



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA  
MAGÍSTER EN IMPLANTOLOGÍA ORAL**

**TESIS DE MAGISTER**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE INJERTOS DE HUESO EN  
REGENERACION OSEA GUIADA. CARACTERIZACIÓN DE LA  
RESPUESTA FRENTE A INJERTOS AUTÓLOGOS Y  
SUSTITUTOS DE ORIGEN HUMANO, BOVINO Y QUÍMICO”**

Realizada en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata  
durante el período 2002-2004

**MAESTRANDO:  
OD. CÉSAR GABRIEL LUCHETTI**

**DIRECTOR:  
PROF. DRA. ALICIA KITRILAKIS**

*AÑO 2004*

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE INJERTOS DE HUESO EN  
REGENERACION OSEA GUIADA. CARACTERIZACIÓN DE LA  
RESPUESTA FRENTE A INJERTOS AUTÓLOGOS Y  
SUSTITUTOS DE ORIGEN HUMANO, BOVINO Y QUÍMICO”**

**A mis Abuelos y a mi Madre**

## AGRADECIMIENTOS

---

**Prof. Dra. Alicia Kitrilakis,**  
por su apoyo incondicional y la dirección de este trabajo.

**Prof. Dra. Mercedes Medina,**  
por su constante estímulo en el área de la investigación

**Prof. Dra. Cecilia Carbone,**  
por abrirme las puertas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y asesorarme en el manejo de los animales de laboratorio.

**Dr. Miguel Ayala,**  
colaborador imprescindible, sin quien el esfuerzo que significó este proyecto me hubiera superado.

**Prof. Dra. Graciela Durso,**  
por su asesoramiento en nuestros comienzos.

**Prof. Dr. Enrique Portiasky,**  
por su ayuda en las mediciones de los preparados histológicos.

# INDICE GENERAL

---

Título .....	1
Agradecimientos .....	3
Índice .....	4
Resumen .....	5
Introducción .....	8
Marco Teórico .....	12
Objetivos .....	42
Material y Métodos .....	43
Resultados .....	62
Discusión .....	76
Conclusiones .....	83
Bibliografía .....	85

## RESUMEN

---

El objetivo del presente trabajo es evaluar injertos de hueso de distintos orígenes y formas, y estudiar el efecto de los mismos en la regeneración ósea. Se utilizaron 60 ratas macho, de cepa Fisher 344 (F344/N), originarias del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU., y producidas en Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, endocriadas, libres de patógenos específicos (SPF), de 16 semanas de edad y de 500 gramos de peso. Los animales fueron divididos en 6 grupos de 10 cada uno y operados bajo anestesia general con ketamina/xilacina 75 mg/kg + 10 mg/kg por vía IM. Se les realizó en el fémur una perforación de 3 mm de ancho por 9 mm de largo por 3 mm de profundidad. Al grupo 1 se le injerto hueso autólogo obtenido con un filtro, al grupo 2 hueso humano en partículas, al grupo 3, hueso humano en forma de gel, al grupo 4 hueso bovino en partículas, al grupo 5 fosfato tricálcico en esferas y el grupo 6 no recibió tratamiento, quedando como control. Los animales permanecieron en la sala donde fueron intervenidos durante las primeras 24 hs a temperatura constante de 28 ° C, y luego de ese período pasaron a ser alojados en el pabellón de animales de experimentación del Bioterio de la FCVUNLP. Como complemento en el postoperatorio recibieron Ácido Acetilsalicílico y alimento balanceado. A los 30 los animales días fueron sacrificados y se realizaron los preparados para microscopía. Las muestras fueron digitalizadas y se evaluó la superficie de nuevo hueso, es decir el hueso regenerado, dentro del defecto. La segmentación y el calculo 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 ha funcionado correctamente y no han presentado mayores inconvenientes en su ejecución. Los injertos utilizados no generaron respuestas adversas en ninguno de los casos. La mayor cantidad de regeneración fue obtenida con el hueso autólogo, seguida por el fosfato tricálcico, el hueso bovino, el hueso humano en partículas, el hueso humano en gel y por último el defecto control. La mejor calidad ósea, en cuanto a su patrón arquitectónico, se observó con el fosfato tricálcico y el hueso autólogo, seguidas por el hueso bovino y el humano en partículas, luego el humano en gel y por último el defecto control. Estos resultados ratifican al hueso autólogo como el patrón de referencia en el tratamiento de grandes defectos óseos. La obtención con el filtro colector usado aquí aparece como menos traumática, con respecto a otras metodologías. El fosfato tricálcico ha mostrado un excelente comportamiento como material de injerto, no solo por la regeneración obtenida, sino fundamentalmente por la excelente arquitectura lograda. Los huesos humano y bovino en partículas han mostrado un comportamiento muy similar, con una buena cantidad de regeneración ósea, aunque con una menor calidad que los casos anteriores. El hueso humano en forma de gel, no logró la regeneración completa del defecto, observándose una gran cavidad residual. Sin embargo en la zona en la que alcanzó a inducir nuevo hueso, este es de una densidad importante, lo cual lo situaría para uso en defectos pequeños o como adyuvante en la consolidación de fracturas. Dentro de los límites del presente trabajo, se puede concluir que el hueso autólogo debería ser usado siempre que se pueda. En caso necesario de recurrir a un sustituto, se

debería considerar al fosfato tricálcico como de primera elección. En una tercera línea podrían usarse los huesos particulados tanto humano como bovino. El hueso humano en forma de gel no debería usarse en el tratamiento de grandes defectos.

## INTRODUCCIÓN

---

El hueso es un tejido altamente especializado que cumple básicamente dos funciones: por un lado le da integridad mecánica al esqueleto con fines de locomoción y protección; y por otro, participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis mineral.<sup>1</sup>

En la boca, brinda soporte a las piezas dentarias, a través del ligamento periodontal, para permitir una adecuada masticación, disipando a su vez las fuerzas que de ella se generan.

La pérdida ósea puede deberse a patologías sistémicas, como la Osteoporosis primaria (por deficiencia de estrógenos) o secundaria (alteraciones hormonales, fármacos, etc)<sup>2</sup>, Mieloma Múltiple, Enfermedad de Paget, entre otras, o a problemas locales como quistes, tumores, fracturas, etc.<sup>3</sup>

A nivel oral la causa más común es la pérdida de las piezas dentarias, ya que al desaparecer éstas se elimina el estímulo mecánico de la masticación, para el mantenimiento del hueso, lo que lleva a reabsorción de las apófisis alveolares.

Otras causas también incluyen quistes y tumores de los maxilares, fracturas, exodoncias traumáticas, o cargas oclusales y/o protéticas mal distribuidas.

La pérdida de piezas dentarias puede deberse a caries extensas, traumatismos, o enfermedad periodontal. Esta última es, quizás, la más complicada en cuanto a la pérdida ósea, ya que la misma se va produciendo mientras el diente aún está en la boca, y se agrava al comenzar la movilidad

del mismo, ya que está produciendo presiones no fisiológicas sobre el alvéolo dental, que aceleran el proceso de reabsorción ósea.

La pérdida ósea maxilar es, en primera instancia, causa de movilidad dentaria, la cual es, a su vez, causa de mayor reabsorción de hueso, como mencionamos más arriba.

Una vez perdida una cierta cantidad de piezas, las prótesis utilizadas para su reemplazo muchas veces necesitan de apoyo directo sobre la mucosa, lo cual transmite cargas no funcionales al hueso subyacente, aumentando su reabsorción.

En el edentulismo total desaparece toda la parte ósea alveolar, dando lugar a cambios morfológicos que implican alteraciones faciales estéticas importantes, por pérdida de soporte de tejidos blandos; y funcionales, ya que los rebordes residuales no son generalmente suficientes para una adecuada retención de las prótesis. Esto último ha podido ser parcialmente solucionado con el advenimiento de la implantología oral. Sin embargo, en ocasiones la pérdida ósea es tal que la colocación de implantes resulta imposible. Por esto, en los últimos tiempos, las investigaciones han estado centradas en crear nuevo hueso donde sea necesario.

Los comienzos en la búsqueda de la regeneración ósea en los maxilares fueron con el fin de aumentar el hueso alrededor de las piezas dentarias que no tienen soporte suficiente; y, posteriormente han sido trasladados, en los casos más extremos, a formar nuevo tejido óseo para permitir la inserción de implantes dentales.

Con este fin se han utilizado diversos materiales y técnicas. Dentro de ellos están las membranas, que actúan como una barrera para mantener el

volumen de los defectos del hueso, aislándolo a su vez del tejido conjuntivo.<sup>4, 5, 6</sup>

No obstante, cuando el defecto óseo a tratar es muy grande, o bien no es favorable, es necesario realizar injertos de hueso para ganar el volumen perdido. El uso de hueso del mismo paciente ha sido probado, y es elegido como primera opción para estos procedimientos, aunque conlleva una cirugía adicional para tomar el hueso a injertar, usualmente de la zona del mentón, trígono retromolar, tuberosidad del maxilar, y en menor medida de calota craneana o cresta ilíaca, dependiendo de la cantidad necesaria.<sup>7, 8, 9</sup>

Sin embargo, muchas veces para los pacientes esta cirugía adicional es muy traumática. Para evitar este problema, se han propuesto aloinjertos (hueso humano procesado en diferentes formas), xenoinjertos (por ej. hueso bovino), o material aloplásticos a base de fosfato de calcio.<sup>10, 11, 12</sup>

No obstante, aun no se ha determinado cual de ellos es el más beneficioso, y de mejor comportamiento en cuanto a la regeneración del hueso. Esto se debe en parte a la variabilidad de los tipos de estudio y a las diferencias entre el procesamiento y la elaboración de los materiales, aún dentro de los de un mismo tipo.

Los injertos a base de hueso bovino o humano en partículas llevan más tiempo de uso, aunque su respuesta es muy variada desde el punto de vista clínico, presentando además varios inconvenientes en cuanto a su manipulación, así como su colocación y mantenimiento en el lecho receptor. La nueva formulación de hueso humano de banco procesado en formas de gel ha generado una verdadera revolución en el tema, debido a su propuesta mayor facilidad de manipulación. Sin embargo, el escaso tiempo que lleva en

el mercado, determina pocos estudios independientes, que hayan valorado la verdadera funcionalidad de los mismos.

Por esta razón, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta ósea frente diferentes biomateriales, así como también a una nueva forma de obtener el hueso autólogo.

# MARCO TEÓRICO

---

Es conveniente analizar en este punto las bases que dan sustento y facilitan la comprensión del presente trabajo, así como el estado actual del tema.

En este sentido, creemos oportuno estudiar consecutivamente la estructura y biología ósea, fundamentar los procesos regenerativos, diferenciándolos de los reparativos, y por último, evaluar las técnicas y materiales utilizados hasta el momento con el fin de obtener una adecuada regeneración de hueso.

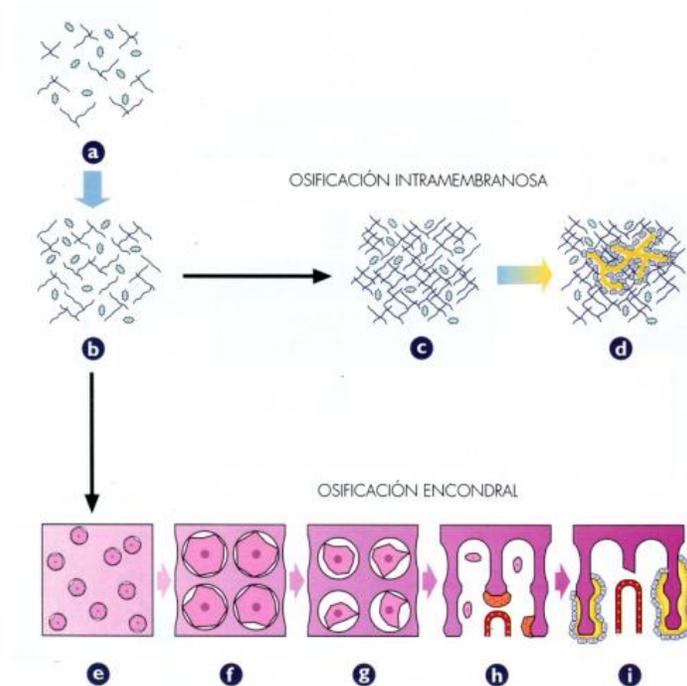
## I. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA ÓSEA

Como expresamos en la introducción el hueso es un tejido altamente especializado que cumple básicamente dos funciones: por un lado le da integridad mecánica al esqueleto con fines de locomoción y protección; y por otro, participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis mineral.

### 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. (Fig.1) En condiciones normales se forma antes que nada, hueso esponjoso, cuyas estructuras están representadas por trabéculas delgadas que se engrosan sucesivamente. El hueso compacto aparece solo en un segundo tiempo, por

adelgazamiento de los espacios entre las trabéculas, con confinamiento de los espacios vasculares en el interior de delgados canales para el mantenimiento del trofismo celular.<sup>7</sup>



**Fig.1.** Osteogénesis. El esquema refleja los principales procesos de los dos tipos de osificación. A. Mesénquima. B. Mesénquima con aumento de densidad. C. Esbozo de tejido fibroso. D. Osteogénesis. E. Esbozo de cartílago hialino. F. Cartílago hipertrófico. G. Cartílago calcificado. H. Condrólisis. I. Osteogénesis

### 1.1 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 osteoide, 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.<sup>1, 13</sup>

## **1.2 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.

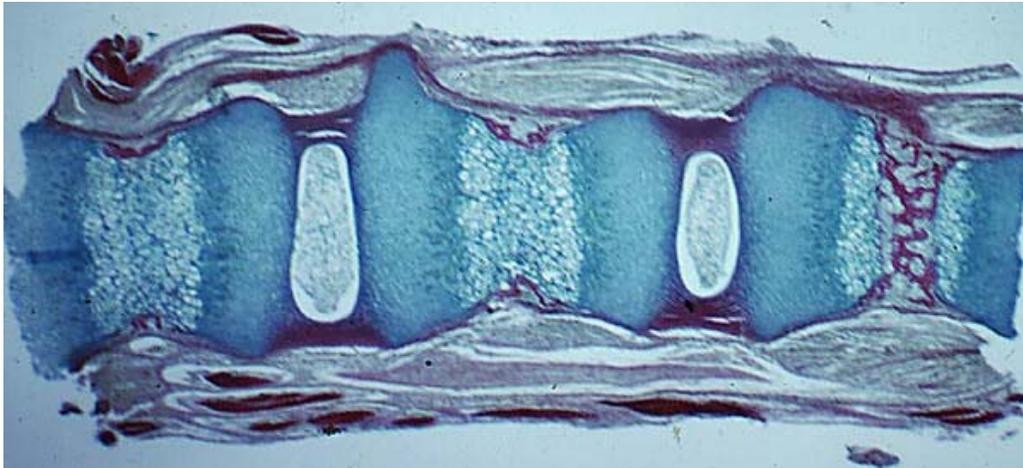
Los segmentos esqueléticos donde se puede apreciar mejor este proceso, están representados por los huesos largos de las extremidades.

Inicialmente se desarrolla un modelo cartilaginoso que adopta una forma parecida a la del hueso en formación.(Fig.2). 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 fosfato 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. (Fig.3)

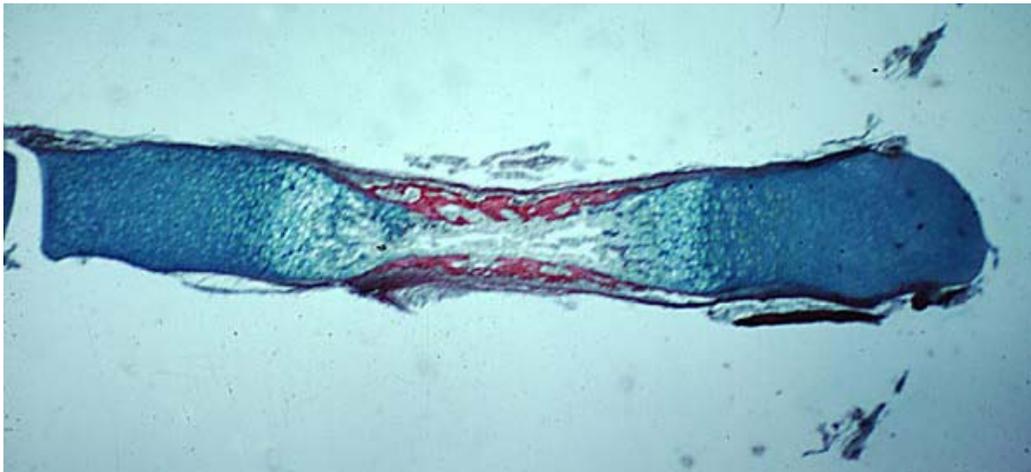
Del tejido conjuntivo perióstico que rodea este collar óseo se producen aperturas en el mango que permiten a los vasos sanguíneos en crecimiento penetrar en la diáfisis, a través de una actividad macrofágica, que se extiende después al interior de la matriz cartilaginosa calcificada, hasta transformar 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.<sup>1, 14</sup>



**FIG. 2.** Modelo cartilaginoso del hueso en formación.



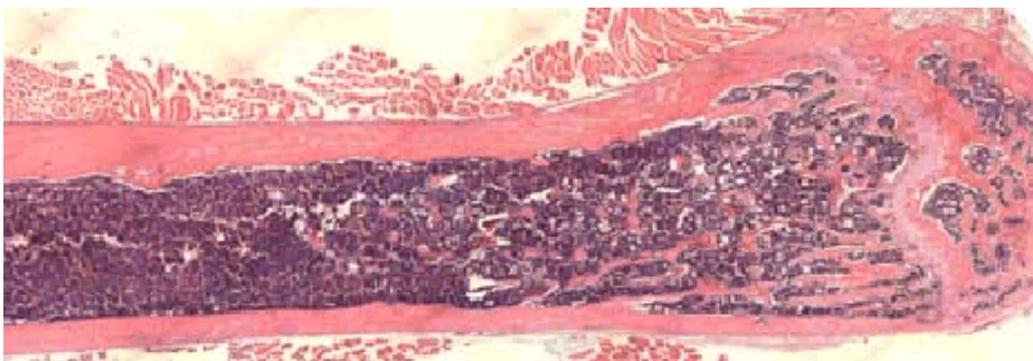
**Fig.3.** Tejido óseo formando el mango perióstico alrededor de la parte central de la diáfisis.

## 2. ESTRUCTURA

Independientemente de su origen distinguimos en el hueso elementos comunes que analizaremos a continuación.

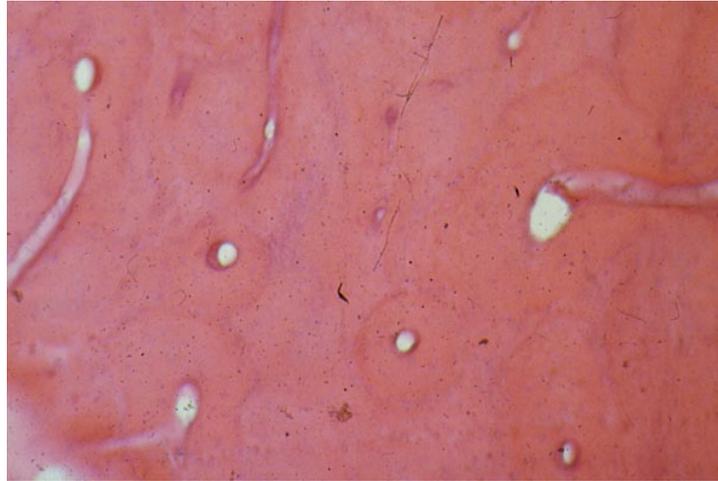
### 2.1 MACROSCOPICA

Observamos dos porciones, un hueso cortical, más compacto, ubicado en la parte exterior, y un hueso esponjoso, más poroso, en la parte central. (Fig.4). Estos representan el 80 % y el 20 % de la masa ósea respectivamente. Sin embargo, las 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. <sup>7, 15, 16</sup>



**Fig.4.** Disposición del hueso trabecular y cortical. Fémur de rata.

**HUESO COMPACTO.** El tejido óseo se organiza en tres formas distintas, formando los sistemas de Havers, sistemas laminillares intersticiales, y sistemas circunferenciales externo e interno. (Fig.5).



**FIG.5.** Hueso compacto.

Cada sistema de Havers ("osteón") consiste en un largo cilindro hueco cuyas paredes están formadas por un número variable de laminillas óseas concéntricas, dispuestas de tal modo que las fibrillas colágenas paralelas de cada laminilla están orientadas en forma perpendicular a la de las laminillas vecinas, entre las laminillas disponen las lagunas, que contienen los osteocitos, con los canalículos dirigidos de preferencia en forma radial hacia la cavidad central que corresponde al conducto de Havers el cual se comunica con los conductos de Volkman y contiene vasos sanguíneos y nervios, rodeados de escaso tejido conjuntivo laxo.

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.

Los sistemas de laminillas intersticiales son grupos de laminillas paralelas de forma irregular que ocupan los espacios entre sistemas de Havers y sistemas circunferenciales.

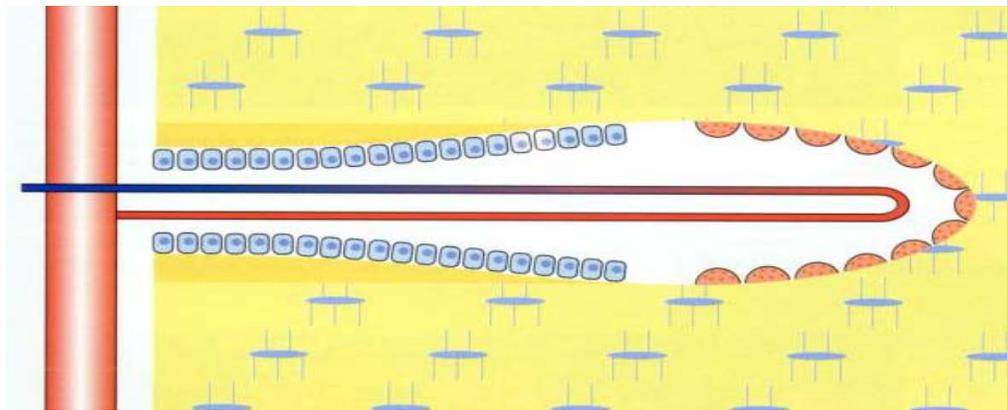
Ellos corresponden a restos de sistemas de Havers que han sido parcialmente removidos durante los procesos de crecimiento y de remodelación ósea.

Los sistemas de laminillas circunferenciales interno y externo se observan en los huesos que han terminado su proceso de crecimiento y consisten en laminillas óseas paralelas entre sí que forman bandas de grosor variable bajo el periostio y el endóstio, recibiendo sus osteocitos su nutrición desde vasos sanguíneos del tejido conjuntivo

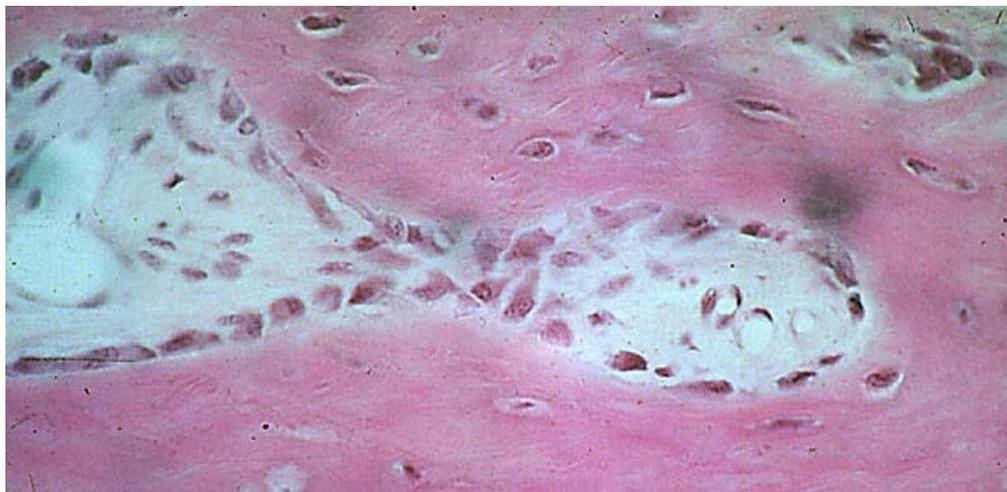
*Remodelación del hueso compacto.* En la unidad de remodelación ósea del hueso compacto existen un cono perforante que avanza y un cono de cierre que le sigue.

El cono perforante o conducto de reabsorción contiene osteoclastos activos adyacentes a los cuales avanzan removiendo el tejido óseo que no está respondiendo a tracción ni compresión y van formando un conducto a expensas de partes de sistemas de Havers existentes y porciones de sistemas de laminillas intersticiales el cual va siendo ocupado por un asa capilar con pericitos y rodeada de células preosteoblásticas. El diámetro de este conducto establece el diámetro del nuevo sistema de Havers que se va a formar en él. Las células preosteoblásticas se diferencian a osteoblastos y

comienzan a sintetizar la matriz orgánica del hueso (osteóide) y a depositarla sobre las paredes del conducto en laminillas sucesivas. Posteriormente la matriz ósea de cada laminilla se mineraliza. A medida que avanza el depósito de laminillas hacia el centro del conducto los osteoblastos van quedando atrapados en la matriz ósea, transformándose en osteocitos y el diámetro del conducto se va estrechando hasta alcanzar el diámetro del conducto de Havers maduro, el cuál contiene capilares, células de revestimiento óseo y escaso conjuntivo laxo.<sup>16</sup> (Figs.6 y 7)

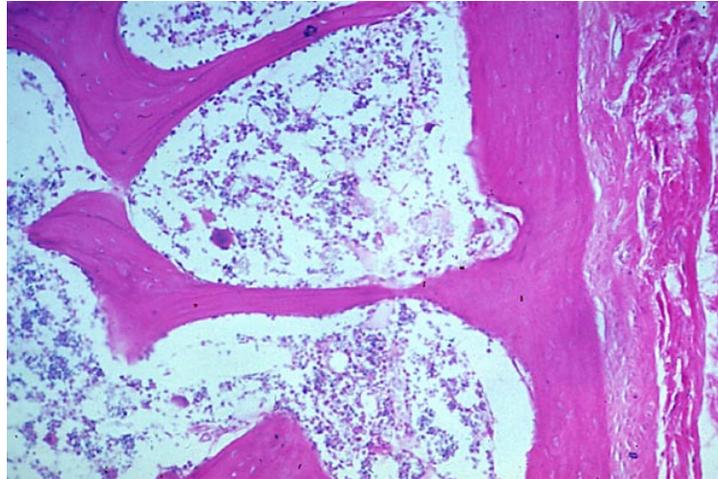


**Fig.6.** Remodelado de hueso compacto. Cono de corte. Se observan los Osteoclastos en naranja y los Osteoblastos en azul.



**Fig.7.** Remodelado de hueso compacto

**HUESO ESPONJOSO.** Está formado por delgadas trabéculas, que, en los huesos ya formados, corresponden a tejido óseo laminillar rodeadas por células de revestimiento óseo. Los osteocitos de las trabéculas óseas se mantienen desde los capilares sanguíneos vecinos ubicados en la médula ósea. (Fig.8)



**Fig.8.** Hueso esponjoso. Se observan trabéculas y médula ósea en los espacios entre las mismas.

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.<sup>15</sup>

## 2.2 MICROSCÓPICA

Consideramos una matriz extracelular y cuatro tipos celulares: Osteoblastos, Osteoclastos, Osteocitos y Células de Revestimiento (Bone Lining Cells)

### 2.2.1 MATRIZ OSEA

El hueso debe sus características de dureza y resistencia a la composición de su matriz extracelular. El 70 % esta compuesto por la parte inorgánica y el 30% restante por la orgánica.<sup>7, 17</sup>

**Matriz inorgánica.** Está formada por cristales muy pequeños cuyo componente principal es la hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$  asociada a cantidades variables de carbonato. Además del calcio, fosfatos, hidroxilos y carbonatos, se encuentran también aniones citrato, fluoruros, cloruros, cationes magnesio, sodio, potasio, estroncio, hierro, zinc, etc. Algunos de los mismos pueden sustituir al calcio en la mineralización y, por lo tanto, son denominados cationes osteotropos.

**Matriz orgánica.** Esta formada por dos componentes: fibrilar (95%) y no fibrilar (5%). El componente fibrilar esta representado casi exclusivamente por colágeno de tipo I. La parte no fibrilar está formado por proteínas no colágenas, como la osteocalcina, la osteonectina, fosfoproteinas, proteoglicanos, sialoproteinas y seroproteinas. Este último grupo de

biomoléculas no forma parte directamente de la constitución estructural del hueso, sino que desempeña un rol de regulación.

## **2.2.2 CÉLULAS ÓSEAS**

### **OSTEOBLASTOS**

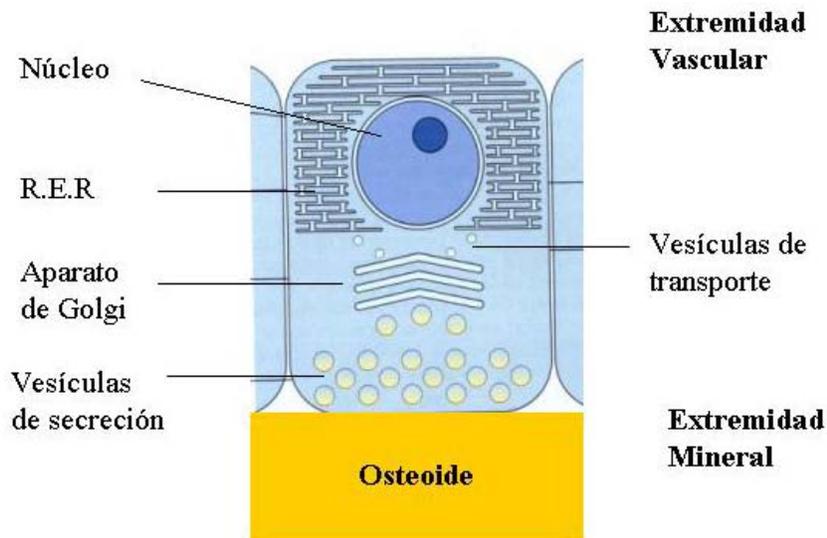
Los osteoblastos son células diferenciadas que sintetizan el colágeno y la sustancia fundamental ósea. (Fig.9)

Cuando están en plena actividad su forma es cuboide con un citoplasma basófilo, además de un prominente aparato de Golgi. Son células polarizadas que vacían sus productos de secreción por la zona del citoplasma en contacto con la matriz ósea ya formada, (matriz intercelular preósea o osteoide)

Los osteoblastos son células poliédricas con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas que son rodeadas por el osteoide producido y que se asocian mediante uniones de comunicación (nexos o gap junction) con prolongaciones similares de los osteoblastos vecinos.

Los osteoblastos participan también en el proceso de mineralización de la matriz orgánica ya que producen vesículas de matriz, de unos 100nm de diámetro, rodeadas de membrana celular, las que acumulan  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{PO}_4^-$  y son ricas además en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas que capaces de generar iones  $\text{PO}_4^-$ , elevando su concentración en el medio extracelular y creando centros de nucleación para el depósito de las sales minerales.

Los osteoblastos tienen dos destinos posibles: ser rodeados por la matriz ósea que producen y pasan a ser osteocitos o permanecer en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo.<sup>18, 19</sup>



**FIG.9.** Osteoblasto.

### **OSTEOCITOS**

Son las células propias del tejido óseo formado. (Fig.10). Son capaces de sintetizar y de reabsorber, en forma limitada, a componentes de la matriz ósea ("osteólisis osteocítica"), procesos que tienen importancia en la regulación de la calcemia. Cada osteocito, bañado por una delgada capa de líquido tisular, ocupa su laguna y proyecta sus prolongaciones citoplasmáticas por los canaliculos, dentro de los cuales, toma contacto con prolongaciones de osteocitos vecinos mediante uniones de comunicación, o con células de revestimiento óseo bañadas por el líquido tisular del tejido conjuntivo que rodea a los capilares sanguíneos.<sup>20</sup>

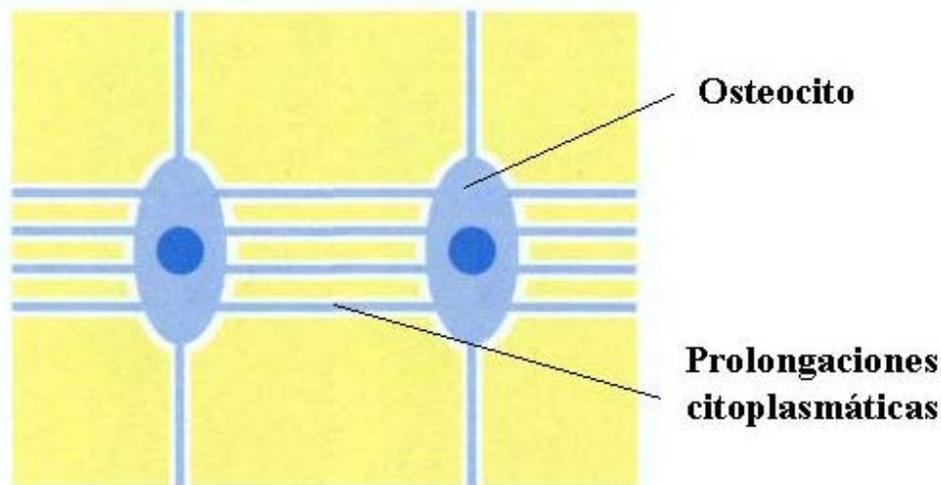


Fig.10. Osteocitos.

### **CELULAS DE REVESTIMIENTO**

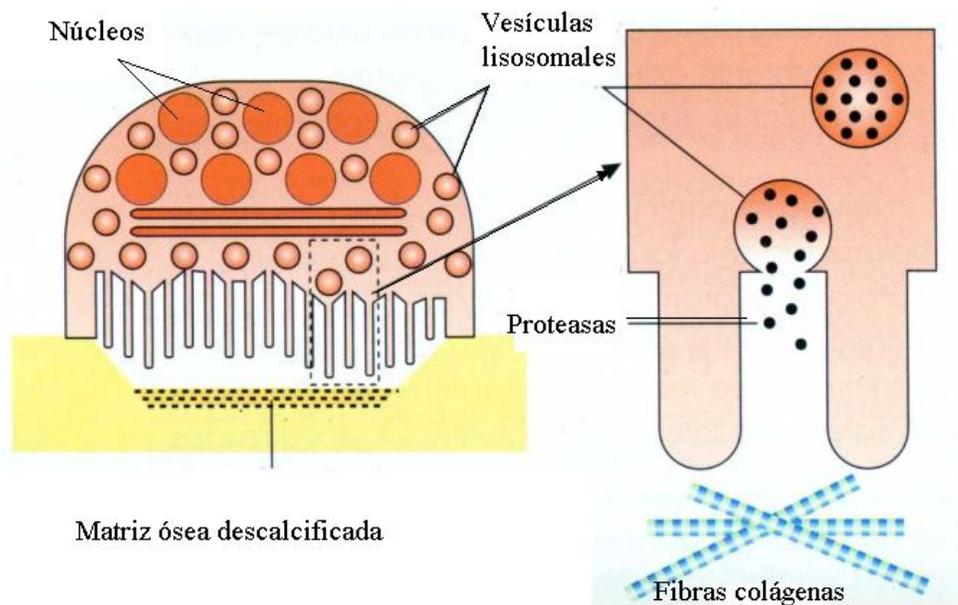
Son células aplanadas que revisten las superficie óseas del interior de los huesos, y en su mayor parte corresponden a osteoblastos inactivos que están asociados entre sí y con prolongaciones de los Osteocitos. Junto con estos, son capaces de ser estimulados por factores mecánicos u hormonales y/o locales, para iniciar el proceso de remodelado óseo.<sup>7</sup>

### **OSTEOCLASTOS**

Son células móviles, gigantes y multinucleadas y se localizan adosadas a la superficie de tejido óseo que debe ser removido.

Se originan por fusión de monocitos que han abandonado la sangre. Contienen numerosos lisosomas y en la superficie del osteoclasto que esta en contacto con la matriz a remover se distinguen dos zonas distintas: un anillo externo o zona clara que corresponde a una especialización de la superficie celular en que la membrana se asocia estrechamente al hueso que delimita el área que se va a reabsorber, y la región central o borde estriado que presenta profundos repliegues de la superficie celular. La membrana de los lisosomas primarios se fusiona con la membrana celular

que reviste a los repliegues del borde festoneado, liberando las enzimas lisosomales hacia el exterior y produciendo una acidificación del microambiente que baña al tejido óseo a reabsorber. El borde festoneado contiene además gran cantidad de vesículas endocíticas y lisosomas secundarios, indicando que ocurre además un proceso de fagocitosis del material parcialmente solubilizado por el ambiente ácido y la acción lítica de la enzimas lisosomales.<sup>21</sup> (Fig.11)



**Fig.11.** Osteoclasto. Mecanismo de reabsorción.

### 3. METABOLISMO OSEO

El hueso es un tejido en constante recambio, el cual mediante un proceso reconocido como bone turnover (recambio óseo) se renueva constantemente. A nivel celular es llamado también como BMU (Basic Multicelular Unit) o Unidad Multicelular Básica, ya que intervienen todas las células óseas de manera coordinada. Comprende cuatro fases: Activación, Reabsorción, Neoformación y Mineralización.<sup>22</sup>

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.<sup>23</sup>

La *PTH (Parathormona)* se secreta por las glándulas paratiroideas y es importante para el mantenimiento de la calcemia. Esta hormona aumenta la resorción ósea, aumenta la reabsorción tubular renal de calcio, y aumenta la absorción intestinal de calcio estimulando la síntesis renal de 1,25-vitamina D; por lo tanto aumenta la calcemia. Su secreción aumenta cuando desciende la calcemia y disminuye cuando esta aumenta.

La *Vitamina D* es producida principalmente por la piel. En la piel se sintetiza por la acción de la luz solar, pero debe transformarse en 1,25-vitamina D, para ejercer actividad biológica. Esta transformación se produce principalmente en el riñón por estímulo de la PTH. Produce un aumento en la absorción intestinal de calcio, manteniendo los niveles normales de calcemia contribuyendo a la normal mineralización del hueso.

La *Calcitonina* es una hormona secretada por las células C de la glándula tiroides. Su secreción se estimula por varios factores, entre ellos el aumento de la calcemia. Sus efectos predominantes son el descenso de la resorción ósea y de la reabsorción tubular renal de calcio.

Otras hormonas actúan sobre el metabolismo del calcio y del hueso, como los esteroides gonadales y suprarrenales, la tiroxina, la insulina y la hormona del crecimiento, aunque, a diferencia de las hormonas calciotropas, su secreción no depende principalmente de la concentración extracelular de calcio.

La concentración de las hormonas que regulan el metabolismo del calcio determina la dirección del recambio óseo, pero los factores locales modulan el efecto final y, a su vez, modifican la concentración de las hormonas y la respuesta biológica a nivel de los osteoblastos y los osteoclastos. Entre los factores locales implicados se destacan el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas(PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), las proteínas morfogenéticas óseas(BMP), la interleukina 1 (IL1) y 6 (IL6), el factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citocinas.<sup>24</sup>

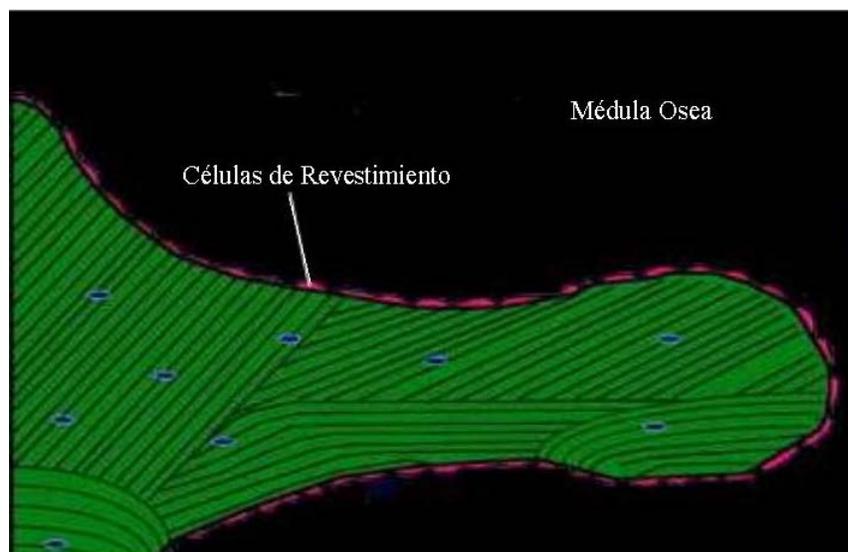
**Sistema de señales entre las células óseas.** Las células del estroma osteoblástico están esencialmente implicadas en la función y diferenciación osteoclástica a través del contacto célula-célula.

Algunos estudios demostraron la presencia de un factor en la membrana de las células osteoblásticas, miembro de la superfamilia de ligandos del FNT ( Factor de Necrosis Tumoral): el RANKL (Ligando Receptor del Activador del Factor Nuclear Kappa-B). Su producción es máxima en las células indiferenciadas del estroma y se reduce a medida que madura el fenotipo osteoblástico. Estimula la diferenciación, supervivencia y fusión de las células precursoras de osteoclastos, activa los osteoclastos

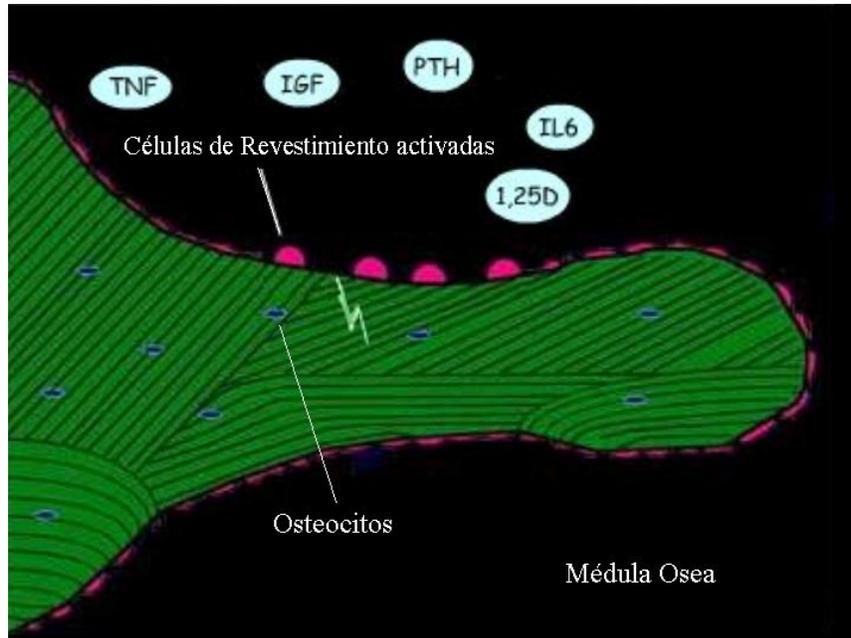
maduros y prolonga su vida útil. Como resultado permite la expansión de la masa osteoclástica activa capaz de formar sitios de resorción ósea.

Los efectos del RANKL están mediados por su unión a un receptor altamente específico: el RANK, al cual activan. Es una proteína transmembrana expresada por los osteoclastos. La unión del RANK (Receptor del Activador del Factor Nuclear Kappa-B ) con su ligando (RANKL) induce la activación de una cascada de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los osteoclastos.<sup>23</sup>

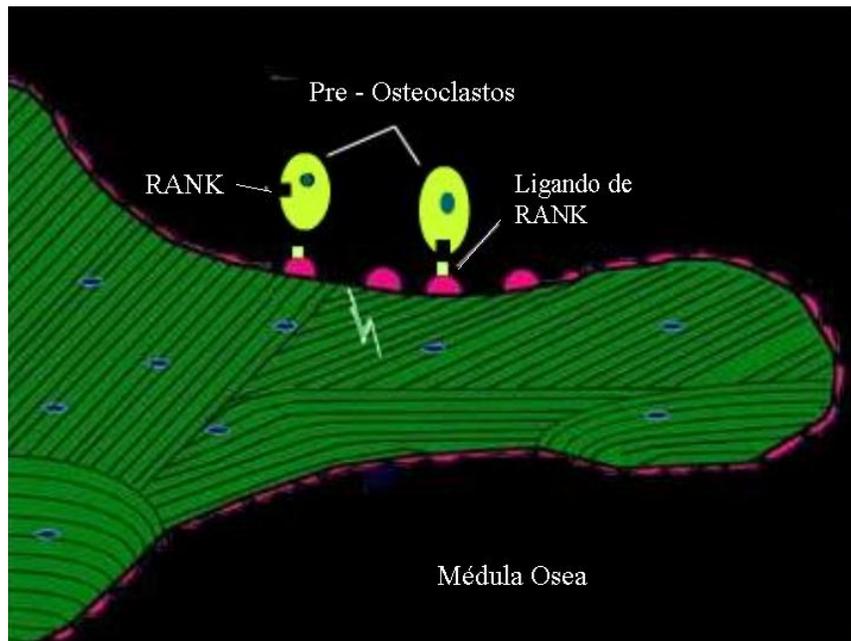
En las figuras 12 a 23 se observa un resumen de los eventos que se producen.



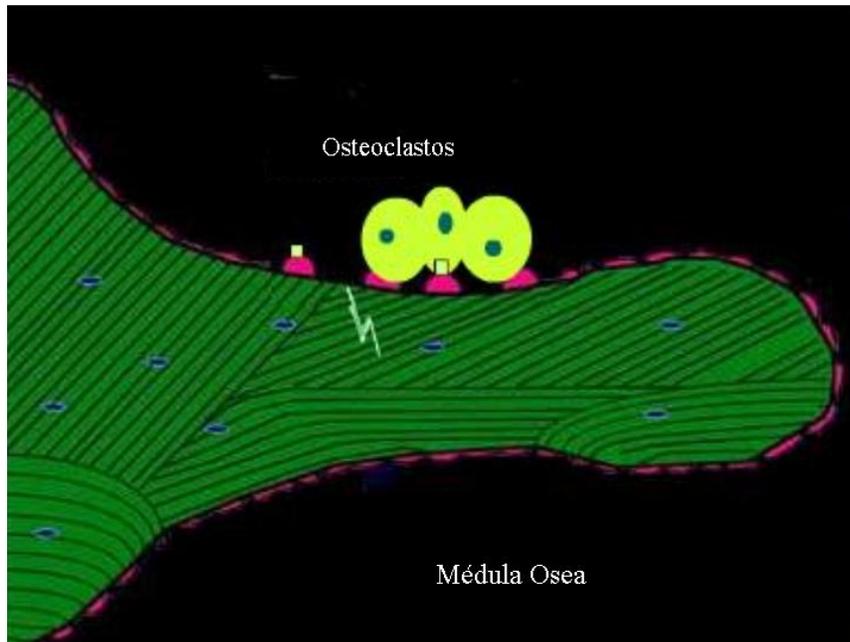
**Fig.12.** El grafico muestra una trabécula ósea (en verde) cubierta por Células de Revestimiento.



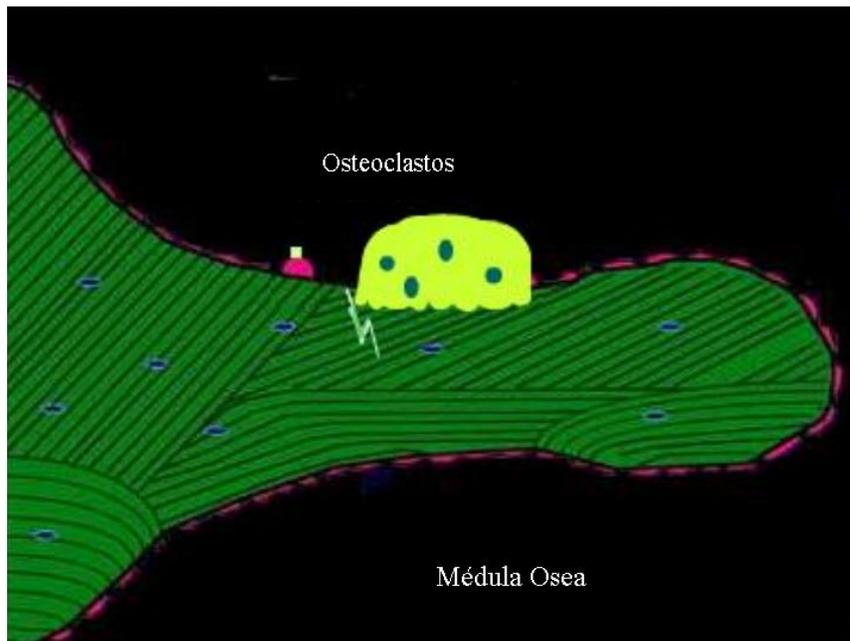
**Fig.13. ACTIVACIÓN.** El proceso comienza con una micro fractura, captada por los Osteocitos, o cuando es estimulado por hormonas o factores que activan a las Células de Revestimiento.



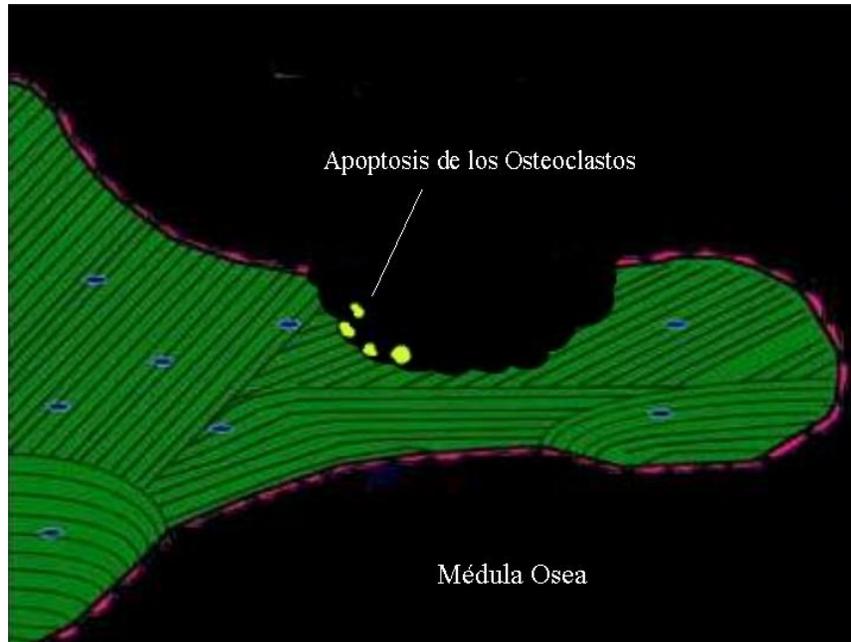
**Fig.14. ACTIVACION.** La Célula de Revestimiento segrega el ligando para RANK, el cual es una proteína que activa el receptor RANK de los Pre-Osteoclastos.



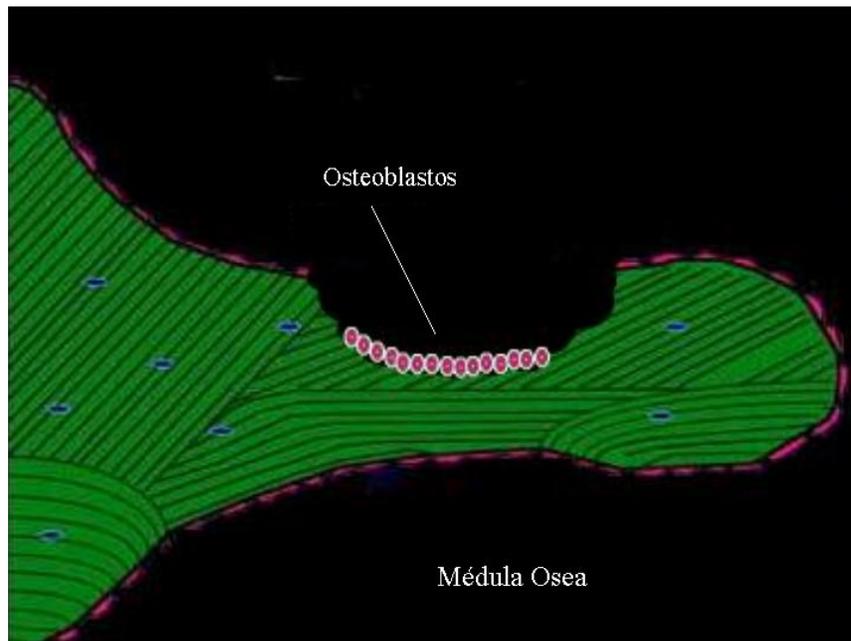
**Fig.15. ACTIVACION** La activación del receptor RANK causa la fusión de los Pre-Osteoclastos y la formación de Osteoclastos multinucleados



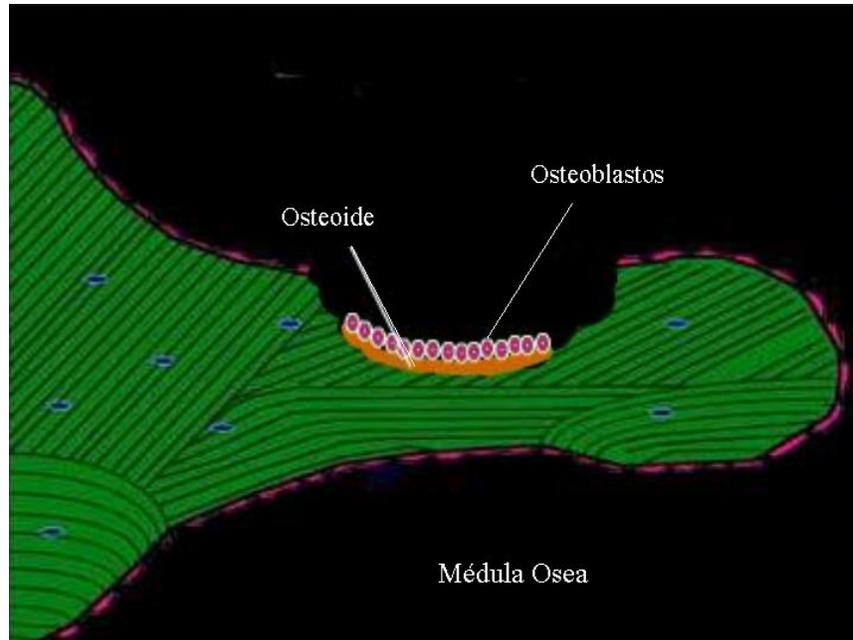
**Fig.16. REABSORCIÓN.** Los Osteoclastos comienzan a reabsorber el hueso.



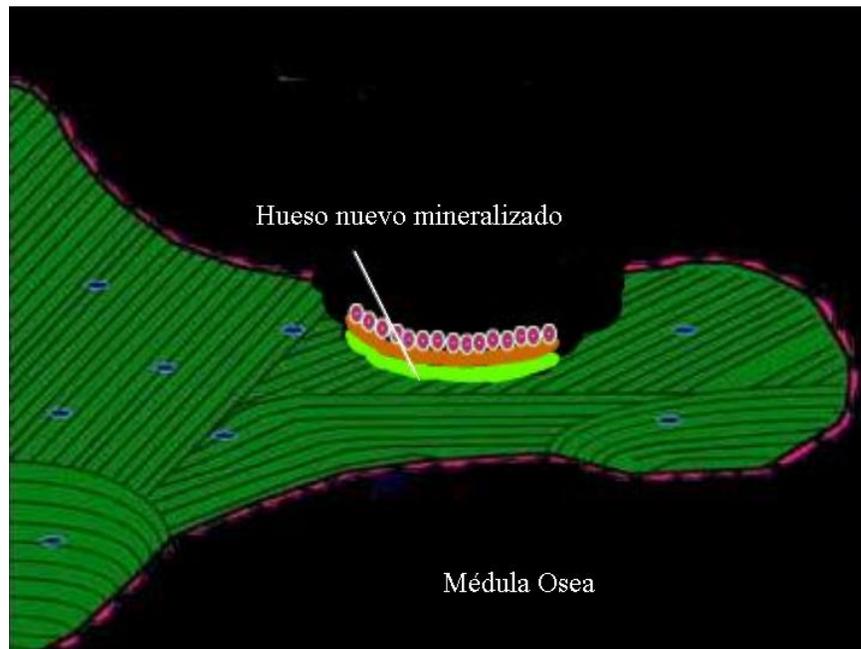
**Fig.17. REABSORCIÓN.** Después de alrededor de 2 semanas, una vez que han terminado de reabsorber el hueso, los Osteoclastos entran en apoptosis. (Muerte celular programada)



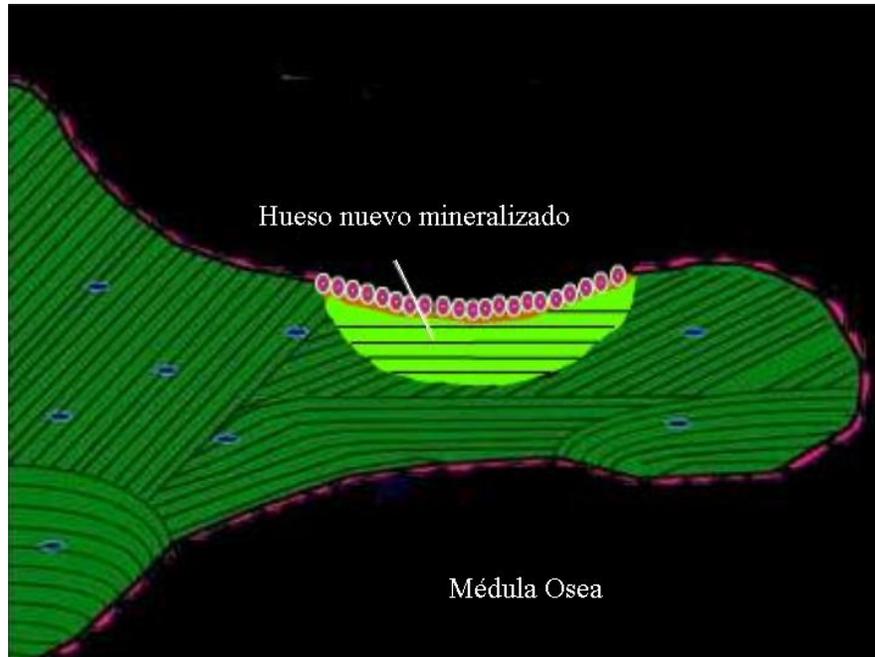
**Fig.18. NEOFORMACION.** Mientras tanto, los Osteoblastos son reclutados a la cavidad reabsorbida, por señales no del todo conocidas aún, probablemente, factores de crecimiento liberados a partir del hueso reabsorbido. (BMPs)



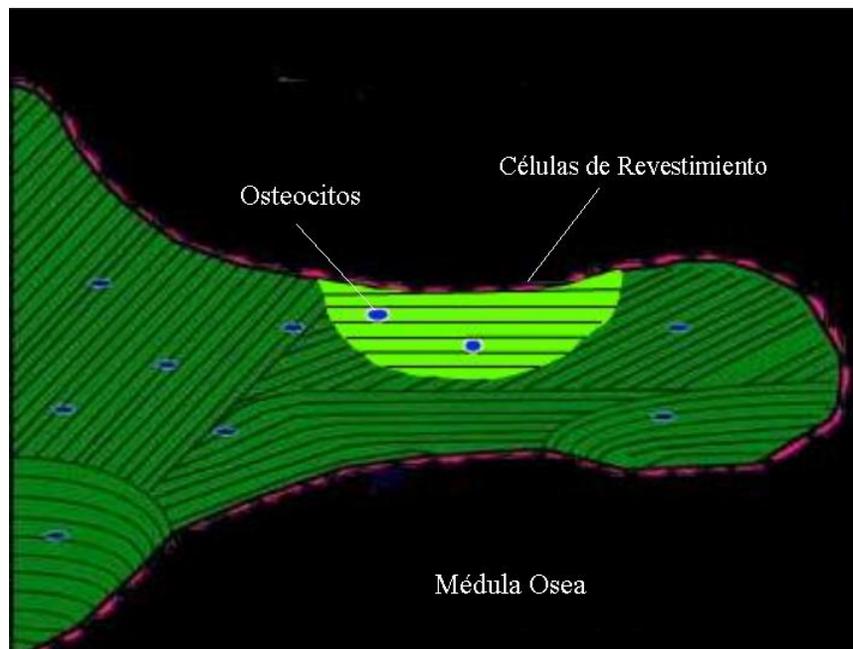
**Fig.19.** NEOFORMACION. Los Osteoblastos segregan la matriz ósea (en naranja) denominada osteoide



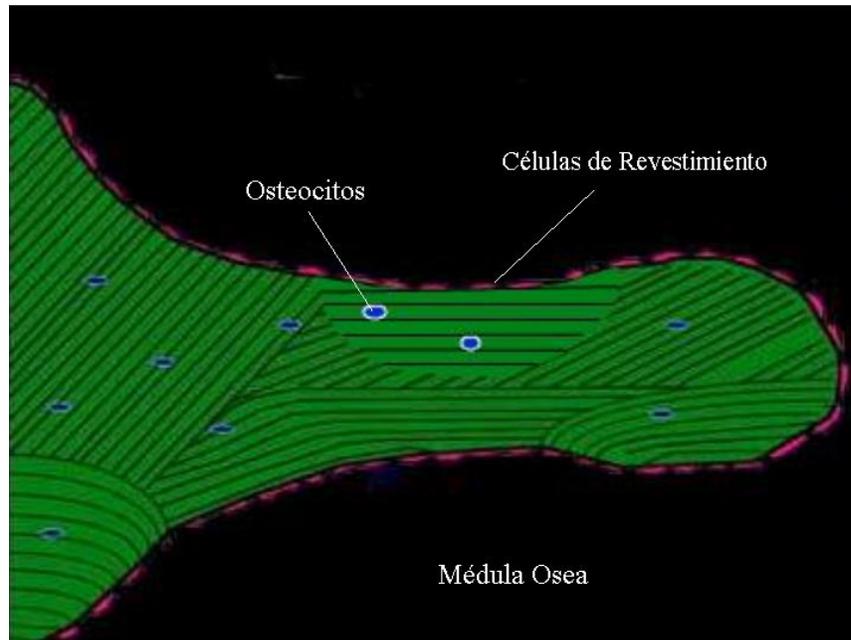
**Fig.20.** NEOFORMACION. Después de alrededor de 11 días el osteoide comienza a mineralizarse (verde claro). Mientras tanto, los Osteoblastos continúan formando nuevo osteoide.



**Fig.21. NEOFORMACION.** El proceso continua hasta que la cavidad es llenada por nuevo hueso, normalmente entre dos y tres meses después.



**Fig.22. MINERALIZACION.** Los Osteoblastos pueden entrar en apoptosis y desaparecer, o bien transformarse en Osteocitos o Células de Revestimiento. El nuevo hueso formado continua mineralizándose con el tiempo.

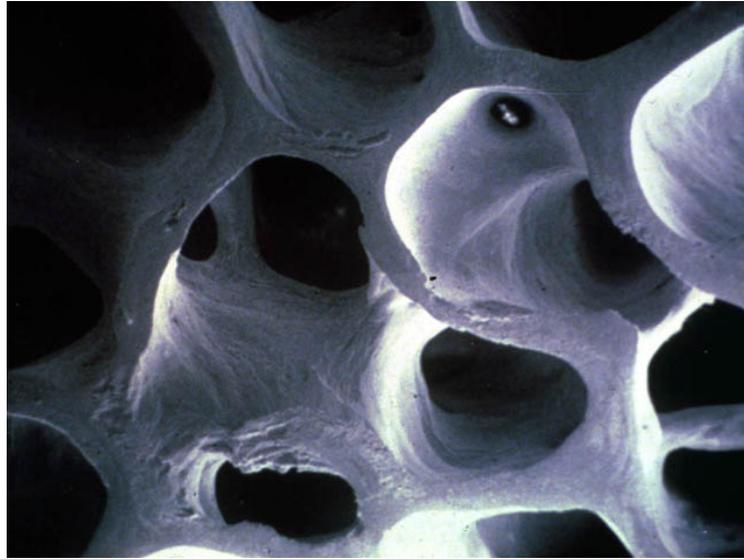


**Fig.23.** MINERALIZACION. Remodelado óseo completo.

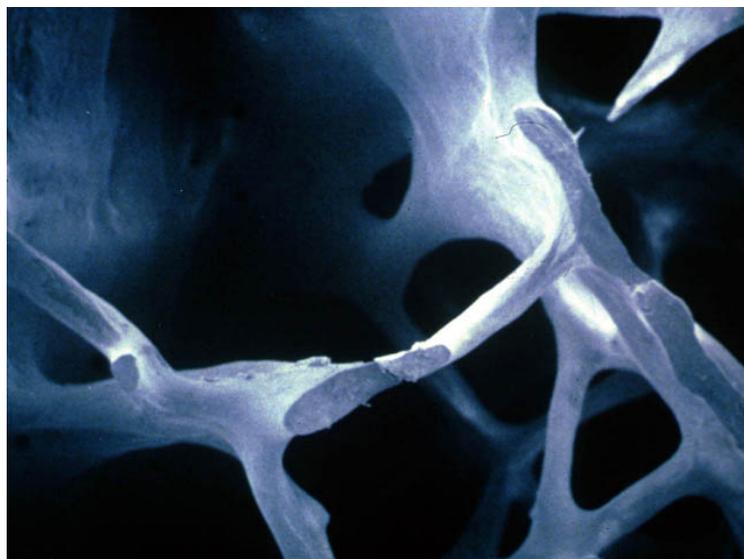
El proceso de recambio óseo no es igual en todas las etapas de la vida. Inicialmente, y hasta aproximadamente los 20 años la formación excede a la reabsorción, dando lugar al crecimiento de los huesos (modelado) y a un continuo aumento de la masa ósea. Luego se estabiliza y la reabsorción y la formación se equiparan. En un último período, la reabsorción es mayor que la formación (de mayor importancia en la mujer, después de la menopausia, por deficiencia en el nivel de estrógenos) lo cual determina una disminución de la masa ósea, pudiendo llevar a osteopenia y osteoporosis.<sup>2</sup>

Debemos tener en cuenta que el remodelado se produce en todas las superficies óseas, tanto externas como internas. De esta manera, aunque el volumen de hueso trabecular es menor, su superficie es mayor, lo que genera que el recambio metabólico se produzca aproximadamente cuatro

veces más que en el hueso compacto. Esto determina que en los casos de pérdida del balance en el turnover, como en la última fase que mencionamos más arriba, inicialmente se vea afectado más el hueso esponjoso, con adelgazamiento del espesor de las trabéculas, y posteriormente con pérdida de conectividad entre las mismas. (Figs. 24 y 25)



**FIG.24.** Hueso trabecular normal (MEB)



**Fig.25.** Hueso trabecular con Osteoporosis. Obsérvese el adelgazamiento y la pérdida de conexión entre las trabéculas (MEB)

Para finalizar e introducirnos en la próxima sección, podemos concluir que los huesos con mayor cantidad de cortical presentan una mayor resistencia y se ven menos afectados en caso de alteración del balance metabólico, con respecto a los de mayor contenido esponjoso. Sin embargo, estos últimos presentan mayores condiciones para la regeneración, debido a su mayor cantidad de médula ósea.

## **II. REGENERACIÓN OSEA**

Se entiende por regeneración ósea al proceso que permite que un defecto estructural en el hueso pueda ser corregido mediante la formación de un tejido de iguales características al original. Usamos el termino de reparación cuando dicho tejido de reemplazo es diferente y no recupera las propiedades mecánicas ni la fisiología del original.

### **1. PROCESO BIOLÓGICO DE REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA**

Luego del tratamiento de un defecto óseo por medio de injertos, se dan una serie de procesos que llevan a la regeneración del hueso.<sup>8</sup>

Inicialmente se produce un agregado plaquetario que forma el coagulo de fibrina, el cual engloba al material de injerto utilizado. A partir del 4<sup>to</sup> día comienzan a formarse capilares y arteriolas desde el lecho receptor, que invaden todo el material de injerto presente en la cavidad. Alrededor de los 10 a 14 días se forma el entramado de colágeno. Los osteoblastos proliferan y comienza la migración a través de la matriz de colágeno. Al mes el injerto queda bien vascularizado y comienza la fase de sustitución progresiva que durara entre 4 y 8 semanas. Se forma inicialmente un hueso desorganizado,

que posteriormente por remodelado se transformara en hueso maduro, bien organizado, con características similares al original.

## **2. INJERTOS ÓSEOS**

Para lograr mediante un tratamiento la correcta regeneración del hueso se han propuesto varios abordajes consistentes en rellenar la cavidad ósea. Estos difieren entre si fundamentalmente en el tipo de material de relleno utilizado.

Según su composición dicho material puede clasificarse como:

- » *osteogénico*, produciendo nuevo hueso (osteoblastos vitales)
- » *osteoinductor*, induciendo la formación de nuevo hueso (proteínas morfogenéticas óseas)
- » *osteoconductor*, sirviendo de matriz o guía facilitando la neoformación ósea.

De acuerdo a esto puede considerarse al hueso autólogo como material de injerto ideal. Sin embargo, muchas veces, como expresamos en la introducción, esto no es posible y es necesario recurrir a sustitutos.

Analizaremos a continuación primero al hueso autólogo, y luego los sustitutos.

### **2.1 HUESO AUTÓLOGO**

Es el material de injerto ideal, constituido por hueso tomado del mismo paciente. El mayor inconveniente consiste en la cirugía adicional para tomar el hueso a injertar, usualmente de la zona del mentón, trígono retromolar, tuberosidad del maxilar, y en menor medida de calota craneana

o cresta ilíaca, dependiendo de la cantidad necesaria.<sup>7, 8, 9</sup> Sin embargo, en ocasiones es factible tomar hueso de las zonas adyacentes al defecto a tratar con lo cual este problema se elimina. En estos casos se utilizan cinceles para recolectar pequeños fragmentos o bien se puede desgastar el hueso con un motor y luego aspirarlo con una cánula especial con un filtro en su interior, que recoge las partículas. Esta forma es muy útil, ya que puede utilizarse durante las osteotomías para la colocación de implantes, y presenta una consistencia muy buena, similar a una pasta, que facilita su colocación en el defecto a tratar. Esta forma de obtención es una de las variables analizadas en el presente trabajo.

Por último, cabe destacar que el injerto autólogo es el único que cumple con las tres vías para la formación de hueso nuevo (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción)

## **2.2 HUESO HOMÓLOGO**

También llamados aloinjertos, son tomados de otros individuos de la misma especie pero de diferentes genotipos. Se obtienen de cadáveres, se almacenan y procesan en bancos. Tiene ventajas debido a que se elimina el sitio donante en el paciente, se disminuye el tiempo quirúrgico y de anestesia y se presenta menor pérdida sanguínea durante la cirugía; es de vital importancia revisar adecuadamente la historia clínica de los donantes con el fin de evitar los que tengan antecedentes de infecciones, neoplasias malignas, enfermedades óseas degenerativas, hepatitis B o C, enfermedades de transmisión sexual, SIDA y otras enfermedades que afectan la calidad del hueso y podrían afectar la salud del receptor. Los aloinjertos

pueden formar hueso a través del efecto de la oseoinducción y la oseoconducción; mientras que no se da en el proceso de la osteogénesis debido a que el injerto no posee células vivas, por lo tanto la formación ósea es lenta y se pierde volumen apreciable si se compara con el injerto autólogo.<sup>25, 26, 27</sup>

El aloinjerto se comporta como una estructura que permitirá el crecimiento de nuevo hueso a partir del reemplazo gradual que sufre el injerto por el hueso huésped. En el presente trabajo se evalúan dos formas de aloinjerto, una en partículas y otra en forma de gel.

### **2.3 HUESO HETERÓLOGO**

Son denominados Xenoinjertos. Se obtienen de otras especies, siendo el más utilizado de origen bovino. Este basa sus propiedades en procesos que remueven casi totalmente los lípidos, proteínas no colágenas, proteoglicanos y glucoproteínas, conservando la estructura mineral y el colágeno intactos.

El material así obtenido se caracteriza por buena histocompatibilidad dado que la única proteína remanente es colágeno tipo I, buenas propiedades mecánicas, semejantes al hueso y buena capacidad osteoconductor por su similitud a la matriz inorgánica del hueso humano.<sup>28, 29, 30</sup>

En nuestro trabajo se evalúa una forma de xenoinjerto de origen bovino en partículas.

## 2.4 MATERIALES SINTÉTICOS DE ORIGEN QUÍMICO

Este grupo está constituido por un conjunto heterogéneo, que incluye al sulfato de calcio, a un grupo caracterizado por tener al fosfato de calcio como base, a algunos polímeros y a sustancias compuestas.-

De todos los tipos, que son muchos, no limitaremos a analizar al fosfato tricálcico, por ser una de las variables de estudio en el presente trabajo.

*Fosfato Tricálcico:* Son materiales biocompatibles, osteoconductores, admitiendo su uso solos o combinados con injertos óseos.

Se caracterizan por ser reabsorbibles, variando su velocidad de reabsorción en función de la densidad (los fosfatos tricálcicos más densos se reabsorben más lentamente). Por lo demás, actúan de manera similar que los anteriores, generando una matriz que conduce la regeneración del hueso.<sup>31, 32, 33, 34</sup>

Se presentan en forma de polvo y en gránulos, siendo esta última la utilizada por nosotros.

## OBJETIVOS

---

- Identificar factores que favorezcan la neoformación ósea.
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del hueso autólogo obtenido por medio de filtro como material de injerto.
- Estudiar, analizar y evaluar la acción del hueso humano de banco como material de injerto.
- Estudiar, analizar y evaluar la acción de la nueva formulación de hueso humano de banco en forma de gel, y su posible aptitud como material de injerto.
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del hueso de origen bovino como material de injerto.
- Estudiar, analizar y evaluar la acción del fosfato tricálcico en esferas como material de injerto.
- Diseñar una estrategia terapéutica frente a los defectos estructurales del hueso.

### **HIPÓTESIS:**

Los defectos óseos responden de manera diferente en cuanto a la calidad y cantidad de regeneración, según sean tratados con injertos autólogos o de sustitutos de origen bovino, humano o químico.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## I ) DISEÑO DEL ESTUDIO

**TIPO DE ESTUDIO:** Experimental cuantitativo.

### **VARIABLES:**

#### **Variables Independientes:**

- Hueso autólogo obtenido por filtro
- Hueso bovino procesado en partículas.
- Hueso humano procesado en partículas.
- Fosfato Tricálcico en esferas
- Hueso humano procesado en gel.

#### **Variables Dependientes:**

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

### **UNIVERSO Y MUESTRA:**

Se utilizarán 60 ratas endocriadas de cepa Fisher (F344/N) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Las mismas serán escogidas por muestreo aleatorio simple, y serán luego divididas en grupos de acuerdo a las variables independientes más un grupo control.

## **METODOS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS:**

- Observación directa.
- Estudios histológicos realizados por computadora.

## **PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS:**

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

CANTIDAD DE HUESO NEOFORMADO: Se medirá la superficie total de hueso regenerado en función del defecto creado artificialmente, utilizando el software de análisis de imágenes Image ProPlus V.4.1- Media Cybernetics, USA.

CALIDAD DE HUESO NEOFORMADO: Se realizará un estudio cualitativo en función de la disposición de la microarquitectura del tejido óseo, utilizando los mismos instrumentos que en el punto anterior.

Luego de obtenidos los datos, se analizarán y se establecerá que efecto produce cada variable independiente sobre cada una de las variables dependientes.

## **II) DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA (MODELO ANIMAL)**

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

### **1) Elección del animal. Fundamentación.**

La elección de la rata como animal para la 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 individual entre los individuos que integran la muestra se eligieron animales endocriados, libres de patógenos específicos (SPF).<sup>35</sup>

La elección del sexo de los animales se debió a que, durante las pruebas preliminares, algunas hembras murieron probablemente porque no soportaron la cirugía, debido a su menor peso. Esto produjo que nos decidiéramos finalmente por trabajar sobre machos.

### **2) Elección de la anestesia.**

La anestesia general se logró con Ketamina/ Xilacina 75 mg/kg +10 mg/kg vía IM. Se eligió como primera opción debido a la mayor facilidad de uso, y a la no necesidad de instrumentos y/o equipos accesorios, como puede ser en el caso de la anestesia por vía inhalatoria.

Se realizó una prueba para comprobar su utilidad, alcanzando los animales una muy buena anestesia quirúrgica, de unos 20 a 30 minutos de duración, y recuperándose sin problema.

Se escogió la vía IM por sobre la IP, por ser de ejecución más simple. Los riesgos de una y otra han sido bien descriptos, e incluyen miositis (IM) e infecciones (IP).<sup>36</sup> Sin embargo, ninguno de estos problemas ocurrió en nuestra experiencia.

### 3) **Acto operatorio.**

a) *Depilación de la zona a trabajar.* La depilación puede efectuarse con una maquinita de afeitar convencional o una hoja tipo gillette. Sin embargo, si bien se logra despejar el campo de esta manera, no es del todo prolijo, y muchas veces aparecen cortaduras en la piel del animal. Estos detalles no crean problemas para la ejecución del modelo, no obstante hemos tenido resultados mucho más prolijos y de manera más rápida, realizando la depilación a mano. En efecto, tirando de los pelos suavemente, estos salen sin oponer resistencia, probablemente por efecto del estado de relajación durante la anestesia. El resultado es una depilación completa, prolija y rápida. Aquí el factor rapidez es importante, ya que el tiempo que empleemos de más en este punto, es tiempo que tendremos de menos para el acto quirúrgico propiamente dicho, debido a la duración de la anestesia.

b) *Incisiones:* Se realizaron por planos, primero la piel y luego el músculo. Por palpación se identifica el fémur, y el largo del mismo, a partir de 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. Menos dificulta la visión operatoria, y más determina una herida más grande y mayor cantidad de puntos de sutura.

Una vez completada, se continúa en el plano muscular. Al inicio de nuestra experiencia realizábamos esto también con bisturí. Sin embargo, en uno de los primeros casos se lesionó la arteria femoral, y hubo que pinzarla, y detener la cirugía durante un tiempo bastante importante hasta lograr la hemostasia que nos permitió continuar. Luego de este hecho, se cambió la técnica, y el plano muscular fue abordado con tijeras mediante divulsión. De esta manera, no solo no se corren riesgos de lesionar vasos sanguíneos, sino que también la apertura es más rápida y más prolija.

Una vez identificado el hueso, lo que mejor resultado nos ha dado para lograr la separación del mismo del tejido muscular, fue la colocación de dos separadores tipo Farabeuf, uno por delante y otro por detrás, y luego tirar suavemente de los mismos.

Por último, se limpia bien la superficie ósea a intervenir, eliminando todo el periostio con la ayuda de un periostótomo.

c) *Creación de los defectos óseos:* Las perforaciones se realizan con tres fresas secuenciales, y con abundante irrigación para evitar el sobrecalentamiento del hueso. Primero utilizamos una redonda para marcar la entrada y superar la cortical, luego una de dos milímetros de diámetro y por último una de tres de diámetro, dando como resultado un defecto de tres mm de diámetro por tres de profundidad y una longitud de 9 mm. Cabe destacar que las fresas utilizadas, son las mismas que se usan para la creación de los lechos óseos para la colocación de implantes dentales. De esta manera, nos aseguramos de estar utilizando un instrumental que no

produzca daño en el hueso adyacente al defecto, ya que de otra manera la regeneración sería imposible.

En este modelo se realiza una sola perforación, aunque podrían ser más. Mayor cantidad de defectos permite incluir más de una variable dentro de cada animal.

Una vez conformados los mismos, pueden ser tratados con una gran variedad de terapéuticas tendientes a lograr la regeneración del hueso. En nuestro caso utilizamos injertos óseos autólogos y sustitutos de diferentes procedencias.

Una vez tratados los defectos, se realiza una sutura por planos, primero el muscular y luego la piel.

d) *Sutura*: La sutura en el plano muscular corresponde hacerla con hilo reabsorbible de colágeno. Sin embargo, utilizamos en algunos casos sutura de seda y no observamos diferencias, en cuanto a reacciones adversas, entre los dos tipos de hilos utilizados. Cabe destacar aquí que la seda es más económica que el colágeno.

La sutura en la piel se hizo inicialmente con seda. Esto trajo algunos inconvenientes debido al movimiento del animal que determinó que algunos puntos se soltaran y también una mayor acumulación de "suciedad" sobre la herida, ya que la naturaleza de la seda, la hace más dificultosa para el lavado postoperatorio de la misma. Estos problemas son mínimos, y en los casos utilizados, no se observaron reacciones importantes. De todas maneras, decidimos cambiar la seda por tanza, la cual mostró mayor resistencia de los puntos y, gracias a su superficie más lisa, menor acumulación de "suciedad".

#### 4) **Postoperatorio**

a) *Postoperatorio inmediato y recuperación de la anestesia:* La recuperación de la anestesia fue relativamente lenta, aproximadamente entre 3 horas y media y cuatro horas, aunque esto está dentro de los valores normales para la Xilacina / Ketamina.<sup>36</sup> La pérdida de la temperatura corporal durante la anestesia produce que el animal tarde más en recuperarse. Para contrarrestar este problema, utilizamos un papel de nylon con burbujas de aire, para envolverlos durante la recuperación, lo cual permitió mantener la temperatura corporal a niveles no tan bajos, generándose de esta manera una recuperación más rápida.

En esto también influye mucho la temperatura de la sala de recuperación, así como la disposición de los animales en la misma.

La temperatura ambiente debe ser constante de 28 grados centígrados, y puede agregarse una fuente adicional, más directa, durante las primeras horas.

En cuanto a la disposición, es importante que las cajas no queden en el piso, sino que se coloquen sobre una mesada. Si no se dispone de una, aunque sea una leve separación del piso, para que circule aire templado por debajo, otorgando una temperatura uniforme.

En nuestra experiencia, la recuperación de los animales en sala a temperatura de 28 grados tardó entre 3 horas y media y cuatro horas, como expresamos más arriba. Cuando tomamos como medidas adicionales envolver al animal, separar la caja del piso y colocar otra fuente de calor, dichos tiempos estuvieron entre las 2 horas y las 2 horas y media.

b) *Medicación postoperatoria y alimentación:* Se les administró ácido acetilsalicílico diluído en el agua de consumo para el control del dolor. La aplicación de agentes analgésicos por vía inyectable no mostró, por lo menos en nuestra experiencia, diferencias significativas, a partir de la observación del comportamiento del animal.<sup>36</sup>

La alimentación de los mismos fue con alimento balanceado comercial. Además, a partir de algunas complicaciones que surgieron con la hidratación, y que se describen en el apartado correspondiente, se agrego a la dieta del postoperatorio inmediato una gelatina a base de agar nutritivo, el cual mostró mejores resultados, que cuando se utilizó el alimento comercial solo.

c) *Complicaciones postoperatorias:* Una de las complicaciones que se observó en algunos animales fueron signos de deshidratación, los cuales fueron revertidos mediante la administración de suero salino por vía SC. Esto motivó la introducción, en casos posteriores, del agar nutritivo al que hacíamos referencia más arriba, no volviéndose a presentar signos de deshidratación con su utilización.

Otra complicación, aunque leve, fue la aparición de sequedad de las conjuntivas, lo cual fue atribuido al largo período de recuperación de la anestesia. En los casos en que apareció, fue tratado con lavajes de la zona y pomadas específicas. Estos casos no volvieron a presentarse desde que se tomaron los recaudos para disminuir el tiempo de recuperación de la anestesia.

d) *Postoperatorio mediato:* Luego de las primeras 24 horas, los animales pasaron a ser alojados en el pabellón de animales de experimentación del

Bioterio de la FCVUNLP, manteniéndose el régimen de temperatura constante y alimentación balanceada.

#### **5) Obtención y procesado de las muestras**

Luego de 30 días los animales fueron sacrificados por sobredosis con éter y sus fémures resecados para realizar los preparados para microscopía. El acceso quirúrgico fue el mismo que se utilizó en la cirugía inicial. Se desprendieron todas las inserciones musculares alrededor del fémur, y luego se realizaron dos cortes cerca de ambas articulaciones utilizando discos de carburo montados sobre un motor eléctrico. Esto permitió separar el fémur por completo y retirarlo. Por último, se realizaron cortes adicionales para separar los segmentos que contenían los defectos. Las muestras fueron fijadas en formol al 10 % a 4°C, y luego descalcificadas en EDTA. Posteriormente fueron incluidas en parafina para conformar los tacos, a partir de los cuales se obtuvieron los cortes con microtomo, que fueron teñidos con Hematoxilina- Eosina.

#### **6) Evaluación de los resultados**

Las muestras fueron capturadas mediante una cámara de video (Sony DXC-151A) montada sobre microscopio óptico (Olympus SZ 40) y conectada a una computadora. Las imágenes fueron posteriormente digitalizadas mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA) y procesadas con un analizador digital de imágenes (ImagePro Plus v4.1. - Media Cybernetics, USA). La resolución de las imágenes fue de 640 x 480 pixels, con un rendimiento (yield) de 9 µm/pixel.

Luego de la calibración espacial de las imágenes capturadas se procedió a la determinación del área total de hueso, las superficies de hueso sano, de hueso regenerado a la entrada del defecto, la superficie total del defecto, la de nuevo hueso dentro del defecto y la de tejido de granulación. Además se tomaron medidas lineales para cuantificar el espesor de hueso sano, la cantidad de cierre de la entrada del defecto, el espesor de dicho tejido de cierre, y la presencia de aberturas residuales.

Los distintos elementos fueron segmentados basados en el color de la tinción (H y E).

La evaluación comparativa de los resultados entre los diferentes grupos esta hecha de acuerdo a la superficie total de hueso regenerado, ya que este es el parámetro más importante dentro del presente trabajo. El resto de las mediciones han servido como complemento en el análisis de los fenómenos presentados.

### III) METODOLOGÍA

Se utilizaron 60 ratas macho, de cepa Fisher 344 (F344/N), originarias del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU., y producidas en Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, endocriadas, libres de patógenos específicos (SPF), de 16 semanas de edad y de 500 gramos de peso.

Los animales fueron divididos en 6 grupos de 10 cada uno, manteniéndose durante 48 horas en condiciones ambientales convencionales: Temperatura 23 +/- 1 grados centígrados, humedad 50/55 %, iluminación 12 hs luz/ 12 hs oscuridad, con alimento balanceado comercial y agua autoclavada ad-libitum.

Dos horas antes de la intervención quirúrgica se les retiró el alimento, manteniéndolas con dieta líquida.

Todas fueron operadas bajo anestesia general con ketamina/xilacina 75 mg/kg + 10 mg/kg por vía IM. Se utilizó un motor de cirugía eléctrico con irrigación de solución fisiológica incorporada (Nouvag), contraángulo reductor 1:16 a 1700 rpm, fresas e instrumental quirúrgico para el acceso al hueso. (Figs. 26, 27 y 28). Para recolectar el hueso autólogo se uso una cánula de aspiración, con un filtro en forma de malla en su interior, conectada a una bomba de aspiración. (Figs. 29 y 30)



**Fig. 26. Motor de cirugía**



**Fig.27. Contraángulo y fresas.**



**Fig.28. Instrumental quirúrgico**



**Fig.29. Filtro recolector de hueso**



**Fig.30. Filtro recolector de hueso desarmado.**

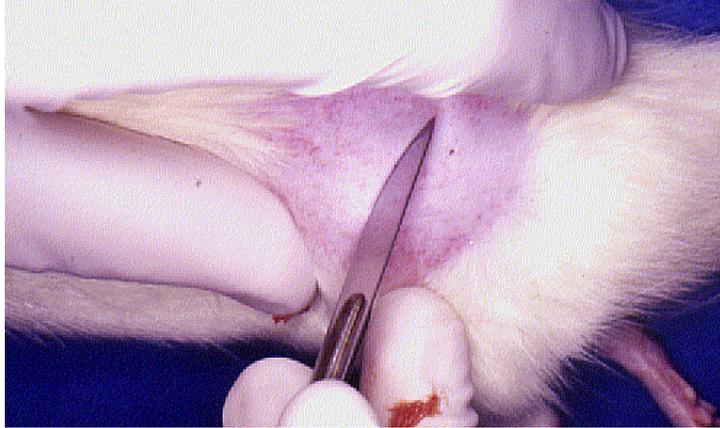
Se depiló la piel en la zona del fémur, luego se realizó una incisión en piel con bisturí y se continuó en el plano muscular con tijeras por divulsión, hasta identificar el hueso. (figs.31, 32 y 33)

Una vez limpio y retirado el periostio, se realizó una perforación de 3 mm de ancho por 9 mm de largo por 3 mm de profundidad. (figs. 34 y 35)

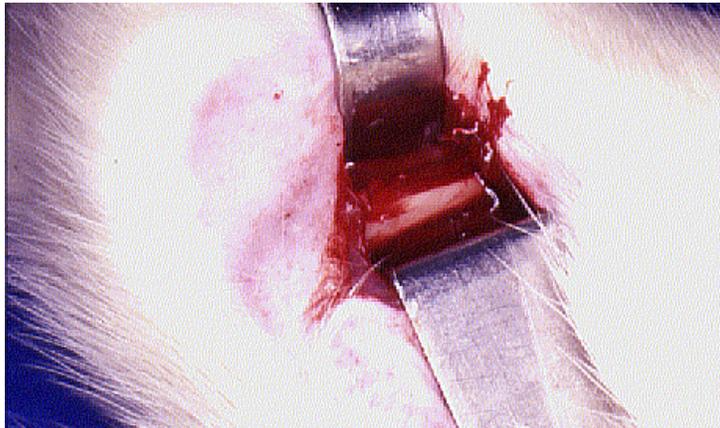
Al grupo 1 se le injerto hueso autólogo obtenido por desgaste de hueso con fresas y recolectado con un filtro conectado a una cánula de aspiración, al grupo 2 hueso humano en partículas, al grupo 3, hueso humano en forma de gel, al grupo 4 hueso bovino en partículas, al grupo 5 fosfato tricálcico en esferas y el grupo 6 no recibió tratamiento, quedando como control. (fig.36) Una vez finalizado, se realizó una sutura por planos. (fig.37).



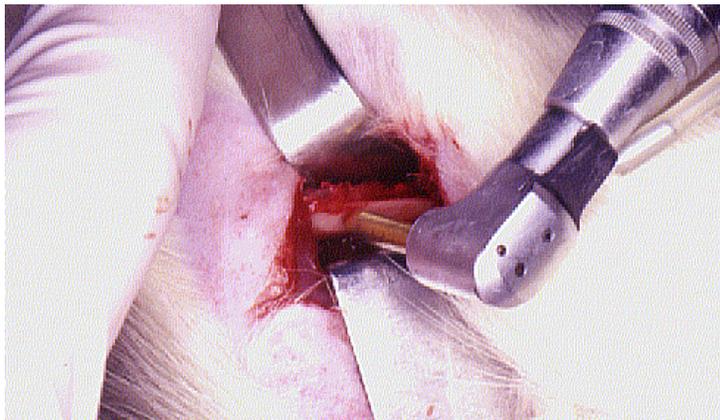
**Fig.31. Zona operatoria depilada**



**Fig.32. Incisión con bisturí**



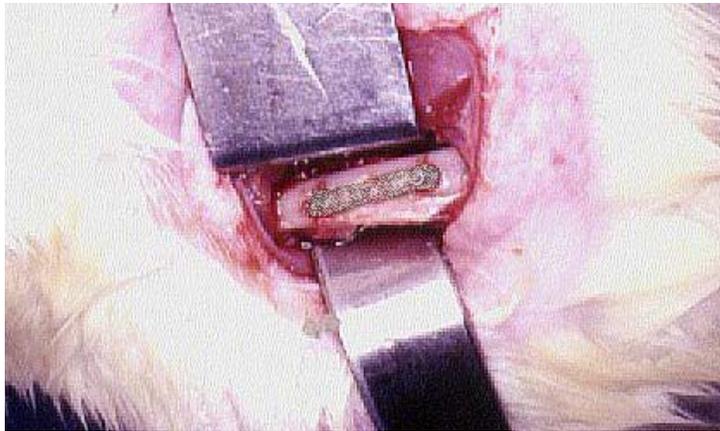
**Fig.33. Fémur expuesto.**



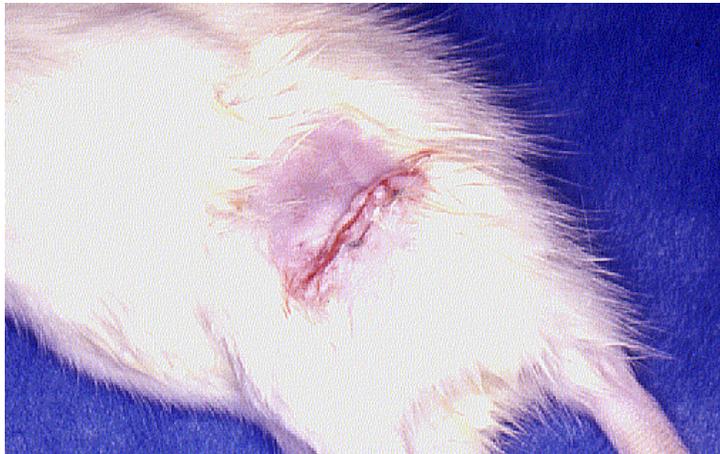
**Fig.34. Creación del defecto óseo**



**FIG. 35. Defecto óseo**



**Fig.36. Injerto colocado dentro de la cavidad ósea.**



**Fig.37. Sutura.**

Los animales permanecieron en la sala donde fueron intervenidos durante las primeras 24 hs a temperatura constante de 28 °C, y luego de ese periodo pasaron a ser alojados en el pabellón de animales de experimentación del Bioterio de la FCVUNLP. Como complemento en el postoperatorio recibieron Acido Acetilsalicílico y alimento balanceado.

A los 30 días los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter, y sus fémures resecados mediante discos de corte de carburo, con el fin de obtener muestras para su procesado y estudio histológico.

Las muestras fueron fijadas en formol al 10% a 4°C, descalcificadas en EDTA, incluidas en parafina, cortadas en micrótopo, montadas en portaobjeto y teñidas con hematoxilina eosina.

Los preparados fueron capturados mediante una cámara de video (Sony DXC-151A) montada sobre un microscopio óptico (Olympus SZ 40) y posteriormente digitalizados mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA). De cada preparado se obtuvieron aproximadamente 20 imágenes a 40X, las cuales fueron montadas luego para constituir una imagen única, que fue evaluada con un analizador digital de imágenes (ImagePro Plus v4.1. - Media Cybernetics, USA). (Fig.38) Los distintos elementos de la imagen histológica fueron segmentados en base al color de la tinción, y posteriormente se calculó la superficie de hueso nuevo regenerado, así como el patrón arquitectónico dentro de los límites del defecto creado. (Fig.39) La superficie se expresa en mm<sup>2</sup>, mientras que la arquitectura se consideró: Buena (Regeneración completa con patrón trabecular bien definido); Aceptable (Regeneración completa con patrón trabecular más irregular); Mala (Regeneración incompleta)

Estos estudios se llevaron a cabo en el Servicio de Microscopía de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. El análisis estadístico se realizó mediante Análisis de Varianza en Rangos, Test de Comparaciones Múltiples de Dunnett y Test de Comparaciones Apareadas de Student Newmann Keuls. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo una P menor que 0,05.

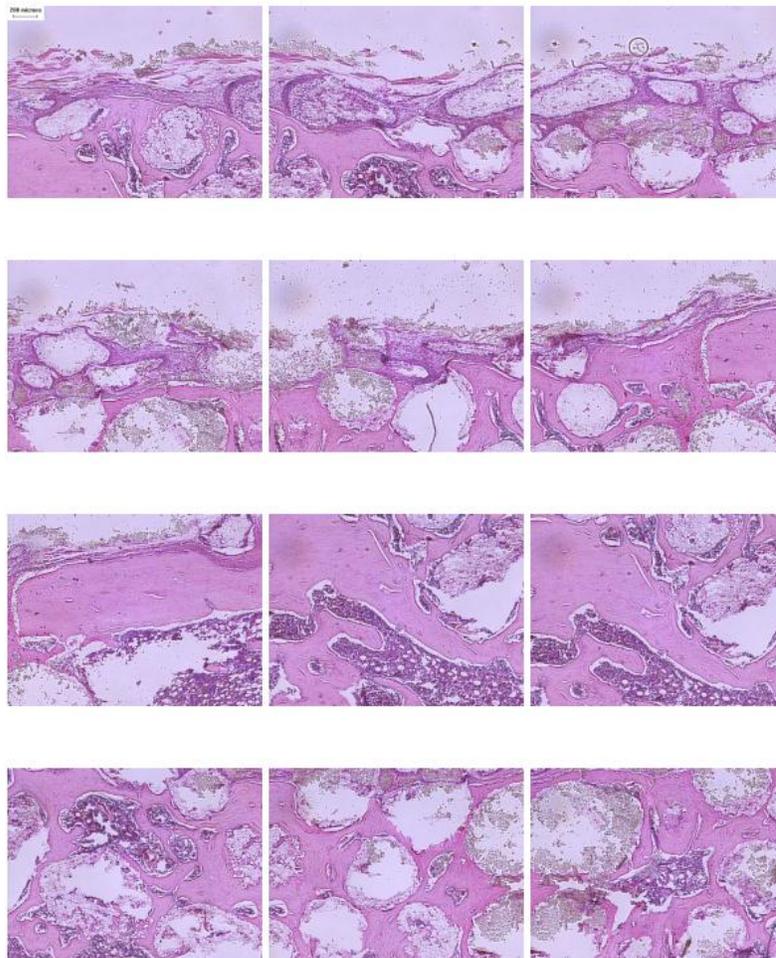
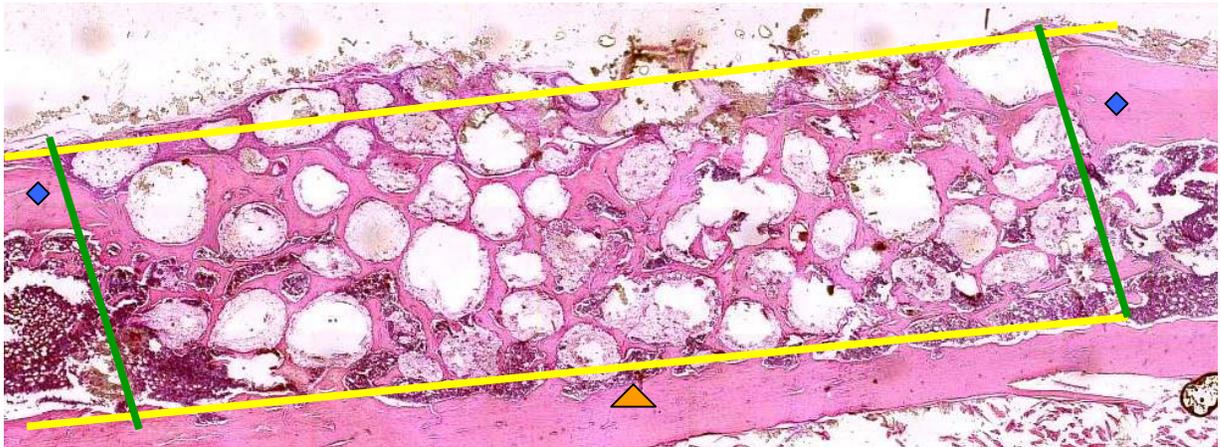


Fig. 38. Imágenes seriadas, a partir de las cuales se realiza luego el montaje en una imagen única.



**Fig.39. Límites del defecto, a los efectos de considerar la regeneración ósea obtenida.**

Referencias:

— Límites superior e inferior del defecto.

— Límites laterales del defecto.

◆ Bordes de la cortical superior, eliminada en la creación del defecto.

▲ Cortical inferior.

## RESULTADOS

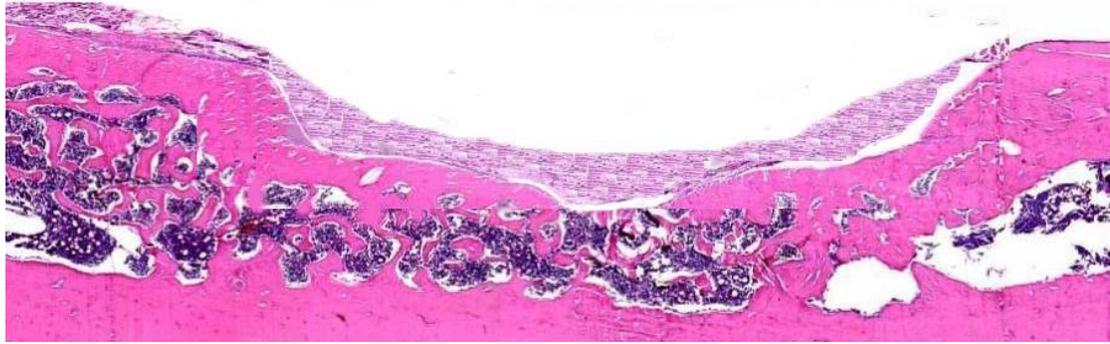
---

El modelo experimental desarrollado y utilizado ha funcionado correctamente y no ha presentado mayores inconvenientes en su ejecución. Los injertos utilizados no generaron respuestas adversas en ninguno de los casos. En general, todos los injertos resultaron de fácil manipulación.

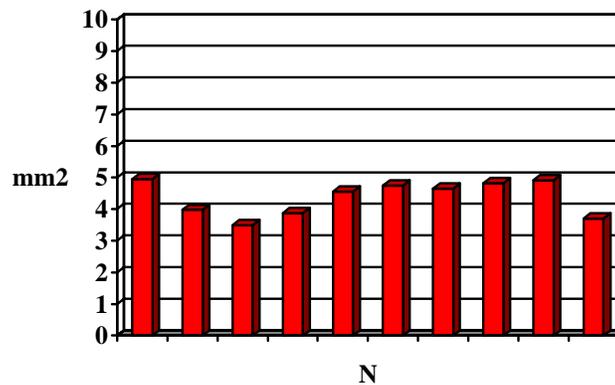
La mejor calidad ósea, en cuanto a su patrón arquitectónico, se observó con el *Fosfato Tricálcico* y el *Hueso Autólogo* (Buena), seguidas por el *Hueso Bovino* y el *Humano en Partículas* (Aceptable), luego el *Humano en Gel* (Aceptable/Mala) y por último el defecto *Control* (Mala).

La mayor cantidad de regeneración, en superficie regenerada expresada en  $\text{mm}^2$ , fue obtenida con el *hueso autólogo* 9,812 (+/- 0,262), seguida por el *Fosfato Tricálcico* 8,640(+/- 0,722), el *Hueso Bovino* 8,392 (+/- 0,770), el *Hueso Humano en Partículas* 8,359 (+/- 0,746), el *Hueso Humano en Gel* 5,520 (+/- 0,200) y por último el defecto *Control* 4,370 (+/- 0,549). (Figs.40 a 50 y Tablas 1 a 6)

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  Anova on Ranks) a la vez que todos los grupos de estudio presentaron diferencias con respecto al control ( $p < 0,05$  Dunnett's). En cuanto a todas las comparaciones apareadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre hueso autólogo con respecto a fosfato tricálcico, hueso bovino y hueso humano en partículas, estos a su vez presentaron diferencias con hueso humano en gel, y por último este tuvo diferencias con respecto al control. ( $p < 0,05$  Student-Newmann-Keuls) (Figs.51 y 52 y Tabla 7)

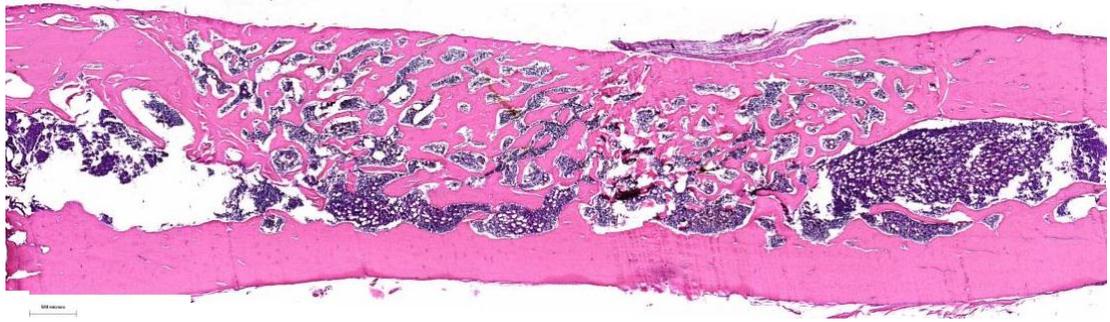


**Fig. 40. Defecto Control.** Se observa una gran pérdida ósea en la cicatrización, invadida por tejido conjuntivo fibroso. En la parte inferior se nota hueso regenerado, con cavidades medulares amplias. La pérdida ósea es mayor en el centro y disminuye cuanto mas se acerca a los límites laterales del defecto. HE 40X Imagen compuesta y reducida

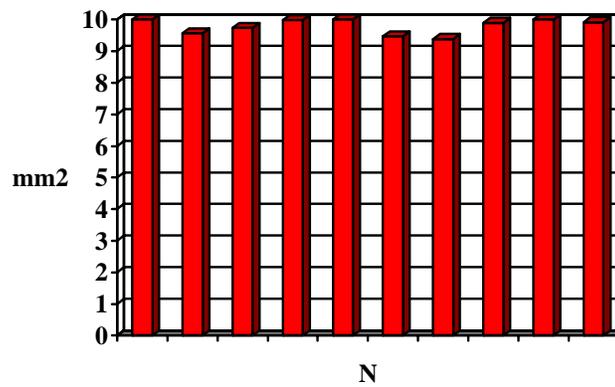


Media	DS	Rango	Max	Min	Mediana	N
4,370	0,549	1,450	4,950	3,500	4,605	10

**Tabla 1. Defecto Control. Superficie Regenerada.** Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm<sup>2</sup>. En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos.

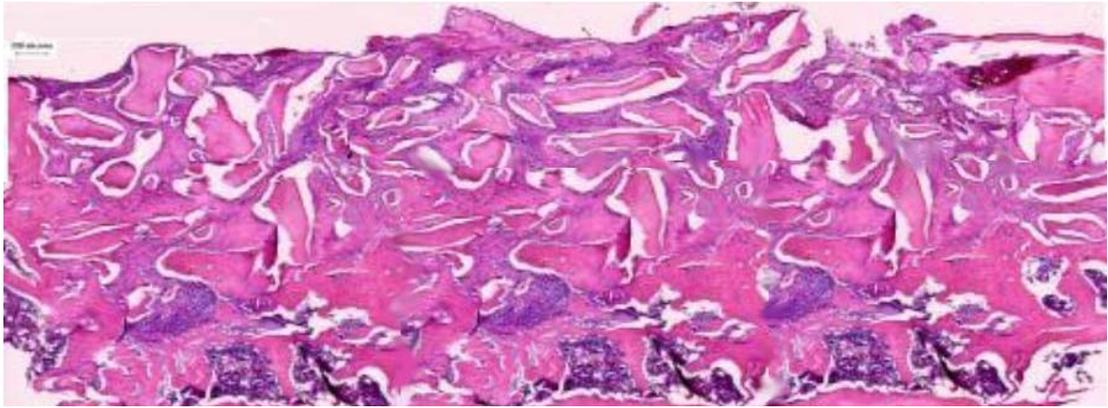


**Fig.41. Hueso Autólogo.** Se observa una regeneración completa del defecto, con hueso maduro y cavidades medulares de tamaño intermedio. Se puede ver también un buen patrón arquitectónico, con trabéculas anchas y buena conectividad entre ellas. HE 40X Imagen compuesta y reducida

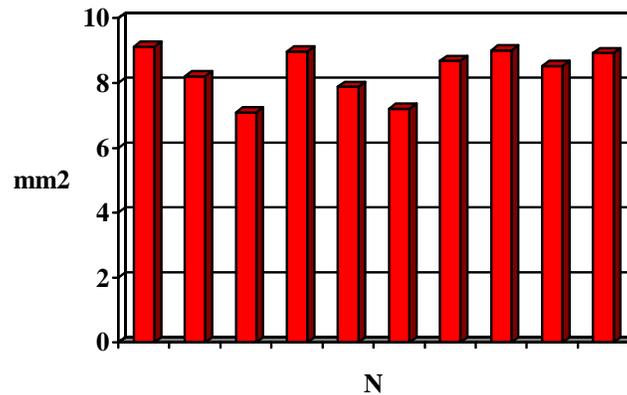


Media	DS	Rango	Max	Min	Mediana	N
9,812	0,262	0,740	10,120	9,380	9,900	10

**Tabla 2. Hueso Autólogo. Superficie Regenerada.** Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm<sup>2</sup>. En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos.

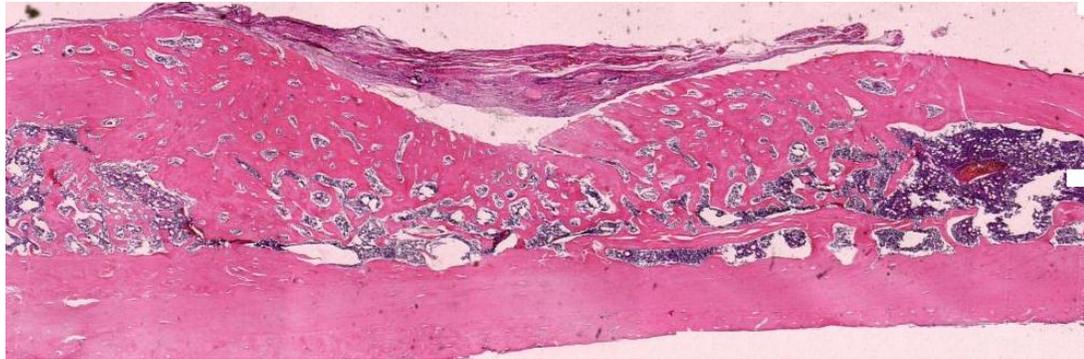


**Fig.42. Hueso Humano en Partículas.** Se verifica una regeneración completa del defecto, con un patrón de regeneración ósea irregular, desorganizado, con restos de partículas de Hueso Humano incluídas en su interior. Es de destacar que al ser también hueso se tiñen de manera similar al hueso vivo, aunque se diferencian por la ausencia de células en su interior. HE 40X Imagen compuesta y reducida

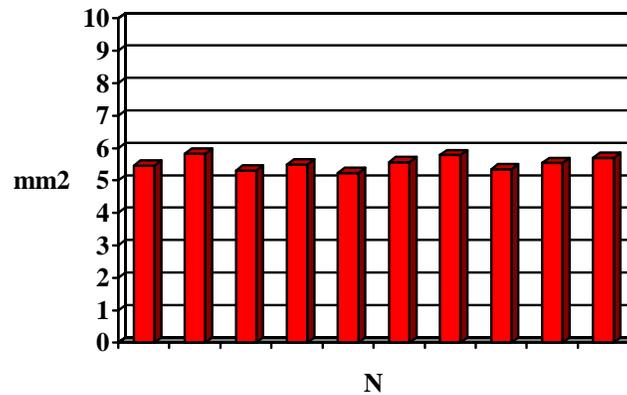


Media	DS	Rango	Max	Min	Mediana	N
8,359	0,746	2,020	9,110	7,090	8,600	10

**Tabla 3. Hueso Humano en Partículas. Superficie Regenerada.** Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm<sup>2</sup>. En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos.

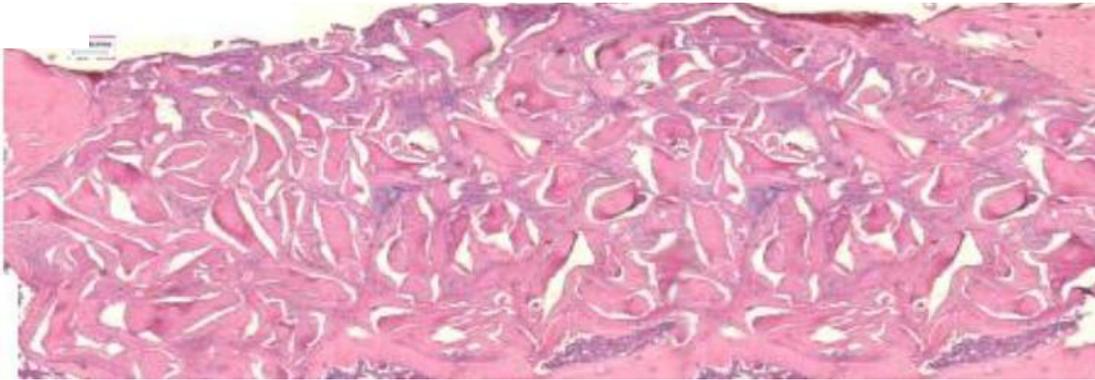


**Fig.43. Hueso Humano en Forma de Gel.** Se observa una regeneración incompleta, con una amplia cavidad residual invadida por tejido fibroso. En la parte inferior se nota hueso regenerado con una buena densidad y una arquitectura aceptable. HE 40X Imagen compuesta y reducida

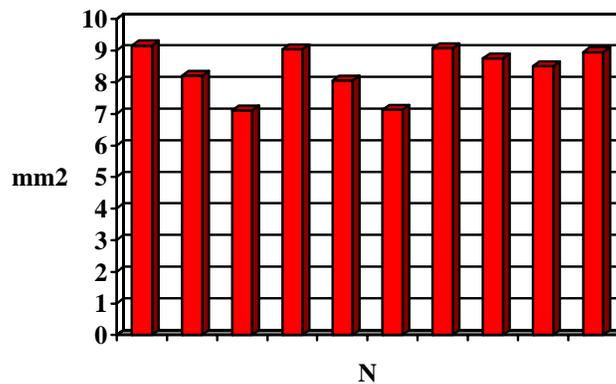


Media	DS	Rango	Max	Min	Mediana	N
5,520	0,200	0,590	5,820	5,230	5,515	10

**Tabla 4. Hueso Humano en Forma de Gel. Superficie Regenerada.** Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm<sup>2</sup>. En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos.

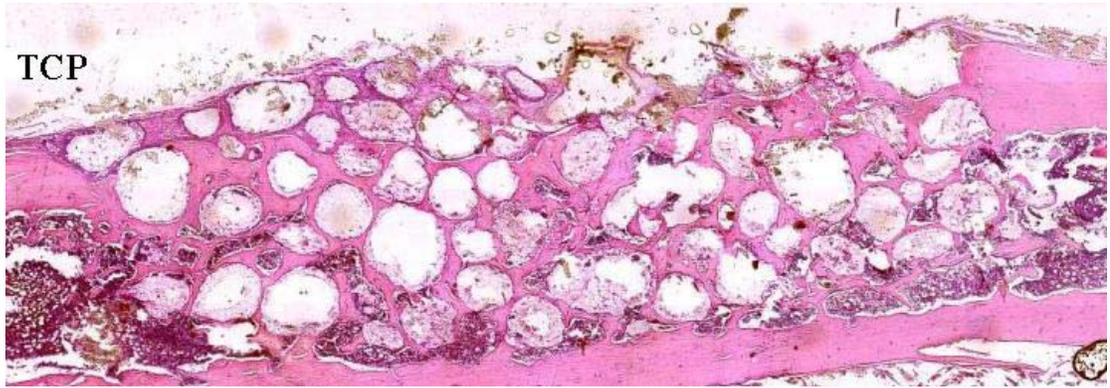


**Fig. 44. Hueso Bovino en Partículas.** Se observa una regeneración completa del defecto, con un patrón de regeneración ósea irregular, con restos de partículas de Hueso Bovino que permanecen incluídas en su interior, muy similar a lo observado con el Hueso Humano en Partículas. HE 40X Imagen compuesta y reducida

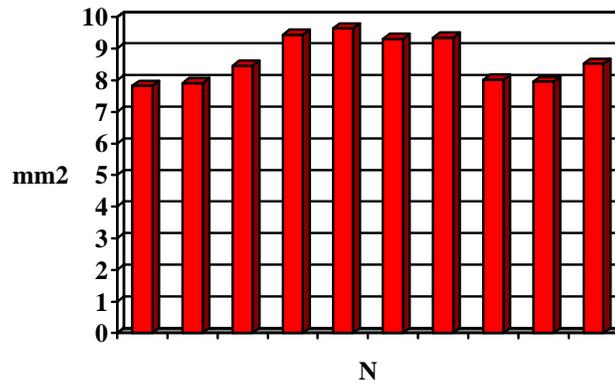


Media	DS	Rango	Max	Min	Mediana	N
8,392	0,770	2,050	9,150	7,100	8,625	10

**Tabla 5. Hueso Bovino en Partículas. Superficie Regenerada.** Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm<sup>2</sup>. En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos.

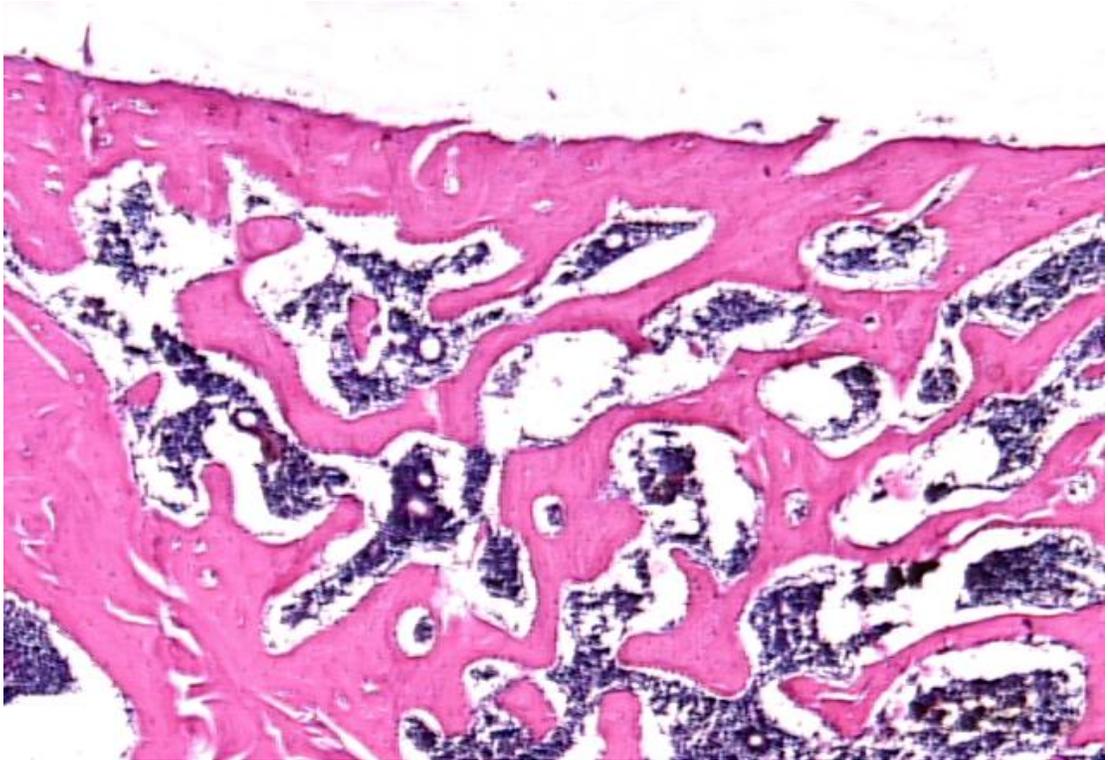


**Fig. 45.** Fosfato Tricálcico. Se observa una regeneración completa del defecto, con un hueso maduro y de patrón arquitectónico bien organizado, similar a un panal o hueso trabecular, rodeando las esferas de fosfato tricálcico que están siendo reabsorbidas. HE 40X Imagen compuesta y reducida.

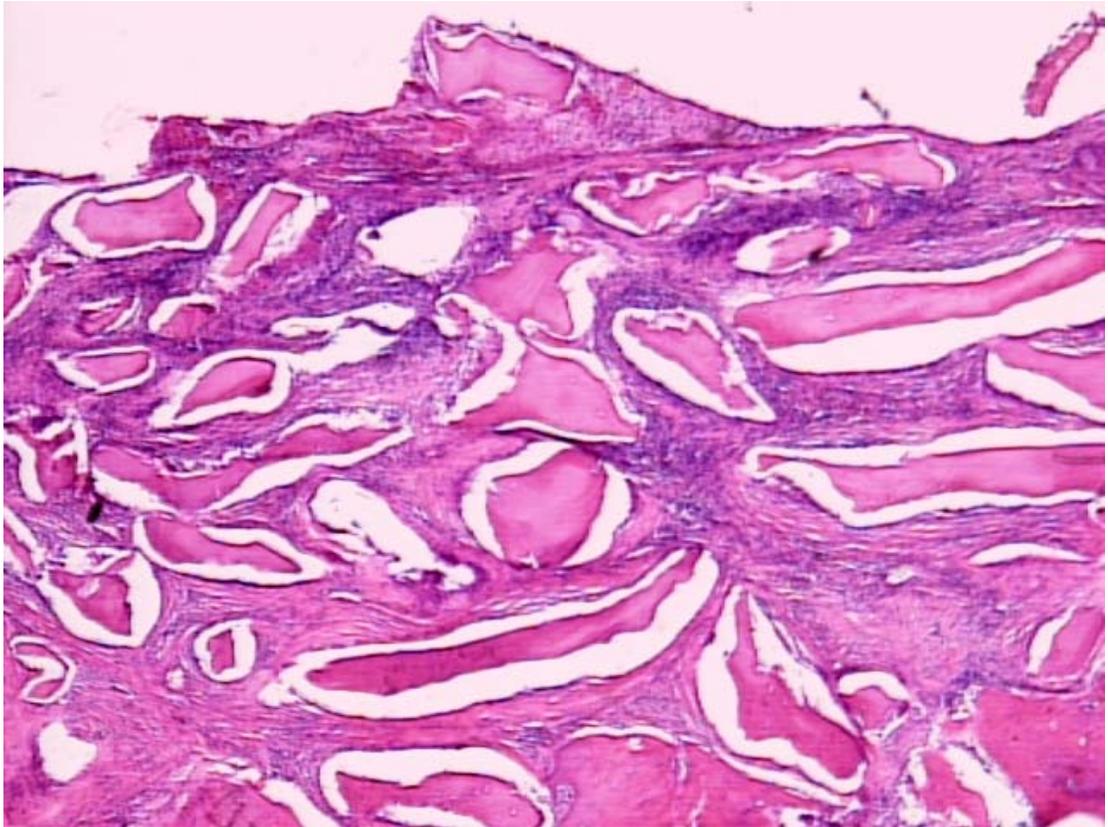


Media	DS	Rango	Max	Min	Mediana	N
8,640	0,722	1,820	9,640	7,820	8,485	10

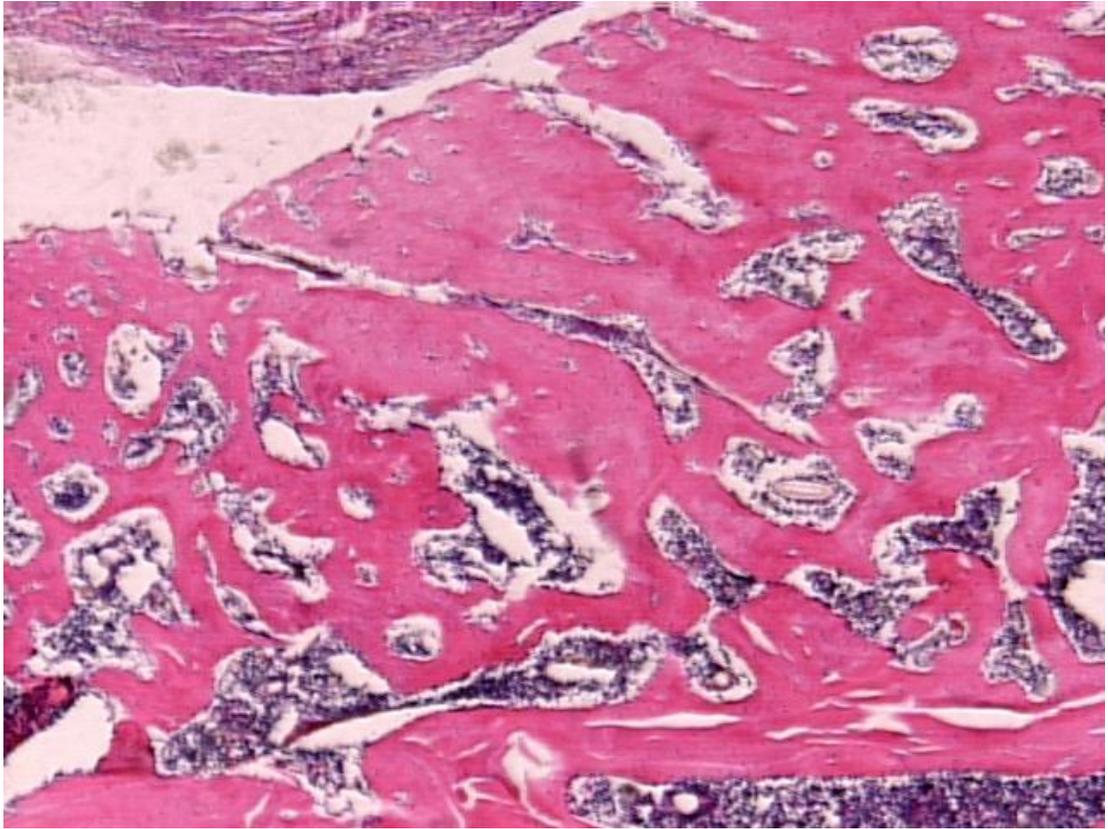
**Tabla 6. Fosfato Tricálcico. Superficie Regenerada.** Cada barra en el gráfico representa un animal. La altura de las mismas representa la superficie regenerada expresada en mm<sup>2</sup>. En la tabla al pie se presenta un resumen de los datos estadísticos descriptivos.



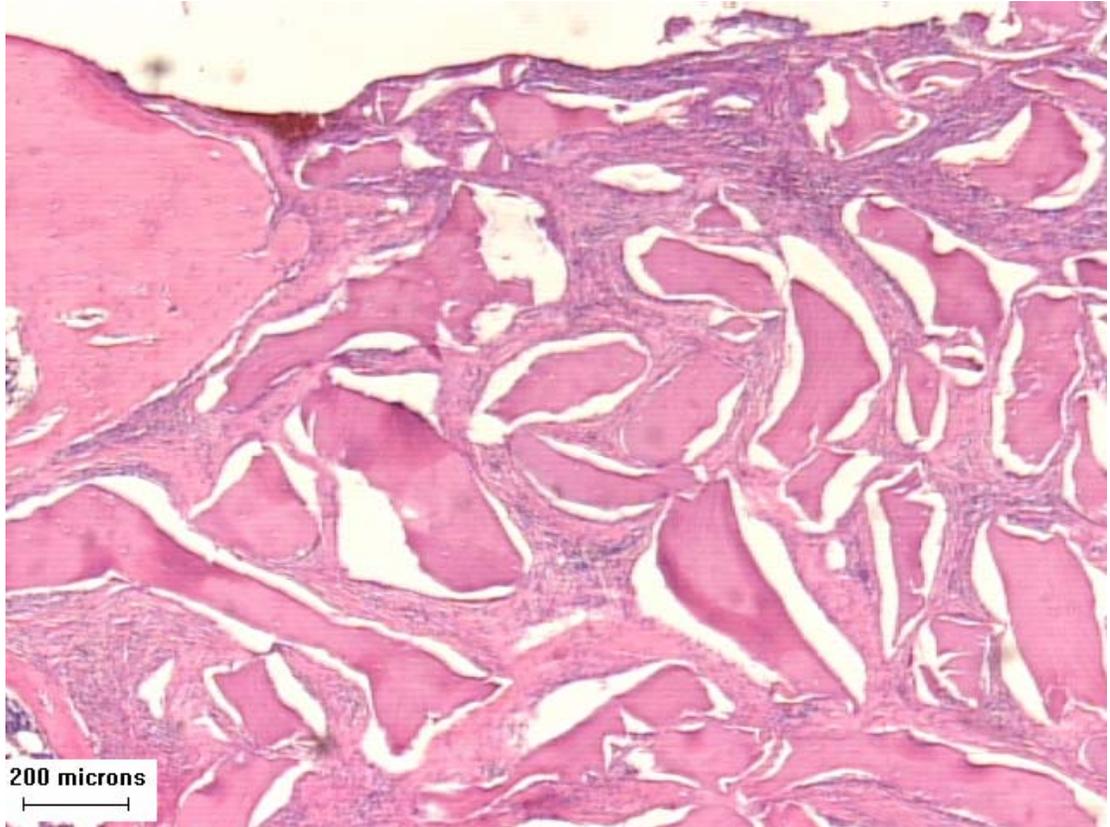
**Fig.46.** *Hueso Autólogo.* HE 40X Magnificación original.



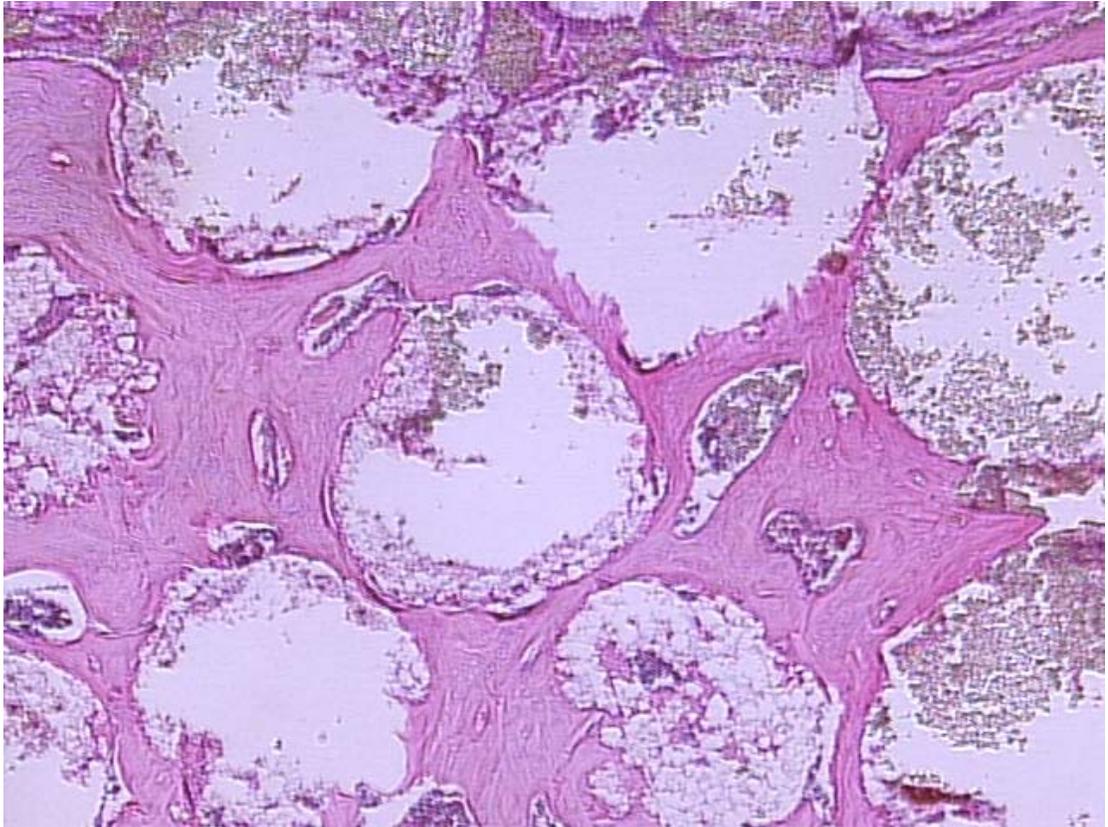
**Fig.47.** *Hueso Humano en Partículas.* HE 40X Magnificación original.



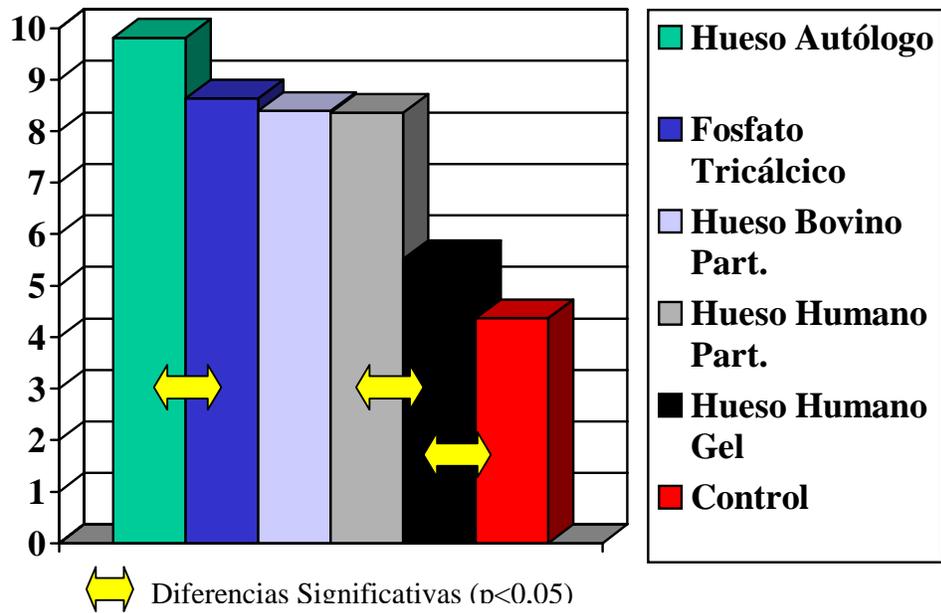
**Fig.48.** *Hueso Humano en Gel.* HE 40X Magnificación original.



**Fig.49.** *Hueso Bovino en Partículas.* HE 40X Magnificación original.



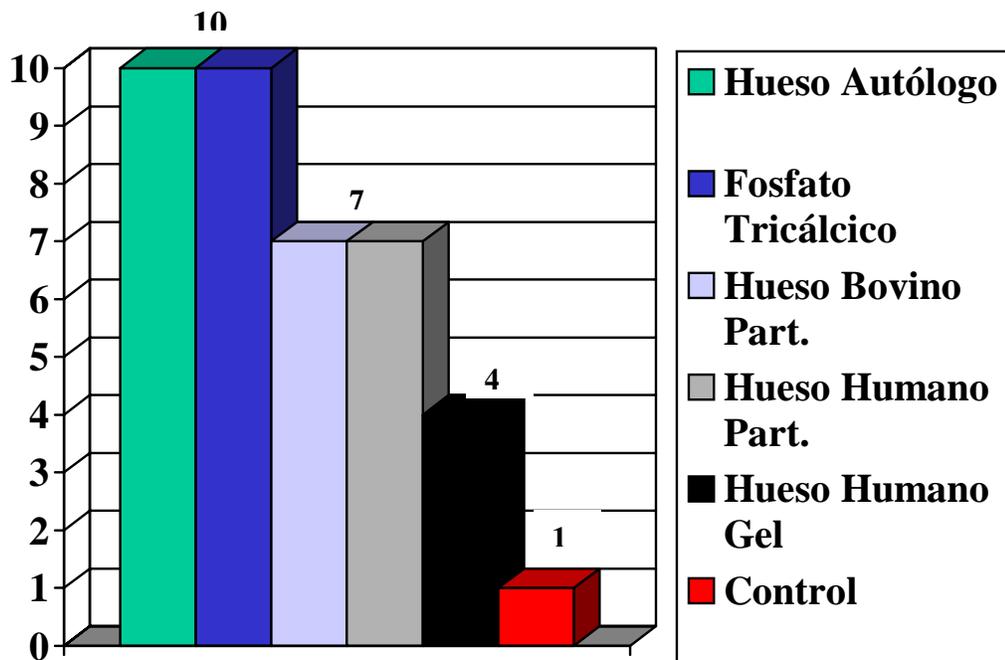
**Fig.50.** *Fosfato Tricálcico.* HE 40X Magnificación original.



	Media	Desvio Estandar	Rango	Max	Min	Mediana	N
<b>Hueso Autólogo</b>	9,812	0,262	0,740	10,120	9,380	9,900	10
<b>Fosfato Tricálcico</b>	8,640	0,722	1,820	9,640	7,820	8,485	10
<b>Hueso Bovino Part.</b>	8,392	0,770	2,050	9,150	7,100	8,625	10
<b>Hueso Humano Part.</b>	8,359	0,746	2,020	9,110	7,090	8,600	10
<b>Hueso Humano Gel</b>	5,520	0,200	0,590	5,820	5,230	5,515	10
<b>Control</b>	4,370	0,549	1,450	4,950	3,500	4,605	10

\* Valores de superficie de hueso regenerado expresados en  $\text{mm}^2$

**Fig.51 y Tabla 7.** Tabla comparativa de la superficie de hueso nuevo regenerado dentro de los defectos en los diferentes grupos



**Fig.52.** Grafico comparativo de la calidad de la arquitectura ósea lograda.

**Referencias:**

- 10. Buena (Regeneración completa con patrón trabecular bien definido);
- 7. Aceptable (Regeneración completa con patrón trabecular más irregular);
- 4. Aceptable/Mala (Patrón trabecular irregular con regeneración incompleta)
- 1. Mala (Regeneración incompleta)

**NOTA:** Los números son arbitrarios, y se utilizan al solo fin de poder graficar las diferencias.

La categoría *Aceptable/Mala* no prevista originalmente, se utiliza para graficar una regeneración incompleta, pero a la vez la parte regenerada con una arquitectura aceptable.

# DISCUSIÓN

---

Las discusiones y consideraciones específicas sobre los resultados se comentan a continuación:

## **I. Evaluación de los tipos de Injertos**

Los injertos utilizados no generaron respuestas adversas en ninguno de los casos.

La mayor dificultad de manipulación y contención dentro de los defectos fue observada con los injertos particulados, tanto bovino como humano, ya que las partículas tienden a moverse y salirse del lugar en que son colocadas. En estos casos es necesario mezclar las partículas con sangre del animal y esperar unos minutos a que comience a coagular. De esta manera, actúa como aglutinante y facilita su adaptación.

El hueso humano procesado en forma de gel presenta condiciones de adaptación muy buenas, aunque al igual que en los casos anteriores, tiende a desplazarse, pero en menor medida.

La manipulación de los distintos tipos, en una proyección clínica, no debería representar ninguna dificultad. En los casos en que se presenten mayores inconvenientes de adaptación, los injertos podrían ser contenidos con la ayuda de membranas de barrera, tanto de colágeno como de teflón, que hemos probado con éxito durante los estudios realizados con anterioridad.

A continuación se discuten cada una de las variables independientes por separado:

## **1) Hueso Autólogo.**

Aparece como la mejor opción por varios factores:

- a) Es hueso propio, por lo que es la posibilidad más natural de reemplazo, con un 0 % de probabilidades de generar algún tipo de reacción con el huésped.
- b) Al ser obtenido momentos antes de su uso, es hueso vivo que conserva en su interior factores de crecimiento que pueden actuar como osteoinductores para lograr una mejor y más rápida regeneración.
- c) La consistencia obtenida es óptima, ya que una vez retirado del filtro, presenta una forma de pasta que es fácilmente adaptable a los requerimientos del defecto, a la vez que presenta una excelente adhesión a los límites del mismo, lo cual asegura una buena inmovilización, requisito fundamental para que la regeneración ocurra.
- d) Presenta otra ventaja, frente a la desventaja natural de los injertos autólogos. Normalmente estos se obtienen a través de la remoción de un bloque, que luego puede ser particulado para facilitar su uso, dejando un pequeño defecto en el área donante. En el caso del uso del filtro, se realiza un desgaste óseo con fresas quirúrgicas y abundante irrigación de solución fisiológica. Este hueso desgastado es absorbido por la cánula de aspiración y retenido en el filtro (malla metálica) dispuesto en su interior. Esto permite que el área donante sea tratada, y remodelada, con máxima delicadeza, sin dejar defectos desprolijos.

Además en el área bucal, este hueso puede ser fácilmente obtenido, por ejemplo, de la ostectomía realizada para liberar un diente con retención

intra-ósea, o de la ostectomía de los lechos creados para la colocación de implantes dentales.

e) Por último, cabe destacar el bajo costo, ya que básicamente lo único necesario para un quirófano medianamente equipado, es la cánula con el filtro.

## **2) Fosfato Tricálcico**

A partir de lo evaluado en el presente trabajo, cuando no se dispone de hueso autólogo suficiente, o bien el paciente prefiere no realizarse una cirugía adicional para acceder al área donante, podría considerarse como la primera opción por varias razones:

a) Ha presentado una regeneración completa con una buena arquitectura ósea.

b) Al ser un producto químico, que al no derivar de muestras óseas humanas o animales, posee una nula probabilidad de generar reacciones adversas con el huésped. Esto mismo puede derivar en una mayor probabilidad de aceptación por parte de los pacientes.

c) Tiene una gran adhesividad a los tejidos, fundamentalmente después de la coagulación, gracias a su estructura porosa.

d) Su forma geométrica ayuda a generar un patrón arquitectónico bien regular, como se pudo ver en las microfotografías.

e) Es reabsorbido progresivamente, a medida que ocurre la regeneración, actuando como un andamiaje, que dirige la misma. Además, al reabsorberse libera fosfatos y calcio al medio, los cuales pueden ser incorporados a la matriz ósea en formación, contribuyendo a su mineralización. Es de destacar

que dicha mineralización es mayor, según se ve en las muestras, con respecto a los preparados en partículas a partir de hueso humano o bovino.

f) Forma una gran cohesión entre las partículas, generando una barrera que impide la proliferación de tejido conjuntivo fibroso dentro del defecto, con lo cual no aparece como necesario la utilización de membranas (barreras mecánicas) de manera conjunta.

g) Como desventaja puede señalarse la relativamente lenta reabsorción del material, que considerando una visión clínica (como la que se muestra aquí macroscópicamente –fig.53- y sobre la que se discute más adelante) da una imagen de que no hay regeneración sino una simple permanencia de partículas. Sin embargo la histología revela que hay hueso nuevo, más allá de la permanencia de las esferas.

Esto no supone un gran problema, sobre todo si no se va a volver a trabajar en la zona en el corto plazo. No obstante, en el caso de prever la colocación de implantes dentales, si bien el hueso presente le permitiría lograr una buena estabilidad inicial, sería deseable la que las partículas remanentes fueran las menos posibles. (Esto también es válido para los otros injertos particulados) En este sentido, se consideran dos puntos, que son la utilización de partículas más pequeñas y la combinación con factores de crecimiento, que forman parte del proyecto para un nuevo estudio.

### **3) Hueso Bovino en Partículas**

Podría ser considerarse como una tercera opción, detrás de los anteriores, de acuerdo a lo observado:

a) La regeneración ha sido completa, aunque con hueso más inmaduro y desorganizado que los anteriores.

b) Se observa muy similar al hueso humano en partículas, por lo que sería preferible debido al menor riesgo de transmisión de patologías.

c) Dentro de las desventajas, al igual que con el hueso humano en partículas, está la dificultad de monitorear la evolución del injerto ya que, tanto clínicamente como radiográficamente, se produce una mimetización muy importante. Esto produce una visión de excelente regeneración, cuando en realidad hay numerosas partículas en su interior. Histológicamente, estas se tiñen igual que el hueso vivo, aunque es posible identificarlas por su forma y, fundamentalmente, por la ausencia de células.

Esta diferencia entre la visión macroscópica e histológica se comenta más adelante y se demuestra en la fig.24.

#### **4) Hueso Humano en Partículas**

Comparte las mismas características que el anterior, ya que su composición es prácticamente igual (hidroxiapatita), habiendo presentado en este trabajo resultados muy similares. Se prefiere menos, por ser derivado humano y presentar mayores riesgos de transmisión de enfermedades que el derivado bovino. Sin embargo, cabe destacar que el proceso de purificación y eliminación del contenido orgánico incluye un amplio testeo para los virus humanos transmisibles más importantes, y que el riesgo real es bajísimo, menos aún que el de una transfusión de sangre proveniente de banco.

## **5) Hueso Humano en Gel**

Corresponden las mismas consideraciones que el anterior en cuanto a la bioseguridad. Se diferencian por la forma, ya que éste está constituido por partículas óseas microscópicas aglutinadas en un polímero sintético en forma de gel.

En cuanto a su aplicación, ha demostrado poseer una muy baja viscosidad, y facilidad de adaptarse a las irregularidades del defecto. Sin embargo, esta fluidez no ha permitido que se mantenga estable dentro de un defecto de gran tamaño, así como tampoco formó una barrera para evitar la proliferación de tejido conjuntivo fibroso como los anteriores.

Los resultados mostraron una pérdida importante de altura, resultando en un importante defecto residual. No obstante, en la parte inferior, se observa hueso regenerado con una buena densidad. Esto podría indicar que este material podría funcionar bien en cavidades pequeñas o como adyuvante en la consolidación de fracturas, pero desaconseja su uso en defectos de gran tamaño.

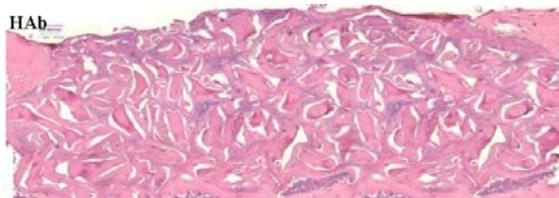
## **II. Correlación Macro – Microscópica**

Especial consideración merecen el Fosfato Tricálcico y el Hueso Bovino en Partículas, ya que de acuerdo a lo observado podrían considerarse como la primera y segunda opción de tratamiento, luego de los injertos autólogos. Por esta razón, creemos importante completar la información presentada con la correlación de las visiones macroscópica e histológica de estos materiales, con el fin de comprender mejor cual sería la

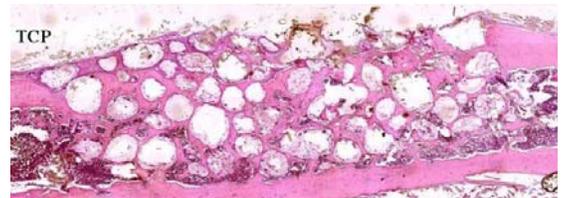
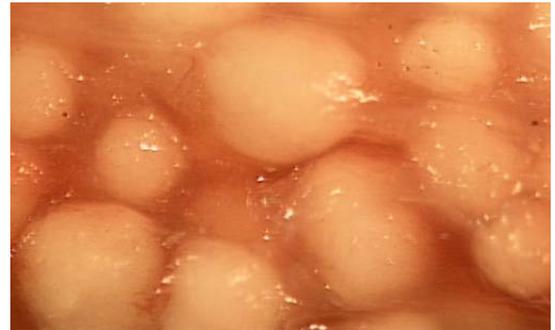
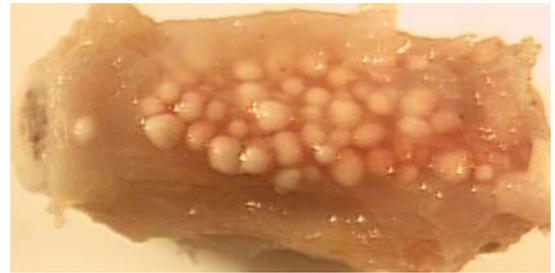
observación clínica en cada caso, así como la realidad histológica correspondiente. (Fig.53)

### Correlación Macro-Microscópica

#### Hueso Bovino en Partículas



#### Fosfato Tricálcico



**Fig.53.** Secuencia comparativa entre la visión macroscópica y la microscópica para el Hueso Bovino en Partículas y el Fosfato Tricálcico.

Se observa un contraste entre la valoración macroscópica y la microscópica. El HBp parecería muy superior en el primer caso, donde se nota una mimetización muy importante con respecto al hueso adyacente, mientras que las esferas de FTC se siguen observando a simple vista. A diferencia de la visión macroscópica, el FTC muestra mejor comportamiento histológicamente, aún presentando similares valores de superficie regenerada, produciendo un ordenamiento del hueso nuevo muy superior.

## CONCLUSIONES

---

Dentro de los límites del presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- El hueso autólogo obtenido por medio del filtro ha presentado los mejores resultados tanto en cuanto arquitectura como en la superficie regenerada. Asimismo, las condiciones de manipulación fueron óptimas debido a su consistencia tipo pasta y su gran adhesividad. Por este motivo debería ser usado siempre que la situación clínica lo permita.
- En caso de ser necesario recurrir a un sustituto, se debería considerar al fosfato tricálcico como de primera elección, ya que si bien la superficie regenerada fue similar a los otros injertos particulados, la arquitectura ósea lograda fue muy superior.
- En una tercera línea podrían usarse los huesos particulados tanto humano como bovino, siendo éstos últimos los preferibles. En ambos casos, se debería tener en cuenta la mimetización que se produce entre estos sustitutos y el hueso que los circunda, ya que en una visión clínica podría aparecer como una excelente regeneración, pero en la realidad histológica se observan gran cantidad de partículas remanentes.
- El hueso humano en forma de gel ha mostrado una capacidad interesante en cuanto a la regeneración, pero debido a sus

características físicas, donde se destaca su alta fluidez, no debería usarse en el tratamiento de grandes defectos. Sin embargo, según lo observado podría utilizarse, tanto como complemento de injertos particulados, así como también en el tratamiento de pequeños defectos y/o fracturas.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. **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, pags. 3-14
2. **Rodan, GA; Raiz, LG; Bilezikian, JP.** *"Pathophysiology of Osteoporosis"* En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. "Principles of Bone Biology" 1996, Academic Press, pags.979-992
3. **Beers, MH; Berkow, R.** *Manual Merck. "Enfermedades Musculoesqueleticas y del Tejido Conjuntivo"*, 1999, 10 ed., pags, 471-483
4. **Nyman, R et al.** *"Membrane guided bone regeneration. Segmental radius defects studies in the rabbit"* Acta Orthop. Scand, 1995, 66 (2): 169-173
5. **Zitzmann, NU; Naef, R; Scharer, P.** *"Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration"* Int. J. Oral Maxillofac. Implants 1997, 12 (6): 844-52.
6. **Luchetti, C et al** *"Uso del Pamidronato Disódico en el tratamiento de defectos estructurales del hueso"* Rev. Arg. De Ostelgia,2002, 1 (1): 16-17
7. **Bianchi, A.** *"Prótesis Implanto Soportada. Bases Biológicas"* 2001, Actualidades Medico Odontológicas Latinoamericanas, pags. 3-155.
8. **Anitua Aldecoa, E.** *"Un Nuevo Enfoque en la Regeneración Ósea"* 2000, Puesta al Día Publicaciones, pags.17-46
9. **Lundgren ,AK; Sennerby, L; Lundgren, D et al.** *"Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia."* Clin. Oral Implants Res. 1997, 8 (2): 82-9.
10. **Rabie AB; Wong RW; Hagg U** *"Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits."* Br J Oral Maxillofac Surg 2000 Oct;38(5):565-570
11. **Richardson CR et al.** *"Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans".* J Clin Periodontol 1999 Jul;26(7):421-8

12. **Aichelmann-Reidy ME; Yukna RA** *"Bone replacement grafts. The bone substitutes"*. Dent Clin North Am 1998 Jul;42(3):491-503
13. **Price, JS et al.** *"The Cell Biology of Bone Growth"*. Eur. J. Clin. Nutr., 1994, 48: 131-149
14. **Frost, HM et al.** *"Perspectives: A Vital Biomechanical Model of the Endochondral Ossification Mechanism"* Anat. Rec., 1994, 240: 435-446
15. **Einhorn, TA.** *"Biomechanics of Bone"* En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. *"Principles of Bone Biology"* 1996, Academic Press, pags. 25-38
16. **Hert, J et al.** *"Osteon Orientation of the Diaphysis of the Long Bones in Man"*. Bone, 1994, 15: 269-277
17. **Rossert, J and de Crombrughe, B.** *"Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation"* En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. *"Principles of Bone Biology"* 1996, Academic Press, pags. 127-142
18. **Aubin, JE et al.** *"Osteoblast and Chondroblast Differentiation"*. Bone, 1995, 17: 77-83
19. **Aubin, JE and Liu, F.** *"The Osteoblast Lineage"* En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. *"Principles of Bone Biology"* 1996, Academic Press, pags. 51-67
20. **Nijweide, PJ et al.** *"The Osteocyte"* En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. *"Principles of Bone Biology"* 1996, Academic Press, pags. 115-126
21. **Vaananen, K.** *"Osteoclast Function: Biology and Mechanisms"*. En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. *"Principles of Bone Biology"* 1996, Academic Press, pags. 103-113
22. **Ott, SM.** *"Theoretical and Methodological Approach"* En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. *"Principles of Bone Biology"* 1996, Academic Press, pags. 231-241
23. **Montenegro, SD et al.** *"Metabolismo Oseo: Actualización"* Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste, 2002 N° 117 –
24. **Horowitz, MC and Lorenzo, JA.** *"Local Regulators of Bone: IL1, TNF, Lymphotoxin, Interferon gamma, IL8, IL10, IL4, the LIF/IL6 Family and Additional Cytokines"* En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. *"Principles of Bone Biology"* 1996, Academic Press, pags. 687- 700

25. **Ciapetti G. Et al.** "Osteoblast growth and function in porous poly epsilon -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study". *Biomaterials*. 2003 Sep;24(21):3815-24.
26. **Committee on Research, Science and Therapy of the American Academy of Periodontology.** "Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration". *J Periodontol*. 2001 Jun;72(6):834-8
27. **Moore WR, Graves SE, Bain GI.** "Synthetic bone graft substitutes". *ANZ J Surg*. 2001 Jun;71(6):354-61
28. **Heard RH, Mellonig JT.** "Regenerative materials: an overview". *Alpha Omegan*. 2000 Dec;93(4):51-8
29. **Terheyden H et al.** "Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs". *Clin Oral Implants Res*. 1999 Dec;10(6):510-21.
30. **Hockers, T** "The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs". *Clin Oral Implants Res*. 1999 Dec;10(6):487-98.
31. **Manjubala I et al.** "Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition." *J Biomed Mater Res*. 2002;63(2):200-8.
32. **Ogose A et al.** "Histological examination of beta-tricalcium phosphate graft in human femur". *J Biomed Mater Res*. 2002;63(5):601-4.
33. **Niedhart C et al.** "Stimulation of bone formation with an in situ setting tricalcium phosphate/rhBMP-2 composite in rats". *J Biomed Mater Res*. 2003 Apr 1;65A(1):17-23.
34. **Hao H et al.** "A histological evaluation on self-setting alpha-tricalcium phosphate applied in the rat bone cavity". *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):431-42.
35. **Geddes, AD.** "Animal models of bone disease" En: Bilezikian et al "Principles of Bone Biology", Ed. Academic Press, 1996, pags.1343-1354.
36. **Flecknell, PA.** "Anestesia de animales de laboratorio". , 1998, Ed. Acribia., pags. 15-157