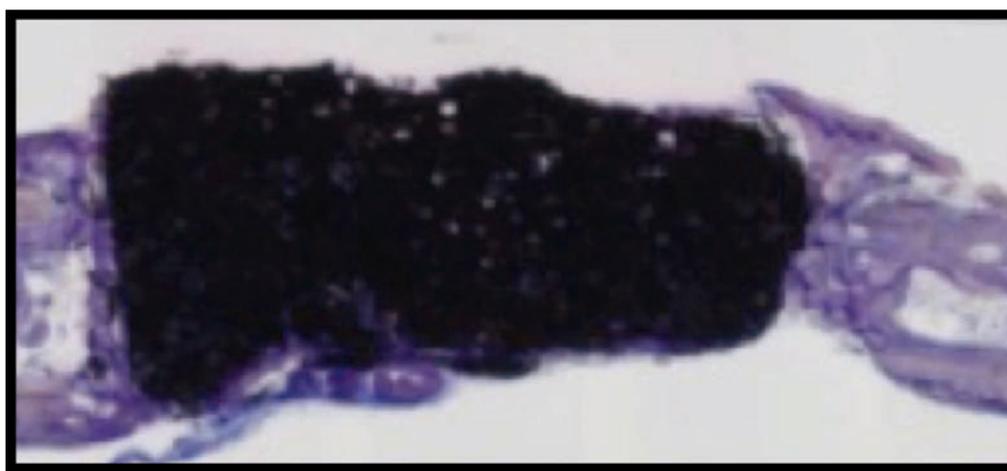


Fig. 42: Comparación mediante histomorfometría: Grupo B (4BONE® + 3% Silicio) a las 8 semanas (Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo).

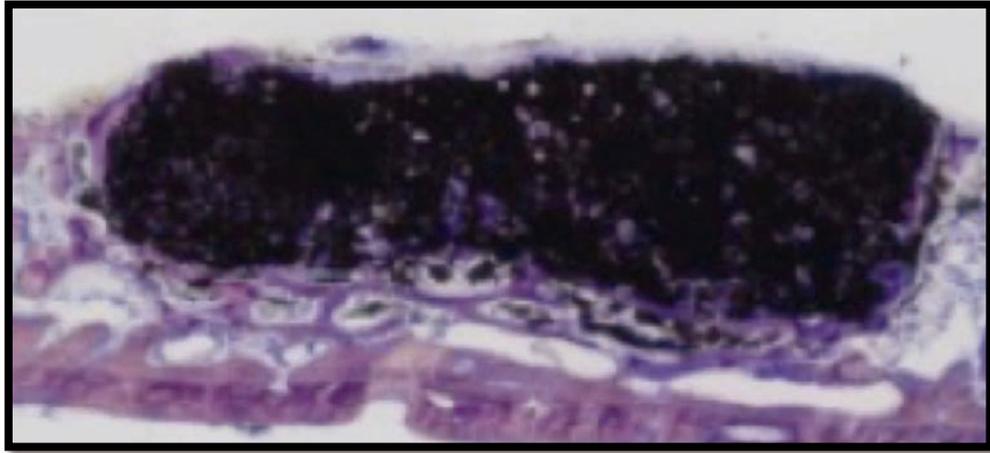


Fig. 43: Comparación mediante histomorfometría: Grupo B (4BONE® + 3% Silicio) a las 12 semanas (Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo).

Las imágenes del Grupo A obtenidas a las ocho semanas muestran hueso neoformado alrededor del injerto, pero también se observa la disolución de las partículas del biomaterial, con la consecuente reducción del injerto a las 12 semanas (Fig. 44), la neoformación ósea se hace más evidente, con una reducción significativa del injerto (Fig. 45).

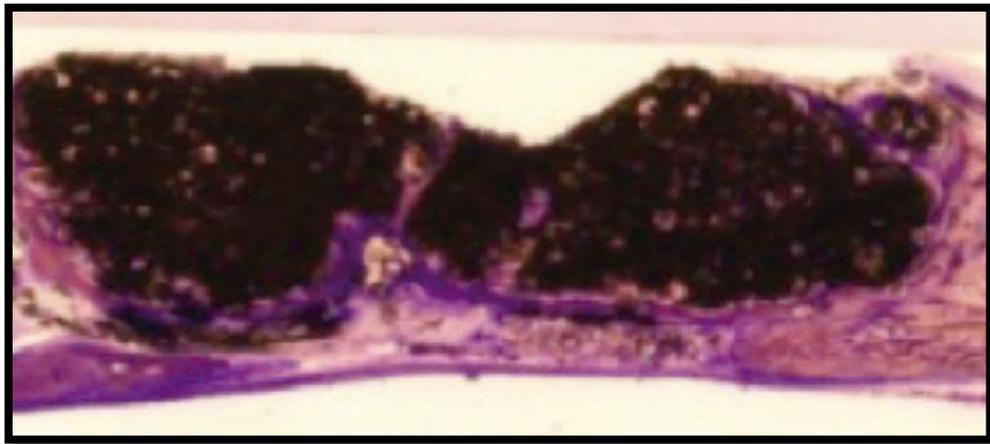


Fig. 44: Comparación mediante histomorfometría: Grupo A (4BONE®) a las 8 semanas (Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo).

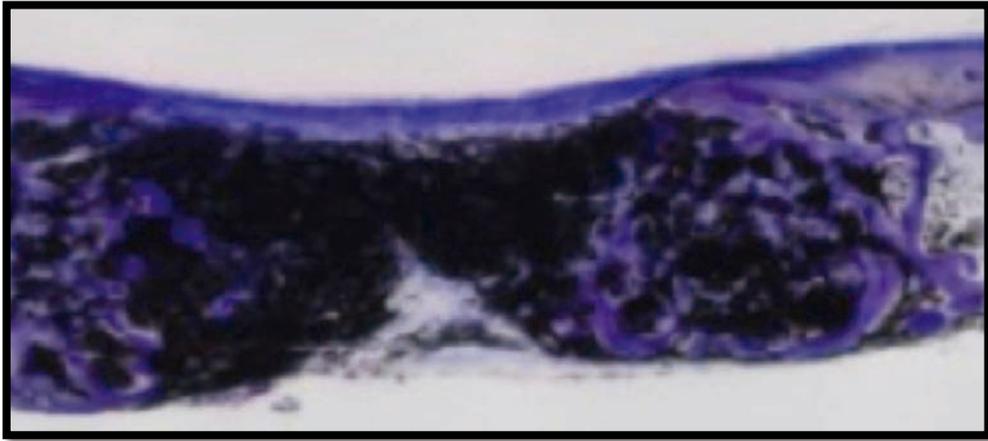


Fig. 45: Comparación mediante histomorfometría: Grupo A (4BONE®) a las 12 semanas (Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo).

El Grupo Control muestra, a las 12 semanas, neoformación ósea solamente en las paredes del defecto; en este grupo no se observó el cierre completo del defecto (Fig. 46).

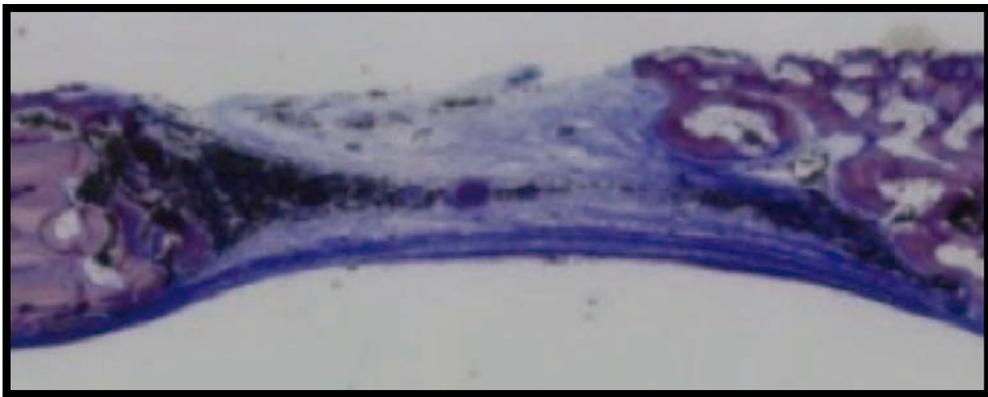


Fig. 46: Comparación mediante histomorfometría: Grupo Control a las 12 semanas (Magnificación 5X y tinción con Leva-Lackzo).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN:

El objetivo de este estudio es evaluar los beneficios que aporta la incorporación de 3% de silicio en la composición de un material de injerto sintético bifásico con HA / β -TCP (60% / 40%), en términos de sustitución ósea y estabilidad dimensional.

Este estudio in vivo utiliza defectos de tamaño crítico en calotas de conejo (12 mm de diámetro que no cura espontáneamente en 16 semanas).

Este estudio tiene ciertas limitaciones, como los tiempos de estudio de ocho y doce semanas, que excluyen información importante acerca de la curación del hueso para una mejor comprensión del comportamiento de este material.

Defecto óseo en modelo experimental animal

En el ámbito de la investigación biomédica de la regeneración ósea, hay muchos modelos de estudio distintos. Hay estudios centrados en la regeneración ósea en tibia, radio, mandíbula y calota craneal. Se recomienda iniciar estos estudios en ratas y conejos, pasando posteriormente a perros (Schmitz y Hollinger, 1986).

Los estudios realizados en cráneos de animales proporcionan un sustento muy similar al hueso mandibular, dado su origen intramembranoso, por esta razón, se ha extendido mucho la investigación en cráneos de animales pequeños, los estudios realizados en calotas de conejo son ampliamente usados. Además, los estudios en calota de conejo tienen ventajas sobre el resto: el conejo tiene un alto índice de regeneración-renovación ósea, que alcanza la madurez a los seis meses y proporciona un modelo adecuado para experimentos relacionados con materiales de regeneración ósea. Otra ventaja de este tipo de estudios sobre calota de conejo es que esta parte del macizo craneal del animal permite la creación de múltiples defectos, reduciendo así el riesgo de errores observacionales que se pueden dar en estudios animales individuales (Delgado-Ruiz et al., 2015).

Cierre del defecto:

El cierre del defecto se evaluó mediante histomorfometría a las 8 y a las 12 semanas. Los grupos estudio mostraron una cicatrización prácticamente completa, con hueso neoformado y material particulado.

A las doce semanas, el cierre del defecto había mejorado si lo comparamos con las ocho semanas. De todos modos, ningún defecto se cerró por completo durante el tiempo del estudio.

Los estudios mediante μ CT e histología permiten observar la evolución de este tipo de lesiones. En nuestro estudio se observó que el HA/ β -TCP + 3% silicio producía un cierre efectivo del defecto y mejoraba la neoformación ósea, además, el material se mantenía estable en el defecto. Éstos resultados concuerdan con los obtenidos por Kruse et al, 2011, éstos investigadores crearon defectos no críticos en calotas de conejo y los rellenaron con gránulos de base de óxido de hidroxapatita/sílice sintética (HA/SiO), gránulos a base de hidroxapatita xenogénica, y gránulos a base de hidroxapatita y óxido de sílice sintético (HA / SiO). Los resultados que obtuvieron muestran que los biomateriales que contienen Silicio promueven la regeneración ósea de una forma similar a los biomateriales de origen bovino (Kruse et al., 2011).

Hwang, en el 2012, concluye que el uso de HA, β -TCP o Fosfato Cálcico Bifásico proporciona mayor control de la cicatrización y osificación del defecto (Hwang et al., 2012).

Otros estudios, como los de Calvo-Guirado en 2013 y 2014, sobre el uso de HA/ β -TCP como biomaterial de elección para defectos óseos, indica que el uso de una barrera biodegradable como una membrana de colágeno reabsorbible, mejora el cierre del defecto, si lo comparamos con un defecto sin cubrir (Calvo-Guirado et al., 2013, 2014).

En nuestro estudio no se utilizaron membranas reabsorbibles de colágeno para poder evaluar la cantidad de tejido conectivo que prolifera en el defecto, dificultando el cierre del mismo. Existen muchos artículos en la literatura que eliminan las membranas de colágeno de los estudios para reducir variables y centrarse en la respuesta del hueso al recibir el

biomaterial injertado (Jensen et al., 2007; Kruse et al., 2011; Hwang et al., 2012; Lee et al., 2013; Schmidlin et al., 2013; Yang et al., 2013; Aguado et al., 2014; Kunert-Keil et al., 2015; Ma et al., 2016).

En nuestra investigación, el grupo HA/ β -TCP obtuvo menor cierre del defecto (57,62% - 8 semanas ; 75,62% - 12 semanas) comparado con el grupo HA/ β -TCP + 3% Silicio (65,51% - 8 semanas ; 83,59% - 12 semanas), mientras que en el Grupo Control prácticamente no se observó cierre del defecto (14,54% - 8 semanas ; 27,31% - 12 semanas).

Neoformación ósea:

La neoformación ósea encontrada en esta investigación es prácticamente igual en los grupos de HA/ β -TCP (41,54% - 8 semanas ; 52,06% - 12 semanas) y HA/ β -TCP + 3% Silicio (39,33% - 8 semanas ; 54,09% - 12 semanas).

Añadir 3% de Silicio al HA/ β -TCP provoca que la fase de TCP se estabilice. Así, pese a que haya mayor cantidad de biomaterial granulado, la neoformación ósea es más estable y ordenada, por lo tanto, más efectiva. Lo cual explica que haya más neoformación ósea en el Grupo B que en el Grupo A, a las doce semanas. Además, Maté-Sánchez de Val et al. en 2015 define al HA/ β -CP como un biomaterial biocompatible, osteoconducente y parcialmente reabsorbible (Maté-Sánchez de Val et al., 2015).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio contrastan con los de Khan en 2015. Este autor y su grupo de investigación mostraron que, a las 8 semanas, los defectos que albergaban HA/TCP habían formado la mitad del hueso obtenido en nuestros resultados (Khan et al., 2015). Estas grandes diferencias pueden ser debidas a que Khan usó una proporción de HA/TCP de 25/75 y en nuestro estudio, 60/40. Carrel et al. en 2016 usaron CEROS[®], un biomaterial sintético hecho de partículas de β -TCP, los resultados recogidos en neoformación ósea a las ocho semanas fueron de 13,8% y a las 16 semanas de 43% en defectos de 10mm (Carrel et al., 2016). Hwang, en 2012, trabajó sobre defectos ligeramente más pequeños (8mm) y estudió los resultados de biomateriales formados por HA, HA/ β -TCP granulado y BCP en bloques, a las cuatro y a las ocho semanas. En este estudio, la mayor regeneración se encontró en el grupo de BCP, seguido del grupo HA y por último, el grupo HA/ β -TCP. Además, se observó que el área total de aumento óseo

prácticamente triplicaba al grupo control. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio (Hwang et al., 2012).

Jensen et al., en 2007, encuentra que en las primeras semanas de cicatrización, el hueso autólogo genera más hueso neoformado, si lo comparamos con HA o HA/ β -TCP sintéticos. A pesar de esto, el mismo autor dice que a medida que se avanza en el tiempo, la neoformación ósea se iguala en todos los grupos (hueso autólogo - HA - HA/ β -TCP 60/40 - TCP) (Jensen et al., 2007).

Lim et al (2015) comparó diferentes proporciones de HA/ β -TCP, siendo la proporción HA/ β -TCP 70%/30% la que obtuvo mejores resultados en aumento y neoformación ósea al principio del estudio, si lo comparamos con las proporciones HA/ β -TCP 30% /70% y 20% / 80%. El mismo autor advierte que al final del estudio, los tres grupos obtuvieron resultados muy similares en cuanto a aumento de volumen y neoformación ósea (Lim et al (2015). Yang et al (2014) también observó el mismo patrón de comportamiento durante su estudio: comparó diferentes proporciones de HA/ β -TCP (60% /40% y 20% / 80%) encontrando como resultado que la proporción 60/40 obtenía más volumen de hueso en el defecto y mayor neoformación ósea en los primeros estadíos de la regeneración (2 semanas). A las 8 semanas, el grupo con menor proporción de HA consiguió obtener mayor área aumentada de tejido óseo (Yang et al., 2014).

Yip et al (2015), usó HA/ β -TCP en las mismas proporciones que esta investigación (60/40) y lo comparó con HA/ β -TCP (10/90), HA/ β -TCP + PLGA (polyactivecoating) y hueso bovino desmineralizado (BioOss®). A las 12 semanas, el HA/ β -TCP (60/40) tenía un 46,33% de neoformación ósea, un resultado ligeramente inferior al obtenido en esta investigación: 52,06%. Si se compara con los otros resultados del resto de grupos, vemos que esta relación de HA/ β -TCP (60/40) es la que promueve mejor regeneración, comparado con HA/ β -TCP (10/90): 38,42% y HA/ β -TCP + PLGA (polyactivecoating): 25%. Estos investigadores, cubrieron sus defectos (de 6mm) con membranas de colágeno reabsorbibles (Yip et al., 2015).

En otro artículo, Calvo-Guirado et al. 2013 demostró que aplicar HA/ β -TCP en un defecto óseo promueve la regeneración del tejido afectado haciendo que el cierre del defecto se

duplique a los sesenta días. El autor advirtió que el uso de membranas mejora el cierre del defecto. En el mismo artículo, se observó menor material residual, mayor formación ósea y menor cantidad de tejido conectivo cuando se usaban membranas reabsorbibles para cubrir el defecto (Calvo-Guirado et al., 2014a).

Material residual:

En nuestro estudio, la mayor cantidad de material residual la encontramos en los defectos del Grupo B (HA/ β -TCP + 3% Silicio). El silicio aporta mayor estabilidad y mejora las propiedades mecánicas del β -TCP.

Maté-Sánchez de Val et al (2013) estudió diferentes proporciones de HA/TCP, al que añadía colágeno: HA/TCP/colágeno (Grupo 1: 40/30/30; Grupo 2: 50/20/30; Grupo 3: 60/20/20). Se observó que a menor concentración de HA, mayor era la reabsorción del biomaterial y, por lo tanto, mayor era la neoformación ósea (Maté-Sánchez de Val et al., 2013).

El mismo autor, en 2014, publicó que los injertos particulados de HA/ β -TCP promueven la regeneración del tejido duro y que no interfieren ni adulteran la regeneración normal del hueso. Además este tipo de biomaterial proporciona una base sólida para la regeneración (Sánchez de Val et al., 2014).

HA y β -TCP se consideran materiales parcialmente reabsorbibles. La velocidad de reabsorción del biomaterial es indirectamente proporcional a la cantidad de HA presente en el injerto: a mayor cantidad de HA, menor velocidad de reabsorción del biomaterial (Jensen et al 2007, Calvo-Guirado et al 2012, Lambert et al 2013, Schmidlin et al 2013, Maté-Sánchez de Val et al 2015, Lim et al 2015).

Rojbani et al (2011) comparó β -TCP y HA con α -TCP. El estudio demostró que el grupo α -TCP tenía una mayor degradación que el grupo β -TCP, pero el grupo HA seguía mostrando mayor material residual (Rojbani et al 2011).

Tejido conectivo:

En el estudio de Hwang et al. (2012) también se cuantificó el tejido blando en el defecto, siendo mucho mayor en los grupos estudio HA, HA/ β -TCP y BCP que el grupo control (Hwang et al. 2012). Yip et al (2015) mostró que el defecto rellenado con HA/ β -TCP (60/40) poseía un 18,6% de tejido blando, resultado ligeramente superior obtenido en nuestro estudio (12,16% para el grupo de HA/ β -TCP y 9,31% para el grupo de HA/ β -TCP + 3% Silicio) pero muy superior al 5,58% y al 7,8% obtenido por Yip et al cuando la relación es 10/90 y cuando se le añade PLGA (Yip et al., 2015).

En esta investigación, la mayor cantidad de tejido conectivo fue encontrado en el Grupo Control, comparándolo con los otros dos grupos. Un resultado parecido se obtuvo en la investigación llevada a cabo por De Aza et al. (2013), quién usó α -TCP y α -TCP + 3 wt% Cerámica de silicio dicálcica en defectos críticos de tibia de conejo. Éstos autores observaron fibras de colágeno organizadas en los defectos donde se había aplicado el α -TCP + 3 wt% Cerámica de silicio dicálcica después de cuatro semanas, mientras que no se observó ninguna rastro de colágeno en los injertos sin silicio. Esto sugiere que incorporar silicio al α -TCP promueve la remodelación ósea en la interfase α -TCP/hueso, de modo que la tasa de estabilidad del α -TCP disminuye (De Aza et al. 2013).

Biomateriales:

Diversos autores han realizando estudios modificando biomateriales obteniendo buenos resultados.

Luvizuto et al (2011) realizó un estudio comparando tres biomateriales: β -TCP, PLA/PGA y Cemento de Fosfato Cálcico. Los resultados mostraron que el β -TCP mejoraba los resultados del injerto de hueso autólogo y que si se le aplicaba un suplemento de BMP-2 no mejoraba su osteointegración.

Moon et al (2015) realizó un estudio con defectos de 8mm creados en calotas de ratas, se observó que, a las seis semanas, el aloinjerto (Tutoplast) y el biomaterial bovino (Bio-Oss®) utilizados producían una gran regeneración, si lo comparamos con el defecto control. Los mismos autores explicaron que a las doce semanas el hueso neoformado en los defectos

donde se encontraban los aloinjertos era superior a los ocupados por xenoinjertos. A las doce semanas, el injerto que cicatrizaba sin biomaterial tenía muy poco hueso regenerado (Moon et al., 2015). Yip et al., en 2015, registraron un 32,33% y un 45,1% de hueso regenerado a los tres y a los seis meses cuando se aplicaba Bio-Oss® (Yip et al., 2015). Los resultados de Turri y colaboradores, muestran que si se le añade una membrana de colágeno reabsorbible al injerto de origen bovino se consigue una formación ósea de 6,5% a las dos semanas, un 21,3% a las cuatro semanas y un 18,1% a las ocho semanas (Turri et al., 2015). Ezirganli en 2015 realizó un estudio con membranas de titanio no reabsorbibles a 90, 120, 150 y 180 días. Los defectos que fueron cubiertos con xenoinjertos de origen bovino mostraron un mayor crecimiento óseo (Ezirganli et al., 2015).

HA/TCP + silicio:

Bohner explica que la liberación de iones de Si es el mecanismo activo que hace que comience la respuesta biológica de la regeneración, en el mismo artículo, comenta que el tamaño de los gránulos del biomaterial, los cambios en la conformación de proteínas en la superficie o un cambio en la topografía del biomaterial son otros mecanismos (“mecanismos pasivos”) mediante los cuales se pueden explicar la sustitución del Si durante la regeneración. En el mismo artículo, el autor dice que los biomateriales portadores de Si deberían ser considerados como un fármaco, dada la liberación de iones de Si que se produce (Bohner, 2009).

Ibrahim y colaboradores en 2016 estudiaron in vitro los efectos del Fosfato Cálcico Bifásico modificado con Silicio sobre osteoblastos humanos. Los resultados de este estudio mostraron que la presencia de Si no solo modificaba la morfología y la superficie de biomaterial, también afectaba a la proliferación y a la adhesión celular, demostrando que el Si tiene un papel importante en el aumento de la proliferación y adhesión de osteoblastos, debido a que el Si hace la superficie más rugosa (Ibrahim et al., 2016).

Backly y colaboradores, en 2014, compararon los efectos del plasma rico en plaquetas y un biomaterial compuesto de HA/ β -TCP combinado con silicio aplicados en defectos óseos de calotas de conejos a las cuatro, a las ocho y a las dieciséis semanas. Obteniendo buenos resultados en regeneración ósea cuando se combinan los biomateriales y el Si (Bakly et al.,

2014).

Kruse et al., en 2011, crearon defectos no críticos en calotas de conejos, y los rellenaron con gránulos de base de óxido de hidroxiapatita / sílice sintética (HA/SiO), gránulos a base de hidroxiapatita xenogénica, y gránulos a base de óxido-sintético de hidroxiapatita / sílice (HA / SiO). Los resultados obtenidos en la neoformación ósea y el desarrollo de puentes entre la lesión y sus márgenes mostraron que los biomateriales que incorporaban silicio al HA eran comparables a los obtenidos cuando se usaban gránulos minerales de hidroxiapatita xenogénicos de origen bovino (Kruse et al., 2011).

Tal y como dijo Velasquez et al. en 2013, la adición de silicio al α -TCP mejora sus propiedades y disminuye su ratio de reabsorción aumentando así la estabilidad del material durante el proceso de formación ósea. Resultados similares a los de Fei et al. (2012), un 50 u 80% de silicio puede promover la regeneración y estimular la osteogénesis, la angiogénesis y la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas (Fei et al., 2012).

Aparentemente, el silicio aplicado al biomaterial facilita la mineralización de la red de colágeno sobre la matriz. Además, la introducción de Silicato Cálculo en los poros de TCP es una manera efectiva de preparar un material de injerto bioactivo para el uso clínico y también para controlar propiedades como la biodegradación in vivo y la osteoconducción del TCP (Liu et al., 2013).

Incorporar Silicato Dicálcico (C_2Si) a la estructura del α -TCP mejora la integración del material y su compatibilidad, por lo tanto, facilita su unión al hueso receptor. Mejorando así el ratio de formación ósea en comparación a los biomateriales que no incorporaban el Silicato Dicálcico (C_2Si). α -TCP y α -TCP + C_2Si tienen un comportamiento in vivo e in vitro muy similar (Velasquez et al., 2013).

La bioactividad y la biocompatibilidad de estos materiales dependen del contenido de C_2Si . Los resultados de los estudios indican que añadir 1,5 o 3% de C_2Si al α -TCP promueve la mineralización del hueso. El C_2Si - β -TCP al 3% obtuvo los mejores resultados en cuanto a biocompatibilidad seguido del C_2Si - α -TCP al 1,5% y el α -TCP sin C_2Si .

El β -TCP con 3% de C₂Si ofrece una matriz ideal para la regeneración gracias a sus propiedades mecánicas y biológicas, y podría ser un candidato prometedor para aplicaciones en ortopedia y cirugía oral y maxilofacial. De todas las fórmulas probadas, el α -TCP con 3% de C₂Si demostró ser el biomaterial más bioactivo, tanto in vivo como in vitro y podría ser un biomaterial interesante para algunos casos específicos (Velasquez et al., 2013).

En nuestro estudio, el mayor volumen de neoformación ósea lo encontramos en el Grupo B (HA/ β -TCP+3% silicio - $54.09 \pm 0.7\%$), seguido del grupo Grupo A (HA/ β -TCP - $52.06 \pm 2.6\%$) y comparados con el Grupo Control, que solo mostró un $29,39 \pm 3,8\%$ de formación ósea a las 12 semanas. Estos resultados se ven reafirmados con los resultados obtenidos por otros estudio que también añadían silicio a biomateriales sintéticos para mejorar la regeneración ósea. La adición de Silicio al TCP ha tenido resultados prometedores mejorando las propiedades osteogénicas del material. (Kruse et al., 2011; Fei et al., 2012; Liu et al., 2013; Velasquez et al., 2013)

Después de obtener y comparar estos resultados, se puede afirmar que el uso de un biomaterial, sea cual sea, estimula y mejora la neoformación ósea. Aunque deberemos elegir cuidadosamente el biomaterial en función de la zona receptora (morfología y patología previa) y los objetivos de la regeneración ósea.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES:

Teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio experimental realizado en modelo animal, hemos concluido que:

1. Mediante el estudio histomorfométrico y de μ CT, concluimos que el biomaterial HA/ β -TCP (60/40) + 3% de Silicio acelera el cierre del defecto crítico a las ocho y a las 12 semanas, comparado con los defectos en los que se usó el material bifásico sin Silicio.
2. La modificación de un material bifásico HA/ β -TCP (60/40) con la aplicación del 3% de Silicio mejora la neoformación ósea a 8 y 12 semanas.
3. Utilizando HA/ β -TCP (60/40) + 3% de Silicio obtenemos una menor reabsorción del material injertado a las 8 y a las 12 semanas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., Brånemark, P.I. (1981) A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* **6**:387-416.

Aghaloo, T.L., & Moy, P.K. (2007) Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement?. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **22 Suppl**: 49-70. Erratum in (2008): *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **23**: 56.

Aguado E., Pascaretti-Grizon F., Gaudin-Audrain C., Goyenvalle E. & Chappard D. (2014) β -TCP granules mixed with reticulated hyaluronic acid induce an increase in bone apposition. *Biomedical Materials* **9**: 015001 doi:10.1088/1748-6041/9/1/015001.

Alberts, B. (2016), *Biología molecular de la célula*. Capítulo 1, página 337. Capítulo 19, página 229-30. 6ª Ed. Editorial Omega, Barcelona.

Albrektsson, T. (1980) Repair of bone grafts. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* **14**: 1-12.

Albrektsson, T., Jansson, T., Lekholm, U. (1986) Osseointegrated dental implants. *Dent Clin North Am.* **30**:151-174.

Backly, R.M., Zaky, S.H., Canciani, B., Saad, M.M., Eweida, A.M., Brun, F., Tromba, G., Komlev, V.S., Mastrogiacomo, M., Marei, M.K. & Cancedda, R. (2014) Platelet rich plasma enhances osteoconductive properties of a hydroxyapatite β -tricalcium phosphate scaffold (SkeliteTM) for late healing of critical size rabbit calvarial defects. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* **42**: e70-79.

Beck, G.R. Jr, Ha, S.W., Camalier, C.E., Yamaguchi M., Li,Y., Lee, J.K., & Weitzmann, M.N. (2012) Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine* **8**: 793-803.

Bohner M (2009). Silicon-substituted calcium phosphates - a critical view. *Biomaterials*.

30: 6403-6406.

Bosch, C., Melsen, B. & Vargervik, K. (1998) Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. *Journal of Craniofacial Surgery* **9**: 310–316.

Boyce, B.F. & Xing, L. (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* **473**: 139-146.

Buser, D., Hoffmann, B., Bernard, J.P., Lussi, A., Mettler, D. & Schenk RK. (1998) Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandibles of miniature pigs. *Clinical Oral Implants Research* **9**: 137–150.

Buser, D., Ingimarsson, S., Dula, K., Lussi, A., Hirt, HP., Belser, UC. (2002) Long-term stability of osseointegrated implants in augmented bone: a 5-year prospective study in partially edentulous patients. *Int J Periodontics Restorative Dent.* **22**:109-117.

Calvo-Guirado, J.L., Delgado-Ruíz, R.A., Ramírez-Fernández, M.P., Maté-Sánchez, J.E., Ortiz-Ruiz, A. & Marcus, A. (2012a) Histomorphometric and mineral degradation study of Ossceram: a novel biphasic β -tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 667–675.

Calvo-Guirado, J.L., Gómez-Moreno, G., Guardia, J., Ortiz-Ruiz, A., Piatelli, A., Barone, A., Martínez-González, J.M., Meseguer-Olmo, L., López-Marí, L. & Dorado, C.B. (2012b) Biological response to porcine xenograft implants: an experimental study in rabbits. *Implant Dentistry* **21**: 112-117.

Calvo-Guirado, J.L., Ramírez-Fernández, M.P., Delgado-Ruíz, R.A., Maté-Sánchez J.E., Velasquez, P. & De Aza, P.N. (2014) Influence of Biphasic β -TCP with and without the use of collagen membranes on bone healing of surgically critical size defects. A radiological, histological, and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* **25**: 1228-1238.

Calvo-Guirado, J.L., Ramírez-Fernández, M.P., Maté-Sánchezde Val, J.E., Bruno N., Velasquez P. & de Aza P.N. (2015a) Enhanced bone regeneration with a novel synthetic bone substitute in combination with a new natural cross-linked collagen membrane:

- radiographic and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 454-464.
- Calvo-Guirado, J.L., Garces, M., Delgado-Ruiz, R.A., Ramirez Fernandez MP, Ferres-Amat, E. & Romanos, G.E. (2015b) Biphasic β -TCP mixed with silicon increases bone formation in critical site defects in rabbit calvaria. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 891-897.
- Calvo-Guirado, J.L., Maté-Sánchez, J.E., Delgado-Ruiz Delgado-Ruiz, R.A., Romanos, G.E., De Aza-Moya, P. & Velásquez, P. (2015c) Bone neo-formation and mineral degradation of 4Bone.® Part II: histological and histomorphometric analysis in critical size defects in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 1402-1406
- Cangini, F., Cornelini, R. (2005) A comparison between enamel matrix derivative and a bioabsorbable membrane to enhance healing around transmucosal immediate post-extraction implants. *J Periodontol.* **10**:17
- Cardaropoli, G., Araújo, M. & Lindhe, J. (2003) Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **30**: 809-818.
- Cardaropoli, G, Araújo, M., Hayacibara, R., Sukekava, F. & Lindhe, J. (2005) Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 435-440.
- Carlisle, E.M. (1970) Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* **167**: 279-280.
- Carrel, J.P., Wiskott, A., Moussa, M., Rieder, P., Scherrer, S. & Durual, S. (2016) A 3D printed TCP/HA structure as a new osteoconductive scaffold for vertical bone augmentation. *Clinical Oral Implants Research* **27**: 55-62.
- Cawood, J.I. & Howell, R.A. (1991) Reconstructive preprosthetic surgery. I. Anatomical considerations. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery.* **20**: 75-82.
- Chatakun, P., Núñez-Toldrà, R., Díaz López, E.J., Gil-Recio, C., Martínez-Sarrà, E., Hernández-Alfaro, F., Ferrés-Padró, E., Giner-Tarrida, L. & Atari, M. (2014) The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cell Mol Life Sci.* **71**: 113-142.

Chiapasco, M., Casentini, P. & Zaniboni M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **24** Suppl: 237-259.

Choi, S.Y., Jang, Y.J., Choi, J.Y., Jeong, J.H. & Kwon, T.G. (2013) Histomorphometric analysis of sinus augmentation using bovine bone mineral with two different resorbable membranes. *Clinical Oral Implants Research* **24** Suppl A100: 68-74.

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

Cooper, G., Mooney, M., Gosain, A., Campbell, P., Losee, J. & Huard, J. (2010) Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic and Reconstructive Surgery* **125**: 1685-1692.

Crockett, J.C., Rogers, M.J., Coxon, F.P., Hocking, L.J. & Helfrich, M.H. (2011) Bone remodelling at a glance. *Journal of Cell Science* **124**: 991-998.

Curtis, H., Barnes, N.S., Schneck, A. & Massarini, A. (2015), *Invitación a la biología*. 7^a Sección 1 página 90. Ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid.

Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. & Nyman, S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* **81**: 672-676.

De Aza, P.N., Luklinska, Z.B., Mate-Sanchez de Val, J.E. & Calvo-Guirado, J.L. (2013) Biodegradation process of α -tricalcium phosphate and a α -tricalcium phosphate solid solution bioceramics In Vivo: a comparative Study. *Microscopy Microanalysis* **19**: 1350-1357.

Delgado-Ruiz, R.A., Calvo-Guirado, J.L. & Romanos, G.E. (2015) Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 915-930.

Dutta-Roy, T., Simon, J.L., Ricci, J.L., Rekow, E.D., Thompson, V.P. & Parsons, J.R. (2003) Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-

dimensional fabrication techniques. *Journal of Biomedical Materials Research* **67**: 1228–1237.

Ezirganli, S., Kazancioglu, H.O., Mihmanli, A., Sharifov, R. & Aydin, M.S. (2015) Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 1482-1488.

Fei, L., Wang, C., Xue, Y., Lin, K., Chang, J. & Sun, J. (2012) Osteogenic differentiation of osteoblasts induced by calcium silicate and calcium silicate/ β -tricalcium phosphate composite bioceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **100**: 1237–1244.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera-Gracia, M.A., del Canto-Pingarrón, M. & Blanco-Jerez, L. (2006) Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **11**: 151-157.

Fink-Eriksen, E. (2010) Celular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* **11**: 219–227.

Florencio-Silva, R., Rodrigues da Silva-Sasso, G., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMedicine Research International* 2015:421746. doi 10.1155/2015/421746

Furlaneto, F.A.C., Nagata, M.J.H., Fucini, S.E., Deliberador, T.M., Okamoto, T. & Messoria, M.R. (2007) Bone healing in critical size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate. A histologic and histometric study in rat calvaria. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 311-318.

Garber, DA., Rosenberg, ES. (1981) The edentulous ridge in fixed prosthodontics. *Compend Contin Educ Dent*. **2**:212-223.

Gauthier, O., Boix, D., Grimandi, G., Aguado, E., Bouler, J.M., Weiss, P. & Daculsi, C. (1999) A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets: A preliminary study in dogs. *Journal of Periodontology* **70**: 375-383.

George R.B., Shin-Woo H., Camalier C.E., Yamaguchi M., Li Y., Lee J.K. Weitzmann M.N. (2012) Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone forming osteoblasts,

suppress bone resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine* **8**: 793–803.

Gibson, I.R., Best, S.M. & Bonfield, W. (1999) Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* **44**: 422–428.

Gómez de Ferraris, M.E. & Campos Muñoz, A. (2009) *Histología, embriología e ingeniería titular bucodental*. Capítulo 12 páginas 314-9. 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid.

Greenwald, A.S., Boden, D.P., Goldberg, V.M., Khan, Y., Laurencin, C.T. & Rosier, R.N. (2001) Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions and Applications. *Journal of Bone and Joint Surgery* **83** Suppl 2: S98 -103.

Guyton. (1989) *Tratado de fisiología médica*. 7ª Ed. Editorial Interamericana. México. Cap.79 p. 933-941.

Hollinger, J.O. & Kleinschmidt, J.C. (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery* **1**: 60-68.

Hooper, N.M., Schouten, R. & Hooper, G.J. (2013) The outcome of bone substitute wedges in medial opening high tibial osteotomy. *The Open Orthopaedics Journal*, **7**: 373-377.

Hwang, Y.J., Hahn, C., Liu, B. & Yang, P. (2012) Photoelectrochemical properties of TiO₂ nanowire arrays: a study of the dependence on length and atomic layer deposition coating. *ACS Nano* **6**: 5060-5069.

Ibrahim, S., Sabudin, S, Sahid, S, Marzuke, MA, Hussin, ZH, Kader Bashah, NS, Jamuna-Thevi, K. (2016) Bioactivity studies and adhesion of human osteoblast (hFOB) on silicon-biphasic calcium phosphate material. *Saudi J Biol Sci.* **23**:56-63. doi: 10.1016 / 2015 / 10.024.

Jensen, S.S., Brogini, N., Weibrich, G., Hjørting-Hansen, E., Schenk, R. & Buser, D. (2005) Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone

substitutes in combination with platelet concentrate: A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **20**: 703–712.

Jensen, S.S., Brogini, N., Hjørting-Hansen, E., Schenk R. & Buser, D. (2006) Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 237–243.

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

Khan, R., Witek, L., Breit, M., Colon, D., Tovar, N. Janal, M.N., Jimbo, R. & Coelho, P.G. (2015) Bone Regenerative Potential of Modified Biphasic Graft Materials. *Implant Dentistry* **0**: 1-6.

Khoury, F., Hemprich, A. & Sass T. (1985) Use of the free bone graft in various surgical procedures for the mandible. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* **9**: 298-304.

Khoury F. (2004) The 3-dimensional reconstruction of the alveolar crest with mandibular bone block graft: a clinical study. *J Oral Maxillofac Implants* **19**: 765-766.

Khoury, F. & Khoury, C. (2006). Mandibular Bone block grafts: instrumentation, harvesting technique and application. *Journal de Parodontologie & d'Implantologie Orale*. **25**: 15-34.

Khoury, F., Antoun, H. & Missika, P. (2010) *El aumento de hueso en implantología*. Capítulo 1 páginas 2-4, 18-24. Capítulo 5 páginas 291-302. Quintessence, Barcelona.

Kim, Y.T., Wikesjö, U.M., Jung, U.W., Lee, J.S., Kim, T.G. & Kim, C.K. (2013) Comparison between α -tricalcium phosphate and an absorbable collagen sponge carrier technology for rhGDF-5-stimulated periodontal wound healing/ regeneration. *Journal of Periodontology* **84**: 812–820.

Klein, C.P.A.T., De Groot, K., Dreissen, A.A. & Van der Lubbe, H.B.M. (1985) Interaction of biodegradable β -Whitlockite ceramics with bonetissue. An in vivo study. *Biomaterials* **6**: 189–192.

Korhi, M., Miki, K., Waite, D.E., Nakjima, H. & Okabe, T. (1993) In vitro stability of biphasic calcium phosphate. *Biomaterials* **14**: 299–304.

Kruse, A., Jung, R.E., Nicholls, F., Zwahlen, R.A., Hämmerle, C.H. & Weber, F.E. (2011) Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute material. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 506– 511.

Kunert-Keil, C., Scholz, F., Gedrange, T. & Gredes, T. (2015) Comparative study of biphasic calcium phosphate with betatricalcium phosphate in rat cranial defects. A molecular biological and histological study. *Annals of Anatomy* **199**: 79-84.

Lambert, F., Leonard, A., Lecloux, G., Sourice, S., Pilet, P. & Rompen, E. A comparison of three calcium phosphate-based space fillers in sinus elevation: a study in rabbits. *International Journal Oral & Maxillofacial Implants*. **28**: 393-402.

Le Guehennec, L., Layrolle, P. & Daculsi, G. (2004) A review of bioceramics and fibrin sealant. *European Cells Materials Journal* **8**: 1–10.

Le Guehennec, L., Goyenvalle, E., Aguado, E., Houchmand-Cuny, M., Enkel, B., Pilet, P., Daculsi, G. & Layrolle, P. (2005) Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *Journal of Biomedical Material Research. Part B, Applied Biomaterials* **72**: 69-78.

Lecomte, A., Gautier, H., Bouler, J.M., Gouyette, A., Pegon, Y., Daculsi, G. & Merle, C. (2008) Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research* **84**: 1–6.

Lee, J.H., Ryu, M.Y., Baek, H.R., Lee, K.M., Seo, J.H. & Lee, H.K. (2013) Fabrication and evaluation of porous betatricalcium phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite asa bone graft extender using rat calvarial bone defect mode *Scientific World Journal*. 2013:481789. doi: 10.1155/2013/481789.

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

Lim, H.C., Kim, K.T., Lee, J.S., Jung, U.W. & Choi, S.H. (2015) In vivo comparative investigation of three synthetic graft materials with varying compositions processed using different methods. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. **30**: 1280-1286.

Lindhe, J., Lang, N. P. & Karring, T. (2009) *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Capítulo 38 páginas 907-17. 5ª Ed. Editorial Panamericana, Madrid.

Liu, S., Jin, F., Lin, K., Lu, J., Sun, J., Chang, J., Dai, K. & Fan, C. (2013) The effect of calcium silicate on in vitro physiochemical properties and in vivo osteogenesis, degradability and bioactivity of porous β -tricalcium phosphate bioceramics. *Biomedical Materials* **8**:025008. doi: 10.1088/1748-6041/8/2/025008.

Luvizuto, E. R., Tangl, S., Zanoni, G., Okamoto, T., Sonoda, C. K., Gruber, R. & Okamoto, R. (2011) The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials* **32**: 3855-3861.

Ma, R., Yu, Z., Tang, S., Pan, Y., Wei, J. & Tang, T. (2016) Osseointegration of nanohydroxyapatite- or nano-calcium silicate-incorporated polyetheretherketone bioactive composites in vivo. *International Journal of Nanomedicine*. **11**: 6023-6033.

Martin, K.R. (2007) The chemistry of silica and its potential health benefits. *Journal of Nutrition Health and Aging* **11**: 94-97.

Martinez, I.M., Velasquez, P. & De Aza, P.N. (2010) Synthesis and stability of alpha-Tricalcium Phosphate doped with Dicalcium silicate in the system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. *Materials Characterization* **61**: 761-767.

Maté-Sánchez de Val, J.E., Calvo-Guirado, J.L., Delgado-Ruiz, R.A., Ramírez-Fernández, M.P., Negri, B., Abboud, M., Martínez, I.M. & De Aza, P.N. (2012) Physical properties, mechanical behaviour, and electron microscopy study of a new α -TCP block graft with silicon in an animal model. *Journal of Biomedical Materials Research* **100**: 3446- 3454.

Maté-Sánchez de Val, J.E., Calvo Guirado, J.L., Delgado Ruiz, R.A., Gómez-Moreno, G.,

Ramírez-Fernández, M.P. & Romanos G.E. (2014) Bone neo-formation and mineral degradation of 4Bone®. Part I: material characterization and SEM study in critical size defects in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 1165-1191.

Mathews, C.K., Van Holde, K.E. & Anthony-Cahill, S.J. (2013), *Bioquímica*. Capítulo 6 páginas 191 – 4. Capítulo 9 páginas 337, 341-2. Capítulo 23 páginas 935. 4ª Ed. Pearson Educación, Barcelona.

McAllister BS., Haghghat K. (2007) Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology*. **78**:377-396.

McCarthy, C., Patel, RR., Wragg, PF., Brook, IM. (2003) Dental implants and onlay bone grafts in the anterior maxilla: analysis of clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants*. **2**:238-241.

Merida-Velasco, J.A., Sánchez-Montesinos, I., Espín-Ferra, J., García-García, J.D. & Roldán-Schilling, V. (1993) Developmental differences in the ossification process of the human corpus and ramus mandibulae. *Ant. Rec.* **235**: 319-324.

Misch, C.M. (2000) Use of the mandibular ramus as a donor site for onlay bone grafting. *Journal of Oral Implantology* **26**: 42-49.

Misch, C.E. (2008), *Contemporary implant dentistry*. Capítulo 3 páginas 40-8. Capítulo 26 páginas 568-73. 3rd Ed. Mosby Elsevier, St Louis.

Monje, A., Aranda, L., Diaz, K.T., Alarcón, M.A., Bagramian, R.A., Wang, H.L. & Catena, A. (2016) Impact of Maintenance Therapy for the Prevention of Peri-implant Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Dental Research* **95**: 372-379.

Moon, K.-N., Kim, S.-G., Oh, J.S., Kim, C.-S., Lim, S.C. & Jeong, M.A. (2015) Evaluation of Bone Formation After Grafting With Deproteinized Bovine Bone and Mineralized Allogenic Bone. *Implant Dentistry* **24**: 101-105.

Nather, A., Wong, K.L., David, V. & Pereira B.P. (2012) *Journal of Orthopaedic Surgery* **20**: 375-380.

Navarro-Moreno, M.A. & Alía-Ramos, P. (2006) Metabolismo óseo. Vitamina D Y PTH. *Endocrinol Nutr* **53**: 199-208.

Pearce, A., Richards, R.G., Milz, S.E., Schneider, E. & Pearce S.G. (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells and Materials* **13**: 1-10.

Pérez-Sánchez, M.J., Ramírez-Glindon, E., Lledó-Gil, M., Calvo-Guirado, J.L. & Pérez-Sánchez, C. (2010) Biomaterials for bone regeneration *Medicina Oral Patología Oral Cirugía Bucal* **15**: e517-522.

Phemister, D.B. (2008) The classic: repair of bone in the presence of a septic necrosis resulting from fractures, transplantations, and vascular obstruction. *Clinical Orthopaedic and Related Research* **466**: 1021–1033.

Qiu, ZY., Li, G., Zhang, YQ., Liu, J., Hu, W., Ma, J., Zhang, SM. (2012) Fine structure analysis and sintering properties of Si-doped hydroxyapatite. *Biomed Mater.* **4**:1-11. doi:10.1088/1748-6041/7/4/045009.

Ramírez-Fernández, M., Calvo-Guirado, J.L., Delgado-Ruiz, R.A., Maté-Sánchez del Val, J.E., Vicente-Ortega, V. & Meseguer-Olmos L. (2011) Bone response to hydroxyapatites with open porosity of animal origin (porcine [OsteoBiol mp3] and bovine [Endobon]): a radiological and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 767–773.

Rentsch, C., Schneiders, W., Manthey, S., Rentsch, B. & Rammelt, S. (2014) Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomatter* **4**.pii: e27993.

Riancho, J.A. & Delgado-Calle, J. (2011) Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatología Clínica* **7** Suppl 2:S1–S4.

Rojbani, H., Nyan, M., Ohya, k. & Kasugai, S. (2011) Evaluation of the osteoconductivity of a-tricalcium phosphate, b-tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *Journal of biomedical materials research A* **98**: 488-498.

Rokn, A., Moslemi, N., Eslami, B., Abadi, H.K. & Paknejad, M. (2012) Histologic Evaluation of Bone Healing Following Application of Anorganic Bovine Bone and β -

tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria. *Journal of Dentistry (Tehran,Iran)* **9**: 35-40.

Romanos, G.E., Delgado-Ruiz, R.A., Gómez-Moreno, G., López-López, P.J., Mate Sanchez de Val, J.E. & Calvo-Guirado, J.L. (2015) Role of mechanical compression on bone regeneration around a particulate bone graft material: an experimental study in rabbit calvaria. *Clinical Oral Implants Research* 2015 Apr 12. doi: 10.1111/clr.12592. [Epub ahead of print].

Seeman, E. & Delmas, P.D. (2006) Bone Quality — The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility *New England Journal of Medicine* **354**: 2250-2261.

Schmidlin, P.R., Nicholls, F., Kruse, A., Zwahlen, R.A. & Weber, F.E. (2013) Evaluation of moldable, in situ hardening calcium phosphate bone graft substitutes. *Clinical Oral Implants Research*. **24**: 149-157.

Schmitt, J.M., Buck, D.C., Joh, S.P., Lynch, S.E. & Hollinger, J.O. (1997) Comparison of Porous Bone Mineral and Biologically Active Glass in Critical-Sized Defects. *Journal of Periodontology* **68**: 1043-1053.

Schmitz, J.P. & Hollinger J.O. (1986) The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **205**: 299-308.

Simion, M, Jovanovic, SA., Tinti, C., Benfenati, SP. (2001) Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical Ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 years follow-up. *Clin Oral Implants Res.* **12**:35-45.

Tadic, D. & Epple, M. (2004) A thorough physico-chemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* **25**: 987–994.

Turri, A. & Dahlin, C. (2015) Comparative maxillary bone-defect healing by calcium-sulphate or deproteinized bovine bone particles and extra cellular matrix membranes in a guided bone regeneration setting: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 501-506.

Urban, I.A. & Lozada, J.L., (2010) A Prospective Study of Implants Placed in Augmented Sinuses with Minimal and Moderate Residual Crestal Bone: Results After 1 to 5 years. *International journal of oral & maxillofacial implants* **25**: 1203–1212.

Velasquez, P., Luklinska, Z.B., Meseguer-Olmo, L., Mate-Sanchez de Val, J.E., Delgado-Ruiz, R.A., Calvo-Guirado, J.L., Ramirez-Fernandez, M.P. & De Aza, P.N. (2013) α -TCP ceramic doped with dicalcium silicate for bone regeneration applications prepared by powder metallurgy method: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research* **101**: 1943–1954.

Vidal, B., Pinto, A., Galvão, M.J., Santos, A.R., Rodrigues, A., Cascão, R., Abdulghani, S., Caetano-Lopes, J., Ferreira, A., Fonseca, J.E. & Canhao H. Bone histomorphometry revisited. *Acta reumatol port.* **37**: 294-300.

Volkman, R., Bretschneider, K., Erlekampf, E. & Weller, S. (2007) Revision surgery in high grade acetabular defects with thermo disinfected allografts. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* **145** Suppl 1: S44–48.

Wang, H.L. & Boyapati, L. (2006) "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent* **15**: 8-17.

Yang, C., Unursaikhan, O., Lee, J.S., Jung, U.W., Kim, C.S. & Choi, S.H. (2014) Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **102**: 80–88.

Yaszemski, M.J., Payne, R.G., Hayes, W.C., Langer, R. & Mikos, A.G. (1996) Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* **17**: 175–185.

Yuan, H., Fernandes, H., Habibovic P., de Boer, J., M. C. Barradas, A., de Ruiter, A., Walsh, W.R., van Blitterswijk, C.A. & de Bruijn, J.D. (2010) Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 13614-13619.

Yip, I., Ma, L., Mattheos, N., dard, M. & Lang N.P. (2015) Defect healing with various bone substitutes. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 606-614.

Zitzmann, NU., Schärer, P., Marinello, CP., Schüpbach, P., Berglundh, T. (2001) Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* **21**:288-295.

Zou, S., Ireland, D., Brooks, R.A., Rushton, N. & Best, S. (2009) The effects of silicate ions on human osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research* **90**: 123–130.

