



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

**TESIS DE MAGISTER**

**“FOSFATO TETRACÁLCICO FRAGUABLE,  
HIDROXIAPATITA SINTÉTICA Y LA COMBINACIÓN  
ENTRE AMBOS COMO MATERIALES DE INJERTO EN  
REGENERACIÓN OSEA GUIADA”**



**MAESTRANDO:  
OD. ADOLFO NICOLAS BAEZ**

**DIRECTOR:  
PROF. MG. CESAR LUCHETTI**

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

**AÑO 2012**

**“FOSFATO TETRACÁLCICO FRAGUABLE,  
HIDROXIAPATITA SINTÉTICA Y LA COMBINACIÓN  
ENTRE AMBOS COMO MATERIALES DE INJERTO EN  
REGENERACIÓN OSEA GUIADA”**

**A mi familia.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Prof. Mg. César Gabriel Luchetti,**

Por su desempeño fundamental en el desarrollo de mi carrera odontológica y la dirección de este trabajo.

**Prof. Dra. Alicia Elena Kitrilakis,**

Por su ejemplo en la excelencia y constancia en el trabajo clínico, científico y docente.

**Prof. Dra. María Mercedes Medina,**

Por su apoyo y estímulo a nuestro grupo de jóvenes investigadores.

**Prof. Dra. Cecilia Carbone,**

Por brindar todo su conocimiento y apoyo en el campo de la investigación.

**Dr. Miguel Ayala,**

Por la enseñanza y colaboración recibida en el manejo de animales de laboratorio.

**Dra. María Alejandra Fanovich,**

Por la provisión de los materiales de injerto utilizados en este trabajo.

**Srta. Agustina Cerruti,**

Por su ayuda en el diseño y dibujos esquemáticos del presente estudio.

## INDICE GENERAL

|                         |    |
|-------------------------|----|
| Título.....             | 2  |
| Agradecimientos.....    | 4  |
| Índice.....             | 5  |
| Resumen.....            | 6  |
| Introducción.....       | 8  |
| Marco Teórico.....      | 10 |
| Objetivos.....          | 49 |
| Material y Métodos..... | 50 |
| Resultados.....         | 69 |
| Discusión.....          | 85 |
| Conclusiones.....       | 88 |
| Bibliografía.....       | 89 |

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del Fosfato tetracálcico fraguable  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$ , su combinación con la hidroxiapatita sintética y su posible aptitud como material de injerto. Como así también diseñar una estrategia terapéutica frente a los defectos estructurales del hueso e identificar factores que favorezcan la neoformación ósea.

Se utilizaron 30 ratas endocriadas de cepa Fisher (F344/N), libres de patógenos específicos (SPF), con un peso de 500 gramos y 16 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Las mismas fueron escogidas por muestreo aleatorio simple, y luego divididas en 3 grupos de 10 animales cada uno.

Todas fueron operadas bajo anestesia general con Ketamina/ Xilacina 75 mg/kg + 10 mg/kg por vía IM. Se realizó una perforación de 9 mm de largo, por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad.

El grupo 1 fue injertado con fosfato tetracálcico fraguable, el grupo 2 con la combinación de fosfato tetracálcico e hidroxiapatita sintética y el grupo 3, sin tratamiento, fue el grupo control.

Una vez operados, los animales integrantes de cada una de las experiencias que se efectuaron, permanecieron alojados bajo observación en el pabellón de Animales de Experimentación de la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, durante 30 días.

Posteriormente los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono, y sus fémures resecados a fin de hacer preparados para su

evaluación por microscopía. Estudios que se llevaron a cabo en el Servicio de Microscopía de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

Las mismas fueron digitalizadas y se evaluó la superficie de hueso regenerado, dentro del defecto.

Los distintos elementos de la imagen histológica fueron segmentados en base al color de la tinción (H.E) y posteriormente calculada su superficie mediante un analizador digital de imágenes.

## INTRODUCCIÓN

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

El mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, ya sea proveniente del propio paciente, aunque conlleva una cirugía adicional para tomar el hueso a injertar, usualmente de la zona del mentón, trígono retromolar, tuberosidad del maxilar, calota craneana o cresta ilíaca, dependiendo de la cantidad necesaria (autoinjerto óseo), o bien obtenido de un donante (aloinjerto óseo).

En el campo de la odontología, a partir del desarrollo de la implantología es que comenzaron a realizarse cada vez más estudios con respecto a este tema, debido a la falta, en muchas ocasiones, de hueso disponible para colocar implantes.

Por esto, en los últimos tiempos, las investigaciones han estado centradas en crear nuevo hueso donde sea necesario, y así poder aumentar el número de personas que puedan gozar de los beneficios de la implantología.

Con este fin se han utilizado diversos materiales y técnicas. 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.



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 materiales aloplásticos a base de hidroxiapatita o fosfato de calcio.

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.

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. Las nuevas formulaciones de sustitutos han generado una verdadera revolución en el tema, debido a sus propuestas mayores facilidades de manipulación, entre ellas se destacan el fosfato tetracálcico fraguable y la hidroxiapatita sintética. Sin embargo, el escaso tiempo que llevan en desarrollo, determina pocos estudios independientes, que hayan valorado la verdadera funcionalidad de los mismos<sup>1,2</sup>.

## MARCO TEÓRICO

El hueso es un órgano firme, duro y resistente que forma parte del endoesqueleto de los vertebrados, está compuesto por tejidos duros y blandos.

El principal tejido duro es el tejido óseo, un tipo especializado de tejido conectivo constituido por células (osteocitos) y componentes extracelulares calcificados.

Hay 206 huesos en el cuerpo humano, éstos poseen una cubierta superficial de tejido conectivo fibroso llamado periostio y en sus superficies articulares están cubiertos por tejido conectivo cartilaginoso. Los componentes blandos incluyen a los tejidos conectivos mieloide tejido hematopoyético y adiposo (grasa) la médula ósea. El hueso también cuenta con vasos y nervios que, respectivamente irrigan e inervan su estructura.<sup>3</sup>

Los huesos poseen formas muy variadas y cumplen varias funciones. Con una estructura interna compleja pero muy funcional que determina su morfología, los huesos son livianos aunque muy resistentes y duros.

El conjunto total y organizado de las piezas óseas (huesos) conforma el esqueleto o sistema esquelético. Cada pieza cumple una función en particular y de conjunto en relación con las piezas próximas a las que está articulada.<sup>4</sup>

Los huesos en el ser humano, son órganos tan vitales como los músculos o el cerebro, y con una amplia capacidad de regeneración y reconstitución.

Es un tejido muy consistente, resistente a los golpes y presiones pero también elástico, protege órganos vitales como el corazón, pulmones, cerebro, etc.

Asimismo permite el movimiento en partes del cuerpo para la realización de trabajo o actividades estableciendo el desplazamiento de la persona. Forma el aparato locomotor originando la estructura ósea o esqueleto. Es también un depósito de almacenamiento de calcio y fósforo del cuerpo.

Los huesos se componen de un tejido vivo llamado tejido conectivo.<sup>5</sup>

## CLASIFICACIÓN

**Huesos Largos.-** presentan una forma cilíndrica, predomina la longitud sobre el ancho y grosor, se dividen en tres porciones un cuerpo y dos extremos (proximal y distal), generalmente se encuentran en los miembros locomotores. Ejemplo: húmero, fémur, metacarpos, etc.

**Huesos Cortos.-** presentan una forma cuboide, siendo que ninguna de sus dimensiones predomina, su función es de amortiguamiento. Ejemplos: huesos del carpo y tarso.

**Huesos Planos.-** su principal característica es que son más anchos y largos que gruesos, su función es la de proteger tejidos blandos e inserción de grandes masas musculares. Ejemplos: escápula u omóplato, huesos del cráneo y coxal.

**Huesos Irregulares.-** no presentan forma o división predominante para su agrupación, son impares y se localizan en la línea media, sus funciones son variables aunque la de mayor importancia es la protección del sistema nervioso central. Ejemplos: vértebras, occipital, falange distal.<sup>3, 5, 6</sup>

## COMPOSICIÓN

La constitución general del hueso es la del tejido óseo. Si bien no todos los huesos son iguales en tamaño y consistencia, en promedio, su composición química es de un 25% de agua, 45% de minerales como fosfato y carbonato de calcio, y 30% de materia orgánica, principalmente colágeno y otras proteínas. Así, los componentes inorgánicos alcanzan aproximadamente 2/3 (65%) del peso óseo (y tan sólo un 35% es orgánico).

El componente principal de la **matriz inorgánica** es la la hidroxiapatita esta aparece a intervalos regulados de 60 nm a 70 nm a lo largo de las fibras y está asociada a cantidades variables de carbonato, además encontramos calcio, fosfatos, hidroxilos y carbonatos. También aniones citrato, fluoruros , cloruros, cationes magnesio, sodio, potasio, estroncio, hierro, zinc, etc. Algunos de estos pueden sustituir al calcio en la mineralización y, por o tanto, son denominados osteotropos.

La **matriz orgánica** está formada por dos componentes: Fibrilar(95%)representado casi exclusivamente por colágeno tipo I y no fibrilar (5%) formada por proteínas no colágenas como la osteocalcina , la osteonectina , fosfoproteínas ,proteoglicanos ,sialoproteínas y seroproteínas. Este último grupo de biomoléculas no forma parte directamente de la constitución estructural del hueso, sino que desempeña un rol de regulación.<sup>1</sup>

### **Sustancia Fundamental :**

Compone 10% de la matriz orgánica, posee una concentración menor de glucosaminoglucanos (GAG), que el cartílago (ácido hialurónico, condroitín sulfato, queratán sulfato), es una matriz acidofila (en parte debido al colágeno). Posee proteínas exclusivas del hueso como la osteocalcina unida a la hidroxipatita. La osteopontina también unida a la hidroxipatita es similar a la fibronectina.

### **Colágeno:**

Es una molécula proteica o proteína que forma fibras, las fibras colágenas. Estas se encuentran en todos los animales. Es el componente más abundante de los huesos, cubriendo un 25% de la masa total de proteínas en los mamíferos. Comprende el 90% de la matriz orgánica ósea ( tipo 1). Las fibras colágenas son flexibles, pero ofrecen gran resistencia a la tracción. El punto de rotura de las fibras colágenas de los tendones humanos se alcanza con una fuerza de varios cientos de kilogramos por centímetro cuadrado. A esta tensión solamente se han alargado un pequeño porcentaje de su longitud original.

Cuando el colágeno se desnaturaliza por ebullición y se deja enfriar, manteniéndolo en una solución acuosa, se convierte en una sustancia muy conocida, la gelatina.

**Colágeno tipo I:** Se encuentra abundantemente en el hueso. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas

alfa de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. A uno de los cuales se designa como cadena alfa1 y al otro, cadena alfa2. En el tejido óseo es sintetizado por los osteoblastos. Su función principal es la de resistencia al estiramiento.

### **Sustancia inorgánica:**

Esta compuesta por Fosfato cálcico presente en forma de cristales de hidroxiapatita que aparecen a intervalos regulados de 60 nm a 70 nm a lo largo de las fibras. También posee citrato, bicarbonato, fluoruro, magnesio e ion sodio. El hueso además posee afinidad por sustancias radioactivas que destruyen sus componentes.

Los minerales de los huesos no son componentes inertes ni permanecen fijos sino que son constantemente intercambiados y reemplazados junto con los componentes orgánicos en un proceso que se conoce como remodelación ósea.

Su formación y mantenimiento está regulada por las hormonas y los alimentos ingeridos, que aportan vitaminas de vital importancia para su correcto funcionamiento.<sup>6,7</sup>

## **TIPOS DE TEJIDO ÓSEO**

Los huesos poseen zonas con diferente densidad que se diferencian macroscópicamente y microscópicamente en áreas de hueso compacto y áreas de hueso esponjoso, no existen límites perfectamente marcados entre éstas existiendo entre ellos una pequeña zona de transición.

### **HUESO COMPACTO (cortical)**

Este tipo de tejido forma la diáfisis (la porción alargada de los huesos largos que queda en el medio de las epífisis o porciones distales de los mismos). Aparece como una matriz ósea mineralizada que esta depositada en laminillas, entre éstas se ubican lagunas con osteocitos (cada laguna con el osteocito es llamada osteoblasto) desde cada una se irradian canalículos (conductillos muy delgados), ramificados que las comunican y permiten la nutrición de los osteocitos (recordemos que esto es importante ya que los osteocitos se encuentran rodeados de matriz mineralizada que no permite la difusión de nutrientes hacia éste).

Este tipo de tejido se organiza en tres formas distintas:

- Concéntricamente alrededor de un canal longitudinal vascular (llamado conducto de Havers), que contiene capilares, venulas postcapilares y a veces arteriolas, formando estructuras cilíndricas llamadas osteones o sistemas haversianos, visibles al microscopio óptico.

- Entre los osteones se dispone de forma irregular formando los sistemas intersticiales separados de los osteones por las llamadas líneas de cemento (capa de matriz ósea pobres en fibras colágeno que no son atravesados por estos canalículos, o sea que no poseen elementos vasculares; todo esto es observable al microscopio óptico).
  
- Por debajo del periostio sobre su superficie interna, y por debajo del endostio se ubican alrededor de la circunferencia del tallo de forma extendida las laminillas circunferenciales externas e internas (paralelas a la superficie).

Los canales haversianos comunican con la superficie o la cavidad medular por canales transversales u oblicuos llamados canales perforantes o de Volkman que poseen vasos que vienen del periostio y del endosito, son más grandes que los de los osteones. Al microscopio óptico es difícil reconocerlos porque no se encuentran rodeados de láminas concéntricas.<sup>3,5,8</sup>



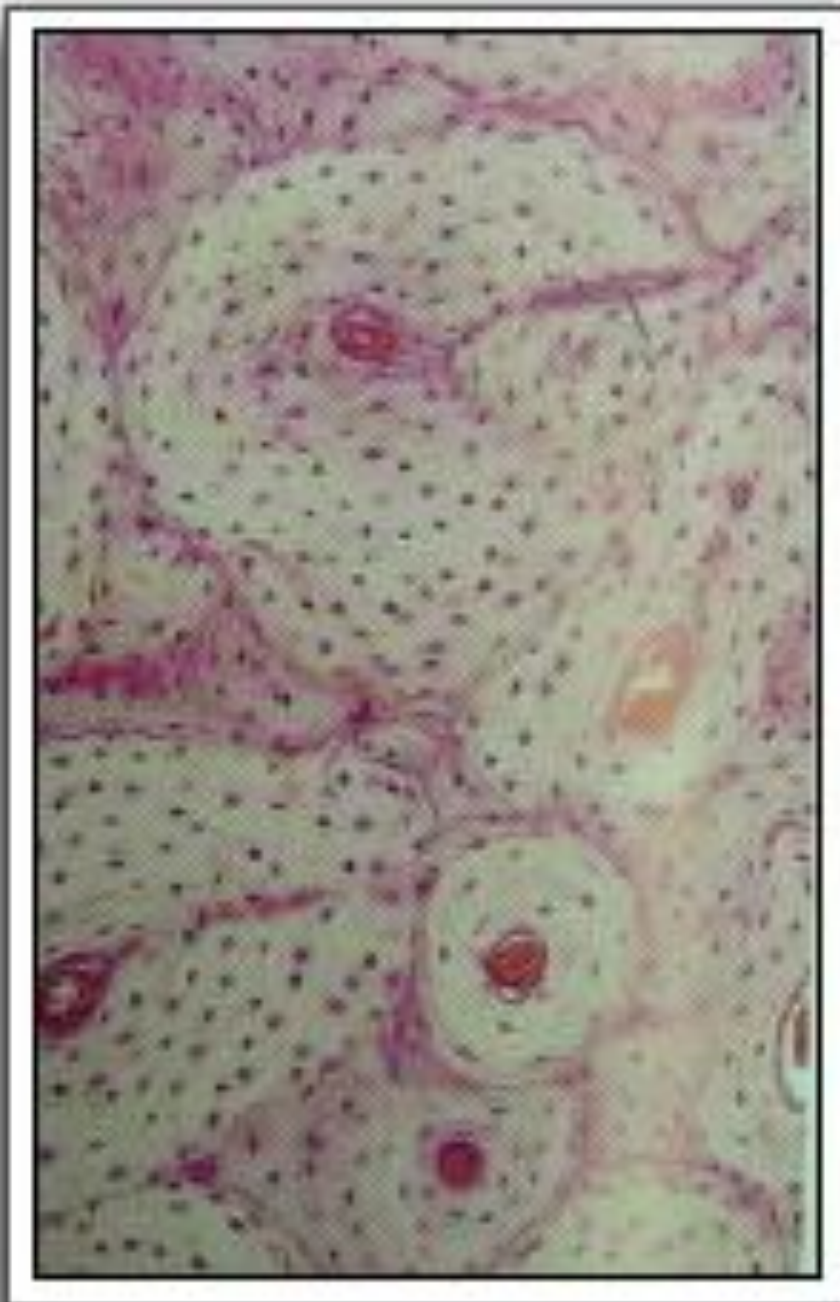


Fig. 1 Fotomicrografía de hueso compacto descalcificado (x162). Se muestran varios osteones con sus láminas concéntricas. También se identifica un conducto de Volkmann (V). *Tomado de Gartner y Hiatt 2002*



Fig. 2 Fotomicrografía de hueso descalcificado (x270). Obsérvese el sistema de Havers que contiene el canal haversiano (C) y láminas concéntricas con lagunas y sus canaliculos. (flechas). *Tomado de Gartner y Hiatt 2002*

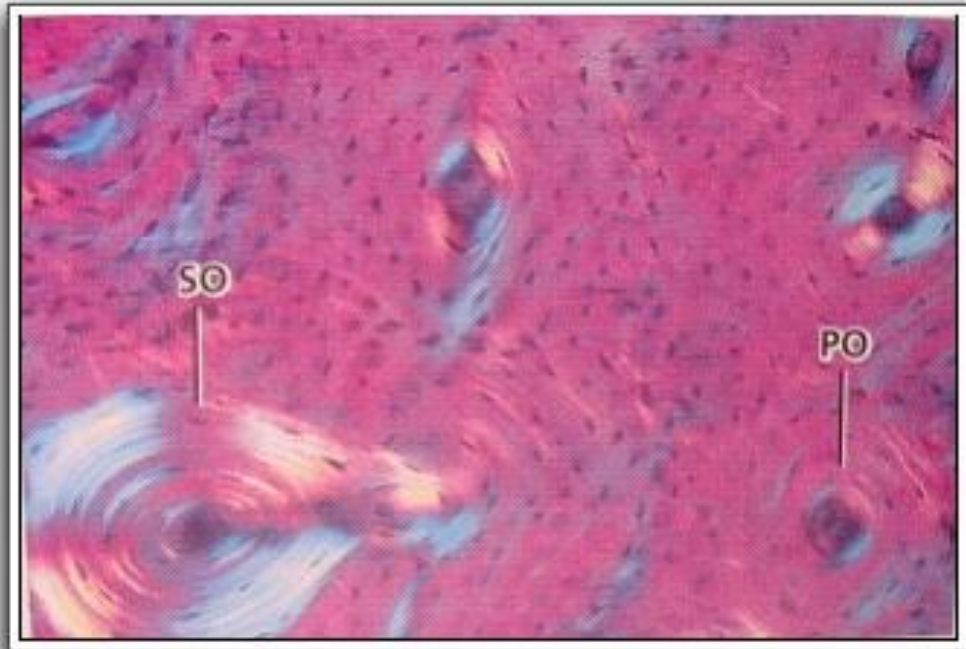


Fig. 3 Fotomicrografía que muestra osteones primarios (PO) y secundarios (SO), con luz polarizada. Tomado de Lindhe. 2009

## **HUESO ESPONJOSO (reticulado, trabecular)**

Este tipo de tejido óseo no contiene osteones, sino que las láminas intersticiales están de forma irregular formando unas placas llamadas trabéculas. Estas placas forman una estructura esponjosa dejando huecos llenos de la médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con éstos. El hueso esponjoso es constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de otros huesos. La orientación de cada trabécula y la disposición de sus laminillas óseas mineralizadas esta determinada por las tensiones mecánicas locales con el fin de resistir las compresiones y tensiones a las que es sometida una trabécula (aumento de peso de un individuo, crecimiento u otra).

## **FORMACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO (origen)**

El hueso se forma por sustitución de un tejido conectivo preexistente (el cartílago).

Existen dos tipos de osificación: intramembranosa (o directa) y **endocondral** (o indirecta).

**Osificación intramembranosa (o directa).** Tiene lugar directamente en el tejido conectivo. Por este proceso se forman los huesos planos de la bóveda del cráneo: hueso frontal, hueso occipital, hueso parietal, hueso temporal, el maxilar superior y casi toda la mandíbula excepto los cóndilos articulares. El mensénquima se condensa en conjuntivo vascularizado en el cuál las células

están unidas por largas prolongaciones y en los espacios intercelulares se depositan haces de colágeno orientados al azar que quedan incluidos en la matriz (gel poco denso). La primera señal de formación ósea es la aparición de bandas de matriz eosinófila más densas que se depositan equidistantemente de los vasos sanguíneos que forman la red. Las células se agrandan y se reúnen sobre las trabéculas, adquieren forma cuboidea o cilíndrica y permanecen unidas por prolongaciones cortas, se hacen más basófilas transformándose en osteoblastos que depositan matriz osteoide no calcificada.<sup>9,10,11</sup> Las trabéculas se hacen más gruesas, se secreta colágeno que forma fibras orientadas al azar formando hueso reticular . Se depositan sales de calcio sobre la matriz extracelular (calcificación). Debido al engrosamiento trabecular los osteoblastos quedan atrapados en lagunas y se convierten en osteocitos que se conectan con los osteoblastos de la superficie por medio de los canalículos. El número de osteoblastos se mantiene por la diferenciación de células primitivas del tejido conjuntivo laxo. En las áreas esponjosas que deben convertirse en hueso compacto las trabéculas siguen engrosándose hasta que desaparecen los espacios que rodean los vasos sanguíneos. Las fibras de colágeno se vuelven más ordenadas y llegan a parecerse al hueso laminar pero no lo son. Donde persiste el esponjoso termina el engrosamiento trabecular y el tejido vascular interpuesto se transforma en tejido hematopoyético. El tejido conjuntivo se transforma en el periostio. Los osteoblastos superficiales se transforman en células de aspecto fibroblástico que persisten como elementos osteoprogenitores en reposo ubicados en el endostio o el periostio pudiéndose transformar de vuelta en osteoblastos si son provocados por ese motivo.

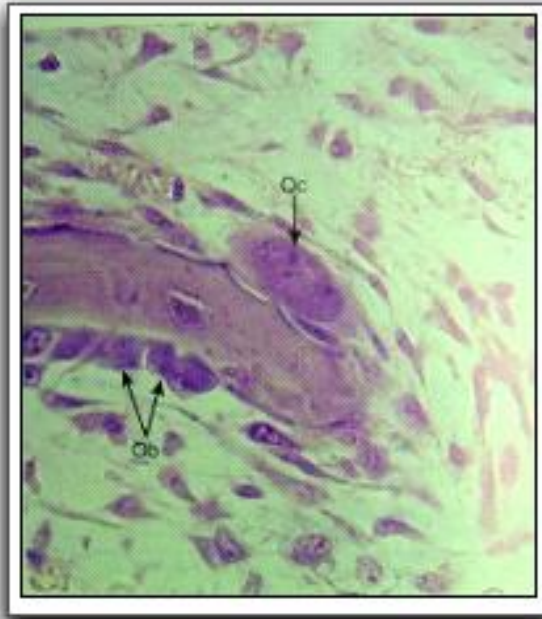


Fig. 4 Fotomicrografía de la osificación intramembranosa (x540). Los osteoblastos (Ob) recubren la espícula ósea en donde secretan osteoide hacia el hueso. Se observan osteoclastos (Oc) alojados en lagunas de Howship. Tomado de Gartner y Hiatt 2002

**Osificación endocondral (o indirecta).** La sustitución de cartílago por hueso se denomina osificación endocondral. Aunque la mayoría de los huesos del cuerpo se forman de esta manera, el proceso se puede apreciar mejor en los huesos más largos, lo que se lleva a cabo de la manera siguiente:

1. *Desarrollo del modelo cartilaginoso:* En el sitio donde se formará el hueso, las células mesenquimatosas se agrupan según la forma que tendrá el futuro hueso. Dichas células se diferencian en condroblastos, que producen una matriz cartilaginosa llamada cartílago hialino.

Además se desarrolla una membrana alrededor del modelo cartilaginoso (pericondrio).

2. *Crecimiento del modelo cartilaginoso*: Cuando los condroblastos quedan ubicados en las capas profundas de la matriz cartilaginosa, se les llama condrocitos. El modelo cartilaginoso crece en sentido longitudinal por división celular continua de los condrocitos, acompañada de secreción adicional de matriz cartilaginosa. Este proceso genera un aumento de longitud que se llama crecimiento intersticial (o sea, desde dentro). En contraste, el incremento en el grosor del cartílago se debe principalmente a la adición de matriz en la periferia del modelo por nuevos condroblastos, los cuales evolucionan a partir del pericondrio. A este tipo de desarrollo por depósito de matriz sobre la superficie cartilaginosa se le llama “desarrollo por aposición”. Al continuar el crecimiento del modelo cartilaginoso, se hipertrofian los condrocitos de su región central, probablemente en virtud de que acumulan glucógeno para la producción de ATP y de que sintetizan enzimas que catalizarán las reacciones químicas. Algunas de las células hipertróficas explotan y liberan su contenido, lo que modifica el pH de la matriz, este cambio activa la calcificación. Otros condrocitos del cartílago en calcificación mueren porque la matriz ya no difunde los nutrientes con rapidez suficiente. Al ocurrir esto, se forman lagunas que tarde o temprano se fusionan para formar cavidades pequeñas.<sup>12</sup>

3. *Desarrollo del centro de osificación primario:* Una arteria nutricia penetra en el pericondrio y en el modelo cartilaginoso en calcificación a través de un agujero nutricio en la región central del modelo cartilaginoso, lo cual estimula que las células osteógenas del pericondrio se diferencien en osteoblastos. Estas células secretan, bajo el pericondrio, una lámina delgada de huso compacto, llamada collar de matriz ósea. Cuando el pericondrio empieza a formar tejido óseo, se le conoce como periostio. Cerca del centro del modelo crecen capilares periósticos en el cartílago calcificado en desintegración. El conjunto de estos vasos y sus correspondientes osteoblastos, osteoclastos y células de la médula ósea roja recibe el nombre de brote perióstico o yema perióstica. Al crecer en el modelo cartilaginoso, los capilares inducen el crecimiento de un centro de osificación primario, región en que el tejido óseo sustituye la mayor parte del cartílago<sup>7,13,14</sup>. Luego los osteoblastos comienzan a depositar matriz ósea sobre los residuos del cartílago calcificado, con lo que se forman las trabéculas del hueso esponjoso. A medida que el centro de osificación se alarga hacia los extremos del hueso, los osteoclastos destruyen las trabéculas recién formadas. De este modo se forma la cavidad medular, en el centro del modelo, la cual se llena después con médula ósea roja. La osificación primaria comienza en la superficie exterior del hueso y avanza hacia el interior.<sup>5,8</sup>
4. *Desarrollo de los centros de osificación secundarios:* La diáfisis, que al principio era una masa sólida de cartílago hialino, es reemplazada por hueso compacto, cuyo centro contiene la cavidad llena de médula ósea roja. Cuando los vasos sanguíneos penetran la epífisis, se forman los



centros de osificación secundarios, por lo regular hacia el momento del nacimiento. La formación de hueso es similar a la que tiene lugar en los centros de osificación primarios; sin embargo, se diferencia en que el tejido esponjoso permanece en el interior de la epífisis (no se forma la cavidad medular). La osificación secundaria se inicia en el centro de la epífisis y prosigue hacia el exterior, en dirección a la superficie externa del hueso.<sup>15</sup>

5. *Formación del cartílago articular y de la placa epifisiaria:* El cartílago hialino que cubre las epífisis se convierte en cartílago articular. durante la niñez y la adolescencia se conserva cartílago hialino entre la diáfisis y las epífisis, el cual se conoce como placa epifisiaria y es la que permite el crecimiento longitudinal de los huesos largos.<sup>14,16</sup>

### **CÉLULAS ÓSEAS :**

En el tejido óseo maduro y en desarrollo, se pueden diferenciar cuatro tipos de células: osteoprogenitoras(células de revestimiento), osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los tres primeros tipos son estadios funcionales de un único tipo celular. El proceso reversible de cambio de una modalidad funcional a otra se conoce como *modulación celular*. Los osteoclastos tienen un origen hematopoyético compartido con el linaje mononuclear-fagocítico. El estadio mitótico de los tres primeros tipos celulares solo se observa en el estadio de célula osteoprogenitora.

- **Células 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.

- **Osteoblastos.** Los osteoblastos son células diferenciadas que sintetizan el colágeno y la sustancia fundamental ósea.

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  $Ca^{++}$  y  $PO_4$  y son ricas además en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas que capaces de generar iones  $PO_4$ , 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>12,17,18</sup>

- **Osteocitos.** Se encuentran en el hueso completamente formado ya que residen en lagunas en el interior de la matriz ósea mineralizada. Su forma se adapta al de la laguna y emiten prolongaciones digitiformes largas que se extienden por los canaliculos de la matriz ósea y esto los pone en contacto con otros osteocitos. En esas zonas de contacto las membranas forman un nexo que permite el intercambio de iones, moléculas pequeñas y hormonas. Son similares a los osteoblastos, pero menos activos y por lo tanto su reticulo endoplasmático y aparato de Golgi esta menos desarrollado. Su función es seguir sintetizando los componentes necesarios para el mantenimiento de la matriz que los rodea. Están ampliamente relacionados con la mecanotransducción, proceso en el que reaccionan a la tensión ejercida liberando cAMP (monofosfato de adenosina cíclico), osteocalcina y somatomedinas lo que induce a la adición de osteoblastos para la remodelación del hueso. Se discute si se pueden transformar en osteoblastos activos.



Fig. 5 Fotomicrografía de hueso compacto descalcificado (x540). Pueden observarse osteocitos en lagunas. Véase asimismo la osteona y las líneas de cementación. *Tomado de Gartner y Hiatt 2002*

- **Osteoclastos.** Tienen como función la resorción ósea. Por su origen hematopoyético, son entendidos como "macrófagos del hueso". Hasta hace poco, se creía que surgían de la fusión de varios monocitos, pero, de acuerdo a las nuevas investigaciones se ha descubierto que tienen su origen en el sistema de fagocitos mononucleares y surgen de la diferenciación (mediada por citocinas provenientes del osteoblasto) de macrófagos. Ubicados en las lagunas de Howship pueden llegar a ser células gigantes (hasta 150 micrometros de diámetro), con varios núcleos.

Se encuentran polarizados con los núcleos cerca de su superficie lisa mientras que la superficie adyacente al hueso presenta prolongaciones muy apretadas como una hoja delimitadas por profundos pliegues (se le llama *borde en cepillo* o *borde plegado*). Abundantes mitocondrias en el borde plegado, también en esta región hay lisosomas y vacuolas. Alrededor del borde plegado la membrana se une al hueso por filamentos de actina (zona de sellado donde el osteoclasto lleva a cabo su función de reabsorción). En este sitio de sellado el osteoclasto bombea protones que baja el pH (acidifica el medio), para disolver el material óseo. El interior ácido del compartimiento favorece la liberación de hidrolasas ácidas lisosomales y proteasas, como gelatinasa y colagenasa (por el aparato de Golgi, retículo endoplasmático y vesículas del borde), que eliminan las sales de calcio y degradan el colágeno y componentes orgánicos de la matriz ósea.<sup>3,5,6</sup>

### **METABOLISMO ÓSEO:**

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 enllamado 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.

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.

La PTH (Paratohormona) se secreta por las glándulas paratiroideas y es importante para el mantenimiento de la calcemia. Esta hormona aumenta la reabsorción ósea, aumenta la reabsorción tubular renal de calcio, y también aumenta la reabsorción 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.<sup>19,20</sup>

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 calcemia. Sus efectos predominantes son el descenso de la reabsorción ósea y de la reabsorción tubular 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 de crecimiento, aunque, a diferencia de las hormonas calcitropas, 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 citoquinas.<sup>1,2</sup>

### **Sistemas de señales entre células óseas:**

Las células del estroma osteoblástico están inicialmente implicadas en la función y diferenciación osteoblástica a través del contacto célula-célula.

Algunos estudios demostraron la presencia de un factor en la membrana de las células osteoblásticas, miembro de 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 la 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 reabsorción ósea.

Los efectos del RANKL están mediados por su unión a un receptor altamente específico: el RANK ,al cual activan. Es una proteína transmembranos 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.

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 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 diferencia en el nivel de estrógenos) lo cual determina una disminución de la masa ósea, pudiendo llevar a la osteopenia y osteoporosis.

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 del 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.



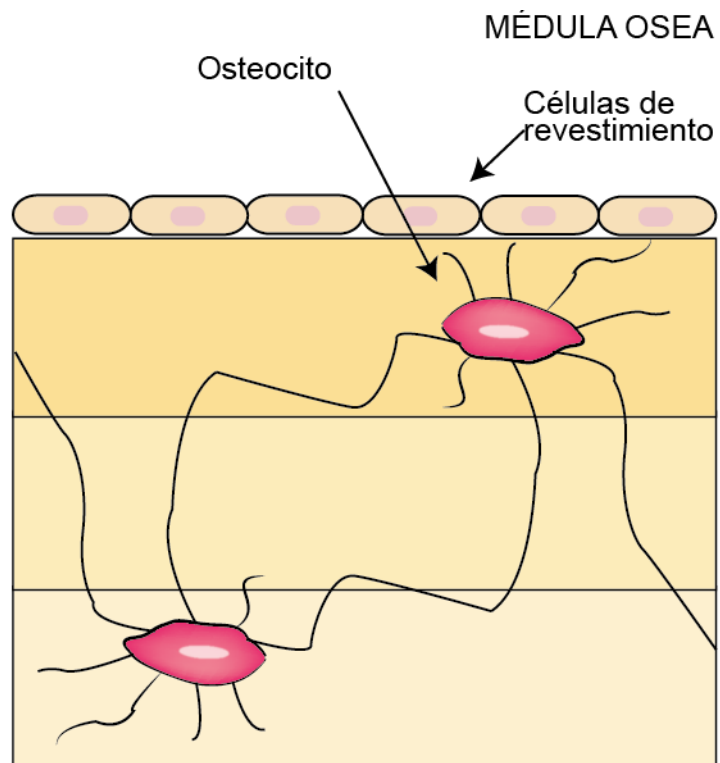


Fig. 6

El gráfico muestra una trabécula ósea, cubierta por Células de Revestimiento.

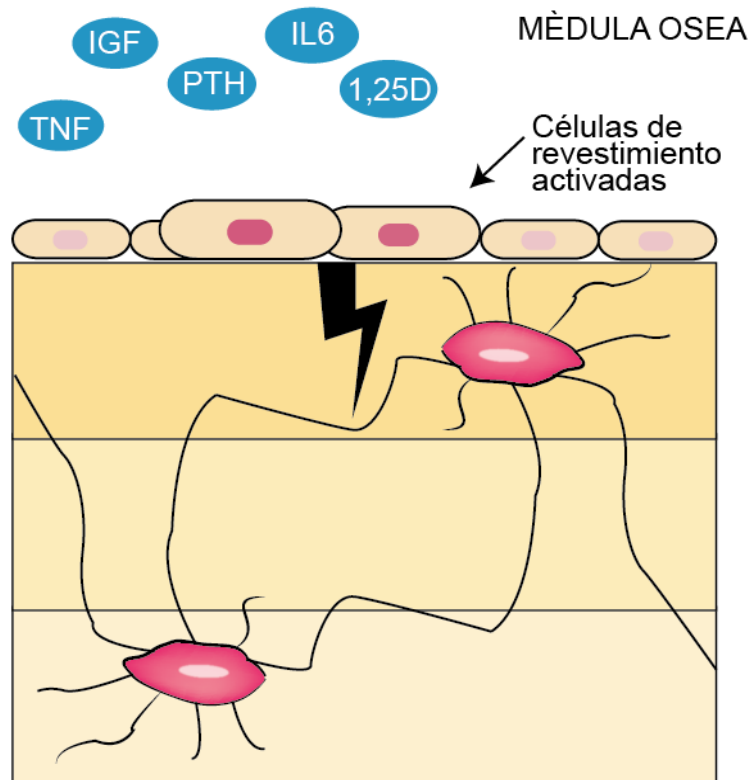


Fig.7

**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.

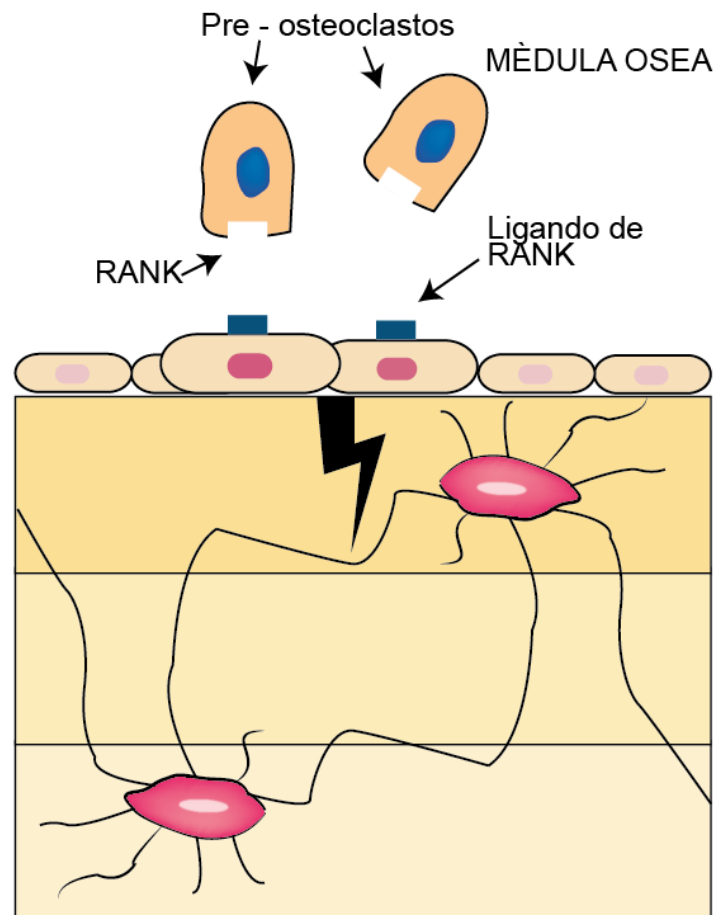


Fig.8

**ACTIVACIÓN.** La Célula de Revestimiento segrega el ligando para RANK, el cuál es una proteína que activa el receptor RANK de los Pre-Osteoclastos.

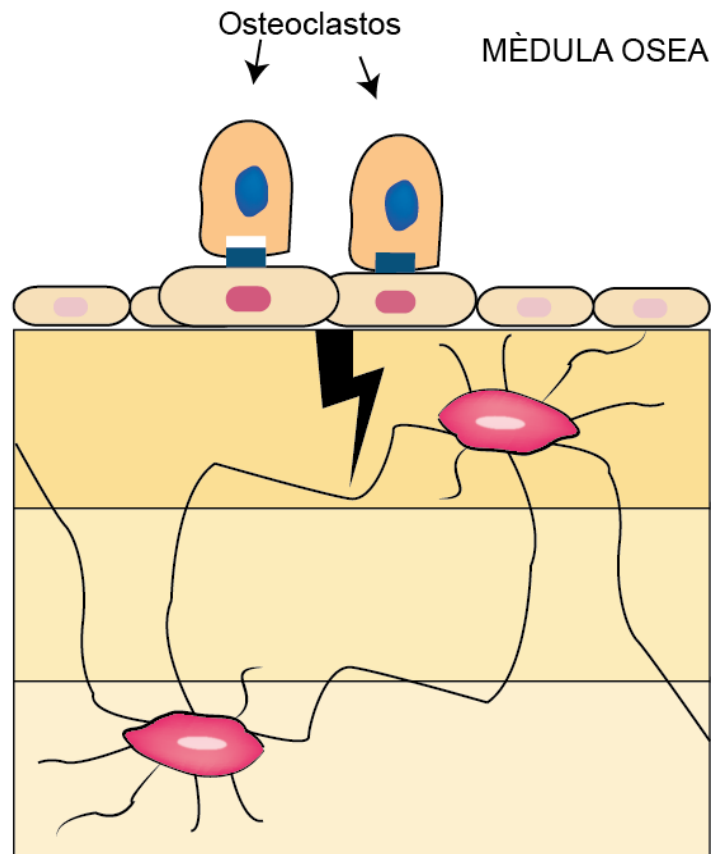


Fig. 9

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

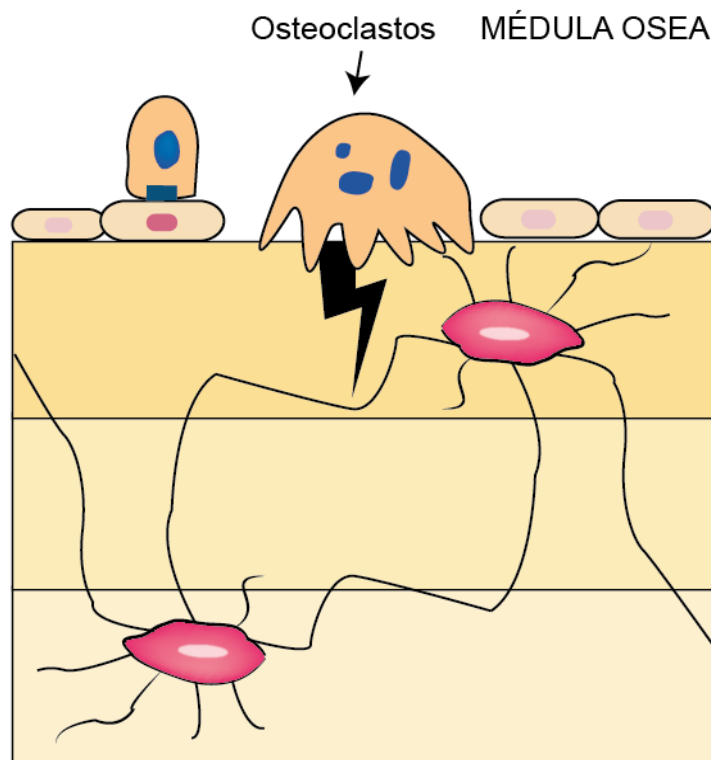


Fig. 10

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

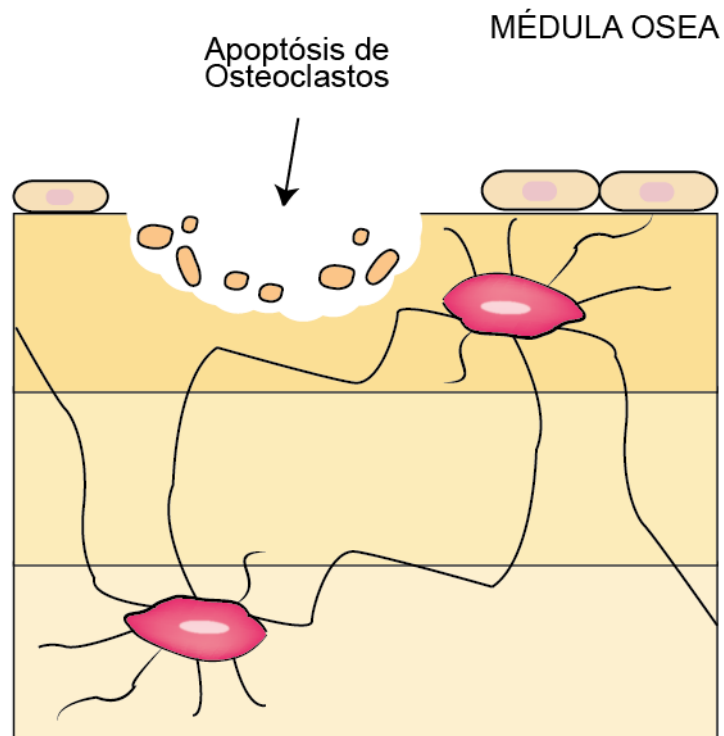


Fig.11

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

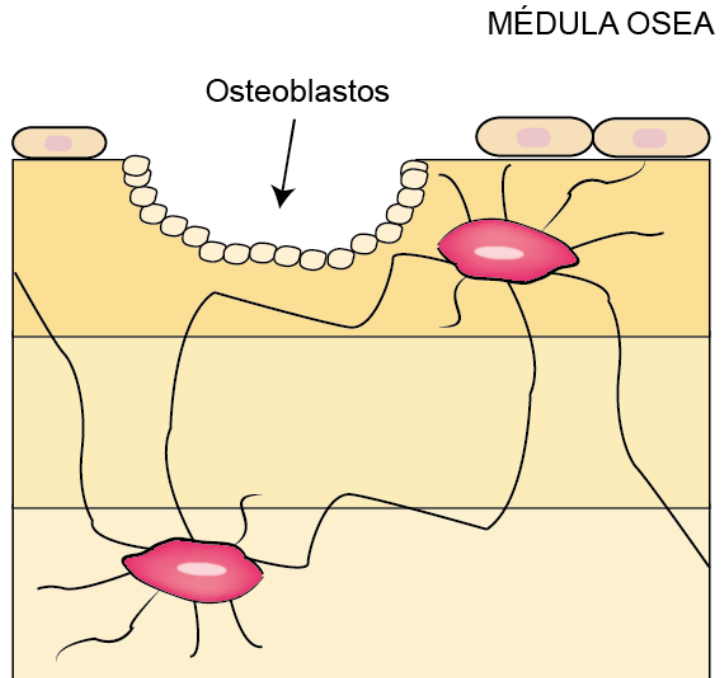


Fig.12

**NEOFORMACIÓN.** 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)

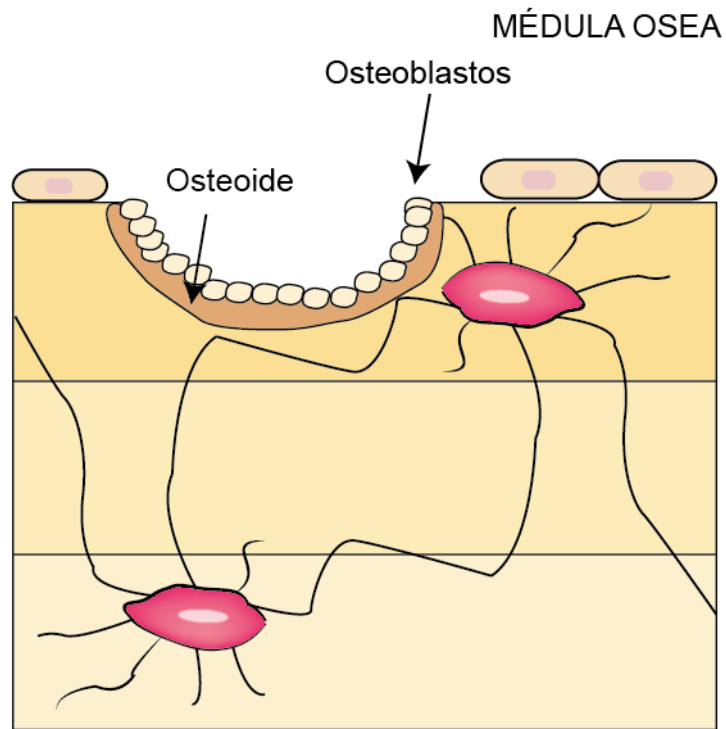


Fig.13

**NEOFORMACIÓN.** Los Osteoblastos segregan la matriz ósea denominada **Osteoide.**



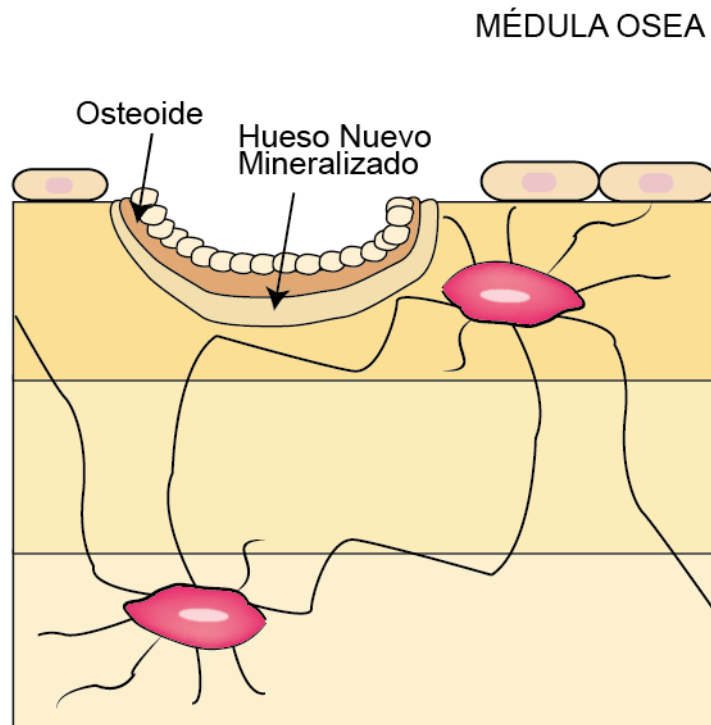


Fig.14

**NEOFORMACIÓN.** Después de alrededor de 11 días el Osteoide comienza a mineralizarse. Mientras tanto, los Osteoblastos continúan formando nuevo Osteoide.

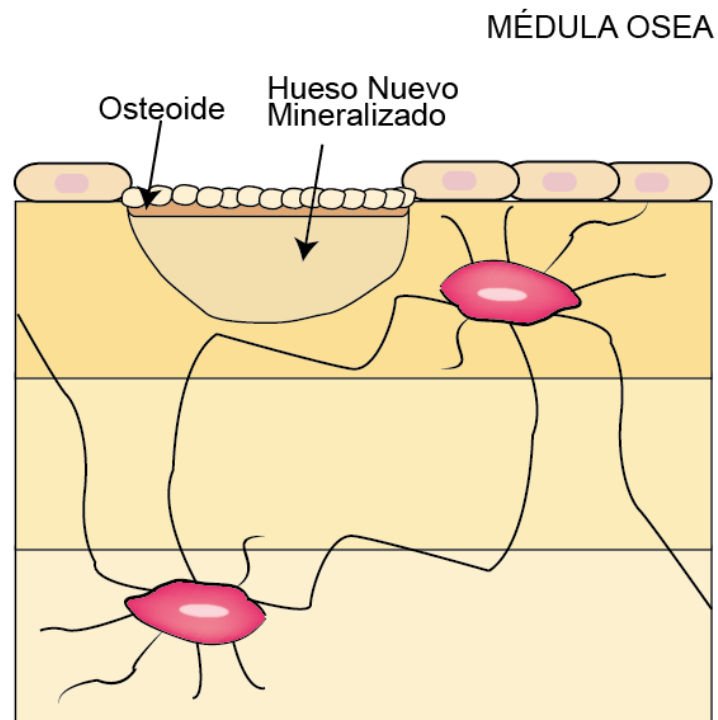


Fig. 15

**NEOFORMACIÓN.** El proceso continua hasta que la cavidad es llenada por nuevo hueso, normalmente entre 2 y 3 meses después.

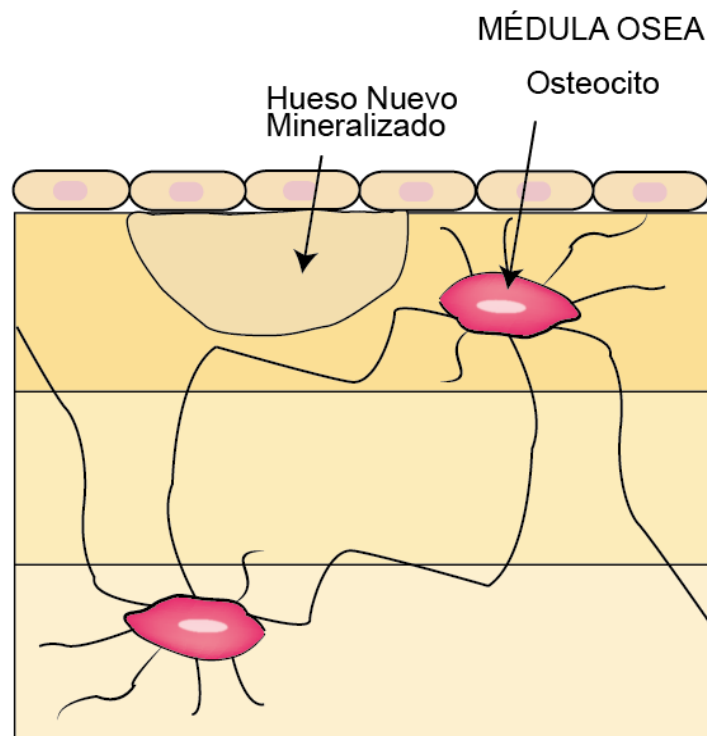


Fig. 16

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

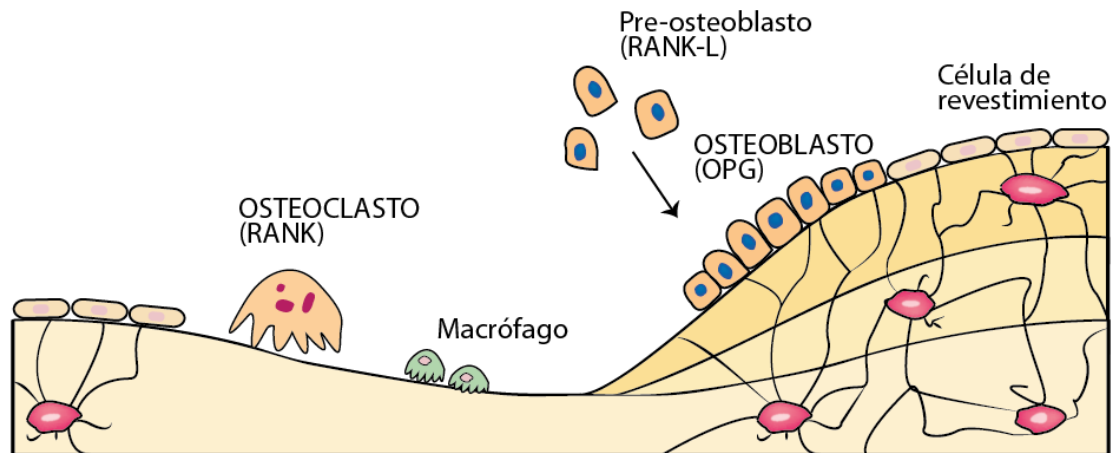


Fig. 17

### Esquema de remodelación ósea general.

#### REGENERACIÓN ÓSEA:

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 término reparación cuando dicho tejido de reemplazo es diferente y no recupera las propiedades mecánicas ni la fisiología del original.

#### 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.

Inicialmente se produce un agregado plaquetario que forma el coagulo de fibrina, el cual engloba al material de injerto utilizado. A partir del cuarto día comienzan a formarse capilares y arteriolas desde el lecho receptor, que invaden todo el material de injerto presente en toda la cavidad. Alrededor de los

10 a 14 días se forma el entremado 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 dura entre 4 y 8 semanas. Se forma inicialmente un hueso desorganizado, que posteriormente por remodelado se transforma en hueso maduro, bien organizado, con características similares al original.

### **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 sí fundamentalmente en el 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 se puede considerar 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.

### **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, trigono retromolar, tuberosidad del maxilar y en menor medida de la calota craneana o cresta ilíaca, dependiendo de la cantidad necesaria. 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 simultáneamente aspirarlo con cánula especial provista de un filtro recolector de partículas en su interior. 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.<sup>17,21</sup>

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

## **HUESO HOMOLÓLOGO:**

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 que tengan antecedentes de infecciones neoplasias malignas, enfermedades óseas degenerativas , hepatitis B o C , enfermedades de transmisión sexual , HIV 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 osteoinducción y la osteoconducción ; mientras que no se da en el proceso de la osteogénesis debido a que el injerto no posee células vivas, por lo tanto la neoformación ósea es lenta y se pierde volumen apreciable si se compara con el injerto autógeno.

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.<sup>1,12,22</sup>

### **HUESO HETERÓLOGO:**

Son denominados Xenoinjertos. Se obtienen de otras especies , siendo el más utilizado el 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 una buena histocompatibilidad dado que la única proteína remanente el colágeno tipo I, buenas propiedades mecánicas , semejantes a las del hueso y buena capacidad osteoconductor por su similitud a la matriz inorgánica del hueso humano.<sup>2,23</sup>

### **MATERIALES SINTÉTICOS DE ORIGEN QUÍMICO:**

Este grupo está constituido por un grupo 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.

En el presente trabajo fueron utilizados dos tipo de materiales pertenecientes a este grupo, estos son la Hidroxiapatita sintética y el Fosfato tetracálcico fraguable, ambos son biocompatibles , osteoconductores y pueden ser utilizados en combinación con injertos óseos o sin ellos.<sup>19,24,25</sup>

Se caracterizan por ser reabsorbibles, variando su velocidad de reabsorción en función de la densidad. Por lo demás actúan de manera similar que los anteriores, generando una matriz que conduce la regeneración del hueso.

Se presentan en forma de gránulos, en el caso de la hidropoxiapatita y en forma de polvo-líquido, el fosfato tetracálcico fraguable.<sup>21,26,27</sup>



## **OBJETIVOS:**

- Identificar factores que favorezcan la neoformación ósea.
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del fosfato tetracálcico como material de injerto.
- Estudiar, analizar y evaluar la acción de la hidroxiapatita sintética como material de injerto.
- Estudiar, analizar y evaluar la acción de la combinación de ambos y su posible aptitud como material de injerto.
- Diseñar una estrategia terapéutica frente a los defectos estructurales del hueso.

## **HIPÓTESIS:**

La reparación de defectos óseos difiere en cuanto a calidad y cantidad de regeneración según se utilice como injerto fosfato tetracálcico fraguable solo, o combinado con hidroxiapatita sintética.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**TIPO DE ESTUDIO:** Experimental cuantitativo.

### **VARIABLES:**

#### **Variables Independientes:**

- Fosfato Tetracálcico Fraguable
- Combinación Hidroxiapatita sintética y Fosfato tetracálcico

#### **Variables Dependientes:**

- Cantidad de Neoformación Ósea.
- Calidad de Neoformación Ósea

### **UNIVERSO Y MUESTRA:**

Se utilizaron 30 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 fueron escogidas por muestreo aleatorio simple, y fueron luego divididas en grupos de acuerdo a las variables independientes más un grupo control.

### **MÉTODOS 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 midieron según sus indicadores, y luego se tabularon, de acuerdo al efecto producido sobre las variables dependientes de la siguiente manera:

CANTIDAD DE HUESO NEOFORMADO: Se midió 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 realizó un estudio cualitativo en función del recuento de los diferentes tipos celulares presentes, así como de la disposición de la microarquitectura del tejido óseo, utilizando los mismos instrumentos que en el punto anterior.

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

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

Se analizaron 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 de experimentación obedece en mayor medida al hecho de que las mismas poseen un metabolismo más acelerado que otros animales, lo cual permite acotar 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).

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 75mg/kg más 10mg/Kg vía IM. Se eligió como primera opción debido a la facilidad de uso, y a la no necesidad de instrumentos y/o equipamientos accesorios, como puede ser 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 de duración, 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 descritos, e incluyen miositis (IM) e infecciones (IP). Sin embargo, ninguno de estos problemas ocurrió en nuestra experiencia.

### **3) Acto operatorio:**

a) *Depilación de la zona a trabajar:* esta puede realizarse con máquina de afeitar o con una hoja convencional del tipo gillete. Sin embargo si bien se logra despejar el campo de esta manera, no es del todo prolijo ya que 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 en forma manual. En efecto, tirando de los pelos suavemente estos salen sin oponer resistencia , probablemente por el estado de relajación durante la anestesia. El resultado es una depilación completa, prolija y rápida. Aquí el factor rapidez es muy 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 la necesidad de 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 casos se lesionó la arteria femoral, 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 prolija.

Una vez identificado el hueso, lo que mejor resultado nos ha dado para lograr la separación del mismo tejido muscular, fue la colocación de dos separadores de 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 refrigeración 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 milímetros 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 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 gran variedad de terapéuticas tendientes a lograr la regeneración del hueso. En nuestro caso utilizamos injertos de origen sintético.

Una vez tratados los defectos, se realiza una sutura por planos, primero el muscular y segundo el epitelial.

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 ésta la hace más dificultosa para el lavado postoperatorio de la misma. Estos problemas son mínimos, y en los casos en los que fueron 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 tres horas y media a cuatro, aunque esto está dentro de los valores normales para la Ketamina/ Xilacina.

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 constante de 28 grados centígrados, y puede agregarse una fuente 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 suelo, para que circule aire templado por debajo, otorgando una temperatura uniforme.

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

#### *b) Medicación postoperatoria y alimentación:*

Se les administró ácido acetilsalicílico diluido 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.

La alimentación de los mismos fue mediante alimento balanceado comercial.

Además, a partir de algunas complicaciones que surgieron con la hidratación, y que se describen en el apartado correspondiente, se agregó a la dieta del postoperatorio inmediato una gelatina a base de agar nutritivo, el cual mostró mejores resultados que al utilizar solamente alimento balanceado comercial solamente.

*c) Complicaciones postoperatorias:*

Una de las complicaciones que se observó en algunos animales fue la deshidratación, esta fue revertida mediante la administración de suero salino por vía sub-cutánea.

Esto motivó la introducción, en casos posteriores, del agar nutritivo al que hacíamos referencia mas arriba, no volviéndose a presentar signos de deshidratación con su utilización.

Otra complicación, aunque leve, fue la aparición de sequedad en 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) Evaluación de los resultados:**

Las muestras fueron capturadas mediante una cámara de video (Sony DXC-151) montada sobre microscopio óptico (Olympus SD 40) y conectada a una computadora. Luego las imágenes fueron digitalizadas mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA) y procesadas con un analizador digital de imágenes (Image Pro Plus v4.1.-Media Cybernetics, USA) La resolución de las imágenes fue de 640 x 480 píxels, con un rendimiento (yield) de 9  $\mu\text{m}$ /píxel.

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 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 Hematoxilina eosina.

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.

## **METODOLOGÍA**

Se utilizaron 30 ratas macho, de la cepa Fisher 344 (F344/N), originarias del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU., y producidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.P., endocriadas, libres de patógenos específicos (SPF), de 16 semanas de edad y 500 gramos de peso.

Los animales fueron divididos en tres grupos de 10 cada uno, manteniéndose durante 48 horas en condiciones ambientales convencionales: 23 +/- 1 grados centígrados, humedad 50/55 %, iluminación 12 horas luz / 12 horas 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 intramuscular. Se utilizó un motor de cirugía eléctrico con irrigación de solución fisiológica incorporada (Dyna Surg), contra-ángulo reductor 1:16 a 1700 rpm, fresas e instrumental quirúrgico para el acceso al hueso.

Se depiló la piel en la zona del fémur (Fig. 20), luego se realizó una incisión en piel con bisturí (Figs. 21 y 22) y se continuó en el plano muscular con tijeras por divulsión, hasta identificar el hueso. (Fig.23)

Una vez limpio y retirado el periostio, se realizó una perforación de 3mm de ancho por 9mm de largo y 3 mm de profundidad. (Fig. 24)

Al grupo 1 se le injertó fosfato tetracálcico fraguable, al grupo 2 la combinación de hidroxiapatita sintética y fosfato tetracálcico fraguable y el grupo 3 no recibió tratamiento, quedando como control. (Fig. 25)

Una vez finalizado, se realizó una sutura por planos. (Figs.26 y 27)

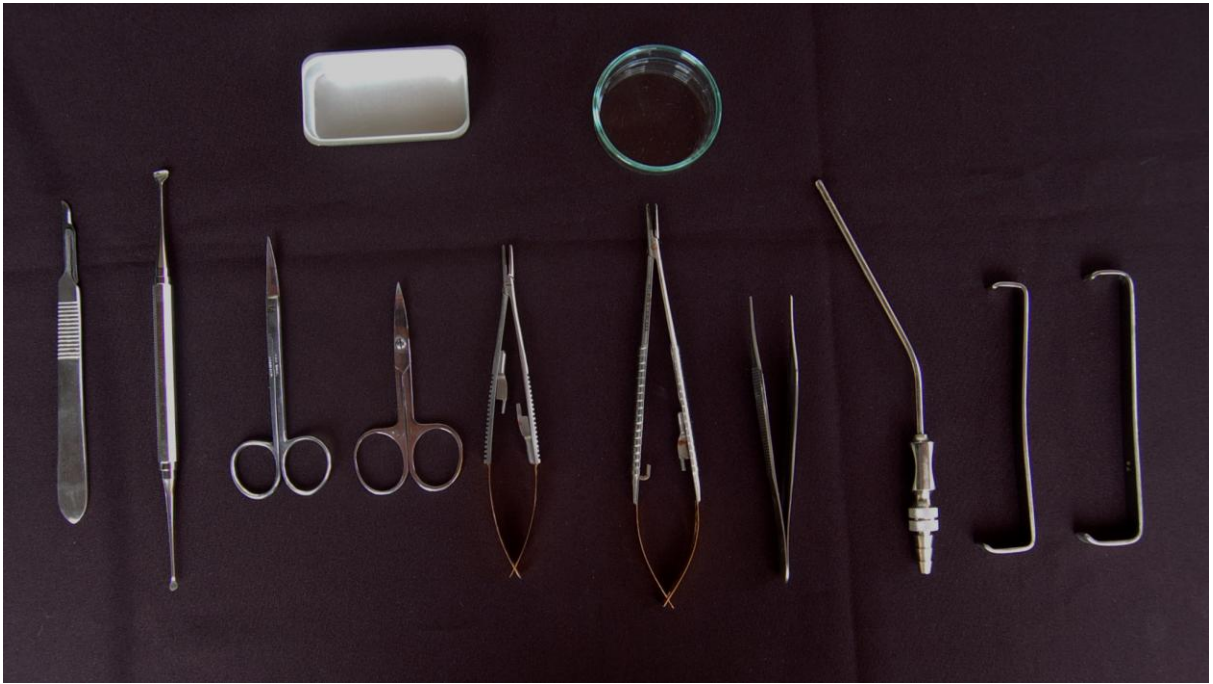


Fig. 18

Instrumental quirúrgico utilizado.



Fig. 19

Fisio-dispenser utilizado en las cirugías.

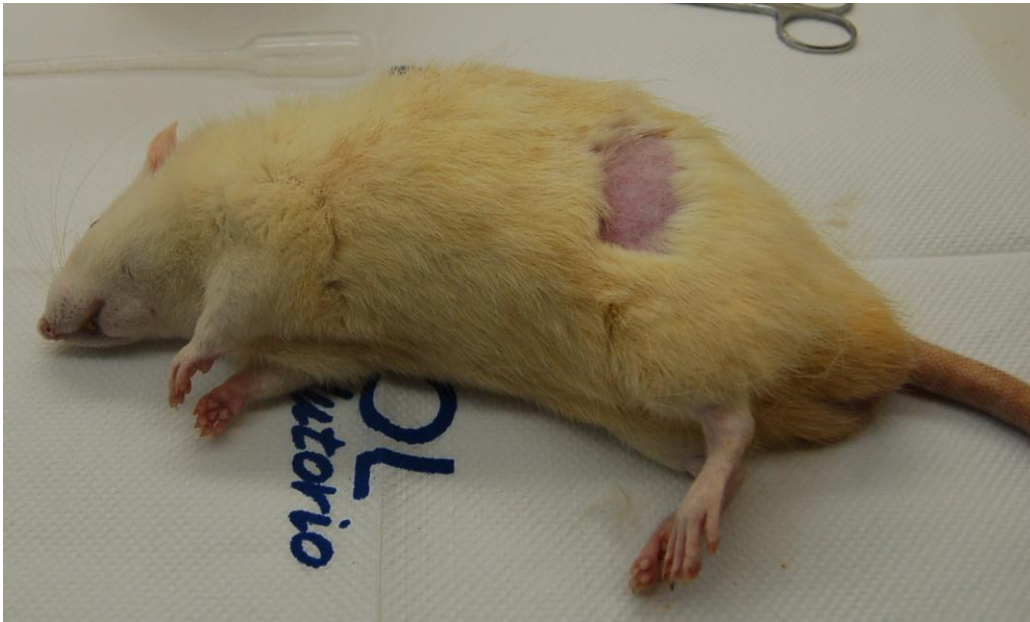


Fig. 20



Fig.21



Fig.22



Fig.23



Fig.24



Fig.25





Fig.26



Fig.27

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

A los 30 días los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono, y sus fémures resecados mediante discos 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 con micrótopo, montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina eosina.

Los preparados fueron capturados mediante de video (Sony DXC-151A ) montadas sobre un microscopio óptico (Olympus SZ 40 ) y posteriormente digitalizadas mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA ) De cada preparado se obtuvieron aproximadamente 20 imágenes a 40 X, las cuales fueron montadas luego para constituir una imagen única, que fue evaluada con un analizador digital de imágenes ( Image Pro Plus v4.1.-Media Cybernetics, USA) ( Fig. 28, 29 y 30 )

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. 28, 29 y 30 )

La superficie se expresa en mm<sup>2</sup>, mientras que la arquitectura se considero: 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 Microscopia de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Vetrinarias 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.

## 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, ambos resultaron de fácil manipulación.

La Hidroxiapatita (HA) sintética, al ser particulada, no difiere en cuanto a su manejo, a otros injertos de estas características disponibles en el mercado.

El Fosfato Tetracalcico, fraguable, presenta una gran facilidad de manipulación. Una vez realizada la mezcla, la consistencia es de tipo cremosa, muy similar a la de un yeso de uso odontológico. El fraguado es rápido, y ocurre en promedio en unos 3 minutos, lo cual hace que una vez colocado dentro del defecto mantenga la forma que se le otorga.

Pasados los 30 días de estudio, y una vez tomadas las muestras, en la vista macroscópica se observa una regeneración casi, o totalmente completa de los defectos en ambos grupos.

Es de destacar que en el grupo de Fosfato Tetracalcico solo, prácticamente no es distinguible donde estaba el defecto. De esta manera, macroscópicamente se observó mejor que la combinación con hidroxiapatita.

Posteriormente, se realizaron los preparados histológicos, para evaluar la calidad y la cantidad de hueso regenerado.

La calidad ósea, en cuanto a su patrón arquitectónico, fue similar en el Fosato Tetracalcico solo (Grupo 1) y como en el Fosfato Tetracalcico combinado con HA (Grupo 2). En ambos casos se observa hueso maduro, bastante bien organizado, con trabéculas de espesor variable, aunque la interconexión entre

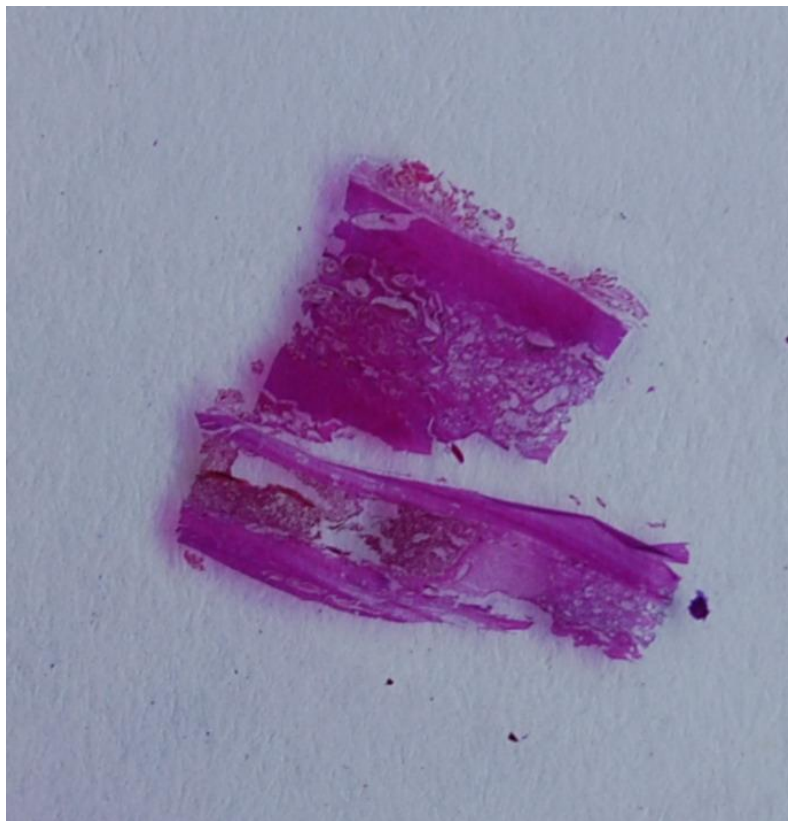
las mismas es irregular y variable, lo que implicaría que todavía era necesario más tiempo para la maduración final del injerto. El control sin tratamiento, (Grupo 3), no mostró regeneración ósea, y en su lugar se observa una gran invaginación de tejido conjuntivo fibroso.

La mayor cantidad de regeneración, en superficie regenerada expresada en  $\text{mm}^2$ , fue obtenida con el Fosfato Tetracalcico solo (Grupo 1) 8,630 (+/-0,790), seguida Fosfato Tetracalcico combinado con hidroxiapatita (grupo 2). 8,504 (+/-0,745), y por último el defecto control 4,350 (+/-0,550).

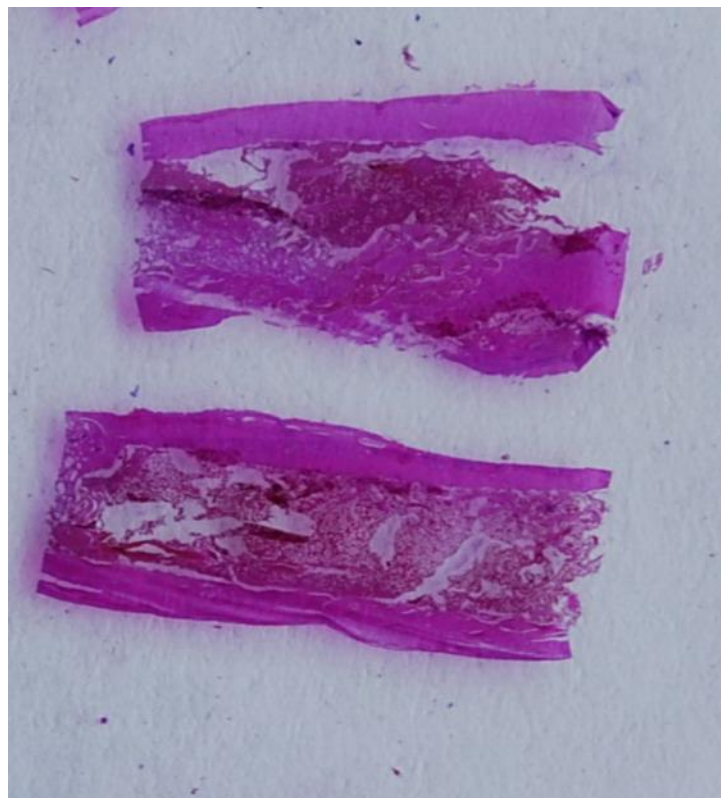
Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  Anova on Ranks) donde ambos grupos de estudio presentaron diferencias con respecto al control ( $p < 0,05$  Dunnett's).

En cuanto a todas las comparaciones apareadas, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los dos grupos de estudio con respecto al control, pero no entre el grupo 1 y el grupo 2 ( $p < 0,05$  Student-Newmann-Keuls) (Figs.51, 52 y Tabla 7)

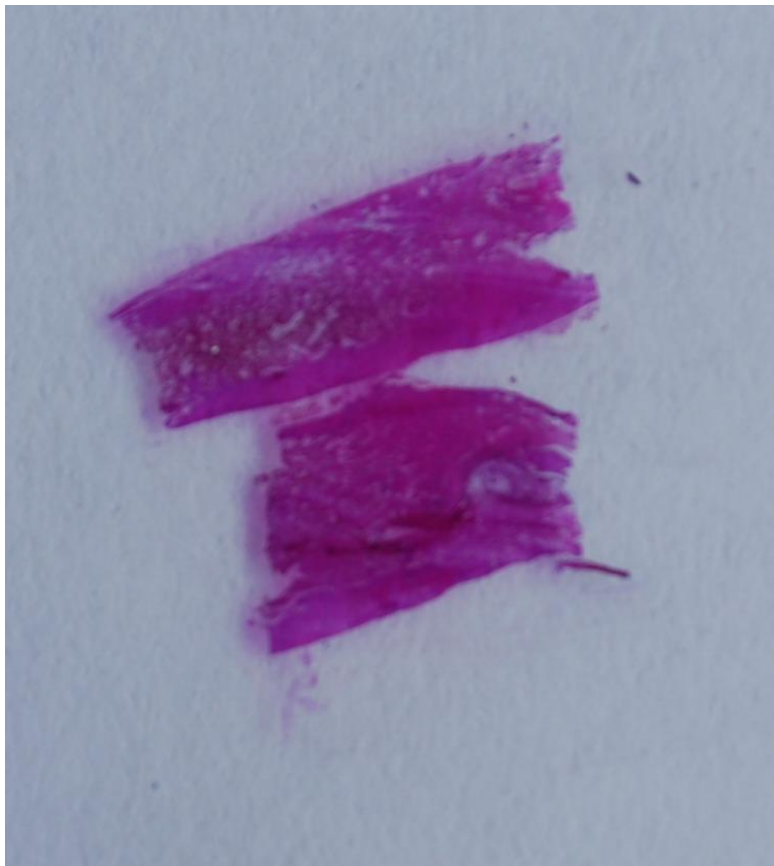
De esta manera, ambos grupos de estudio fueron superiores al no tratamiento, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.



**Fémur 1**

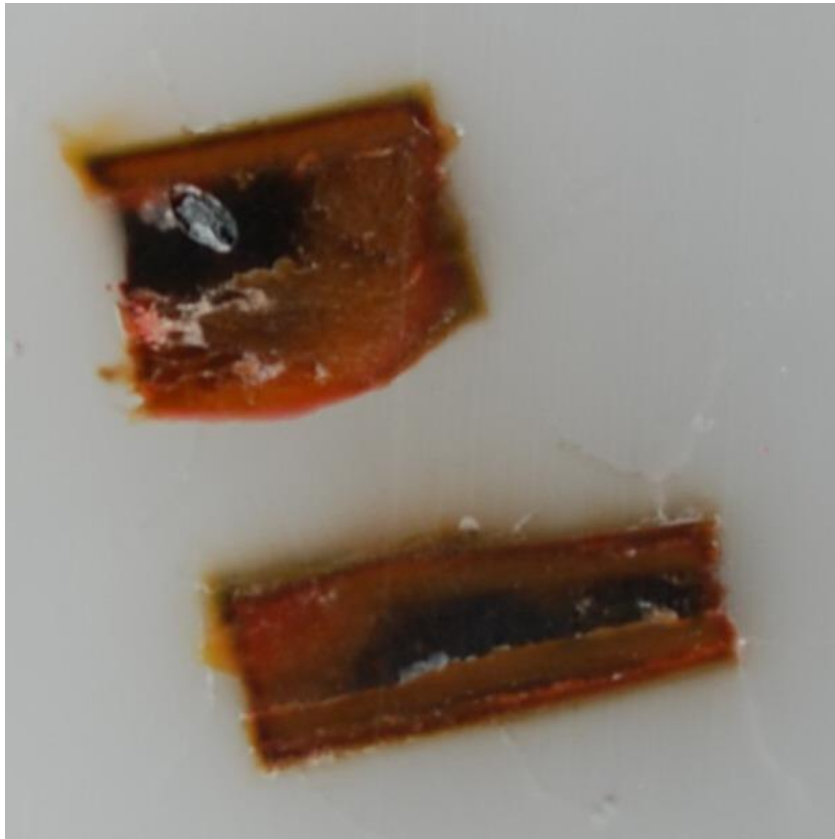


**Fémur 1 B**



**fémur 1C**

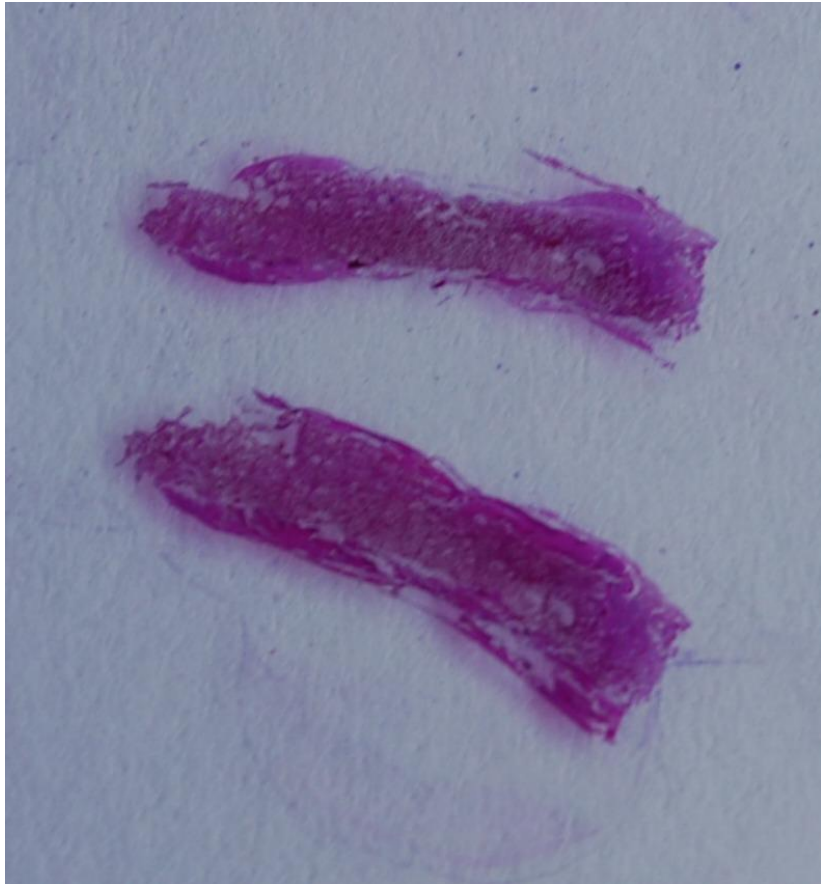
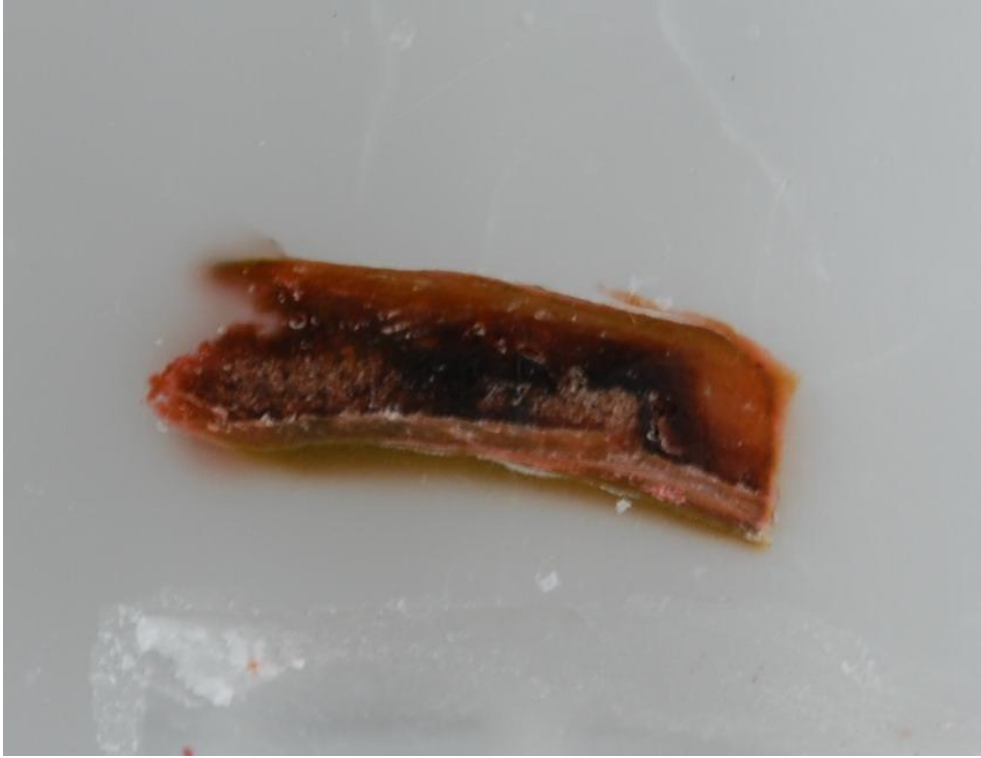




**Fémur 1D**



**Fémur 2**



**Fémur 2A**



**Fémur 2B**



**Fémur 2C**

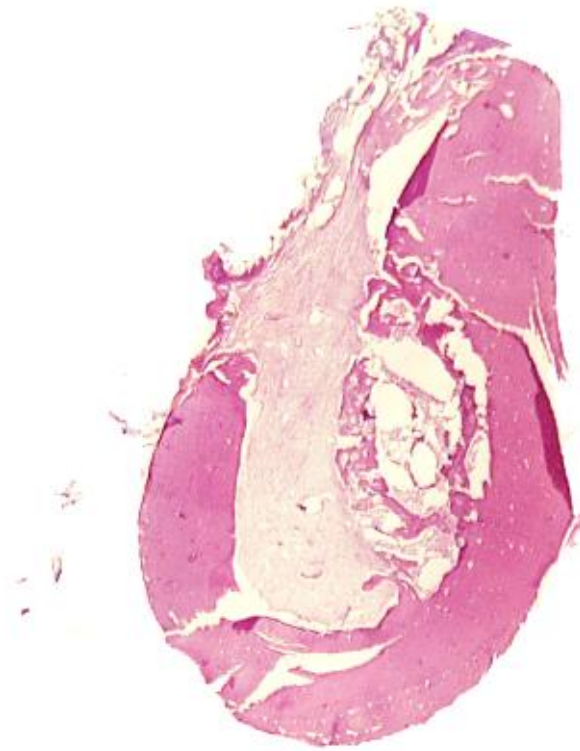
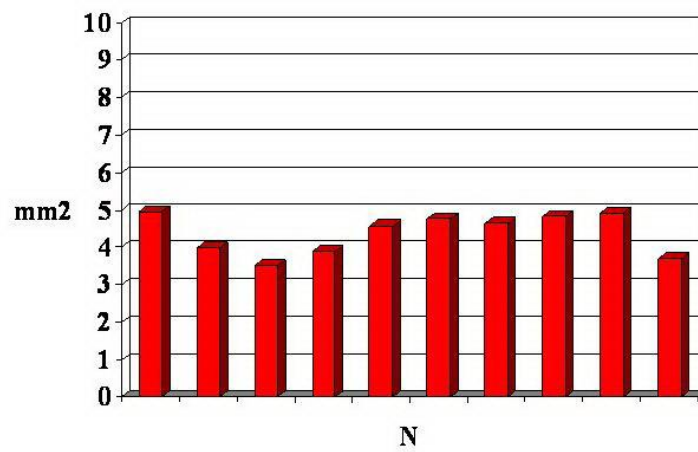


Fig. 28

### Defecto Control



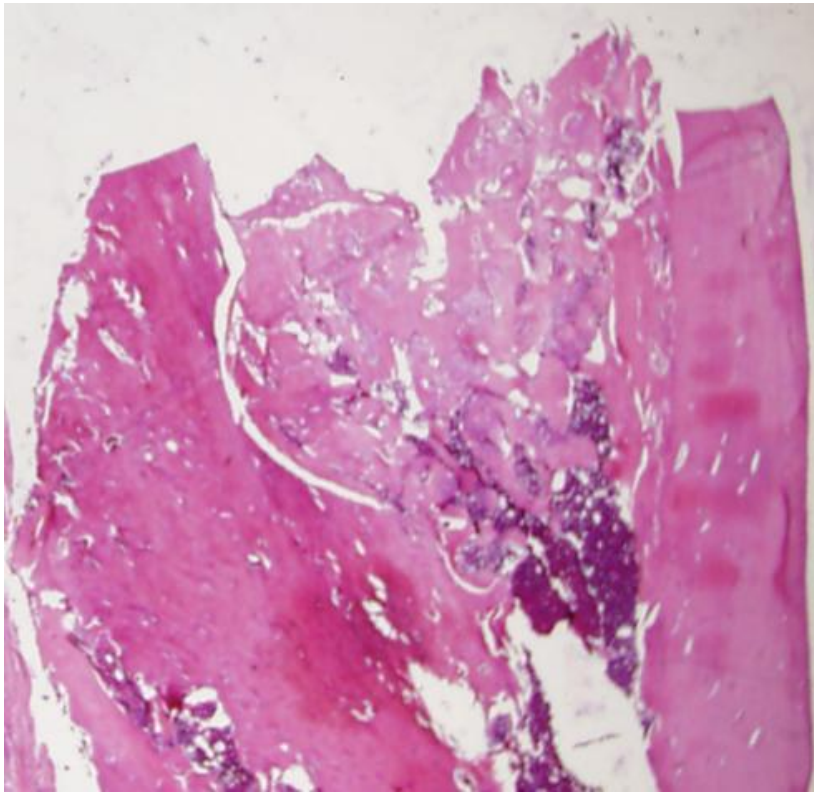
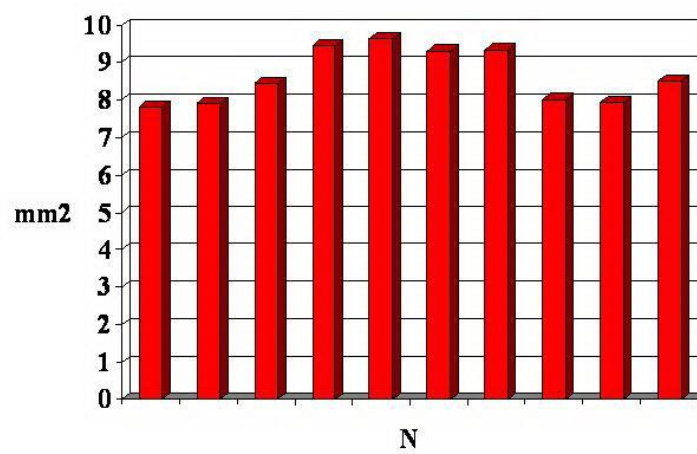


Fig. 29

### Fosfato Tetracalcico



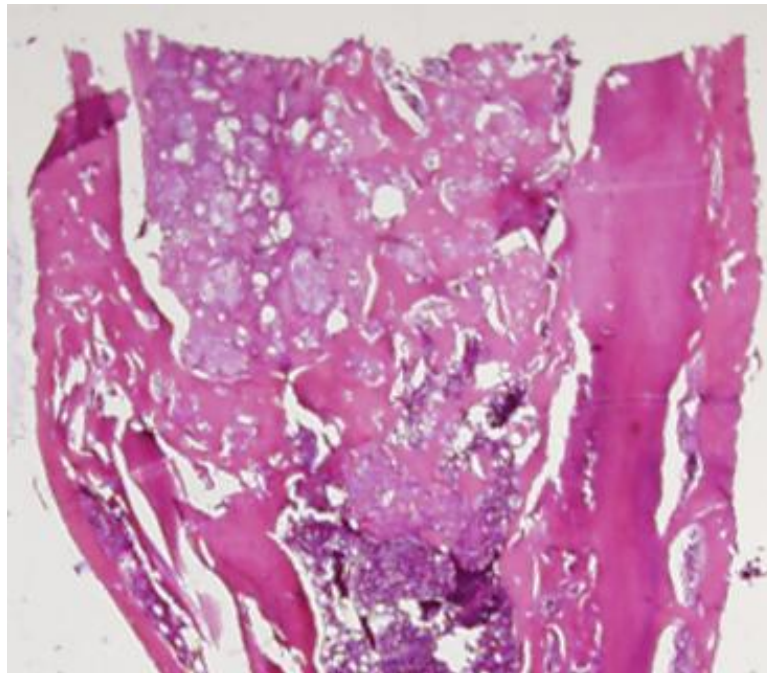
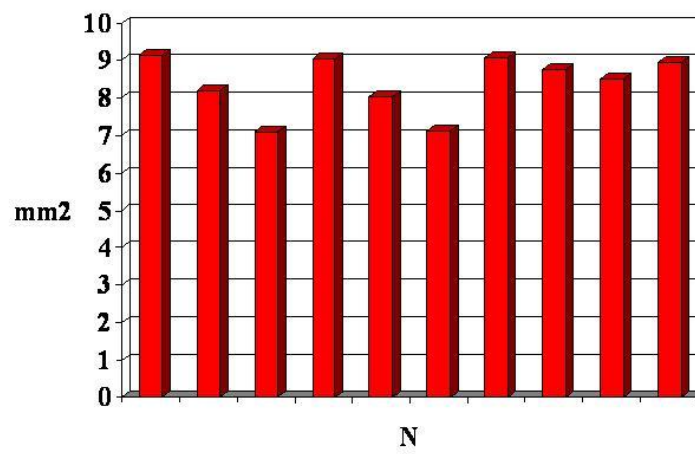


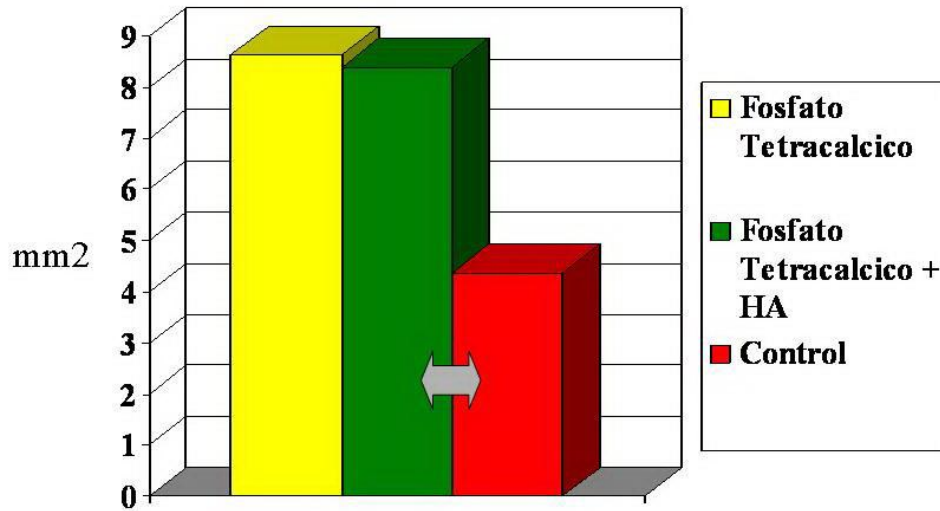
Fig. 30

### Fosfato Tetracalcico + HA





## SUPERFICIE DE HUESO REGENERADO

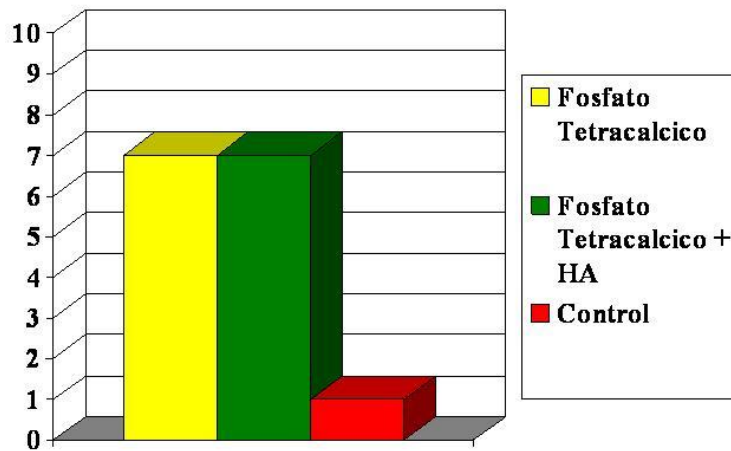


•  $p < 0,001$  Anova on Ranks

Control vs Tratamientos  $p < 0,05$  Dunnett's

↔ Comparaciones Apareadas  $p < 0,05$  Student-Newmann-Keuls

## CALIDAD DE LA ARQUITECTURA ÓSEA



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

**Descriptive Statistics:**

Data source: Data 1 in Notebook 1

| <b>Column</b>      | <b>Size</b> | <b>Missing</b> | <b>Mean</b> | <b>Std Dev</b> | <b>Std. Error</b> | <b>C.I. of Mean</b> |
|--------------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------------|---------------------|
| Fosfato Tetra      | 10          | 0              | 8,630       | 0,790          | 0,250             | 0,565               |
| Fosfato Tetra + HA | 10          | 0              | 8,504       | 0,745          | 0,236             | 0,533               |
| Control            | 10          | 0              | 4,350       | 0,550          | 0,174             | 0,393               |

| <b>Column</b>      | <b>Range</b> | <b>Max</b> | <b>Min</b> | <b>Median</b> | <b>25%</b> | <b>75%</b> |
|--------------------|--------------|------------|------------|---------------|------------|------------|
| Fosfato Tetra      | 2,390        | 9,940      | 7,550      | 8,585         | 7,820      | 9,310      |
| Fosfato Tetra + HA | 2,050        | 9,270      | 7,220      | 8,580         | 8,250      | 9,230      |
| Control            | 1,450        | 4,970      | 3,520      | 4,555         | 3,790      | 4,820      |

| <b>Column</b>      | <b>Skewness</b> | <b>Kurtosis</b> | <b>K-S Dist.</b> | <b>K-S Prob.</b> | <b>Sum</b> | <b>Sum of Squares</b> |
|--------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------|-----------------------|
| Fosfato Tetra      | 0,181           | -1,111          | 0,147            | 0,671            | 86,300     | 750,381               |
| Fosfato Tetra + HA | -0,792          | -0,424          | 0,167            | 0,535            | 85,040     | 728,181               |
| Control            | -0,384          | -1,839          | 0,214            | 0,215            | 43,500     | 191,943               |

## **DISCUSIÓN**

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

### **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 es usualmente observada con los injertos particulados, ya que las partículas tienden a movilizarse 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.

La combinación de las partículas con un biomaterial fraguable, como el Fosfato Tetracalcico utilizado en este trabajo, simplifica su manejo y adecuación al defecto óseo a tratar.

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 estudios previos de nuestro grupo.<sup>1, 2, 28.</sup>

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

## **1) Fosfato Tetracálcico Fraguable**

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 una de las primeras opciones 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 y adaptación a los tejidos, fundamentalmente después del fraguado, lo cual permite que mantenga su forma.
- d) 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, que evaluamos en trabajos previos de nuestro grupo.<sup>1, 28.</sup>
- e) Forma una gran cohesión, 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.

## **2) Fosfato Tetracálcico Fraguable combinado con Hidroxiapatita**

De acuerdo a lo evaluado en el presente trabajo, en el tipo de defecto tratado, la combinación con hidroxiapatita no supone un beneficio adicional, ya que los resultados fueron similares a los obtenidos con el fosfato tetracalcico solo.

La hidroxiapatita sola no ha mostrado ser superior a otras formas, como el injerto autologo o el fosfato tricalcico en partículas, según ya hemos evaluado en trabajos previos.<sup>1, 28.</sup>

Se decidió incorporarla al fosfato tetracalcico como otro grupo en este trabajo, para darle mas cuerpo, y con la intención de mejorar su densidad. Esto basado en otro estudio previo de nuestro grupo, donde evaluamos el sulfato de calcio fraguable, con buenos resultados, pero con una densidad inicial baja, que determinaba a posteriori una reabsorción rápida del biomaterial<sup>29</sup>

Sin embargo aquí, el fosfato tetracalcico mostró un comportamiento superior al sulfato de calcio, por lo cual no se observo un beneficio al adicionar partículas.

No obstante esto, la combinación podría ser útil en defectos más complejos, sobre todo cuando faltan paredes laterales.

## CONCLUSIONES

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

- De acuerdo a lo observado, tanto desde el punto de vista macroscópico, como histológico, el Fosfato Tetracalcico fraguable ha mostrado muy buenas propiedades como material de injerto óseo, posibilitando la regeneración ósea completa de un defecto óseo crítico.
- Sus características físicas, y su facilidad de manipulación supondrían un beneficio adicional en el uso clínico.
- La combinación de Fosfato Tetracalcico fraguable con Hidroxiapatita sintética no mostró beneficios adicionales respecto del uso de Fosfato Tetracalcico solo, en el tipo de defecto óseo tratado. Sin embargo, podría ser útil en el tratamiento de defectos más complejos, especialmente cuando no existan paredes laterales, aunque esto deberá ser evaluado en futuros trabajos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. **Luchetti, C.** “Estudio Comparativo de Injertos de Hueso en Regeneración Ósea Guiada. Caracterización de la Respuesta Frente a Injertos Autólogos y Sustitutos de Origen Humano, Bovino y Químico”.2002.
  
2. **Luchetti, C. et al** “ Uso del Pamidronato Disódico en el tratamiento de defectos estructurales del hueso” Rev. Arg. De Osteología, 2002, 1 (1): 16-17
  
3. **Szpalski C, Wetterau M, Barr J, Warren SM.** “Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques Part I-Scaffolds”.  
Tissue Eng Part B Rev. 2011 Oct 26
  
4. **Gartner, Leslie P. et James L. Hiatt.** “Texto Atlas de Histología”.3 ed.  
Editorial Mc Graw Hill. USA, 2007.
  
5. **Jan Lindhe, Niklaus P. Lang** “Clinical Periodontology and Implant Dentistry”  
5th ed. 2008
  
6. **John P. Bilezikian, Lawrence Gideon Raisz, Gideon A. Rodan** “Principles of Bone Biology”- 2002



7. **Bernal Zepeda, H; Carmona Ocañas, A; Carrillo Martínez, F y col.** 2003.

“Apuntes de Anatomía Comparada”. Facultad de Estudios Superiores

Cuautitlán-UNAM.

8. **Michael H Ross. Wojciech Pawlina** “HISTOLOGY. A Text and Atlas with correlated cell and molecular biology”. Fifth edition 2006

9. **Abraham L. Kierszenbaum** “Histology and Cell Biology, An Introduction to Patology” 2008

10. . **Jiang BQ, Xu X, Liu X, Liu GL, Liang J.** “Clinical retrospective study on membrane guided bone tissue regeneration technique in dental implants in the anterior maxilla”. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 2010 Dec;19(6):586-9.

11. **Kim SH, Kim I, Jeong DM, Chung KR, Zadeh H.** “Corticotomy-assisted decompensation for augmentation of the mandibular anterior ridge”.

Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011 Nov;140(5):720-31

12. **Fu JH, Wang HL.** “Horizontal bone augmentation: the decision tree”.

Int J Periodontics Restorative Dent. 2011 Jul-Aug;31(4):429-36.

13. **Freilich M, Wen B, Shafer D, Schleier P, Dard M, Pendrys D, Ortiz D, Kuhn L.**

“Implant-guided vertical bone growth in the mini-pig”.

Clin Oral Implants Res. 2011 Aug 2. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02199.x.

14. **Fontana F, Maschera E, Rocchietta I, Simion M.** “Clinical classification of complications in guided bone regeneration procedures by means of a nonresorbable membrane”.

Int J Periodontics Restorative Dent. 2011 Jun;31(3):265-73.

15. **Wolf Larry** “New clinical materials and techniques in guided tissue regeneration”. (2000). International dental journal; 50: 235-244

16. **Wang Lay** “Guided Tissue regeneration. Based root coverage utilizing collagen membranes: Technique and case reports”. (2002). Quintessence Int; 33: 715-721

17. **Khoury Fouad** “Soft Tissue management in oral implantology: a review of surgical techniques for shaping and estetic and functional peri-implant tissue structure” (2000). Quintessence Int ;31:483-499

18. **Isaka Jun** “Participation of periodontal Ligament cells with regeneration of alveolar bone”. (2001) J Clin Periodontol; 72:314-323

19. . **Kim D, Kang T, Gober D, Orlich C.** “A liquid membrane as a barrier membrane for guided bone regeneration”.

ISRN Dent. 2011;2011:468282.

20. . **Lesmes D, Laster Z.** “Innovations in dental implant design for current therapy”.Dent Clin North Am. 2011 Oct;55(4):649-61. doi: 10.1016/j.cden.2011.07.004

21. **H. E. Romeo y M. A. Fanovich** “Síntesis de fosfato tetracálcico a partir de reactivos activados mecanoquímicamente”.

División Cerámicos - Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA-CONICET)

Facultad de Ingeniería – Universidad Nacional de Mar del Plata.Juan B. Justo 4302 (B7608FDQ) Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

22 **Chen WC, Ju CP, Tien YC, Lin JH.** “In vivo testing of nanoparticle-treated TTCP/DCPA-based ceramic surfaces”.

Acta Biomater. 2009 Jun;5(5):1767-74. Epub 2008 Dec 24.

23. **Sugawara A, Fujikawa K, Takagi S, Chow LC.** “Histological analysis of calcium phosphate bone grafts for surgically created periodontal bone defects in dogs”.

Dent Mater J. 2008 Nov;27(6):787-94.

24. **Kim H, Camata RP, Vohra YK, Lacefield WR.** “Control of phase composition in hydroxyapatite/tetracalcium phosphate biphasic thin coatings for biomedical applications”.

J Mater Sci Mater Med. 2005 Oct;16(10):961-6.

25 **Tsai CH, Lin RM, Ju CP, Chern Lin JH.** "Bioresorption behavior of tetracalcium phosphate-derived calcium phosphate cement implanted in femur of rabbits".

Biomaterials. 2008 Mar;29(8):984-93.

26. **Lucaciu O, Băciuț M, Băciuț G, Câmpian R, Sorițău O, Bran S, Crișan B, Crișan L.**"Tissue engineered bone versus alloplastic commercial biomaterials in craniofacial reconstruction".

Rom J Morphol Embryol. 2010;51(1):129-36.

27.**Hirayama S, Takagi S, Markovic M, Chow LC.** "Properties\_of\_Calcium Phosphate\_Cements\_With\_Different\_Tetracalcium Phosphate\_and\_Dicalcium Phosphate Anhydrous\_MolarRatios".

J Res Natl Inst Stand Technol. 2008 Nov 1;113(6):311-320.

28 **Luchetti, C.** " Injertos Autólogos, Alógenos, Xenógenos y Sintéticos en el Tratamiento de Grandes Defectos Estructurales del Hueso " Revista Argentina de Osteología, 2005, 4 (1): 9 – 23

29. **Lopez, M.** "Sulfato de Calcio en Regeneración Ósea Guiada.Estudio Comparativo de su uso solo o enriquecido con minerales", 2008.