



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
CARRERA DE MAESTRIA EN IMPLANTOLOGÍA ORAL

TESIS DE MAGISTER

**“INFLUENCIA DE LA SIMVASTATINA EN LA
REGENERACIÓN ÓSEA”**



MAESTRANDO: Od. JOSE LUIS BELTRANO
DIRECTOR: Prof. Dr. CESAR LUCHETTI
CO DIRECTORES: Prof. Dr. MIGUEL AYALA
Od. Mg. ADOLFO BÁEZ

AÑO: 2024

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, **Prof Dr. Cesar Gabriel Luchetti**, por su apoyo durante el desarrollo del trabajo, sus correcciones y sus consejos.

Al **Prof. Dr. Miguel Ayala**, co-director del trabajo, por permitirme trabajar en el bioterio de la facultad de ciencias veterinarias de la UNLP de una manera cómoda, sin presiones y aportando todo lo que estaba a su alcance para llevar adelante el trabajo.

Al **Od. Mg. Adolfo Baez**, co-director del trabajo, por acompañarme en el proceso de aprendizaje en el procedimiento quirúrgico de los animales de laboratorio.

A la **Prof. Dra Alicia Kitrilakis**, por su confianza y apoyo en este trabajo de investigación.

A **Ruben Mario**, por su ayuda en el manejo de las muestras y de los cortes histológicos.

A mi Familia, y en especial a mi papá, Jose Beltrano, quien fue mi guía en la docencia y en la investigación, quien me motivó de chico y no solo eso, sino que me acompañó hasta que llegué a concretarlo. Sin él, nada de esto hubiera sido posible.

INDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCION.....	6
2. MARCO TEORICO.....	8
TEJIDO OSEO: GENERALIDADES:	8
1.1 ORIGEN	8
1.2 CLASIFICACION SEGÚN SU ESTRUCTURA:.....	13
1.3 HISTOLOGIA DEL HUESO:	17
1.4 FISIOLÓGÍA ÓSEA.....	31
1.5 PROCESOS BIOLÓGICOS DE LA REGENERACIÓN ÓSEA:	37
1.6 ACOPLAMIENTO ENTRE OSTEOLASTO Y OSTEOLASTO (SISTEMA RANK-RANKL-OPG) 46	
1.7 BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL.....	49
1.8 SIMVASTATINA	51
3. OBJETIVOS	60
4. HIPOTESIS:.....	60
5. MATERIALES Y METODOS	61
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	61
2. GENERALIDADES.....	61
3. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA (MODELO ANIMAL)	63
4. METODOLOGIA	66
6. RESULTADOS.....	77
7. DISCUSIÓN	77
8. CONCLUSIONES.....	88
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es evaluar la regeneración ósea utilizando una droga de uso común como es la simvastatina, droga utilizada para tratar la hipercolesterolemia, utilizándola en diferentes dosis combinándola con un injerto óseo bovino como vehículo. Se utilizaron 20 ratas macho, de cepa Wistar WKAH/HokLAE, producidas en el Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, libres de patógenos específicos (SPF), de 25 semanas de edad y de aproximadamente 500 gramos de peso. Los animales se dividieron en 4 grupos de 5 cada uno y se realizaron los procedimientos quirúrgicos bajo anestesia inhalatoria de isoflurano. En el fémur izquierdo se les realizó un defecto de 3 mm de ancho por 9 mm de largo por 3 mm de profundidad, siguiendo el modelo desarrollado por nuestro grupo hace más de 20 años. A los animales del grupo 1 se le injerto hueso bovino particulado únicamente, siendo este el grupo control, al grupo 2 se le coloco injerto óseo bovino con una dosis de simvastatina de 0.1 mg, al grupo 3, se le coloco injerto óseo bovino con una dosis de simvastatina de 0.5 mg, y al grupo 4 se le coloco injerto óseo bovino con una dosis de simvastatina de 2.5 mg. Los animales fueron intervenidos en el quirófano del LAE y mantenidos luego de la cirugía en el pabellón de animales de experimentación del Bioterio de la FCV-UNLP durante 30 días controlando los factores del macro y microambiente. A los 30 días los animales se sacrificaron por el método de dióxido de carbono y se tomaron muestras para la realización de los preparados para microscopía. Las muestras se digitalizaron, evaluando así la superficie de hueso regenerado dentro del defecto. La segmentación y el cálculo de superficie se realizó en base al color de la tinción (H.E) y la calibración de la imagen con respecto a una medida patrón, mediante un analizador digital de imágenes. El modelo experimental utilizado funcionó correctamente y no se presentaron mayores inconvenientes en su ejecución. La mayor cantidad de regeneración se obtuvo en el grupo Sim 0.5, seguida por el Sim 0.1, el grupo control y por último el grupo Sim 2,5. La mejor calidad ósea, en cuanto a su patrón arquitectónico, se observó con el grupo Sim 0,5. El grupo Sim 2.5 mg mostro una regeneración deficiente tanto en calidad como cantidad, generando

incluso alteración en la piel de los animales. Dentro de los límites del presente trabajo, podemos concluir que la Simvastatina 0,5 mg combinada con un Injerto Bovino podría tener un efecto positivo en la regeneración ósea.

1. INTRODUCCIÓN

El tema de regeneración ósea es hoy motivo de múltiples investigaciones, ya que de este proceso depende el éxito de la implantología oral. No hay dudas que los implantes se oseointegran, ni que la regeneración ósea es posible, pero uno de los temas más buscados dentro de la Implantología oral, es la búsqueda de procedimientos que acorten y mejoren los plazos de regeneración ósea.

Desde la difusión de los implantes dentales, los odontólogos se han encontrado ante circunstancias en las que se vieron obligados a colocar los implantes en zonas donde la calidad, la cantidad y la topografía del sustrato óseo eran claramente desfavorables. Se han propuesto varias estrategias de regeneración ósea con el fin de preservar el proceso alveolar después de la extracción dental o para aumentar el soporte óseo para implantes dentales.

Urist et al. informaron la identificación de una proteína insoluble de bajo peso molecular llamada proteína morfogenética ósea [BMP], capaz de inducir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se la considera osteoinductiva. Actualmente es considerada el factor más potente en la diferenciación osteoblástica.¹

En la búsqueda de alternativas a la obtención de esta proteína de manera exógena mediante ingeniería genética, algunos autores han sugerido el uso tópico de fármacos dirigidos a la inducción de factores de crecimiento óseo intrínseco. Recientemente se ha demostrado que algunos fármacos ampliamente conocidos, tales como las estatinas (Simvastatina), pueden regular el crecimiento óseo a través de vías bioquímicas distintas y complejas.²

Las estatinas son utilizadas para el tratamiento de la hipercolesterolemia y para la enfermedad arterial coronaria. Su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima que sintetiza el colesterol, la HMG-CoA reductasa.^{3, 4, 5} Adicionalmente a sus efectos hipolipemiantes, la Simvastatina puede generar algunos efectos pleiotrópicos, que conducen a la modulación del proceso de regeneración ósea a nivel molecular y celular.^{6,7} La Simvastatina parece jugar un importante papel en la regeneración ósea mediante la participación directa en la activación de los osteoblastos, aumentando la expresión de proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) y en la inhibición de los osteoclastos, e indirectamente, por estimulación neovascular debido al aumento de la secreción de Factor de Crecimiento

Endotelial Vascular.⁸ Sin embargo, existe controversia en el potencial de las estatinas en la regeneración ósea, ya que a ciertas dosis puede provocar inflamación local sin efectos visibles en cuanto a mejora de formación de hueso.⁷ El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la influencia de la Simvastatina en la regeneración ósea, aplicada localmente en defectos óseos labrados en el fémur de ratas de laboratorio, teniendo como testigos ratas no tratadas con la droga.

2. MARCO TEÓRICO

En este punto se detallan las bases que dan sustento y facilitan la comprensión del presente trabajo. Se analizan el tejido óseo, tanto su composición como su histología y su fisiología, la simvastatina y el modelo animal utilizado.

TEJIDO OSEO: GENERALIDADES:

El cuerpo humano de un individuo adulto tiene 206 huesos, mientras que el de un recién nacido está formado por cerca de 300, ya que algunos huesos se fusionan durante la etapa de crecimiento.

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo denso. Los componentes extracelulares sufren calcificación, lo que les confiere dureza. Proporciona al esqueleto la fortaleza necesaria para cumplir su principal función, la de ser **órgano de sostén**, dado que actúa como sitio de inserción de los músculos y, a la vez, brinda cierta rigidez al organismo para protegerlo de la fuerza de la gravedad. El esqueleto también tiene importantes funciones protectoras al rodear con una coraza el cerebro, la medula espinal y parte de los órganos del tórax y el abdomen. La segunda función importante del tejido óseo es representar un notable eslabón en la **homeostasia del calcio**, dado que los huesos del esqueleto contienen más del 99% del calcio del organismo.⁹

El tejido óseo sufre un remodelado de un 10 % aproximadamente al año, lo que permite mantener las funciones normales, ya que hace posible reparar microlesiones de fatiga (microfracturas), cuya acumulación comprometería la resistencia del hueso.¹⁰

1.1 ORIGEN

Según su origen, puede dividirse en intramembranoso o endocondral.

La osificación intramembranosa es cuando el hueso se forma directamente en el interior del tejido conjuntivo, y la osificación endocondral, cuando el hueso se desarrolla a partir de un modelo cartilaginoso.

1) OSIFICACIÓN INTRAMEMBRANOSA

Algunos huesos planos del cráneo, como el frontal, parietal, occipital, y el temporal, el maxilar superior y casi toda la mandíbula (excepto los cóndilos), se forman por osificación intramembranosa y se denominan huesos membranosos. En este tipo de osificación, el mesénquima se condensa formando una capa de tejido conjuntivo ricamente vascularizado.

Células mesenquimáticas diferenciadas, productoras de tejido óseo se agrupan alrededor de los capilares; mientras que los espacios intercelulares son ocupados por delicados haces de fibras colágenas orientadas al azar. Estas células aumentan de volumen y asumen forma cúbica o cilíndrica. En este proceso se tornan intensamente basófilas y el núcleo se coloca hacia el mesénquima circundante, asumiendo una polarización que permite identificarlas como osteoblastos. Estas producen moléculas de tropocolágeno que, disponiéndose en la parte externa de las células, forman el componente fibrilar de la matriz. En la recién formada matriz pre-ósea, llamada **osteoides**, aparecen los primeros cristales de calcio que producen la mineralización del hueso. La segunda aposición lleva a la formación de trabéculas óseas calcificadas, que se disponen formando mallas entretejidas y ramificadas entre los vasos sanguíneos.

Las trabéculas primitivas son progresivamente engrosadas a expensas del tejido conjuntivo interpuesto. En aquellas regiones en donde el hueso está destinado a permanecer esponjoso, las trabéculas cesan de engrosarse y el conjuntivo vascularizado, interpuesto entre las mismas, se transforma gradualmente en tejido hematopoyético (médula ósea). Por otra parte, el conjuntivo que rodea externamente al segmento esquelético se condensa para conformar el periostio.^{11, 12} (Fig. 1)



Fig. 1: Osificación intramembranosa: los osteoblastos sintetizan rápidamente el osteoide, que posterior será reemplazado por hueso laminar

2) OSIFICACION ENDOCONDRALE

Los huesos de la base del cráneo, de la columna vertebral, pelvis y extremidades son denominados huesos de sustitución, puesto que en una primera etapa están constituidos por cartílagos hialinos y posteriormente son sustituidos por tejido óseo, gracias a un proceso denominado osificación endocondral. Los segmentos esqueléticos donde se puede apreciar mejor este proceso, están representados por los huesos largos de las extremidades.

Inicialmente se desarrolla un modelo cartilaginoso que adopta una forma parecida a la del hueso en formación.

Los condrocitos sufren notables modificaciones lo cual constituye el primer signo tangible de la aparición del centro de osificación primario. Los condrocitos situados en la parte central de la diáfisis del esbozo cartilaginoso se tornan hipertróficos y asumen un aspecto muy vacuolizado. La matriz hialina que rodea a los condrocitos hipertróficos se calcifica cuando en el plasma sanguíneo y en el líquido intersticial del tejido está presente una adecuada concentración de calcio y fósforo y se depositan pequeñas cantidades de cristales de fosfato de calcio.

En forma paralela, existe una activación de la potencialidad osteogénica de las células mesenquimáticas del conjuntivo pericondral que, transformándose en osteoblastos, depositan alrededor de la parte central de la diáfisis, una delgada capa de tejido óseo, denominado mango o collar periostico.

Del tejido conjuntivo perióstico que rodea este collar óseo se producen aperturas en el mango que permiten a los vasos sanguíneos en crecimiento penetrar en la diáfisis, a través de una actividad macrofágica, que se extiende después al interior de la matriz cartilaginosa calcificada, hasta transformar el interior del esbozo esquelético en una cavidad. Luego, células mesenquimáticas indiferenciadas son transportadas al interior del cartílago, muchas de las cuales se diferencian en elementos hematopoyéticos de la médula, y otras, en contacto con el cartílago calcificado se transforman en osteoblastos. Estas células se unen para formar una capa alrededor de la superficie de las espículas de matriz cartilaginosa calcificada y se depositan sobre ella la matriz ósea. Por lo tanto, las primeras trabéculas que se forman en los centros de osificación endocondral están constituidas por una parte central de cartílago calcificado, revestido por una capa de hueso de espesor variable.^{11, 13} (Fig. 2)

En los cortes histológicos donde se estudia el proceso de calcificación por esta vía, Se pueden diferenciar seis fases en la placa epifisario que muestran la transición del cartílago a hueso.

-Zona de reserva (R): formada por cartílago hialino con condrocitos en grupos isogénicos rodeados de bastante matriz.

-Zona de proliferación o seriada (P): en esta zona, los condrocitos se dividen de manera axial o seriada formando columnas, separadas por abundante matriz rica en proteoglicanos.

-Zona de maduración (M): en esta zona cesa la división celular, y los condrocitos aumentan de tamaño.

-Zona de hipertrofia (H): los condrocitos aumentan considerablemente de tamaño y se vacuolizan, y la matriz comienza a calcificarse.

-Zona de degeneración (D): los condrocitos degeneran y las lagunas de la matriz calcificada son invadidas por células osteogénicas procedentes de la diáfisis.

-Zona osteogénica (O): las células osteogénicas se diferencian en osteoblastos que se agregan en la superficie de las espículas del cartílago calcificado donde comienzan a formar hueso. (Fig. 3)

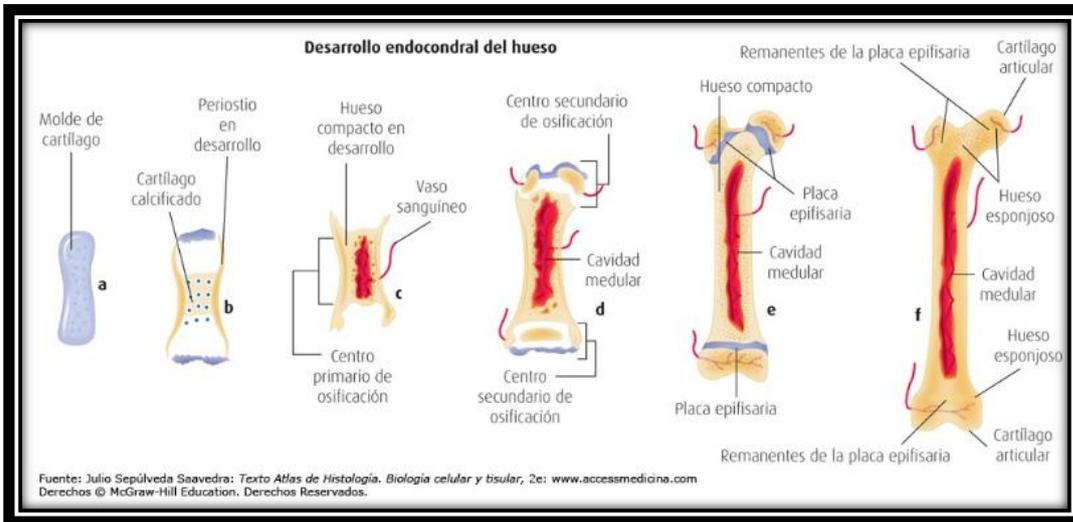


Fig. 2. Desarrollo endocondral del hueso. <https://100cia.site/index.php/biologia/item/17067-porque-los-bebes-tienen-mas-huesos-que-los-adultos>)

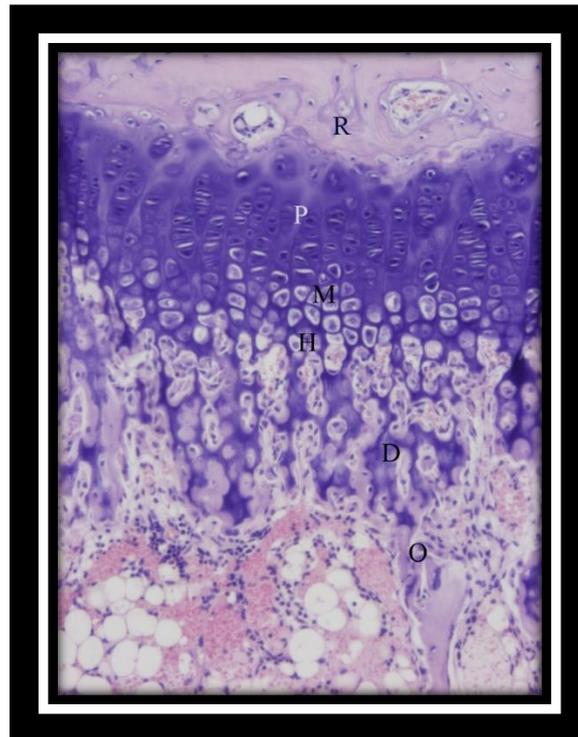


Fig. 3. Corte histológico de osificación endocondral donde se pueden diferenciar las 6 fases de transición de cartílago a hueso. R: Reserva, P: Proliferativa, M: Maduración, H: Hipertrofia, D: Degeneración, O: Osteogénica

1.2 CLASIFICACION SEGÚN SU ESTRUCTURA:

A- tejido óseo cortical

B- tejido óseo esponjoso

Observamos dos porciones, un hueso cortical, más compacto, ubicado en la parte exterior, y un hueso esponjoso, más poroso, en la parte central. Estos representan el 80 % y el 20 % de la masa ósea respectivamente. Sin embargo, la superficie total del hueso, considerando tanto las periostales como las endostales, es mayor en el esponjoso que en el compacto, en una relación de 4 a 1. La proporción entre uno y otro tipo determina diferencias mecánicas y metabólicas. Los huesos con mayor proporción de tejido compacto presentan una mayor resistencia mecánica, y un menor compromiso metabólico. De manera opuesta, los huesos con mayor proporción de tejido esponjoso tienen menor resistencia mecánica y mayor compromiso metabólico.¹⁴(Fig. 4)

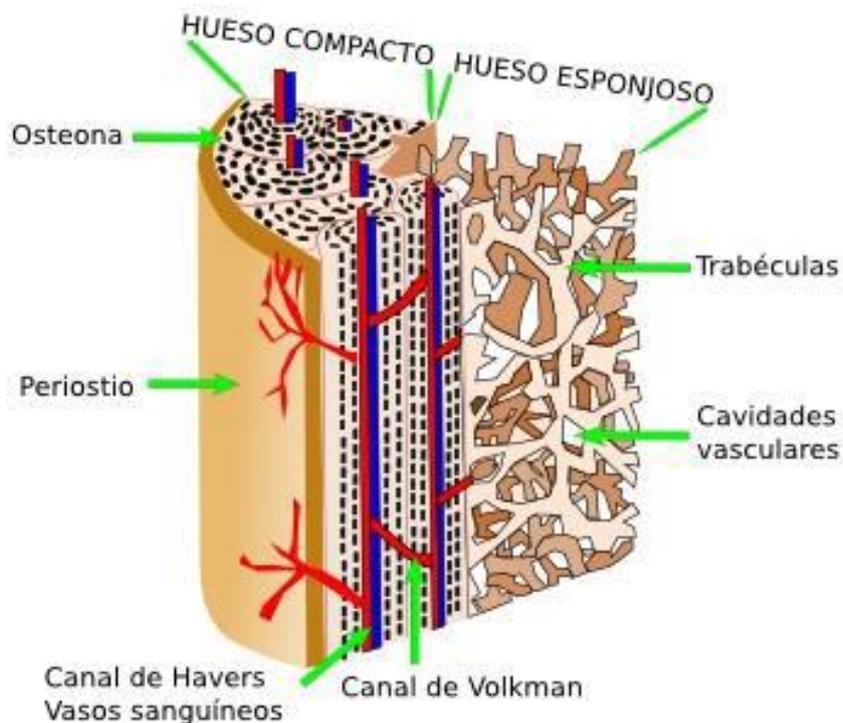


Fig. 4. Esquema hueso trabecular y cortical. Atlas de histología vegetal y animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

TEJIDO OSEO COMPACTO:

Forma parte de la capa externa de todos los huesos del esqueleto y la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos.

Está constituido por una unidad básica llamada **osteona (sistema de Havers)**, la cual está formada por:

- Laminillas, anillos concéntricos de matriz compuesto por sales minerales, que proporcionan al hueso dureza, y fibras colágenas que le confieren resistencia.
- Lagunas o pequeños espacios entre las laminillas que contienen a las células Oseas maduras llamadas **osteocitos**.
- Canaliculos que se proyectan desde las lagunas y proporcionan numerosas vías por las que los elementos nutritivos pueden alcanzar a los osteocitos y a su vez eliminar los residuos de la actividad celular.
- Un canal central llamado **canal de Havers**, que contiene los vasos sanguíneos, linfáticos y nerviosos. A su vez los canales haversianos están conectados entre si por otros canales llamados **canales de Volkmann**.

Las áreas comprendidas entre las osteonas contienen laminillas intersticiales. Estas son fragmentos de osteonas antiguas que han sido parcialmente destruidas durante el proceso de sustitución ósea.

La forma en que se orientan los sistemas de Havers en cada zona del hueso compacto guarda estricta relación con los requerimientos mecánicos a que el hueso está sometido. Si cambian los requerimientos mecánicos se produce su reabsorción parcial o total y la formación de nuevos sistemas de Havers, proceso conocido como remodelación interna del hueso compacto o Haversiano.¹⁵ (Fig. 5)

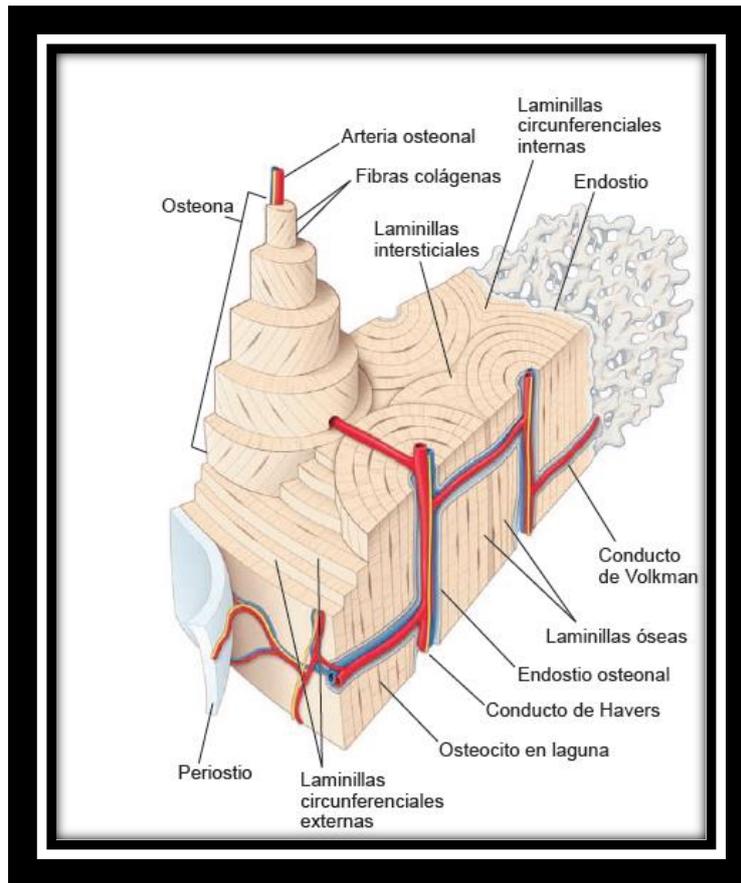


Fig. 5. Diagrama de un bloque de hueso compacto extraído de la diáfisis de un hueso largo. Las laminillas concéntricas y el conducto de Havers que ellas rodean, constituyen la osteona (o el sistema de Havers). Uno de los sistemas de Havers de este diagrama se ha dibujado como una estructura cilíndrica alargada y escalonada que sobresale del plano superior del bloque. Concurren a su formación varias laminillas concéntricas que se han eliminado parcialmente para mostrar la orientación perpendicular de las fibras colágenas en las laminillas contiguas. Entre los sistemas de Havers hay laminillas intersticiales, que son restos de sistemas similares más antiguos que aparecen como consecuencia del remodelado óseo. En las superficies interna y externa del hueso compacto de este diagrama, se ven laminillas adicionales (las laminillas circunferenciales internas y externas) que se distribuyen en capas gruesas. La laminilla circunferencial más interna está cubierta por una fina capa de endostio que se encuentra en contacto con la cavidad medular, mientras que la superficie externa del hueso tiene un revestimiento de periostio. En el interior de los conductos de Havers y Volkman se han dibujado ramas de las arterias nutricias acompañadas de venas pequeñas. Estas arterias y vasos también irrigan el periostio y el endostio.¹⁵

HUESO ESPONJOSO:

Al contrario del hueso compacto, el esponjoso no contiene verdaderas osteonas. Está formado por laminillas dispuestas irregularmente de finas placas de hueso llamadas **trabéculas**. Los espacios entre las trabéculas de algunos huesos están ocupados por **medula ósea roja** productora de células sanguíneas. En el interior de las trabéculas existen osteocitos, situados en lagunas de las que parten

conductillos radiales. Los osteocitos de las trabéculas reciben su nutrición directamente de la sangre que circula de las cavidades medulares.

La orientación de cada trabécula y la disposición de sus laminillas óseas mineralizadas está determinada por las tensiones mecánicas locales con el objeto de resistir las compresiones y las tensiones a que es sometida. Si cambia la dirección de los requerimientos mecánicos a que es sometida una trabécula (aumento de peso del individuo, crecimiento u otro) ella debe cambiar su orientación. El cambio en la forma de una trabécula se realiza mediante dos procesos coordinados que ocurren en zonas precisas de la trabécula a remodelar: crecimiento por aposición de la trabécula por acción de los osteoblastos los que depositan laminillas sucesivas de tejido óseo en la zona en que existe una requerimiento mecánico, y remoción del tejido óseo de la trabécula por acción de los osteoclastos en los sitios en que no está sometido a tracción ni compresión.¹⁶ (Fig 6)

Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral.

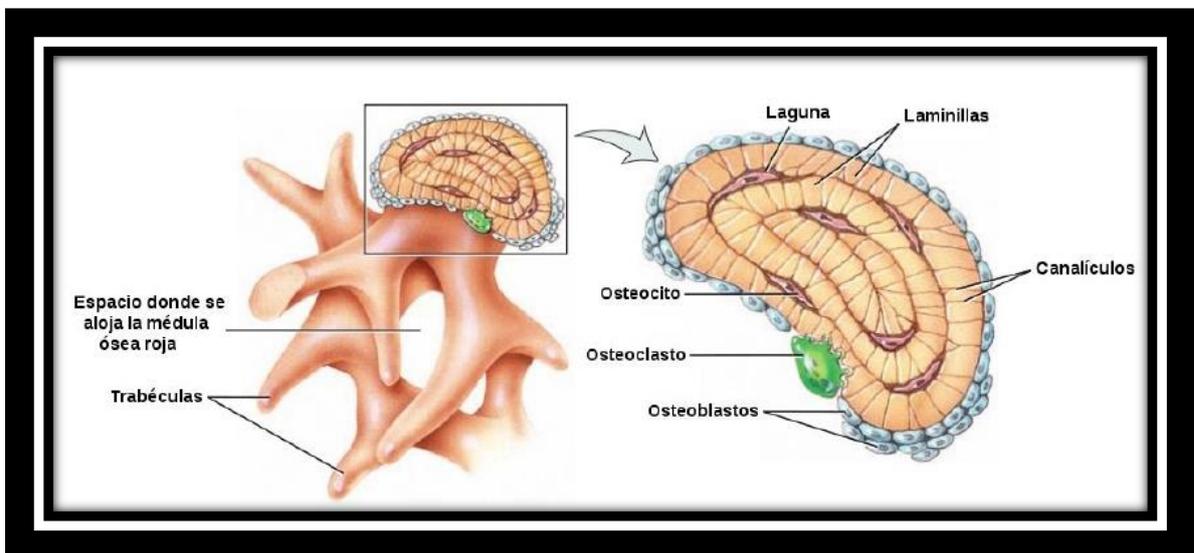


Fig. 6. Esquema de hueso trabecular: se puede observar la disposición de las laminillas y canaliculos en las trabéculas. (Tortora G y Derrickson B., 2009)

1.3 HISTOLOGIA DEL HUESO:

La histología ósea está integrada por una matriz extracelular y cuatro tipos de células: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células de revestimiento (bone lining cells)

El tejido óseo contiene una abundante matriz que rodea a las células ampliamente separadas unas de otras. La **matriz extracelular** es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso y se encuentra mineralizada. Está formada aproximadamente por un 20 % de agua, un 50 % de sales minerales y un 30 % de matriz orgánica. Dicha matriz orgánica o **sustancia osteoide** está compuesta principalmente por proteínas entre las que se destaca el colágeno tipo I (un 90 % de las proteínas totales). La fase mineral está formada por calcio, fosfato y carbonato en forma de cristales de hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) entre las fibras de colágeno. En menor proporción también se encuentran el magnesio, sodio, potasio, manganeso y fluor.

Las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión. ⁹

1. Células óseas

Son 4 los tipos de células que podemos indentificar en el tejido óseo. (Fig. 7)

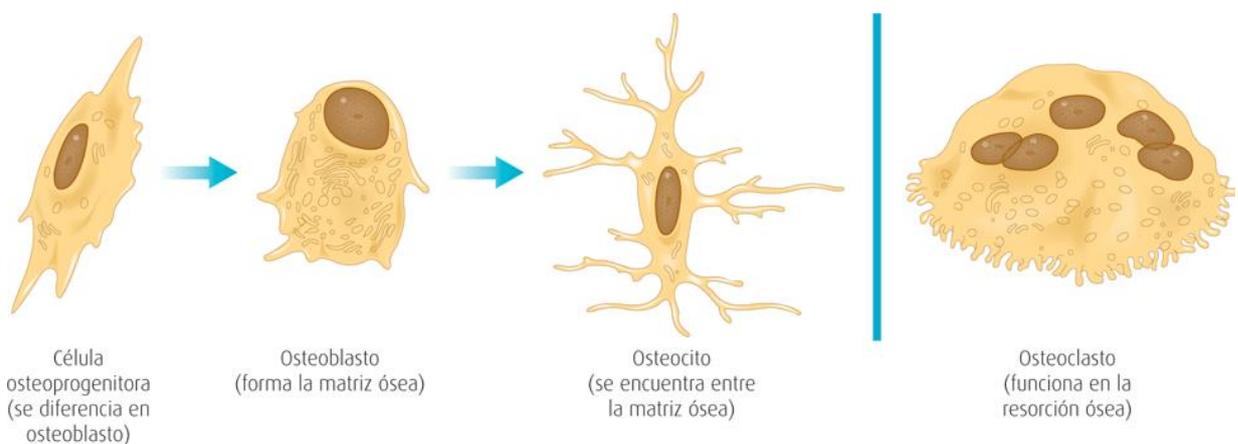


Fig. 7. Células del tejido óseo. Julio Sepúlveda Saavedra: Texto atlas de histología, biología celular y tisular

1.a-Celulas osteoprogenitoras:

Las células osteoprogenitoras derivan de la diferenciación de células progenitoras de médula ósea. Se encuentran en la porción más interna del periostio, en el endostio y en los canales del hueso que contiene los vasos sanguíneos. Durante la formación de hueso, las células osteoprogenitoras se dividen y desarrollan a células formadoras de hueso u osteoblastos. (Fig.7)

Diferenciación osteoblástica.

a) genética y factores de crecimiento: actualmente se sabe que la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia hedgehog, de los cuales los más conocidos son: ihh (indian hedgehog) y shh (sonic hedgehog)^{17, 18}. También es esencial el factor de transcripción cbfa1 (core-binding factor a-1, también llamado runx2)^{19, 20, 15} y las proteínas morfogenéticas óseas (bmps), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales pluripotenciales.¹⁸

b) marcadores de diferenciación: a medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. la expresión de cbfa1 es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica ¹⁸, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos. El colágeno I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente, la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica.²¹

1.b.- El osteoblasto.

Los osteoblastos son las células formadoras de hueso que se originan a partir de células osteoprogenitoras por diferenciación a pre-osteoblastos y luego a osteoblastos maduros. Son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante.⁹ (Fig. 7)

Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina 43.²²

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente, se sabe que:

- 1.- Sintetizan y secretan el osteoide o matriz ósea orgánica (fibras de colágeno, proteoglucanos, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína ósea, osteopontina),
- 2.- dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular
- 3.- contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina. Esta enzima favorece la deposición de fosfato de calcio, siendo su actividad uno de los primeros marcadores del fenotipo
- 4.- secreción de citoquinas y factores de crecimiento que regulan tanto el reclutamiento como la diferenciación de osteoclastos, células que degradan hueso. Entre ellos se encuentran el Ligando para el Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa (RANK-L), interleuquinas, TNF- α , factor estimulante de colonias monocito-macrófago (M-CSF) y osteoprotegerina (OPG).⁹

La osteoblastogénesis es inducida por factores sistémicos, como PTH, insulina, estrógenos, hormona de crecimiento, y locales que pueden ser sintetizados y secretados por los propios osteoblastos (factor de crecimiento transformante (TGF- β), proteínas séricas morfogénicas (BMPs), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento insulino-símil (IGF-1). Alcanzada la finalización del proceso de formación ósea, los osteoblastos pueden tener tres destinos: incorporarse en su propio osteoide y continuar la diferenciación hacia osteocito (célula ósea madura); transformarse en células de muy baja actividad (células de revestimiento óseo) o continuar hacia el proceso de apoptosis.^{9, 15}

Las **células de revestimiento** son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblasticos como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, y fosfatasa alcalina así como el receptor de parathormona (PTH) y permanecer a lo largo de la superficie endóstia, constituyendo en el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo.^{9, 23}

1.c- El osteocito.

Una vez que el osteoblasto se rodea completamente de osteoide, pasa a ser un *osteocito*, representando así el 90% de las células óseas en el esqueleto adulto.

Los osteocitos son las células más abundantes del hueso. Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado **mecanotransducción**.²⁴ (Fig. 7)

La carga mecánica produciría un flujo de líquido intersticial entre la pared del canalículo y la membrana del osteocito produciendo un esfuerzo de corte tangencial (*shear stress*) que deformaría el cuerpo de la célula en la laguna y las prolongaciones en los canalículos. Estas cargas/descargas *in vivo* producen variaciones en la expresión génica de los osteocitos. Ante la presencia de carga mecánica normal sobre el esqueleto, los osteocitos envían señales que inhiben a los osteoclastos como prostaglandina E2, óxido nítrico, IGF, ATP y aumento del Ca⁺² intracelular, activándose la vía de la β -catenina. Cuando esta carga no está presente, como en la inmovilización, se activa la resorción ósea: M-CSF y RANKL estimulan la formación de osteoclastos, mientras que se inhiben a los osteoblastos mediante la secreción de esclerostina, que a su vez también induce la formación de osteoclastos por aumento de los niveles de RANKL y disminución de osteoprotegerina.^{25, 26}

Los osteocitos tienen la capacidad de modificar su matriz pericelular mediante un proceso denominado **osteólisis osteocítica**. Estas células son capaces de degradar la matriz ósea en la cercanías a la célula. Esto lleva a la reabsorción del mineral óseo, por lo que los osteocitos desempeñan un papel importante en la homeostasia del calcio, puesto que la osteolisis es estimulada por la hormona paratiroidea e inhibida por la calcitonina.⁹

Los osteocitos pueden morir por senescencia, degeneración/necrosis, apoptosis o pueden ser fagocitados por osteoclastos. La apoptosis puede inducirse por inmovilización, micro-daño, falta de estrógenos o por el aumento de TNF- α . Este daño en los osteocitos genera un aumento en los niveles de RANKL y M-CSF, con la consecuente activación de la actividad osteoclástica.²⁷

Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes.²⁴

1.d.- El osteoclasto.

El **osteoclasto** es una célula multinucleada, móvil y gigante (100 μ m) que degrada, reabsorbe y remodela huesos. Al igual que el osteoblasto, está

implicado en la remodelación de hueso natural. Deriva de células hematológicas. Los osteoclastos, células responsables de la resorción de la matriz ósea, son células acidófilas y polinucleadas de gran tamaño. Ocupan una cavidad llamada laguna de resorción o **laguna de Howship** y se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea, por medio de integrinas ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$).²⁴ (Fig. 7)

Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas "Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos" (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos.

Los osteoclastos se caracterizan por poseer una porción de su membrana "arrugada", en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos llamada "zona clara", con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas, unos receptores especializados del hueso. El proceso de resorción se inicia al excretar lisosomas con enzimas capaces de producir un microambiente ácido por debajo de la membrana arrugada como consecuencia del transporte de protones mediante la bomba de protones ATP-dependiente, el intercambio Na^+/H^+ y la anhidrasa carbónica. Las enzimas lisosomales de los osteoclastos implicadas en este proceso son cistein-proteasas como la catepsina y sobre todo, la fosfatasa ácida tartrato-resistente (FATR) (esta última se utiliza como marcador del fenotipo osteoclástico). Las enzimas lisosomales solo son liberadas en la zona clara en las proximidades del borde arrugado produciéndose en esta área las reacciones de degradación de la matriz que deben producirse antes de que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso.

Se demostró en los estudios experimentales de Lucht y Maunsbach, que la aplicación de hormona paratiroidea implica el aumento de la producción y el transporte de lisosomas hacia el borde fruncido. Por el contrario, la aplicación de calcitonina es capaz de producir la eliminación del borde fruncido y la desaparición de las enzimas lisosómicas. El osteoclasto posee receptores para la calcitonina.⁹

Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), ésta se identifica en el "borde ondulado" del osteoclasto activo y en la región de la matriz

que le rodea durante la reabsorción ósea. La estimulación de la reabsorción ósea por parthormona o calcitriol va asociada a la aparición de FATR in vitro. Esta enzima se encuentra elevada en gran variedad de situación que cursan con remodelado óseo incrementado: pacientes inmovilizados, mieloma, cánceres metastásicos (de mama y próstata) enfermedad de paget, pacientes postmenopausicas y la tuberculosis pulmonar activa. Además, la FATR guarda buena correlación con la hidroxiprolinuria en procesos con remodelado óseo avanzado. La hidroxiprolina urinaria procede del catabolismo del colágeno y sus niveles se han utilizado como marcadores de reabsorción ósea en procesos como enfermedad de paget, osteoporosis, tumores con metástasis óseas e hiperparatiroidismo primario.²⁸

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente $\alpha\beta3$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, y glucuronidasa, entre otras, que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después.²⁴ (Fig. 8)

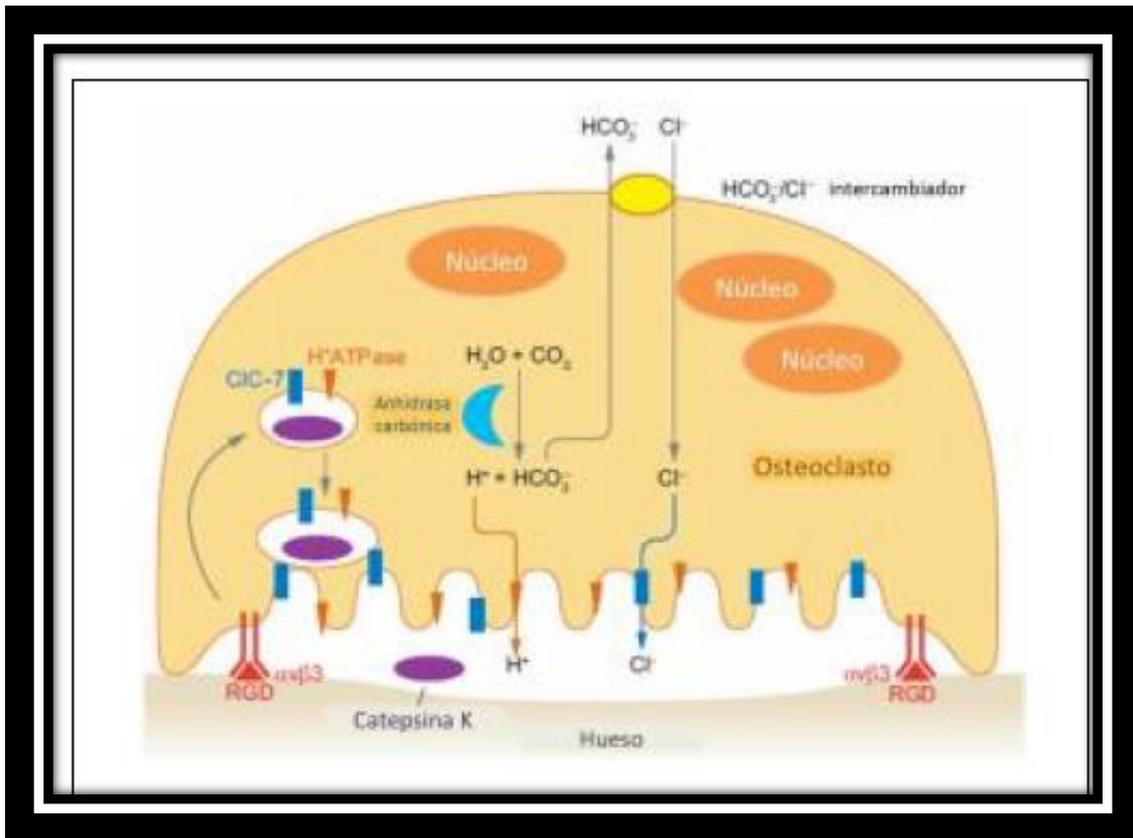


Fig. 8. Esquema de un osteoclasto en su laguna de resorción. Novack y teitelbaum, 2008

Para que se lleve a cabo la formación de osteoclastos, hay dos citoquinas críticas: el Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κ B (**RANKL**) que se expresa en la membrana plasmática de osteoblastos y células estromales e interactúa con RANK (receptor activador del factor nuclear κ B), expresado en la membrana de precursores osteoclasticos. El RANKL es miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y es crítico para la formación de osteoclastos^{15, 29}; la segunda citoquina necesaria para este proceso es el factor estimulante de colonias monocíticas-macrofágicas (**M-CSF**), que también se expresa en la membrana de osteoblastos/células estromales y promueve la proliferación, supervivencia y diferenciación de los precursores osteoclasticos. Este se une a un receptor de membrana expresado en los pre-osteoclastos, denominado **c-Fms**, con actividad tirosinquinasa^{29, 30}. Por lo tanto, para que se produzca la osteoclastogénesis, es necesario el contacto directo de estos dos factores entre osteoblastos y los pre-osteoclastos mediante moléculas de membrana.³¹ (Fig. 9)

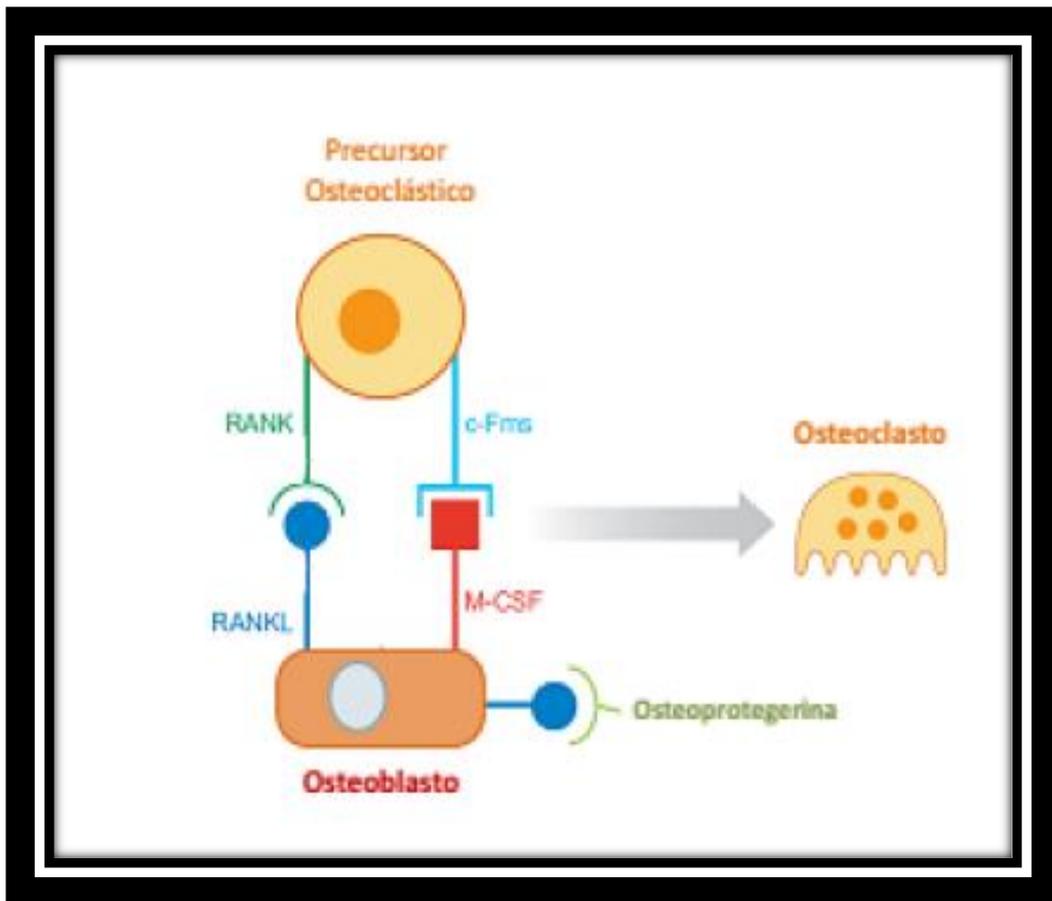


Fig. 9: Diferenciación osteoclástica: los osteoblastos expresan factores indispensables para la activación de osteoclastos (RANKL y M-CSF) (Novack y Teitelbaum, 2008).

El $\text{TNF-}\alpha$, elevado en situaciones inflamatorias, es capaz de actuar sinérgicamente con el RANKL y estimular la osteoclastogénesis.³⁰

La osteoprotegerina (OPG) es una proteína soluble secretada por los osteoblastos, que se une a RANKL con gran afinidad para inhibir su acción sobre RANK, limitando la formación de osteoclastos. Las concentraciones relativas de RANKL y OPG determinan la proliferación y diferenciación de los precursores osteoclásticos, y, por lo tanto, la masa ósea. Su producción está influenciada por varios factores, como PTH, estrógenos, interleuquina-1, prostaglandina E2, TNF, TGF- β , vitamina D. Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis.¹⁵ (Fig. 10)

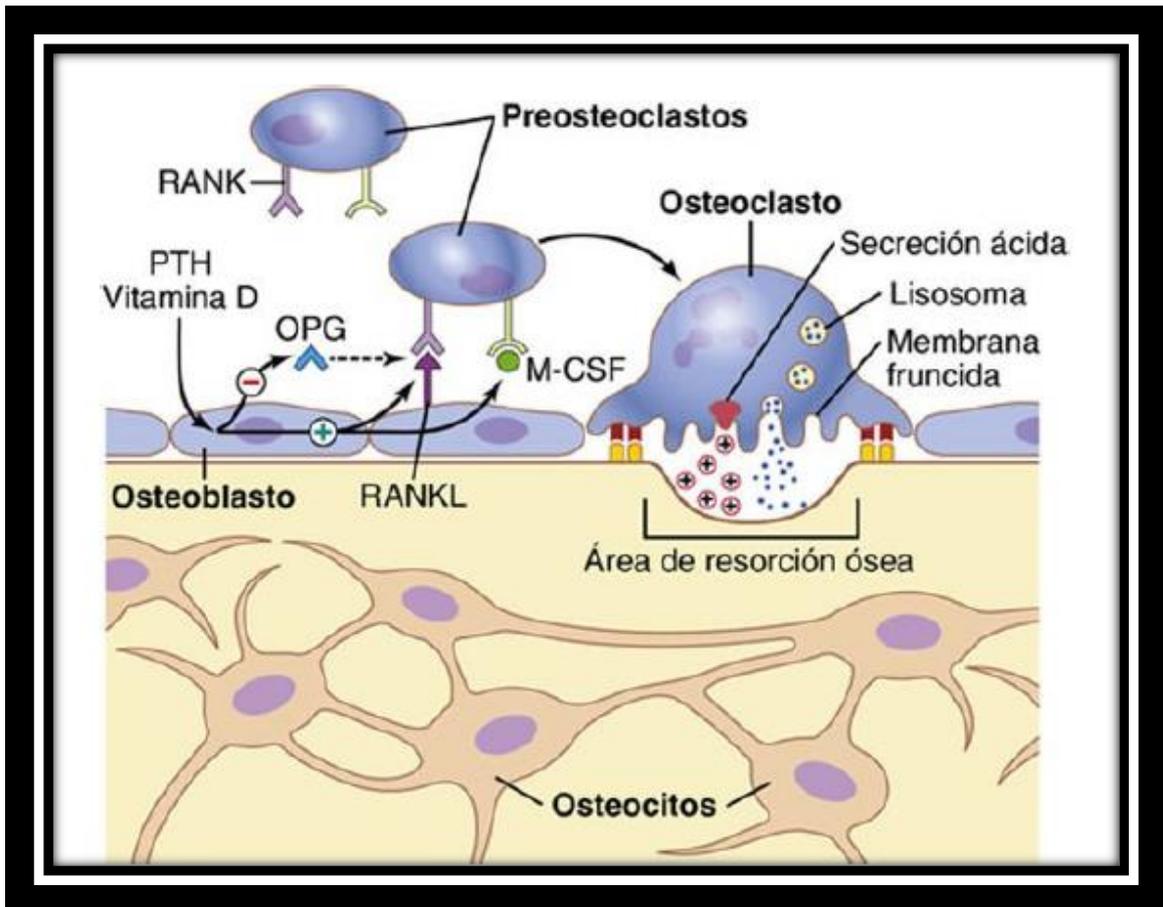


Fig. 10. Resorción ósea por los osteoclastos. La hormona paratiroidea (*PTH*) se une a los receptores en los osteoblastos para formar el activador de receptor para el ligando B del factor nuclear κ (*RANKL*) y liberar el factor estimulador de colonias de macrófagos (*M-CSF*). El *RANKL* se une a *RANK* y el *M-CSF* se une a sus receptores en las células preosteoclastas, lo que provoca la diferenciación en osteoclastos maduros. La *PTH* reduce también la producción de osteoprotegerina (*OPG*), que inhibe la diferenciación de preosteoclastos en osteoclastos maduros mediante la unión a *RANKL* y evita que interactúe con su receptor en preosteoclastos. Los osteoclastos maduros desarrollan un borde fruncido y liberan enzimas de los lisosomas, así como ácidos que promueven la resorción ósea. Los osteocitos son osteoblastos que se han encajado en la matriz ósea durante la producción de tejido óseo; los osteocitos forman un sistema de células interconectadas que se extienden por todo el hueso.

2. Matriz Ósea

La matriz ósea extracelular está compuesta por una matriz orgánica y sales inorgánicas.

La matriz orgánica constituye el 40% del peso en seco del hueso y está formada por fibras de colágeno tipo I en un 90%, proteoglucanos, fosfoproteínas, fosfolípidos y glicoproteínas; mientras que los componentes inorgánicos representan un 60% del peso en seco del hueso y están compuestos en su mayor parte por depósitos de fosfato de calcio cristalino (y una pequeña parte de

fosfato de calcio amorfo), casi idénticos a los del mineral hidroxiapatita, con fórmula general $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. La dureza y la resistencia del tejido a la compresión se deben al contenido de sales inorgánicas, mientras que sus propiedades elásticas y de resistencia a la tracción dependen del colágeno.¹⁵

2.a) La matriz orgánica:

Está compuesta por fibras de colágeno y proteínas no colágenas incluidas en una sustancia fundamental que contiene principalmente proteoglicanos. En los adultos el colágeno representa un 90 % de la matriz orgánica, por lo que la matriz ósea generalmente es acidófila. (Fig. 11)

COLÁGENO	Tipo I, III, V, XII	
PROTEOGLICANOS	condroitin sulfato	decorina
	biglicano	hialuronano
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ-CARBOXI-GLUTÁMICO	osteocalcina	
	proteína de la matriz con ácido γ -carboxi-glutámico	
GLICOPROTEÍNAS	osteonectina / fosfatasa alcalina /	
	fibronectina / osteopontina /	
	vitronectina / sialoproteínas óseas	
PROTEÍNAS DEL PLASMA	albúmina	α 2-SH-glicoproteína
FACTORES DE CRECIMIENTO	IGF-I y II (Insulin growth factor I y II)	
	TGF- β (transforming growth factor-beta)	
	PDGF (Platelet derived growth factor)	

Fig. 11. Proteínas de la sustancia osteoide (Fernandez-Tresguerres Hernandez- Gil et al. 2006)

A) Proteínas colágenas:

El 90% de la matriz extracelular (MEC) está constituida por colágeno, sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas. Contiene característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo, este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y estando sus valores de excreción

urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.²⁴ La piridinolina (ICTP) es una molécula de degradación de colágeno que luego de la reabsorción de hueso y la degradación de la matriz colágena es liberada a la circulación y no puede pasar a vías anabólicas y ser reutilizada durante la síntesis de colágeno, por lo cual podría considerarse un biomarcador específico de reabsorción ósea.³²

B) Proteínas no colágenas: Entre ellas destacan:

B.1.- Proteoglicanos: Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos: Hialuronano y Condroitín-sulfato: de molécula grande, intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Biglicano y decorina: de molécula más pequeña, aparecen en las fases siguientes de la formación ósea. Contribuyen a que el hueso ofrezca resistencia a la compresión. También son responsables de la fijación de factores de crecimiento y pueden inhibir la mineralización.^{15, 24}

B.2.- Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico: Son la osteocalcina (OCN) y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis.

- La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.

B.3.- Glicoproteínas: Son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp).

- La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Sirve como adhesivo entre el colágeno y los cristales hidroxiapatita. En el hueso es necesaria para la mineralización normal.
- La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Existen varias isoenzimas y, entre ellas la ósea, se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica.
- Proteínas con el tripéptido RGD, también llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, con una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ($\alpha v\beta 3$, entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.

B.4.-. Proteínas procedentes del plasma: Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la $\alpha 2$ -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

B.5.-. Factores de Crecimiento y citoquinas: Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina. se encuentran los factores de crecimiento insulino (IGF), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor transformante de crecimiento β (TGF- β), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), la esclerostina (antagonista de BMP) y las interleuquinas (IL-1, IL-6).^{15, 24}

2.B) Fase mineral

Finalmente, el componente mineral del hueso representa el 60% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben.²⁴

Mineralización de la matriz ósea

Se denomina *mineralización* al proceso por el cual se produce la deposición de minerales en la matriz extracelular orgánica del cartílago y tejido óseo. La matriz no mineralizada se denomina *osteóide*. Este proceso es regulado por los osteoblastos y comienza unos 20 días después de que los osteoblastos formaron la matriz ósea orgánica.⁹

El mecanismo exacto de mineralización aún no se conoce, pero inicialmente el mineral sería depositado en “huecos” en los extremos de las fibras de colágeno. Para que se produzca este proceso, la concentración local de iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} en la matriz debe superar su Kps o producto de solubilidad; con este fin, la osteocalcina y otras sialoproteínas fijan Ca^{+2} , aumentando así la concentración local de este ion, lo que estimula a los osteoblastos a secretar fosfatasa alcalina. La función de esta enzima es liberar iones PO_4^{-3} , que causan un aumento local de pH hasta niveles básicos, lo cual disminuye el Kps para el fosfato de calcio favoreciendo su depósito en forma de cristales. En esta etapa de concentraciones extracelulares altas de Ca^{+2} y PO_4^{-3} , los osteoblastos liberan pequeñas vesículas matriciales hacia la matriz ósea que contienen fosfatasa alcalina y pirofosfatasa que escinden iones PO_4^{-3} de otras moléculas de la matriz; luego se produce la cristalización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en las vesículas matriciales circundantes. Los cristales de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ inician la mineralización de la matriz por formación y depósito de cristales de hidroxiapatita $\{\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\}$ en la matriz que rodea a los osteoblastos. Una vez que han precipitado los primeros

cristales de hidroxiapatita, éstos crecen con rapidez hasta que se unen con los cristales vecinos producidos alrededor de otras vesículas.

En el tejido óseo recién formado se deposita alrededor del 80% del total del mineral al cabo de 3-4 días, lo que se denomina mineralización primaria. La mineralización completa tiene lugar en la mineralización secundaria, luego de 3-4 meses durante los cuales los cristales de hidroxiapatita crecen en tamaño por intercambio del agua ligada a los cristales por mineral.^{9, 15}

1.4 FISIOLÓGÍA ÓSEA.

Se entiende por **regeneración ósea** el proceso por el cual un defecto estructural en el hueso es corregido mediante la formación de un tejido de iguales características al original. En cambio, se utiliza el término **reparación ósea** cuando el tejido de reemplazo es diferente (tejido cicatricial) y no recupera las propiedades mecánicas ni la fisiología del original.¹⁷

El tejido óseo y el embrionario son los únicos tejidos del organismo con la capacidad de regenerarse. Se produce en el hueso, tras un trauma, la **restitutio ad integrum**. Cuando ocurre una fractura, la colocación de un implante dental o la inserción de un injerto para aumentar el sustrato óseo, antes de la instalación de implantes, lo que se pretende es la regeneración ósea. La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular.^{17, 24}

Modelado y remodelado

El **modelado** es el proceso por el cual los huesos cambian su forma adaptándose gradualmente a cambios fisiológicos o de fuerza mecánica. Se produce durante todo el periodo de desarrollo en paralelo al crecimiento longitudinal de los huesos y es menos frecuente en adultos. Se produce formación de hueso en algunas zonas y resorción en otras, se caracteriza porque estos procesos no están acoplados siendo las funciones de osteoblastos y osteoclastos independientes entre sí.^{9, 29} Durante el crecimiento predomina el proceso de formación ósea, por lo que la masa va aumentando continuamente

hasta alcanzar el pico máximo a los 20-25 años, momento en el que el esqueleto adquiere su forma y tamaño definitivos.⁹

El **remodelado** es el proceso por el cual se reemplaza tejido óseo formado por tejido nuevo, y por el cual se mantiene la fuerza ósea y la homeostasis mineral. Ocurre desde el nacimiento hasta la muerte, por lo que coexiste con el modelado durante la etapa de crecimiento. Este proceso previene la acumulación de microdaños óseos al ir renovando pequeños “paquetes” de hueso. Se caracteriza porque hay actividad acoplada de osteoblastos y osteoclastos, trabajando en conjunto para formar la Unidad Remodeladora Ósea (BFU).²⁹(Fig. 12)

Este fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado permite la renovación de un 5% del hueso cortical y un 20 % del trabecular al año. Aunque el hueso cortical constituye un 75% del total, la actividad metabólica es 10 veces mayor en el trabecular, ya que la relación entre superficie y volumen es mayor (la superficie del hueso trabecular representa un 60% del total). Por esto la renovación es de un 5-10% del hueso total al año. El remodelado óseo existe toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo.²³

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases:

Fase Quiescente o Reposo: Se refiere al hueso en condiciones de reposo.

Fase de Activación: Activación de la superficie ósea previa a la reabsorción ósea mediante la reabsorción de células limitantes. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de los osteoclastos circulantes.

Fase de Reabsorción: Los osteoclastos comienzan a reabsorber la matriz mineral y descomponer la matriz osteoide. Este proceso es finalizado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz. (TGF- β : Factor transformante del crecimiento β , PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IGF-I y II: Factor de crecimiento análogo a la insulina I y II)

Fase de Inversión y Formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de **preosteoblastos**, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (Proteínas Morfogenéticas Óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas.

Fase de Mineralización: A los 30 días del depósito del osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 días en el hueso trabecular. Luego empieza la fase quiescente o de descanso.²³

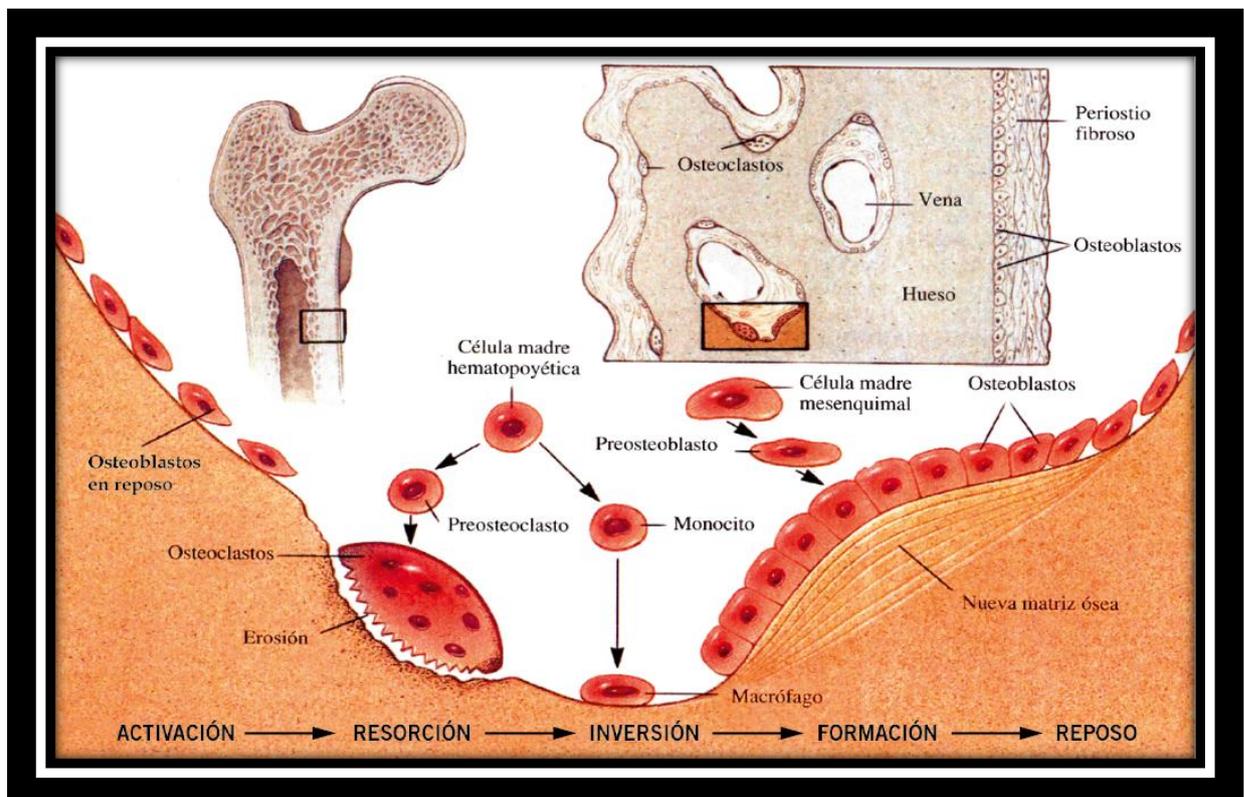


Fig 12. Fases del remodelado óseo. (<https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2015-07/valoracion-e-interpretacion-de-la-masa-osea-en-la-infancia-y-adolescencia/>)

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas unidades básicas multicelulares o BMU (*Basic Multicellular Units*). La reabsorción siempre precede a la formación y en el esqueleto joven las cantidades de hueso reabsorbidas son similares a las neoformadas. Por esto se dice que es un proceso balanceado, acoplado en

condiciones normales, tanto en el espacio como en el tiempo. La vida media de cada unidad de remodelado en humanos es de 2 a 8 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. Existen en el esqueleto humano 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años.²³

La remodelación comienza cuando un grupo de preosteoblastos se activa y da lugar a la aparición de osteoclastos, que comienzan con la resorción de tejido óseo y la creación de un conducto cilíndrico. Los osteoclastos forman un cono perforante (Cutting Cone) claviforme que se desplazada por el hueso y perfora un conducto cilíndrico por resorción, con un diámetro correspondiente al de la última osteona. Después de la resorción se produce el crecimiento interno de vasos recién formados y entonces se diferencian osteoblastos que depositan capa tras capa de tejido óseo laminar sobre las paredes del conducto, que a continuación se rellena y da lugar a la formación de una osteona cortical (secundaria). El depósito de tejido óseo comienza con la formación de una línea de cemento que separa la futura osteona del tejido óseo circundante. En consecuencia, en un corte longitudinal del conducto en la unidad remodeladora se distingue una forma de cono alargado, el cono de cierre (**Closing Cone**), donde la punta del cono expresa el cierre gradual del conducto. Por último, los osteoblastos se transforman en células de recubrimiento óseo, que tapiza el conducto de Havers. (Fig. 13)

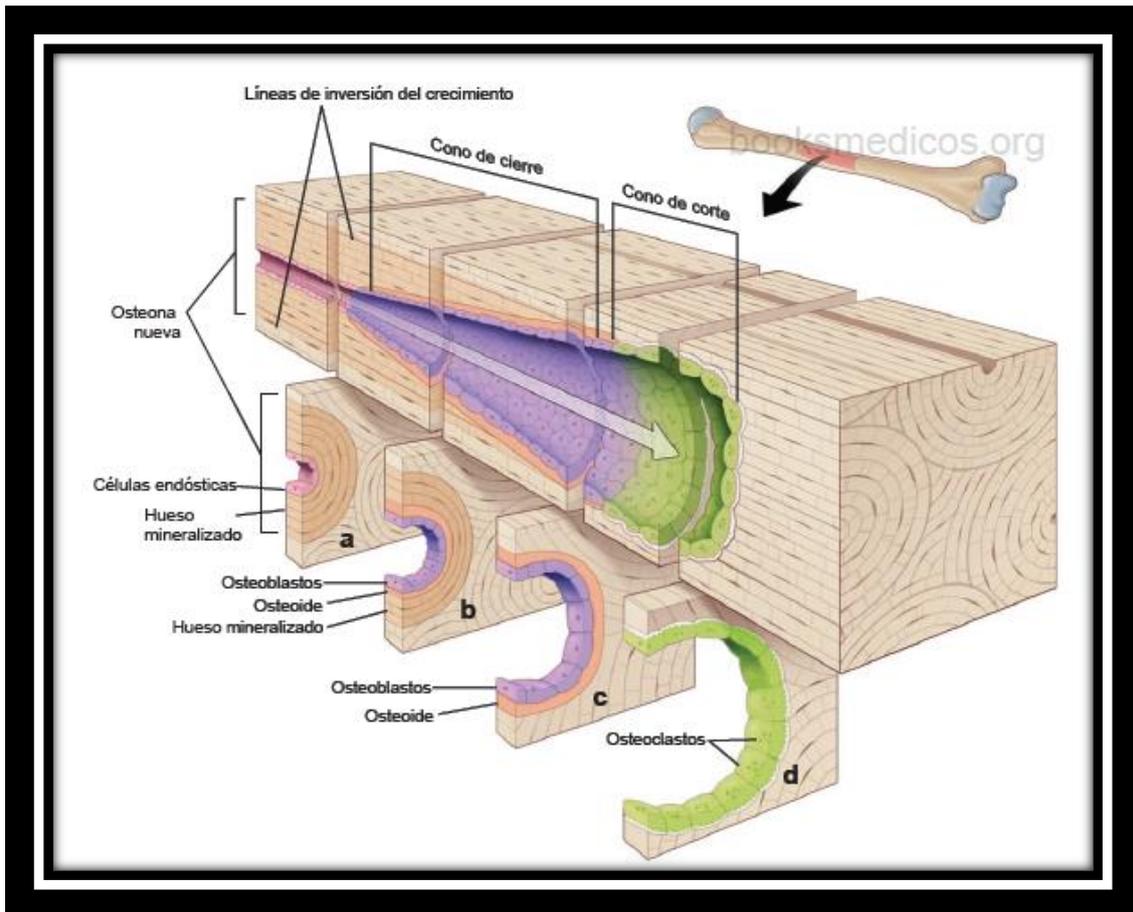


Fig. 13 **Diagrama de una unidad de remodelado óseo.** Una unidad de remodelado óseo se compone de un cono de corte que avanza y un cono de cierre que le sigue. El cono de corte formado por osteoclastos se encarga de perforar el túnel o cavidad de resorción a través del hueso compacto. Su acción comienza dentro del hueso compacto en la parte izquierda del diagrama (en la zona que corresponde a la sección **a**). El cono de corte avanza a lo largo de las osteonas, en la dirección indicada por la flecha, hasta la región correspondiente a la sección **d**. La sección **d** muestra un corte transversal a través del cono de corte revestido por los osteoclastos (células verdes). La cavidad de resorción es el sitio donde se formará la osteona futura por la acción del cono de cierre, que consiste en los osteoblastos (células púrpuras). Estas células comienzan a depositar el osteoide sobre las paredes del conducto en laminillas sucesivas. La formación gradual del tejido óseo nuevo rellena la cavidad de resorción. Debe tenerse en cuenta la deposición del osteoide, profundo con respecto a los osteoblastos visto en las secciones **b** y **c** y, en las secciones **a** y **b**, la presencia del hueso mineralizado. Conforme se depositan laminillas óseas sucesivas, el conducto por fin alcanza el diámetro relativamente estrecho del conducto de Havers maduro bordeado por las células endólicas (células rosas), como las que se muestran en la sección **a**. La línea de inversión de crecimiento que aparece en el límite externo de una osteona recién formada representa una frontera entre la actividad resortiva del cono de corte y la matriz ósea no remodelada por esta actividad.¹⁵

En el tejido óseo esponjoso primitivo transcurren las mismas fases, pero aquí los osteoclastos no resorben un conducto, sino un surco, por lo que un corte longitudinal a través de la unidad remodeladora ósea se visualiza como una unidad cortical seccionada por la parte media. Así, el surco de resorción comienza en la superficie de una trabécula y desciende hasta una profundidad

de unos 70 μm . Aquí también los osteoblastos terminan transformándose en células de recubrimiento óseo, que forman una capa delgada sobre la superficie de la trabécula. El tejido óseo recién formado que ocupa el surco de resorción representa una nueva osteona trabecular.

El acoplamiento de la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos, con activación, resorción y formación de tejido óseo, también denominado secuencia **ARF (activation, resortion and formation)** en la remodelación ósea, implica que la formación de hueso siempre es precedida por resorción ósea, y que la resorción ósea siempre es seguida por formación de hueso. La frecuencia con que determinada zona ósea sufre remodelación se denomina **frecuencia de activación**. Esta frecuencia es afectada por factores locales tales como citoquinas secretadas, factores de crecimiento, por sobrecargas mecánicas del tejido óseo, además de las hormonas circulantes.

Se considera que la principal función del proceso de remodelado es el mantenimiento de las características mecánicas del hueso a través de la sustitución de las zonas dañadas por hueso nuevo. También es responsable de la organización espacial del hueso a la carga mecánica experimentada en cada momento y contribuye a la homeostasis mineral y especialmente al balance fosfocálcico, dado que el constante metabolismo del tejido óseo, con resorción del mismo, favorece el intercambio de iones calcio entre el líquido extracelular y el plasma sanguíneo.⁴⁰

Los osteocitos pueden reaccionar frente a acciones mecánicas sobre el tejido óseo y es posible que, junto con las células de recubrimiento óseo, intervengan en la activación de la remodelación.

El lado negativo de la resorción está presente en el periodo posterior de haber alcanzado la masa ósea pico, a partir de los 30-40 años, es causal de una pérdida gradual e irreversible de masa ósea durante el resto de la vida.

Todo esto se halla bajo la dirección de un sistema de señales hormonales a su vez modulada por factores locales óseos que mantienen un equilibrio.

1.5 PROCESOS BIOLÓGICOS DE LA REGENERACIÓN ÓSEA:

La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Tras un trauma se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina. Las células de coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará el coágulo inicial. Todo ello está regido por una serie de factores interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales.²⁴

Factores Genéticos: Son determinantes muy importantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente.³³ Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que los de raza blanca y éstos mayor que la amarilla. La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen.³⁴

Factores Mecánicos: La actividad física es imprescindible para el correcto desarrollo del hueso. La acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea.³⁵

Factores Vasculo-nerviosos: La vascularización es fundamental para el normal desarrollo óseo permitiendo el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. La inervación es necesaria para el normal fisiologismo óseo. El hueso es inervado por el sistema nervioso autónomo y por fibras nerviosas sensoriales. La vascularización constituye el primer paso para la osificación: los vasos sanguíneos invaden el cartílago y

posteriormente se produce la reabsorción ósea por los osteoclastos, procedentes de los vasos próximos.²⁴

Factores Nutricionales: Este factor puede ser modificado. Se necesita un mínimo de calcio para permitir la mineralización que la mayoría de los autores cifran en unos 1.200 mg diarios hasta los 25 años; después y hasta los 45 debe ser de 1 g y tras la menopausia debe ser por lo menos 1.500 mg al día.³⁶

Factores Hormonales: El desarrollo normal del esqueleto está condicionado por el correcto funcionamiento del sistema endocrino, fundamentalmente por la hormona somatotropa (GH) y las hormonas calciotrópicas (parathormona, calcitonina, metabolitos de la vitamina D). Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúan a distancia de su lugar de producción (**efecto endocrino**), pero también regulan la síntesis y acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (**efectos autocrino y paracrino**).³⁶

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

1. **Hormonas Tiroideas:** Las hormonas tiroideas, tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), son hormonas basadas en la tirosina producidas por la glándula tiroides. Poseen dos acciones contrapuestas sobre el hueso. En primer lugar, estimulan la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización. En segundo lugar, se produce un efecto contrario, cuando los niveles de hormonas tiroideas son alto, estimulando la reabsorción, al aumentar el número y función de los osteoclastos.³⁷
2. **PTH (Parathormona):** Es producida por las glándulas paratiroides, controla la homeostasis de calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Es la hormona hipercalcemiente por excelencia, al favorecer la reabsorción. La PTH estimula la secreción de RANKL, IGF-1 e interleuquinas (IL) 6 y 11 por los osteoblastos, lo que activa la diferenciación y función osteoclástica.³⁸
3. **Calcitonina:** La calcitonina es una hormona producida por la glándula tiroides que desempeña un papel importante en la regulación del

metabolismo del calcio en el cuerpo. Su principal función es disminuir los niveles de calcio en la sangre. Para lograr esto, la calcitonina inhibe la actividad de los osteoclastos, las células responsables de la reabsorción ósea, lo que reduce la liberación de calcio desde los huesos hacia la sangre. Además, la calcitonina aumenta la excreción de calcio en los riñones. En conjunto, estas acciones ayudan a mantener los niveles de calcio en el organismo dentro de un rango normal.³⁹

4. Calcitriol o 1,25(OH)₂ Vitamina D₃: El calcitriol ayuda a regular la actividad de los osteoclastos, inhibiendo su función y reduciendo la reabsorción ósea. Esto contribuye a mantener un equilibrio adecuado entre la formación y la degradación del hueso. Entre sus acciones se incluye el aumento de la absorción de calcio intestinal y renal, y la inhibición de la secreción de PTH actuando sobre las paratiroides.²³
5. Andrógenos: Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. Además, actúan como mediadores en el pico de GH existente en la pubertad. Los principales efectos de los andrógenos tanto en varones como en mujeres son incrementar el tamaño óseo y estimular la formación, con un discreto efecto de inhibición de la resorción ósea.²³
6. Estrógenos: Tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo. Por un lado, favorece la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y, por otro lado, disminuye la reabsorción. Son esenciales para el cierre de los cartílagos de conjunción. El papel fundamental de los estrógenos en el metabolismo óseo queda de manifiesto en la pérdida de masa ósea que ocurre en los primeros años de postmenopausia tras el cese de la actividad estrogénica, lo que ocasiona un aumento del remodelado debido a la elevación de distintas citoquinas proresortivas como IL-1, M-CSF y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Los estrógenos ejercen además sus efectos positivos a través de un efecto parácrino. El papel de los estrógenos *in vitro* es la inhibición del desarrollo de los osteoclastos, favoreciendo su apoptosis por estímulo de la

producción del factor de crecimiento tumoral b (TGF b) por los osteoblastos, además de inhibir la producción de IL-6, el principal estímulo para la resorción. Previenen también la apoptosis osteoblástica. La deficiencia estrogénica incrementa además la apoptosis de los osteocitos, lo que, según se ha propuesto, altera la función mecanosensora del sistema canalicular de reparación de microdaños contribuyendo a la fragilidad ósea. Tanto *in vivo* como *in vitro* los estrógenos estimulan la producción de OPG y suprimen la de RANKL, mientras que la testosterona inhibe ambas moléculas¹². Es posible que exista un efecto diferencial sobre otras moléculas reguladoras de la osteoclastogénesis.⁴⁰

7. Progesterona: Son anabolizantes sobre el hueso, bien directamente, a través de los osteoblastos, que poseen receptores para la hormona o bien de forma indirecta, mediante la competición por los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides.⁴¹
8. Insulina: Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I (factor de crecimiento análogo a la insulina-I)²³
9. Glucocorticoides: A dosis alta tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhibe la síntesis IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa 1, factores críticos para la osteoblastogénesis. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica.²³
10. Hormona de Crecimiento (GH): Actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina, y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos aumentando el número y función. Además, se considera la GH como un factor de crecimiento local, ya que

no solo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos, teniendo un efecto **autocrino** y **paracrino**, además de **endocrino**.^{23, 42}

Factores Locales: El remodelado óseo también está regulado por numerosos factores locales, tanto paracrinos como autocrinos, entre ellos están los factores de crecimiento, las citoquinas y las proteínas de la matriz ósea (moduladores de la acción de otros factores locales). (Fig.14)

Las células óseas cumplen un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, así como de citoquinas y factores de crecimiento.²³

	Estimulan formación	Estimulan reabsorción	Inhiben reabsorción
Factores de crecimiento	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (Proteína morfogenética ósea-4) BMP-6 (Proteína morfogenética ósea-6) BMP-7 (Proteína morfogenética ósea-7) IGF-I (factor análogo a la insulina I) IGF-II (Factor análogo a la insulina II) TGF-β (Factor transformante del crecimiento β) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
Citoquinas		IL-1 (Interleuquina -1) IL-6 (Interleuquina -6) IL-8 (Interleuquina -8) IL-11 (Interleuquina -11) PGE ₂ (Prostaglandina E-2) PGE ₁ (Prostaglandina E-1) PGG ₂ (Prostaglandina G-2) PGI ₂ (Prostaglandina I-2) PGH ₂ (Prostaglandina H-2)	IFN-γ (Interferón γ) IL-4 (Interleuquina-4)

Fig. 14. Factores locales reguladores del modelado óseo

1. **FACTORES DE CRECIMIENTO:** Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra óseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular.²³
 - **IGF-I y II (Insulin like Growth Factor I y II):** Son polipéptidos similares a la insulina sintetizados por el hígado y los osteoblastos. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide.

Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. Están regulados por hormonas y factores de crecimiento. Así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben.⁴³ Asimismo, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo.⁴³ El IGF-II es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, siendo importante durante la embriogénesis.²³

- TGF- β (Transforming Growth Factor- β): Son una superfamilia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo. Están presentes en la matriz en forma latente y se activan durante la reabsorción osteoclástica.⁴⁴

Es un potente estimulador de la formación ósea, potenciando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide e inhibiendo la síntesis de proteasas (Las MMP metaloproteasa por ejemplo). Además, inhibe la reabsorción al reducir la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros y estimular su apoptosis.⁴⁵ Estimula además la síntesis de OPG, por lo que se considera una señal crucial entre las células que mantienen el remodelado óseo y desempeña un importante papel en la reparación de fracturas.⁴⁶

- BMP (Bone Morphogenetic Proteins): Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son un conjunto de proteínas endógenas que pertenecen a la familia de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran autoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo, durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.⁴⁸

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica.⁴⁷ Canalis et al., creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.⁴⁸

Las BMPs fueron descritas por el Dr. Marshal Urist en 1965 al implantar matriz ósea desmineralizada extraída de bovino a nivel intramuscular en ratas y conejos y observar la producción ósea ectópica en el sitio de implantación; Él lo denominó “formación ósea por autoinducción”. Urist atribuyó el proceso a la presencia de una proteína que atrae células mesenquimáticas pluripotenciales e induce formación ósea local, por lo que la denominó proteína morfogenética ósea (BMP).⁴⁹

- PDGF (Platelet-Derived Growth Factor): Por un lado, estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos, y por otro favorece la reabsorción ósea. Ayuda la cicatrización al generar la proliferación de los fibroblastos, células musculares lisas, estimula la neovascularización y la síntesis de colágeno, por lo que favorece la cicatrización.⁵⁰
- FGF (Fibroblastic Growth Factor): Es anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos.⁵¹
- EGF (Epidermal Growth Factor): Es un potente mitógeno de las células de origen mesodérmico y ectodérmico. Respecto al hueso, podría tener una doble acción, formadora y destructora (esta última es la más conocida).²³
- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor): Induce a la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular. Produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular.²³

- GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor): Es importante para la osteoclastogénesis y puede intervenir en la patología de la osteopetrosis.²³
- M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor): Es producido por los osteoblastos y células del estroma medular y es requerido como factor esencial en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas.²³
- TNF (Tumor Necrosis Factor): El factor de necrosis tumoral in vitro estimula la reabsorción ósea.²³

2. PROTEÍNAS DE LA MATRIZ: Las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento.⁵² Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan a una concentración mil veces mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían jugar un papel más importante en la regulación de las diferentes funciones celulares.⁵³ Por otro lado, estas proteínas de la matriz también participan en la regulación de la diferenciación de las células contenidas en la matriz. Por ejemplo, el colágeno tipo I es uno de los marcadores más tempranos que regulan las células osteoprogenitoras, y la fosfatasa alcalina, es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células de las células osteoblásticas.²³

3. CITOQUINAS: Son polipéptidos sintetizados en las células linfocíticas y monocíticas que juegan un papel importante en múltiples funciones celulares. Poseen un efecto autocrino y paracrino y en el hueso son importantes las siguientes:

- Interleuquina 1 (IL-1): Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los

preosteoclastos, así como la actividad osteoclástica, además de inhibir la apoptosis de los osteoclastos. Es un factor activador de los osteoclastos maduros.⁴¹

- Interleuquina 6 (IL-6): Estimula precursores hematopoyéticos, lo que de forma indirecta estimula la formación osteoclástica. Estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la enfermedad de Paget.⁵⁴ Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25(OH)₂D₃.²³
 - Interleuquinas 4,13 y 10: inhiben la maduración osteoclastica.⁴⁰
 - Interleuquina 11 (IL-11): Se produce en la medula ósea. Estimula la producción de RANKL por los osteoblastos e induce la osteoclastogénesis.^{23, 40}
 - Interleuquina 12 y 18: inhiben la formación de osteoclastos.⁴⁰
 - Prostaglandinas (PG): *in vitro* favorecen la reabsorción ósea. Estudios *in vivo*, midiendo los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular han demostrado su participación en la destrucción ósea que se presenta en la enfermedad periodontal.⁵⁵
4. ÓXIDO NÍTRICO: La fuente principal de óxido nítrico en el hueso son los osteoblastos y las células endoteliales. Ha cobrado importancia en los últimos años como regulador del remodelado, ya que es un mediador del efecto anabólico de los estrógenos y de la respuesta mecánica del hueso, y ejerce también efectos de inhibición osteoclástica.⁴⁰
5. LEPTINA: La leptina es una hormona liberada desde el tejido adiposo con efecto regulador del apetito y de la función reproductora por acción en el sistema nervioso central. Recientemente se ha destacado su efecto sobre el esqueleto, y se han demostrado receptores para leptina en células

mesenquimales preosteoblásticas y osteoblastos maduros. Su efecto es anabólico ya que promueve la diferenciación osteoblástica, aumenta la síntesis de proteínas de la matriz y reduce su apoptosis. Disminuye también la función osteoclástica por aumento de OPG y descenso de RANKL.⁴⁰

1.6 ACOPLAMIENTO ENTRE OSTEOLASTO Y OSTEOLASTO (SISTEMA RANK-RANKL-OPG)

Es evidente que el mantenimiento de la integridad del esqueleto requiere un acoplamiento adecuado entre osteoblasto y osteoclasto. Cuya actuación debe ser coordinada, de manera que se activen en el mismo lugar y en una secuencia temporal correcta y, además, que lo hagan con una eficiencia similar.

Los osteocitos y el inicio del remodelado

A la hora del remodelado, se piensa que en ello desempeña un papel importante los osteocitos, marcando el lugar donde debe producirse la activación de los precursores osteoclásticos para iniciar la resorción. Por lo que estos actuarían como sensores de situaciones inductoras de remodelado, como la aparición de microfracturas o la modificación de las fuerzas mecánicas a la que está sometida el esqueleto. De hecho, se piensa que la apoptosis de los osteocitos puede desencadenar el inicio del remodelado. Los mecanismos íntimos se desconocen, pero se han observado osteocitos apoptóticos en zonas de microfracturas y en la proximidad de focos de resorción.⁵⁶ (Fig. 15)

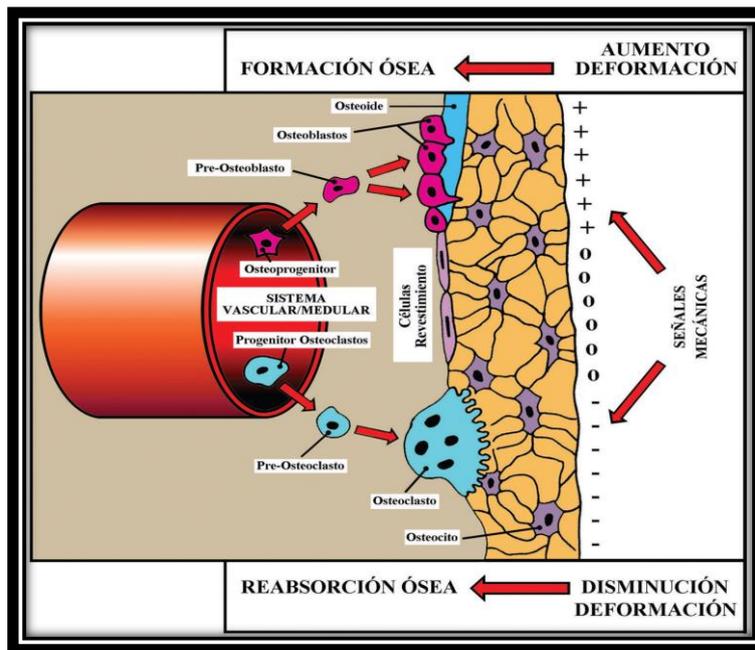


Fig. 15. Esquema del acoplamiento en el remodelado óseo según las

Los osteocitos no presentan conexiones físicas con las células de la medula. Por lo tanto, si actúan sobre precursores osteoclasticos, lo debe hacer a través de mecanismos humorales. De hecho, se ha demostrado que estas células producen diversos mediadores químicos que pueden influir en la osteoclastogenesis, como óxido nítrico, TGF beta, prostaglandinas o RANKL.⁵⁷ Otra posibilidad es que la activación sea indirecta, a través de las células de revestimiento, mediante señales enviadas por los osteocitos. Este linaje celular se despega de las superficies óseas y constituyen una especie de cúpula que constituye el llamado “espacio de remodelado” donde se inicia la resorción.⁵⁶

Modulación de la osteoclastogénesis por los osteoblastos:

Por otro lado, las células osteoblasticas sintetizan algunos factores que son esenciales para la diferenciación de los osteoclastos. Uno de ellos es el factor estimulante de las colonias de tipo monocito macrófago (M-CSF o CSF-1). Su importancia se visualiza en algunos estudios sobre modelos experimentales murinos en los que la falta de M-CSF impide la formación de osteoclastos y conduce a la aparición de osteopetrosis.⁵⁸

SISTEMA RANKL-RANK-OPG

Otro factor crítico para la formación de osteoclastos es el RANKL (ligando del receptor activador del Factor Nuclear Kappa B). La principal fuente de RANKL son los Linfocitos T y los osteoblastos. Este factor pertenece a la familia del TNF. Cuando se fija a su receptor RANK presente en la membrana de los precursores osteoclásticos induce una serie de señales que promueven la diferenciación de estos y la formación de osteoclastos.^{59, 60}

Cuando RANKL, interacciona con su receptor RANK, se activan diferentes vías de señalización intracelular en el precursor del osteoclasto que induce la expresión de genes promoviendo su diferenciación y activación. Tras el contacto, la parte citoplasmática de RANK interacciona con proteínas adaptadoras conocidas como TRAF. Estas proteínas son de vital importancia, tal es así que modelos murinos KnockOut para TRAF6, en los que se bloquea la expresión de este gen, desarrollan osteopetrosis al carecer de osteoclastos.⁶¹

Varios factores humorales que promueven la resorción de hueso actúan, al menos en parte, incrementando la expresión de RANKL. Es el caso de la parathormona, la 1,25 dihidroxivitamina D o algunas citocinas, como la IL-6.⁶² Además de RANKL, los osteoblastos producen otra citoquina como lo es la osteoprotegerina (OPG), que es un inhibidor del RANKL. La OPG se une al ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) neutralizando su acción, y de esta manera inhibe la osteoclastogénesis. Actúa como señuelo, se fija al RANKL e impide la interacción de este con su receptor RANK.⁵⁶

En cualquier caso, el sistema RANKL-RANK-OPG desempeña un papel esencial en la osteoclastogénesis. Existen numerosos datos clínicos y experimentales que lo demuestran. De hecho, los animales en los que se bloquea la expresión de RANKL desarrollan osteopetrosis. Por el contrario, cuando se bloquea la expresión de OPG desarrollan osteoporosis.⁶⁰ (Fig. 16)

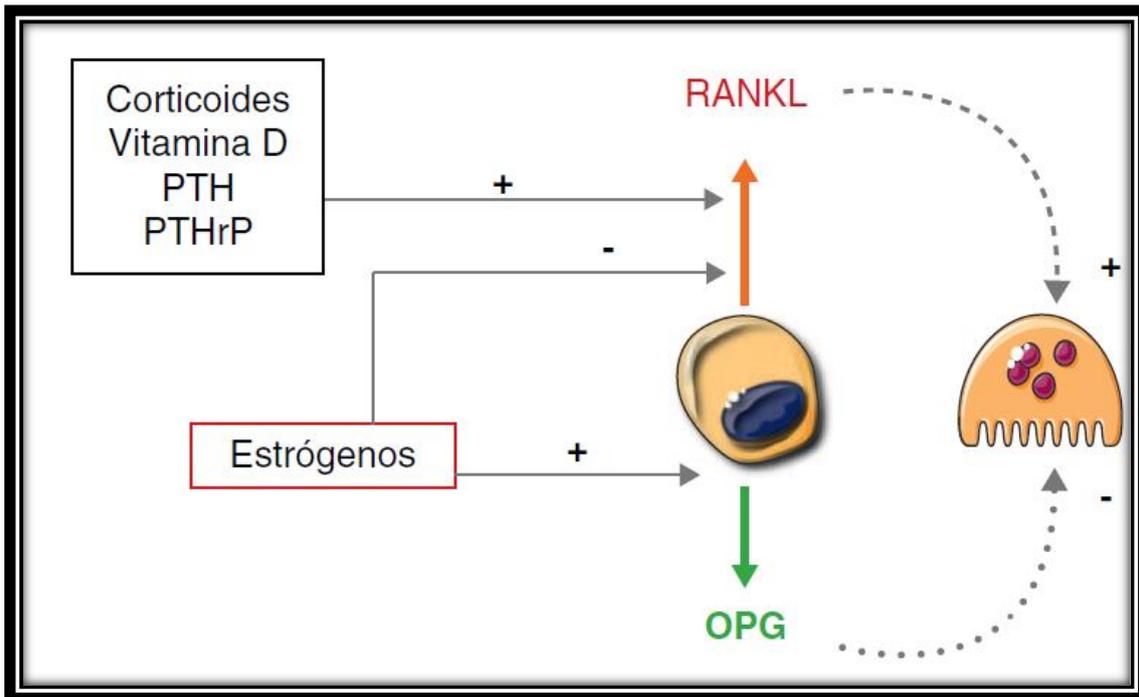


Fig. 16. Efectos de los factores hormonales sobre RANKL y osteoprotegerina.

1.7 BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL

El colesterol desempeña funciones muy importantes en el ser vivo ya que forma parte de las membranas celulares y es el precursor de los ácidos biliares y de las hormonas esteroideas.

Las células de los mamíferos, utilizan el colesterol que se genera a través de las vías endógenas y exógenas.

- Ruta exógena: El colesterol se incorpora a las células gracias a las lipoproteínas, especialmente la LDL (lipoproteína de baja densidad). Esta molécula es introducida en la célula mediante un mecanismo de endocitosis ⁶³, siendo a continuación degradadas las lipoproteínas en el interior de los lisosomas y el colesterol reciclado.
- Ruta endógena: Cuando no hay LDL plasmática, se pone en marcha un proceso de síntesis celular a través de las propias rutas endógenas que posee la célula. ⁶⁴

En las células eucariotas el proceso de biosíntesis del colesterol se lleva a cabo en diferentes compartimentos celulares. Así, formación del HMG-CoA a partir del acetil-CoA se produce en el citosol y en los peroxisomas gracias a la acción de

la HMG-CoA sintasa. La reducción del HMG-CoA hacia mevalonato tiene lugar en el retículo endoplásmico y en los peroxisomas, catalizado por la acción de la enzima HMG-CoA reductasa. Y es éste el paso limitante en la síntesis del colesterol. (Fig. 17)

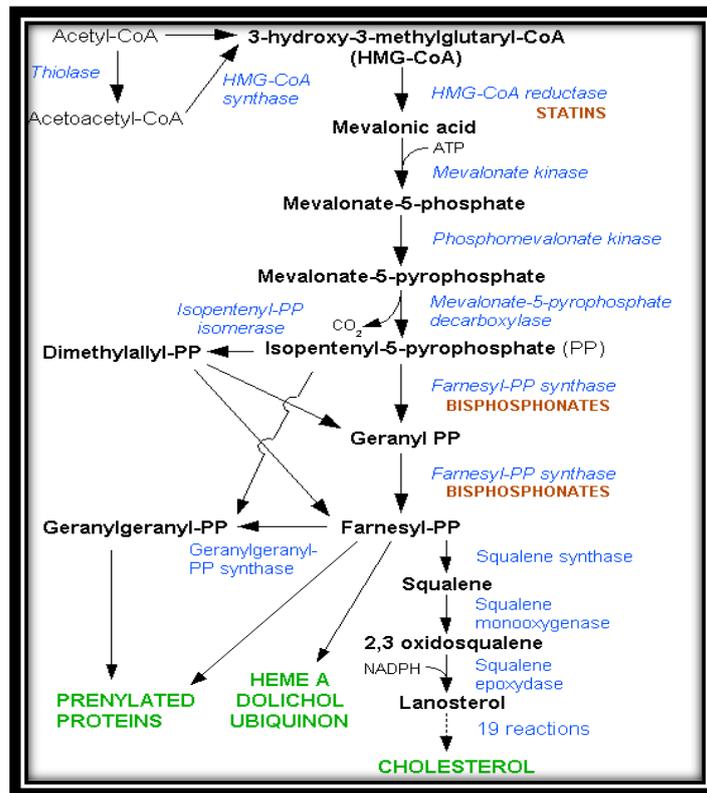


Fig. 17. Vía de síntesis del colesterol, denominada vía del Mevalonato.

Durante todo el proceso se genera, además del colesterol, varios subproductos de gran importancia. Entre ellos se destacan, los lípidos isoprenoides *farnesil pirofosfato* (FPP) y *geranylgeranyl pirofosfato* (GGPP). Estos dos últimos lípidos son claves para que se pueda producir la isoprenilación de pequeñas proteínas GTPasas.⁶⁴

Isoprenilación proteica

En la vía del mevalonato se forman dos intermediarios de gran valor biológico.

- 1- El farnesil pirofosfato (FPP), que tiene 15 carbonos
- 2- El geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), tiene 20 carbonos.

Se entiende por isoprenilación proteica a aquel proceso mediante el cual se modifican diversas proteínas tras la adición de los lípidos isoprenoides, como es el caso del FPP o del GGPP. (Fig.18)

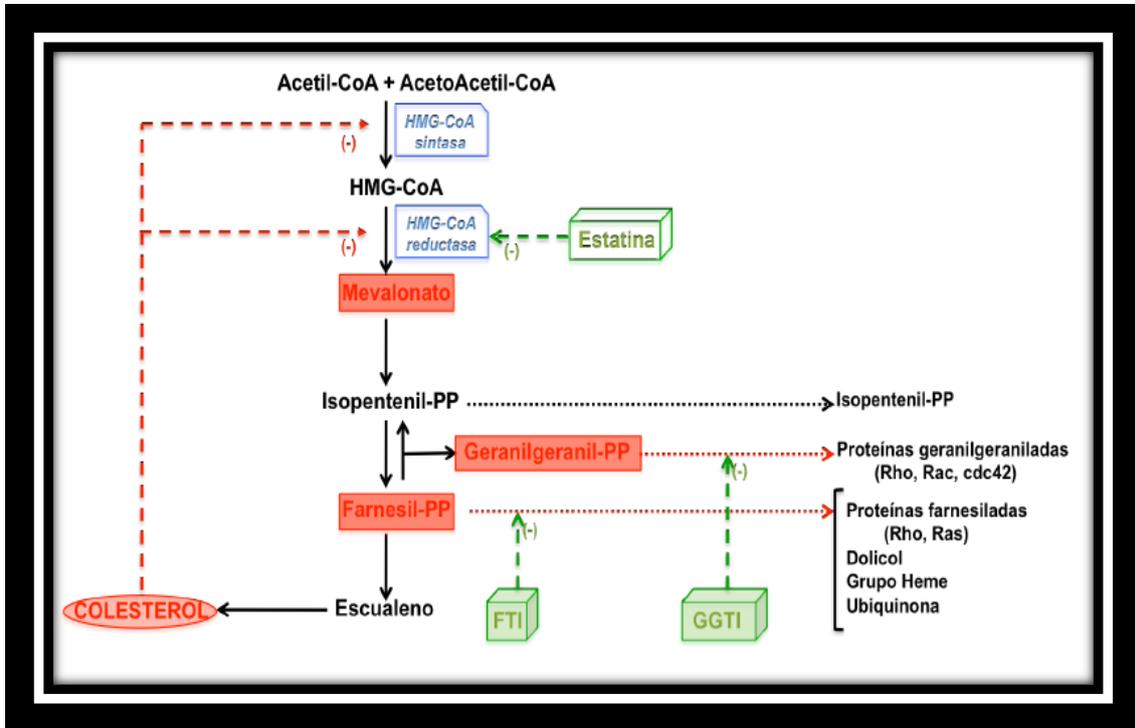


Fig 18. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL Y FORMACION DE PFF Y GGPP.

Numerosas son las proteínas que son modificadas mediante este proceso de isoprenilación y se sabe que éstas juegan un papel crítico en procesos íntimamente relacionados con la actividad celular. Así, las proteínas Ras y Rho son, entre otras, los mayores sustratos para la isoprenilación con FPP y GGPP para poder unirse a la membrana y con ello completar su actividad biológica. Los anclajes de estas pequeñas proteínas a la membrana requieren de la prenilación de los compuestos antes mencionados. Las proteínas Ras están farnesiladas y las proteínas Rho están geranilgeraniladas.⁶⁵

1.8 SIMVASTATINA

La simvastatina es un fármaco de la familia de las estatinas utilizado para disminuir los niveles de colesterol en sangre. Su importancia es grande, dada la trascendencia del colesterol como factor de riesgo cardiovascular.⁷³

La simvastatina (C₂₅H₃₈O₅) es una modificación química de la lovastatina, que consiste en el reemplazo en la cadena lateral del grupo 2-metil-butiril de la lovastatina por un grupo 2,2 dimetil-butiril .⁶⁶

Las concentraciones de simvastatina en médula ósea provenientes de su administración sistémica no han sido bien establecidas todavía, pero los osteoblastos y los osteoclastos podrían estar expuestos a muy bajas concentraciones con pautas orales de administración.⁶⁷

La Simvastatina es uno de los fármacos más comúnmente prescritos para el tratamiento de la hipercolesterolemia, debido a que inhibe la vía del mevalonato anulando la acción de la enzima 3-hidroxi-3metil-glutaril Coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) impidiendo la síntesis de colesterol. La HMG-CoA reductasa convierte HMG-CoA a mevalonato y es la enzima determinante en la síntesis de colesterol. Hay una inhibición competitiva entre la enzima y el fármaco. ⁶⁸

Además de los efectos hipolipemiantes de la simvastatina, recientemente se han estudiado efectos pleiotrópicos, como son la inhibición de crecimiento tumoral y metástasis, promoción de la angiogénesis, descenso del péptido β -amiloide, supresión de linfocitos T, etc.⁷

En particular, uno de los efectos que más puede influir en el campo de la odontoestomatología es la capacidad de la simvastatina de promover la diferenciación osteoblástica, provocada por la estimulación de la producción de la proteína morfogenética ósea (BMP). Además, se observó en estudios que inhibe la actividad osteoclástica. ^{7, 18, 69} También se ha estudiado la posibilidad de que la simvastatina aumente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), favoreciendo también así la formación ósea. ⁷

Sin embargo, existe controversia en el potencial de las mismas en la regeneración ósea, ya que a ciertas dosis puede provocar inflamación local sin efectos visibles en cuanto a la mejora de formación de hueso. ⁷

La estrategia que se intenta desarrollar con la combinación de simvastatina con los materiales aloplásticos y heterólogos disponibles en el mercado es producir, mediante estímulos externos, una estimulación de las células del organismo y provocar de esta forma una reparación local del tejido óseo de una forma óptima en el menor tiempo posible. ^{70, 71, 72}

¿Cómo actuaría la Simvastatina en la regeneración ósea?

La evaluación de la expresión de la BMP-2 es la forma más indicada para investigar la capacidad de curación ósea y regeneración. Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son factores de inducción ósea que actúan sobre las células mesenquimales inmaduras, incluidos los osteoblastos, promoviendo la osteogénesis.^{7, 73}

Las estatinas, y la simvastatina en particular promueven la diferenciación osteoblástica. La simvastatina ha demostrado que invierte los efectos supresivos del factor de necrosis tumoral (TNF) e impide la inhibición de BMP-2 mediada por la fosforilación 1,5 y 8 de Smad. Esto se daría mediante el antagonismo de la Simvastatina con el TNF alfa con Ras/Rho/Mitogen Protein Kinasa Activada (MAPKs) aumentando la señalización de las BMP-Smad.^{74, 75}(Fig. 19)

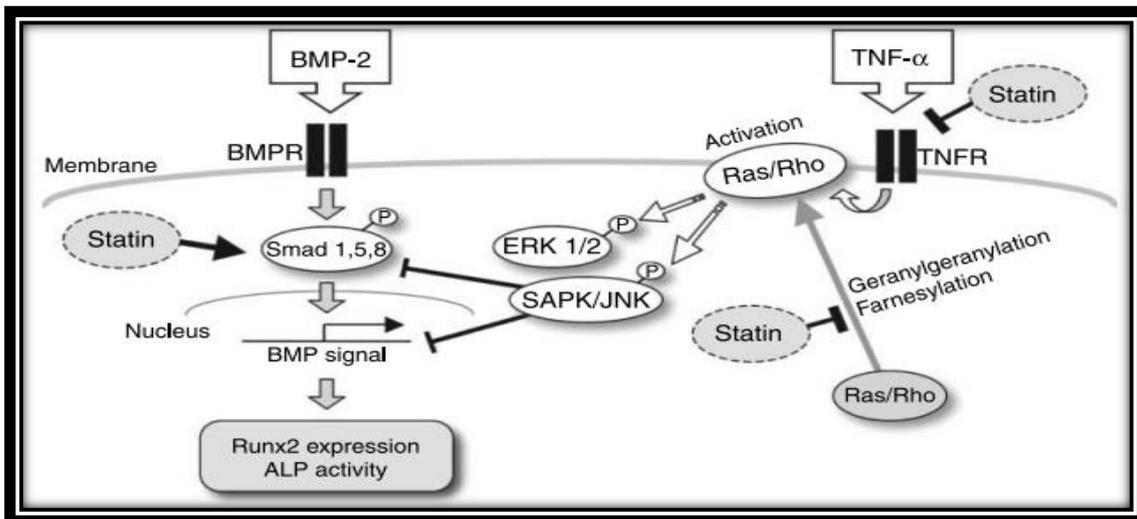


Fig. 19. Un mecanismo por el cual la simvastatina antagoniza la inhibición de TNF- α en la diferenciación osteoblástica inducida por BMP-2. La simvastatina respalda la diferenciación de osteoblastos inducida por BMP-2 que se muestra como la expresión de Runx2 y la activación de ALP a través de la vía de antagonismo de TNF- α -a-MAPK y el aumento de la señalización de Smad1,5,8. La vía SAPK/JNK que es inducida por TNF- α es un regulador importante para suprimir la señalización de BMP (Mukai et al. 2007). La activación de la vía del mevalonato conduce a la modificación postraduccional de Ras y Rho, como la farnesilación y la geranylgeranilación. Las proteínas Ras/Rho activadas son componentes clave para las cascadas de quinasas transductoras de señales, incluidas ERK1/2 y SAPK/JNK. La simvastatina previene la localización de Ras/Rho en la membrana inducida por TNF- α y también reduce la expresión de TNFR en células C2C12.

El potencial efecto positivo de las estatinas sobre la formación ósea puede explicarse a partir de 3 mecanismos: 1) la promoción de la osteogénesis, 2) la inhibición de la osteoclastogénesis. 3) la supresión de la apoptosis de los osteoblastos.⁷⁶

1- La promoción de la osteogénesis:

Parece estar ligada a los mecanismos de prenilación como modificación postraduccional necesaria de ciertas proteínas clave de algunas cascadas de señalización. La enzima HMG-CoA reductasa cataliza la síntesis de mevalonato, el cual es un paso limitante para las reacciones de formación de los isoprenoides farnesil y geranil pirofosfato, que son los primeros pasos para la síntesis de colesterol.

El efecto principal de las estatinas radica en una disminución de la actividad catalítica de la HMG-CoA reductasa, de la transformación de HMG-CoA hacia mevalonato y, finalmente, de la formación de farnesil y geranil-pirofosfato. Estos compuestos son esenciales para la prenilación de proteínas pequeñas de unión al guanosina trifosfato (proteínas G monoméricas)⁷⁷, las cuales requieren de prenilación para su activación y anclaje a las membranas celulares, lo cual finaliza en una serie de eventos de transducción de señales. Un ejemplo de estas proteínas G monoméricas preniladas es Rho, que ha evidenciado tener un papel antiosteogénico. Existe evidencia de que Rho y su proteína blanco, la Rho-quinasa, tienen un efecto negativo en la formación ósea⁷⁸ y su inhibición promueve la diferenciación osteoblástica.⁷⁹

Una consideración a tener en cuenta para explicar su acción es la similitud que tiene en su vía de acción con los Bifosfonatos, los cuales son compuestos nitrogenados utilizados para diferentes patologías óseas, entre ellas la osteoporosis. Estos compuestos actúan en la vía del mevalonato inhibiendo la acción del FPP y el GGPP generando una detención en la reabsorción ósea y desencadenando un aumento de la densidad del mismo tejido.⁸⁰

Vía del Mevalonato

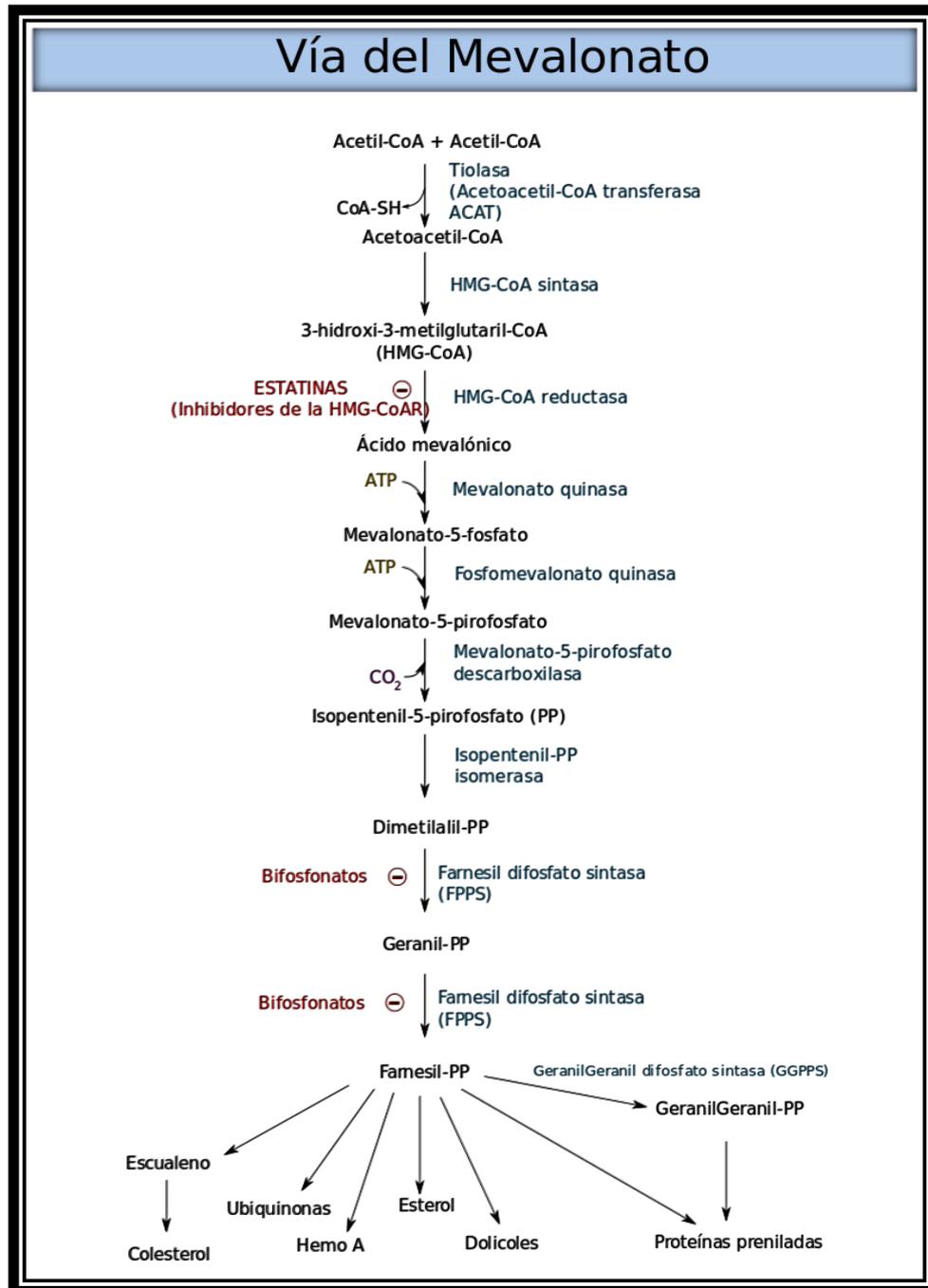


Fig. 20. En la siguiente imagen se observa como las estatinas actúan inhibiendo la acción de la enzima HMG-CoA reductasa, disminuyendo la formación de compuestos tales como el farnesil pp y el geranilgeranil pp. Así mismo se observa en el grafico la acción de los bifosfonatos, fármacos bien conocido en cuanto a su efecto sobre la osteoporosis. Estos últimos generan un aumento de la masa ósea a expensas de la inhibición de la reabsorción y a un aumento en la neoformación, y actúan inhibiendo la acción del farnesil pp y el geranilgeranil pp. Las inhibiciones de estas evitan la prenilación de proteínas.

2- La inhibición de las osteoclastogénesis:

Una de las explicaciones sería la deficiente prenilación de las proteínas requeridas para esta función celular explicada en el punto anterior.

La otra, tiene conexión con la vía de señalización de la osteoprotegerina (OPG). Esta es una proteína que actúa como receptor señuelo del RANKL (ligando del receptor activador nuclear κ B). Estudios demostraron que la simvastatina incrementa la expresión del ARNm de OPG causando una disminución de la expresión del correspondiente transcrito de RANK-L.⁸¹

Actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Asimismo, los efectos del RANKL tanto in vivo, como in vitro son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF. Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis.²⁴ (Fig. 21)

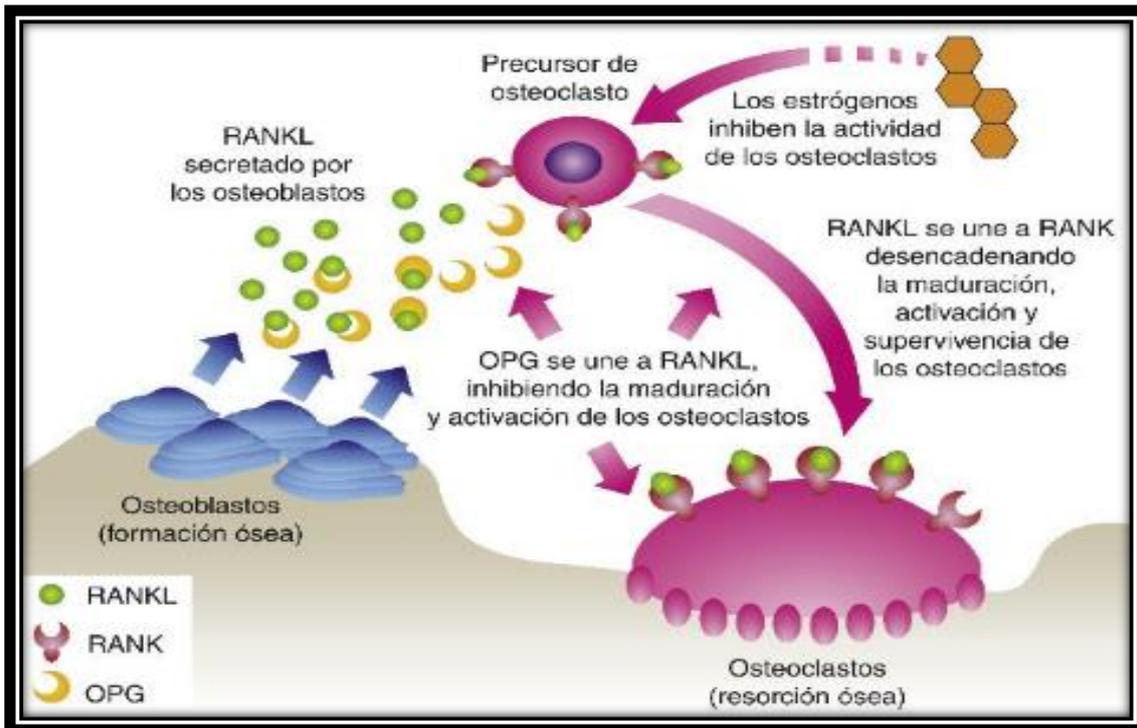


Fig. 21. Efecto señuelo de la osteoprotegerina (OPG) sobre el ligando RANK (RANKL) del osteoblasto. De esta forma no se desencadena la activación de los osteoclastos y por ende la acción de la osteoclastogénesis.

3- La supresión de la apoptosis de los osteoblastos:

Se ha descrito cierto grado de inhibición apoptótica modulado por simvastatina, el cual es explicable por el aumento de la expresión de la proteína Smad 3 (mother against decapentaplegic homolog 3)⁸¹. Las proteínas Smad 3 son transductores de señales y moduladores transcripcionales activados por el factor transformante beta (TGF Beta) el cual ejerce un factor crítico en la formación ósea.⁸²

Las proteínas efectoras específicas denominadas Smads son los principales transductores en la superfamilia del TGF- β , con la función de mediar la señalización del receptor desde la superficie celular hasta los genes diana en el núcleo. Se pueden clasificar en 3 grupos:

- R-Smads o Smads que recluta el receptor: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8
- El mediador común de Smad o Co-Smad: Smad4
- Smads inhibitorios: Smad6 y Smad7

Por lo que, en la mayoría de los miembros de la familia, una vez unido el ligando la actividad serina/treonina del receptor II fosforila y activa el receptor de tipo I, que recluta y fosforila, a su vez, las R-Smads. Desde la nueva conformación aumenta la afinidad por el Co-Smad, Smad4 formándose un complejo (R-Smads-Smad4) que se acumula en el núcleo.⁸³ (Fig. 22)

Se ha descrito que las BMPs también podrían desencadenar vías de señalización no-canónicas o no-Smads que, en ciertos contextos, son fundamentales para los efectos biológicos de las BMPs.^{84, 85} Se incluyen las vías MAPK (p38, ERK y JNK), PI3K/AKT, NF- κ B, Wnt y Rho-GTPasa.⁸⁴

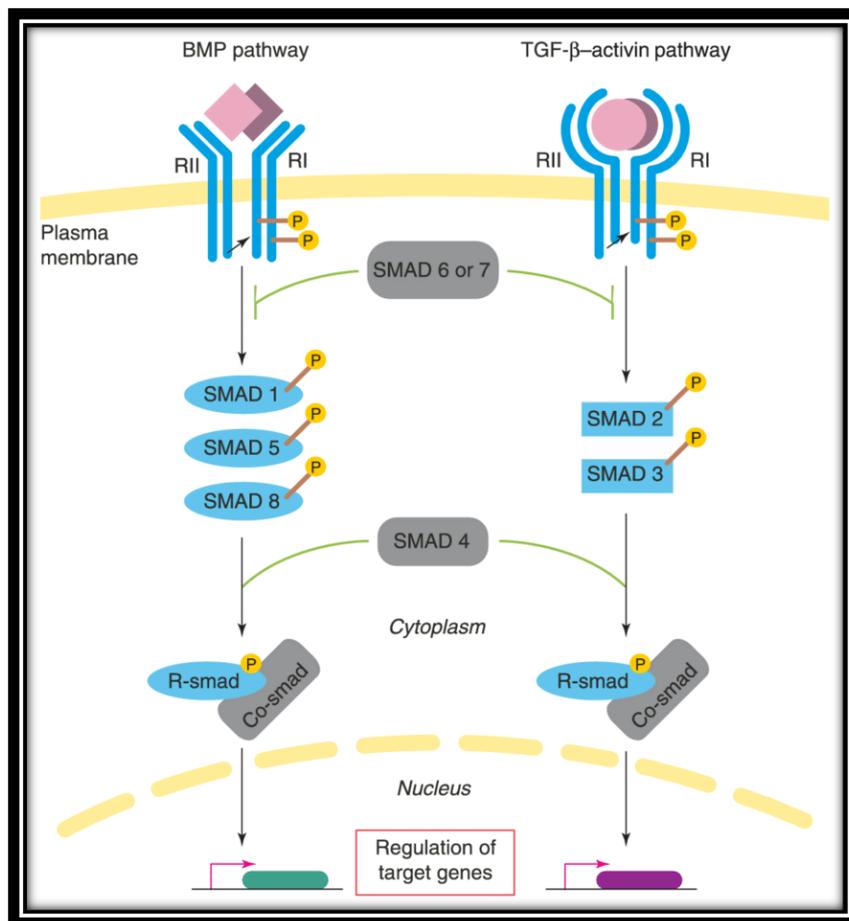


Fig. 22. Activación de las proteínas SMAD via BMP o TGF-B cuando se forma un dímero entre RI Y RII, lo que genera una estimulación de la síntesis de proteínas celular con acción autócrina y parácrina, generando un aumento de las BMPen la zona de acción.

Teniendo en cuenta lo mencionado de que la Simvastatina aplicada en ratas de laboratorio, aumentaría la síntesis de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) y así la formación de nuevo hueso, que estimula la proliferación, diferenciación y maduración de los osteoblastos, aumentando de esta manera la densidad ósea acortando los tiempos de regeneración ósea, es que se plantea la HIPOTESIS de que la Simvastatina en conjuntos con el injerto óseo bovino aplicada en defectos estructurales de ratas de laboratorio, responden de mejor manera en cuanto a calidad y cantidad de hueso regenerado que los defectos óseos tratados con solo el injerto.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

- Diseñar una estrategia frente a los defectos estructurales del hueso.

Objetivos Específicos

- Identificar factores que favorezcan la neoformación ósea.
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento una matriz de hueso bovino desproteinizado (DBBM).
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento de la simvastatina en dosis de 0,1 mg asociado a una matriz de hueso bovino desproteinizado (DBBM).
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento de la simvastatina en dosis de 0,5 mg asociado a una matriz de hueso bovino desproteinizado (DBBM).
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento de la simvastatina en dosis de 2,5 mg asociado a una matriz de hueso bovino desproteinizado (DBBM).

4. HIPÓTESIS:

La Simvastatina en conjuntos con el injerto óseo bovino aplicada en defectos estructurales de ratas de experimentación, responden de mejor manera en cuanto a calidad y cantidad de hueso regenerado que los defectos óseos tratados con solo el injerto.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de animales de experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCVUNLP), que posee las instalaciones y equipamiento adecuado de acuerdo con los estándares internacionales. (Guide for and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition)). (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS)).

Durante el proceso experimental se contó con la supervisión de médicos veterinarios especializados en animales de laboratorio.

El protocolo correspondiente al procedimiento experimental que se realizó en los animales se presentó en la FCVUNLP, para ser evaluado por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio).

- ▶ **Consideraciones éticas:** Este proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCV – UNLP (CICUAL FCV UNLP) bajo el código: **60-5-16T**

2. GENERALIDADES

Diseño del Estudio

- Tipo de estudio: Experimental cuanti-cualitativo, prospectivo.

Variables

➤ Variables Independientes:

- Grupo CONTROL: Matriz de hueso bovino desproteinizado (DBBM).
- Grupo SIM 0,1mg + INJERTO: Solución de simvastatina al 0,1 en 0,5 mg Matriz de hueso bovino desproteinizado (DBBM).

- Grupo SIM 0,5 mg +INJERTO: Solución de simvastatina al 0,5 en 0,5 mg Matriz de hueso bovino desproteínizado (DBBM).
- Grupo SIM 2,5 mg + INJERTO: Solución de simvastatina al 2,5 en 0,5 mg Matriz de hueso bovino desproteínizado (DBBM).

➤ Variables Dependientes:

- Cantidad de Neoformación Ósea.
- Calidad de Neoformación Ósea.

UNIVERSO Y MUESTRA

Se utilizaron 20 ratas macho de cepa Wistar (WKH/HokLAE), procedentes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), de 25 semanas de edad y de aproximadamente 500 gr. de peso. Las mismas fueron escogidas por muestreo aleatorio simple y luego fueron divididas en 4 grupos de acuerdo a las variables independientes.

MÉTODOS E INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

- Observación directa.
- Estudios de los cortes histológicos realizados por computadora.

PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS

Cada una de las variables independientes se midió según sus indicadores, y luego se tabuló, de acuerdo al efecto producido sobre las variables dependientes de la siguiente manera:

- Cantidad de Hueso Neoformado: Se midió la superficie de hueso regenerado en función del defecto creado artificialmente, utilizando el programa de adobe Photoshop 2020. Para esto se tomó un corte transversal en el centro del defecto de cada uno de los fémures de cada grupo.

- Calidad de Hueso Neoformado: Se realizó un estudio cualitativo en función de la disposición de la microarquitectura del tejido óseo, mediante la observación directa de cada muestra en el microscopio.

3. **DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA (MODELO ANIMAL)**

Se analizarán a continuación los puntos principales del modelo, teniendo en cuenta los detalles que fueron evaluados, hasta arribar al modelo definitivo. ¹⁴

ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL: FUNDAMENTACIÓN

La elección de la rata como modelo animal de experimentación obedece en mayor medida al hecho de que las mismas poseen un metabolismo más acelerado que otros animales, lo cual permite acortar los tiempos en una investigación.

Para asegurar una mínima, o nula, variación entre los individuos que integran la muestra se eligieron animales endocriados, libres de patógenos específicos (SPF).

La elección del sexo de los animales se debió a que, los machos presentan una menor variación hormonal. En este caso, juegan un papel importante las hormonas esteroides que intervienen en el metabolismo óseo, como por ejemplo los estrógenos. Esa variación en la secreción de los estrógenos, podría influir en el reparo del defecto óseo entre hembra y hembra, dependiendo del estadio del ciclo ovárico que el animal estuviera cursando durante el experimento. ¹⁴

ELECCIÓN DEL METODO ANESTESICO

En este trabajo se utilizó el método de anestesia inhalatoria usando como agente anestésico el isoflurano. Se eligió este método por la seguridad y el tiempo del procedimiento quirúrgico experimental sobre el animal y la rápida recuperación del individuo cuando se dejaba de administrar el anestésico.

PROCEDIMIENTO QUIRURGICO EXPERIMENTAL

Depilación de la zona anatómica (Tricotomía)

Incisiones: Se realizaron con bisturí Bard-Parker N° 3 y hoja de bisturí N° 15. Las incisiones se realizaron en la zona del muslo izquierdo por planos, primero la piel y luego el músculo. Por palpación se identifica el fémur, y el largo del mismo, el principal objetivo en este punto es distinguir las articulaciones fémoro-tibial y coxo-femoral. En base a esto se traza una incisión en piel del largo adecuado, idealmente de articulación a articulación. Una incisión chica dificultaría la visión operatoria, mientras que una incisión mayor determinaría una herida más importante lo que conlleva a una sutura mayor con posible reapertura de la herida.

Una vez completada la incisión en piel, se continúa en el plano muscular divulsionando las capas musculares con tijeras punta roma. De esta manera, no solo no corremos riesgos de lesionar vasos sanguíneos, sino que también la apertura es más rápida, prolija y facilita la cicatrización.

Una vez identificado el hueso, se posiciona dos separadores de tipo Farabeuf chicos, uno por cada lado del fémur, obteniendo de esta manera un acceso al fémur con los labios de la herida separados, listo para poder trabajar. Por último, se limpia bien la superficie ósea a intervenir, eliminando todo el periostio con la ayuda de un periostótomo o con la hoja de bisturí. (Fig. 28)

Creación de los defectos óseos: Las perforaciones se realizaron a 1000 RPM utilizando fresas redondas N° 8 de carburo de tungsteno para contra-ángulo NSK 20.1. Se realizaron 3 perforaciones contiguas entre sí sobre el fémur, profundizando la totalidad de la parte activa de la fresa, luego se unieron las tres perforaciones, dando como resultado un defecto de tres milímetros de ancho por tres de profundidad y una longitud de nueve milímetros. Cabe destacar, que el defecto se realizó con fresas nuevas, bajo abundante irrigación con solución fisiológica, con el fin de evitar el sobre calentamiento de hueso ya que, de otra manera, la regeneración sería imposible. (Fig. 29 -30) Las fresas se cambiaron cada 5 ratas.

Una vez tratados los defectos, se realizaron las suturas por planos, primero el muscular y segundo el epitelial.

Sutura: Para la sutura del plano muscular utilizamos nylon monofilamento 4/0 (Keeper, China) basándonos en trabajos anteriores con resultados exitosos, en los cuales no hubo alteración ni aperturas de las heridas. La sutura en la piel se hizo con una tanza delgada de 0,30mm, la cual cumplía con los requisitos óptimos para realizar la sutura. (Fig. 32-33) ¹⁴

POSTOPERATORIO:

- **Postoperatorio inmediato y recuperación de la anestesia:** La recuperación de la anestesia fue rápida gracias a la utilización del anestésico inhalatorio. Una vez que cesaba el uso del anestésico, se le aplicaba oxígeno hasta la recuperación rápida y segura del animal. Para evitar la hipotermia la rata permaneció durante todo el acto quirúrgico y la recuperación post anestesia, apoyada sobre una compresa que estaba sobre una almohadilla térmica, la cual mantuvo la temperatura corporal del animal. Los animales una vez recuperados de la anestesia se alojaban en sus cajas. Todos los animales, luego de las cirugías, se mantuvieron durante todo el ensayo en el pabellón de animales de experimentación del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (FCVUNLP), manteniéndose bajo los factores macro y microambientales controlados.

Medicación pre y postoperatoria:

Se les administro analgésico:

- Meloxicam 20 mg/Kg antes de la cirugía y luego cada 12 horas.
- Tramadol 20 mg/Kg cada 12 horas luego de la cirugía.

Ambos por vía subcutánea, durante 5 días postquirúrgicos.

Se les administro Antibiótico:

- Penicilina G 22000 UI cada 24 horas,
- Eritromicina 20 mg/Kg,
- Enrofloxacin 2.5 mg/Kg

Por vía intramuscular cada 24 horas durante 1 semana.

El alimento y el agua de bebida se administraron ad libitum.

4. **METODOLOGIA**

Se utilizaron 20 Ratas de cepa WKAH/HokLAE, machos, de 500 gr., provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCVUNLP).

Los animales fueron divididos, por muestreo aleatorio simple, en cuatro grupos, cada uno con 5 animales. En racks ventilados, se alojaron de a 2 animales por caja con provisión de lecho de viruta estéril. Se mantuvieron en condiciones ambientales controladas: 23 +/- 1 grados centígrados, humedad 50/55%, iluminación 12 horas luz/ 12 horas oscuridad, 24 recambios de aires por hora, evitando los ruidos y polvo. El alimento balanceado y agua autoclavada se les administro *ad-libitum*, manteniendo su estatus microbiológico de animales libre de patógenos específicos (SPF).

Los animales se anestesiaron utilizando isoflurano mediante el método de anestesia inhalatoria, una vez anestesiados se realizó la depilación en la región del muslo, luego se incidió en la piel y tejido subcutáneo utilizando un bisturí bard parker N° 3 con una hoja de bisturí N° 15, y finalmente se divulsionó el plano muscular utilizando una tijera curva tipo metzenbaum, para acceder al fémur. Se utilizaron separadores tipo Farabeuf para poder separar los tejidos blandos de ambos lados de fémur y de esta forma poder trabajar sobre el plano óseo para realizar el defecto. Se utilizó un contra-ángulo montado en un fisiodispenser y a 1000 rpm se realizó el defecto óseo de 3x3x9 mm utilizando una fresa N° 8, irrigando la zona con solución fisiológica. Éste tipo de defecto es considerado un defecto crítico. Se denomina defecto crítico a aquel que no puede cicatrizar por si solo en forma completa.

Durante el trabajo se utilizaron diferentes dosis de simvastatina mezclada con un injerto bovino, con la finalidad de evaluar luego la regeneración ósea obtenida. Las dosis de simvastatina aplicadas sobre el injerto de hueso y su disolución, se describen a continuación: (Fig. 23)

GRUPO CONTROL: se utilizó solo un injerto bovino (OSTIUM MAX, partículas de 0,25 A 1,68 mm)

DOSIS. 0,1 mg: un comprimido de simvastatina 10 mg disuelto en 50 ml de solución fisiológica. Se tomó 0.5 ml para obtener una concentración de simvastatina al 0.1 mg. Estos 0.5 ml fueron colocados con 4 días de anticipación dentro de un injerto bovino de 0.5 mg.

DOSIS. 0,5 mg: un comprimido de simvastatina 20 mg disuelto en 20 ml de solución fisiológica. Se tomó 0.5 ml para obtener una concentración de simvastatina al 0.5 mg. Estos 0.5 ml fueron colocados con 4 días de anticipación dentro de un injerto bovino de 0.5 mg.

DOSIS. 2,5 mg: dos comprimidos de simvastatina 20 mg disuelto en 8 ml de solución fisiológica. Se tomó 0.5 ml para obtener una concentración de simvastatina al 2,5 mg. Estos 0.5 ml fueron colocados con 4 días de anticipación dentro de un injerto bovino de 0.5 mg.

Para realizar la solución se usó un agitador magnético y un recipiente que posee un huso metálico cubierto por un plástico. El agitador posee una placa debajo de la que se encuentra un imán rotatorio o una serie de electroimanes dispuesto en forma circular a fin de crear un campo magnético rotatorio. (Fig 23)



Fig. 23. A- Disolución de comprimido B- Injerto utilizado C - Injerto embebido en la solución



Fig. 24. Pesaje animal

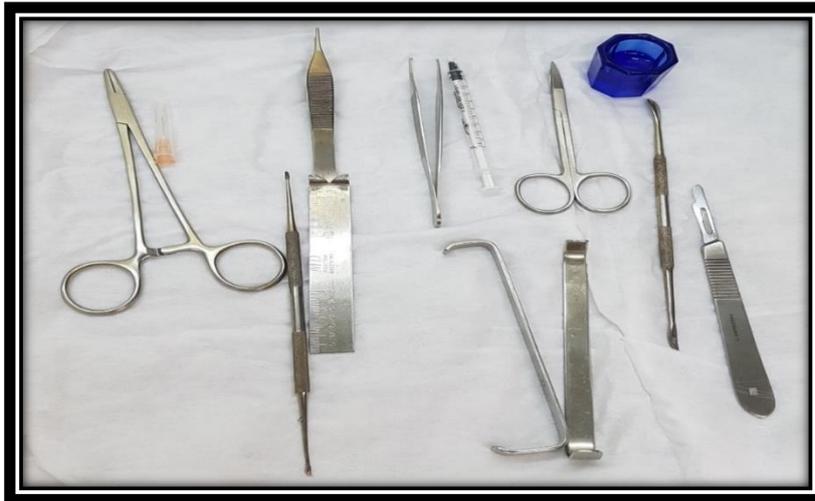


Fig. 25. Instrumental quirúrgico utilizado



Fig. 26. Simvastatina, comprimidos de 10 y de 20 mg.



Fig. 27. Equipo de anestesia inhalatorio con un animal ya en la cámara.

1. SECUENCIA FOTOGRÁFICA DE LA CIRUGÍA



Fig. 28. Incisión de piel y tej. subcutáneo



Fig. 29. Trepanación del fémur



Fig. 30. Unión de los orificios



Fig. 31. Injerto dentro del defecto óseo



Fig. 32. Sutura de musculo con nylon 4/0



Fig. 33. Sutura plano muscular finalizada



Fig. 34. Sutura de piel con con nylon 0,30 mm



Fig. 35. Sutura de piel finalizada



Fig. 36. Postoperatorio inmediato



Fig. 37. Postoperatorio inmediato

Finalizadas las cirugías, se les cortó el suministro del agente anestésico y se reemplazó por oxígeno para la recuperación de las mismas. Estas se colocaron en sus cajas y estas en racks ventilados, donde fueron alojadas durante 30 días. Para asegurarse del bienestar de los animales durante el desarrollo de la experiencia los médicos veterinarios se encargaron del cuidado de los animales aplicándoles tanto el antibiótico como el analgésico, como así también controlando los factores macro y microambientales y suministrándole enriquecimiento ambiental. (Fig. 36-37)

ANTIBIOTICOS:

- Penicilina G 22000 UI cada 24 hs. Durante 1 semana
- Eritromicina 20 mg/kg cada 24 hs. Durante 1 semana
- Enrofloxacina 2,5 mg/kg cada 24 hs Durante 1 semana

ANALGESICOS:

- Tramadol 20 mg/kg cada 12 hs
- Meloxicam 20 mg/kg cada 12 hs.

A los 30 días de la cirugía se sacrificó a las ratas en una cámara de dióxido de carbono mediante inhalación del mismo (30% de O₂ y 70% de CO₂). Después de la eutanasia se procedió a realizar la necropsia de las mismas y a la extracción de los fémures.

2. SECUENCIA FOTOGRAFICA POST NECROPSIA



Fig. 38. Piel a los 30 días



Fig. 39. Incisión de piel. nótese el nylon



Fig. 40. Incisión plano muscular



Fig. 41. Fémur extraído con defecto óseo



Fig. 42. Fémur extraído con defecto cicatrizado. Grupo injerto solo



Fig. 43. Fémur extraído con defecto cicatrizado. Grupo SIM 0,1 mg



Fig. 44. Fémur extraído con defecto cicatrizado. Grupo SIM 0,5 mg



Fig. 45. Fémur extraído donde se observa una pérdida de continuidad en el tejido, con secuestros óseos dentro. Grupo SIM 2,5 mg

Se realizó una evaluación macroscópica de los fémures extraídos mediante lupa estereoscópica. Luego las muestras fueron fijadas en formol al 10%, descalcificadas en EDTA, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo, montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina eosina, para su posterior observación a través de un microscopio óptico.

ESTUDIOS DE LAS MUESTRAS HISTOLOGICAS. METODOLOGÍA DE MEDICIÓN

Las muestras fueron capturadas mediante una cámara de video montada sobre microscopio óptico (Leica) y conectada a una computadora. Luego las imágenes fueron procesadas con un analizador digital de imágenes (Adobe Photoshop 2020).

Se tomaron imágenes de los cortes histológicos con un lente al 10X, luego se unieron las distintas tomas fotográficas con la finalidad de armar el corte histológico completo.

Una vez obtenidas todas las imágenes y escaladas se procedieron a realizar las mediciones para concretar el trabajo.

De la imagen total obtenida se tomó para obtener los resultados una superficie de 2,5 x 2,5 mm, obteniendo de esta manera una superficie total de trabajo de 6,25 mm² en todos los cortes. Luego utilizando el programa Adobe Photoshop 2020 se determinó el área total de hueso regenerado.

Los distintos elementos fueron segmentados basados en el color de la tinción Hematoxilina-Eosina.

La evaluación comparativa de los resultados entre los diferentes grupos se realizó de acuerdo a la superficie total de hueso regenerado, ya que este es el parámetro más importante dentro del presente trabajo.

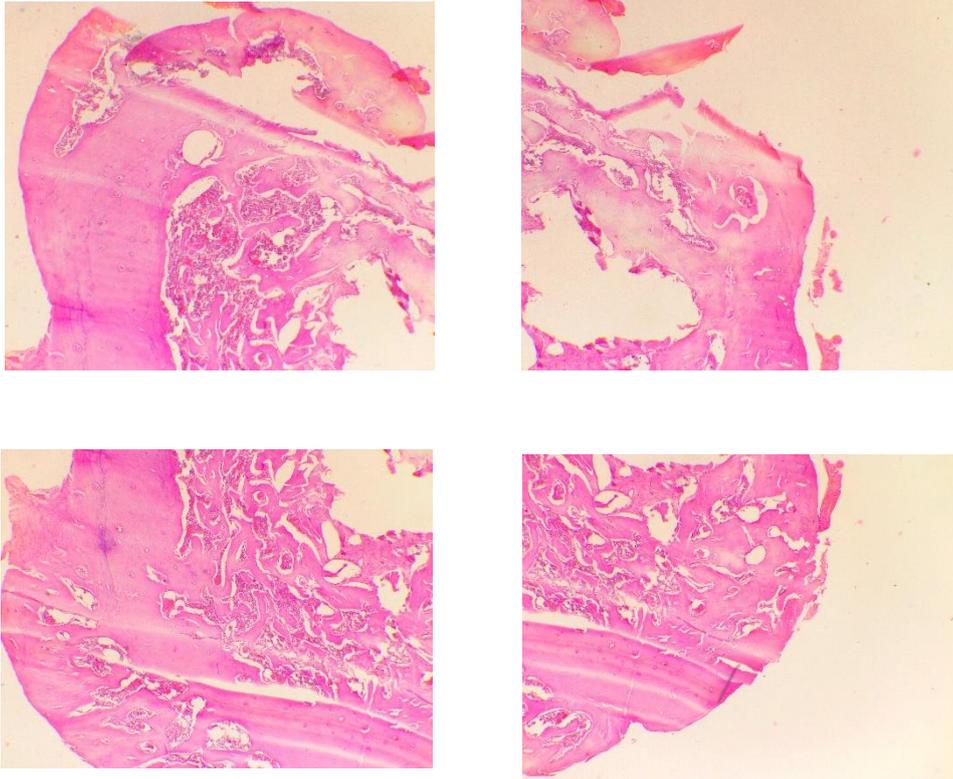


Fig. 46. imágenes seriadas a partir de las cuales se realiza luego el montaje de una imagen única

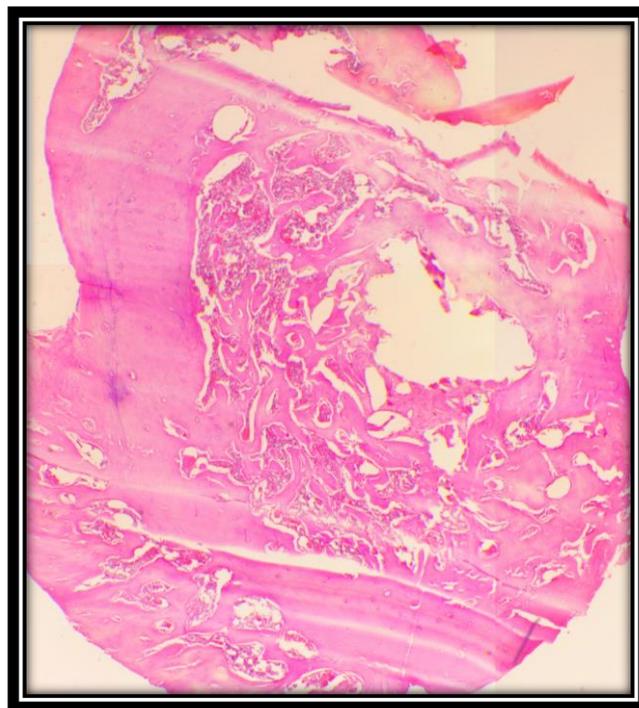


Fig. 47. Imagen ensamblada para realizar la medición de la superficie ósea regenerada

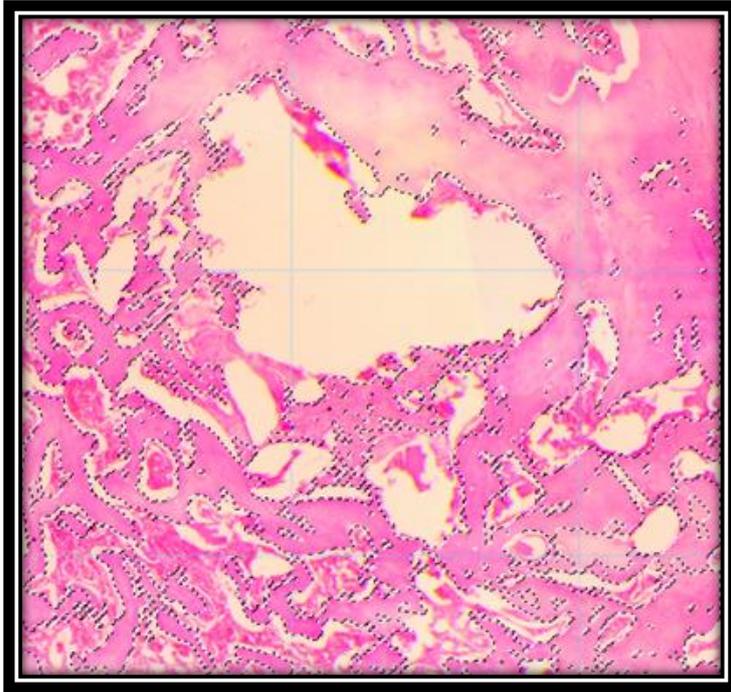


Fig. 48. Ejemplo de superficie ósea analizada

6. RESULTADOS

El modelo animal experimental utilizado funcionó correctamente y no presentó mayores inconvenientes en su ejecución. Tanto el injerto óseo bovino solo, como los combinados con las dosis de SIM. 0,1 y 0,5 mg no generaron respuestas adversas, sin embargo, el combinado con la dosis de SIM. 2,5 mg mostró una reacción inflamatoria en 3 de las 5 ratas, manifestándose éstas tanto en la superficie epitelial del animal como en el tejido óseo.

En todos los casos el injerto óseo, ya sea combinado o no con las dosis de simvastatina fue de fácil manipulación.

En cuanto a la calidad ósea en relación a su patrón arquitectónico, se observó que tanto el injerto óseo bovino solo, como el combinado con las dosis de SIM 0,1 fue Aceptable. El grupo de SIM 0,5 mg fue Buena, mientras que en el grupo de SIM. 2,5 mg fue Mala.

Los resultados de superficie regenerada en mm², considerando Media y Desvío Estándar en cada grupo fueron: INJERTO (Control): 2,376 (0,0929), Grupo SIM 0,1mg : 2,762 (0,182), Grupo SIM 0,5mg : 3,284 (0,858) y Grupo SIM 2,5mg : 0,8 (0,39).

En la comparación entre grupos se observan diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,001$). Anova On Ranks. (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

En el post test, comparando los grupos de estudio versus control (Injerto solo) mediante el método de Dunn, (Multiple Comparisons versus Control Group, Dunn's Method): no se observan diferencias en la combinación con Simvastatina 0,1 mg, pero si se observan diferencias estadísticamente significativas con Simvastatina 0,5 mg. ($P < 0,05$).

Por otra parte, en la combinación con Simvastatina 2,5 mg, no se observa mejoría, con una diferencia negativa vs control.

ESTADISTICA DESCRIPTIVA

Column	Size	Missing	Mean	Std Dev	Std. Error	C.I. of Mean
INJERTO SOLO	5	0	2,376	0,0929	0,0415	0,115
SIM 0,1 mg + INJERTO	5	0	2,762	0,182	0,0816	0,226
SIM 0,5 mg + INJERTO	5	0	3,284	0,858	0,384	1,065
SIM 2,5 mg + INJERTO	5	0	0,800	0,390	0,174	0,484

Column	Range	Max	Min	Median	25%	75%
INJERTO SOLO	0,240	2,520	2,280	2,380	2,302	2,422
SIM 0,1 mg + INJERTO	0,450	2,960	2,510	2,760	2,630	2,923
SIM 0,5 mg + INJERTO	2,110	4,610	2,500	2,980	2,643	3,883
SIM 2,5 mg + INJERTO	0,960	1,260	0,300	0,900	0,458	1,087

2) ESTADISTICA COMPARATIVA

GRUPOS DE ESTUDIO VS CONTROL

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Normality Test: Passed (P = 0,151)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Injerto	5	0	2,380	2,302	2,422
Injerto + Simvastatina 0,1 mg	5	0	2,760	2,630	2,923
Injerto + Simvastatina 0,5 mg	5	0	2,980	2,643	3,883
Injerto + Simvastatina 2,5 mg	5	0	0,900	0,458	1,087

H = 15,480 with 3 degrees of freedom. (P = 0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunn's Method):

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0,05
Injerto + Simvastatina 0,1 mg	7,800	2,085	No
Injerto + Simvastatina 0,5 mg	6,000	1,604	Yes
Injerto + Simvastatin 2,5 mg	5,400	1,443	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

MICROFOTOGRAFIAS:

A) Injerto solo



Fig. 49. Corte transversal grupo control. 4x

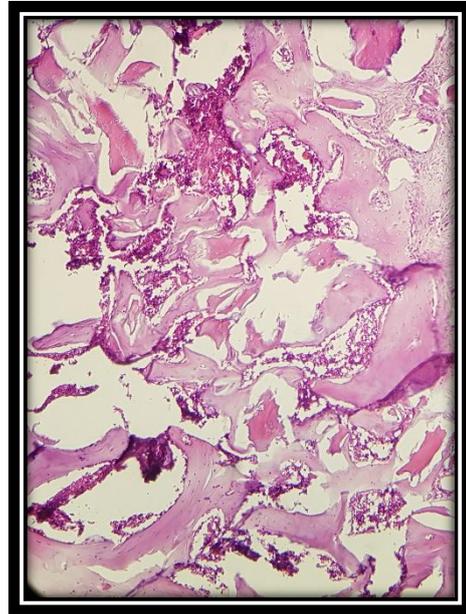


Fig. 50. corte transversal. 10x



Tabla 1- INJERTO SOLO. Superficie Regenerada. Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm2. En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos

Rango	Max	Min	Mediana	media	desv. Estándar
0,24	2,52	2,28	2,38	2,376	0,0929

B) Grupo SIM 0,1 mg

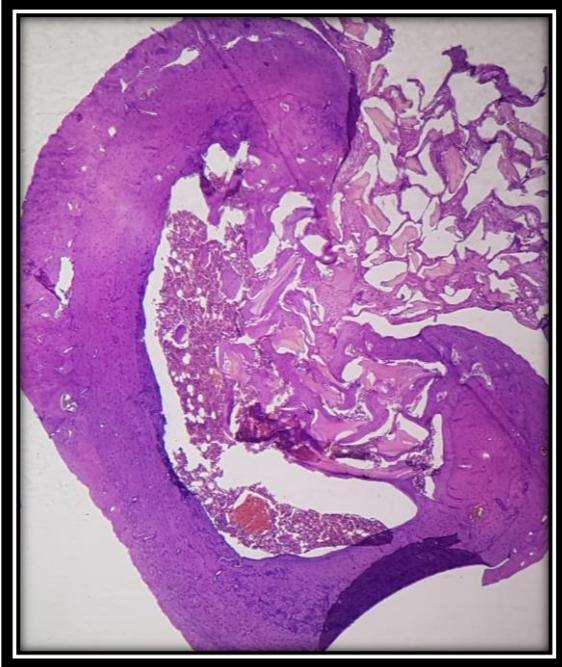


Fig. 51. Corte transversal grupo Sim 0,1 mg 4X

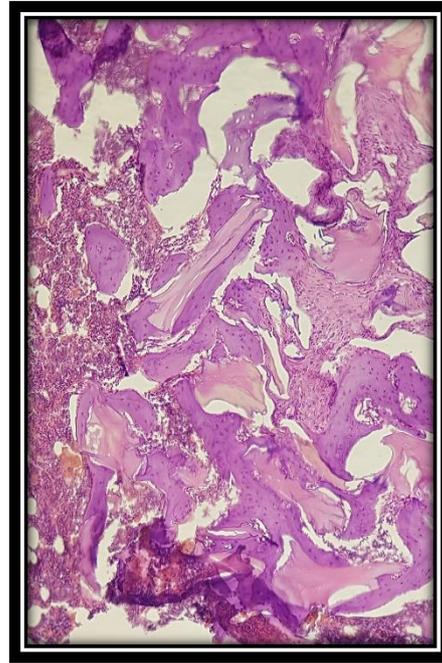


Fig. 52. Corte transversal. grupo Sim 0,1 mg al 10 X



Tabla 2- Grupo SIM 0,1 mg. Superficie Regenerada. Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm². En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos

Rango	Max	Min	Mediana	media	desv. Estándar
0,45	2,96	2,51	2,76	2,762	0,182

C) Grupo SIM 0,5 mg



Fig. 53. Corte transversal grupo Sim 0,5 mg. 4x

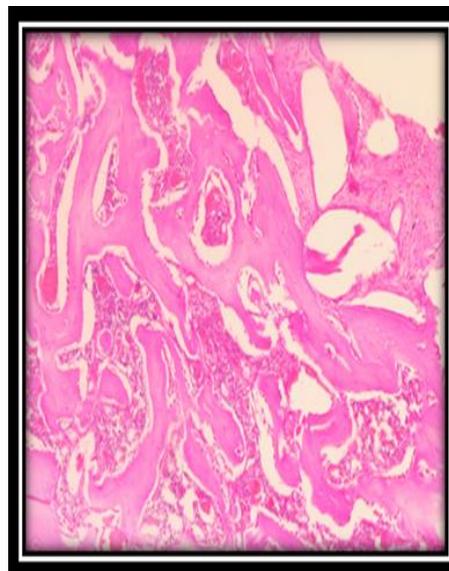


Fig. 54. Corte transversal grupo Sim 0,5 mg 10X



Tabla 3- Grupo SIM 0,5 MG. Superficie regenerada. Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm². En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivo

Rango	Max	Min	Mediana	media	desv. Estándar
2,11	4,61	2,5	2,98	3,284	0,858

D) Grupo SIM 2,5 mg



Fig. 55. Corte transversal grupo Sim 2,5 mg 4X

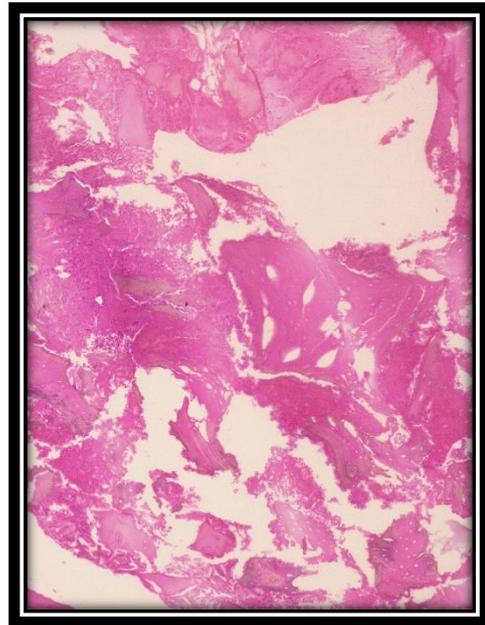


Fig. 56. Corte transversal grupo Sim 2,5 mg 10X



Tabla 4- Grupo SIM 2,5 MG. Superficie regenerada. Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm². En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos.

Rango	Max	Min	Mediana	media	desv. Estándar
0,96	1,26	0,3	0,9	0,8	0,39

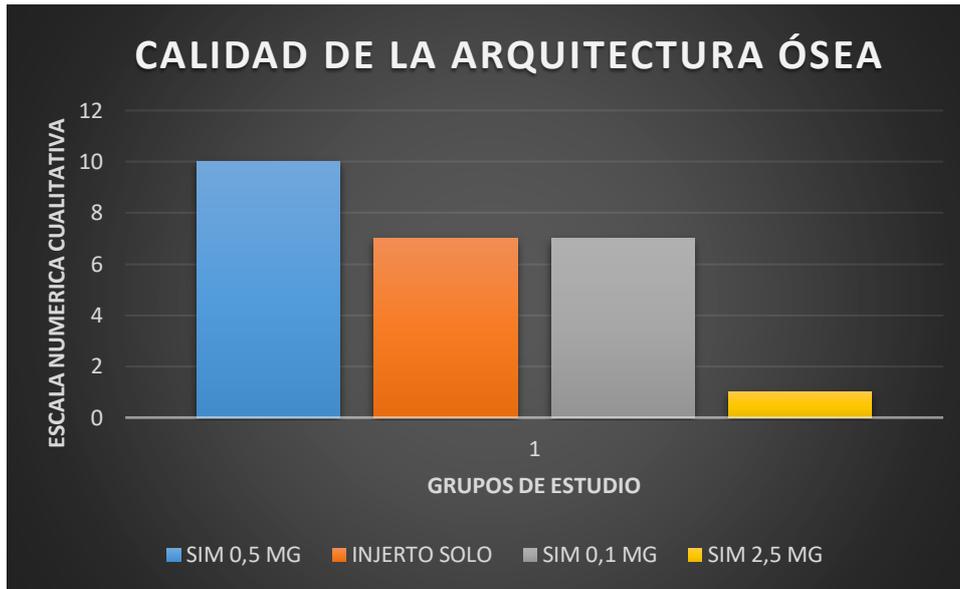


Tabla 5- Calidad de arquitectura ósea medida cualitativamente donde:

- **10. BUENA:** REGENERACIÓN COMPLETA CON PATRÓN TRABECULAR BIEN DEFINIDO
- **7. ACEPTABLE:** REGENERACIÓN COMPLETA CON PATRÓN TRABECULAR MAS IRREGULAR
- **4. REGULAR:** PATRÓN TRABECULAR IRREGULAR CON RENERACION INCOMPLETA
- **1. MALA:** REGENERACIÓN INCOMPLETA.

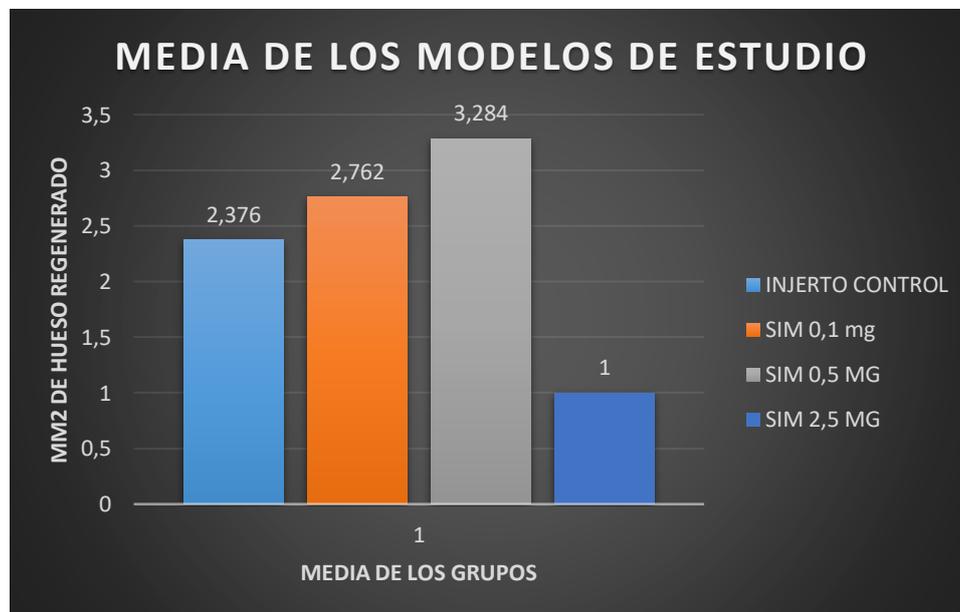


Tabla 6- En la tabla 6 se reflejan las medias obtenidas en cada grupo de estudio mostrando la diferencia del grupo de SIM 0,5 mg respecto al resto, al igual que se observa el bajo valor obtenido en el grupo SIM 2,5 mg.

7. DISCUSIÓN

Desde la difusión de los implantes dentales, los odontólogos se han encontrado en circunstancias en las que se ven obligados a colocar los implantes en las zonas donde la calidad, la cantidad y la topografía del sustrato óseo no son los ideales.

En los últimos años diversos grupos de estudios dedicados a la investigación en cirugía y traumatología bucomaxilofacial y en implantología oral han utilizado numerosos compuestos para mejorar la respuesta ósea, sea en una reconstrucción ósea o en zonas periimplantarias. Entre los más importantes encontraremos las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)^{49, 47}, los factores de crecimiento, hormonas⁴², y medicaciones que pueden tener injerencia en el metabolismo óseo, ya sea directa o indirectamente, como es el caso de los bifosfonatos⁸⁶ o las estatinas^{70, 71, 73, 76}.

La estrategia que se intenta desarrollar en este trabajo de Tesis, mediante la combinación de simvastatina con materiales de injerto óseo de origen bovino, es producir mediante estímulos externos, la estimulación de las células del organismo e inducir la regeneración local del tejido óseo de una forma óptima en el menos tiempo posible.

Diferentes investigadores demostraron a lo largo de los últimos 20 años que la simvastatina tiene un rol activo en la regeneración ósea. Muchos coinciden en que parece jugar un importante papel mediante la participación directa en la activación de los osteoblastos, aumentando la expresión de proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) y en la inhibición de los osteoclastos, e indirectamente, por estimulación neovascular debido al aumento de la secreción de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular^{7, 8, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 87}. Sin embargo, se encuentran también a lo largo de la bibliografía autores que no coinciden y en su efecto, manifiestan que la simvastatina es perjudicial para la regeneración ósea ya que encontraron reacciones inflamatorias, acompañadas de necrosis y costras^{88, 89, 90}.

Por otro lado, son varios los autores que han investigado en esta línea, cual sería la dosis y el sustrato ideal, ya que en diferentes trabajos se manifestaron que dosis bajas pueden no tener impacto en la regeneración ósea, mientras que en dosis altas pueden estimular inflamación. También

determinaron que en dosis altas pueden tener un efecto citotóxico, debido a la disminución de la formación del colesterol, el cual se sabe que es un elemento indispensable para la integridad de membrana celular ⁹¹.

En el presente trabajo se eligió como vía de administración la aplicación local de simvastatina utilizando como carrier hueso bovino, el cual se aplicó sobre un defecto óseo labrado en el fémur de las ratas de laboratorio. Este modelo de trabajo fue elegido basado en diferentes trabajos publicados con anterioridad.

La solución de simvastatina se administró en diferentes dosis, según el grupo de trabajo: 0.1, 0.5, y 2.5 mg aplicada sobre el injerto óseo bovino. Esta forma de aplicación en el momento de la cirugía es sencilla, y probablemente tendrá más aceptación por parte del paciente que la aplicación subcutánea mencionada por varios autores.

En la literatura hay múltiples vías de administración tópica de simvastatina en un defecto óseo. Stein en su estudio de 2005, aplica simvastatina en diferentes dosis y encuentra signos clínicos de inflamación que podían ser reducidos disminuyendo la dosis de simvastatina. En este estudio, demuestran que una dosis de 0.1 mg de simvastatina produce una inflamación mínima medida mediante la observación clínica y el infiltrado inflamatorio, pero que aportaba poco crecimiento óseo en comparación con el grupo control, sugiriendo como dosis óptima de simvastatina 0.5 mg ⁹² la cual es utilizada por otros autores con resultados satisfactorios ⁹³ y donde nosotros conseguimos el mejor resultado. En cambio, para Nyan y colaboradores la dosis óptima es de 0.1mg ya que es la que significativamente produce una formación ósea mayor con menor inflamación ^{70 71 94 95}. en este caso coincidimos con el trabajo de Nyan y col. en que la inflamación observada es baja, pero no encontramos la mejor regeneración ósea en esta dosis. Estas variaciones pueden deberse a diferencias entre los modelos experimentales y el biomaterial utilizado como vehículo de la simvastatina. Stein y colaboradores aplican simvastatina en el periostio en zonas mandibulares intactas ⁹², mientras que Nyan y colaboradores lo hacen en un defecto óseo en calota ^{71, 94, 95}. Como vehículo

de la simvastatina, Stein utiliza gel de metil-celulosa ⁹² mientras que Nyan ^{71,}
^{94, 95} y Rojbani ⁷⁰ utilizan fosfatos tricálcicos o hidroxiapatita.

Esta es una de las justificaciones que motivo la realización de este trabajo en donde nos planteamos evaluar la regeneración ósea obtenida con las mismas dosis de simvastatina de 0.1 y 0.5 mg. y utilizando como vehículo un injerto óseo de origen bovino, en un modelo de rata wistar con defecto crítico en el fémur.

Sin embargo otros autores como Lima y colaboradores evalúan la influencia de dosis de simvastatina de 2.2mg/50µl y 0.5mg/50µl en combinación con matriz ósea bovina desmineralizada obteniendo resultados que indican que no sólo la simvastatina no produce una mejora en el proceso de osteogénesis sino que lo dificultan y enlentece. ^{88, 89}

Las dosis deben ser escogidas con precaución considerando los beneficios y los riesgos. Todos los autores consultados en la literatura coinciden en que son necesarios más estudios para confirmar la dosis óptima para lograr los efectos terapéuticos perseguidos.

8. CONCLUSIONES

En la comparación entre grupos se observan diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,001$) Anova On Ranks.

En el post test, comparando los grupos de estudio versus control (Injerto solo) mediante el test de Dunn, no se observan diferencias en la combinación con Simvastatina 0,1 mg, pero si se observan diferencias estadísticamente significativas con Simvastatina 0,5 mg. ($P < 0,05$).

Por otra parte, en la combinación con Simvastatina 2,5 mg, no se observa mejoría, sino lo contrario, con una diferencia negativa vs control.

De esta manera, la dosis mayor de Simvastatina parecería ser perjudicial para la regeneración ósea.

En relación al patrón de regeneración ósea se observó un patrón bueno de regeneración cuando se realizó el estudio cualitativo en el grupo de SIM 0,5 mg, un patrón aceptable de regeneración en el caso del grupo CONTROL y grupo SIM 0,1 mg y una mala regeneración en el caso de la dosis más alta utilizada en el presente trabajo, SIM 2,5 mg.

Por lo tanto, y dentro de límites del presente estudio, la combinación de injerto óseo más Simvastatina 0,5 mg. parecería otorgar los mejor resultados en cuanto a capacidad de regeneración ósea.

Esta combinación fue superior a los injertos óseos normalmente utilizados de manera sola.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Urist, M.R.; Silverman, B.F.; Buring, K.; DUBUC, F.L.; and Rosenberg, J.M.: The Bone Induction Principle, Clin Orthop 53: 243-283, 1967
- ² Chen, P.Y., Sun, J.S, Tsuang, Y.H, Chen M.H., Weng, P.W and Lin, F.H. (2010) Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. Nutrition research 30: 191-199.
- ³ Henwood, J.M and Hell, R.C (1988) Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamics properties and therapeutic use in hyperlipidemia. Drugs 36: 429-454
- ⁴ Kishida, Y, Naito, A., Iwado, S., Terahara, A and Tsujita, Y. (1991) Research and development of pravastatin. Yakugaku zasshi III: 469-487.
- ⁵ Anbinder AL, Junqueira JC, Mancini MNG, Balducci I, Rocha RF da, Carvalho YR. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. Braz Dent J. 2006;17(4):267-73.
- ⁶ Davignon J: Pleiotropic effects of pitavastatin. Br J Clin Pharmacol, 2012,73:512-535
Grover HS, Luthra S, Maroo S, Maroo N. The pleotropic role of statins: Could it be the imminent host modulation agent in periodontics? Dent Res. J 2013;10:143-8.
- ⁷ Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, et al. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(3):336-42.
- ⁸ Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. Endocrinologist 2003; 144:681-92.
- ⁹ Finn Geneser. Histología sobre bases biomoleculares.3ed. Buenos Aires. Editora Médica Panamericana. 2000.
- ¹⁰ Fernández-Tresguerres Hernández-Gil Isabel, Alobera Gracia Miguel Angel, Canto Pingarrón Mariano del, Blanco Jerez Luis. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. Med. oral patol. oral cir.bucal (Internet) [Internet]. 2006 Feb [citado 2021 Dic 29]; 11(1): 47-51. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000100011&lng=es.
- ¹¹ Marks Jr, SC; Hermey, DC. "The Structure and Development of Bone" En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. "Principles of Bone Biology" 1996, Academic Press, pages. 3-14
- ¹² Price, JS et al. "The Cell Biology of Bone Growth". Eur. J. Clin. Nutr.,1994, 48: 131-149
- ¹³ Frost, HM et al. "Perspectives: A Vital Biomechanical Model of the Endochondral Ossification Mechanism" Anat. Rec., 1994, 240: 435-446

-
- ¹⁴ Luchetti C.G. Estudio comparativo de huesos en la regeneración ósea guiada. Caracterización de la respuesta frente a injertos autólogos y sustitutos de origen humano, bovino y químico. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de La Plata. 2004. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2110>
- ¹⁵ Ross. Histología texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular. 7.a ed., de Wojciech Pawlina, publicada por Wolters Kluwer
- ¹⁶ Einhorn, TA. "Biomechanics of Bone" En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. "Principles of Bone Biology" 1996, Academic Press, págs.25-38
- ¹⁷ Davies JE. Bone Engineering. Em Squared; 2000. 656 p.
- ¹⁸ Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 2000;21(4):393-411.
- ¹⁹ Zarb GA, Lekholm U, Albrektsson TO. Aging, osteoporosis, and dental implants. Quintessence Pub. Co; 2002. 280 p.
- ²⁰ Hoshi K, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone.* 1999;25(6):639-51.
- ²¹ Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. Principles of Bone Biology. Academic Press; 2008. 1024 p.
- ²² Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993;91:1888-96.
- ²³ Fernández-Tresguerres Hernández-Gil Isabel, Alobera Gracia Miguel Angel, Canto Pingarrón Mariano del, Blanco Jerez Luis. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. *Med. oral patol. oral cir.bucal (Internet) [Internet].* 2006 Abr [citado 2021 Dic 30]; 11(2): 151-157. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000200012&lng=es.
- ²⁴ Fernández-Tresguerres Hernández-Gil Isabel, Alobera Gracia Miguel Angel, Canto Pingarrón Mariano del, Blanco Jerez Luis. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Med. oral patol. oral cir.bucal (Internet) [Internet].* 2006 Feb [citado 2021 Dic 30]; 11(1): 47-51. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000100011&lng=es.
- ²⁵ Wijenayaka, A.; Kogawa, M.; Lim, H.; Bonewald, L.; Findlay, D.; Atkins, G. 2011. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PlosOne* 6: Issue 10: 1-9.
- ²⁶ Niedzwiedzki, T; Filipowska, J. 2015. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *Journal of Molecular Endocrinology.* 55: 23-36
- ²⁷ Hekimsoy Zeliha. 2008. Osteocytes-The Known and unknown. *Turk Jem.* 12: 23-7.
- ²⁸ F.J.Borrego. La fosfatasa ácido tartrato resistente ¿un marcador de reabsorción ósea potencialmente útil en la osteodistrofia renal? *Nefrología.vol. XIII. Numero 3.* 1993.

-
- ²⁹ Clarke, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3:S131-9
- ³⁰ Novack, D.V.; Teitelbaum, S.L. 2008. The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol.* 3:457-84.
- ³¹ S.R. Chuguransky. Alteraciones óseas asociadas con diabetes mellitus: mecanismos patogénicos y estrategias de tratamiento con alendronatos. Tesis doctoral. 2016.
- ³² González QJ, Rivera AS. Niveles de piridinolina (ICTP) en el fluido gingival crevicular (FGC) en la periodontitis crónica. *Odovtos-Int J Dent Sc.* 2016;18(3):61-68.
- ³³ Grant SF, Ralston SH. Genes and osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab.* 1997;8(6):232-6.
- ³⁴ Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest.* 1987;80(3):706-10.
- ³⁵ Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science.* 1978;201(4361):1138-41.
- ³⁶ Hall JE, Guyton AC. *Guyton & Hall Compendio de fisiología médica.* Elsevier España; 2007. 748 p.
- ³⁷ Jódar Gimeno E, Muñoz-Torres M, Escobar-Jiménez F, Quesada Charneco M, Luna del Castillo JD, Oleà N. Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hyperthyroidism: role of biological markers of bone turnover. *Calcif Tissue Int.* 1997;61(5):370-6.
- ³⁸ Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1989;18(4):903-18.
- ³⁹ Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología Humana*, 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1999.p.979-93.
- ⁴⁰ Reyes Garcia R, Rozas Moreno P, Muñoz Torrez M. Regulacion del proceso de remodelado óseo. Elsevier. Vol. 17. Num.1. Pag. 10-14 (enero 2008).
- ⁴¹ Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001;81(1):419-47.
- ⁴² Arrienti R. Acción local de la hormona de crecimiento en polvo liofilizado asociada a injertos óseos en cirugía implantológica. estudio experimental. Tesis de Magister en Implantología Oral. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de La Plata. 2016.
- ⁴³ Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology.* 1995;136(1):124-31.
- ⁴⁴ Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S565-72.
- ⁴⁵ Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991;263:30-48.
- ⁴⁶ Roggia C, Tamone C, Cenci S, Pacifici R, Isaia GC. Role of TNF-alpha producing T-cells in bone loss induced by estrogen deficiency. *Minerva Med.* 2004 Apr;95(2):125-32. English, Italian. PMID: 15272247.

-
- ⁴⁷ Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.
- ⁴⁸ Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35.
- ⁴⁹ Urist, M. R. Bone: Formation by autoinduction. *Science*, 150(3698):893-9, 1965.
- ⁵⁰ Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*. 1994;15(2):203-8.
- ⁵¹ Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. 2003;316:23-32
- ⁵² Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(1):2-4.
- ⁵³ Horowitz M. Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblast function and bone formation. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(1):5-7
- ⁵⁴ Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992;89:46-52.
- ⁵⁵ Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):432-44.
- ⁵⁶ Riacho J.A, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. Vol. 7. Núm. S2.páginas 1-4 (Septiembre 2011)
- ⁵⁷ Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:437-43.
- ⁵⁸ Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010;285:25103-8.
- ⁵⁹ Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008;29:155-92.
- ⁶⁰ Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009;2:56-64.
- ⁶¹ Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells*. 1999;4:353-62.
- ⁶² O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone*. 2010;46:911-9.
- ⁶³ Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986; 232:34-47.
- ⁶⁴ Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*; 1990. 343:425-30

-
- ⁶⁵ Torrez Lopez U. Efecto de la inhibición de la isoprenilación de la proteína RhoA por las estatinas lipofílicas sobre la supervivencia celular de líneas celulares de condrosarcoma. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.2015
- ⁶⁶ Fernández PL, Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. Ed. Médica Panamericana; 2008. 1404 p.
- ⁶⁷ Park J-B. The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14(9):e485-8.
- ⁶⁸ Anbinder AL, Junqueira JC, Mancini MNG, Balducci I, Rocha RF da, Carvalho YR. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. *Braz Dent J*. 2006;17(4):267-73
- ⁶⁹ Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35.
- ⁷⁰ Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A*. 2011;98(4):488-98.
- ⁷¹ Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, et al. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2010;93(1):65-73.
- ⁷² Montero J, Manzano G, Albaladejo A. The role of topical simvastatin on bone regeneration: A systematic review. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(3):e286-90.
- ⁷³ Maciel-Oliveira N, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(2):170-9.
- ⁷⁴ Chen P-Y, Sun J-S, Tsuang Y-H, Chen M-H, Weng P-W, Lin F-H. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr Res*. 2010;30(3):191-9.
- ⁷⁵ Manzano G. Factores pronósticos en implantología oral. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. 2016.
- ⁷⁶ Pachecho-Pantoja EL, Alvarez-Nemegyei J. Estatinas y osteoporosis: una promesa latente. *Reumatol Clin*. 2014
- ⁷⁷ Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:241–69.5.
- ⁷⁸ Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*.2001;287:337–42.6.
- ⁷⁹ Yoshikawa H, Yoshioka K, Nakase T, Itoh K. Stimulation of ectopic bone formation in response to BMP-2 by Rho kinase inhibitor: A pilot study. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467:3087–95.7

-
- ⁸⁰ Fisher J.E, Rogers M.J, Halasy J.M, Luckman S.P, Hughes D.E, Masarachia P.J, Wesolowski G, Russell R.G.G, Rodan G.A, and Reszka A.A. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 96, pp 133-138 January 1999.
- ⁸¹ Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K. Statins modulate the levels of osteo-
protegerin/receptor activator of NFkappaB ligand mRNA in mouse bone-cellcultures. Horm
Metab Res. 2005;37:589–92.
- ⁸² Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. Partnership between DPC4and SMAD
proteins in TGF-beta signalling pathways. Nature. 1996;383:832–6.11
- ⁸³ Herrera B, Sánchez A, Fabregat I. BMPS and liver: more questions than answers. 2012
Mar; [Pubmed]
- ⁸⁴ Herrera B, Dooley S, Breitkopf-Heinlein K. Potential roles of bone morphogenetic protein
(BMP)-9 in human liver diseases. Review 2014 Mar; [Pubmed]
- ⁸⁵ Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P (2009) Recent advances in BMP receptor signaling.
Cytokine Growth Factor Review 20: 343–355.
- ⁸⁶ Fisher J.E, Roger M.J, Halasy J.M, Luckman, S.P, Hughes D.E, Masarachia P.J, Wesolowski
G, Russel R.G.G, Rodan G.A, Reska A.A. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol,
an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone
resorption, and kinase action in vitro. Proc.Natl. Acad.Sci. USA. Vol.96,pp. 133-138.january
1999
- ⁸⁷ Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone
following tooth extraction. Int J Oral Maxillofac Surg. 2008 Feb;37(2):170-6.
- ⁸⁸ Villaboim de Castro Lima C.E, Calixto J.C, Anbinder A.L. Influence of the association
between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. Braz Oral
Res. 2011. Jan-Feb;25(1):42-8.
- ⁸⁹ Calixto J.C, Villaboim de Castro Lima C.E, Frederico L, Pio dos Santos de Castro Lima R,
Anbinder A.L. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in
rats. Journal of cranio-Maxillo-Facial Surgery 39(2011)215-220.
- ⁹⁰ Von Stechow D, Fish S, Yahalom D, Bab I, Chorev M, Müller R, *et al.* Does simvastatin
stimulate bone formation *in vivo*? BMC Musculoskelet Disord. 2003 Apr 28;4:8.
- ⁹¹ Benoit DS, Nuttelman CR, Collins SD, Anseth KS. Synthesis and characterization of a
fluvastatin- releasing hydrogel delivery system to modulate hMSC differentiation and fuction for
bone regeneration. Biomaterials. 2006 Dec;27(36):6102-10.
- ⁹² Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, et al. Local simvastatin
effects on mandibular bone growth and inflammation. J Periodontol. 2005;76(11):1861-70.
- ⁹³ Ozeç I, Kiliç E, Gümüş C, Göze F. Effect of local simvastatin application on mandibular
defects. J Craniofac Surg. 2007;18(3):546-50.

⁹⁴ Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci.* 2007;104(4):384-6.

⁹⁵ Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(3):280-7.