

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REGENERACIÓN DE
DEFECTOS ÓSEOS EN CÚBITOS DE CONEJOS DE
NUEVA ZELANDA ALBINOS INDUCIDA POR LA
APLICACIÓN TÓPICA DE ALENDRONATO DE SODIO
GELIFICADO Y/O BETA FOSFATO TRICÁLCICO**

Leticia Alejandra Blanco Antona

2013

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REGENERACIÓN DE
DEFECTOS ÓSEOS EN CÚBITOS DE CONEJOS DE
NUEVA ZELANDA ALBINOS INDUCIDA POR LA
APLICACIÓN TÓPICA DE ALENDRONATO DE SODIO
GELIFICADO Y/O BETA FOSFATO TRICÁLCICO**

Leticia Alejandra Blanco Antona

2013

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REGENERACIÓN DE
DEFECTOS ÓSEOS EN CÚBITOS DE CONEJOS DE
NUEVA ZELANDA ALBINOS INDUCIDA POR LA
APLICACIÓN TÓPICA DE ALENDRONATO DE SODIO
GELIFICADO Y/O BETA FOSFATO TRICÁLCICO**

Leticia Alejandra Blanco Antona

DIRECTORES:

Prof. Dr.D. Javier Montero Martín, Contratado Doctor del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.

Prof. Dr. Da. María Ángeles Pérez de la Cruz, Profesora Titular del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Salamanca.

Prof. Dr. D. Antonio López-Valverde Centeno, Ayudante Doctor del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca. Subdirector del Departamento de Cirugía.

2013

PROF. DR. D. JAVIER MONTERO MARTÍN, CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PROF. DR. Da. MARÍA ÁNGELES PÉREZ DE LA CRUZ, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PROF. DR. D. ANTONIO LÓPEZ-VALVERDE CENTENO, AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REGENERACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS EN CÚBITOS DE CONEJOS DE NUEVA ZELANDA ALBINOS INDUCIDA POR LA APLICACIÓN TÓPICA DE ALENDRONATO DE SODIO GELIFICADO Y/O BETA FOSFATO TRICÁLCICO”**, que presenta Da. Leticia Alejandra Blanco Antona, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Cirugía, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a 7 de Octubre de 2013.

D. Javier Montero Martín

D. María Ángeles Pérez de la Cruz

D. Antonio López-Valverde Centeno

PROF. DR. D. CLEMENTE MURIEL VILLORIA, CATEDRÁTICO DE ANESTESIOLOGÍA. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA QUE:

La presente Tesis Doctoral, titulada "ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REGENERACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS EN CÚBITOS DE CONEJOS DE NUEVA ZELANDA ALBINOS INDUCIDA POR LA APLICACIÓN TÓPICA DE ALENDRONATO DE SODIO GELIFICADO Y/O BETA FOSFATO TRICÁLCICO", realizada por Da. Leticia Alejandra Blanco Antona para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Salamanca, cumple todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

Y para que así conste a los efectos oportunos, expido el siguiente certificado en Salamanca, a 7 de octubre de dos mil trece.

Fdo. Prof. Dr. Clemente Muriel Villoria

El presente proyecto doctoral ha sido financiado por el Programa de Ayudas a
Proyectos de Investigación de la Universidad de Salamanca

(Ref. 18KC10/463AC01)

2013

AGRADECIMIENTOS

A los directores de esta tesis: Javier Montero, María de los Ángeles Pérez y Antonio López-Valverde, por su inestimable contribución al logro de los objetivos propuestos, su atención en las revisiones y sus enseñanzas.

A mis padres, con cariño infinito y eterna gratitud por la vida que me dieron y la que me han entregado con ignorado sacrificio, por el ejemplo, prodigalidad, dedicación y amor recibidos.

A mi hermano Curro, modelo para mí desde la cuna, por su fraternal apoyo, incondicional ayuda, decisiva entrega y constante estímulo, sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A mi marido Jorge, por su indulgencia, ánimos permanentes, paciencia duradera, amor incondicional y comprensión inagotable.

A Clemente, por aceptarme en su equipo de investigadores y darme todas las facilidades posibles para la realización de este trabajo.

A María José, madrina universitaria, compañera y maestra, por la amabilidad, respeto, afecto y profesionalidad que me ha brindado, con desmedido entusiasmo, destacado interés y donación generosa.

A María Portillo, por compartir conmigo el trabajo experimental con entusiasmo y buen humor, las mañanas de cada jueves.

Al amigo farmacéutico Agapito por su importante y desinteresada colaboración para conseguir los objetivos de este trabajo.

A los técnicos del laboratorio de Histología, Javier y Rosa, por su interés y colaboración al éxito de este proyecto.

Y a los empleados del animalario, Paco y José Fernando, por su buena disposición a facilitarme todo lo que demandaba.

A mi familia

índice

	Pág.
PRESENTACIÓN	1
I ~ INTRODUCCIÓN	4
1 - CONTEXTO SOCIODEMOGRÁFICO Y CULTURAL.....	5
2 - EL HUESO.....	9
2.1 - Osteología.....	9
2.2 - Composición del tejido óseo.....	11
2.3 - Células óseas.....	16
2.3.1 - Osteoblastos.....	16
2.3.2 - Osteocitos.....	18
2.3.3 - Osteoclastos.....	21
2.4 - Organización estructural del hueso.....	23
2.4.1 - Estructura global ósea.....	25
2.4.2 - Estructura macroscópica ósea.....	25
2.4.3 - Estructura microscópica ósea.....	25
2.4.3.1 - Hueso plexiforme.....	25
2.4.3.2 - Hueso haversiano.....	26
2.4.3.3 - Hueso laminar.....	26
2.5 - Tipos de tejido óseo.....	28
2.6 - Funciones del hueso.....	30
2.7 - Origen embriológico del hueso.....	30
2.8 - Remodelación ósea.....	33
2.9 - Reparación ósea.....	36

3 -	REGENERACIÓN DE LOS DEFECTOS ÓSEOS.....	37
	3.1 - Defectos óseos de los maxilares.....	37
	3.2 - Regeneración del tejido óseo.....	39
	3.2.1 - Sustitutos óseos.....	41
	3.2.2 - Injertos óseos: tipos.....	41
	3.2.2.1 – Autoinjertos.....	43
	3.2.2.2 – Aloinjertos.....	44
	3.2.2.3 – Isoinjertos.....	46
	3.2.2.4 - Xenoinjerto o heteroinjerto.....	46
4 -	BIOMATERIALES.....	47
	4.1 - Biomateriales como sustitutivos óseos.....	47
	4.2 - Biomateriales cerámicos.....	48
	4.2.1 - Cerámicas a base de fosfatos de calcio.....	51
5 -	BIFOSFONATOS.....	62
	5.1 - Características químicas.....	63
	5.2 - Clasificación de los bifosfonatos.....	66
	5.2.1 – Bifosfonatos no nitrogenados.....	66
	5.2.2 - Bifosfonatos nitrogenados	67
	5.3 - Mecanismos de acción de los bifosfonatos.....	69
	5.4 – Aplicación clínica de los bifosfonatos.....	73
	5.5 – Complicaciones asociadas a los bifosfonatos.....	74
	5.6 – Alendronato.....	78
	5.6.1 - Propiedades farmacológicas.....	78
	5.6.2 - Mecanismos de acción.....	80
	5.6.3 - Seguridad y efectos secundarios.....	81
6 -	OTROS FÁRMACOS O SUSTANCIAS POTENCILAMTENTE IMPLICADOS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA.....	82
II ~	OBJETIVOS.....	84

III ~ MATERIAL Y MÉTODO	86
1 - MATERIALES.....	87
1.1 - Material KeraOs®.....	87
1.2 - Alendronato de sodio.....	90
1.3 - Membrana de colágeno.....	91
1.4 - Modelo animal de experimentación.....	91
1.5 - Instalaciones.....	93
2 - MÉTODO.....	95
2.1 – Técnica experimental.....	95
2.1.1 - Protocolo anestésico.....	95
2.1.2 - Protocolo quirúrgico.....	96
2.2 – Seguimiento y recogida de muestras.....	104
2.2.1 - Manejo de las muestras.....	106
2.3 – Protocolo radiológico.....	107
2.4 – Protocolo histológico.....	107
2.5 – Variables de resultado.....	116
IV ~ RESULTADOS	118
1 – GRUPO 1 (CEMENTO).....	119
1.1 – Subgrupo 1.a (4-5 semanas y n = 10).....	120
1.2 – Subgrupo 1.b (6-7 semanas y n = 10).....	130
1.3 – Subgrupo 1.c (9 semanas y n = 3).....	138
1.4 – Subgrupo puente entre subgrupos (10 semanas: n =1 y 11 semanas: n = 1).....	144
1.5 – Subgrupo 1.d (12-13 semanas y n = 5).....	149
2 – GRUPO 2 (CEMENTO CON ALENDRONATO).....	156
2.1 – Subgrupo 2.a (4-5 semanas y n = 10).....	156
2.2 – Subgrupo 2.b (6-7 semanas y n = 10).....	169
2.3 – Subgrupo 2.c (9 semanas y n = 3).....	175
2.4 – subgrupo 2.d (12-13 semanas y n = 5).....	181

3 – RESUMEN DE RESULTADOS.....	187
V ~ DiSCVSiON.....	191
VI ~ CONCLVSiONES.....	203
VII ~ BiBLiOGRAffA.....	205

íNDICE DE FIGURAS

I ~ INTRODUCCIÓN	Pág.
Fig.1. Pirámide población española, enero 2013.....	5
Fig.2. Porcentaje población española con enfermedad periodontal. Según la encuesta del consejo general de dentistas de España 2010.....	7
Fig.3. Porcentaje de la población española con caries según la edad. Según la encuesta del consejo general de dentistas de España.....	8
Fig.4. Numero de dientes afectados por caries según la edad. Según la encuesta del consejo general de dentistas de España.....	8
Fig.5. Estructura cristalina de la hidroxiapatita.....	11
Fig.6. Estructura de la hélice de colágeno.....	12
Fig.7. Imagen osteológica de osteoblastos y línea de osteoide.....	17
Fig.8. Imagen osteológica de un osteocito.....	19
Fig.9. Imagen histológica de un osteoclasto.....	21
Fig.10. Esquema de la organización estructural del hueso.....	23

Fig.11. Imagen macroscópica que muestra el hueso compacto cortical en la parte externa y el retículo de trabéculas del hueso esponjoso en su interior.....	28
Fig.12. Imagen histológica de hueso cortical.....	28
Fig.13. Imagen histológica de hueso esponjoso.....	29
Fig.14. Estructura química básica de los bifosfonatos.....	64
Fig.15. Formulas de los bifosfonatos no nitrogenados.....	66
Fig.16. Bifosfonatos nitrogenados.....	67
Fig.17. Estructura del alendronato.....	78
Fig.18. Gráfica que muestra el crecimiento exponencial en el numero de publicaciones sobre estos fármacos.....	83

II ~ MATERIAL Y MÉTODO

Fig.1 y 2. Microestructura del biomaterial KeraOs [®]	88
Fig.3. Formato comercial del biomaterial KeraOs [®]	89
Fig.4. Bote de la presentación del alendronato de sodio (Laboratorios Normon TM).....	90
Fig.5. Membrana de colágeno Bio Gide [®]	91
Fig.6. Foto y esquema del esqueleto del conejo de Nueva Zelanda albino.....	92
Fig.7. Ampolla de Diazepan y Ketamina.....	95

Fig.8. Fotos del anestésico local y del sistema de inyección.....	96
Fig.9. Aislamiento del campo quirúrgico.....	97
Fig.10. Incisión lineal.....	98
Fig.11. Marcas realizadas con la fresa de inicio.....	98
Fig.12. Aspecto final de las dos ostectomías.....	98
Fig.13. Gráfica de las muestras de estudio.....	99
Fig.14. Vaso Dappen con el biomaterial KeraOs®	100
Fig.15. Cucharilla de legrado para la colocación del Biomaterial.....	101
Fig.16. Aplicación del biomaterial KeraOs® sobre el defecto óseo.....	101
Fig.17. Vaso Dappen con gel de alendronato y biomaterial KeraOs®	102
Fig.18. Gel de alendronato vehiculizado con jeringuilla.....	102
Fig.19. Membrana de colágeno colocada e inicio de la sutura con Vicryl.....	103
Fig.20. Sutura reabsorbible de Vicryl 5/0.....	103
Fig.21. Sutura cutánea con con puntos simples de seda.....	103
Fig.22. Sutura irreabsorbible de seda 4/0.....	104

Fig.23. Radiografía del cúbito del animal nº 26: se observa el orificio distal vacío y el cemento colocado en el lecho proximal.....	107
Fig.24. Corte de la muestra nº 57.....	108
Fig.25. Introducción en cassette de la pieza nº 57.....	108
Fig.26. Fotografías de las piezas óseas embebidas en los bloques de metilmetacrilato.....	110
Fig.27. Micrótopo. Técnico realizando cortes.....	110
Fig.28. Técnica de Tricrómpico de Goldner (materiales utilizados).....	113
Fig.29. Imagen obtenida con la técnica del Tricrómpico de Goldner.....	114
Fig.30. Imagen obtenida con la técnica de Von Kossa (2x).....	115
Fig.31. Cámara fotográfica Nikon acoplada al microscopio óptico.....	116

III ~ RESULTADOS

Fig.1. Radiografía de la inyección de cemento con una supervivencia de cuatro semanas y cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 63.....	123
Fig.2. Tricrómpico de Goldner (2x). Reacción conectiva asociada a periostio.....	123
Fig.3. Tricrómpico de Goldner (4x). Contorno irregular de espículas.....	124
Fig.4. Tricrómpico de Goldner (10 x). Interfase entre cemento y tejido conectivo.....	124

Fig.5. Tricrómico de Goldner (10 x). Tejido conectivo introducido en el cemento.....	125
Fig.6. Tricrómico de Goldner (20 x). Hilera de osteoblastos.....	125
Fig.7. Tricrómico de Goldner (20 x). Relación del cemento con el tejido conectivo.....	126
Fig.8. Tricrómico de Goldner (40 x). Detalle de las papilas conectiva.....	126
Fig.9. Tricrómico de Goldner (40 x). Trabécula y células de hábito osteoblástico.....	127
Fig.10. Tricrómico de Goldner (40 x). Trabéculas sin hábito de células osteoblásticas.....	127
Fig.11. Tricrómico de Goldner (2 x). Gránulos de cemento en la cavidad medular.....	128
Fig.12. Tricrómico de Goldner (10 x). Espícula ósea neoformada.....	128
Fig.13. Tricrómico de Goldner (20 x). Detalle de trabéculas óseas neoformadas inmaduras.....	129
Fig.14. Técnica de Von Kossa (2 x). Hueso neoformado, inmaduro y no laminar.....	129
Fig.15. Gránulos de cemento separados. Animal 34.....	132
Fig.16. Tricrómico de Goldner (4 x). Cemento rodeado de tejido óseo y tejido conectivo.....	132
Fig.17. Tricrómico de Goldner (20 x). Cemento rodeado de tejido conectivo.....	133
Fig.18. Tricrómico de Goldner (4 x). Cemento rodeado de fenómenos de osteosíntesis.....	133

Fig.19. Tricrómico de Goldner (40 x). Fenómenos de osteosíntesis en la vecindad del cemento.....	134
Fig.20. Tricrómico de Goldner (20 x). Cemento rodeado de macrófagos que contienen partículas de cemento en su interior.....	134
Fig.21. Tricrómico de Goldner (20 x). Hueso neoformado con procesos de remodelación.....	135
Fig.22. Tricrómico de Goldner (20 x). Médula ósea roja cercana al cemento.....	135
Fig.2. Técnica de Von Kossa (2 x). Zonas de cemento asociadas a hueso.....	136
Fig.24. Técnica de Von Kossa (4 x). Partículas de cemento rodeadas de tejido óseo y tejido conectivo.....	136
Fig.25. Técnica de Von Kossa (2 x). Orificio quirúrgico invadido por tejido conectivo.....	137
Fig.26. RX gránulos de cemento con contornos irregulares y espacios intergranulares. Cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 46.....	140
Fig.27. Tricrómico de Goldner (2 x). Cemento recubierto de tejido óseo.....	140
Fig.28. Tricrómico de Goldner (4 x). Gránulos de cemento fragmentados por puentes de tejido óseo...	141
Fig.29. Tricrómico de Goldner (4 x). Cemento rodeado de tejido conectivo adyacente a médula ósea amarilla.....	141
Fig.30. Tricrómico de Goldner (10 x). Tejido conectivo rodeando al cemento.....	142

Fig.31. Tricrómico de Goldner (10 x). Tejido óseo con fenómenos de síntesis.....	142
Fig.32. Tricrómico de Goldner (20 x). Tejido óseo con fenómenos de remodelación.....	143
Fig.33. Tricrómico de Goldner(10 x). Macrófagos con gránulos de cemento en su citoplasma.....	143
Fig.34. RX gránulos de cemento en un animal de 10 semanas de evolución después de haber realizado la inyección de dicho cemento. Cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 27.....	145
Fig.35. Tricrómico de Goldner (2 x). Cemento recubierto por tejido óseo.....	145
Fig.36. Tricrómico de Goldner (10 x). Hueso débilmente calcificado y fenómenos de remodelación ósea.....	146
Fig.37. Tricrómico de Goldner (10 x). Macrófagos con resto de cemento en su citoplasma y células gigantes.....	146
Fig.38. Tricrómico de Goldner (10 x). Hileras de osteoblastos asociadas a sustancia osteoide.....	147
Fig.39. Técnica de Von Kossa (2 x). Gránulos de cemento de morfología irregular.....	147
Fig.40. Técnica de Von Kossa (4 x). Gránulos de cemento rodeados por tejido conectivo y médula ósea.....	148
Fig.41. Técnica de Von Kossa (10 x). Médula ósea amarilla o roja adyacente al hueso.....	148
Fig.42. RX gránulos de cemento con aumento del espacio intergranular Cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 40.....	151

Fig.43. Tricrómico de Goldner (2 x). Proliferación ósea con signos de osteosíntesis.....	151
Fig.44. Tricrómico de Goldner (4 x). Espículas o trabéculas óseas con actividad osteosintética.....	152
Fig.45. Tricrómico de Goldner (10 x). Macrófagos y células multinucleadas.....	152
Fig.46. Tricrómico de Goldner (20x). Remodelación ósea con osteoclastos.....	153
Fig.47. Tricrómico de Goldner (20 x). Células gigantes multinucleadas.....	153
Fig.48. Técnica de Von Kossa (2 x). Hueso neoformado bien calcificado.....	154
Fig.49. Técnica de Von Kossa (4 x). Gránulos de cemento y trabéculas óseas.....	154
Fig.50. Técnica de Von Kossa (20 x). Células macrófagicas y multinucleadas de cuerpo extraño.....	155
Fig.51. RX Gránulos de cemento con alendronato. A la derecha, lesión con alendronato. Cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 62.....	160
Fig.52. Tricrómico de Goldner (2 x). Gránulos de cemento con alendronato y finas trabéculas de hueso neoformado.....	160
Fig.53. Técnica de Von Kossa (2 x). Finas trabéculas óseas neoformadas en la cavidad medular.....	161
Fig.54. Tricrómico de Goldner (4 x). Gránulos de cemento con alendronato rodeados de tejido conectivo.....	161
Fig.55. Tricrómico de Goldner (10 x). Células multinucleadas.....	162

Fig.56. Tricrómico de Goldner (10 x). Hueso neoformado alrededor del cemento con alendronato.....	162
Fig.57. Tricrómico de Goldner (20 x). Células multinucleadas de hábito osteoclástico.....	163
Fig.58. Tricrómico de Goldner (2 x). Inducción de la formación de tejido óseo.....	163
Fig.59. Tricrómico de Goldner (4 x). Cemento y alendronato rodeado de tejido óseo neoformado.....	164
Fig.60. Tricrómico de Goldner (10 x). Cemento y alendronato rodeado de tejido conectivo y fenómenos de remodelación ósea.....	164
Fig.61. Tricrómico de Goldner (20 x). Macrófagos en relación con el cemento y alendronato.....	165
Fig.62. Tricrómico de Goldner (20 x). Cemento y alendronato rodeado de tejido conectivo.....	165
Fig.63. Tricrómico de Goldner (20 x). Médula roja hematopoyética con células gigantes multinucleadas.....	166
Fig.64. Tricrómico de Goldner (20 x). Trabécula ósea con síntesis de tejido óseo.....	166
Fig.65. Tricrómico de Goldner (20 x). Cemento y alendronato en el centro relacionado con macrófagos y células multinucleadas.....	167
Fig.66. Técnica de Von Kossa (2 x). Gránulos de material (cemento más alendronato) rodeados de una trama reticular.....	167

Fig.67. Técnica de Von Kossa (2 x). Zona de inyección del material con tejido óseo intentando obliterar dicha zona.....	168
Fig.68. Técnica de Von Kossa (4 x). Proliferación reticular con fenómenos de síntesis y remodelación ósea.....	168
Fig.69. RX gránulos de cemento y alendronato en animales de 6 - 7 semanas postinyección. Cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 84.....	171
Fig.70. Tricrómico de Goldner (4 x). Perforación cortical central.....	171
Fig.71. Tricrómico de Goldner (2 x). Gránulos de cemento con alendronato rodeados por hueso.....	172
Fig.72. Tricrómico de Goldner (4 x). Gránulos con cemento y alendronato con diferentes densidades...	172
Fig.73. Tricrómico de Goldner (10 x). Tejido conectivo con macrófagos y células gigantes entre el material (cemento más alendronato) y tejido óseo.....	173
Fig.74. Tricrómico de Goldner (10 x). Síntesis ósea en la trabécula y material (cemento más alendronato) rodeado por tejido óseo.....	173
Fig.75. Tricrómico de Goldner (10 x). Médula ósea adiposa bien vascularizada y fenómenos de síntesis ósea.....	174
Fig.76. Tricrómico de Goldner (4 x). Gránulos de material (cemento más alendronato) rodeados de tejido óseo.....	174
Fig.77. RX gránulos de cemento más alendronato con densidad variable de animales de 9 semanas de evolución. Cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 47.....	177

Fig.78. Tricrómico de Goldner (2 x). Zona de inyección del material (cemento más alendronato) y gránulos de dicho material rodeados por tejido conectivo.....	177
Fig.79. Tricrómico de Goldner (4 x). Restos de material (cemento más alendronato) rodeados por gruesas trabéculas óseas.....	178
Fig.80. Tricrómico de Goldner (10 x). Macrófagos y células gigantes cercanos al material (cemento y alendronato).....	178
Fig.81. Tricrómico de Goldner (4 x). Gránulos (cemento más alendronato) rodeados de trabéculas.....	179
Fig.82. Tricrómico de Goldner (4x). Síntesis ósea entre el material (cemento más alendronato) y las trabéculas óseas.....	179
Fig.83. Tricrómico de Goldner (4 x). Hueso neoformado estabilizando la estructura ósea.....	180
Fig.84. Técnica de Von Kossa (4 x). Proliferación ósea y trabéculas óseas.....	180
Fig.85. RX gránulos de cemento y alendronato de animales de 12 y 13 semanas de evolución después de la inyección. Cilindro de metacrilato con pieza del animal nº 69.....	183
Fig.86. Técnica de Von Kossa (2 x). Proliferación, síntesis y remodelado óseo.....	183
Fig.87. Tricrómico de Goldner (4 x). Pequeño gránulo (cemento más alendronato) rodeado de tejido conectivo.....	184
Fig.88. Tricrómico de Goldner (10 x). Detalle de la anterior, observándose macrófagos y células gigantes.....	184

Fig.89. Tricrómico de Goldner (20 x). Macrófagos y células gigantes en el tejido conectivo.....	185
Fig.90. Tricrómico de Goldner (10 x). Médula ósea rica en adipocitos bien vascularizada.....	185
Fig.91. Tinción de Von Kossa (4 x). Gránulo con material (cemento más alendronato) que presenta una marcada argirofilia.....	186
Fig.92. Tinción de Von Kossa (10 x). Detalle de la anterior observándose contornos irregulares en el gránulo rodeado de macrófagos y células multinucleadas.....	186
Fig.93. Tricrómico de Goldner (2x) a las 4 y 7 semanas, que muestra como la cortical se ve interrumpida en la zona del defecto.....	189
Fig.94. Tricrómico de Goldner (2x) a las 4 y 7 semanas, que muestra como la cortical se ve interrumpida en la zona del defecto.....	189
Fig.95. Tricrómico de Goldner (2x) a las 12 se manas de seguimiento sin regeneración del defecto.....	190
Fig.96, y 97. Tinción de Von Kossa (2x) sobre el mismo animal de la figura 13, a las 4 y 7 semanas de seguimiento, donde se constata que no existe regeneración de la cortical.....	190
Fig.98. Técnica de Von Kossa (2x) a las 12 semanas de seguimiento....	190

ÍNDICE DE TABLAS

I ~ INTRODUCCIÓN

Pág.

Tabla 1.	Propiedades de los distintos tipos de injertos óseos.....	42
Tabla 2.	Características de los distintos tipos de injertos óseos.....	45
Tabla 3.	Estudios realizados en modelos animales con fosfatos de calcio.....	60
Tabla 4.	Estudios realizados en humanos con fosfatos de calcio.....	61
Tabla 5.	Formulación de los bifosfonatos más empleados.....	68

II ~ MATERIAL Y MÉTODO

Tabla 1.	Subdivisión de animales de experimentación (grupo 1 y 2), según el período de seguimiento.....	105
Tabla 2.	Distribución exacta del período de seguimiento en cada conejo (numeración de la muestra).....	106

III ~ RESULTADOS

Tabla 1.	Hallazgos histológicos.....	187
Tabla 2.	Imágenes histológicas que resumen los hallazgos obtenidos.....	188

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- AAOMS:** American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.
- AECO:** Asociación Española Contra la Osteoporosis.
- ALN:** Alendronato.
- ARN:** Ácido Ribonucleico.
- ATPasas:** Enzimas Adenosin Trifosfato.
- BFs:** Bifosfonatos.
- BMP-2:** Proteínas Morfogenéticas del Hueso 2.
- BMPs:** Proteínas Morfogenéticas del Hueso.
- BOE:** Boletín Oficial de Estado.
- CEE:** Comunidad Económica Europea.
- clg-PVP:** Colágena-Polivinilpirrolidona.
- CSF-1:** Colony Stimulating Factor 1 (citokina).
- DMO:** Densidad Mineral Ósea.
- DMP1:** Proteína de la Matriz Dentinaria 1.
- ED1:** gen que codifica para la proteína transmembrana ectodisplasina A.
- EV:** Endovenoso.
- FDA:** Food and Drug Administration.
- FPFS:** Farnesil Pirofosfato Sintetasa .
- HA:** Hidroxiapatita.
- IGF-I:** (Insulin-like Growth Factor-1) factor de crecimiento insulínico tipo 1.
- IGF-II:** (Insulin-like Growth Factor-2) factor de crecimiento insulínico tipo 2.
- IL:** Interleukina-1b.
- IL-6:** Interleukina-6.
- INE:** Instituto Nacional de Estadística.
- IPA:** Ingenuity Pathways Analysis.
- IV:** Intravenoso.
- MMPs:** Matriz Metaloproteínasas.
- Nell-1:** NEL-like protein 1.
- NIH:** National Institutes of Health.

ONM: Osteonecrósis Maxilar.

OPG: Osteoprotegerina.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PFIs: Pirofosfatos Inorgánicos.

PLGA: Ácido Poliláctico-co-glicólido.

PMO: Proteína Morfogenética Ósea.

PTH: Parathormona.

RANKL: Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand.

RGD: Secuencia (Arginina-Glicina-Aspartato) presentada en la sialoproteína.

RRR: Reducción del Reborde Residual.

RX: Radiografía.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TRAP: Fosfatasa ácida Tartrato Resistente (para tinciones).

UBMs: Unidades Básicas Multicelulares.

USAL: Universidad de Salamanca.

Wnt: Wingless (Vía de señalización de proteínas).

β -TCP: Beta Fosfato Tricálcico.

PRESENTACIÓN

Con esta presentación se pretende introducir al lector en el tema objeto de esta tesis, facilitando su lectura y permitiendo que el prefacio cumpla la misión que le corresponde, anteponiéndose a la obra.

En todo trabajo científico no puede obviarse la inevitable influencia de antecedentes en los que basar la experimentación, pues la producción del intelecto humano está conformada por una interminable cadena de herencias y legados.

Como en todas las investigaciones, las aportaciones de otros científicos han sido base de nuestros logros, y merecedoras de agradecimiento, pues sin tal legado hubiera sido imposible alcanzar los resultados obtenidos, en beneficio de los pacientes, los colegas profesionales y el progreso científico.

El presente trabajo ha sido dirigido por profesores universitarios que han ayudado a la doctoranda a descubrir lo que no es posible aprender durante la carrera, cumpliéndose así el principio básico que rige estos estudios, al poner sobre la mesa científica descubrimientos hasta ahora inéditos, algo que no hubiera logrado la autora de esta tesis sin el apoyo incondicional de sus directores; sin su ayuda desinteresada; y sin su disponibilidad permanente a resolver en todo momento las dificultades encontradas a lo largo del proceso.

Son ellos quienes han planificado, organizado y controlado cada una de las etapas del trabajo, mereciendo por ello sincera eterna gratitud de la doctoranda, pues su intervención ha permitido armonizar y concertar todos los factores intervinientes, para alcanzar felizmente los objetivos propuestos.

Algunos autores han investigado la reducción de masa ósea en los maxilares debido a pérdidas dentales, así como las posibilidades de regenerar hueso mediante la aplicación de injertos o biomateriales, y se han estudiado las distintas combinaciones de estos materiales con sustancias que podrían potenciar dicha regeneración ósea y facilitar la reposición protética de los dientes perdidos.

Hasta el primer tercio del siglo XX, los investigadores eran personas que se encerraban solos en laboratorios a experimentar las ideas y proyectos que su privilegiada mente les sugería. Pero en el siglo XXI esto no es factible, ni productivo, ni eficaz, ni útil, para alcanzar los elevados fines que demanda la investigación actualmente, donde el trabajo en equipo es la base para alcanzar los objetivos que demanda el progreso de una sociedad moderna. Ello explica la interdisciplinariedad de la presente tesis doctoral, implicando áreas de conocimiento pertenecientes a distintos ámbitos del saber, con fin de transversalizar los conocimientos en beneficio de un progreso científico, tendente a mejorar la calidad de vida de los pacientes y el bienestar de la sociedad en que están inmersos.

El trabajo y los resultados obtenidos en la investigación llevada a cabo ha sido posible gracias a la estrecha colaboración de cuatro especialidades:

Odontología, Cirugía Maxilar, Experimentación Animal e Histología, representadas en la presente investigación por los profesores Javier Montero, Antonio López-Valverde y María de los Ángeles Pérez de la Cruz.

La escasa doctrina científica existente en el ámbito odontológico debido a la reciente implantación y desarrollo de esta especialidad médica, impulsa la idea del presente trabajo a fin de contribuir al enriquecimiento de la investigación en este ámbito, aportando conclusiones científicas de indudable valor, tendentes a facilitar el manejo de los tejidos óseos y minimizar la pérdida ósea de los maxilares permitiendo mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Hemos valorado el efecto resultante de combinar dos compuestos químicos en condiciones no investigadas hasta ahora, analizando cualitativamente el nivel de regeneración ósea producido, utilizando el bifosfonato en estado de gel.

Los resultados de este trabajo confirman la hipótesis inicial del mismo, comprobándose que la combinación de alendronato de sodio gelificado con beta fosfato tricálcico tiene un efecto potenciador en la regeneración de defectos en cúbitos de conejos albinos de Nueva Zelanda.



I. iNTRoDvCCiÓN

1. CONTEXTO SOCIODEMOGRÁFICO Y CULTURAL

El progreso científico de la sociedad moderna, nos permite prolongar las expectativas de vida, a la vez que expone a un envejecimiento de la población española, tal y como expone el Instituto Nacional de Estadística (INE) en sus datos demográficos de 2013 (INE, 2013).

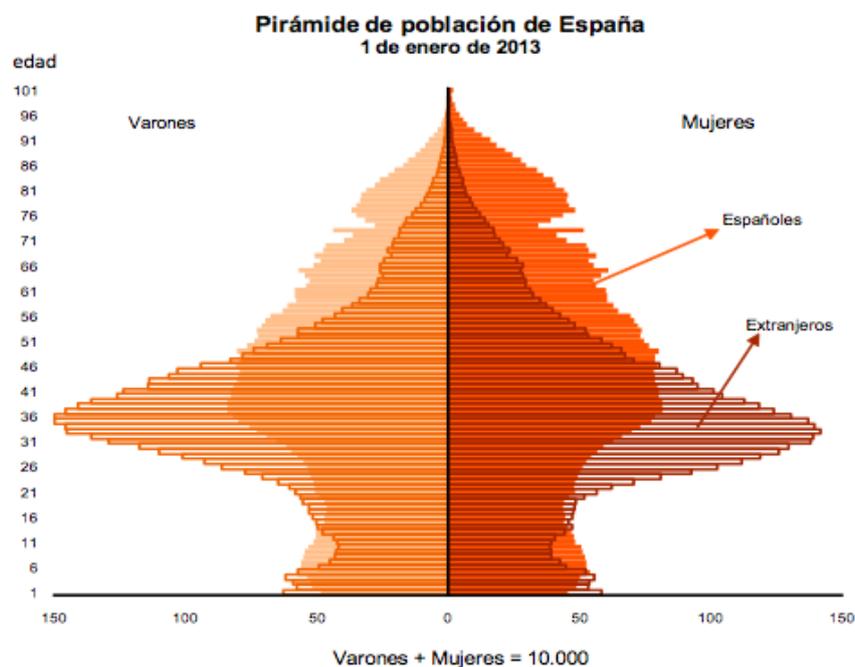


Fig.1. Pirámide de población española, enero 2013 (INE, 2013).

Este aumento de edad media de la población, dificulta el mantenimiento de la calidad de vida en términos generales, y en particular de la salud bucal, por existir un notable incremento de las afecciones bucales que requieren sustitución protésica y sus correspondientes recambios.

Debido al envejecimiento progresivo de la población, la incidencia y la prevalencia de algunas enfermedades que afectan al hueso, como la osteoporosis, se han incrementado estos últimos años.

En 1995 Melton estimó la prevalencia de osteoporosis según los criterios de la OMS en mujeres de raza blanca mayores de 50 años, siendo del 15% cuando se mide en una de las tres localizaciones habituales (columna, cadera o muñeca) y del 30% cuando se mide en todas ellas (Melton LJ, 1995). La prevalencia aumenta con la edad desde el 15% para las edades comprendidas entre 50 y 59 años hasta una prevalencia mayor al 80% para las mujeres con una edad superior a 80 años (Rosen CJ, 2005).

El *National Institutes of Health* (NIH, 2000), en la conferencia de consenso de 2000, redefinió la osteoporosis como “un trastorno esquelético caracterizado por un compromiso de la resistencia ósea que predispone a las personas a un aumento del riesgo de fracturas”.

La Osteoporosis es una enfermedad muy frecuente. Cerca de 3 millones de personas la padecen en España, la mayor parte de las cuales son mujeres. Aproximadamente, 3 de cada 10 mujeres la sufren después de la menopausia (AECO, 2013). Este tipo de enfermedades afectan directamente a la calidad y cantidad de tejido óseo remanente.

El envejecimiento de la población determina un deterioro de los tejidos orgánicos, en particular del tejido óseo, con pérdida dental y ósea del reborde alveolar, a nivel de los maxilares.

La atrofia o reabsorción del hueso alveolar relacionada con la pérdida dental por traumatismos, caries o periodontitis puede comprometer la inserción de los implantes dentales en una posición prostodóncica ideal. En este sentido es necesario el aumento de ese volumen óseo para realizar con éxito un implante dental que garantice buenos resultados funcionales y estéticos a largo plazo (Esposito M, 2006; Jensen SS, 2009).

El factor más influyente en el éxito de los implantes dentales es la cantidad y calidad ósea del tejido receptor. Éstas se consideran ideales cuando se mantienen dientes sanos en oclusión unos con otros, y se ven mermadas cuando la caries o la enfermedad periodontal - consideradas las enfermedades bucodentales más comunes del adulto -, obligan a la extracción dentaria. Según el Consejo General de Dentistas de España las enfermedades periodontales severas, que pueden desembocar en la pérdida de dientes, afectan entre 5 - 11% de los adultos, como se puede observar en la Figura 2. Entre el 85-94% de la población española mayor de 35 años presenta algún problema relacionado con las encías (Consejo de Dentistas, 2010).

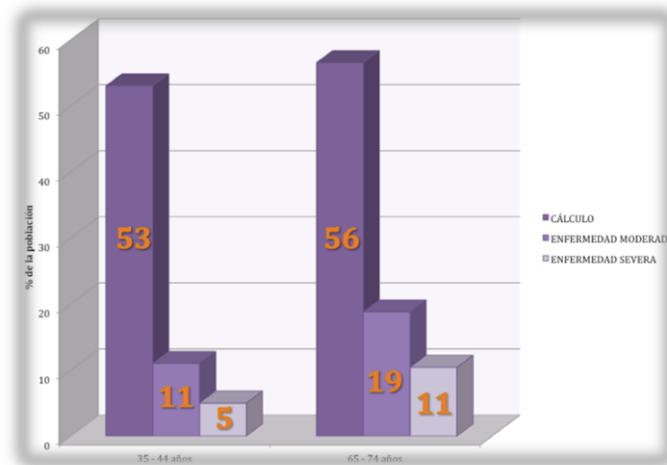


Fig.2. Porcentaje de población española con enfermedad periodontal. Según la encuesta del Consejo General de Dentistas de España 2010.

Según esta misma encuesta de 2010 a partir de los 35 años de edad, la caries es una enfermedad generalizada: entre el 92-94% de la población adulta tiene caries. Uno de cada dos jóvenes españoles (12-15 años) tiene caries en dientes definitivos y uno de cada tres tiene caries en dientes de leche (a los 5-6 años) (Figura 3).

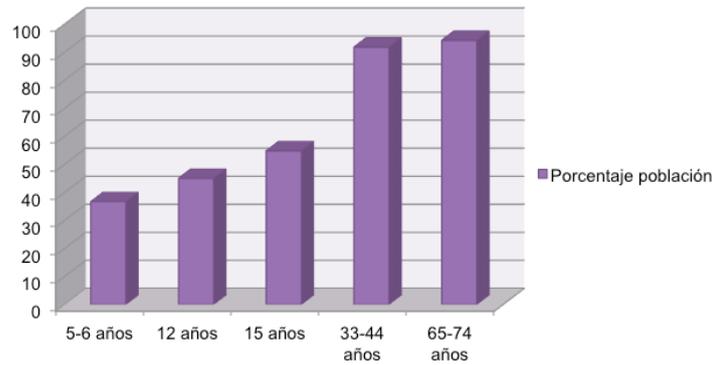


Fig. 3. Porcentaje de la población española con caries según la edad. Según la encuesta del Consejo General de dentistas de España 2010.

Según esta misma encuesta en 2010, la cantidad de dientes afectados de caries aumenta con la edad, siendo más del doble el número de dientes con caries a partir de los 65 años (14 dientes) que en la edad adulta (6 dientes) (Figura 4).

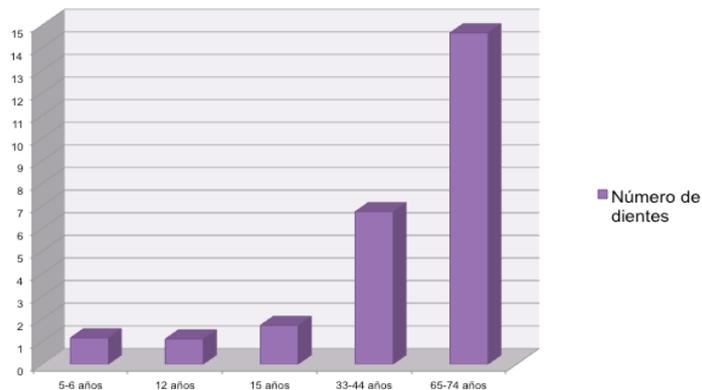


Fig. 4. Número de dientes afectados por caries según la edad. Según la encuesta del Consejo General de dentistas de España 2010.

La extracción dental como resultado de caries, trauma, lesiones endodónticas, defectos del desarrollo o periodontitis avanzadas, origina en muchas ocasiones deformidades óseas de la cresta alveolar, que pueden causar problemas estéticos y funcionales en la rehabilitación del edentulismo, e incluso a un impedimento para la colocación de un implante.

Como solución, se propone por muchos autores la técnica de preservación alveolar o el empleo de injertos o sustitutos óseos que mantengan la altura y anchura de la cresta ósea tras la extracción dental, realizándose un aumento del volumen óseo tras una cirugía, de manera que se pueda realizar una correcta rehabilitación protésica.

2. EL HUESO

El estudio de biomateriales o fármacos destinados a la regeneración del tejido óseo, necesita apoyarse en un conocimiento profundo de la anatomía y biomecánica del hueso, así como de los procesos que dan lugar al crecimiento óseo y a la reparación de fracturas. Estas son las razones por las que describimos importantes conceptos del tejido óseo, que ayudan a comprender su composición, estructura, propiedades y mecanismos de reparación.

2.1 - OSTEOLOGÍA

El tejido óseo representa la parte principal del esqueleto y se caracteriza por poseer una gran dureza y fortaleza asociada al mínimo peso (Fawcett DW, 1995). Las funciones principales de este tejido son las de protección de numerosos órganos y soporte del cuerpo, ejercidas gracias a su resistencia, dureza y elasticidad, así como el control y mantenimiento de estas propiedades realizado por medio de la adaptación a las distintas situaciones biológicas (Bauer TW, 2002), sirviendo a la vez como reservorio de iones calcio, fósforo y otros, albergando también la médula ósea hematopoyética (Mariñoso ML,

1999; Geneser F, 2000;).

Si bien, el hueso se forma a partir del mesénquima, existen dos tipos diferentes de osificación. La primera, denominada “osificación intramembranosa”, se produce a partir de una membrana conectiva, y es la propia de los huesos de la bóveda craneal, el macizo facial, el maxilar inferior y la clavícula. El resto de huesos que conforman el esqueleto se originan a partir de un molde de cartílago que después es sustituido por una matriz ósea, proceso denominado “osificación endocondral”.

El tejido óseo presenta una característica única: la no formación de capa fibrosa cuando es dañado, algo que le diferencia del resto de tejidos. La respuesta del hueso ante cualquier agresión es la regeneración de nuevo tejido y su posterior remodelación en la dirección de las tensiones locales, siendo ocasionalmente suficiente la dinámica del organismo para reconstruir el defecto. Sin embargo, en otros casos, las grandes cantidades de masa ósea perdida pueden exigir la utilización de los injertos de tejido óseo o el uso de un biomaterial.

El hueso es un tejido conectivo mineralizado especializado que contiene principalmente fosfato de calcio (45%), agua (20%) contenida principalmente en la sangre y la médula ósea, y una matriz orgánica (35%) fundamentalmente compuesta de colágeno tipo I, osteonectina, osteocalcina, proteína morfogénica del hueso, proteoglicano óseo y sialoproteína ósea. Su matriz mineral está formada por cristales de hidroxiapatita (HA) $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ de baja cristalinidad (Figura 5) y deficiente en calcio (Ten Cate AR, 1986). El ratio de componentes inorgánicos / orgánicos es de aproximadamente 75 / 25 en peso y 65 / 35 en volumen (LeGeros RZ, 2002).

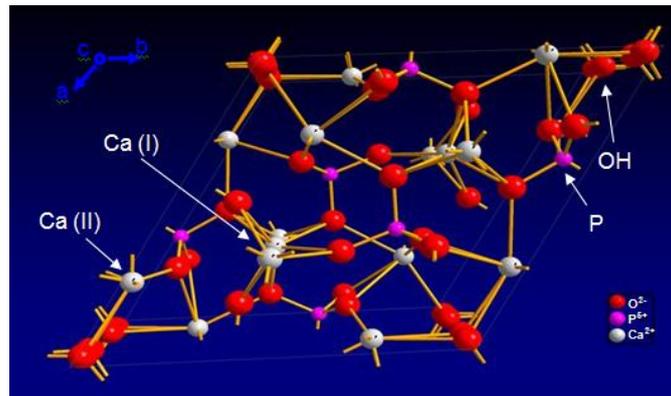


Fig.5. Estructura cristalina de la hidroxiapatita.

(Imagen: Eric M. Rivera-Muñoz. 'Biomedical engineering: frontiers and challenges'. Chap 4: Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization).

2.2 - COMPOSICIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El hueso está compuesto por una matriz ósea que representa alrededor de un 98 % y células específicas que corresponden a un 2 %, estando un 20 % de su volumen constituido por agua. El tejido óseo almacena casi el 99 % del calcio del organismo lo que corresponde aproximadamente a 1.200 g de los cuales sólo 900 mg se encuentran en el líquido extracelular.

La composición y estructura de los huesos están sujetas a influencias hormonales, metabólicas y nutricionales múltiples. El hueso está compuesto por dos partes: una mineral, dura e inorgánica, y otra orgánica, en estrecha relación con la primera. La matriz tiene una función de sostén aunque también cumple tareas metabólicas, estando formada aproximadamente por un 35% de material orgánico (sobre todo fibras colágenas, proteínas óseas y proteoglicanos), y un 65 % de sales inorgánicas.

Matriz orgánica

Está compuesta por fibras de colágeno predominantemente de tipo I, que constituyen aproximadamente el 95% del componente óseo, y se encuentran incluidas en una sustancia fundamental. Cada molécula de colágeno está formada por una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas α , dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, dispuestas sobre un eje común constituyendo una unidad fundamental como podemos observar en la Figura 6.

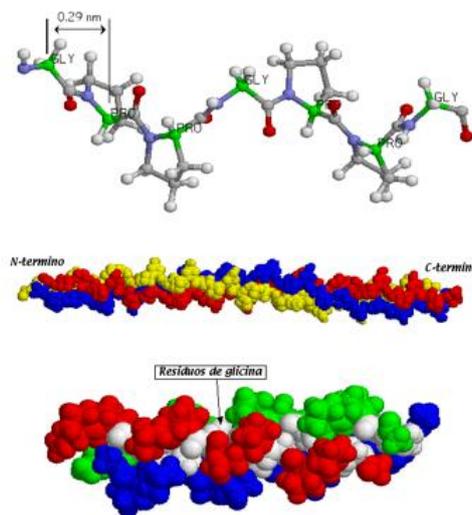


Fig.6. Estructura de la hélice de colágeno.
(Imagen: http://www.biorom.uma.es/contenido/av_biomo/Mat3c.html)

Este colágeno es sintetizado por los osteoblastos y proporciona al hueso propiedades elásticas y de resistencia a la tracción, limita el movimiento de otros componentes del tejido y de la matriz, modula la deposición de cristales de hidroxapatita en el hueso y además tiene una función muy importante sobre la regulación y diferenciación de diversas células y tejidos (Stevens A, 1998).

La sustancia fundamental está formada por proteoglicanos, glicoproteínas y diversas proteínas no colágenas (5%) sintetizadas por los osteoblastos (la osteocalcina, osteopontina, osteonectina y sialoproteínas) (Barrère F, 2006).

Las funciones de estas proteínas aún no están bien definidas, pero se piensa que participan en la regulación del depósito del componente mineral del hueso, en el recambio y en la actividad celular ósea.

La **osteocalcina** presenta la capacidad de unirse al calcio y normalmente está implicada en la inhibición de la formación ósea mediante el retraso de la nucleación de los cristales de hidroxapatita. Es empleada como marcador del recambio óseo, al ser liberada desde la matriz por la actividad osteoclástica y la síntesis osteoblástica (Clarke B, 2008).

La **osteopontina** es una glicoproteína ácida y fosforilada presente en varios tejidos. Actúa como un potente inhibidor de la formación de hidroxapatita mediante la inhibición del crecimiento cristalino (Hunter GK, 1996) y al igual que la sialoproteína, presenta la secuencia RGD que promueve la adhesión celular y está involucrada en la regulación de la movilidad de osteoclastos en los procesos de reabsorción ósea.

La **osteonectina**, glicoproteína sintetizada por los osteoblastos, que constituye el 2% del total del componente proteico del hueso en desarrollo, provoca el aumento del número de osteoblastos y la proliferación y mineralización de la matriz. Está unida a las células óseas mediante integrinas y además puede interactuar tanto con las fibras de colágeno como con las sales inorgánicas, ya que presenta la capacidad de unirse al calcio (Boskey AL, 1989).

La **sialoproteína ósea**, es una sialoglicoproteína ácida que constituye el 15% de las proteínas no colágenas del hueso y está involucrada en la mineralización y el remodelado óseo. Está presente en la mayoría de los tipos celulares del hueso, cartílago y dientes. Media en la unión de osteoblasto y

osteoclastos en la matriz ósea durante el proceso de remodelación ya que presenta la secuencia proteica RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), que es el mínimo requisito estructural para la adhesión celular en células de mamíferos (Wuttke M, 2001).

La enzima ósea más importante es la **fosfatasa alcalina**, que puede encontrarse en el hueso tanto unida a la superficie celular de los osteoblastos, como libre dentro de la matriz mineralizada.

Matriz mineralizada

La composición del hueso es fundamentalmente mineral, hasta en un 50-70%, representando la matriz orgánica un 20-40%, el agua un 5-10% y los lípidos menos de un 3%. Los componentes minerales mayoritarios de la matriz del hueso son el calcio y el fósforo, en su mayoría en forma de cristales de hidroxiapatita, pero también existen otros iones como el carbonato, el citrato, el magnesio, el potasio y el sodio. Los cristales óseos de HA, en comparación con los cristales geológicos, son más pequeños, presentan un menor grado de cristalización y sustitución de grupos carbonato, características que las hacen más solubles, manteniendo así el metabolismo mineral.

La rigidez mecánica y la gran resistencia a la compresión y a la tracción del hueso se debe a esta parte mineral.

Inicialmente la mineralización del hueso comienza en el colágeno, donde se depositan los cristales de hidroxiapatita en intervalos regulares. La maduración de la matriz está asociada a la expresión de la fosfatasa alcalina y algunas de las proteínas no colágenas, como la osteocalcina y sialoproteína ósea. Estas proteínas fosforiladas se unen al calcio y al fosfato, provocando

centros de nucleación y formando cristales de fosfato de calcio. De esta forma, estas proteínas ayudan a regular el depósito mineral mediante la regulación de la cantidad y tamaño de los cristales de hidroxiapatita formados (Barrère F, 2006).

Algunos autores han descrito que, además de la mineralización mediada por las proteínas, los condrocitos y osteoblastos sintetizan unas vesículas pequeñas de matriz extracelular que actúan como microambientes protegidos, donde las concentraciones de calcio y fosfato pueden aumentar hasta el punto de provocar la formación de cristales. La HA no es capaz de precipitar espontáneamente, pero estas vesículas contienen un centro de nucleación compuesto por proteínas y complejos de fosfolípidos, calcio y fosfato inorgánico, que es suficiente para provocar la precipitación de cristales de HA. Dentro de los promotores de la nucleación mineral están la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) y la sialoproteína ósea (Hunter GK, 1996; Clarke B, 2008).

La vitamina D tiene un papel indirecto sobre la estimulación de la mineralización de la matriz ósea desmineralizada. Después de la absorción o producción de la vitamina D por la piel, el hígado sintetiza 25-Hidroxivitamina D y los riñones seguidamente producen 1,25-dihidroxivitamina D (1,25-(OH)₂D) que es activa biológicamente, siendo responsable del mantenimiento de concentraciones adecuadas de calcio y fosfato en el suero, permitiendo una mineralización pasiva de la matriz no mineralizada del hueso. Esta acción la realiza mediante la estimulación de la absorción intestinal de calcio y fosfato. Además el 1,25-(OH)₂D en suero promueve la diferenciación de osteoblastos y estimula la expresión de fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteonectina,

osteoprotegerina (OPG) y una variedad de citocinas por los osteoblastos (Clarke B,2008).

2.3 - CÉLULAS ÓSEAS

Son células de linaje mesenquimal que se encuentran en el interior del periostio, endostio y médula ósea.

Son las responsables de producir, mantener y modificar la estructura del tejido óseo. El hueso posee una capa celular continua que se distribuye por todas las superficies de la matriz ósea, la que proviene de dos líneas diferentes, el linaje osteoblástico, del que forman parte los osteoblastos, los osteocitos y las células de revestimiento, y el linaje osteoclástico de origen monocitario, conformado por los osteoclastos (Chavassieux P, 2003).

2.3.1 – Osteoblastos

Son células especializadas de origen mesenquimal responsables de la formación de la matriz osteoide y de la coordinación del proceso de reabsorción y formación ósea. Además secretan hormonas como la fosfatasa alcalina y la hormona paratiroidea, importantes en el metabolismo óseo (Fawcett DW, 1995) (Figura 7).

Su forma habitual es cúbica y cuando se encuentran en actividad sintetizadora su citoplasma se vuelve basófilo debido a la presencia de ácido ribonucleico (ARN), pero cuando están en reposo son planas y su basofilia disminuye. Derivan de los preosteoblastos, los que a su vez provienen de

células precursoras pluripotenciales que también son capaces de diferenciarse en condrocitos, fibroblastos, miocitos y adipocitos. Su citoplasma presenta un retículo endoplásmico rugoso abundante, un aparato de Golgi muy desarrollado y numerosas mitocondrias, que le permiten sintetizar la fracción orgánica de la matriz ósea, es decir, las fibras de colágeno tipo I, las proteínas no colágenas y los factores de crecimiento. (Mackie EJ, 2003)

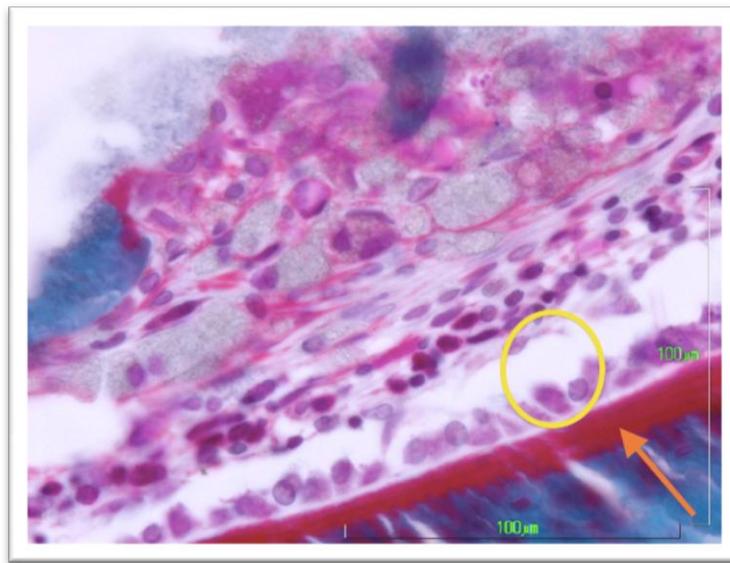


Fig. 7. Imagen histológica de osteoblastos (círculo amarillo ) y línea de osteoide (flecha naranja )

Estas células contienen grandes cantidades de fosfatasa alcalina, enzima que se encuentra en su membrana plasmática y parece ser la encargada de regular la composición de la matriz ósea extracelular, ya sea inhibiendo o favoreciendo el depósito de sales minerales, por lo que desempeñan un importante papel en el control de la mineralización ósea.

Los osteoblastos se disponen en las superficies donde se produce la formación activa de hueso, constituyendo grupos compactos de una capa de espesor con su núcleo ubicado en el extremo más alejado del área donde se asientan. En la superficie externa de los huesos se sitúan en la capa más

interna del periostio y en la faz interna se encuentran entre el tejido y la medula ósea. Funcionalmente, no existe diferencia entre los osteoblastos periósticos y los endósticos, pero la actividad de los primeros origina cambios en la morfología del hueso, mientras que la de los segundos genera modificaciones en la densidad de la masa ósea.

Estas células también participan en la primera fase de la reabsorción ósea, dado que poseen receptores de superficie para factores endocrinos y paracrinos que los inducen a producir una colagenasa que deja expuesta la matriz ósea mineralizada y también liberan factores que atraen a los osteoclastos. El mecanismo de acoplamiento que liga la proliferación osteoblástica, y la formación de hueso con las lagunas de reabsorción osteoclástica es comandado por diversos factores locales de crecimiento.

Los osteoblastos establecen contacto con los osteocitos y las células osteoprogenitoras mediante uniones comunicantes. Se consideran células con diferenciación terminal, es decir, incapaces de dividirse, aunque sí conservan en parte la capacidad de proliferar. Al final de la fase de formación del tejido óseo, los osteoblastos se pueden convertir en osteocitos o células de revestimiento (Mackie EJ, 2003).

2.3.2 – Osteocitos

Constituyen el componente celular más abundante del tejido óseo, ya que el 90 a 95% de las células del hueso adulto son de este tipo, mientras que los osteoblastos forman menos del 5% y los osteoclastos menos del 1%. Los osteocitos son viables durante años, incluso décadas, mientras que los

osteoblastos viven unas semanas y los osteoclastos días.

Son células óseas maduras que se encuentran en el interior de una laguna osteocitaria rodeada por matriz extracelular calcificada. Todos los osteocitos se encuentran conectados entre sí mediante prolongaciones que se extienden por los canalículos de la matriz vecina, de forma que son sensibles a estímulos externos y a los esfuerzos a los que se somete al hueso (Fawcett DW, 1995) (Figura 8).



Fig. 8. Imagen histológica de un osteocito (flecha naranja ➔).

De aspecto estrellado, se encuentran integradas dentro de la matriz ósea mineralizada correspondiendo a osteoblastos que han experimentado una transformación terminal perdiendo gran parte de sus organelos. Los osteocitos se sitúan en espacios o cavidades elipsoidales denominados lagunas osteocitarias y mantienen contacto entre sí y con las demás células, a través de los conductos calcóforos.

Cada osteocito emite unos 50 procesos o anastomosis celulares que se encuentran envueltos por un fluido rico en proteoglicanos, lo que les permite una participación activa en la transmisión de señales mecanosensitivas y en el intercambio con su microambiente. Cuando los osteocitos quedan incorporados en la matriz ósea, reducen su tamaño en alrededor de un 30% y posteriormente continúan disminuyendo con la edad.

Además de la unión de los osteocitos mediante los canalículos, también se produce a través de uniones tipo gap, igualmente presentes en las comunicaciones entre osteocitos y osteoblastos (Nakahama K, 2010). Doty, en 1981 fue el primero en demostrar uniones gap entre células óseas *in vivo* (Doty SB, 1981). Estas uniones están presentes entre todos los tipos celulares del hueso, pero son particularmente abundantes entre osteoblastos y osteocitos, en los extremos de las prolongaciones de los osteocitos. Las uniones tipo gap son un tipo de interacción directa entre célula y célula, que forman canales transmembrana y permiten la comunicación de los citoplasmas entre las células, permitiendo una difusión de iones, metabolitos y pequeñas moléculas de señalización de una célula a otra célula (Civitelli R, 2008).

Los osteocitos presentan diferentes funciones: participan de modo activo en el recambio óseo, realizan un intercambio de iones mediante su amplia red de canalículos que facilita el contacto entre la superficie celular y la matriz, actúan como células mecano-sensitivas y juegan un papel importante en la adaptación funcional del hueso (Aarden EM, 1994).

2.3.3 – Osteoclastos

Son células móviles, gigantes y multinucleadas (pueden presentar desde 6 a 50 núcleos), que derivan de los precursores de la línea mieloide/monocito que circula por la sangre después de su formación en la médula ósea.

Alojadas en las lagunas de Howship, las cuales se deben a la acción erosiva de la célula sobre el hueso subyacente, su actividad consiste en reabsorber matriz ósea regulada por los osteoblastos (Fawcett DW, 1995) (Figura 9).

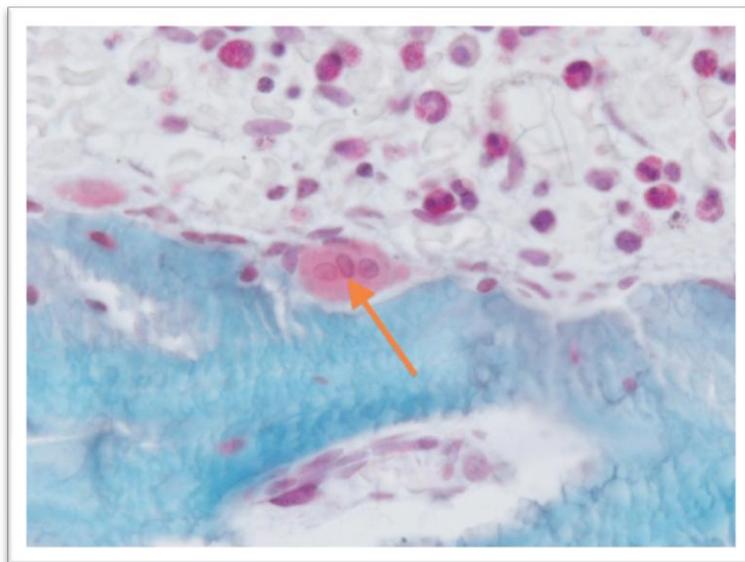


Fig.9. Imagen histológica de un osteoclasto (flecha naranja ➔).

Los osteoclastos al adherirse a la superficie de la pared ósea empiezan a generar prolongaciones irregulares las cuales, a su vez, se subdividen formando terminaciones en borde estriado o en cepillo. Además de permitir el aumento de la superficie celular, pueden formar escotaduras cuya función sería la de retener calcio. En estas prolongaciones, también, se han podido observar

microfibrillas de colágeno en desintegración (Mundy GR,1993).

Los osteoclastos reabsorben hueso durante los procesos normales de remodelado y provocan una pérdida de masa ósea en condiciones patológicas donde su actividad de reabsorción está aumentada.

La reabsorción ósea es necesaria en muchos procesos esqueléticos. Es un proceso obligatorio durante el crecimiento óseo, erupción de los dientes y curación de las fracturas, además de ser necesaria para el mantenimiento de un nivel adecuado de calcio en la sangre.

Los osteoclastos han desarrollado una maquinaria eficiente para disolver los cristales de HA y degradar la materia orgánica rica en fibras de colágeno. El proceso de reabsorción requiere actividades celulares como son la migración de los osteoclastos al lugar de reabsorción, su unión al hueso, la polarización y formación de los dominios de membrana, la disolución de la HA, la degradación de la matriz orgánica y la eliminación de los productos de degradación de la laguna de reabsorción.

Previamente a la reabsorción, los precursores de osteoclastos han tenido que sufrir procesos de diferenciación y mecanismos celulares de tal forma que se fusionan los precursores mononucleares para formar el osteoclasto multinuclear maduro.

Cuando se inicia la reabsorción, los osteoclastos se polarizan, apareciendo tres dominios de membrana diferentes: un borde festoneado, una zona de sellado y un dominio funcional secretor. Simultáneamente, el citoesqueleto sufre una pronunciada reorganización. Durante este proceso, el citoesqueleto de actina forma un anillo de unión en la zona sellante, que permite una unión fuerte a la matriz ósea, de forma que deja un espacio

cerrado entre el borde festoneado de los osteoclastos y la superficie ósea, denominado laguna de reabsorción. En esta laguna el osteoclasto va a secretar protones y proteasas encargadas de la degradación (Väänänen HK, 2000).

2.4 - ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL HUESO

Los huesos adultos, ya sean compactos o esponjosos, son histológicamente idénticos puesto que están compuestos por capas microscópicas o laminillas, que en el hueso compacto se encuentran estrechamente empaquetadas. Se reconocen tres tipos de laminillas: circunferenciales, concéntricas e intersticiales. Las laminillas circunferenciales rodean todo el hueso adulto, formando su perímetro y las concéntricas conforman gran parte del hueso compacto y forman la unidad metabólica básica del hueso compacto, llamada osteona (Figura 10).

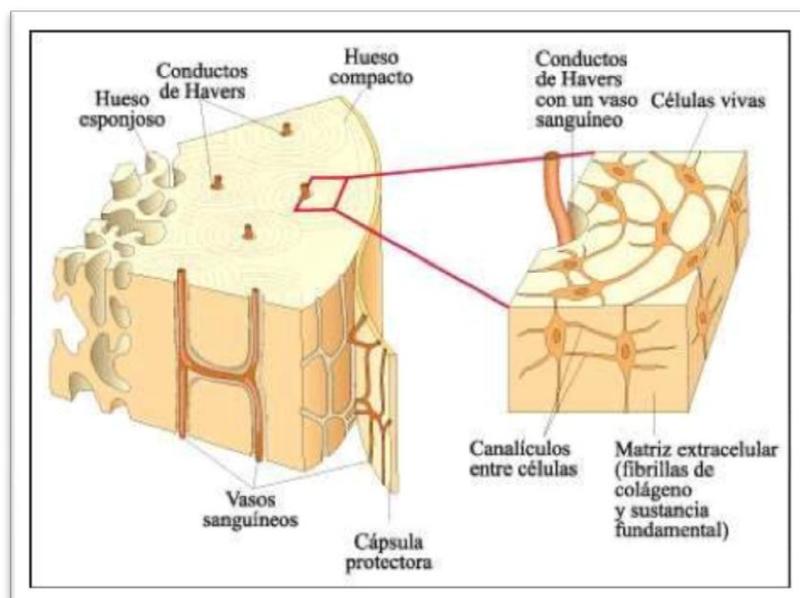


Fig.10. Esquema de la organización estructural del hueso.

La osteona es un cilindro de hueso, generalmente orientado a lo largo del eje mayor que tiene un diámetro de 200 μm y una longitud de 1 a 2 cm. Posee un eje neurovascular central, denominado canal haversiano, que está recubierto por osteoblastos y células osteoprogenitoras. Los conductos de Havers adyacentes se encuentran interconectados por los conductos de Volkman, que contienen vasos sanguíneos, creando de esta manera una rica red vascular a través del hueso compacto. Entremezcladas entre las laminillas concéntricas adyacentes, y llenando los espacios que hay entre ellas, se encuentran las laminillas intersticiales, que son fragmentos de laminillas concéntricas preexistentes, que adoptan multitud de formas (Ten Cate AR, 1986).

Rodeando el perímetro del hueso compacto hay una membrana de tejido conectivo denso osteogénico que sirve de revestimiento muy sensible, dura, fibrosa y bien vascularizada, llamada periostio.

Este periostio posee 2 capas: una externa muy vascularizada y una interna que está revestida por osteoblastos siendo la responsable del crecimiento transversal del hueso (Baron R, 1993).

La capa del periostio más cercana a la superficie ósea es más celular, mientras que el periostio externo es más fibroso, originándose en esta capa externa, las fibras de Sharpey que penetran en la capa celular del periostio extendiéndose dentro de las laminillas circunferenciales.

La superficie interna del hueso compacto y la superficie del hueso esponjoso se recubren por el endostio, que es una delgada capa de tejido conectivo rico en células que separa físicamente la superficie del hueso de la médula ósea ubicada en su interior (Ten Cate AR, 1986). Ambas estructuras,

periestio y endostio, presentan capacidad osteogénica (Hert J, 1972; Marie PJ, 1982; Jee Ws, 1993).

2.4.1 – Estructura global ósea

Los huesos del esqueleto presentan diferentes formas y tamaños que se relacionan con su función específica. Respecto a su estructura global, el tejido óseo está constituido por diferentes fases sólidas y líquidas, que le otorgan la característica de ser junto a la dentina y el esmalte de los dientes, los únicos tejidos duros del organismo (Buckwalter JA, 1996)

2.4.2 – Estructura macroscópica ósea

Los huesos poseen una estructura macroscópica común y están constituidos por dos tipos de tejido óseo: esponjoso o trabecular, que representa alrededor del 20% del volumen total del hueso, el que se encuentra en continuidad con el tejido óseo cortical o compacto, que corresponde a aproximadamente al 80 %.

2.4.3 – Estructura microscópica ósea

Considerando su estructura microscópica se puede distinguir tres tipos diferentes de tejido óseo.

2.4.3.1 – Hueso plexiforme

Corresponde a un hueso inmaduro que se encuentra en el tejido óseo

esponjoso y cortical de los individuos en crecimiento y que durante la maduración es sustituido gradualmente por hueso laminar desde los 14 ó 16 años. Está ausente en el esqueleto adulto, aunque se puede formar cuando se acelera la producción de matriz ósea, como ocurre en los callos de fractura y tumores óseos.

El hueso plexiforme carece de una relación estable entre el contenido mineral y el colágeno, de tal manera que su densidad mineral es muy variable, a diferencia del hueso haversiano y el laminar, que se describen a continuación y que mantienen una relación fija entre estos elementos (Proubasta I, 1999).

2.4.3.2 – Hueso haversiano

Se encuentra constituido por un conjunto de láminas concéntricas, denominadas osteonas o sistemas de Havers. Las osteonas están conformadas por alrededor de 4 a 20 láminas óseas, entre las cuales se localizan los osteocitos. A nivel de la unión entre las osteonas vecinas se encuentra una delgada línea de cementación, compuesta principalmente por sustancia fundamental calcificada.

La microestructura de tipo osteonal o haversiana está presente en el hueso cortical maduro y se forma como resultado de la invasión vascular del tejido óseo ya existente, por lo que posee una menor resistencia mecánica y un sistema circulatorio menos eficiente que el del hueso laminar (Proubasta I, 1999).

2.4.3.3 – Hueso laminar

Las trabéculas del hueso esponjoso y los sistemas circunferenciales del hueso compacto están compuestos por una serie de láminas óseas paralelas entre sí, que tienen un espesor que oscila entre 3 y 7 μm y están formadas por fibras colágenas dispuestas paralelamente unas con otras, aunque presentan una orientación distinta respecto de las fibras de láminas vecinas. En la interfaz entre las láminas óseas se encuentran las cavidades osteocitarias con sus correspondientes células, cuya nutrición depende de los canalículos existentes en la matriz ósea, que permiten el intercambio de moléculas e iones entre los capilares sanguíneos y los osteocitos.

Las láminas del hueso laminar y las osteonas del hueso haversiano son diferentes configuraciones geométricas del mismo material, pues en ambas cada punto del tejido se sitúa, aproximadamente, a unos 100 μm de un vaso sanguíneo.

Tanto el hueso laminar como el haversiano se encuentran simultáneamente en el tejido óseo humano. De esta manera, las diáfisis de los huesos largos están conformadas por los sistemas circunferenciales externos e internos que corresponden a hueso laminar, entre los cuales se encuentran el sistema de Havers constituido por hueso osteonal y el sistema intermedio que procede de restos de osteonas que fueron parcialmente destruidas durante el crecimiento óseo (Proubasta I, 1999).

2.5 - TIPOS DE TEJIDO ÓSEO

Existen dos tipos de tejido óseo bien diferenciados presentes en todos los huesos del organismo; el hueso compacto y el hueso esponjoso o trabecular (Ten Cate AR, 1986; Fawcett DW, 1995; LeGeros RZ, 2002,) (Figura 11).



Fig.11. Imagen macroscópica que muestra el hueso compacto cortical en la parte externa y el retículo de trabéculas del hueso esponjoso en su interior.
(Imagen: <http://www.tienda.osteiberica.com/Bloque-de-hueso-Iliaca-Bicortical-20x-40-mm>)

- El tejido **óseo compacto o hueso cortical**, forma una masa compacta sin espacios visibles, y presenta una mayor complejidad morfofuncional. Se sitúa en la zona externa de los huesos largos, en su parte diafisaria, y se adelgaza hacia los extremos. Se trata de un tejido muy organizado que supone el 80% del peso de los huesos y que les otorga su resistencia por poseer un menor porcentaje de materia orgánica. El tamaño de los poros en este tipo de hueso varía entre 1 y 100 μm (Figura 12).

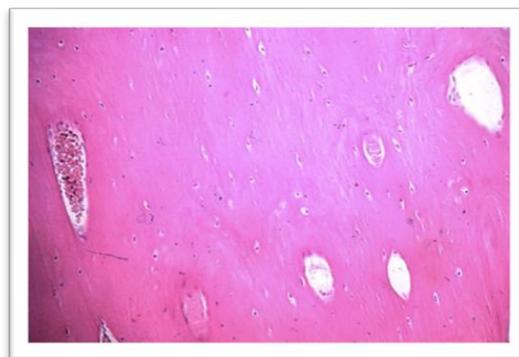


Fig. 12. Imagen histológica de hueso cortical.

- El tejido **óseo esponjoso o hueso trabecular**, está compuesto por finos listones u hojas, las trabéculas, que se orientan de forma paralela a las líneas de fuerza, formando un delicado entramado que sirve de soporte y alberga a la médula ósea. Este tejido óseo trabecular se sitúa en la zona interna del hueso, sobre todo en los extremos de éste, llamado epífisis. Se trata de un tejido de tipo reticular, con espacios interconectados por los vasos sanguíneos y que está en contacto con la médula ósea. Supone el 20% del peso de la masa ósea, siendo su volumen diez veces mayor que el del hueso compacto. El tamaño de los poros en el hueso esponjoso varía entre 200 y 400 μm y su extensión y sus interconexiones son factores importantes que afectan a la difusión de los nutrientes, la adhesión, migración y expresión celular y al crecimiento tisular, necesarios para la formación ósea, la reparación o la regeneración (Figura 13).

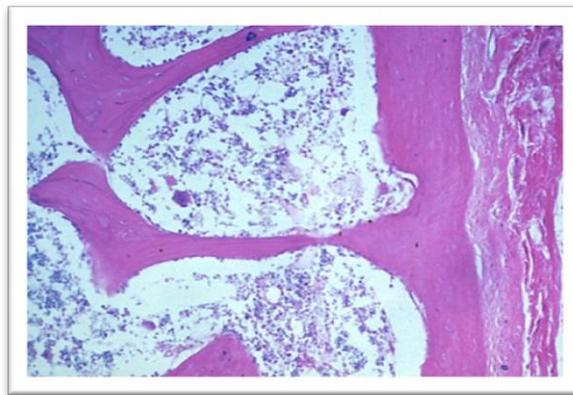


Fig. 13. Imagen histológica de hueso esponjoso.

2.6 - FUNCIONES DEL HUESO

El hueso es el depósito de calcio y fósforo del cuerpo. En el cuerpo hay alrededor de 1,2 Kg de calcio y aproximadamente 1 Kg de fósforo. Apenas el 1% del calcio se encuentra en tejidos blandos y fluidos fisiológicos. La cantidad de calcio en sangre y fluidos permanece constante mediante un equilibrio que se establece entre los huesos y la sangre. El 85% del fósforo se encuentra en los dientes y en los huesos, encontrándose únicamente un 0,1% del fósforo en el torrente sanguíneo (Fawcett DW, 1995).

2.7 – ORIGEN EMBRIOLÓGICO DEL HUESO

El hueso se forma de tres maneras diferentes: endocondral, intramembranosa y sutural. La osificación endocondral tiene lugar sobre un modelo de matriz cartilaginosa, que precede inmediatamente al hueso. La osificación intramembranosa ocurre de manera directa dentro del tejido conectivo. Finalmente, la formación de hueso sutural es un caso especial de osificación intramembranosa en la cual el hueso se ha formado a lo largo de los bordes de las suturas (Ten Cate AR, 1986).

El hueso experimenta un crecimiento longitudinal y radial, denominado modelación, que ocurre durante el crecimiento y el desarrollo en la infancia y la adolescencia. Por otro lado, además sufre procesos de remodelación durante la vida. El crecimiento longitudinal se produce en las placas de crecimiento, donde el cartílago prolifera en la epífisis y metáfisis de los huesos largos, antes de que se produzca la mineralización y se forme el nuevo hueso primario.

El tipo de crecimiento que tiene lugar a lo largo de todos los procesos de remodelación y formación de tejido óseo en los individuos adultos es el crecimiento intramembranoso. Éste es un crecimiento en el cual la mineralización se va produciendo por la sucesiva cristalización de la hidroxiapatita en el interior de una matriz de colágeno. En un adulto, se renueva alrededor de un 5% del hueso compacto y el 20% del hueso esponjoso cada año (Ten Cate AR, 1986), de acuerdo con las siguientes leyes (Allegrini S, 2008):

a) - Ley de Wolff de adaptabilidad mecánica del hueso (1869): “Cada cambio en la forma y la función del hueso o sólo de su función, es seguida por ciertos cambios definidos en su arquitectura interna e igualmente alteraciones secundarias definidas en su conformación externa de acuerdo con leyes matemáticas” (Goodship AE, 1979). El hueso es un tejido complejo y en constante cambio capaz de autorrepararse y adaptarse a cargas nuevas. Los estímulos mecánicos de presión y tensión mediados por la presencia de los elementos dentales permiten el mantenimiento de la forma y la densidad del hueso. Este mecanismo de adaptación reduce el riesgo de fracturas y mantiene las características morfológicas y funcionales del esqueleto (Bauer TW, 2002).

b) - Ley de la transformación del hueso: “El hueso se crea donde es necesario y se reabsorbe donde ya no lo es”. (Esto es lo que ocurre ante la pérdida dentaria en el proceso alveolar maxilar y mandibular) (Allegrini S, 2008).

Así, la estimulación biomecánica es quien determina que el hueso crezca o sea reabsorbido, de manera que ante una sobrepresión se da una activación osteoblástica y un crecimiento a favor de tensión, y ante una falta de presión se da una activación osteoclástica y una reabsorción por falta de tensión. En el hueso cortical, la remodelación se produce desde el interior del hueso; en el hueso esponjoso, por el contrario, la remodelación se produce a través de la superficie exterior de las trabéculas.

Existen dudas sobre la existencia de marcadores de la remodelación ósea. Algunos autores, describen que la remodelación está marcada por el reemplazamiento de hueso microdañado por fatiga y que no es necesaria la presencia de una sustancia que remodele todo el esqueleto (Parfitt AM, 2002).

Además, el hueso tiene sus propios mecanismos de reparación que se ponen en marcha, por ejemplo, en los casos de fracturas. Sin embargo, por encima de un determinado tamaño en el defecto, el proceso natural de consolidación y reparación de una fractura ósea fracasa y el hueso no es capaz de cubrir dicha merma. El tamaño crítico del defecto, por encima del cual no funciona el mecanismo de reparación natural va a depender del sujeto y del metabolismo del mismo.

Del mismo modo los modelos animales experimentales presentan un rango de defecto crítico, a partir del cual sin ayuda de otras sustancias no se produce espontáneamente la regeneración ósea.

En el caso concreto de los conejos de Nueva Zelanda albinos, el defecto crítico en extremidad es de 2 a 5 mm de diámetro (Monjo M, 2010; Sarahrudi K, 2008).

2.8 - REMODELACIÓN ÓSEA

El tejido óseo es uno de los más dinámicos del organismo y está sometido a una serie de procesos de: crecimiento, modelado, remodelado y reparación. De una forma esquemática podemos explicar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la remodelación ósea, mediante 5 pasos consecutivos, que son: la activación, la reabsorción, el cambio, la formación y la terminación (Raggatt LJ, 2010).

Activación

El proceso de remodelación comienza en la superficie de un área pequeña de hueso quiescente, donde la membrana endóstica es digerida por enzimas liberadas por las células de revestimiento óseo. Asimismo, en opinión de Martin (Martin RB, 2000) estas células son responsables de la activación de las Unidades Básicas Multicelulares (UBMs) en respuesta a señales provenientes de osteocitos u hormonas. Los osteoclastos no reabsorben hueso si hay osteoide, es decir materia orgánica. De esta forma, son las células de revestimiento, que sufren cambios morfológicos, las que se encargan de eliminar la matriz orgánica y dejar al descubierto el mineral óseo para que actúen los osteoclastos (Chambers TJ, 1985). Posteriormente, se produce una neoangiogénesis y la liberación o reclutamiento de precursores de osteoclastos desde el torrente circulatorio a la superficie ósea (Férrandez-Tresguerres I, 2006).

Las señales que hacen que se produzca el proceso de remodelación pueden ser, porque se produzcan microfracturas, que conllevan a la apoptosis

de osteocitos y la consiguiente activación de la osteoclastogénesis; o por cambios sistémicos de la homeostasis, donde intervienen las señales hormonales.

Reabsorción

Los osteoblastos expresan citoquinas, como CSF-1, RANKL y OPG, modulado por la acción de la Parathormona (PTH). Las dos primeras actúan de modo coordinado, aumentando su concentración en respuesta a la PTH, y por lo tanto activando a los osteoclastos. Mientras que la expresión de OPG se ve reducida, activando también a los osteoclastos. Por otra parte, los osteoblastos expresan, por acción de PTH y/o estímulos mecánicos, las Matriz Metaloproteínas (MMPs), que son las encargadas de degradar el osteoide - matriz no mineralizada-, de la superficie ósea, dejando libres espacios de unión RGD relacionados con las integrinas $\alpha\beta3$, de osteoclastos en la matriz mineralizada. De este modo, los osteoclastos se unen a la matriz ósea mediante la interacción con las integrinas que presentan la secuencia RGD, secuencias que se encuentran en proteínas de la matriz como la osteopontina y sialoproteína, que fueron depositadas por los osteoblastos durante el ciclo previo de formación. De este modo comienza la reabsorción mediada por los osteoclastos.

Cambio

Seguidamente a la reabsorción mediada por osteoclastos, las lagunas de Howship quedan cubiertas con matriz de colágeno desmineralizada sin digerir. En un principio se pensó que unas células mononucleares eran las encargadas

de eliminar estos remanentes de colágeno y preparar la superficie para la consecutiva formación ósea mediada por los osteoblastos. Estudios posteriores han concluido que estas células pertenecen a la línea celular de los osteoblastos, concretamente se trata de células de revestimiento (Henriksen K, 2009).

Formación

Durante el proceso de reabsorción, se liberan moléculas embebidas en la matriz ósea, como IGF-I, IGF-II y TGF- β . Este último activa el reclutamiento de células mesenquimales al lugar de reabsorción.

Por otro lado, los osteocitos maduros, producen de forma basal esclerostina, que es una molécula antagonista de las Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMPs). La inhibición en la expresión de esclerostina inicia la formación ósea mediada por los osteoblastos e inhibe la reabsorción, favoreciendo un aumento de la masa ósea. Además la inhibición de la esclerostina activa la ruta de señalización de Wnt, una ruta que regula la masa ósea y la función de las células óseas y que provoca la diferenciación, proliferación y síntesis de matriz ósea por los osteoblastos (Bennett CN, 2005; Gaur T, 2005; Kogianni G, 2007).

Terminación

Cuando una cantidad igual de hueso reabsorbido ha sido reemplazado, el ciclo de remodelación concluye. Al completarse la formación del hueso es completa, la secreción de esclerostina por los nuevos osteocitos formados, embebidos en la matriz durante la formación de hueso, inhibe la ruta Wnt y

provoca la terminación del ciclo de remodelación, entrando en un estado de reposo. Además, las células de revestimiento vuelven a cubrir la superficie ósea de nuevo. De esta forma el ambiente de la superficie ósea en reposo se restablece y mantiene hasta que el próximo ciclo de remodelación sea activado.

Una vez mineralizada la matriz ósea sintetizada, los osteoblastos pueden sufrir apoptosis, revertir a células de revestimiento o pueden quedar atrapados en la matriz mineralizada, diferenciándose a osteocitos.

2.9 - REPARACIÓN ÓSEA

El tejido óseo destaca de otros tejidos, entre otras características, por su poder de regeneración. Cuando ocurre una lesión o fractura en el tejido óseo surgen una serie de fenómenos que preparan al hueso para su reparación.

Las fases iniciales de la reparación de la fractura ocurren a partir de los tejidos blandos. Las células reparadoras de la fractura son células osteogénicas que proliferan a partir de la capa profunda del periostio, formando un callo de fractura externo; y en menor medida las que proliferan a partir del endostio, formando el callo interno. Cuando el periostio ha sufrido un gran desgarro, las células reparadoras deben diferenciarse a partir de células mesenquimatosas indiferenciadas de los tejidos blandos (Burchardt H, 1983).

Durante este proceso, se observa un crecimiento desmesurado del tejido con capacidad osteogénica, formando una masa gruesa que se corresponde con el callo de fractura. Las células de este tejido, se diferenciarán en osteoblastos que a su vez sintetizarán hueso. Este proceso ocurre en los extremos de la fractura y continúa hasta la fusión. En el centro de la fractura

(foco de fractura), donde el aporte sanguíneo es más escaso, se forma el nuevo hueso a partir de cartílago. Las células osteoprogenitoras se diferencian en condroblastos, que formaran cartílago y posteriormente, hueso primitivo.

3 ~ REGENERACIÓN DE LOS DEFECTOS ÓSEOS

3.1 - DEFECTOS ÓSEOS DE LOS MAXILARES

El defecto de tejido óseo en los territorios maxilares es uno de los mayores problemas a los que se enfrentan los profesionales de la salud dental en aquellos casos en los que se elige como opción terapéutica restauradora la colocación de implantes osteointegrados o en los que es necesario el tratamiento de defectos óseos ocasionados por traumatismos, enfermedades congénitas, infecciones o tumores.

Los defectos óseos de los maxilares obedecen a causas muy variadas, como pueden ser las resecciones quirúrgicas, las pérdidas traumáticas, la dificultad de osificación en edades avanzadas, las enfermedades periodontales y peri-implantarias, las malformaciones congénitas, las lesiones tumorales, etc. Estos defectos pueden dificultar la fase quirúrgica del tratamiento implantológico al encontrar un insuficiente volumen óseo para la adecuada colocación de los implantes dentales (Lekovic V, 1997; Triplet RG, 2000; Bascones A, 2001; Zijderveld SA, 2005).

Entre las causas de pérdida ósea, son muy frecuentes los defectos óseos maxilares causados por la reabsorción alveolar post-extracción; éste es un fenómeno fisiológico que ocurre tras la extracción dentaria por el cual la cresta

ósea alveolar ve disminuida su altura y su anchura original, en una cantidad que puede variar entre distintas localizaciones e individuos (Palti A, 2002; Darby I, 2008). La pérdida de la dentición natural da lugar a una reducción de la estimulación física del hueso alveolar, produciéndose una reabsorción ósea irreversible, crónica y acumulativa. Se han encontrado grandes diferencias entre el maxilar y la mandíbula, siendo la tasa de reabsorción cuatro veces mayor en la mandíbula que en el maxilar (Allegrini S, 2008).

El mantenimiento del tejido óseo de los maxilares tras cualquier cirugía oral es un requisito fundamental para que la reposición protética mediante implantes dentales tenga un resultado óptimo. No obstante, una reabsorción variable de las tablas óseas suele ocurrir tras la exodoncia para generar aposición de hueso en el lecho alveolar. En el maxilar superior se desarrolla un proceso de remodelación alveolar con una progresiva atrofia ósea en sentido vertical y vestibulo-palatina que se incrementa con la acción de la prótesis removible. La cicatrización del alveolo y su progresiva regeneración ósea suele durar entre 4-6 semanas, aunque la remodelación definitiva puede llegar hasta los 4 meses (Amler LH, 1969).

Desde un punto de vista morfológico, a los 6-12 meses tras la pérdida dental, existe una reducción de 5-7 mm en sentido horizontal o vestibulo lingual, lo que representa casi el 50% de la anchura alveolar inicial. A estos cambios horizontales se acompañan modificaciones en la altura o apico-coronales con una reducción de 2 a 4,5 mm (Johnson K, 1969).

En los humanos el grado de reducción de la altura y anchura del reborde alveolar es máxima en los primeros 3 meses después de la extracción, y tiende a estabilizarse después de los 6-12 meses (Atwood DA, 1971). Esta

remodelación ósea es consecuencia del traumatismo quirúrgico que supone la exodoncia, al estimular la actividad osteoclástica con la consecuente reabsorción alveolar (Jahangari L, 1998) que se produce en las regiones adyacentes al traumatismo (Shimizu M, 1998).

El fenómeno más preocupante - que puede objetivarse en la práctica clínica diaria en los casos de pacientes de larga evolución edéntula -, es la reducción del reborde residual (RRR) implicando esto que mantiene cierta actividad catalítica durante largos periodos (Jahangari L, 1998).

La RRR complica el tratamiento reposicionador mediante prótesis, limitando la función y la estética sobre todo cuando se opta por una rehabilitación implanto-protésica. Por ello se ha propuesto el uso único o simultáneo de distintas técnicas y biomateriales con el fin de minimizar esta reabsorción, entre las que destacan mantenimiento de raíces sumergidas (Ortega AJJ, 1991), injertos autógenos, alogénicos, xenogénicos (Wiesen M, 1998), biomateriales sintéticos (Hahn E, 1988), implantes inmediatos postextractivos (Becker BE, 1998) o membranas de regeneración tisular (Lekowic V, 1998).

3.2 – REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo puede ser regenerado por medio de las siguientes estrategias: *Osteogénesis*, *osteinducción* y *osteoconducción* (Mendes SC, 2000).

La **osteogénesis** es la formación de hueso nuevo que se produce a partir de las células presentes en el injerto, las cuales sobreviven al transplante,

proliferan y se diferencian a osteoblastos.

La **osteoinducción** es la transformación de las células mesenquimales indiferenciadas perivasculares de la zona receptora en células osteoformadoras.

La **osteoconducción** consiste en el crecimiento de tejido vascular y células osteoprogenitoras dentro del andamiaje que presenta el injerto.

En condiciones normales el hueso sano está llevando a cabo continuamente procesos de remodelación ósea. Como ya hemos explicado, la remodelación ósea consiste en un equilibrio continuado de creación y destrucción de hueso, como proceso dinámico y continuado que adapta el hueso a esfuerzos localizados (Allegrini S, 2008) y le otorga la capacidad de autorrepararse. Sin embargo, existe un tamaño de defecto crítico, a partir del cual, el hueso no es capaz de emprender la reparación empleando los procesos de osteogénesis propios. Por tanto, cuando el defecto es de un tamaño mayor que el defecto crítico, se hace necesario el empleo de algún tipo de sustituto óseo (Khan Y, 2008).

El sustituto óseo ideal debería poseer las tres cualidades implicados en la regeneración ósea (osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción), por lo que el hueso autógeno continúa considerándose como el referente, al ser el único injerto que reúne este requisito. Disponemos también de otros sustitutos óseos, como son los aloinjertos o los xenoinjertos, que se diferencian del anterior en la ausencia del potencial osteogénico (Kao ST, 2007) y de los injertos de origen sintético (Mohan BG, 2013).

3.2.1 – Sustitutos óseos

Denominamos sustitutos óseos a todos aquellos tejidos o materiales que se pueden emplear para rellenar defectos del hueso, con el fin de lograr la regeneración y reparación del tejido óseo. De acuerdo con esto, podemos reconocer dos tipos fundamentales de sustitutos: los injertos óseos y los biomateriales (Hollinger JO, 1996; Finkemeier CG, 2002; Delloye C, 2003)

3.2.2 – Injertos óseos: tipos

Un injerto se define como un órgano o tejido que se utiliza para su implante o trasplante (Minsk L, 2005). El injerto óseo es un fragmento de hueso que se puede implantar en un área del esqueleto para restaurar el capital óseo perdido. (Burchardt H, 1983; Stevenson S, 1998; Stevenson S, 1999).

En la actualidad, el injerto de tejido óseo ocupa el segundo lugar en cuanto a número de trasplantes de tejidos, siendo tan sólo superado por el número de transfusiones de tejido sanguíneo (Giannoudis PV, 2005; Shegarfi H, 2009)

Durante las últimas décadas se han desarrollado diversas técnicas quirúrgicas para mejorar las situaciones clínicas de falta de hueso descritas anteriormente, mediante la utilización de injerto de hueso autólogo, aloinjertos, hueso de origen animal o sustitutos óseos sintéticos; además, pueden usarse ciertos factores de crecimiento, expansión de la cresta alveolar y otros tratamientos que se están ensayando actualmente, como son las terapias genéticas (Sethi A, 2000; Triplet RG, 2000; Le Guéhenec L, 2004;

Giannoudis PV, 2005; Zijdeveld SA, 2005; Fischer J, 2011).

Los distintos tipos de injertos óseos pueden poseer alguna de las siguientes cuatro propiedades (Giannoudis PV, 2005; McAllister BS, 2007):

Osteogénesis: viene dada por la presencia en el propio injerto de células con capacidad de diferenciarse en osteoblastos y osteocitos.

Osteoinducción: es la capacidad de estimular las células mesenquimales del huésped para diferenciarse en células osteoblásticas que formen hueso. Este concepto, establecido en 1965 con la formación ósea heterotópica inducida por la familia glicoproteica de los morfogenes, conocidas como Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMPs).

Osteoconducción: describe la facilitación y orientación de los vasos sanguíneos y la creación de nuevos sistemas haversianos; es decir, sobre un soporte físico se lleva a cabo el proceso de colonización y proliferación ósea.

Osteointegración: describe la unión en superficie del hueso del huésped con el material de injerto.

PROPIEDADES DE LOS INJERTOS ÓSEOS				
	OSTEOGÉNESIS	OSTEOINDUCCIÓN	OSTEOCONDUCCIÓN	OSTEOINTEGRACIÓN
CARACTERÍSTICAS	Contiene células vitales con capacidad <u>osteogénica</u>	Contiene factores de crecimiento que ayudan en la nueva formación ósea	Soporte para la nueva formación ósea	Unión de la superficie del hueso y el material
MATERIAL DE INJERTO	- <u>Autoinjerto</u>	- <u>Autoinjerto</u> - <u>Alloinjerto</u> - <u>Xenoinjerto</u>	- <u>Autoinjerto</u> - <u>Alloinjerto</u> - <u>Xenoinjerto</u> - <u>Aloplástico</u>	- <u>Autoinjerto</u> - <u>Alloinjerto</u> - <u>Xenoinjerto</u> - <u>Aloplástico</u>

Tabla 1. Propiedades de los distintos tipos de injertos óseos.

El material de injerto óseo ideal no debería ser sólo un sustituto óseo, sino un material de regeneración que se reabsorba completamente de modo simultáneo a la formación del hueso nuevo. Además, los productos derivados

de su descomposición deberían ser reutilizados para aumentar la masa ósea. Serviría como matriz por sus propiedades osteoconductoras para permitir la formación de hueso y preservar el espacio, previniendo la invasión del mismo por tejido blando y conectivo. Y por último no debería conllevar riesgos inmunológicos (Foitzik C, 2003).

El injerto óseo puede ser de varios tipos, según su origen y las características del receptor, de tal manera que los diferentes tipos quedan definidos por la relación genética existente entre el donante y el receptor (Friedlaender GE, 1987; Goldberg VM, 1987).

3.2.2.1 – Autoinjertos

Consiste en utilizar hueso del propio paciente y está considerado el material de elección preferente, ya que obtiene las mejores características biológicas. Es osteogénico, al contener células osteogénicas viables y proteínas de la matriz ósea, así como osteoconductor y osteoinductor (Tabla 2), y además no provoca reacciones inmunológicas (Le Guéhennec L, 2004; Giannoudis PV, 2005). Se puede obtener tanto de zonas extraorales (principalmente de la cresta iliaca) como de zonas intraorales (cresta alveolar edéntula, exóstosis, torus, tuberosidad maxilar, rama mandibular, etc....), y la elección de la zona va a determinar la reabsorción y comportamiento posterior del injerto (Minsk L, 2005; Schlegel KA, 2006).

Los principales inconvenientes del autoinjerto óseo son su disponibilidad limitada (Le Guéhennec L, 2004; Giannoudis PV, 2005) y la problemática asociada con su obtención, es decir, afectación de estructuras anatómicas

indemnes, morbilidad quirúrgica añadida, prolongación del tiempo quirúrgico, riesgo de infección y dolor postoperatorio.

Otros de los factores que influyen en el éxito de estos injertos son: el origen embriológico del hueso utilizado, ya que sufre menos reabsorción si es de origen membranoso que si es de origen endocondral; la tasa de revascularización del injerto, que es mejor en los de hueso esponjoso que en los corticales; las características estructurales y biomecánicas, la fijación del injerto en el lecho receptor, la orientación del injerto y la disponibilidad de factores de crecimiento locales (Hallman M, 2008). Por otro lado, el hueso autógeno presenta desventajas, como la morbilidad quirúrgica ocasionada en la zona donante del injerto (Kalk VW, 1996; Nkenke E, 2001; Nkenke E, 2002; Nkenke E, 2004). Además, sufren una reabsorción considerable y tienen una viabilidad limitada debido a la falta de vascularización. Hay autores, como Esposito *et al.*, que en su revisión sistemática del año 2006 sobre técnicas de aumento óseo, ponen de manifiesto que el hueso autógeno podría no ser siempre la mejor elección (Esposito M, 2006). Estas desventajas son las que han obligado a los clínicos e investigadores a desarrollar diversos sustitutos óseos que puedan utilizarse con éxito en el tratamiento implantológico con compromiso óseo (Jensen SS, 1996; Kalk VW, 1996; Norton MR, 2002; Schnettler R, 2004; Giannoudis PV, 2005;).

3.2.2.2 – Aloinjertos

Consiste en tejido óseo procedente de un donante de la misma especie (Hallman M, 2008). Se obtiene de bancos de tejidos humanos y normalmente

se produce en dos formas: congelado deshidratado descalcificado o no, porque son las formas que producen menor inmunogenicidad. Es mejor la segunda opción, pero tienen limitaciones, como son los resultados clínicos variables y la potencialidad para transmitir enfermedades y producir reacciones inmunológicas.

Es osteoconductor, en menor grado, osteoinductor, pero no osteogénico, ya que no contienen células viables, y esto último es lo que ocasiona que su integración en el hueso del paciente sea más lenta que en el caso de los autoinjerto aunque el proceso sea similar (Tabla 2) (Le Guéhenec L, 2004; Giannoudis PV, 2005; Minsk L, 2005; Hallman M, 2008).

CARACTERÍSTICAS DE LOS AUTOINJERTOS Y ALOINJERTOS				
INJERTO ÓSEO	FUERZA ESTRUCTURAL	OSTEOCONDUCCIÓN	OSTEOINDUCCIÓN	OSTEOGÉNESIS
AUTOINJERTO				
-Eponjoso	No	***	***	***
-Cortical	***	**	**	**
ALOINJERTO				
-Eponjoso				
<i>Congelado</i>	No	**	*	No
<i>Deshidratado</i>	No	**	*	No
-Cortical				
<i>Congelado</i>	***	*	No	No
<i>Deshidratado</i>	*	*	No	No

Tabla 2. Características de los distintos tipos de injertos óseos.
(Adaptada de Giannoudis PV, 2005)

Sus propiedades mecánicas y biológicas son variables y depende de los sistemas de conservación y esterilización empleados previamente. Se utiliza principalmente en forma de injerto libre, ya sea esponjoso, cortical o corticoesponjoso, para el tratamiento de variados defectos óseos segmentarios

o cavitarios (Burchardt H, 1983; Fernández de Retana P, 1993; Garbuz DS, 1998).

3.2.2.3 – Isoinjertos

Es un injerto que se obtiene e implanta entre individuos genéticamente idénticos, como es el caso de los gemelos univitelinos o animales de laboratorio procedentes de un mismo ovocito (Elves MW, 1975).

3.2.2.4 – Xenoinjertos o heteroinjertos

Injerto que se implanta entre individuos de especies diferentes. Es el centro de interés de muchos estudios debido a que se puede conseguir con facilidad, sin embargo, su capacidad inmunogénica, tanto de las células como de la matriz orgánica, limita su utilización y hace necesaria su desproteinización.

Existen diferentes preparados de heteroinjertos óseos disponibles, siendo los más conocidos los huesos de Kiel y Oswestry, de origen bovino. Presentan las mismas ventajas que los aloinjertos, pero carecen de capacidad osteoinductora siendo sus propiedades biomecánicas deficientes, debido a los procesos de conservación y esterilización.

4 ~ BIOMATERIALES

Los biomateriales son aquellas sustancias o combinaciones de sustancias, naturales o sintéticas, o combinación de sustancias, que pueden implantarse en el organismo para tratar, restituir, sustituir o aumentar un órgano o tejido, entre los cuales se encuentra el tejido óseo.

El implante de un biomaterial genera la reacción de los tejidos vivos receptores, produciéndose un proceso inflamatorio de cuantía variable que concluye con la cicatrización (Williams DF, 1992; Vallet-Regí M, 2000).

La respuesta de los tejidos puede favorecer la incorporación del material o acelerar la regeneración de una lesión. Este es el caso de los implantes de cementos óseos y vidrios bioactivos basados en fosfatos de calcio, en que los biomateriales interactúan directamente con los componentes del tejido óseo y el proceso resultante permite la reparación del defecto óseo (Clément J, 2001; Ginebra MP, 2004).

4.1 - BIOMATERIALES COMO SUSTITUTIVOS ÓSEOS

Los biomateriales que tienen utilidad como sustitutivos óseos son los que al ser implantados tienen la capacidad de promover la regeneración o reparación ósea, por lo que pueden ser empleados con éxito en tratamientos odontológicos con pérdida de tejido óseo, como cirugías de exodoncias, solución de cavidades óseas generadas por la resección de tumores o para rellenar defectos óseos. Se considera que los biomateriales ideales son aquellos que progresivamente son sustituidos por tejido óseo neoformado en el

hueso receptor. (Delloye C, 2003; Vallet-Regí M, 2000; Bauer TW, 2002; Greenspan DC, 1999)

Un biomaterial óptimo en la sustitución ósea debe ser osteoconductor, para lo cual necesita proporcionar un armazón que facilite los fenómenos óseos reparativos; ser estructuralmente resistente, para aportar el mejor soporte biomecánico hasta su reemplazo por el tejido óseo neoforado; y biorreabsorbible, es decir, capaz de ser degradado progresivamente sin generar productos tóxicos.

Teniendo en cuenta los numerosos estudios y líneas de investigación que actualmente se desarrollan para clasificar los biomateriales nos ha parecido pertinente emplear una clasificación simplificada de los distintos biomateriales que probadamente - tanto en investigación básica como en clínica - tienen utilidad como sustitutivos óseos.

De esta forma, hemos ordenado en tres grupos generales los materiales que permiten restaurar el capital óseo perdido y que corresponden a los biomateriales cerámicos, los biomateriales poliméricos y los biomateriales compuestos (Mainard D, 1997). Destacando entre ellos las cerámicas de fosfatos de calcio porque son comparativamente similares a la fase mineral del hueso.

4.2 - BIOMATERIALES CERÁMICOS

Los estudios relacionados con las cerámicas para su aplicación en el campo de la medicina, comienzan hace poco más de 25 años. El interés por los biomateriales cerámicos se debe a que en su mayoría corresponden a óxidos

metálicos, por lo cual no presentan oxidación ni corrosión en el medio biológico y poseen una gran dureza que los hace muy resistentes a la fricción y el desgaste (Hench LL, 1998; Greenspan DC, 1999; LeGeros RZ, 2002).

La utilización de cerámicas específicamente diseñadas para la reparación, reconstrucción y reemplazo de partes dañadas o enfermas del cuerpo, supuso una revolución en cuanto al uso de estos materiales. Las cerámicas utilizadas para este propósito también se conocen con el nombre de biocerámicas (Hench LL, 1998).

Las cerámicas son los biomateriales más parecidos al componente mineral del tejido óseo, por lo que presentan una buena compatibilidad y capacidad de osteointegración. Sin embargo, su aplicación en áreas que deben soportar cargas, es un problema no resuelto, dado que son rígidas y quebradizas (Daculsi G, 1998).

Un reciente estudio (Markovic S, 2011) ha mostrado las grandes similitudes físico-químicas que existen entre la hidroxiapatita obtenida de mandíbula humana y una hidroxiapatita carbonatada sintética en polvo, producida mediante precipitación química. Con la excepción del pirofosfato de calcio, la mayoría de los fosfatos de calcio usados *in vivo* son ortofosfatos de calcio, es decir, contienen el grupo ortofosfato (PO_4^{3-}), siendo la propiedad más importante la solubilidad en agua, lo que permite predecir su comportamiento *in vivo* (Bohner M, 2000).

Teniendo en cuenta las características de la respuesta que generan en el tejido circundante, los biomateriales cerámicos se pueden clasificar en tres grandes grupos (Hench LL, 1991):

a) Cerámicas **bioinertes**. Poseen una elevada estabilidad *in vivo*, gran resistencia mecánica y óptima biocompatibilidad. Tienen una influencia nula o muy pequeña en el tejido óseo adyacente y su principal representante es la alúmina.

b) Cerámicas **bioactivas**. Tienen propiedades osteoconductoras y se unen directamente con el hueso vivo. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes. A este grupo pertenecen los vidrios bioactivos y las cerámicas de fosfatos de calcio.

c) Cerámicas **bioresorbibles**. Después de su implantación son progresivamente reemplazadas por tejido óseo neoformado. Para ello debe existir una adecuada correlación entre las velocidades de reabsorción del biomaterial y de regeneración del hueso. En este grupo se puede clasificar los cementos de fosfatos de calcio.

También se pueden clasificar según su composición:

- a) Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)
- b) Fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- c) Fosfato cálcico bifásico (mezcla de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico)
- d) Apatita no sinterizada o calcio-deficiente

Están disponibles en forma de bloques o partículas, densos o porosos. (LeGeros RZ, 2002; Giannoudis PV, 2005)

Una de sus características más importantes es la porosidad, y son tan importantes por la interconexión de los poros (Hsu YH, 2007), como por el tamaño de los mismos, siendo ideal que el tamaño del poro de una cerámica se aproxime al del hueso esponjoso, es decir $565\mu\text{m}$. Se pueden introducir macroporosidades añadiendo porógenos volátiles, que proporcionan una matriz

para la colonización celular, o microporosidades que permiten la circulación de los fluidos corporales (Passutti N, 1997; LeGeros RZ, 2002; Le Guéhenec L, 2004; Giannoudis PV, 2005; Allegrini S, 2008). La biocompatibilidad de las cerámicas deriva de su composición química, que contiene iones comúnmente encontrados en el ambiente fisiológico (calcio, potasio, magnesio, sodio, etc.) y otros iones con poca toxicidad para los tejidos como aluminio y titanio. Las cerámicas son frágiles y sólo se pueden utilizar en zonas del esqueleto que no sean sometidas a grandes cargas (Vaccaro AR, 2002).

4.2.1 - Cerámicas a base de fosfatos de calcio

La aplicación de cerámicas de fosfato de calcio como posibles sustitutos de hueso se ha investigado por diferentes autores. Inicialmente, estos materiales no eran reabsorbibles, pero sí biocompatibles, y permitían el crecimiento del tejido óseo en el interior de sus poros. Esta propiedad bioactiva depende del intercambio iónico con el hueso huésped y los fluidos orgánicos, ya que en su proceso de degradación son capaces de liberar iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} y difundirse localmente estimulando la osteogénesis (osteoinducción) y permitiendo la colonización ósea en el interior de sus poros (osteoconducción) (Andrades JA, 1999).

La respuesta ósea a las cerámicas de fosfato de calcio depende directamente de la naturaleza exacta de cada cerámica. Los progresos en el campo de la bioingeniería han dado como resultado nuevos biomateriales y en particular, las cerámicas de fosfato de calcio han recibido máxima atención dada su buena biocompatibilidad. Los avances continuos en el campo de los

biomateriales de fosfato de calcio han producido resultados espectaculares en cuanto a su biocompatibilidad y capacidad para estimular la osteogénesis. Sin embargo, la naturaleza y grado de respuesta del tejido óseo huésped parecen depender de las características de los materiales: composición química, textura de la superficie, porosidad y densidad, así como de la forma y el tamaño (Andrades JA, 1999).

De modo aislado, las cerámicas sintéticas no poseen propiedades osteogénicas ni osteoinductoras, y muestran un soporte estructural mínimo; pero cuando se colocan junto a hueso sano, se deposita una capa de osteoide directamente en la superficie de la cerámica, sin una interfase de tejido blando, consiguiendo que el osteoide se mineralice y el hueso resultante quede remodelado (Giannoudis PV, 2005).

Los fosfatos de calcio pueden utilizarse junto a matrices de colágeno o mezclados con pegamentos de fibrina, los cuales forman una red en la que los minerales pueden cristalizar y aportar proteínas importantes en el proceso (Hallman M, 2008, Takahasi 2009). También es posible su combinación con proteínas como las BMPs o con células madre de la médula ósea del paciente (Passutti N, 1997, Vaccaro AR, 2002).

Existen muchos estudios clínicos que analizan la eficacia de los biomateriales combinados con los pegamentos de fibrina. Esta combinación tiene un impacto positivo en la adhesión a las paredes de los defectos óseos y en el manejo del material. El futuro de esta combinación podría estar en la asociación con factores de crecimiento, como por ejemplo, las proteínas morfogenéticas óseas, que juegan un importante papel en la embriogénesis, y además actúan en la diferenciación de las células mesenquimales a

osteoblastos, siendo importantes en la curación y remodelación ósea. Otra combinación posible sería con células de la médula ósea. La combinación de células, fibrina y biocerámicas podría ser un sustituto óseo ideal para reconstrucción ósea (Le Guéhenec L, 2004).

Así, por ejemplo, el estudio de Le Nihouannen, del año 2007 (Le Nihouannen D, 2007), investiga las propiedades mecánicas y osteogénicas de los gránulos de cerámica bifásica de fosfato de calcio (hidroxiapatita 60: β -fosfato tricálcico 40), macro y microporosos asociados a pegamentos de fibrina.

En este estudio se observó, que tanto en espacios intramusculares de ovejas, como en defectos óseos críticos en conejos, la cerámica producía formación de hueso nuevo, con fibras de colágeno ordenadas, osteocitos y sistemas de osteonas. Se encontró tejido óseo mineralizado y maduro en contacto directo y unido a los gránulos de la cerámica, tanto dentro como entre los mismos. La vía de formación de este hueso parece ser intramembranosa, y su estructura es similar a la del hueso esponjoso. Además, al aumentar el tiempo de implantación, aumentaba la cantidad de tejido mineralizado. Esto parece estar a favor de la existencia de propiedades osteoconductoras y osteoinductoras para este material.

Se propone la teoría de que el material produce una reacción inflamatoria, que atrae células mesenquimales indiferenciadas, que proliferan y se diferencian para formar hueso nuevo. Además, el coágulo formado por el pegamento de fibrina - similar al producido en fracturas óseas - es degradado en los primeros días, lo que atrae a cantidad de células osteoprogenitoras, entre otras. Seguidamente se produciría una neovascularización de la zona,

con producción de abundante matriz extracelular por los osteoblastos, que será mineralizada posteriormente.

El estudio de Takahashi en el año 2005 (Takahashi Y, 2005) evalúa las características de las esponjas de gelatina combinadas con β -fosfato tricálcico como matriz para las células madre mesenquimales desde el punto de vista de sus propiedades mecánicas, y la mejora de la osteoinducción por la incorporación del β - fosfato tricálcico. En los resultados del trabajo, se encontró que las células adheridas a todos los tipos de esponjas de gelatina (que contenían distinta cantidad de β -fosfato tricálcico y distinto tamaño de partícula) lo hicieron en un número similar, y estaban uniformemente distribuidas por la esponja. La morfología de las células sí dependía del tipo de esponja, siendo más planas cuanto mayor era la cantidad de β -fosfato tricálcico que contenían las esponjas. La densidad celular aumentaba en muestras con poco β -fosfato tricálcico, y se hacía significativa para esponjas que contenían entre un 75-90% de β - fosfato tricálcico. Igualmente, se observó formación ósea en la parte periférica de la esponja, en todos los casos, comprobándose que las células se distribuían uniformemente en el interior de las esponjas, pero no se vio nuevo hueso en el interior.

Los resultados de este trabajo sugieren que el β -fosfato tricálcico funciona por sí mismo aumentando la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimales. Además, se sugiere que la aplicación de β -fosfato tricálcico combinado con gelatina, solucionaría uno de los problemas de esta cerámica, que es su difícil manejo clínico; y además permitiría que la forma del material se adaptase a la forma del defecto óseo a rellenar. Sin embargo, se trata de un estudio *in vitro*, y se necesitarían más estudios, tanto

in vitro como *in vivo* para comprobar si ambos materiales, al combinarse mejorarían sus propiedades osteogénicas y de manejo, o no.

Se distinguen dos tipos de fosfatos de calcio: los obtenidos por precipitación a partir de una solución acuosa a temperatura ambiente, conocidos como fosfatos de calcio de baja temperatura, y los obtenidos por una reacción térmica, conocidos como fosfatos de calcio de alta temperatura.

Estos últimos son los tradicionalmente usados en medicina, encontrándose entre ellos el β -fosfato tricálcico: β -TCP: β -Ca₃(PO₄)₂. Este compuesto se obtiene a temperaturas de 650°C por varios mecanismos, y difiere del fosfato tricálcico únicamente en la estructura cristalina. Es biodegradable (por vía osteoclástica) y se usa como sustituto óseo en gránulos, bloques o cemento. El fosfato tricálcico poroso desaparece a medida que el hueso nuevo crece. La capa superficial del fosfato tricálcico incrementa la unión con el hueso adyacente, al que se une directamente, lo que estimula la reabsorción por los osteoclastos y la formación de hueso nuevo por los osteoblastos en la zona donde se reabsorbe el implante (Fujita R, 2003; Fujita R, 2003(2)).

Además de la importancia que tiene su porosidad y la interconexión entre los poros en la respuesta celular, la respuesta inflamatoria, la formación de hueso, el crecimiento de vasos sanguíneos en el interior - para ello el tamaño del poro debe superar las 400 μ m - y la reabsorción de la cerámica (von Doernberg MC, 2006; Walsh WR, 2008; Ghanaati S, 2010; Bashoor-Zadeh M, 2011; Feng B, 2011), se ha mostrado que la microestructura de las partículas del β -fosfato tricálcico afecta tanto a la respuesta inflamatoria inicial, como a la

reabsorción del biomaterial y al metabolismo del hueso neoformado (Okuda 2007; Ghanaati S, 2010).

El principal problema de estos materiales son sus propiedades mecánicas, por lo que se intentan desarrollar materiales bioactivos que mejoren las características de éstos para semejarlas a las del hueso vivo.

El primer uso *in vivo* de β -fosfato tricálcico fue llevado a cabo por Albee *et al.* en 1920 (Albee FH, 1920).

El estudio *in vitro* e *in vivo* de Franco *et al.* (Franco J, 2006) mostró que la superficie del β -fosfato tricálcico es colonizada en primer lugar por proteínas y células, y posteriormente por tejido fibrovascular con una intensa actividad angiogénica y ribetes de células multinucleadas que proceden a la remoción del material. El progreso de esta colonización hacia el interior del material depende de su porosidad. En una segunda fase, la matriz proteica extracelular que embebe fragmentos del material se mineraliza, quedando englobado el β -fosfato tricálcico en su interior. El material va siendo sustituido progresivamente por matriz extracelular típica. A nivel clínico, Plenck Jr *et al.* (Plenck Jr H, 2007) mostraron la progresiva reabsorción del β -fosfato tricálcico en elevaciones de seno en humanos y su sustitución por hueso nuevo, aunque señalaron la lentitud con la que esto tiene lugar. Kondo *et al.* (Kondo N, 2005) estudiaron el comportamiento del β -fosfato tricálcico al implantarlo en el fémur de ratas mediante la tinción para TRAP, inmunohistoquímica de la proteína EDI e hibridación *in situ* de procolágeno, osteopontina y osteocalcina; mostraron que la osteoconducción se manifiesta de manera muy temprana (4 días), seguida de una reabsorción del material y reemplazo del mismo por hueso nuevo, de manera que a los 56 días, las áreas del material eran significativamente más

pequeñas que en los 4 y 7 días, sugiriendo una reabsorción cronológica. Habiendo sido estudiado el comportamiento inicial y a corto plazo, el estudio de Ye *et al.* (Ye F, 2007) confirmó la seguridad y la estabilidad a largo plazo del hueso neoformado y de este tipo de cerámicas implantadas en cerdos en un estudio de 4,5 años de duración. También se demostró la estabilidad a largo plazo (5 años) en elevaciones de seno en humanos en el estudio de Velich *et al.* (Velich N, 2004).

Una investigación muy reciente de Zhao *et al.* (Zhao J, 2011) ha estudiado la expresión genética y los mecanismos moleculares tempranos que se producen tras la implantación de β -fosfato tricálcico en defectos artificiales creados en la mandíbula de perros beagle, utilizando para ello un análisis histológico, un análisis de microarrays, un IPA (Ingenuity Pathways Analysis, variante del análisis de redes genómicas *in silico*), una PCR a tiempo real y una PCR con transcriptasa inversa; todo ello a los 4, 7 y 14 días tras la implantación y comparándolo con un grupo control en el que no se utilizó material de relleno. El análisis histológico revela la presencia de fibroblastos, células inflamatorias y linfocitos a los 4 días, hueso nuevo y tejido conectivo fibroso a los 7 días y a los 14 días un relleno completo del defecto por hueso regenerado en el grupo en que se utilizó β - fosfato tricálcico; mientras que en el otro grupo, a los 4 días se encontró tejido conectivo inflamatorio, a los 7 días hueso nuevo en el área periférica de la lesión, y pequeñas área de hueso nuevo a los 14 días. El análisis de la expresión de genes reveló que los perfiles de expresión genética eran similares a los 4 y 7 días, pero muy diferentes a los 14 días, reflejando la presencia de osteoblastos involucrados en la formación de hueso y osteoclastos involucrados en la reabsorción del β -fosfato tricálcico. Los

resultados de este estudio concluyen que el beta fosfato tricálcico intensifica los procesos de curación ósea.

Por tanto, entre los sustitutos sintéticos de tipo cerámico, el β -fosfato tricálcico es un material biocompatible, reabsorbible y osteoconductor que ha sido utilizado ampliamente para la reparación de defectos óseos, ya que permite por sus características fisicoquímicas la infiltración de células osteogénicas y la conservación del espacio rellenado con éxito en diversas áreas de la biología (Liu G, 2007; Gan Y, 2008; Kasten P, 2008), veterinaria (Franch J, 2006), medicina (Linovitz RJ, 2002; Ogose A, 2002; Gaasbeek RDA, 2005; Ogose A, 2005; Ogose A, 2006; Momma F, 2008) y odontología (Foitzik C, 2003; Horch HH, 2006; Aguirre-Zorzano LA, 2007; Zafiroopoulos GG, 2007; Döri F, 2008; Yamauchi K, 2010; Ono D, 2011).

Se ha sugerido también que podría utilizarse como vehículo para factores de crecimiento que estimulen la formación ósea, lo cual aumentaría la respuesta osteogénica y mejoraría los resultados clínicos (Aybar B, 2004; Byun H, 2008). A este respecto, en un reciente ensayo clínico multicéntrico randomizado reciente (Stavropoulos A, 2011) se ha mostrado que la combinación del factor de crecimiento y diferenciación recombinante humano 5 con β -fosfato tricálcico iguala los resultados que ofrece la combinación de hueso autógeno y β -fosfato tricálcico en elevaciones de seno; pudiendo eliminarse por tanto el uso de hueso autógeno, disminuyendo las complicaciones asociadas al mismo.

Además, estudios *in vitro* sobre ingeniería tisular han mostrado que la combinación de β -fosfato tricálcico poroso con células osteoprogenitoras derivadas de la médula ósea seguida de un cultivo en un medio osteogénico,

da lugar a un material compuesto con una buena actividad osteogénica, mejores propiedades mecánicas y menor biodegradabilidad (Dong J, 2002). En este sentido Gan *et al.* (Gan Y, 2008) utilizaron una combinación de β -fosfato tricálcico y células madre derivadas de la médula ósea para la fusión espinal posterior en 41 pacientes con éxito clínico en el 95% de los casos; y Shayesteh *et al.* (Shayesteh YS, 2008) utilizaron una combinación de β -fosfato tricálcico/hidroxiapatita con células madre derivadas de la médula ósea para la elevación de seno maxilar en 6 pacientes con éxito clínico de los 30 implantes colocados en el 93% de los casos. Un reciente estudio de Xia *et al.* (Xia L, 2011) utilizó el β -fosfato tricálcico granulado como vehículo para células de la médula ósea modificadas genéticamente para BMP-2 y Nell-1; encontrando una mejora en la formación ósea a las 2 y 8 semanas de implantación en elevaciones sinusales en conejos debido al efecto sinérgico de estos dos genes en la diferenciación celular osteogénica de las células utilizadas. Por el contrario, Maréchal *et al.* (Maréchal M, 2008) no encontraron mejores resultados al añadir células del periostio a una matriz de β - fosfato tricálcico para la reparación de defectos óseos en el cráneo de conejos, quizá como ellos mismos señalaron, porque las células utilizadas no fueron las adecuadas a este propósito.

El β -fosfato tricálcico ha sido utilizado en estudios sobre diferentes modelos de experimentación animal (perros Beagle, conejos de Nueva Zelanda, ratas Winstar y cerdos) para probar su capacidad como biomaterial en la regeneración ósea (Comuzzi L, 2002; Suba Z, 2004; Artzi Z, 2004; Jensen SS, 2005; Boix D, 2006; Jensen SS, 2006; Alam S, 2007; Fiorellini JP, 2007; Masago H, 2007; Nakajima Y, 2007).

La siguiente tabla resume los resultados de algunos estudios realizados con fosfatos de calcio en modelos animales (Tabla 3).

ESTUDIOS CON FOSFATO TRICÁLCICO SOBRE ANIMALES				
AUTOR (AÑO)	ESPECIE	TÉCNICA	TIEMPO Y VARIABLES ESTUDIADAS	CONCLUSIONES
Conuzzi (2002)	Cabras	Relleno defectos alrededor de implantes	12 semanas. Histología	Relleno casi completo de los defectos
Artzi (2004)	Perros	Defectos mandibulares	3,6,12,y,24 meses. Histomorfometría	Curación ósea demostrada
Suba (2004)	Perros	Preservación alveolar	6,12 y 24 semanas. Histomorfometría	Regeneración ósea completa
Jensen (2006)	Cerdos	Defectos mandibulares	8 semanas. Histomorfometría	Regeneración ósea y reabsorción material adecuadas
Boix (2006)	Perros	Preservación alveolar	3 meses. Histomorfometría	Preservación integridad reborde alveolar
Nakajima (2007)	Perros	Defectos mandibulares	8 meses. Histología e histomorfometría	Relleno de los defectos por hueso nuevo, permanencia del material
Masago (2007)	Conejos	Defectos maxilares	1,2 y 5 meses. Histología	El β -TCP se reabsorbe en 5 meses, dando lugar a hueso nuevo variable
Alam (2007)	Conejos	Defectos mandibulares	2,4,8,12 y 24 sem. Histología, histomorfometría e inmunohistoquímica.	El β -TCP produce formación de hueso, reabsorción muy lenta
Fiorellini (2007)	Perros	Defectos mandibulares	5 meses. Histología e histomorfometría	65% de porcentaje de contacto hueso-implante. Éxito de los implantes
Frota (2011)	Ratas	Defectos en calota craneal	7,15 y 30 días. Histología	No diferencias entre lado control (sin relleno) y lado β -TCP
Yang (2013)	Conejos	Defectos 8mm de diámetro	2 Y 8 semanas. Histología e histomorfometría	El β -TCP produce formación de hueso
Ibara (2013)	Ratas	Decorticación de calota de 4 mm ²	10 y 35 días. Histología e histomorfometría	El β -TCP presenta buena osteoconducción y biocompatibilidad

Tabla 3. Estudios realizados en modelos animales con fosfatos de calcio.

El β -fosfato tricálcico también se ha utilizado con éxito a nivel clínico, en cirugía e implantología oral (Piatelli A, 1996; Szabó G, 2005; Zijderveld SA, 2005; Horch HH, 2006; Ormianer Z, 2006; Suba Z, 2006; Velasco-Ortega E, 2008; Tetsch J, 2010; Schulten, 2013) (Tabla 4).

ESTUDIOS SOBRE HUMANOS CON FOSFATO TRICÁLCICO			
AUTOR (AÑO)	TÉCNICA	TIEMPO Y VARIABLES ESTUDIADAS	CONCLUSIONES
Piatelli (1996)	Relleno de defectos por quistectomías	6 meses. Histología	Osteoconducción y biocompatibilidad. Buena regeneración
Szabó (2005)	Elevación de seno	6 meses. Radiología, histología e histomorfometría	Regeneración ósea y altura adecuadas (igual que hueso autógeno)
Zijderveld (2005)	Elevación de seno	12 meses. Resultados clínicos	100% éxito implantes usando β TCP vs autógeno
Horch (2006)	Quistectomías, fisuras alveolares, defectos periodontales y elevación de seno	4, 12 y 52 semanas. Resultados clínicos, radiología, histología y ultrasonografía	El β TCP es un buen material para relleno de defectos óseos en la región alveolar
Ormianer (2006)	Carga inmediata de 1065 implantes en zonas aumentadas	19,2 meses. Resultados clínicos	97,6% supervivencia de los implantes
Suba (2006)	Elevación de seno	6 meses. Histología e histomorfometría	Regeneración ósea y altura adecuadas (igual que hueso autógeno)
Ridgway (2008)	Relleno de defectos periodontales	6 meses. Histología	Regeneración periodontal en 13 de 16 dientes tratados
Velasco Ortega (2008)	Elevación de seno	8 meses. Resultados clínicos e histología	Regeneración ósea adecuada y éxito clínico de los implantes
Tetsch (2010)	Elevación de seno	176 meses. Resultados clínicos y radiológicos	97,1% de éxito sin diferencias entre hueso bovino y β TCP
Schulten (2013)	Elevación de seno	6 meses. Resultados clínicos, radiológicos e histomorfométricos	Regeneración ósea y altura adecuadas. (no necesario utilizar membranas)

Tabla 4. Estudios realizados en humanos con fosfatos de calcio.

5 ~ BIFOSFONATOS

Los Bifosfonatos (BFs) son conocidos desde mediados del siglo IX, habiendo sido sintetizados por primera vez en Alemania en 1865. El etidronato, fue el primer BF usado para el tratamiento de enfermedades humanas, el cual fue sintetizado hace más de 100 años. Los BFs se emplearon a nivel industrial principalmente como inhibidores de la corrosión o como agentes en la industria textil, fertilizantes, y aceites industriales. Igualmente, su capacidad para inhibir la precipitación del carbonato de calcio de forma similar a los polifosfatos, estimuló su utilización en medicina.

Sólo en las últimas tres décadas, han sido desarrollados como medicamentos a raíz de la publicación de un informe en 1968 para diversas enfermedades óseas, en odontología y en alteraciones del metabolismo del calcio (Fleisch H, 1998).

Su investigación derivó de estudios anteriores realizados con pirofosfatos inorgánicos, encontrándose que el plasma y la orina contenían compuestos inhibidores de la precipitación de fosfato de calcio y que parte de esta actividad inhibitoria era debida al pirofosfato inorgánico, un compuesto que no se había descrito previamente en la literatura científica. Fue entonces cuando el pirofosfato demostró que afectaba *in vitro* la formación y disolución de los cristales de fosfato de calcio. Este efecto fue similar con el carbonato de calcio y, por esta razón, habían sido utilizados en detergentes (Fleisch H, 1998).

El valor clínico potencial del BF fue primeramente apreciado en la década de los 1970, y los esfuerzos de investigación se centraron en el

desarrollo de compuestos más potentes en la actividad antirreabsortiva, pero sin capacidad para inhibir la mineralización.

Al compararlo con productos como el etidronato, se vio una diferencia 10 veces menor entre las dosis que inhibe la mineralización y la dosis que reduce la reabsorción ósea. En contraste, el perfil del clodronato, que surgió de los primeros estudios, perfila que esto podría no ser una propiedad universal de los BFs y, de hecho, la inhibición de la resorción ósea podría ser fácilmente alcanzada sin ningún tipo de alteración de la mineralización. Más tarde, la introducción de los primeros sustituyentes nitrogenados, en productos análogos como el alendronato y el pamidronato, llevó al desarrollo de BFs adicionales en los que la inhibición de la reabsorción ósea era claramente separable de cualquier efecto sobre la mineralización (Russell RGG, 2008).

Los bifosfonatos constituyen una de las alternativas terapéuticas más eficaces para la prevención de fracturas en las mujeres con osteoporosis, y sus acciones sobre la masa ósea y la mejora de fracturas han quedado plenamente demostradas.

5.1 – Características químicas

Los BFs son compuestos químicamente estables derivados del pirofosfato (P-O-P) en los que el oxígeno central de la molécula se ha sustituido por un carbono (*P-C-P*). Hay un compuesto que se produce de manera natural en los organismos, en el cual dos grupos fosfato están unidos por esterificación a una molécula de oxígeno (Drake MT, 2008; Russell RGG, 2008); mientras que los BFs están caracterizados por dos uniones *C-P* (Figura 14).

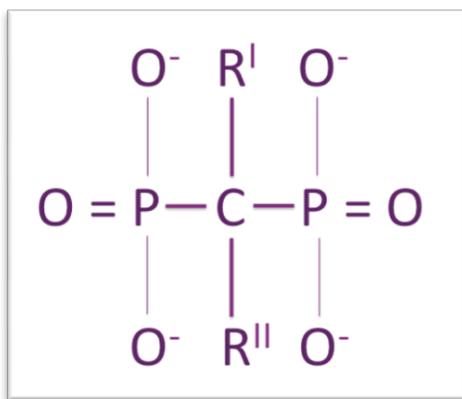


Fig.14. Estructura química básica de los bifosfonatos. La cadena R^{I} cuando es un OH, el grupo de unión a la hidroxiapatita mejora. La cadena R^{II} determina la potencia.

Si las dos uniones están localizadas en el mismo átomo de carbono, el compuesto es llamado bifosfonato geminal (Fleisch H, 1998). En la literatura estos compuestos son llamados normalmente “*Bifosfonatos*”. Aunque esto no es totalmente correcto ya que los bisfosfonatos no geminales también son BFs, se adopta esta nomenclatura para simplificar (Fleisch H, 1998). La estabilidad es conferida por esta sustitución de un átomo de carbono en vez del átomo de oxígeno para conectar los dos fosfatos (Russell RGG, 2008).

La estructura *P-C-P* permite un gran número de posibles variaciones, ya sea por cambio de las dos cadenas laterales en el carbono o por esterificación de los grupos fosfato. Esta unión *P-C-P* actúa como “gancho óseo” y es esencial para la unión a la hidroxiapatita. Cada BF tiene sus propias características químicas, bioquímicas y biológicas, las cuales implican que no es posible extrapolar los resultados de un compuesto a otro con respecto a sus acciones (Fleisch H, 1998).

La modificación de la estructura química de los bifosfonatos ha ampliado las diferencias entre las concentraciones efectivas de BF necesarias para la actividad antireabsortiva en relación a los que inhiben la mineralización de la

matriz ósea, haciendo que las concentraciones circulantes de todos los BFs que se utilizan actualmente en la práctica clínica sean activos para la inhibición de la reabsorción esquelética.

Los conocimientos sobre la farmacocinética de los bifosfonatos provienen de estudios realizados en animales de experimentación y en humanos (Sansom LN, 1995; Porras AG, 1999; Ylitalo P; 1999; Pérez-López FR, 2003).

Son pirofosfatos que se absorben en mínima proporción vía oral (1% de la dosis) y ello siempre que se ingieran en ayunas, de lo contrario prácticamente se anula la absorción. Un dato de interés es que dicha proporción de absorción intestinal no presenta saturación en el rango de dosis de utilidad clínica, lo que permite incrementar la dosis absorbida aumentando la dosis ingerida. Al pasar a la sangre se fijan rápidamente al hueso por la alta afinidad de la *molécula P-C-P* por la hidroxiapatita, importante componente inorgánico óseo. Por ello, se fijan en las superficies óseas que se encuentran en remodelado, donde se incorporan rápidamente en la matriz ósea en formación para quedar allí depositados. El fármaco no fijado se elimina por la orina. Una vez fijado en el tejido óseo, comienza su acción cuando se inicia un ciclo de remodelado en la zona en que se encuentra. Los osteoclastos, al crear la laguna de resorción, quedan expuestos al bifosfonato, que se incorpora en parte a su citoplasma, produciéndose sus efectos en los mismos. Los bifosfonatos tienen una vida media larga en el hueso porque quedan fijados hasta que en esa zona en concreto se inicia la resorción y así se explica que su efecto biológico se continúa ejerciendo mucho después de haberse suspendido su administración (Greenspan SL, 2002).

5.2 – Clasificación de los bifosfonatos

Los distintos bifosfonatos se pueden clasificar (Brown DL, 1999) en función de su mecanismo de acción: bifosfonatos nitrogenados o aminobifosfonatos (que actúan a través de la vía bioquímica del mevalonato) y bifosfonatos no nitrogenados (que actúan a través de ATPasas). La diferencia entre los BFs viene dada por la unión al carbono geminal de la cadena lateral R" y la presencia o ausencia de un átomo de nitrógeno o no en dicho grupo (Senel FC, 2010).

5.2.1 - Bisfosfonatos no nitrogenados

Dentro de este grupo los más conocidos y empleados en clínica son el etidronato, el clodronato y el tiludronato. Están en el uso común hoy en día (Marx RE, 2003). Son rápidamente metabolizados por lo osteoclastos e inactivan un análogo no hidrolizable del adenosin trifosfato que induce la apoptosis (Woo SB, 2006) (Figura 15).

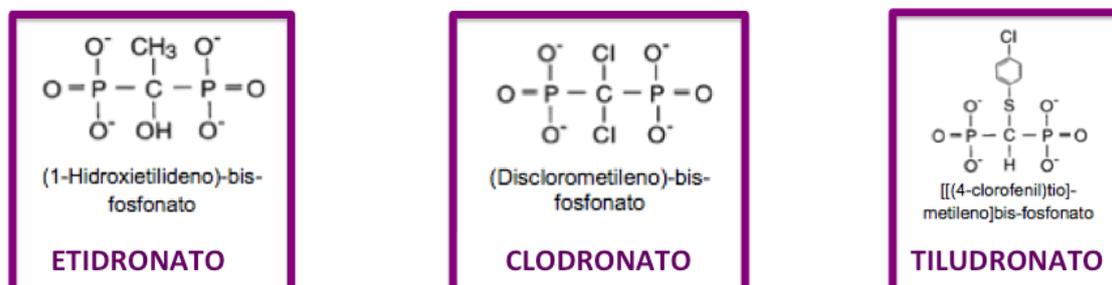


Fig.15. Fórmulas de bifosfonatos no nitrogenados.

5.2.2 - Bifosfonatos nitrogenados

Los BFs de nueva generación o BFs Nitrogenados (BFs-N) pamidronato, zoledronato (Marx RE, 2003), alendronato, ibandronato y risendronato (Woo SB, 2006; Senel 2010) son los BFs que contienen nitrógeno y son mucho más potentes (Marx RE, 2003; Woo SB, 2006). Por lo tanto, se acumulan en el hueso y tienen un efecto continuo cuyo resultado está relacionado posiblemente con las necrosis óseas (Marx RE, 2003). Tienen dos acciones principales como son la inducción de otro análogo del adenosin fosfato que induce apoptosis, y la inhibición de la Farnesil Pirofosfato Sintetasa (FPFS), la cual es una enzima que forma parte de la vía del mevalonato encargada de la síntesis del colesterol (Figura 16).

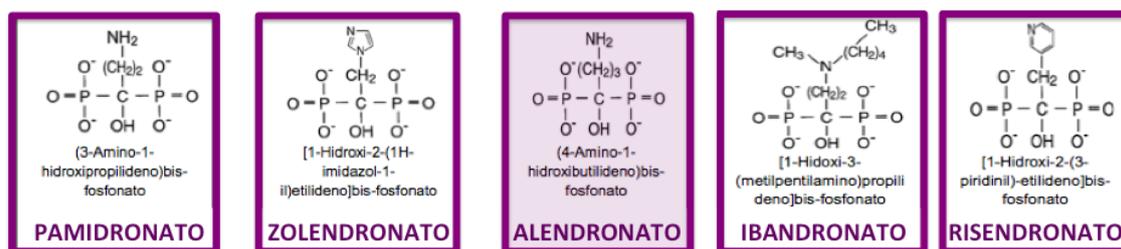


Fig. 16. Fórmulas de los bifosfonatos nitrogenados.

La siguiente tabla (Tabla 5) muestra la formulación de BFs más empleados en la práctica clínica actual, en la que aparece su nombre comercial y el genérico, el laboratorio de fabricación, las dosis existentes, si son nitrogenados o no y su fecha de aprobación por la FDA para su uso en pacientes (Woo SB, 2006; ADA 2006; Montoya JM, 2010).

Nombre genérico	Nombre comercial	Fabricación y localización	Formas de dosificación	Contienen nitrógeno	Fecha de aprobación por la FDA
Etidronato disódico	Didronel® Osteum® Difosfen®	Procter&Gamble Pharmaceuticals Cincinnati, Ohio	Tabletas de 200 y 400 mg	NO	1 de septiembre de 1977
Clodronato disódico	Bonefos® (Canadá)	Schering AG, Berlin, Germany	Tabletas de 400 y 800 mgr Ampollas de 60 mg/mL IV	NO	No aprobado
Tiludronato disódico	Skelid®	Sanofi- Synthelabo Inc. New York	Tableta de 200 mg	No, fracción de zufre	7 de marzo de 1977
Alendronato disódico	Fosamax® Fosavance®	Merck & Co. Inc. Whitehouse station, New Yersey	Tabletas de 5, 10, 35, 70 mg Solución oral de 70 mg/ 75mL	SI	29 septiembre de 1995
Alendronato sodio plus vitamina D3	Fosamax Plus D®	Merck & Co. Inc. Whitehouse station, New Yersey	Tableta de 70 mg y 2800 U cloranfenicol	SI	7 abril 2005
Pamidronato disódico	Aredia® Linoten® Pmifos® Xinsidona®	Novartis Pharmaceuticals Esast Hanover, New Yersey	Viales de 30, 60 y 90 mg IV	SI	31 octubre de 1991
Risedronato sódico	Actonel® Acrel®	Procter&Gamble Pharmaceuticals Cincinnati, Ohio	Tabletas de 5, 30 y 35 mg	SI	27 de marzo de 1998
Risedronato sódico plus calcio	Actonel con calcio®	Procter&Gamble Pharmaceuticals Cincinnati, Ohio	Tabletas de 35 y 500 mg de calcio	SI	12 agosto de 2005
Acido zoledrónico	Zometa® Aclasta®	Novartis Pharmaceuticals Esast Hanover, New Jersey	Viales de 4 mg IV	SI	20 de agosto de 2001
Ibandronato sódico	Boniva® Bondronat®	Roche Laboratories Inc. Nutley, New Jersey	Tableta de 2,5 mg Tableta de 150 mg 3mg/3mL IV	SI	16 de mayo de 2003 24 de marzo de 2005 6 de junio 2006

Tabla 5. Formulación de los bifosfonatos más empleados.

5.3 – Mecanismos de acción de los bifosfonatos

Estudios pioneros en la década de 1960 demostraron que los BFs eran capaces de inhibir la calcificación uniéndose a los cristales de hidroxiapatita (HA), lo que llevó a la hipótesis de que en la regulación de los niveles de BF podría estar implicado el mecanismo por el que se regula la mineralización ósea (Drake MT, 2008).

Los bifosfonatos actúan fundamentalmente inhibiendo la resorción ósea mediante su acción sobre los osteoclastos de dos maneras: disminuyendo la diferenciación y reclutamiento de precursores de los osteoclastos formados a partir de las células hematopoyéticas primitivas y disminuyendo la actividad y funcionalidad de los osteoclastos, y en algunos casos produciendo la apoptosis de estas células.

Los efectos fisicoquímicos de la mayoría de los BFs son muy similares a los de sus análogos naturales PFIs (Drake MT, 2008). Así pues, inhiben la formación y agregación de cristales de fosfato de calcio, incluso a concentraciones muy bajas, bloquean la transformación de fosfato de calcio amorfo a HA y retrasan la agregación de cristales de apatita.

Los BFs también retrasan la disolución de los estos cristales de HA, motivo por el cual se investiga la acción de estos compuestos en la reabsorción del hueso *in vivo* (Fleisch H, 1998).

Los BFs son preferentemente incorporados en las localizaciones donde hay una remodelación ósea activa, lo que comúnmente se produce en zonas caracterizadas por recambio esquelético acelerado.

Además de su capacidad inhibidora la calcificación, los BFs inhiben también la degradación de HA, lo que efectivamente suprime la reabsorción de hueso. Estas propiedades fundamentales de los BFs es lo que ha llevado a su utilidad como agentes clínicos. Más recientemente, se ha sugerido que los BFs también pueden limitar la función de apoptosis de los osteoblastos y la de los osteocitos (Drake MT, 2008).

Sus efectos están mediados por la inhibición de los osteoclastos. Aunque su modo específico de inhibición es desconocido, han sido aportadas varias hipótesis:

- Inhibición del desarrollo de osteoclastos a partir de monocitos.
- Aumento de la apoptosis de los osteoclastos.
- Estimulación del factor de inhibición de osteoclastos.
- Prevención del desarrollo de osteoclastos a partir de los precursores de la médula ósea.
- Reducción de la actividad de los osteoclastos.
- Reducción en la replicación de las metaloproteinasas de la matriz.

Como resultado se produce la reducción de la actividad osteoclástica, junto a la reducción de la reabsorción ósea, apoyando todo esto las indicaciones publicadas. Sin embargo, la osteoclasia normal es vital para el recambio óseo y la viabilidad de los huesos. Los osteocitos se desarrollan a partir de los osteoblastos, los cuales han segregado cristales de HA en una matriz de colágeno mineralizada, conocida como hueso mineralizado, que luego encierra al osteocito.

La osteoclasia normal reabsorbe el hueso no vital y libera citocinas, como la Proteína Morfogenética Ósea (PMO) y los factores de crecimiento de

la insulina 1 y 2 (ILG1 y de ILG2), que normalmente inducen a las células madre mesenquimales, y a los osteoblastos premitóticos, a diferenciarse en hueso activo formando osteoblastos. La interrupción de este ciclo homeostático por la inhibición eficaz en la resorción ósea, da como resultado la acumulación de osteocitos no vitales y microfracturas de la antigua matriz mineral (Marx RE, 2003).

A nivel celular se ha comprobado a través de estudios *in vitro* e *in vivo* que los bifosfonatos interfieren con la diferenciación de células precursoras de osteoclastos maduros (Watts NB, 2003), inhiben el reclutamiento de los osteoclastos, con menor adhesión de los mismos a la superficie ósea, inhiben su activación y estimulan su apoptosis, por lo que su vida media es menor (Hughes DE, 1991; Reszka AA, 1999; Hiroi-Furuya E, 1999; Wang XM, 2000; Senaratne SG, 2000; Suri S, 2001). Por otro lado inhiben la apoptosis de los osteocitos, con lo que aumenta su vida media (Plotkin LI, 1999). En resumen, los bifosfonatos provocan una menor actividad biológica de los osteoclastos y una mayor estabilidad y vida media de los osteocitos.

Los BFs también pueden tener efectos potenciales sobre otras células que intervienen en el proceso de recambio como son los osteoblastos o los osteocitos. Al contrario de lo que ocurre con los osteoclastos, parece que los BFs protegen a los osteocitos de la apoptosis. Experimentalmente, la potencia individual de los BFs en los osteocitos es independiente de su capacidad como inhibidores de la actividad osteoclástica (Russell RGG, 2008).

La vida media de los BFs en la circulación es bastante corta, con un rango que ronda entre los 30 minutos hasta las 2 horas (Senel FC, 2010). Sin embargo una vez incorporados al tejido óseo y encerrados en el esqueleto,

pueden persistir por mucho años, y sólo serán detectados cuando el hueso sea destruido por el recambio del mismo. Aunque la precisión en la determinación de la vida media biológica sigue a debate, debido a la falta de técnicas para determinar los niveles de BFs en orina y suero, las estimaciones; y sobre todo para los BFs más potentes como alendronato; sugieren una vida media biológica en humanos de más de 10 años después de una única dosis intravenosa (IV) (Drake MT, 2008; Senel FC, 2010; Fleisch H, 1998). Debido a la larga vida biológica que presentan los BFs hay que valorar la existencia de efectos adversos de estos tratamientos.

En la homeostasis normal del hueso, la reabsorción osteoclástica está estrechamente ligada a la deposición osteoblástica y ambas funciones son esenciales para la reparación de las microlesiones fisiológicas. El uso prolongado de BFs puede suprimir el volumen de hueso hasta el punto de que tales microlesiones persistan y se acumulen. El resultado es un hueso hipodinámico con una competencia biomecánica disminuida. Aunque la función osteoblástica también se reduce durante el tratamiento con BFs, la mineralización continua genera un hueso duro y frágil con una apariencia osteopetrosa y un mayor riesgo de fractura. Por lo tanto, algunos expertos advierten que los beneficios de un uso prolongado de los BFs deben ser cuidadosamente sopesados frente a los posibles efectos negativos de la supresión excesiva del metabolismo óseo. Otros sostienen que aunque el uso a largo plazo de los BFs puede retrasar la curación de las fracturas o la remodelación lenta del callo de fractura, puede no afectar a la mineralización del hueso o a sus propiedades mecánicas (Woo SB, 2006).

5.4 – Aplicación clínica de los bifosfonatos

Como ya ha sido mencionado anteriormente una de las características farmacológicas más importante de todos los BFs es su extremadamente alta afinidad por el mineral óseo y su consiguiente depósito en el hueso, en relación a otros tejidos. Esta alta afinidad por el mineral óseo permite a los BFs alcanzar una elevada concentración local en todo el esqueleto.

En consecuencia, los BFs se han convertido en los fármacos de tratamiento primario para los trastornos esqueléticos caracterizados por un exceso de remodelación ósea desequilibrada, en la que los osteoclastos, y las actividades de los osteoblastos, no están bien acoplados, lo que lleva a una excesiva reabsorción ósea mediada por los osteoclastos (Drake MT, 2008).

Los BFs son ampliamente utilizados en el tratamiento de las enfermedades óseas como la osteoporosis, enfermedad Paget y la hipercalcemia, así como el dolor óseo relacionado con el cáncer (Melo MD, 2005; Marx RE, 2005; ADA 2006).

Los primeros trabajos clínicos con etidronato fueron hechos en el tratamiento de los desordenes de la calcificación, así como en la miositis osificante progresiva o fibrodisplasia osificante progresiva, y en la enfermedad de Paget, en la cual han demostrado ser notablemente más efectivos que ninguno de los tratamientos previos. Debido a la fuerte afinidad de los BFs por el hueso mineral, otro uso clínico precoz y continuo que se le dio, fue como agente de escaneado del hueso para detectar metástasis óseas y otras lesiones esqueléticas.

Durante los años 70 los BFs empezaron a ser usados como agentes terapéuticos en oncología y han llegado a establecerse ampliamente para el tratamiento y la prevención de complicaciones esqueléticas asociadas con mieloma múltiple o metástasis óseas derivadas del cáncer de mama, próstata, y otros órganos, conduciendo a un aumento en el uso de estos compuestos para la prevención de metástasis óseas (Melo MD, 2005).

En la osteoporosis posmenopáusica, los BFs reducen los marcadores del recambio celular, incrementan la densidad del hueso mineral en la espina lumbar y la cadera, y reduce el riesgo de fracturas de todo tipo. Los BFs también son empleados en el tratamiento de osteoporosis glucocorticoide-inducidas, y en los niños con osteogénesis imperfecta (Russell RGG, 2008).

Los BFs inhiben la acción de los osteoclastos, las células responsables de la desmineralización ósea. También han demostrado inhibir la proliferación de células tumorales y la posible inhibición de la angiogénesis. Estas características añadidas han hecho a los BFs útiles en el tratamiento de las metástasis óseas.

5.5 – Complicaciones asociadas a los bifosfonatos

Los datos publicados de toxicología animal, son escasos, pero la administración aguda, subaguda, y crónica de los BFs ha demostrado en general poca toxicidad. Esto vendría explicado por su rápida incorporación al tejido calcificado y por lo tanto a la corta presencia en la circulación.

Al igual que en los animales, los estudios en humanos han revelado unos pocos efectos adversos significativos, pero se debe tener precaución con

ellos, pues sólo se ven de vez en cuando, y no es seguro que sean realmente causa de los fármacos (Fleisch H, 1998).

Cuando los BFs se administran por vía oral pueden causar dolor de estómago, así como la inflamación y erosiones a nivel del esófago.

Los BFs intravenosos ocasionalmente provocan la aparición de fiebre y síntomas parecidos a la gripe tras la primera infusión sin que se suelen repetir en las perfusiones posteriores.

El efecto secundario más grave de los BFs en el campo de la odontología es la osteonecrosis mandibular.

Osteonecrosis maxilar (ONM)

Desde 2004 (Ruggiero SL, 2004), han aparecido numerosos informes de casos que sugieren asociar que el uso de estos fármacos con una enfermedad llamada Osteonecrosis Mandibular (ONM), que tiene muchas similitudes con la osteomielitis. Si bien han aparecido múltiples publicaciones que relacionan el tratamiento con bisfosfonatos y la ONM (Filleul O, 2010) ya sean para enfermedades hematológicas u osteoporosis (Pazianas M, 2007).

Las recientes revisiones sistemáticas de casos publicados y no publicados indican que el uso de bifosfonatos se asocia con una incidencia de la ONM de menos de 1 de cada 100.000 pacientes tratados por año (Khosla S, 2007), habiendo sido identificados como factores para el desarrollo de la misma, la edad superior a 60 años, el sexo femenino y un tratamiento dental agresivo, previo al tratamiento (Pazianas M, 2007).

Según la American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS), la osteonecrosis maxilar por BFs está diagnosticada en pacientes

con una historia de tratamiento actual o anterior con un bifosfonato, que presenta hueso expuesto no cicatrizado en la región maxilofacial, el cual ha continuado durante más de ocho semanas, sin historia de radioterapia previa en la mandíbula (Erkan M, 2009; Senel FC, 2010). Las ocho semanas de duración coinciden con la franja de tiempo donde la mayoría de los traumas, exodoncias y cirugías orales resuelven con el cierre de los tejidos blandos, y ya no se presentaría hueso expuesto. En el caso de que la lesión sea espontánea, o la historia de su duración se desconozca, el periodo de ocho semanas se empezará a contar desde que la lesión es documentada por un clínico (Khosla S, 2007).

La AAOMS ha creado una clasificación basada en estadios clínicos para categorizar a los pacientes con riesgo de padecer ONM o que ya la están sufriendo, con la intención directa de facilitar las guías de tratamiento, así como recoger los datos y asegurar el pronóstico de estos pacientes. Los diversos estadios son los siguientes:

- **Categoría de riesgo:** pacientes expuestos a BFs orales o IV pero sin evidencias clínicas de hueso expuesto.
- **Estadio 1:** aparece hueso expuesto pero asintomático. No hay evidencia de infección o de inflamación significativa del tejido blando de la zona regional o adyacente.
- **Estadio 2:** caracterizado por hueso expuesto asociado a dolor, e inflamación del tejido blando subyacente, o presencia de infección secundaria.
- **Estadio 3:** hueso expuesto asociado con dolor, inflamación de los tejidos blandos adyacentes, o infección secundaria, junto con fractura

patológica, una fístula extra oral o evidencias radiográficas de la extensión de la osteolisis al borde inferior.

La incidencia se define como el número de nuevos casos dentro de un grupo de población definido y durante un periodo de tiempo predeterminado. La incidencia real de la osteonecrosis maxilar se desconoce actualmente, ya que las cifras difieren entre los distintos autores entre 0,8 - 12% para BFs IV (Bagán J, 2008; Erkan M, 2009). Esta incidencia en tratamientos oncológicos se encuentra en 1 a 10 por cada 100 pacientes (Drake MT, 2008; Estilo CL, 2008). El riesgo de osteonecrosis maxilar parece ser sustancialmente menor entre los pacientes tratados con BFs por vía oral en terapia para la osteoporosis, con una incidencia estimada de aproximadamente 1 de cada 10.000 a 1 de cada 100.000 por paciente y año, aunque esta estimación se basa en datos incompletos (Drake MT, 2008; Bagán J, 2008; Erkan M, 2009). Esto puede ser debido a que el número de pacientes varía de unas series a otras y hay pocos estudios prospectivos. Además hay que tener en cuenta la variación en la vida media de estos fármacos que puede llegar hasta los 10 años, y está todavía por determinar su efecto acumulativo en el hueso (Bagán J, 2008).

También debemos considerar el tipo de BF empleado para el tratamiento de la enfermedad de base. En el caso del alendronato, el BFs más comúnmente prescrito por vía oral, se aprecia una incidencia espontánea de ONM de aproximadamente 0,7 casos por cien mil personas al año expuestas. Pero otro problema añadido para conocer la verdadera incidencia, es que no se suele establecer, una verdadera relación causa y efecto entre ONM y BFs (ADA 2006).

5.6 – Alendronato

El ALN es un aminobisfosfonato cuyo principio activo es el 4-amino-1-hidroxisbutilideno-1,1-bisfosfonato (Figura 17). El alendronato se localiza preferentemente en las zonas de resorción ósea activa mediada por osteoclastos, denominadas "fosas de resorción".

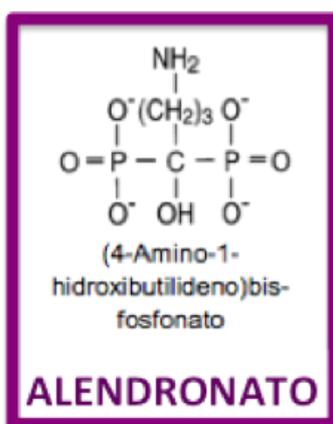


Fig.17. Estructura del Alendronato.

5.6.1 – Propiedades farmacológicas

El alendronato es un bifosfonato de segunda generación, primer fármaco que no sólo previene la pérdida de hueso sino que origina su endurecimiento. Se trata de un potente inhibidor de la resorción ósea, pero a diferencia del etidronato (bifosfonato de la primera generación) no inhibe la mineralización ósea, siendo esta la razón por la que se ha utilizado este compuesto para realizar el presente estudio.

El ALN no se metaboliza en los animales ni en el hombre. Tanto en unos como en otros, la eliminación tiene lugar por excreción renal. La semivida de

eliminación terminal es de aproximadamente un año en la rata, de tres años en el perro y más de 10 años en la mujer osteoporótica.

En el hombre, una dosis oral de 10 mg es tan eficaz como la dosis de 1500 mg de etidronato para reducir la hipercalcemia en las enfermedades óseas tumorales. Tiene una absorción digestiva muy baja por lo que es necesario su administración en ayunas para mantener su biodisponibilidad del 0,76 % con dosis que oscilan entre 5 y 80 mg.

El alendronato está indicado en el tratamiento y la prevención de la osteoporosis en las mujeres post-menopáusicas y para el tratamiento de la enfermedad de Paget. También está indicado en el tratamiento de la osteoporosis inducida por corticoides, y se está investigando su utilidad en la hipercalcemia asociada como la osificación maligna y heterotópica.

A los 3-6 meses del inicio del tratamiento con ALN a 10 mg/día los marcadores bioquímicos de la remodelación ósea disminuyen a valores próximos a la media para las mujeres postmenopáusicas (Bone HG, 2000). En diversos estudios se encontraron incrementos de la densidad ósea en columna vertebral del 8% y en cadera del 7% en un plazo de 3 años, con aumentos algo menores a dosis de 5 mg/día (Lieberman UA, 1995). El seguimiento a largo plazo demuestra que los valores de la Densidad Mineral Ósea (DMO) de la columna vertebral siguen aumentando durante al menos 7 años y que la DMO de otras localizaciones se mantiene, así como los valores bioquímicos de recambio óseo dentro del rango normal para las mujeres premenopáusicas (Tonino RP, 2000).

5.6.2 – Mecanismo de acción

Como otros bifosfonatos, el alendronato inhibe la actividad de los osteoclastos y la resorción ósea. Al unirse a las sales de calcio, el alendronato bloquea la transformación de fosfato de calcio a hidroxiapatita y, por lo tanto, inhibe la formación, agregación y disolución de cristales de hidroxiapatita en el hueso. Mientras que la inhibición de los cristales de hidroxiapatita puede explicar los efectos del fármaco sobre la inhibición de la mineralización ósea observada en dosis altas, no explica sus efectos sobre la resorción ósea, ni se conoce el mecanismo por el cual los bisfosfonatos inhiben esta resorción. El alendronato se localiza preferentemente en los lugares donde hay resorción; sin embargo no interfiere con el reclutamiento y fijación de los osteoclastos. Además, el alendronato es internalizado por los osteoclastos causando la rotura del citoesqueleto de los mismos, con desgaste del borde plegado lo que podría conducir a una pérdida de la capacidad para reabsorber el hueso. El mecanismo molecular de estos efectos no es conocido. Además, los macrófagos y los osteoblastos también pueden intervenir en los efectos del alendronato. Se ha comprobado que el fármaco inhibe la producción de interleukina-1b (IL), IL-6 y TNF por los monocitos (Lourwood DL, 1998).

Se requiere la administración continua de alendronato para mantener la supresión de los osteoclastos sobre la resorción de las superficies óseas recién formadas. En los pacientes con la enfermedad de Paget, el alendronato reduce directamente la resorción ósea lo que termina en una disminución significativa de la fosfatasa alcalina sérica y de los marcadores urinarios de la degradación ósea. El alendronato aumenta ligeramente los niveles de la hormona

paratiroidea. En las mujeres con osteoporosis postmenopáusicas, el alendronato aumenta significativamente la densidad ósea de la espina dorsal y la cadera a los 3 meses, sin que este aumento tenga lugar a expensas de otros huesos esqueléticos.

Para mantener el aumento de la masa ósea, se requiere un tratamiento continuo. Los exámenes histológicos después de un año de tratamiento revelan que la formación ósea es normal tanto en su estructura como en su contenido mineral. Se ha observado en estudios clínicos que el alendronato disminuye la fosfatasa alcalina durante 12 semanas al menos después del tratamiento y las osteocalcinas durante por lo menos 30 semanas. Estas reducciones fueron dosis-dependientes (Harris ST, 1993). El alendronato ocasiona un descenso significativo en los niveles séricos y urinarios de calcio en pacientes con hipercalcemia maligna. Previene la progresión de la enfermedad osteolítica y alivia el dolor óseo severo. En estudios comparativos se ha comprobado que el alendronato es más eficaz que el clodronato en la hiperosteolisis maligna (Rizzoli R, 1992).

5.6.3 – Efectos secundarios

Las reacciones adversas más frecuentes secundarias al ALN son las gastrointestinales tales como dolor abdominal, dispepsia, estreñimiento, diarrea, flatulencia, úlcera esofágica, hemorragia digestiva alta, disfagia, distensión abdominal y regurgitación ácida. También puede producir dolor musculoesquelético, reacciones cutáneas, cefalea, escleritis y uveítis raramente. Son infrecuentes las gastritis, esofagitis y úlceras esofágicas y excepcionales las estenosis esofágica o perforaciones gastrointestinales.

6 ~ OTROS FÁRMACOS O SUSTANCIAS POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA

Existen numerosos fármacos implicados en el metabolismo óseo, utilizados habitualmente en el tratamiento de otras enfermedades, que también pueden tener su implicación en los trastornos que afectan a la calidad y cantidad ósea.

Estos medicamentos o sustancias son muy diversos y numerosos; encontramos desde hormonas, como la Hormona Paratiroidea (PTH) (Esbrit P, 2013) o la insulina (Park AG, 2013); las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Stancoven BW, 2013); proteínas de esqueleto marino (Green DW, 2013); algunos principios activos con propiedades mucolíticas, como la N acetilcisteína (Lee YH, 2013); hasta polímeros como el Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (Nath SD, 2013). Aparecen también estudios sobre unas lactonas esteroideas, los witanólidos, que fueron aisladas por primera vez del “cerezo de invierno” (*Withania somnifera*), en concreto la Witaferina A, (Khedgikar V, 2013).

Otras combinaciones utilizadas en el estudio de la regeneración ósea son la colágena-polivinilpirrolidona (clg-PVP) (Furuzawa CZ, 2005), se trata de una mezcla irradiada por rayos de colágena porcina tipo I ateloapéptica y polivinilpirrolidona (colágena PVP, clg PVP, FIBROQUEL®).

Una familia de compuestos utilizados en el tratamiento del colesterol, las estatinas, están siendo estudiadas en procesos de regeneración ósea obteniendo efectos positivos, en particular la simvastatina (Nath SD, 2013).

Como ejemplo de la ingente información acerca de los agentes en fase de experimentación para la regeneración ósea, hemos constatado que, a fecha 3 de octubre de 2013, realizando una búsqueda en la base de datos *PubMed*, utilizando la siguiente estrategia de búsqueda con las palabras clave “*drugs AND bone regeneration*” se obtienen 1546 resultados.

En la Figura 18 se presenta la gráfica del número de publicaciones existentes en la que podemos observar el crecimiento exponencial que esta teniendo el uso de este tipo de fármacos.



Fig. 18. Gráfica que muestra el crecimiento exponencial en el número de publicaciones sobre estos fármacos.

Es deseable que toda esta inversión de capital humano y financiero en la búsqueda de agentes potenciadores de la regeneración del hueso permita mejorar tanto el abordaje terapéutico como el pronóstico de los pacientes que presentan pérdida de masa ósea.



II. OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos como objetivo general valorar los resultados radiográficos e histológicos de la aplicación tópica de alendronato de sodio combinado con un biomaterial sintético formado por beta fosfato tricálcico (KeraOs®) sobre defectos óseos calibrados en cúbitos de conejos de Nueva Zelanda albinos.

Los objetivos específicos del estudio son:

1. Analizar radiográfica e histológicamente los patrones de regeneración ósea de defectos cilíndricos de 3x3 mm en cúbitos de conejos de Nueva Zelanda albinos para valorar si se consigue una *restitutio ad integrum* a lo largo de un período de seguimiento máximo de 12 semanas.
2. Evaluar el patrón de crecimiento óseo en defectos cilíndricos de 3x3 mm realizados en cúbitos de conejos de Nueva Zelanda albinos, cuando el defecto se rellena con biomaterial sintético formado por beta fosfato tricálcico.
3. Analizar cualitativamente el efecto de la combinación de un biomaterial sintético formado por beta fosfato tricálcico y alendronato de sodio gelificado, sobre la regeneración de defectos óseos cilíndricos de 3x3 mm practicados en cúbitos de conejos albinos de Nueva Zelanda.



III. MATERIAL Y MÉTODO

El título de este capítulo es suficientemente expresivo de su contenido, pues en él se exponen los materiales empleados durante la investigación, así como la metodología de trabajo seguida en el estudio realizado.

1 ~ MATERIALES

Se han utilizado los tres materiales selectivos más aconsejados en investigaciones precedente, con resultados que confirman la bondad científica de los mismos.

1.1 - Biomaterial KeraOs[®]

El biomaterial sintético utilizado en la fase experimental ha sido diseñado y fabricado por la empresa Keramat S.L. (A Coruña. España), con el nombre comercial KeraOs[®], formado por beta-Fosfato Tricálcico (β -TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) con una pureza superior al 99%.

Keramat S.L. es una empresa de base tecnológica fundada en 1999 cuya principal actividad se centra en el diseño, desarrollo, fabricación y comercialización de biomateriales cerámicos para regeneración ósea, con aplicación en los campos de la Odontología, Cirugía Maxilofacial, Traumatología, Neurocirugía y Veterinaria.

La morfología de KeraOs[®] presenta unas características estructurales únicas basadas en su microporosidad, obtenida mediante la aplicación de protocolos de fabricación específicos, presentando la citada microporosidad

magnitudes en torno a $1\mu\text{m}$, junto a un diseño basado en dominios cóncavos y convexos, que conducen a una macroporosidad debido al empaquetamiento de los gránulos en la zona del defecto, con un tamaño medio de poros interconectados de $300\mu\text{m}$, necesario para la adhesión de los factores biológicos de crecimiento implicados en el proceso de regeneración ósea.

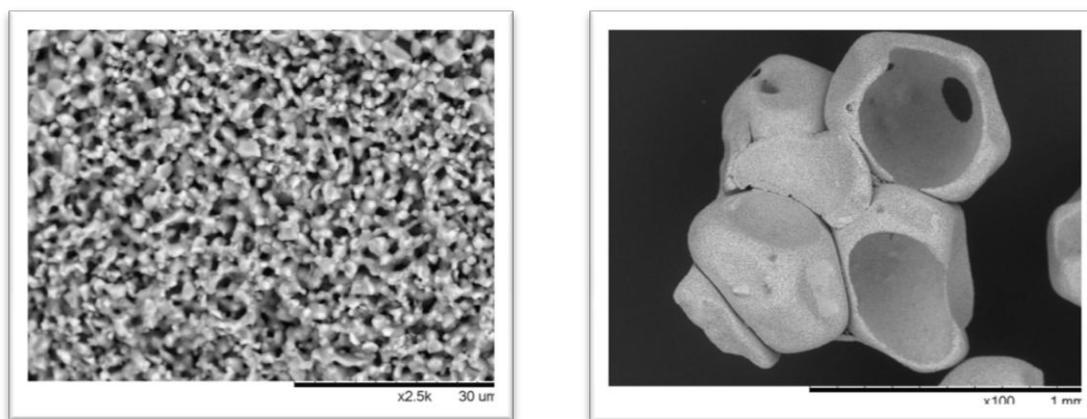


Fig. 1. y Fig. 2. Microestructura del biomaterial KeraOs®.

El biomaterial reacciona superficialmente con el medio fisiológico donde se encuentra, disolviéndose al precipitar la hidroxioapatita en su superficie, lo que condiciona la aparición de osteoblastos y fibras de colágeno encargados de la formación de hueso inmaduro. Éste se estructura y madura, continuando la reabsorción de KeraOs® hasta su total sustitución por hueso neoformado.

Este biomaterial presenta la ventaja de carecer de actividad inmunológica, debido a su origen sintético, lo que permite anticipar los resultados y garantizar la estabilidad regenerativa, consiguiendo máxima efectividad en la regeneración ósea y aumentar la capacidad de osteoconducción, consiguiendo un excelente mantenimiento del volumen y estabilidad primaria del implante (Kerammat S.L., A Coruña).

El KeraOs® está indicado en:

- Rellenos de cavidades óseas post-extracción.
- Reconstrucciones crestales.
- Recubrimiento de fenestraciones.
- Defectos intraóseos en periodoncia.
- Regeneración ósea en expansión.
- Lesiones furcales.
- Exposiciones radiculares.

El producto se presenta envasado en sistema de doble blíster, especialmente diseñado para ser empleado como vaso Dappen, de manera que el profesional pueda hidratar los gránulos de KeraOs® preferentemente con sangre del propio paciente, o suero fisiológico, antes de su aplicación en el defecto óseo. Existen dos formatos en función del tamaño de partícula: de 0.25 a 1.00 mm (presentaciones: 0.5, 1 y 2 cc) y de 1.00 a 2.00 mm (presentaciones: 1 y 2 cc) (Figura 3). Para este trabajo se han utilizado las partículas de 0,25 a 1 mm en presentación de 0,5 cc.



Fig. 3. Formato comercial del biomaterial KeraOs®

1.2 - Alendronato de sodio

La sal sódica del ácido alendrónico ha sido el producto empleado en el trabajo, como solución de alendronato de sodio, fórmula genérica de la casa Normon^{T.M.} que cumple la farmacopea europea 6ª edición (91/155/ CEE), cuya expresión molecular es $C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$ (Figura 4).

El alendronato de sodio es un polvo cristalino de color blanco, soluble en agua, muy poco soluble en metanol y prácticamente insoluble en cloruro de metileno, que presenta un pH entre 4 y 5.

La concentración de compuesto utilizada en la investigación ha sido de 20 mg/ml, para los dos grupos de muestra. Siguiendo las recomendaciones de la patente de Binderman y Yaffe (United States patent. US 2002/0107228. 2002).



Fig. 4. Bote de la presentación del alendronato de sodio (Laboratorios Normon^{T.M.}).

1.3 - Membrana de colágeno

Se ha utilizado una membrana reabsorbible de colágeno Bio-Gide[®], (Figura 5) de la casa comercial Geistlich, para proteger la zona de implantación del biomaterial y evitar el desplazamiento de los gránulos a los tejidos adyacentes, así como para prevenir la contaminación del injerto.

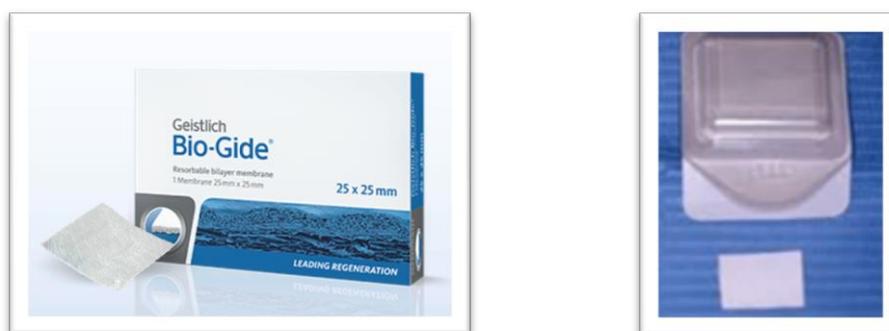


Fig. 5. Membrana de colágeno Bio-Gide[®].

Describimos en este apartado el animal seleccionado en nuestra experimentación, el área de aplicación de los materiales, las instalaciones y la técnica aplicada.

1.4 - Modelo animal de experimentación

De acuerdo con la bibliografía existente, el conejo de Nueva Zelanda albino (Figura 6) constituye un modelo animal reproducible para la valoración de la regeneración ósea, presentando una gran facilidad en el abordaje para la colocación del material regenerativo y la creación de defectos, al ser un animal dócil, de fácil manejo y relativamente económico.

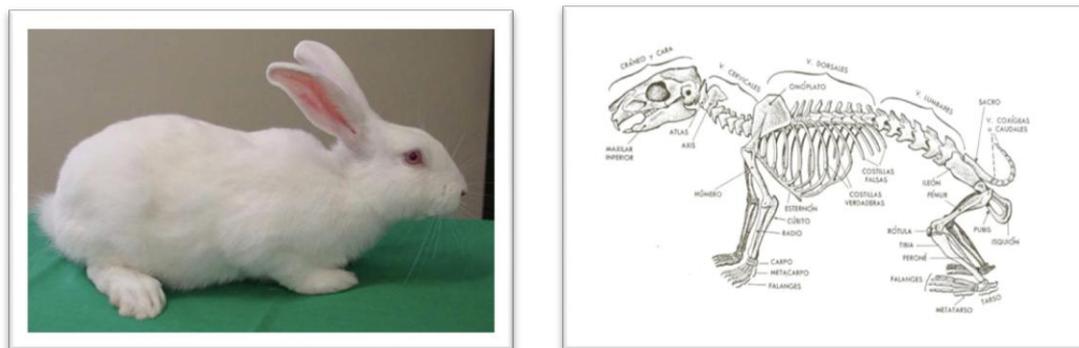


Fig. 6. Foto y esquema del esqueleto del conejo de Nueva Zelanda albino.

En este estudio se ha experimentado con 32 hembras de conejos adultos de raza Nueva Zelanda albinos. La edad de los mismos oscila entre los 20 y los 22 meses de edad. El peso medio de los animales fue de 3,79 Kg (rango: 3 – 5,1 Kg).

Todos presentaron buen estado de salud y permanecieron un mínimo de 14 días en periodo de aclimatación en el Animalario Departamental de la Universidad de Salamanca antes de iniciar el estudio.

Los animales fueron tratados siguiendo las normas de la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y el Consejo, de 22 de julio de 2003 y el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (B.O.E de 21 de octubre de 2005). Actualmente la norma aplicable es el real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, B.O.E. de 8 febrero 2013, en vigor desde el día siguiente de su publicación.

La zona de implantación fue el hueso cúbito, ya que presenta una menor morbimortalidad, al permitir la movilidad del conejo.

1.5 - Instalaciones

La infraestructura experimental básica pertenece al Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, dado que las características del proyecto exigían un espacio adecuado para la experimentación. Este departamento cuenta con:

a) Laboratorios:

- **Laboratorio 1.7** para trabajo con animales de experimentación, dotado de instalación fija de aire acondicionado, mobiliario y elementos necesarios para la realización de modelos experimentales quirúrgicos con animales pequeños y medianos.
- **Laboratorio 1.8a** para el desarrollo de las técnicas de determinación en todo tipo de muestras, dotado de instalación fija de aire acondicionado, gases (O₂ y CO₂), vacío, mobiliario y de todos los instrumentos necesarios para el desarrollo de las técnicas de determinación que se exponen más adelante.
- **Seminario** para mantener reuniones de trabajo, dotado de sistema informático, con sistemas de proyección fijos y mobiliario.
- **Almacén** para el material fungible.

b) Instrumentos:

Limpieza y esterilización:

- Sellador de bolsas de autoclave (Selecta Sealcom 600).
- Esterilizador por gases Amprolene AN74i.

- Autoclave Raypa Steam Sterilizer.
 - Baño de ultrasonidos Branson 2510.
- c) Anestesia:
- 2 ventiladores para pequeños animales SRI.
 - 4 bombas de infusión Braun.
- d) Cirugía:
- Lupa quirúrgica NIKON con sistema de vídeo incorporado.
 - 2 aspiradores portátiles semiautomáticos.
 - 2 mesas de quirófano robotizadas para animales medianos.
 - 2 bisturíes eléctricos.
 - Fuente de luz fría Schott.
- e) Almacenamiento de muestras y reactivos:
- Congelador -80°C: Forma Scientific -86 freezer.
 - 3 Congeladores -20°C.
 - 3 Refrigeradores 4°C.
- f) Estabulación de animales:
- Animalario Departamental de la USAL.
- g) Equipamiento general:
- Termodesinfectador Miele.
 - Armario de seguridad para productos inflamables y corrosivos.
 - Balanza de precisión: Precisa 205^a.
 - Material informático al uso para todos los sistemas especificados.

2 ~ MÉTODO

2.1 - Técnica experimental

El protocolo experimental realizado en este trabajo cuenta con el apoyo del Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca y con el comité de bioética (expediente núm. 251. 3 junio 2010).

2.1.1 – Protocolo anestésico

Se realizó una sedación con diazepam intramuscular (Valium® 10 mg/ml) y una instauración anestésica mediante Ketamina intramuscular (Ketolar® 50 mg/ml) (Figura 7), tras la cual se practicó una anestesia local infiltrativa de Articaína con Epinefrina al 4% (0.12 mg/kg) (Artinibsa®) (Figura 8).



Fig. 7. Ampollas de Diazepam (10 mg/2 ml) y Ketamina (50 mg/ml) utilizadas en la sedación y anestesia de los animales.



Fig. 8. Fotos del anestésico local (Artinibsa[®]) y del sistema de inyección (aspijet[®])

2.1.2 – Protocolo quirúrgico

Material quirúrgico:

Se han empleado materiales quirúrgicos utilizados habitualmente en el campo de la odontología y la implantología oral, como son:

- Jeringa de anestesia local autoaspirativa (Aspijet[®]).
- Bisturí (hoja nº 15).
- Periostotomo Goldman-Fox.
- Periostotomo Prichard.
- Blefarostato.
- Pinzas de Adson con y sin dientes.
- Tijera de disección.
- Porta-agujas de Mayo.
- Tijera de hilos de Mayo.
- Caja quirúrgica de implantes dentales:
 - fresa de inicio de lanza.
 - fresa de 1.5 mm de diámetro.
 - fresa de 2 mm de diámetro.
 - fresa de 3 mm de diámetro.

- Vaso Dappen.
- Cucharilla de legrado.
- Sutura reabsorbible (poliglactina trenzada - Vicryl® 5/0).
- Sutura no reabsorbible (seda 4/0).

Técnica quirúrgica:

A todos los animales se les aplicó el mismo protocolo quirúrgico bajo sedación, anestesia general y local, de forma aséptica en el laboratorio del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca (Figura 9).

La zona de implantación, como ya se ha indicado, fue la diáfisis de ambos cúbitos. Tras realizar una incisión lineal con bisturí, se disecó por planos (Figura 10), bajo irrigación con suero salino fisiológico a 18°C, practicando 2 ostectomías estandarizadas cilíndricas de 3 mm de diámetro y 3 mm de profundidad en cada cúbito, con una separación mínima de 2 mm, iniciadas con una fresa de lanza de implantes, denominada fresa guía o de inicio, que marca el orificio (Figura 11) y se prosiguió ensanchando el orificio con fresas de menor a mayor diámetro progresivamente, hasta alcanzar los 3 mm (Figura 12).

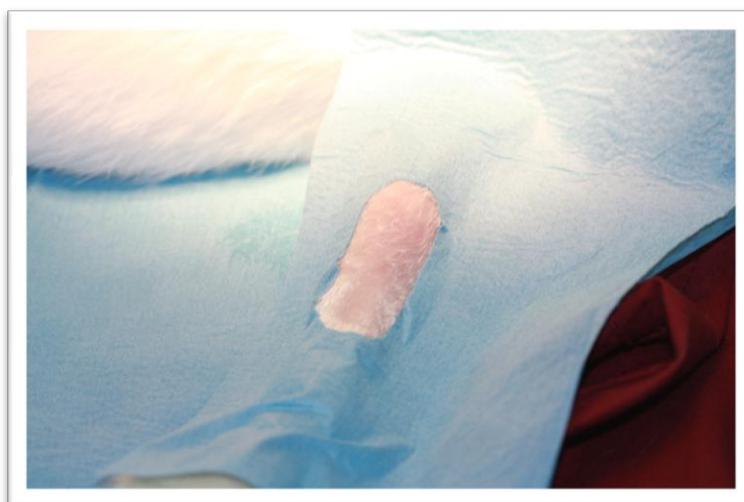


Fig. 9. Aislamiento del campo quirúrgico.



Fig. 10. Incisión lineal.



Fig. 11. Marcas realizadas con la fresa de inicio.



Fig. 12. Aspecto final de las dos osteotomías.

En total se realizaron 4 ostectomías en cada animal, 2 en cada cúbito, una proximal y otra distal, con el fin de obtener 4 muestras distintas para estudio. De manera aleatoria se optó por el cúbito derecho o izquierdo como emplazamiento del biomaterial o del alendronato.

En el cúbito se seleccionan igualmente de manera aleatoria la ostectomía proximal o distal para la colocación del biomaterial, que llamaremos a partir de ahora *Muestra Biomaterial (B)*, en la que se colocará únicamente el KeraOs®; y en la otra ostectomía, que llamaremos *Muestra Control (C)*, no se colocará ningún material, permitiendo que la cicatrización y regeneración ósea se realice siguiendo su curso normal. Debemos señalar que el defecto realizado al hacer la ostectomía se acerca al rango del defecto crítico en extremidad de conejos de Nueva Zelanda albinos, por lo que previsiblemente no existirá regeneración.

Igualmente, se selecciona de manera aleatoria la ostectomía proximal o distal para la colocación del gel de alendronato, que llamaremos a partir de ahora *Muestra Alendronato (A)*; y en la otra ostectomía, que llamaremos a partir de ahora *Muestra Alendronato + Biomaterial (A+B)*, se colocará el biomaterial KeraOs® junto con el gel de alendronato (Figura 13).

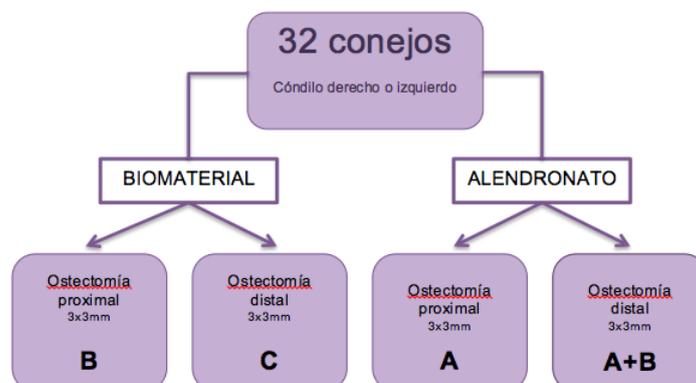


Fig.13. Gráfica de las muestras de estudio.

Como ya hemos señalado anteriormente en las muestras **A** y **C**, donde no se colocó biomaterial, previsiblemente no habrá regeneración ósea, ya que la ostectomía se acerca al rango de defecto crítico en extremidad de conejos de Nueva Zelanda. Estas muestras no han sido estudiadas, tras verificar que no existe regeneración de los defectos realizados en ninguno de los grupos de seguimiento.

En este trabajo se van a analizar y comparar únicamente las muestras **B** y **A+B**, en las que sí existen fenómenos de síntesis, regeneración y remodelación ósea.

Las cirugías de cada animal se realizaron simultáneamente en ambos cúbitos, colocándose el biomaterial KeraOs® (Figura 14) mediante una cucharilla de legrado (Figura 15) en el seno de las ostectomías realizadas (Figura 16).



Fig. 14. Vaso Dappen con el biomaterial KeraOs®.



Fig. 15. Cucharilla de legrado para la colocación del biomaterial.



Fig. 16. Aplicación del biomaterial KeraOS® sobre el defecto óseo.

Impregnamos con gel de alendronato el biomaterial KeraOs® antes de colocarlo en el defecto correspondiente **A+B** (Figura 17). Y en la ostectomía de la muestra **A**, utilizamos una jeringuilla para vehiculizar el gel (Figura 18).



Fig. 17. Vaso Dappen con gel de alendronato y biomaterial KeraOs®.



Fig. 18. Gel de alendronato vehiculizado con jeringuilla.

Tras la implantación de los materiales se colocó una membrana de colágeno (Bio-Gide®) para evitar el desplazamiento y la contaminación de los mismos (Figura 19). Los planos musculares se suturaron con sutura absorbible de 5/0 (Vicryl® Ethicon) (Figura 20). El tejido subcutáneo y la piel (Figura 21) se cerraron con material trenzado no absorbible 4/0 (Mersilk®. Ethicon) (Figura 22).

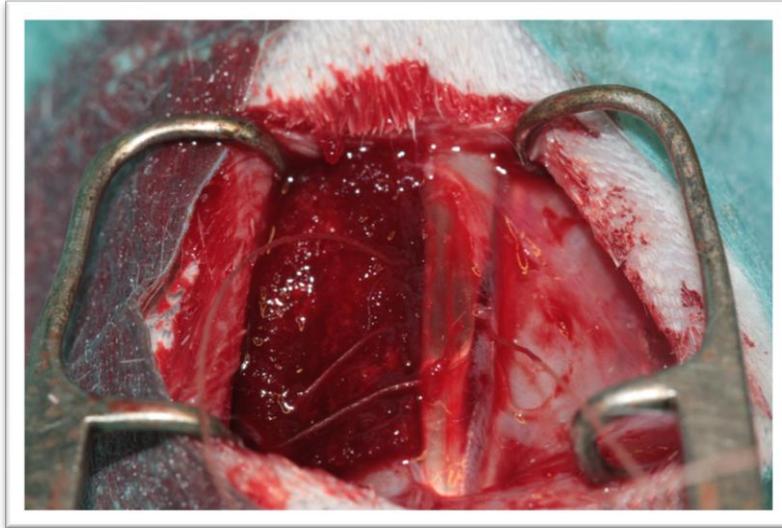


Fig. 19. Membrana de colágeno colocada e inicio de la sutura con Vicryl®.



Fig. 20. Sutura reabsorbible Vicryl® 5/0.



Fig. 21. Sutura cutánea con puntos simples de seda.



Fig. 22. Sutura irreabsorbible de seda 4/0.

Una vez finalizada la cirugía se colocó un vendaje no compresivo en ambas patas delanteras de los conejos, para minimizar el movimiento de la articulación.

Durante la primera semana de seguimiento los animales se controlaron diariamente en el Animalario Departamental de la Universidad de Salamanca.

2.2 – Seguimiento y recogida de muestras

El seguimiento de los animales se hizo durante 13 semanas, subdividiendo los conejos en cuatro subgrupos para analizar el grado, calidad y velocidad de la osteogénesis entre las muestras tratadas con biomaterial únicamente (**B**) y las muestras tratadas con la mezcla de biomaterial y alendronato (**A+B**).

Fueron divididas las muestras en dos grandes grupos: el grupo 1 formado por todas las muestras con biomaterial **B**, y el grupo 2 compuesto por las muestras que contenían biomaterial y alendronato **A+B**. Estando cada uno

de ellos formado a su vez por 4 subgrupos, correspondientes al tiempo de seguimiento, tal y como se detalla en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tiempo de seguimiento	GRUPO 1 BIOMATERIAL	GRUPO 2 BIOMATERIAL + ALENDRONATO
4 semanas (5d, 2 sem, 5 sem)	Subgrupo 1A n = 12	Subgrupo 2A n = 12
6 semanas (7 sem)	Subgrupo 1B n = 10	Subgrupo 2B n = 10
9 semanas (10 sem, 11 sem)	Subgrupo 1C n = 5	Subgrupo 2C n = 5
12 semanas (13 sem)	Subgrupo 1D n = 5	Subgrupo 2D n = 5

Tabla 1. Subdivisión de grupos de animales de experimentación (Grupo 1 y Grupo 2), según el periodo de seguimiento.

Durante la primera semana del periodo postoperatorio, fue observado dos veces al día el estado general del animal de estudio, y posteriormente hasta el final del trabajo las revisiones fueron realizadas diariamente en el Animalario de la Universidad de Salamanca.

Tras el periodo de seguimiento de cada grupo se sacrificaron los animales para tomar las muestras de la regeneración ósea. Las eutanasias de los animales siguieron el protocolo del animalario Departamental de la Universidad de Salamanca, mediante pentobarbital sódico endovenoso (EV) en dosis de 60 mg/Kg.

2.2.1. Manejo de las muestras

Una vez aisladas las partes de estudio donde estaban implantados los materiales, se realizó la limpieza de los tejidos y se fijaron en formol salino al 4%.

Las muestras fueron remitidas individualmente al Departamento de Anatomía e Histología Humanas (Laboratorio de Histología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Todas las muestras obtenidas fueron numeradas y clasificadas según el grupo al que pertenecían y el tiempo de seguimiento (Tabla 2).

TIEMPO DE SEGUIMIENTO	Nº MUESTRA GRUPO1 (CEMENTO)	Nº MUESTRA GRUPO 2 (CEMENTO +ALENDRONATO)
5 días	54	55
2 semanas	57	56
4 semanas	58, 61, 63, 64, 79, 81, 82	59, 60, 62, 65, 78, 80, 83
5 semanas	44, 74, 66	45, 75, 77
6 semanas	31, 33, 34, 71, 73	30, 32, 35, 70, 72
7 semanas	48, 53, 85, 86, 89	49, 52, 84, 87, 88
9 semanas	28, 46, 51	29, 47, 50
10 semanas	27	26
11 semanas	43	42
12 semanas	39, 40, 66, 68	38, 41, 67, 69
13 semanas	36	37

Tabla 2. Distribución exacta del periodo de seguimiento en cada conejo (numeración de la muestra).

2.3. – Protocolo radiológico

Preparación

Una vez recibidas las muestras óseas, se lavaron con suero fisiológico para eliminar restos de formol y se realizaron las radiografías de las piezas completas (Figura 23).

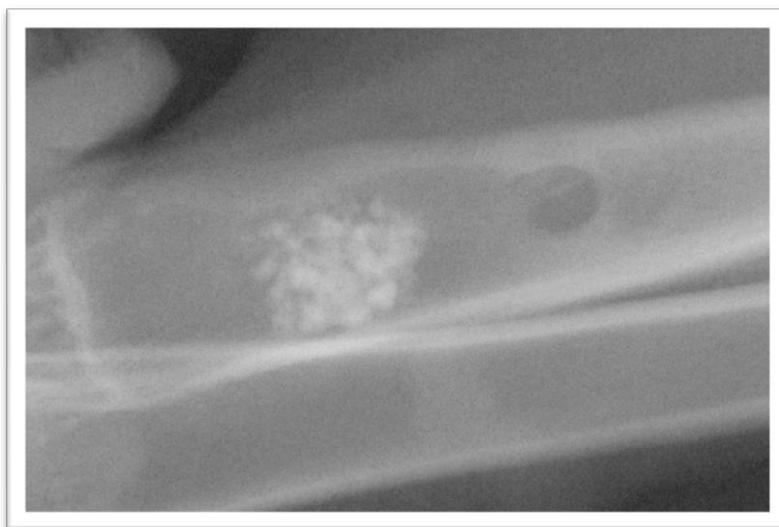


Fig. 23. Radiografía del cúbito del animal número 26: Se observa el orificio distal vacío y el cemento colocado en el lecho proximal.

Técnica empleada

Para la realización de todas las radiografías digitales se empleó un aparato de rayos X portátil (Modelo adx4000 de la marca Dexco).

2.4. – Protocolo histológico

Fijación

Una vez radiografiados, los huesos se post-fijaron en formol salino al 10%, hasta que se realizó el procesado de las muestras, no descalcificadas, para su estudio histológico momento en el que las piezas óseas se volvieron a

lavar con suero fisiológico y se realizó un serrado macroscópico en porciones que incluyeron hueso normal, hueso neoformado y material implantado (Figura 24).

Las porciones óseas se introdujeron en cassettes (Figura 25), adecuadamente etiquetados, y se deshidrataron empleando disoluciones de graduación creciente de etanol (70°, 80°, 90° y 95°), estando embebidas cada día en cada una de ellas, hasta llegar a etanol absoluto, donde se mantuvieron durante 48 h.

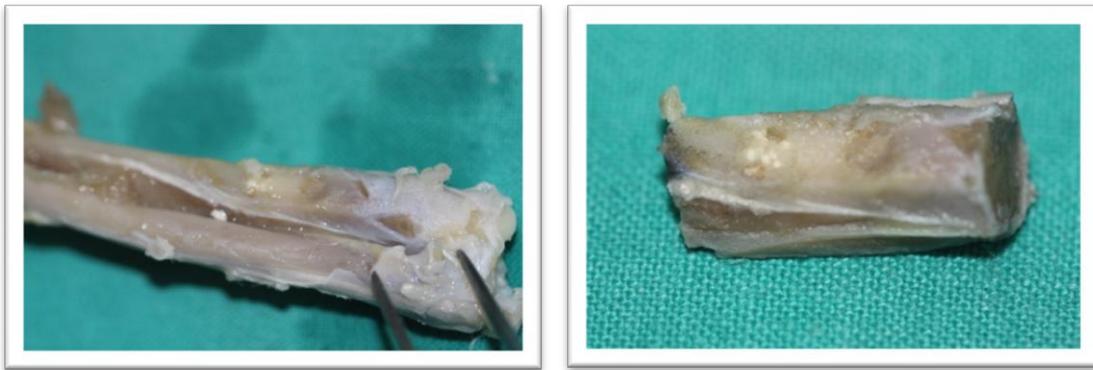


Fig. 24. Corte de la muestra nº 57.



Fig. 25. Introducción en cassette de la pieza nº 57.

Inclusión

La inclusión de las muestras óseas se realizó en metilmetacrilato en estado líquido durante 15 días a 4°C y en agitación.

Los componentes de dicho metilmetacrilato son:

- 800 ml M-metacrilato (monómero estabilizado de hidroquinona).
- 160 ml Nonifenol poliglicol-éter acetato (Plastoid N).
- 16 ml Dibutil-ftalato.
- 40 g Peróxido de benzoilo (este catalizador se adiciona de inmediato).

Una vez preparada la mezcla se guardó en un frasco cerrado y en nevera a 4°C.

Por otro lado se prepararon unos cilindros de vidrio con una base de metilmetacrilato polimerizado que fueron empleados como soporte para la posterior inclusión de las muestras de tejido óseo. Para ello, los tubos de vidrio se rellenaron con la mezcla de metilmetacrilato hasta una altura de 2.5 cm, se cerraron herméticamente con parafilm y se dejaron en la estufa a 32°C durante 2 o 3 días para que polimerizase.

Una vez que las piezas óseas fueron incluidas en metilmetacrilato líquido, se pasaron a los cilindros con bases de metilmetacrilato ya polimerizado. Utilizando un tubo con la base de metilmetacrilato se introdujo la pieza ósea, siendo muy importante su orientación, junto con una etiqueta de papel cebolla con la referencia de la muestra, se recubrió de metilmetacrilato líquido, se etiquetó el tubo por fuera, y se tapó con parafilm para que no entrara aire, tras lo cual se introdujeron los tubos en la estufa a 32°C para su polimerización durante 5 - 6 días.

Seguidamente se rompió el tubo de vidrio, quedando el bloque polimerizado con la muestra ósea que iba a ser cortado con una sierra de cinta para desbastar la muestra, antes de realizar los cortes definitivos (Figura 26).

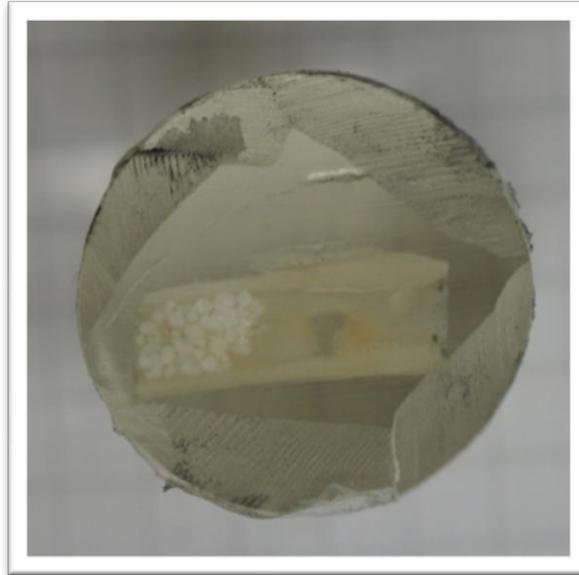


Fig.26. Fotografías las piezas óseas embebidas en los bloques de metilmetacrilato.

Corte de las muestras

El bloque fue serrado y lijado para obtener un tamaño que permitiera su manejabilidad, y se colocó en el microtomo (Microm HM 350 S) (Figura 27).

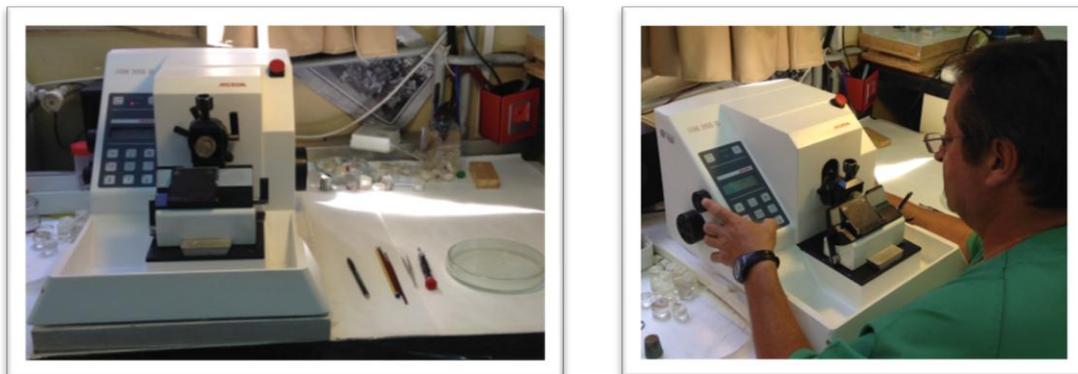


Fig.27. Microtomo. Técnico realizando cortes.

Tanto el bloque como la cuchilla se pincelaron con alcohol de 70° constantemente para mantenerlos humedecidos durante el proceso. Los primeros cortes se realizaron con un grosor de 30 μm hasta llegar a la pieza ósea, momento a partir del cual se comenzó a cortar a 5 μm , desechando los primeros cortes obtenidos.

La gelatinización de los portaobjetos se realizó calentando el agua a 55°C para disolver la gelatina. Una vez enfriado se añadió glicerina y fenol. Para gelatinizar el porta se puso una gota de gelatina sobre él y se extendió con ayuda de otro porta.

Los cortes de 5 μm se colocaron sobre un portaobjetos previamente gelatinizado con gelatina de Haupt (Composición gelatina de Haupt: 1 g de gelatina, 100 ml de agua destilada, 15 ml de glicerina, 2 g de fenol) y fueron impregnados por encima con unas gotas de alcohol de 95° y, pasados 5 minutos, se cubrieron con un film de polietileno y se aplanaron con un rodillo de goma para que el film cubriera toda la superficie del portaobjetos, donde se encontraba el corte.

Los portas se fueron colocando uno encima del otro en una prensa con soportes de madera o metacrilato de 5 a 8 mm de grosor. Apretando la prensa hasta encontrar resistencia, momento a partir del cual se mantuvieron en la estufa 24 h a 60° C. Transcurrido ese tiempo, se quitó el film de polietileno que cubría el portaobjetos, y se desplastificó el corte introduciendo los portas en una solución de metil-acetato durante 55 minutos. Posteriormente, se lavaron en soluciones decrecientes de alcohol (100 - 70%) y por último, se procedió a la tinción de las muestras: tinción Tricrómico de Goldner y tinción de Von Kossa.

Protocolo de tinciones

Las microfotografías que se presentan en este trabajo han sido realizadas con las técnicas que se exponen a continuación, por lo que se obviará su descripción en cada una de las figuras presentadas.

TRICRÓMICO DE GOLDNER (Figura 28 y 29)

Para esta técnica de tinción se ha utilizado la Hematoxilina férrica de Weigert 5': formada por dos compuestos:

Weigert A (concentrada x2):

Hematoxilina (2g) + Alcohol 96o (100ml).

Weigert B:

Percloruro de hierro (1,16g)

HCl (10ml) + Agua destilada (5ml): 1ml

Agua destilada 98ml

Mezclar a partes iguales las soluciones A y B sólo antes de su uso. Se introducen los portas con el material a estudiar en la solución de hematoxilina y posteriormente se siguen los siguientes pasos:

- Agua corriente 10'.
- Ponceau de xilidina 40':
 - 200 ml agua destilada.
 - 2 g Ponceau de xilidina.
 - 0,4 ml ácido acético glacial.
 - 1 g fucsina ácida.
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.

Se diferencian las preparaciones histológicas con ácido fosfotungstico - Orange G 10´:

200 ml agua destilada.

2 g ácido fosfotungstico.

1 g orange G.

- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Verde luz 15´:

200 ml agua destilada

0,4 g verde luz

0,4 ml ácido acético glacial

- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Deshidratar y montar



Fig. 28. Técnica de Tricrómico de Goldner (materiales utilizados).

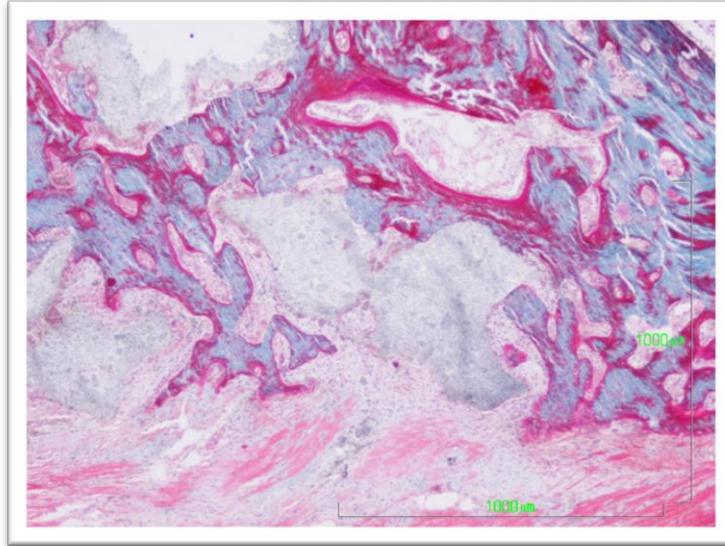


Fig. 29. Imagen obtenida con la técnica del Tricrómico de Goldner (4x).

Con esta tinción observamos la sustancia osteoide en rojo o fuxia y el hueso en azul turquesa.

VON KOSSA (Figura 30)

Los portas con el material óseo a estudiar se procesaron en las siguientes soluciones durante los tiempos adecuados como se indica:

- Nitrato de plata al 3% durante 5 min.
- Agua destilada x2 veces durante 5 min.
- Formol-carbonato de sodio durante 5 min:
 - 10 mg de carbonato de sodio.
 - 150 ml de agua destilada.
 - 50 ml de formaldehído al 37%.
- Agua corriente 10 min.
- Sulfato de sodio al 5%, 5 min.
- Agua corriente, 10 min.
- Ponceau de xilidina 45 min.

- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Diferenciar en ácido fosfotúngstico-Orange G 15 min.
- Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- Lavado rápido en agua destilada.
- Deshidratar y montar.

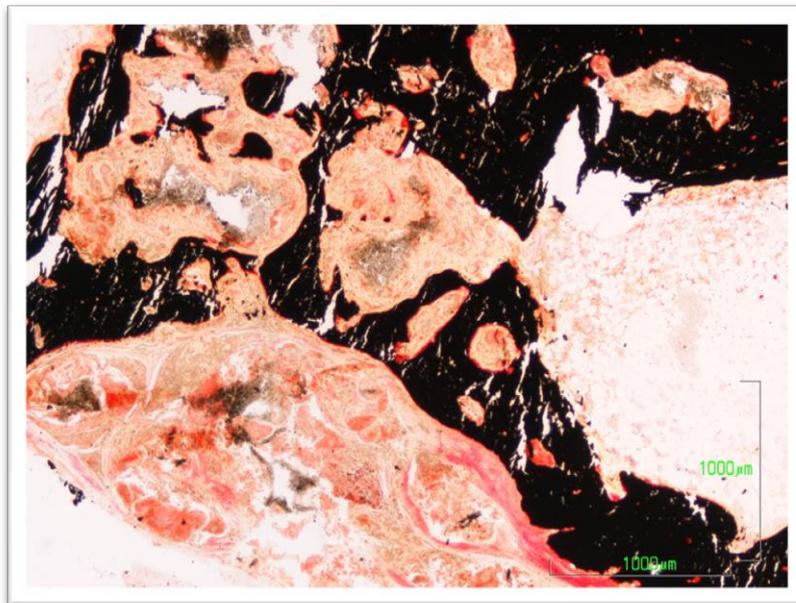


Fig. 30. Imagen obtenida con la técnica de Von Kossa (2x).

Con la tinción de Von Kossa observamos en rojo anaranjado la sustancia osteoide y en negro el hueso mineralizado.

Protocolo fotográfico

Las fotografías de las preparaciones histológicas teñidas tanto con Tricrómico de Goldner como con Von Kossa, se efectuaron mediante una lupa Zeiss Stemi 2000-C con una fuente de luz Zeiss KL1500 electronic acoplada a

una cámara Nikon digital camera DXm 1200, de este modo se obtiene una imagen completa del corte histológico (Figura 31).

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se captaron utilizando una máquina fotográfica Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon eclipse 90i, y digitalizadas directamente por un programa capturador de imágenes MetaMorph Meta Imaging Series 6.1.

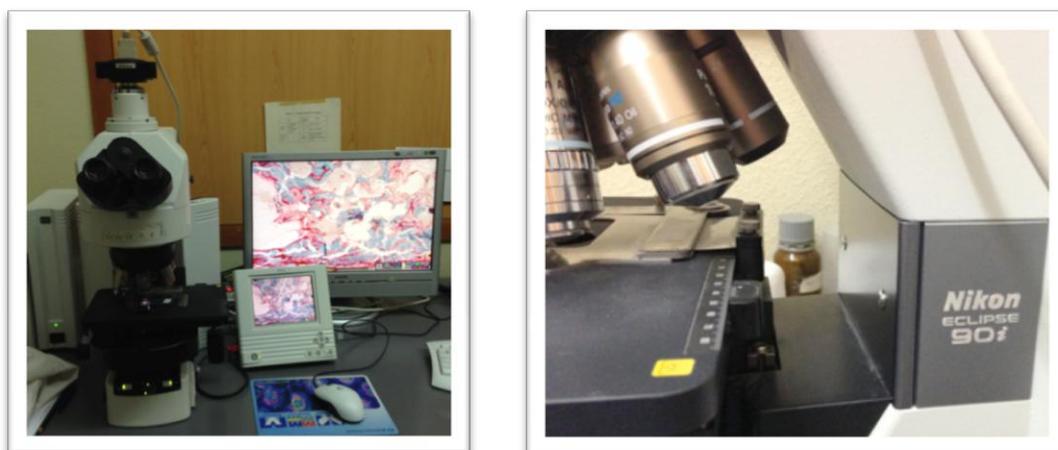


Fig. 31. Cámara fotográfica Nikon acoplada al microscopio óptico.

2.5. VARIABLES DE RESULTADO

Para este estudio hemos utilizado dos tipos de variables, una en función de las radiografías realizadas el día de la eutanasia en el tiempo de seguimiento correspondiente, realizando una valoración cualitativa directa del operador; y otra histológica siguiendo el método utilizado por Kaynak.

Este método semicuantitativo-cualitativo subjetivo, similar al descrito por Kaynak, siguiendo los nueve parámetros que se exponen a continuación:

1. Presencia de restos de los materiales implantados (cemento y ALN).
2. Presencia de signos de inflamación.
3. Presencia de signos de necrosis.
4. Presencia de regeneración de la cortical diafisaria.
5. Presencia de líneas de osteoide.
6. Presencia de macrófagos con restos del material implantado en su citoplasma.
7. Presencia de células gigantes.
8. Presencia de calcificación del tejido óseo neoformado.
9. Presencia de gránulos de material implantado encapsulados por tejido conectivo.

Se valorarán estos parámetros en función de si están presentes en los cortes histológicos o no, y en qué grado, según la escala:

- ausencia, * leve, ** moderado, ***abundante



IV. RESULTADOS

La exposición de los resultados se realizará de acuerdo a la sistemática siguiente, en primer lugar se describirán los hallazgos correspondientes a los distintos grupos experimentales: Grupo I (cemento) y Grupo II (cemento más alendronato), por orden cronológico y dentro de cada grupo se describirán primero los hallazgos radiológicos posteriores a las eutanasias para a continuación exponer los hallazgos histológicos en microscopía, de una manera descriptiva.

De los 32 conejos, 2 murieron antes de haber alcanzado el seguimiento previsto, no obstante han sido evaluados como parte de un ensayo piloto de los métodos de análisis radiográficos e histológicos, y forman parte del subgrupo A.

1- GRUPO I (CEMENTO)

El grupo 1 está constituido por aquellos animales a los que en la intervención quirúrgica tras practicarles la ostectomía se les colocó únicamente el cemento. Dentro de este grupo los animales, tal y como muestra la Tabla 2 de Material y Método, se concentraron en subgrupos con intervalos de tiempo de supervivencia de 4 semanas (n=8), 5 semanas (n=3), 6 semanas (n=5), 7 semanas (n=5), 9 semanas (n=3) y 12 semanas (n=4) y a efectos de seguimiento se presentan menor número de casos a 5 días (n=1), 2 semanas (n=1), 10 semanas (n=1), 11 semanas (n=1) y 13 semanas (n=1).

Se describirán en primer lugar aquellos subgrupos que presentan mayor número de casos, 4, 6, 9 y 12 semanas, utilizando el resto de muestras con las

fechas de menor número de casos para suplir los posibles defectos en la cronología de la lesión.

1.1 - Subgrupo 1A (4 - 5 semanas y n=10)

Este subgrupo está formado por 10 animales cuya numeración se presenta en la Tabla 2 de *Material y Método*.

La Figura 1 constituye la imagen radiológica representativa de la lesión a las 4 semanas de la colocación del cemento del caso 63. El aspecto radiográfico de un defecto sin rellenar presenta a la derecha la diáfisis con una marcada reacción perióstica suprayacente, y a la izquierda la lesión rellena de KeraOs[®] que adapta la morfología de pequeños gránulos redondeados con espacios más claros entre ellos. Los gránulos se han extendido en el interior de la cavidad medular. No observándose gránulos de cemento en el exterior de la pieza ósea.

Para este subgrupo de seguimiento el estudio histológico revela a bajo aumento (2X) que de fuera a dentro de la lesión se evidencia una reacción conectiva, asociada al periostio (Figura 2). La cortical diafisaria no se ha regenerado, si bien existe un pequeño puente de tejido óseo neoformado en la porción interna medular, así mismo se observan gránulos de cemento constituidos por un material amorfo, pulverulento (Figura 2). A mayor aumento (4X) se ve el contorno irregular de las espículas óseas neoformadas asociadas a los gránulos de cemento, mostrando contacto directo entre el tejido óseo y el cemento, y en otras zonas, asociación del cemento con tejido conectivo (Figura 3). El tejido óseo prosigue su proceso de neoformación (Figura 3). El estudio

detallado (10X) permite (Figura 4) delimitar la interfase cemento-tejido conectivo, más celular en la vecindad del cemento y más fibroso según nos alejamos del gránulo de cemento (Figura 4). El tejido conectivo en la vecindad de cemento adopta la morfología de proyecciones a modo de papilas que se introducen en el espesor del cemento (Figura 5). El tejido óseo situado en la vecindad del cemento, no muestra signos de síntesis ósea encontrándose ésta en las caras de la trabécula ósea alejadas del cemento (Figura 5 y Figura 6). La síntesis ósea se caracteriza por la presencia de una banda de osteoide con osteoblasto englobado (Figura 6), hilera de osteoblastos (Figura 6) y médula ósea hematopoyética (Figura 6). En la otra cara de la trabécula se observa tejido óseo primario, inmaduro, en contacto directo con el cemento (Figura 6). En otras zonas se observa la relación del cemento con tejido conectivo celular constituido por células de hábito fibroblástico y macrófagos (Figura 7). Es posible observar zonas de formación inicial de hueso inmaduro (Figura 7). A mayor aumento el estudio de las papilas conectivas (Figura 8) muestra la población celular fibroblástica y los macrófagos que albergan material granugiento similar al cemento en su citoplasma (Figura 8). Este material se observa también en algunas células de hábito osteoblástico en relación con la síntesis ósea (Figura 9) aunque en otras áreas no está presente (Figura 10).

En la cavidad medular se observan los gránulos de cemento (Figura 11) rodeados fundamentalmente por tejido conectivo celular (Figura 11) y en ocasiones se presenta alguna espícula ósea neoformada (Figura 12). La vascularización es normal (Figura 11) y entre las células fibroblásticas se encuentran numerosos adipocitos (Figura 12). A mayor aumento (20X) se

observa el cemento, las trabéculas óseas neoformadas inmaduras (Figura 13) y algunas células multinucleadas (Figura 13).

La técnica de Von Kossa (Figura 14) corrobora los hallazgos previamente descritos con la técnica de tricrómico de Goldner y demuestra que el hueso neoformado no es deficiente en calcio, es de tipo inmaduro, no laminar y el cemento presenta apetencia por la plata (Figura 14).

En resumen en este subgrupo, se observa, persistencia del cemento, leve inducción de la osteogénesis, buena tolerancia citológica, no se observan fenómenos inflamatorios, ni necrosis, la presencia de macrófagos es habitual y ligada a la reabsorción del cemento, existen pocas células multinucleadas, la vascularización es normal y no se encuentran fenómenos de encapsulación de cemento por parte del tejido conectivo. La cortical diafisaria del orificio quirúrgico no está regenerada, sólo hay presencia de tejido conectivo.

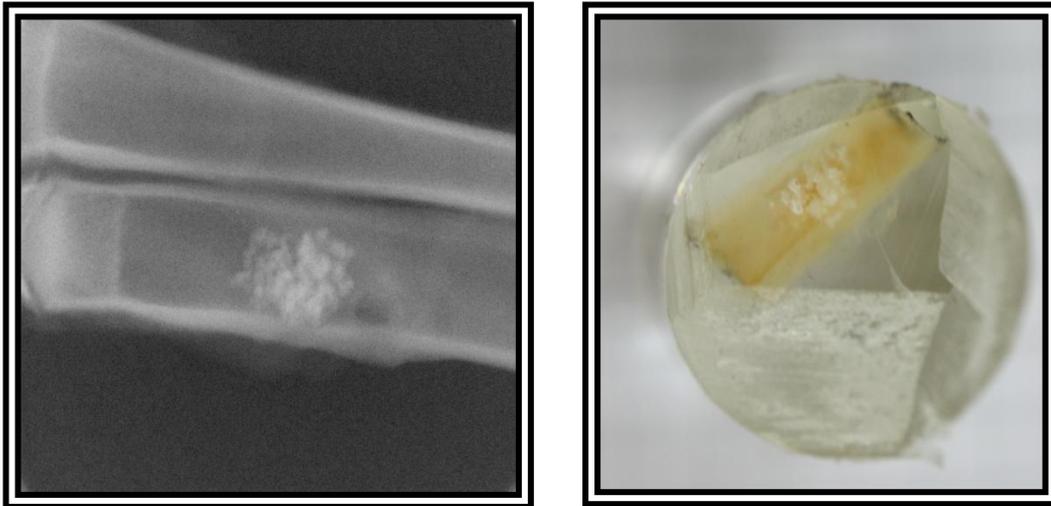


Fig. 1. Radiografía de la inyección de cemento con una supervivencia de 4 semanas y cilindro de metacrilato con la pieza del animal nº 63.

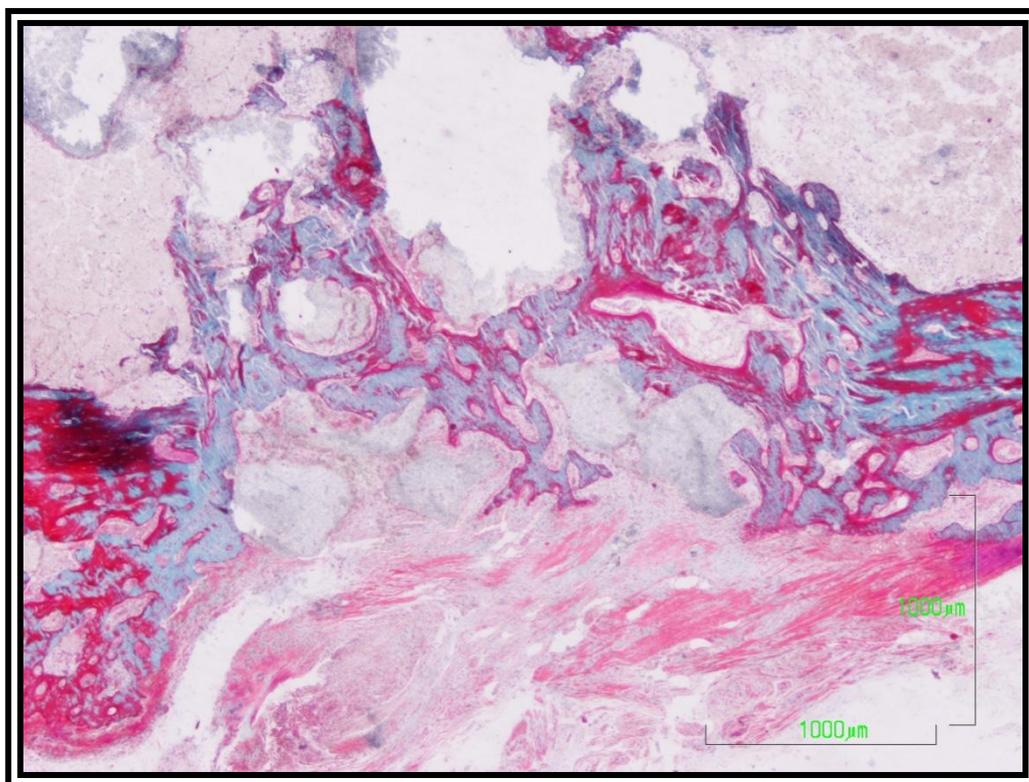


Fig. 2. Tricrómico de Goldner (2x). Reacción conectiva asociada a periostio.

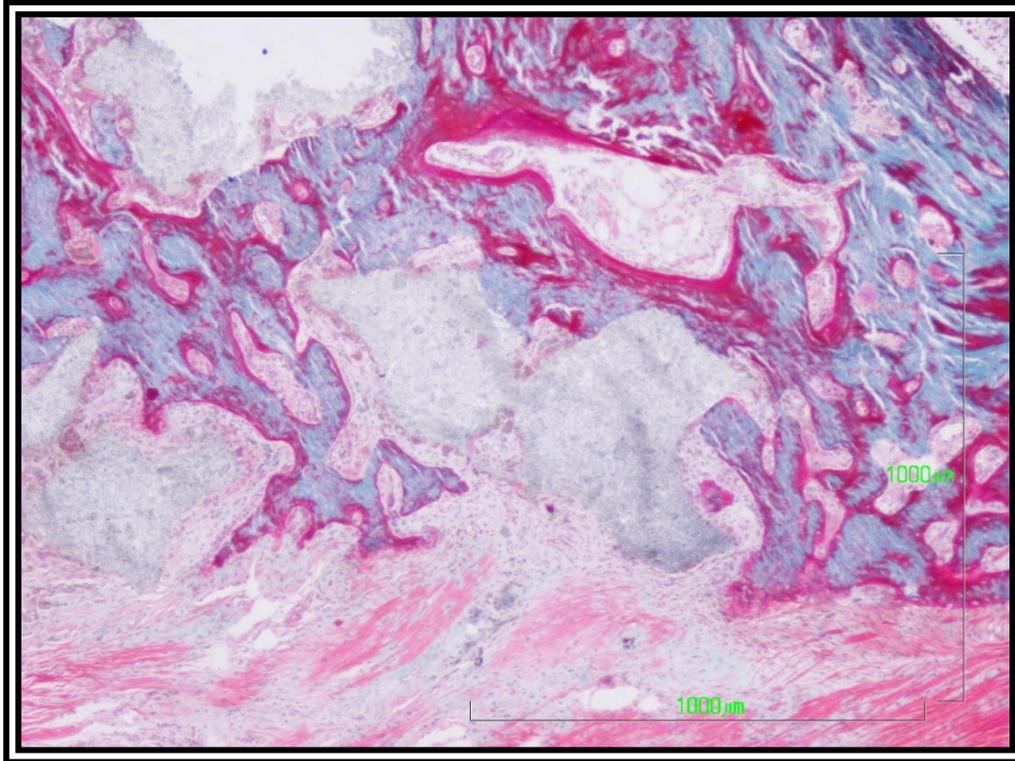


Fig. 3. Tricómico de Goldner (4x). Contorno irregular de espículas óseas.

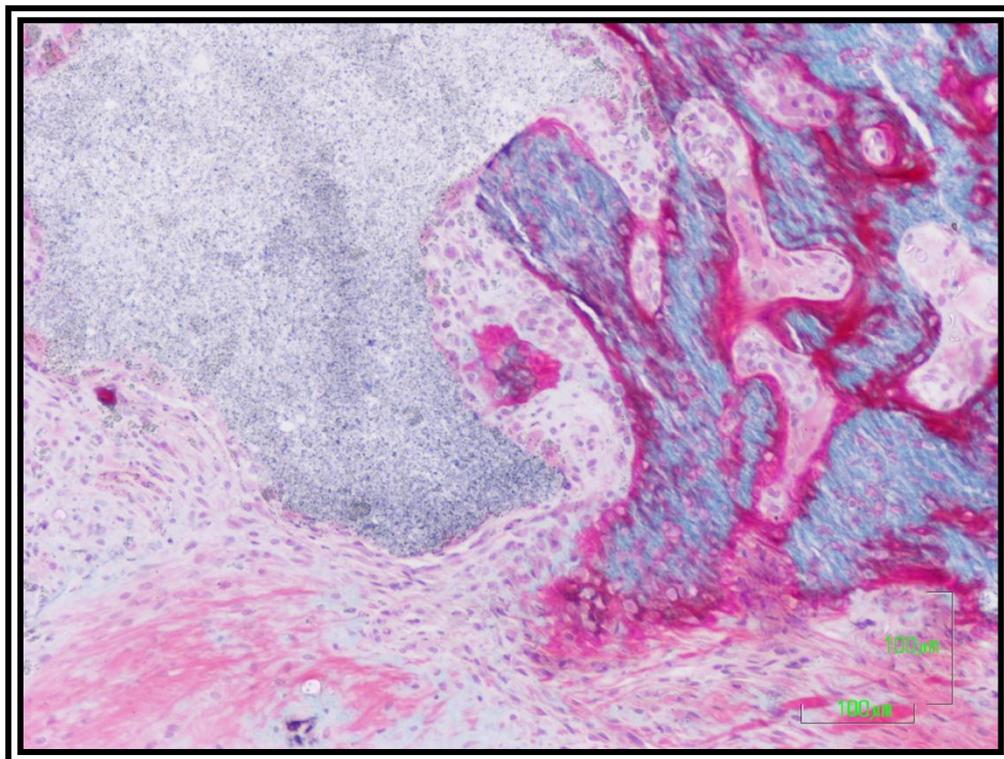


Fig. 4. Tricómico de Goldner (10x). Interfase entre cemento y tejido conectivo.

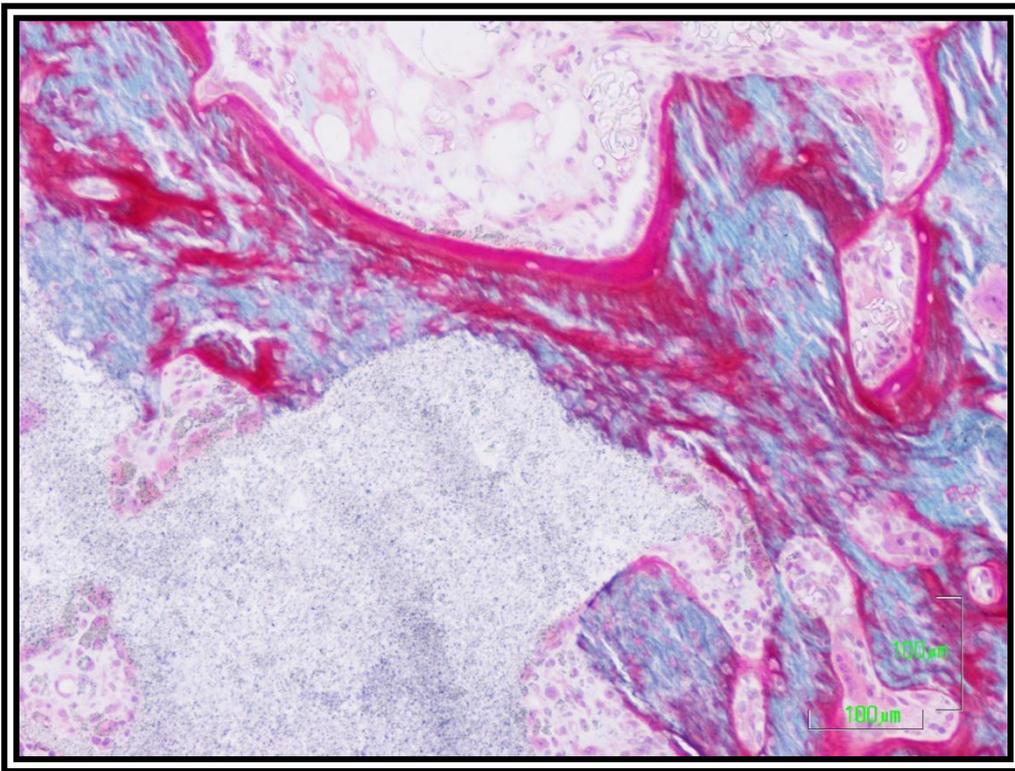


Fig. 5. Tricrómico de Goldner (10x). Tejido conectivo introducido en el cemento.

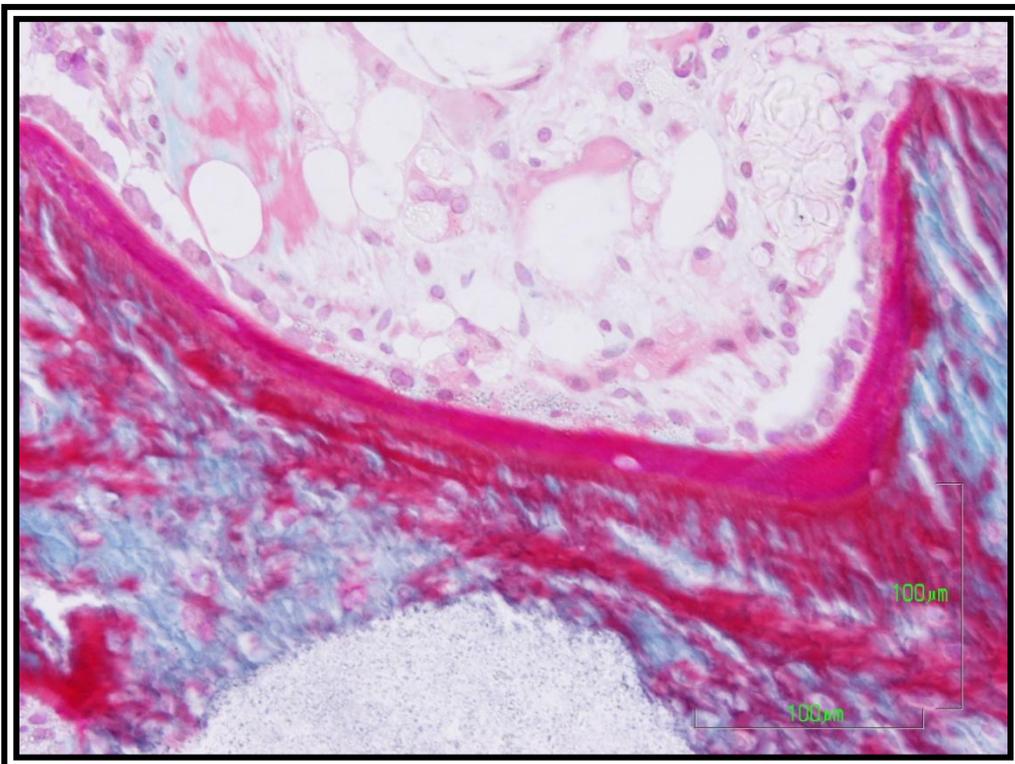


Fig. 6 Tricrómico de Goldner (20x). Hilera de osteoblastos y medulla ósea hematopoiética.

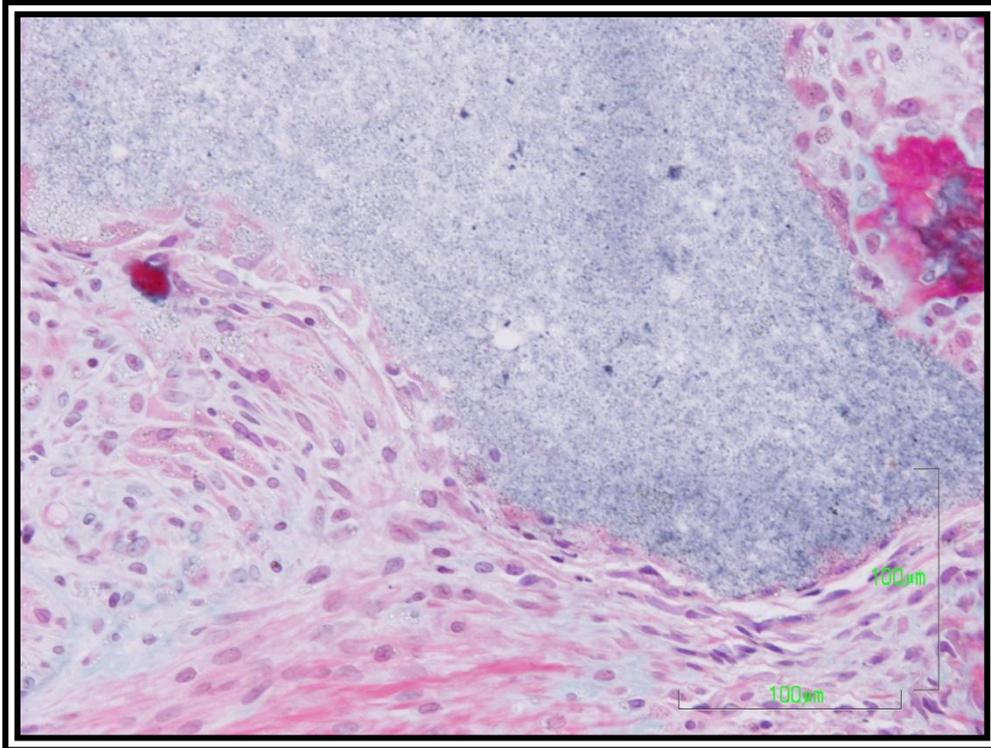


Fig. 7. Tricrómico de Goldner (20x). Relación del cemento con el tejido conectivo.

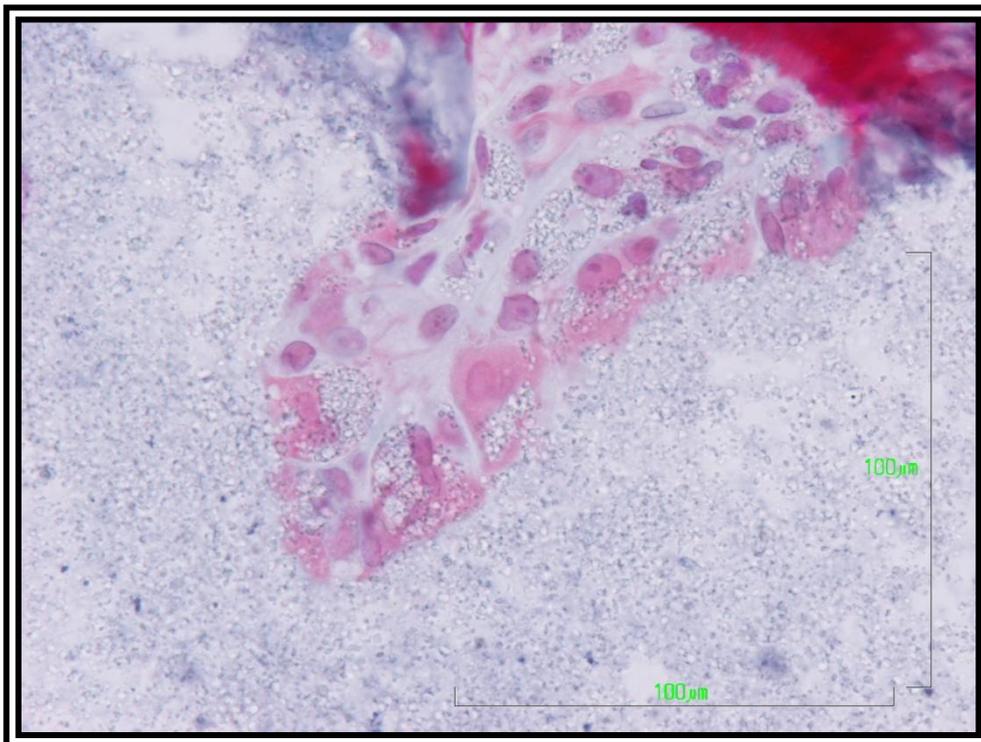


Fig. 8. Tricrómico de Goldner (40x). Detalle de las papilas conectivas.

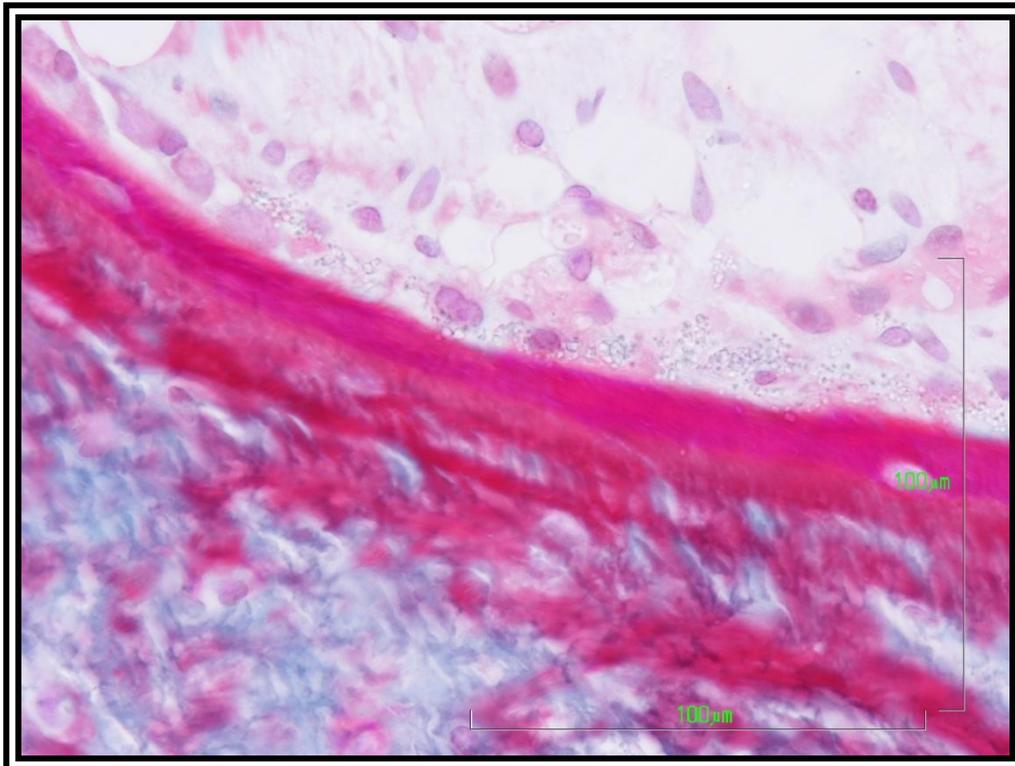


Fig. 9. Tricrómico de Goldner (40x). Trabécula y células de hábito osteoblástico.

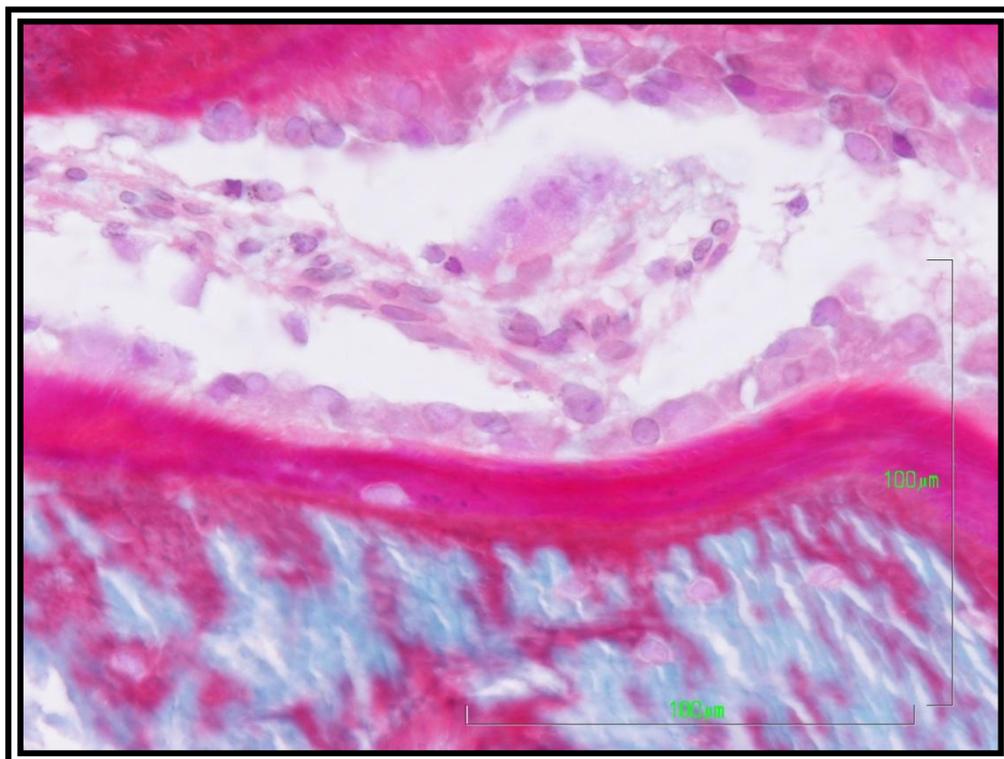


Fig. 10. Tricrómico de Goldner (40x). Trabéculas sin hábito de células osteoblásticas.

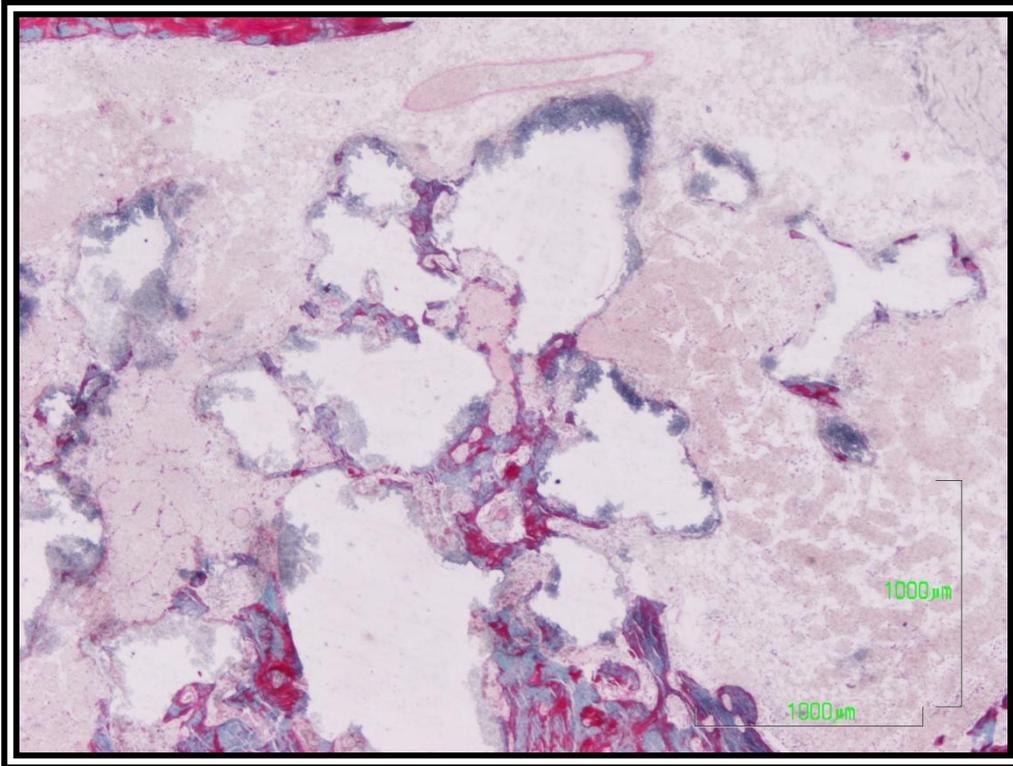


Fig. 11. Tricrómico de Goldner (2x). Gránulos de cemento en la cavidad medular.

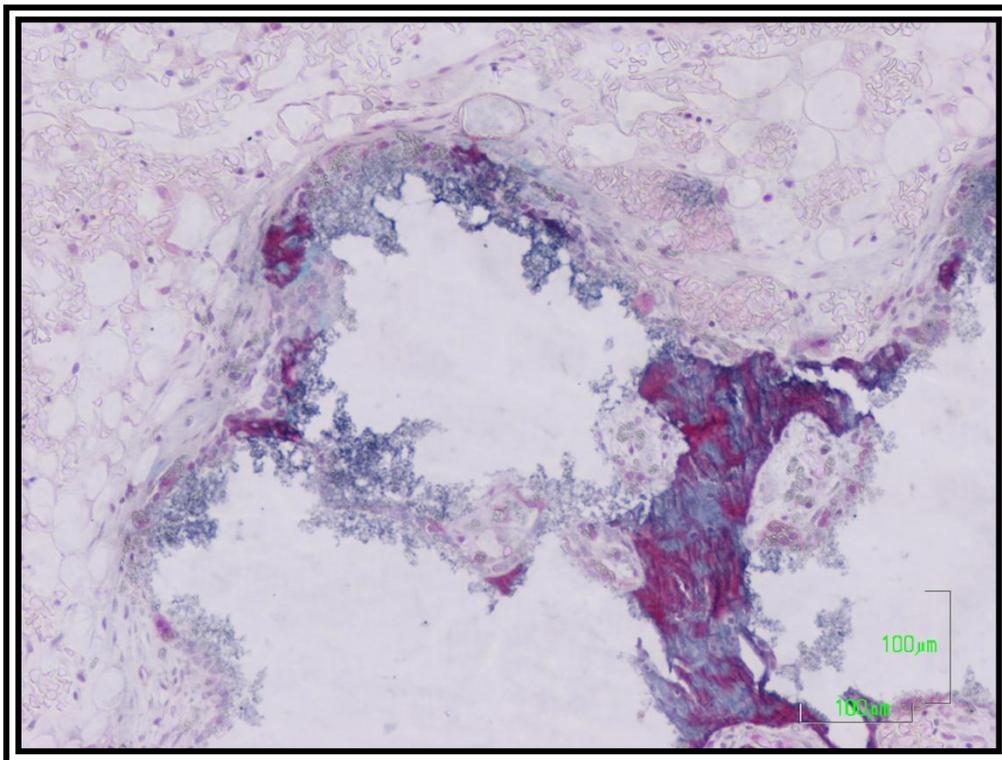


Fig. 12. Tricrómico de Goldner (10x). Espícula ósea neoformada.

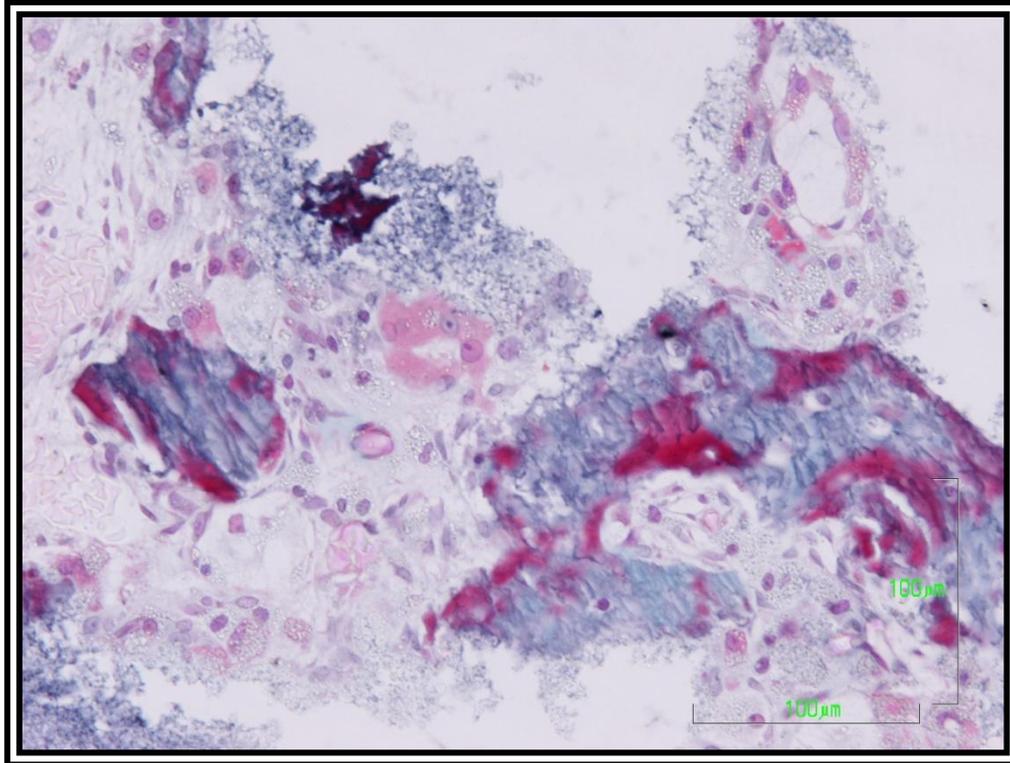


Fig. 13. Tricrómico de Goldner (20x). Detalle de trabéculas óseas neoformadas inmaduras.

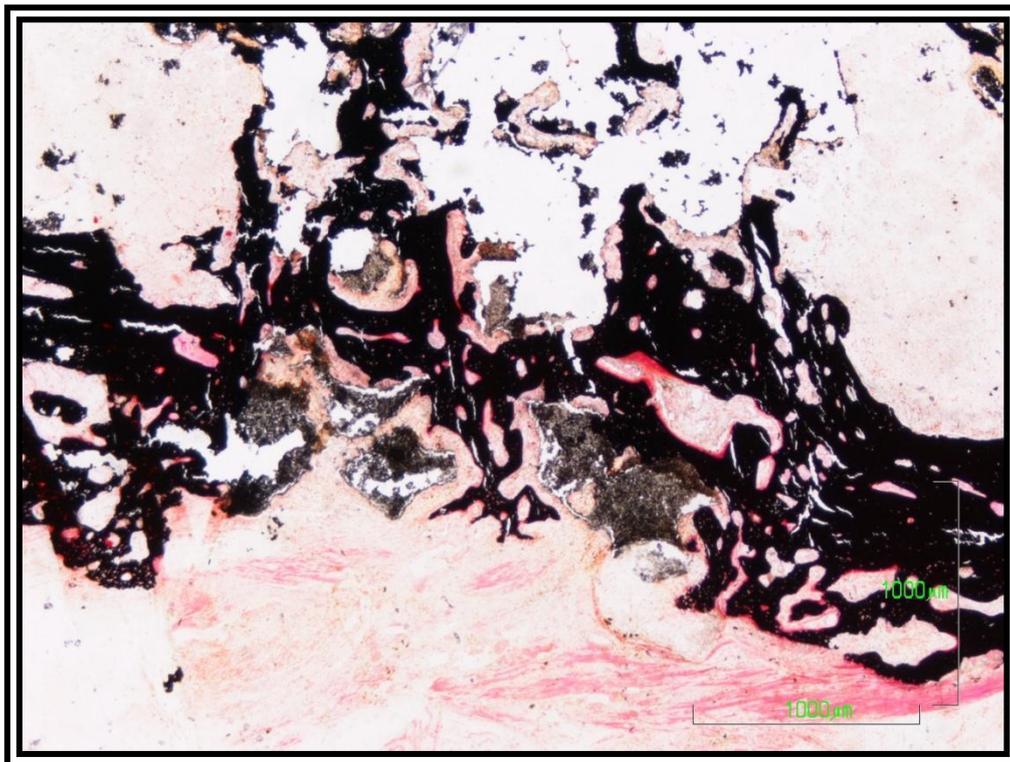


Fig. 14. Técnica de Von Kossa (2x). Hueso neoformado, inmaduro y no laminar.

1.2 - Subgrupo 1B (6 - 7 semanas y n=10)

Este subgrupo está formado por los casos 31, 33, 34, 71, 73, 48, 53, 85, 86 y 89.

Las imágenes radiológicas correspondientes a este subgrupo experimental presentan gránulos de cemento más separados que en el grupo anterior (Figura 15), con un contorno más irregular (Figura 15) y una moderada reacción perióstica (Figura 15).

El estudio histológico revela la integración del material (Figura 16), bien con tejido óseo (Figura 16) o bien con tejido conectivo (Figura 16). En el caso de que los gránulos de cemento se relacionen con tejido óseo, en algunas áreas, se presentan fenómenos de remodelación ósea con formación de hueso secundario asociado a conductos vasculoconectivos rodeados de hueso en proceso de síntesis (Figura 16). Más compleja es la relación con el tejido conectivo (Figura 16), ya que en algunas zonas, el cemento está rodeado por tejido conectivo fibroso (Figura 17) con o sin hueso primario limitante con el cemento (Figura 17), que puede presentar fenómenos de osteosíntesis, generalmente en la cara alejada del cemento (Figura 18), o en la vecindad de este (Figura 19). Los fenómenos de síntesis ósea están constituidos por hileras de osteoblastos (Figura 19), asociadas a tejido conectivo y macrófagos con restos de cemento en su citoplasma (Figura 19), interesante reseñar que el tejido óseo sintetizado en estrecha relación con el cemento, es de tejido secundario (Figura 19). En otras zonas (Figura 20) el cemento no forma hueso alrededor sino que está recubierto por una capa de macrófagos con partículas de cemento en su citoplasma y externamente se encuentran fascículos de

células de hábito fibroblástico. El hueso neoformado sufre procesos de remodelación (Figura 21) y se relaciona con la médula ósea amarilla (Figura 20) y médula ósea roja (Figura 22) sin necrosis ni signos inflamatorios (Figura 22). La técnica de Von Kossa (Figura 23) corrobora los hallazgos del tricrómico de Goldner y es posible observar zonas de cemento asociadas a hueso (Figura 23 y Figura 24), a tejido conectivo (Figura 23 y Figura 24) y a veces una misma partícula de cemento presenta en parte de su perímetro tejido conectivo y en el resto tejido óseo (Figura 23 y Figura 24).

El orificio quirúrgico practicado en la cortical diafisaria, no asociada al cemento, no presenta signos de regeneración ósea, encontrándose invadida por tejido conectivo (Figura 25).

En resumen en este subgrupo, se observa igual que en el primer subgrupo, persistencia del cemento. No existe necrosis ni signo inflamatorios. En algunas zonas en las que los gránulos de cemento se relacionen con tejido óseo, se presentan fenómenos de remodelación ósea con formación de hueso. La cortical diafisaria del orificio quirúrgico no está regenerada, sólo hay presencia de tejido conectivo

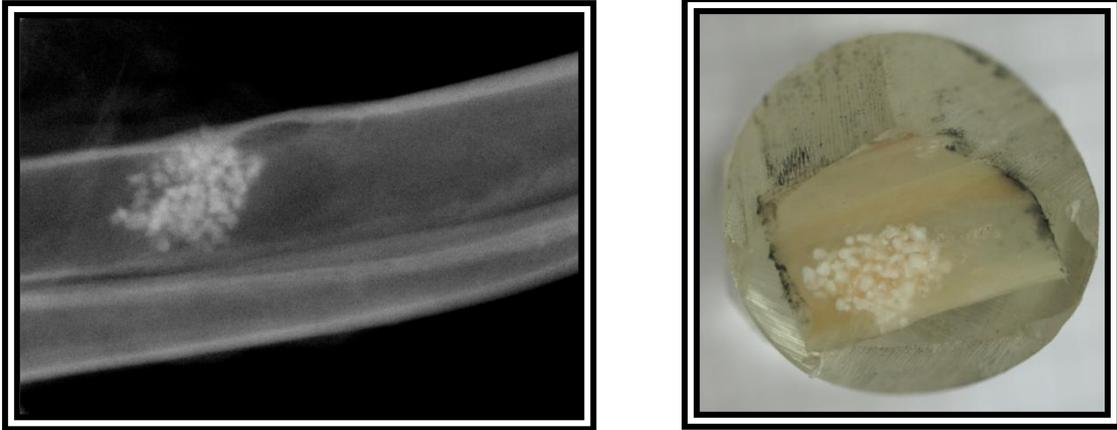


Fig 15. Radiografía y cilindro de metacrilato de la muestra. Gránulos de cemento separados. Animal 34.

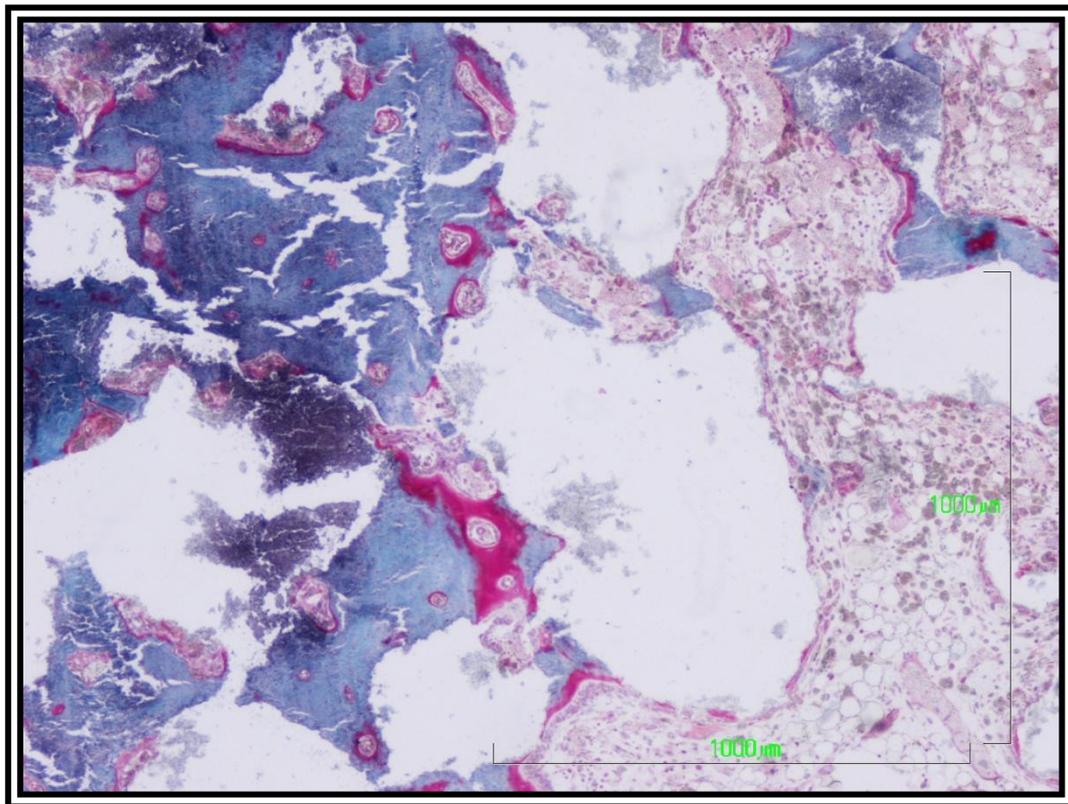


Fig. 16. Tricrómico de Goldner (4x). Cemento rodeado de tejido óseo y tejido conectivo.

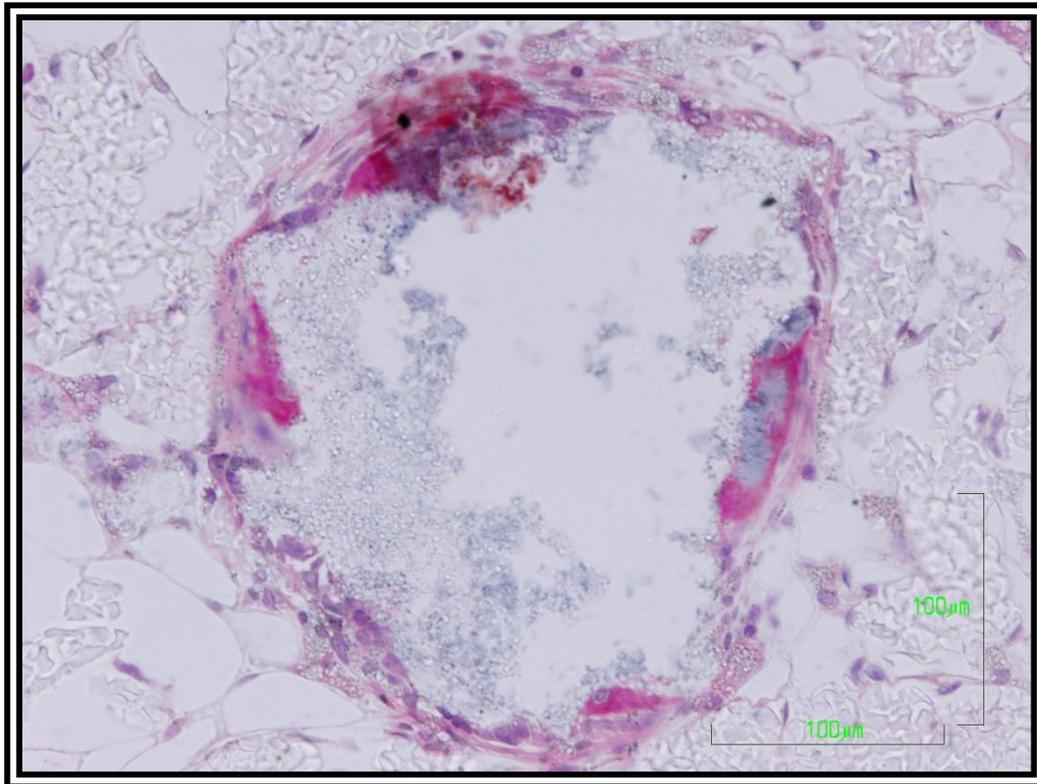


Fig. 17. Tricrómico de Goldner (20x). Cemento rodeado de tejido conectivo.

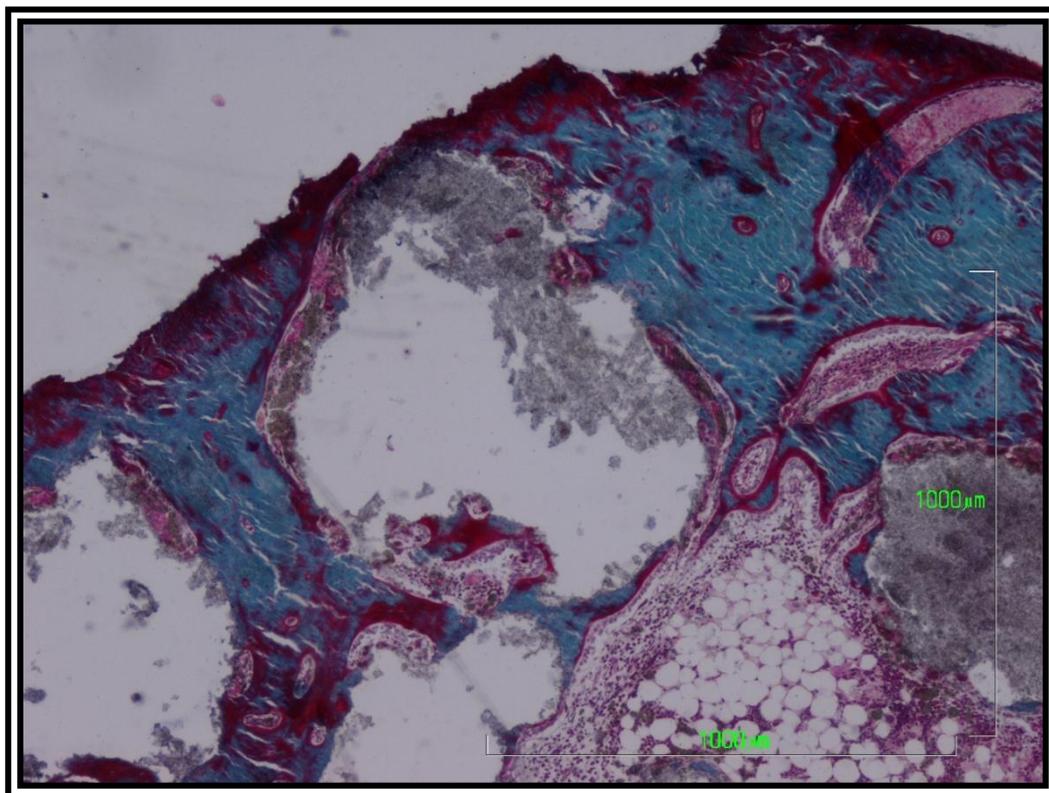


Fig. 18. Tricrómico de Goldner (4x). Cemento rodeado de fenómenos de osteosíntesis.

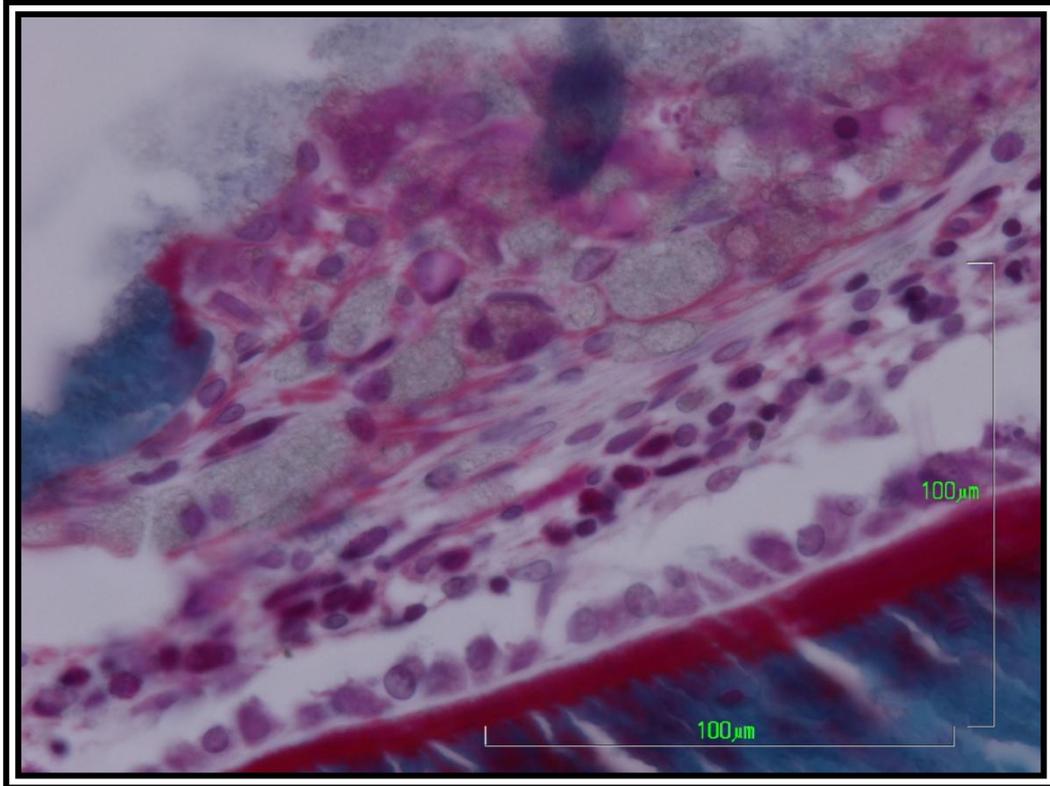


Fig. 19. Tricrómico de Goldner (40x). Fenómenos de osteosíntesis en la vecindad del cemento. Línea de osteoide.

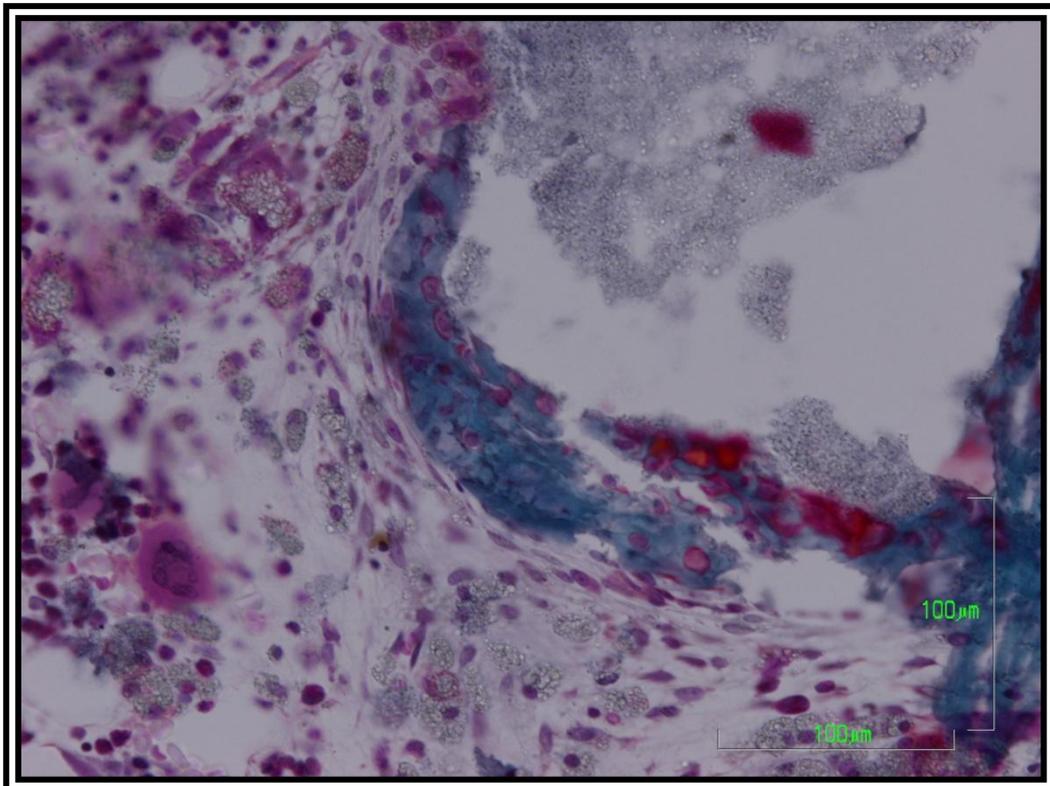


Fig. 20. Tricrómico de Goldner (20x). Cemento rodeado de macrófagos que contienen partículas de cemento en su interior.

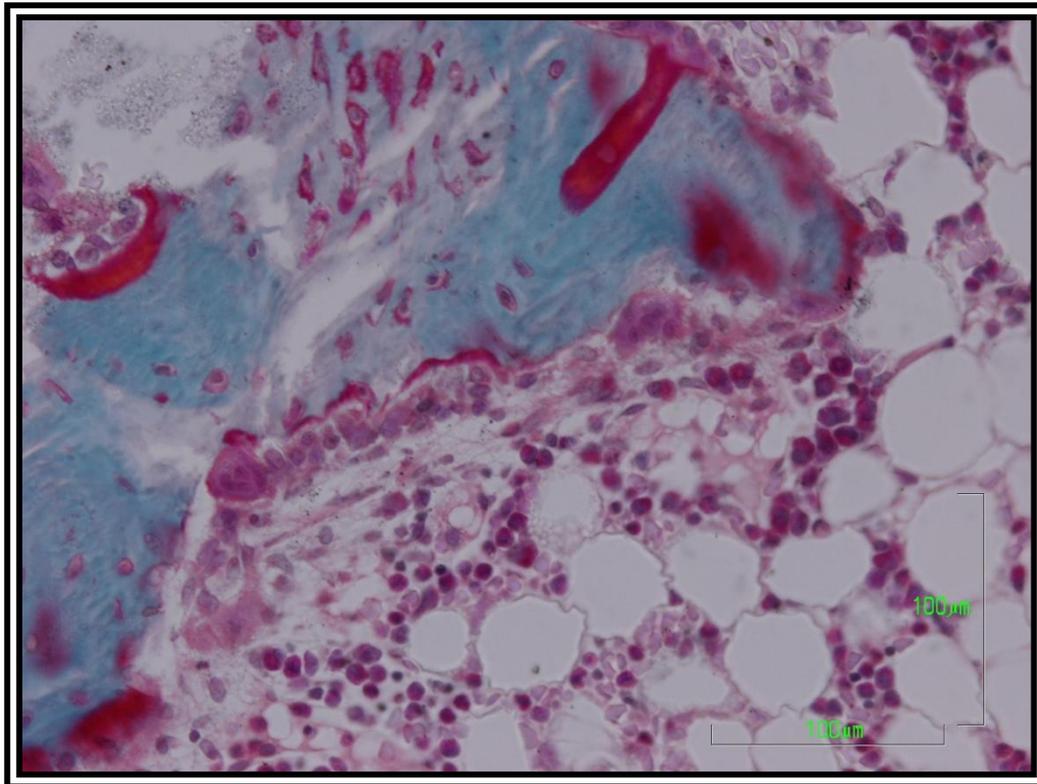


Fig. 21. Tricrómico de Goldner (20x). Hueso neoformado con procesos de remodelación.

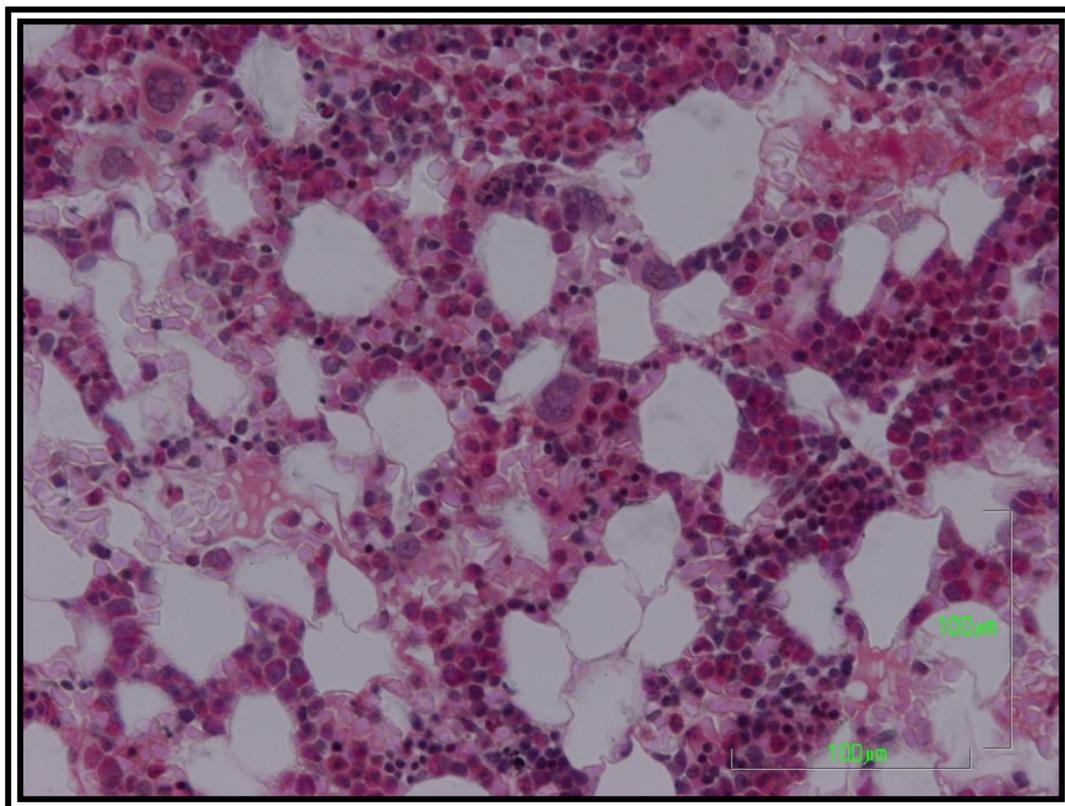


Fig. 22. Tricrómico de Goldner (20x). Médula ósea roja cercana al cemento.

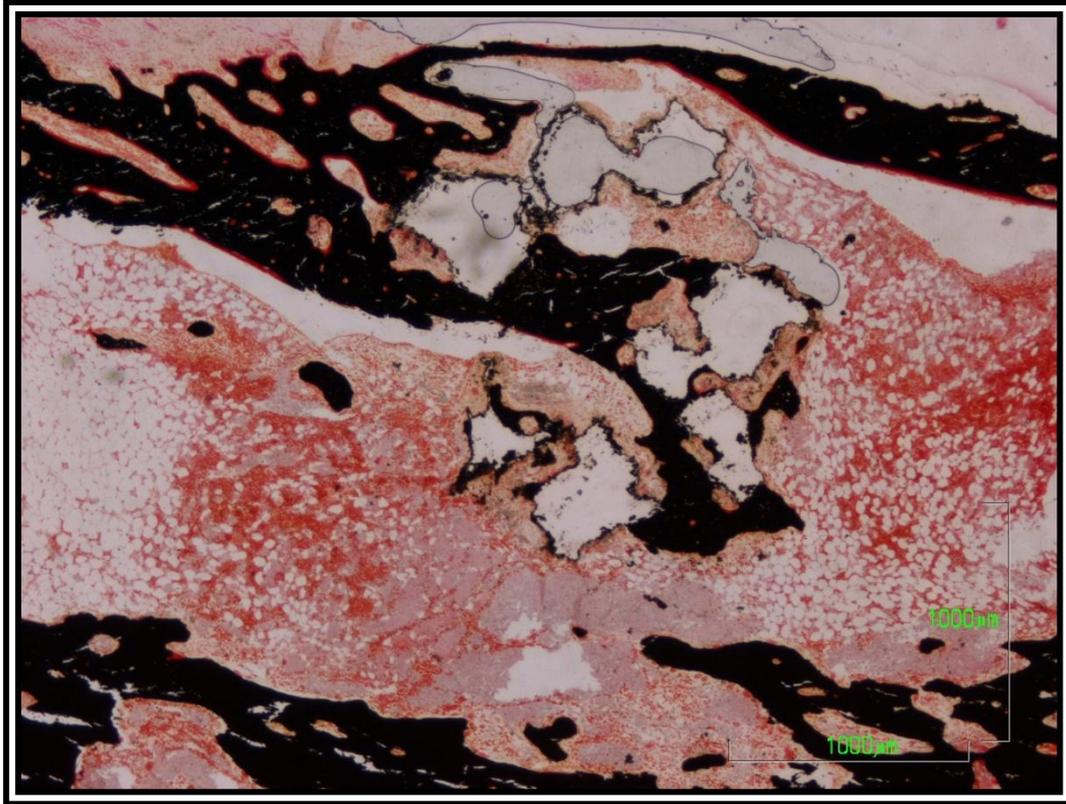


Fig. 23. Técnica de Von Kossa (2x). Zonas de cemento asociadas a hueso.

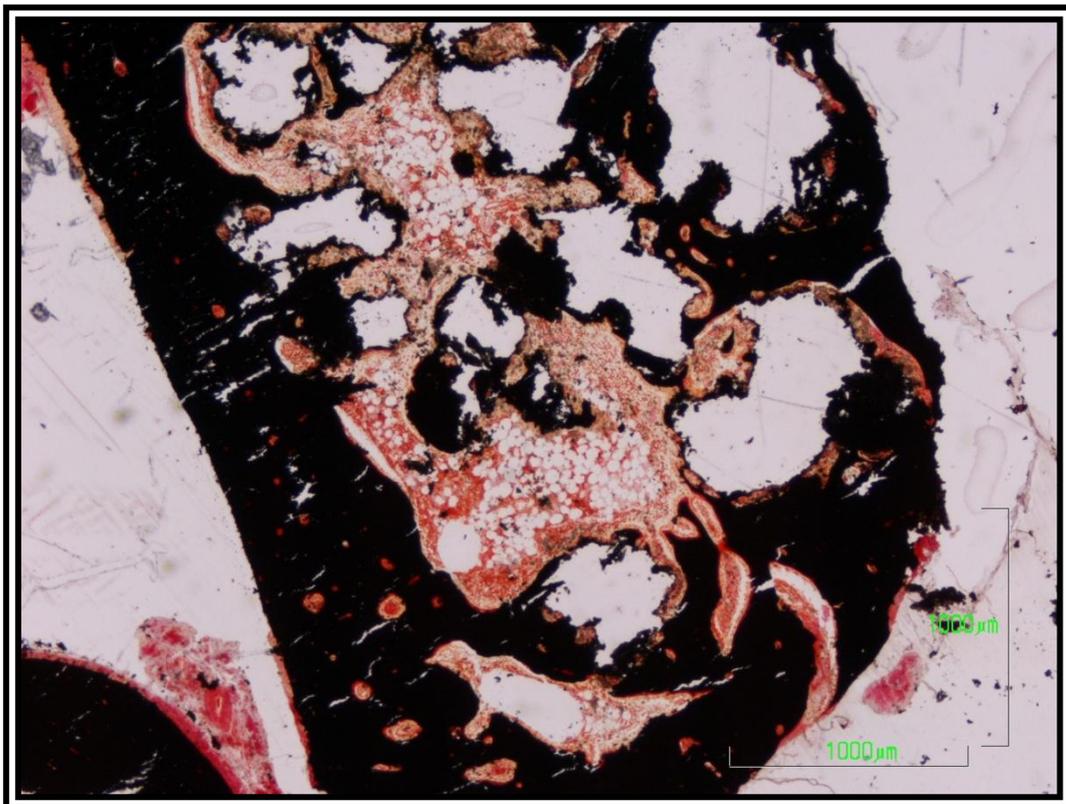


Fig. 24. Técnica de Von Kossa (4x). Partículas de cemento rodeadas de tejido óseo y tejido conectivo.

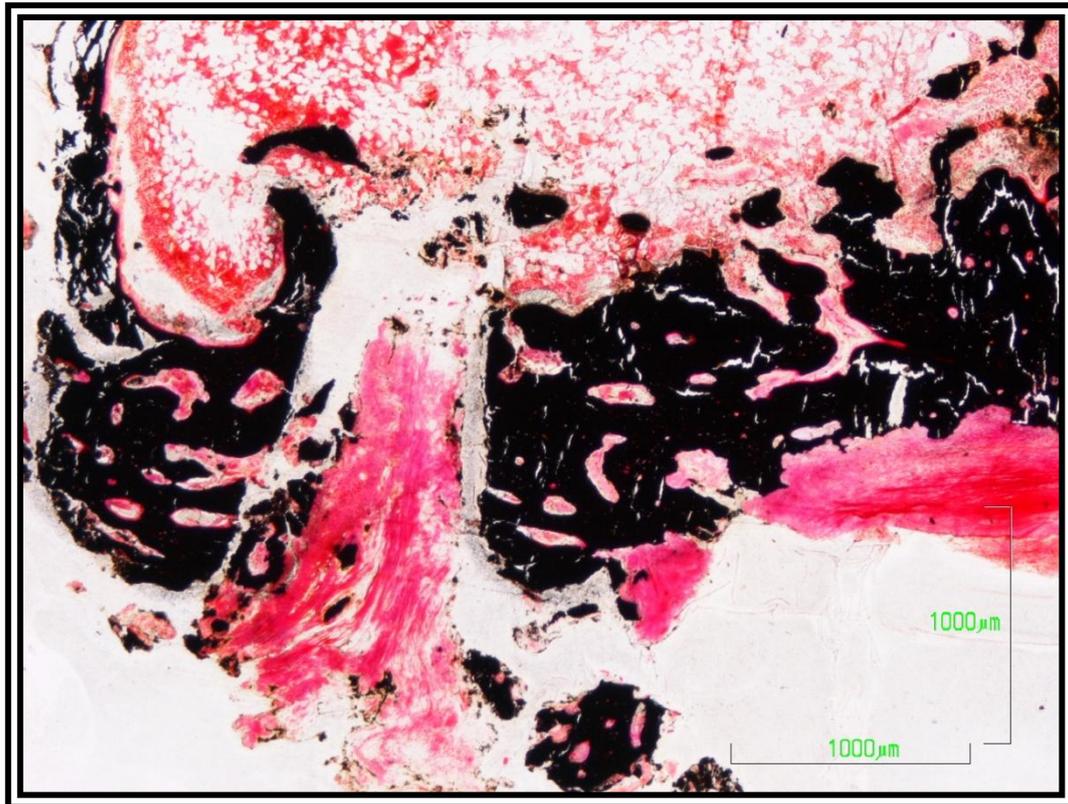


Fig. 25. Técnica de Von Kossa (2x). Orificio quirúrgico invadido por tejido conectivo.

1.3 - Subgrupo 1C (9 semanas y n=3)

Este subgrupo está formado por los casos 28, 46 y 51.

Las imágenes radiológicas del subgrupo de 9 semanas postlesión muestran los gránulos de cemento con una apariencia apolillada, contornos irregulares y mayor espacio intergranular (Figura 26).

El estudio histológico a bajo aumento (2x) corrobora la apariencia radiológica y añade un incremento de la superficie granular recubierta de tejido óseo de espesor variable (Figura 27). A mayor aumento (4x) se observa que muchos gránulos se encuentran fragmentados con frecuentes puentes de tejido óseo entre ellos (Figura 28). No obstante algunas zonas granulares están recubiertas principalmente por tejido conectivo adyacente a médula ósea amarilla (Figura 29). El detalle de la Figura 30 muestra la estructura de tejido conectivo, constituida por una zona interna compuesta por macrófagos y una zona externa formada por fibroblastos y fibras conectivas (Figura 30). El tejido óseo perigranular muestra fenómenos de síntesis ósea, más abundantes en la cara interna, alejada del cemento (Figura 31). En la Figura 32 (20x) se muestra una estructura de tejido óseo, adyacente a restos de cemento con fenómenos de remodelación, asociada a tejido conectivo fibroso. En algunas zonas, el aspecto es más abigarrado presentándose además el tejido óseo con fenómenos de síntesis y remodelación ya descritos (Figura 33), zonas con pequeños restos de cemento asociadas a escasas colecciones de macrófagos con gránulos de cemento en su citoplasma (Figura 33).

En resumen, los animales pertenecientes a este grupo presentan un mayor recubrimiento de tejido óseo, mayor fragmentación granular, más fenómenos de síntesis y remodelación ósea, y en algunas zonas, el cemento

no ha estimulado la síntesis de tejido óseo, estando rodeado por macrófagos y tejido conectivo moderadamente fibroso. No se observaron signos inflamatorios crónicos, ni fenómenos de necrosis.

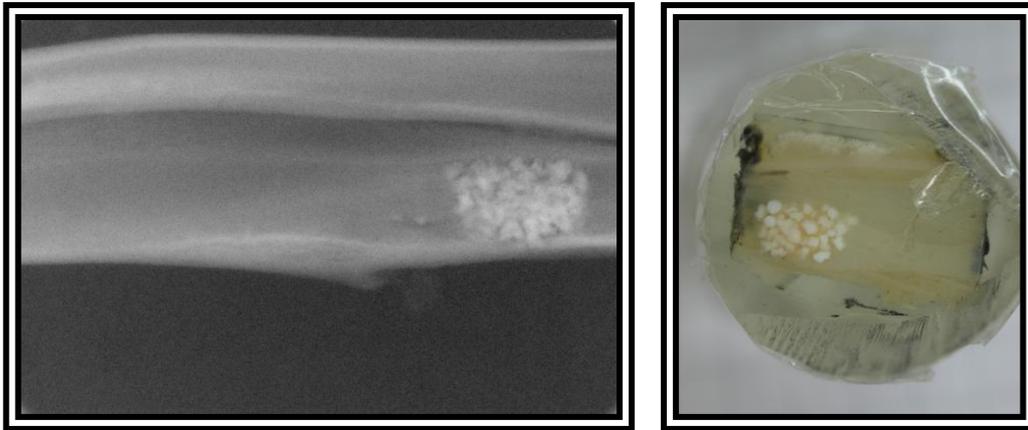


Fig. 26. RX. Gránulos de cemento con contornos irregulares y espacios intergranulares.

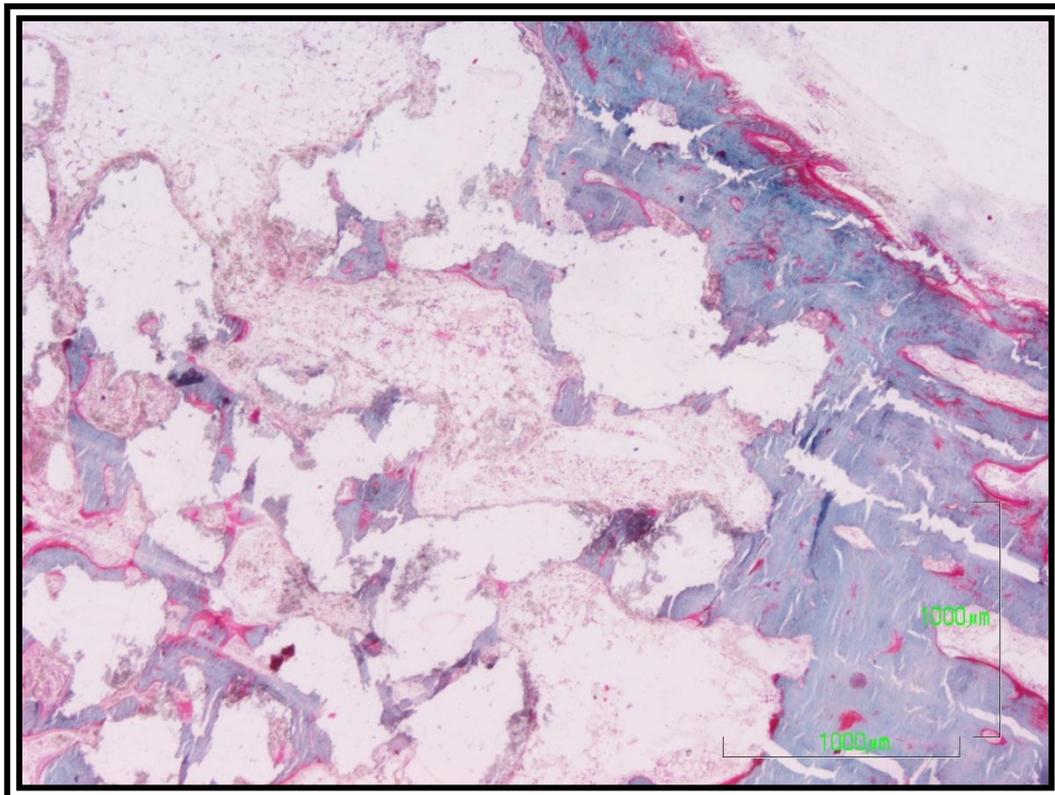


Fig. 27. Tricrómico de Goldner (2x). Cemento recubierto de tejido óseo.

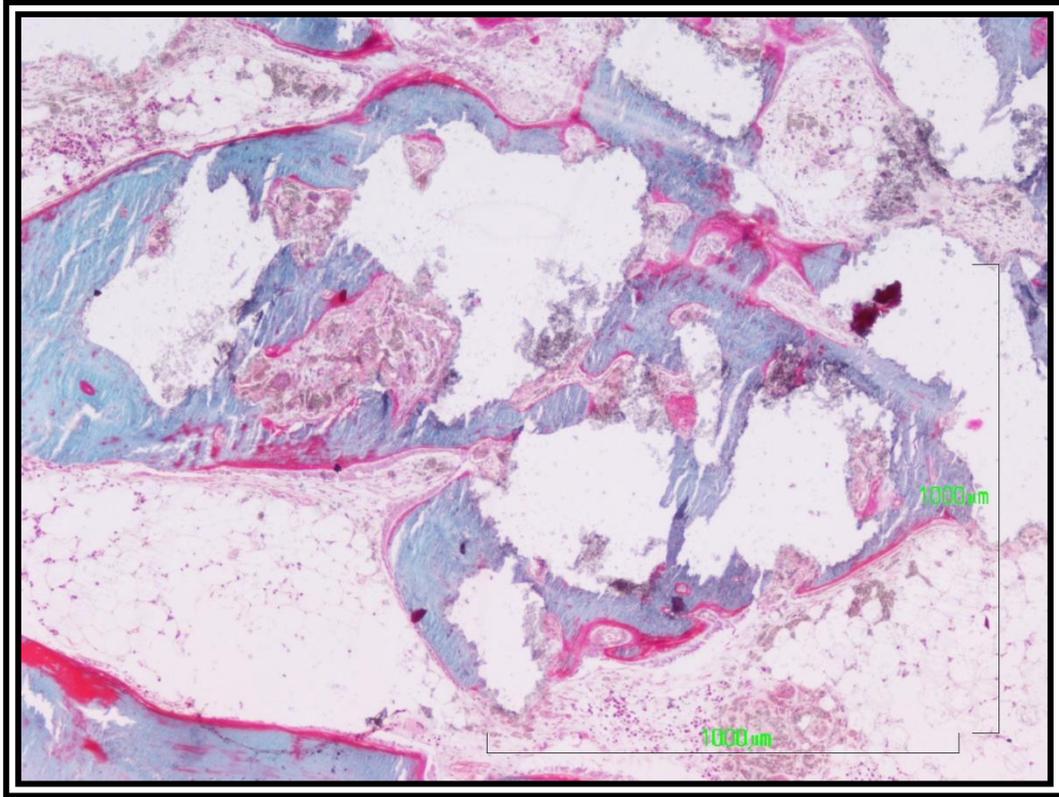


Fig. 28. Tricrómico de Goldner (4x). Gránulos de cemento fragmentados por puentes de tejido óseo.

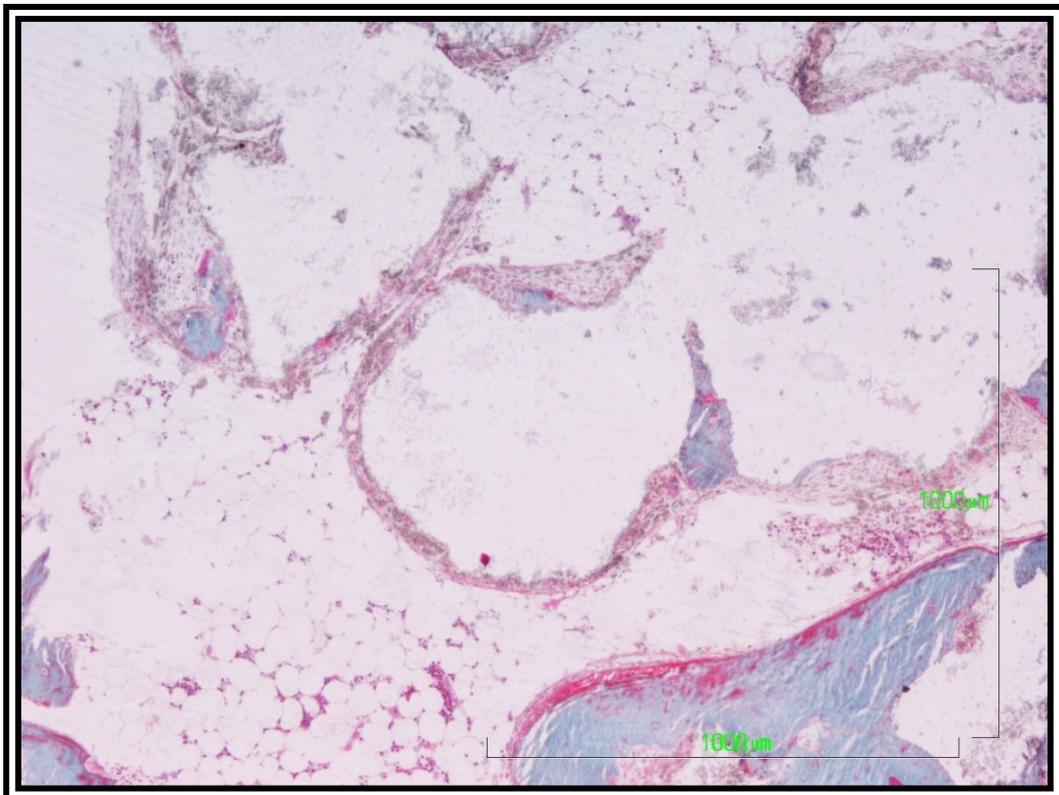


Fig. 29. Tricrómico de Goldner (4x). Cemento rodeado de tejido conectivo adyacente a médula ósea amarilla.

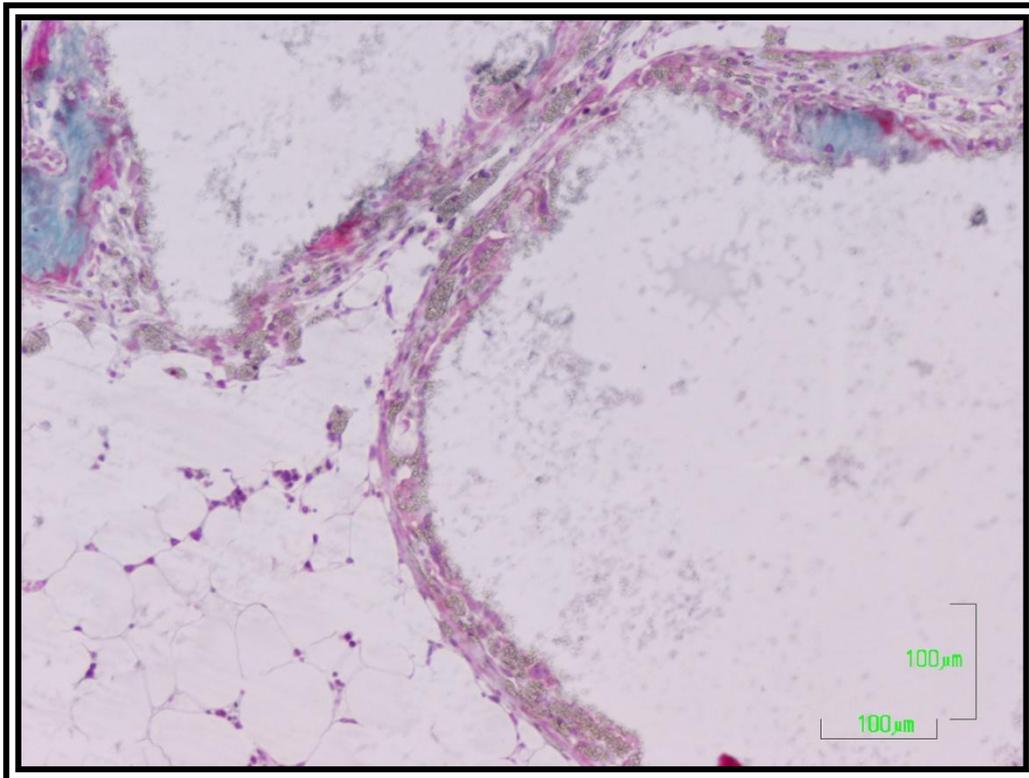


Fig. 30. Tricrómico de Goldner (10x). Tejido conectivo rodeando al cemento.

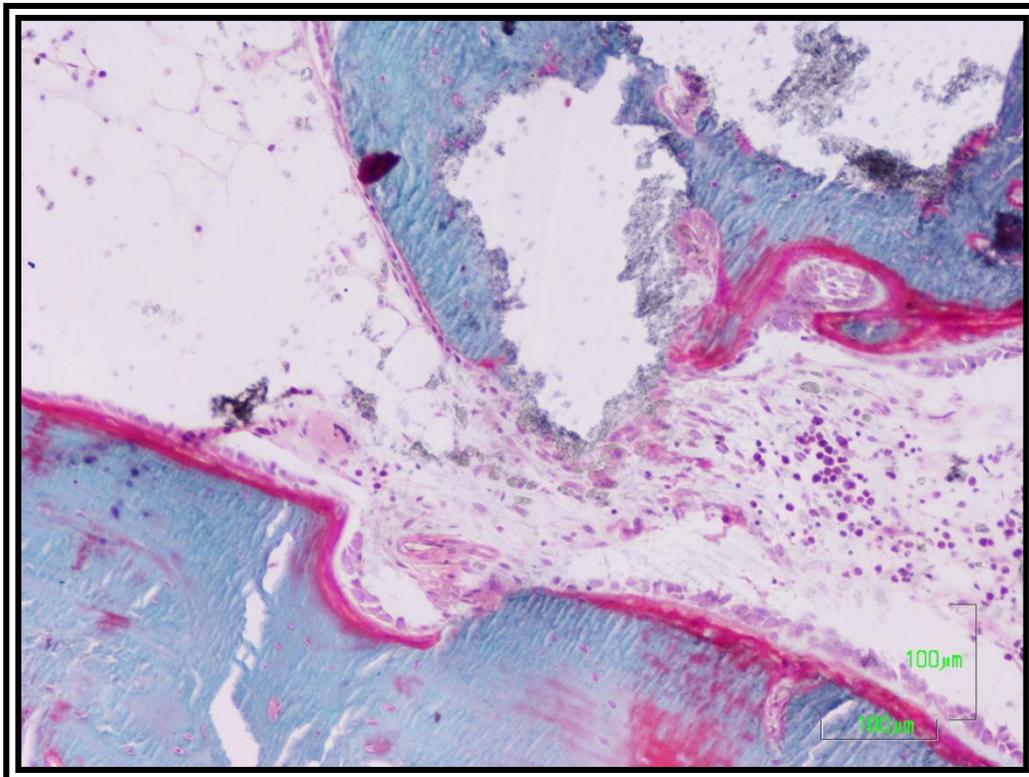


Fig. 31. Tricrómico de Goldner (10x). Tejido óseo con fenómenos de síntesis.

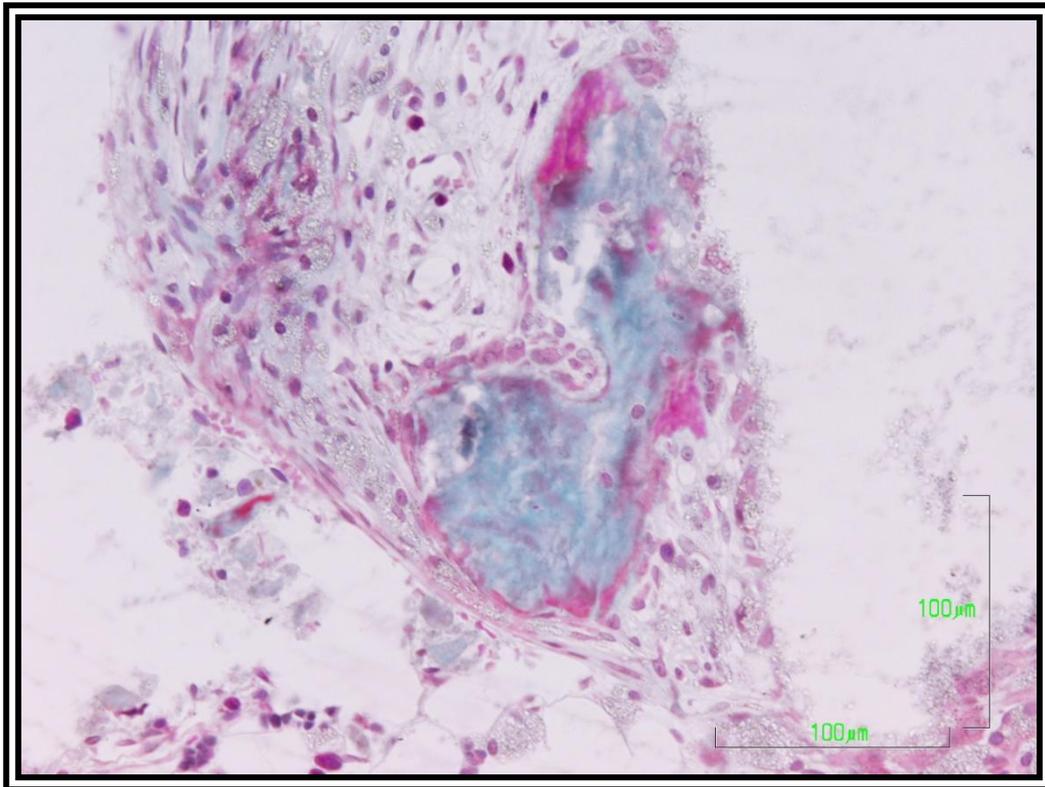


Fig. 32. Tricrómico de Goldner (20x). Tejido óseo con fenómenos de remodelación.

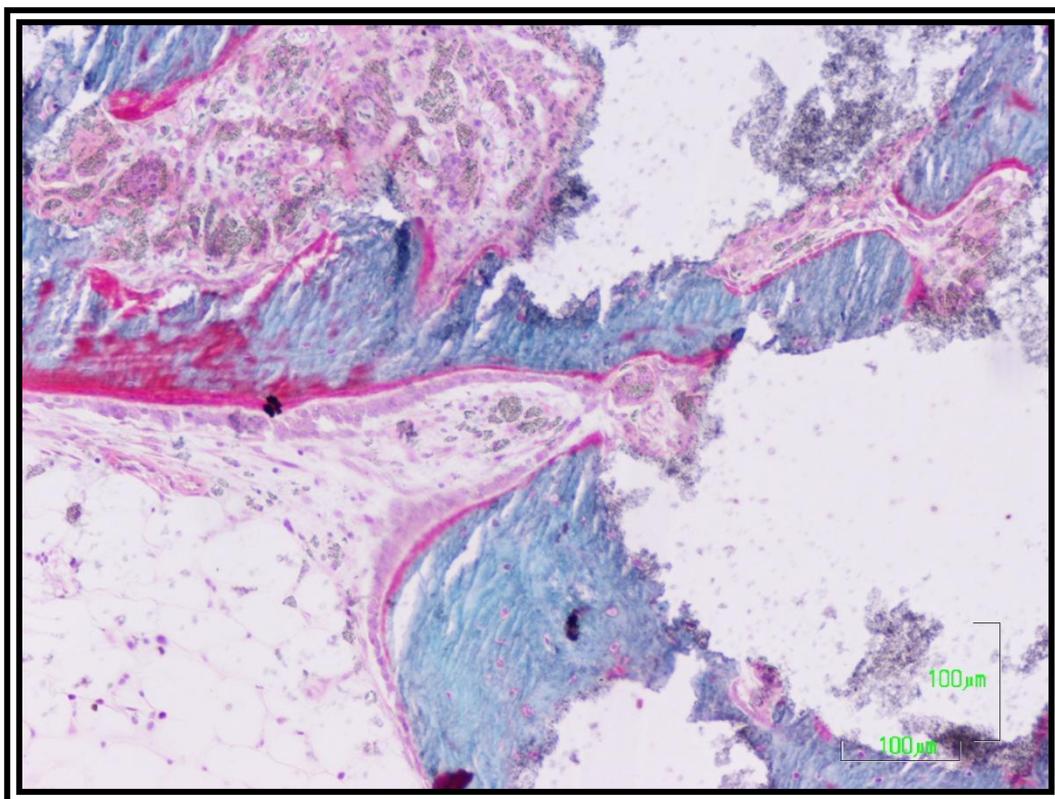


Fig. 33. Tricrómico de Goldner (10x). Macrófagos con gránulos de cemento en su citoplasma.

1.4 - PUENTE entre subgrupos (10 semanas:n=1 y 11 semanas:n=1)

Antes de describir los hallazgos correspondientes a las 12 semanas de evolución, se describirán a modo de puente los cambios correspondientes a los animales de 10 semanas (animal 27) y 11 semanas (animal 43), bien entendiendo que se trata fundamentalmente de cambios cuantitativos , mayor recubrimiento de los gránulos de cemento por tejido óseo que se evidencia tanto radiológica (Figura 34) como histológicamente (Figura 35), presencia de hueso deficientemente calcificado (Figura 36), fenómenos de remodelación ósea (Figura 36 y Figura 37) y presencia de nidos de macrófagos con restos de cemento en su citoplasma (Figura 36 y Figura 37), así mismo , existen algunas zonas con un débil infiltrado inflamatorio crónico (Figura 36). Los fenómenos de síntesis ósea constituidos por hileras de osteoblastos asociados a sustancia osteoide son frecuentes (Figura 38). Con la técnica de Von Kossa se evidencian los gránulos de cemento de morfología irregular rodeadas por hueso o tejido conectivo (Figura 39), y en algunas áreas el tejido óseo neoformado presenta conexión física con el hueso cortical diafisario (Figura 39). En otras zonas, hay gránulos de cemento que están rodeadas casi exclusivamente por tejido conectivo y médula ósea (Figura 40). A mayor aumento el tejido conectivo es de tipo fibroso (Figura 41) y la médula ósea adyacente puede ser amarilla o hematopoyética (Figura 41).

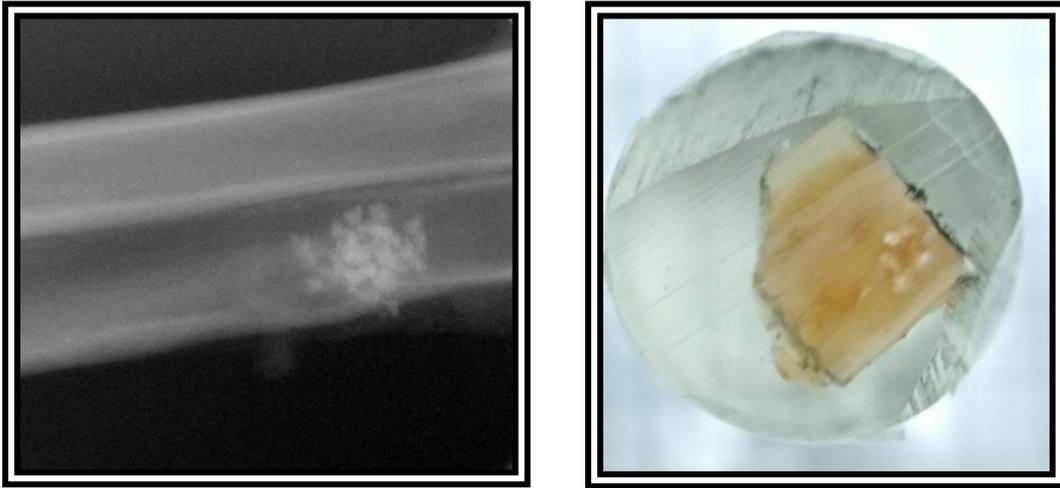


Fig. 34. Radiografía y cilindro de metacrilato de la muestra 27. Gránulos de cemento en un animal de 10 semanas de evolución después de haber realizado la inyección de dicho cemento (animal nº 27).

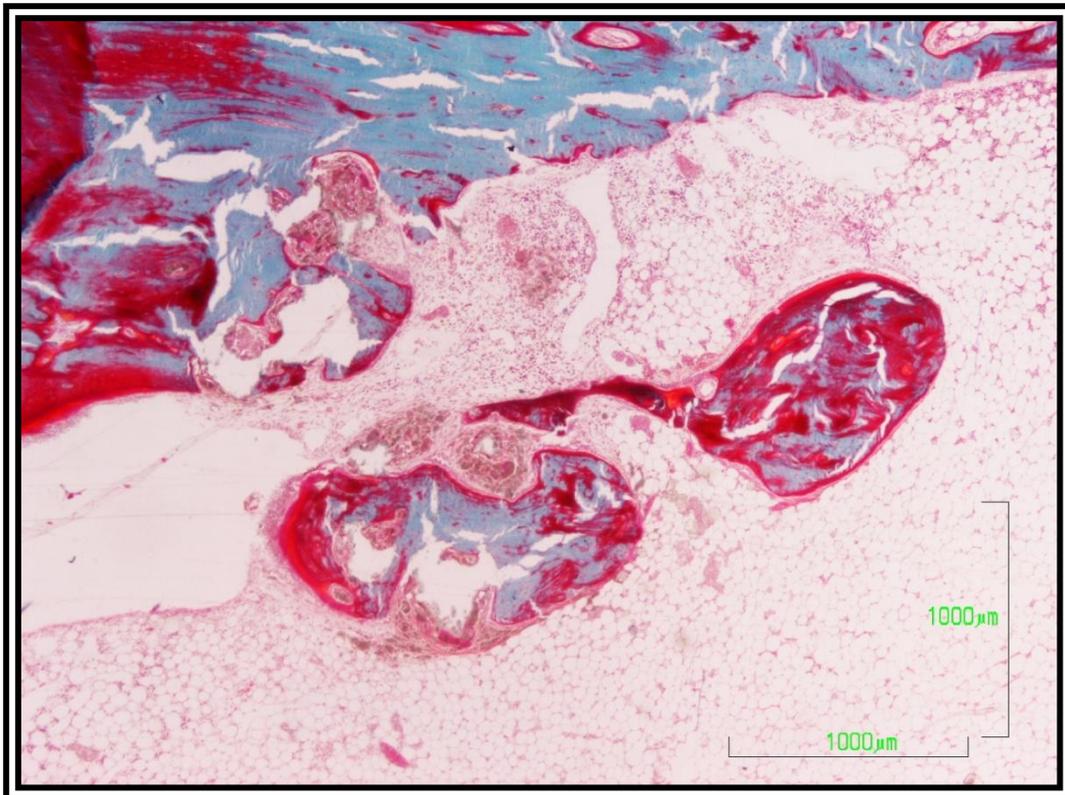


Fig. 35. Tricrómico de Goldner (2x). Cemento recubierto por tejido óseo.

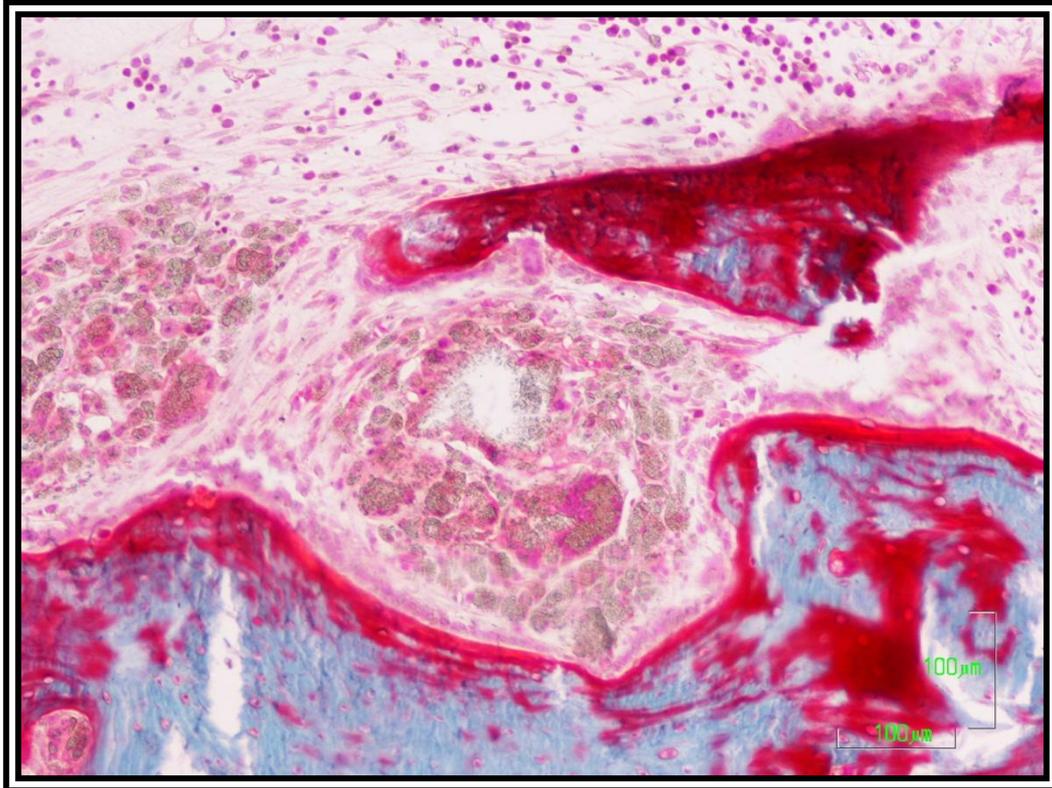


Fig. 36. Tricrómico de Goldner (10x). Hueso débilmente calcificado y fenómenos de remodelación ósea.

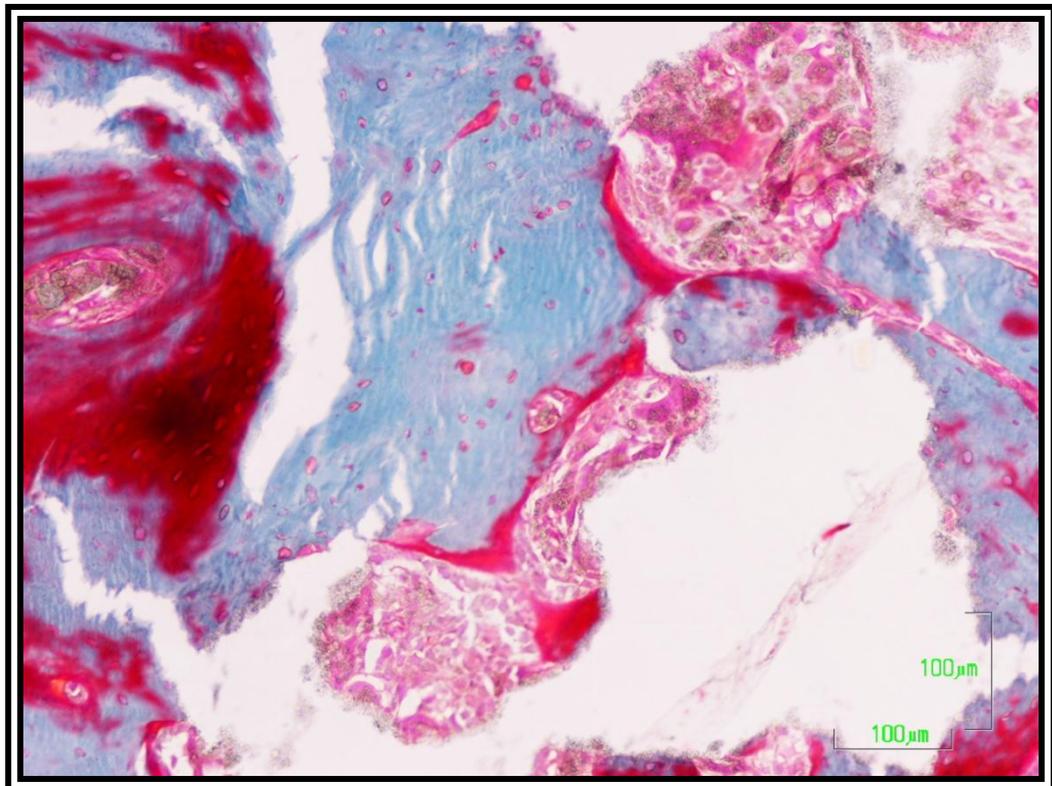


Fig. 37. Tricrómico de Goldner (10x). Macrófagos con resto de cemento en su citoplasma y células gigantes.

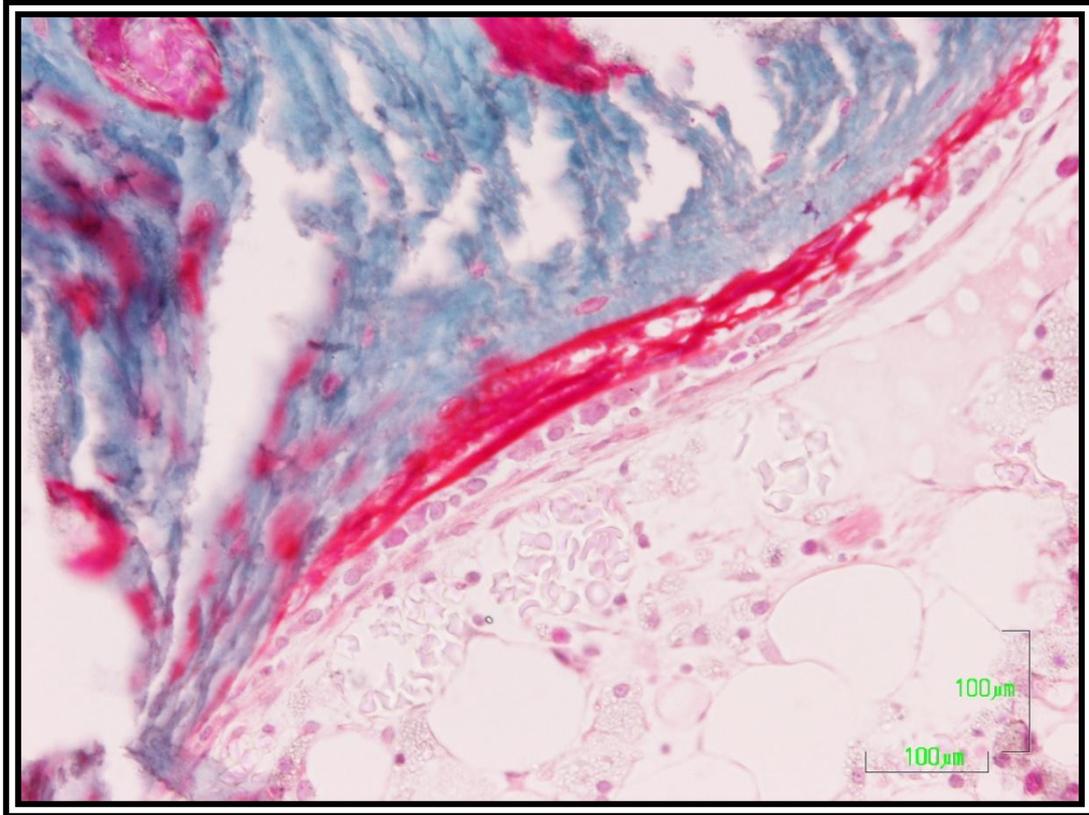


Fig. 38. Tricrómico de Goldner (10x). Hileras de osteoblastos asociadas a sustancia osteoide.



Fig. 39. Técnica de Von Kossa (2x). Gránulos de cemento de morfología irregular.

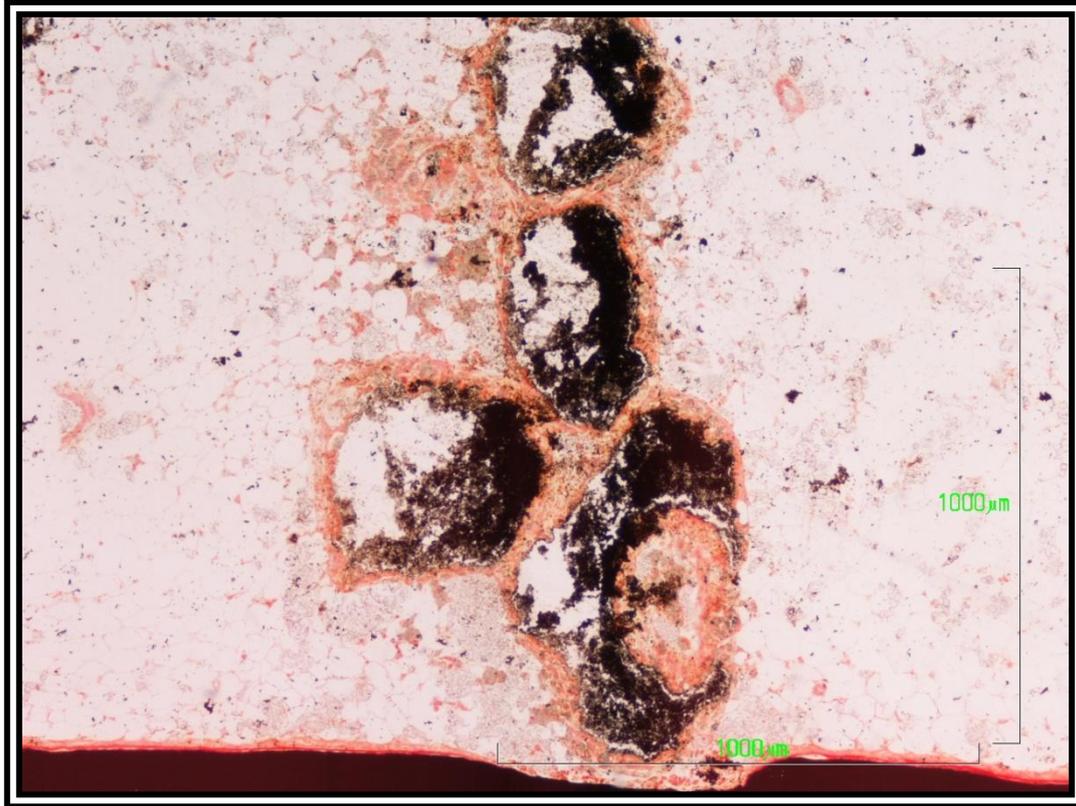


Fig. 40. Técnica de Von Kossa (4x). Gránulos de cemento rodeados por tejido conectivo y médula ósea.

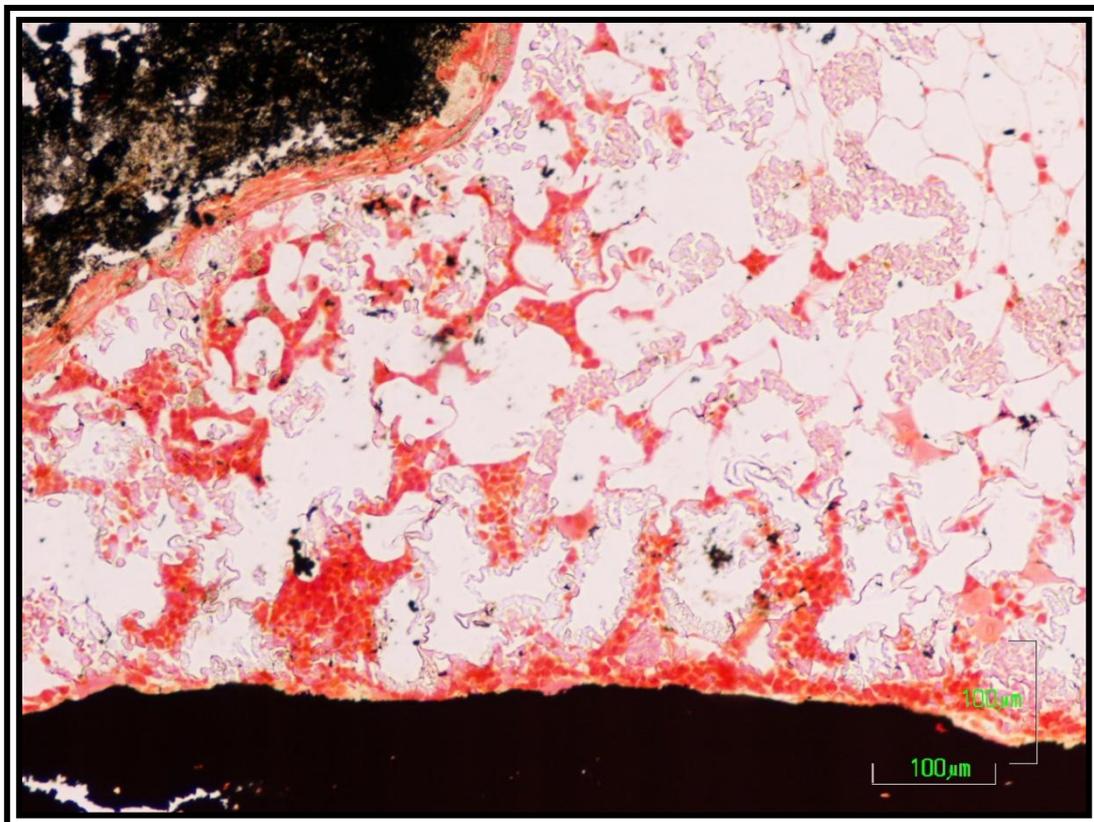


Fig. 41. Técnica de Von Kossa (10x). Médula ósea amarilla o roja adyacente al hueso.

1.5 - Subgrupo 1D (12 - 13 semanas y n=5)

Este subgrupo está formado por los casos 39, 40, 66, 68 y 36.

El grupo de las 12 semanas (animales 39, 40, 66 y 68) se caracteriza radiológicamente por una disminución del tamaño de los gránulos, asociado a un aumento del espacio intergranular (Figura 42). Con la técnica de Goldner se observa proliferación ósea con signos de osteosíntesis (Figura 43) y gránulos de cemento asociado al hueso (Figura 43) y rodeados por tejido conectivo (Figura 43). A mayor aumento (4x) se observa la compleja relación espacial entre los gránulos de cemento de contorno irregular y las múltiples estructuras óseas neoformadas que se presentan como espículas, trabéculas, o formaciones gruesas con actividad osteosintética (Figura 44). El conectivo que rodea a los gránulos de cemento presentan como característica los macrófagos con gránulos citoplasmáticos de cemento ya descritos en grupos anteriores, pero además existen frecuentes células multinucleares (Figura 45 y Figura 47) que en este grupo alcanzan su máxima expresión. Así mismo los fenómenos de síntesis ósea (Figura 44, Figura 45 y Figura 46) se ven acompañados por fenómenos de remodelación representados por osteoclastos (Figura 45 y Figura 46).

La técnica de Von Kossa muestra el hueso neoformado, bien calcificado y los gránulos de contorno irregular rodeados por tejido conectivo (Figura 48). A mayor aumento se observan las trabéculas óseas anastomosadas (Figura 48), pequeñas formaciones óseas y gránulos irregulares con poca afinidad por la plata (Figura 49). A mayor aumento se muestra la proliferación ósea asociada a gránulos de cemento (Figura 50), gránulos de cemento no asociada a hueso

(Figura 49 y Figura 50) y acúmulos de células macrofágicas y multinucleadas de cuerpo extraño (Figura 50).

En resumen, en este subgrupo se observan signos de osteosíntesis y remodelación ósea y presenta pequeños e irregulares restos de cemento. Existen frecuentes células gigantes multinucleares que en este grupo alcanzan su máxima expresión. Presencia de hueso neoformado bien calcificado.

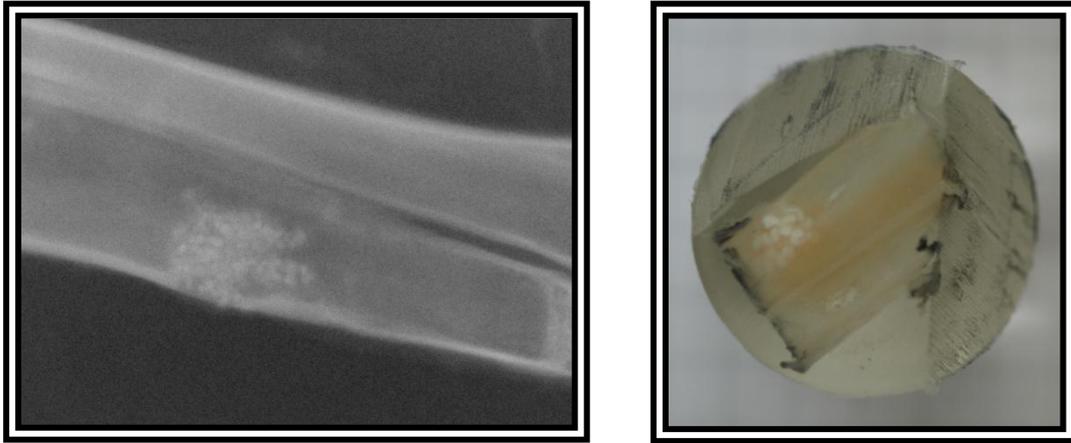


Fig. 42. Radiografía y cilindro de metacrilato de la muestra 40. Gránulos de cemento con aumento del espacio intergranular (animal nº40).

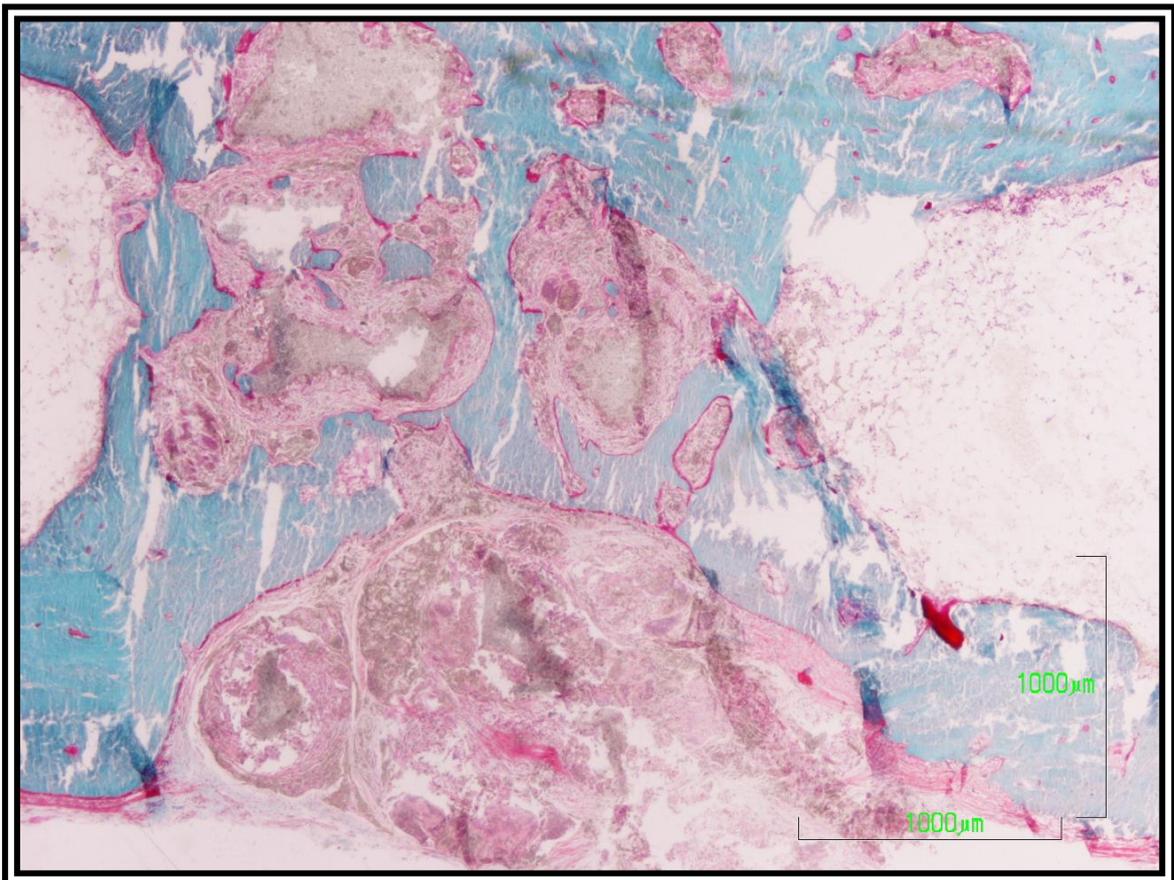


Fig. 43. Tricrómico de Goldner (2x). Proliferación ósea con signos de osteosíntesis.

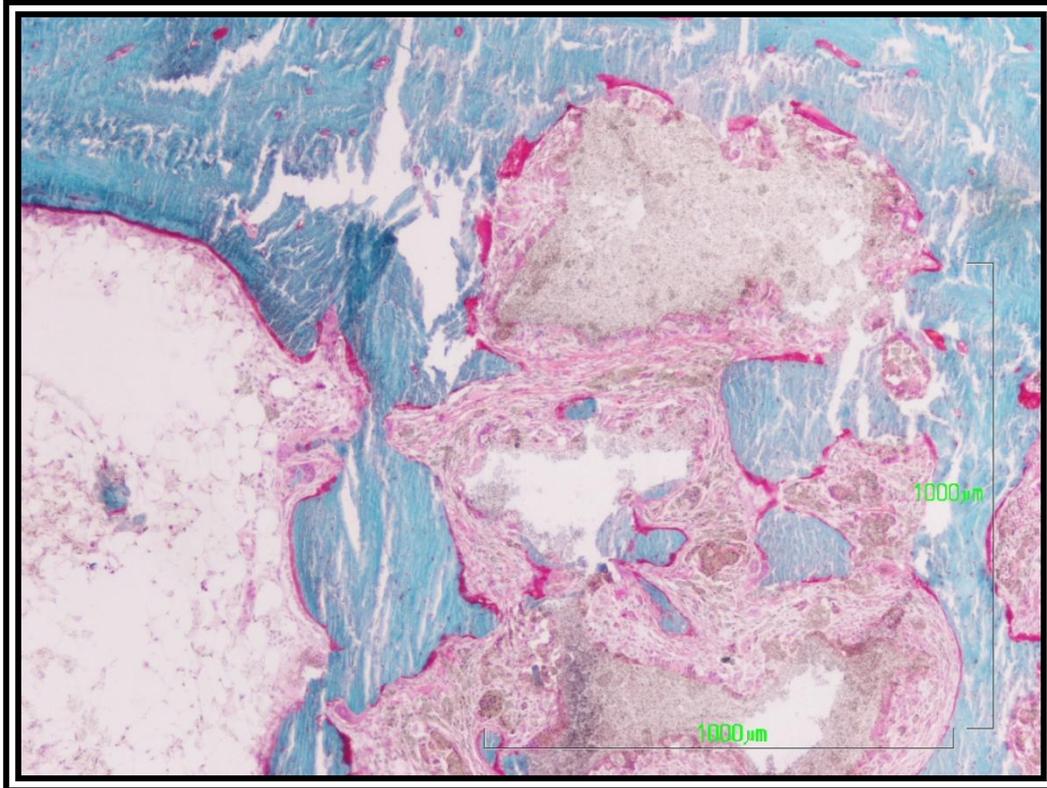


Fig. 44. Tricrómico de Goldner (4x). Espículas o trabéculas óseas con actividad osteosintética.

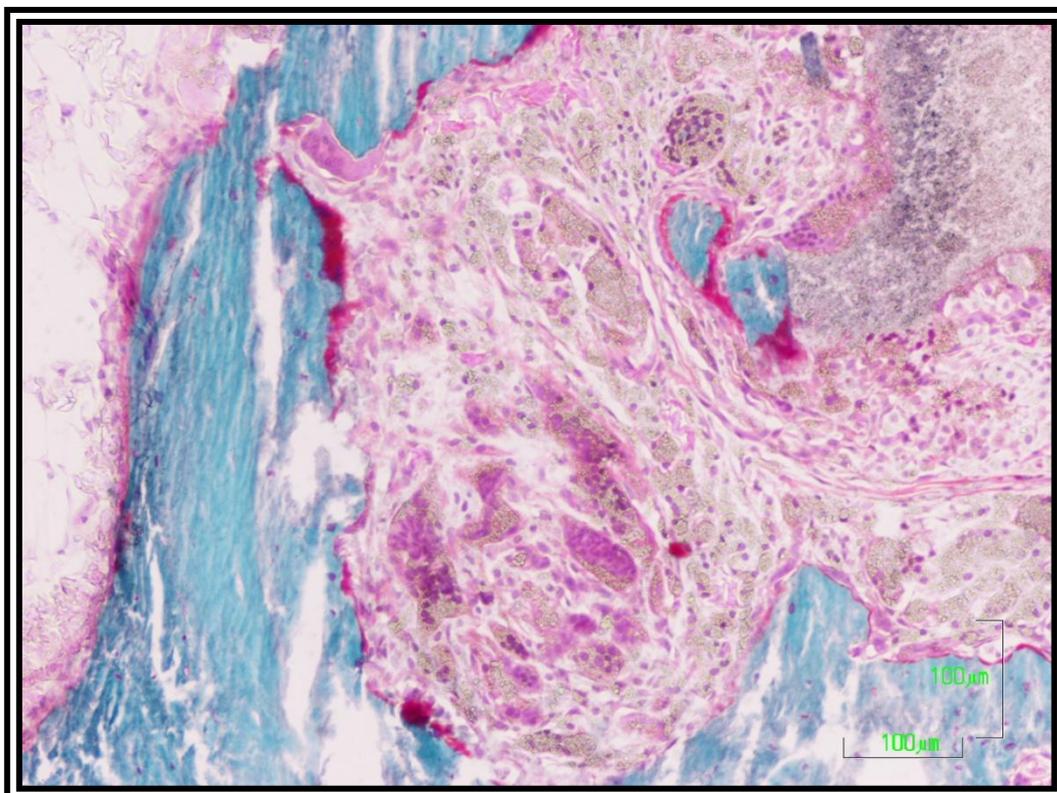


Fig. 45. Tricrómico de Goldner (10x). Macrófagos y células multinucleadas.

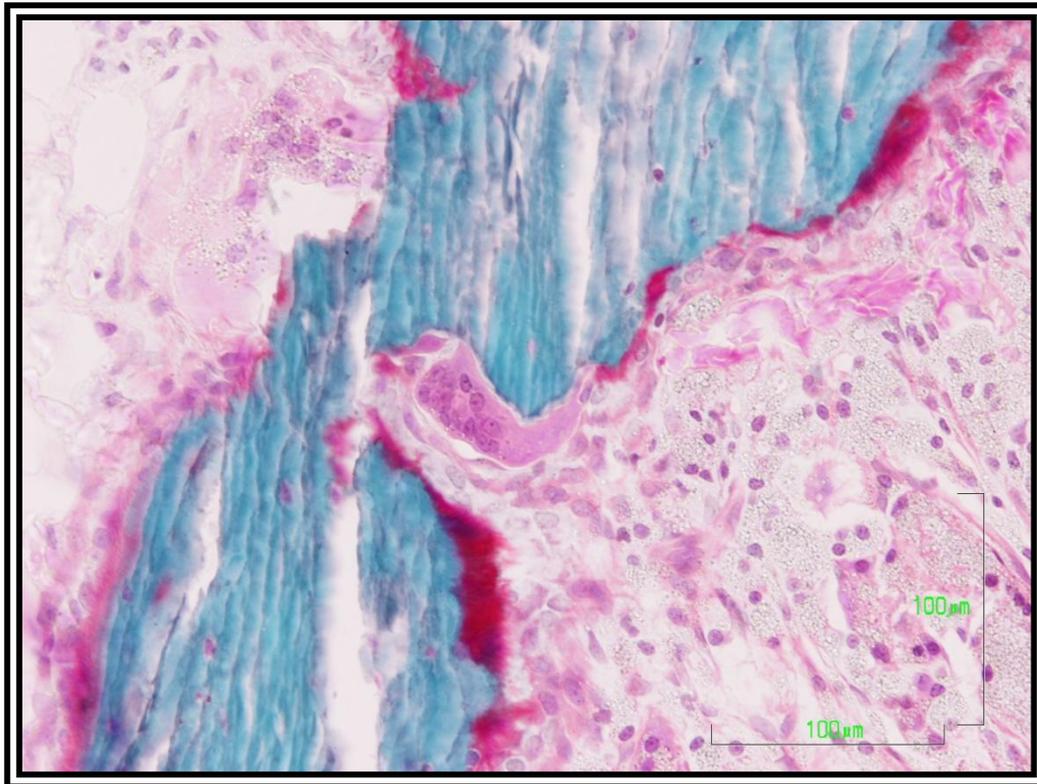


Fig. 46. Tricrómico de Goldner (20x). Remodelación ósea con osteoclastos.

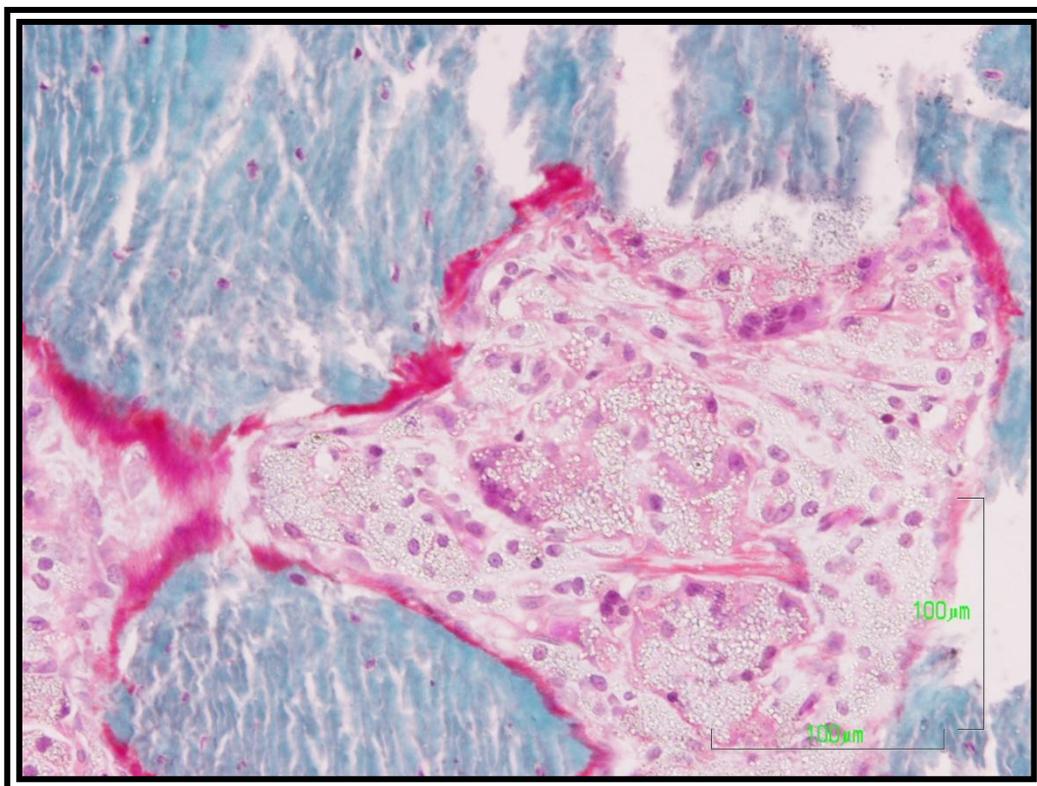


Fig. 47. Tricrómico de Goldner (20x). Células multinucleadas.

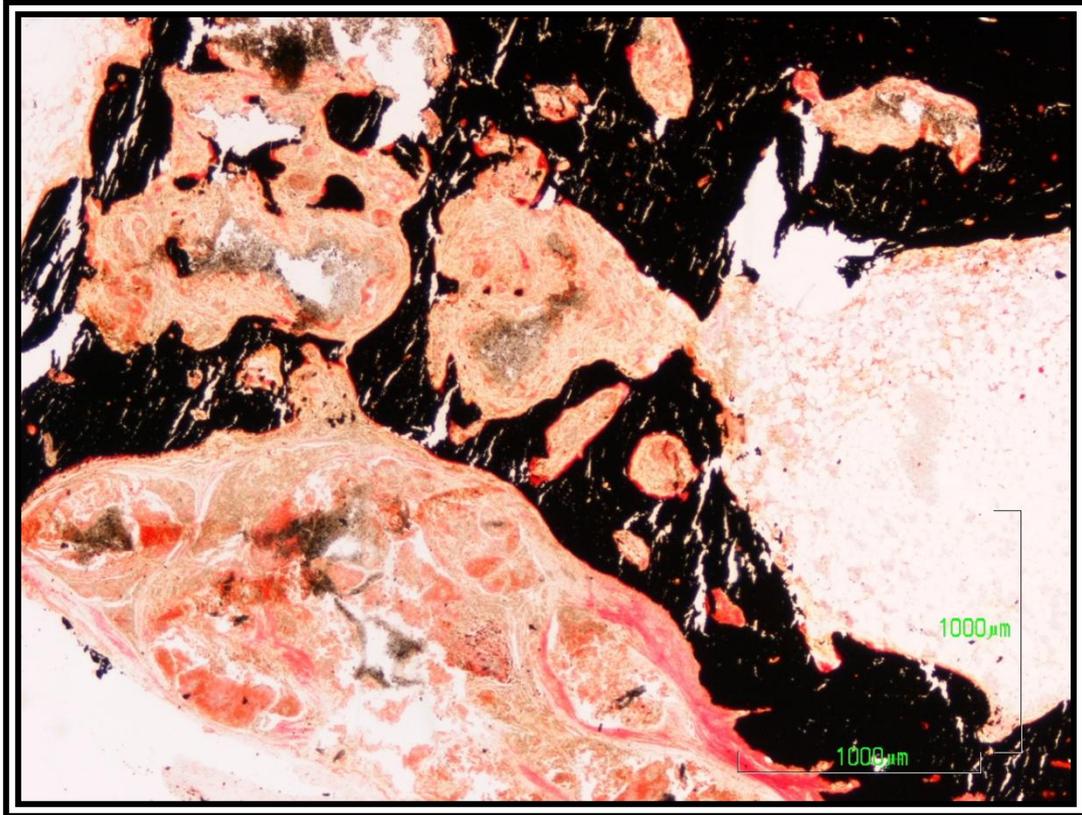


Fig. 48 Técnica de Von Kossa (2x). Hueso neoformado bien calcificado.

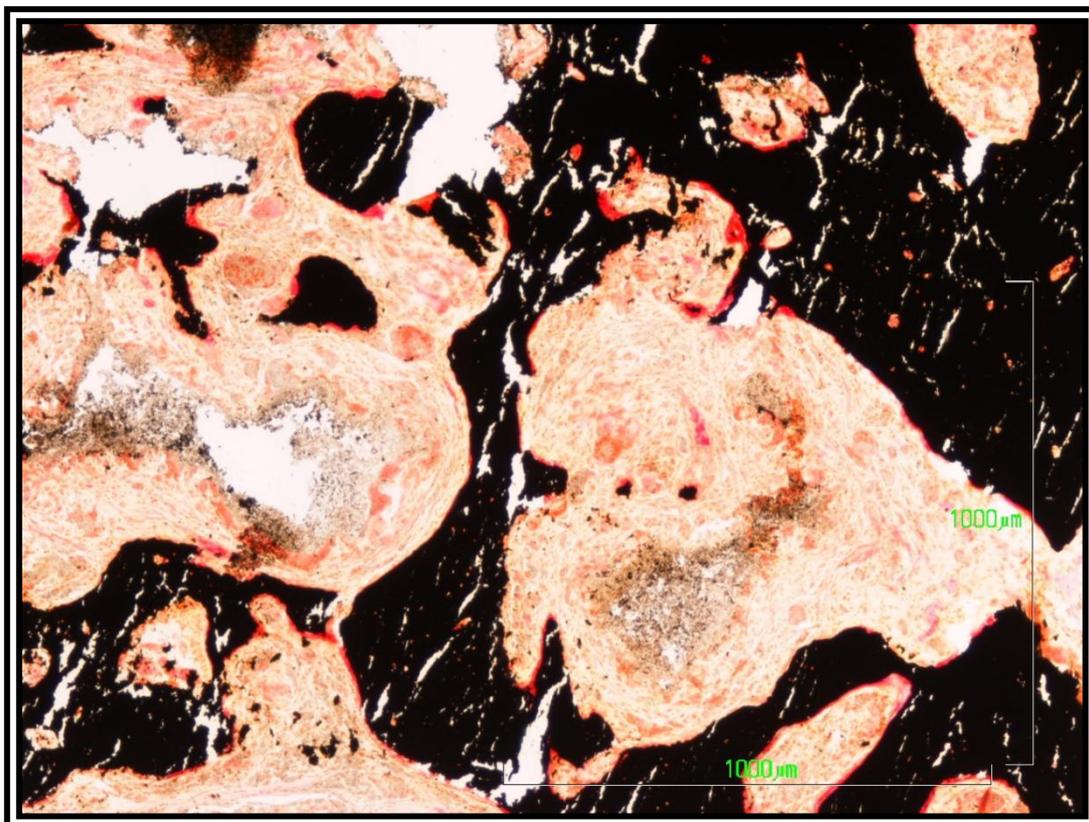


Fig. 49. Técnica de Von Kossa (4x). Gránulos de cemento y trabéculas óseas.

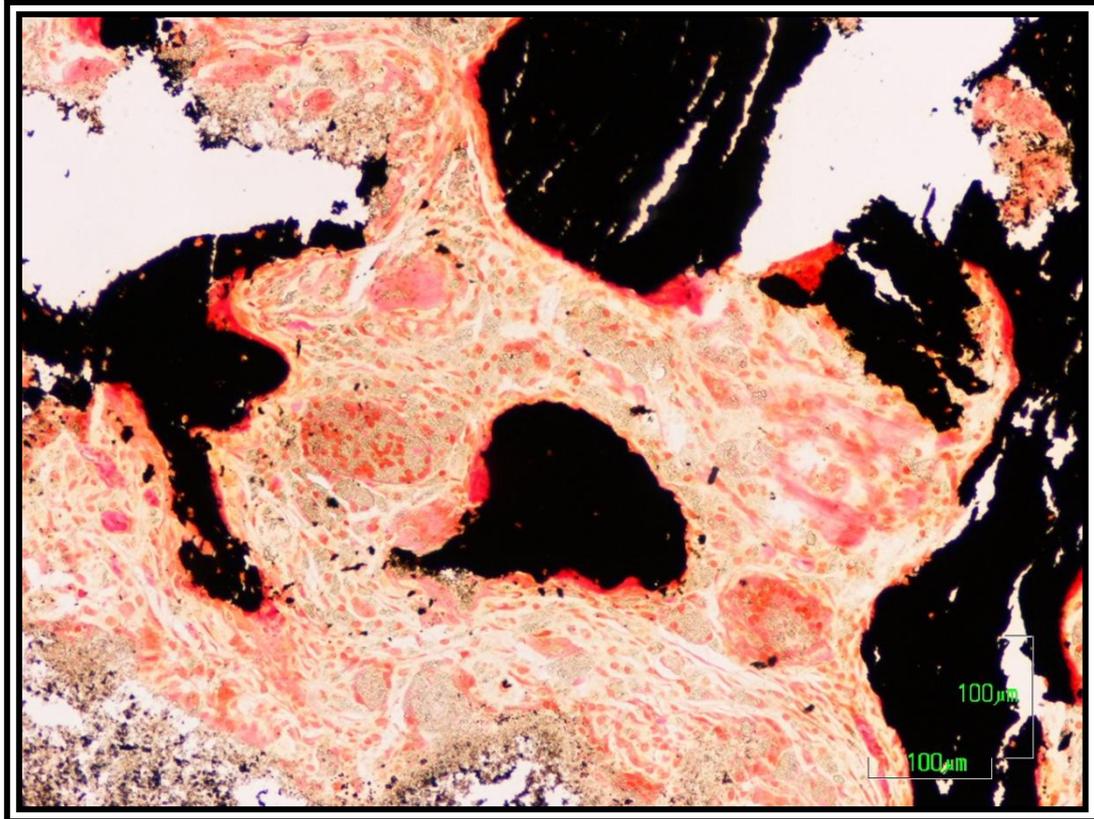


Fig. 50. Técnica de Von Kossa (20x). Células macrofágicas y multinucleadas de cuerpo extraño.

2. GRUPO 2 (CEMENTO CON ALENDRONATO)

El grupo 2 está constituido por los animales a los que se le practicó la osteotomía y a continuación se les colocó cemento impregnado con gel de alendronato.

El conjunto de animales que forman este grupo se haya expuesto en la Figura 28 de *Material y Método*. El tiempo de evolución desde la lesión hasta la eutanasia fue de 5 días, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12 y 13 semanas.

Para la exposición de los resultados se ha agrupado este grupo en subgrupos 2A, 2B, 2C y 2D teniendo en cuenta el tiempo de evolución desde el acto quirúrgico hasta la eutanasia.

2.1 - Subgrupo 2A (4 - 5 semanas y n=10)

Este subgrupo está formado por los casos 59, 60, 62, 65, 78, 80 y 83; 45, 75 y 77, y los hallazgos radiológicos correspondientes a 4 semanas (n=7) y 5 semanas (n=3).

Radiológicamente (Figura 51) se observan los gránulos de cemento más alendronato ocupando el área diafisaria adyacente a la lesión, estos gránulos pueden individualizarse aunque están relativamente compactados. Se observa así mismo la lesión central, sin cemento, a la derecha del conjunto de los gránulos, sin reacción ósea aparente radiológicamente.

Histológicamente, las fotos panorámicas muestran la presencia de los gránulos que se extienden por la cavidad medular (Figura 52), así como la existencia de finas trabéculas de hueso neoformado (Figura 52). Con la técnica

de Von Kossa las formaciones de cemento y alendronato presentan en esta etapa una gran apetencia por la plata (Figura 53) y se confirma la existencia de finas trabéculas óseas neoformadas que se extienden en la cavidad medular, presentando algunas de éstas continuidad física con la superficie interna de la cortical diafisaria (Figura 53).

A mayor aumento (4x) (Figura 54), algunos gránulos de cemento con alendronato se encuentran rodeados por tejido conectivo (Figura 54 y Figura 55) constituido por fibroblastos, macrófagos con gránulos intracitoplásmicos del producto inyectado (Figura 54 y Figura 55), y puede observarse en la vecindad médula ósea amarilla sin alteraciones (Figura 54). En conjunto la fagocitosis y fragmentación del producto es mayor que en el subgrupo homónimo (Subgrupo 1A) a cuyos animales sólo se les administró cemento.

Se observan así mismo células gigantes multinucleadas (Figura 55). En otras zonas, prima la formación de tejido óseo (Figura 56) observándose en la vecindad de los gránulos de cemento, hueso neoformado con organización trabecular (Figura 56). En la vecindad de hueso neoformado es frecuente la presencia de células multinucleadas de hábito osteoclástico (Figura 57).

En otras zonas (Figura 58) se observa una marcada inducción de la formación de tejido óseo (Figura 58) que adopta la forma de finas trabéculas anastomosadas entre sí formando una red en cuyo interior se observan los restos de material con alendronato (Figura 58). A mayor aumento (4x) se observa la estrecha relación del tejido óseo neoformado con los restos de cemento más alendronato (Figura 59) que en algunas áreas es adyacente, sin tejido interpuesto (Figura 59) mientras que en otras se encuentra tejido conectivo separando el material de tejido óseo (Figura 59) Es interesante

reseñar que el hueso neoformado presenta signos de síntesis activa en muchas zonas (Figura 59 y Figura 60) y fenómenos de remodelación ósea como atestiguan los conductos vasculares presentes en su interior (Figura 59 y Figura 60).

La presencia de macrófagos cargados de restos de cemento es constante también en ésta área aunque predomine la neoformación ósea (Figura 60).

La Figura 61, resume los hallazgos de éste grupo, a saber, el material en contacto con tejido conectivo y macrófagos (Figura 61), el material en relación directa con el hueso neoformado (Figura 61), los fenómenos de síntesis ósea activa con osteiodes y osteoblastos (Figura 61) y finalmente los fenómenos de remodelación con canales vasculares (Figura 61). En las fases iniciales se puede observar la síntesis de tejido óseo en relación con el material (Figura 62), mientras que en otras áreas, sin causa diferencial aparente el material se rodea de tejido conectivo (Figura 62). El material administrado no produce alteraciones en la médula ósea amarilla (Figura 62), ni en la médula roja, hematopoyética (Figura 63). La síntesis de tejido óseo puede producirse, indistintamente, en la cara trabecular próxima al material (Figura 64), como en la cara alejada del mismo (Figura 64). El tejido conectivo interpuesto está bien vascularizado (Figura 65), y en algunas zonas además de los macrófagos se observan células gigantes multinucleadas (Figura 65).

Con la técnica de Von Kossa (Figura 66, Figura 67 y Figura 68) se confirma la descripción previa de la trama reticular ósea englobando los gránulos de material argirófilos.

La Figura 67 muestra la formación de tejido óseo intentando obliterar el defecto cortical quirúrgico central vecino a la zona de material.

La Figura 68 muestra a mayor aumento (4x) la proliferación reticular ósea en relación con el material, con marcados fenómenos de síntesis y remodelación.

En resumen, este subgrupo 2A muestra una mayor síntesis ósea en cantidad y calidad que el subgrupo homónimo (subgrupo 1A) al que sólo se le administró cemento. La cortical diafisaria presenta formación de tejido óseo intentando obliterar el defecto.

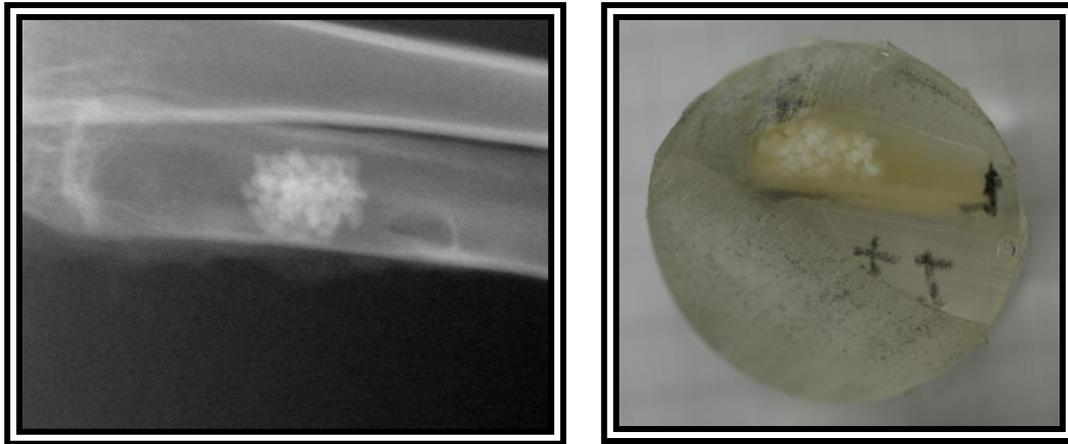


Fig. 51. RX. Gránulos de cemento con alendronato. A la derecha lesión con alendronato (animal nº 62).

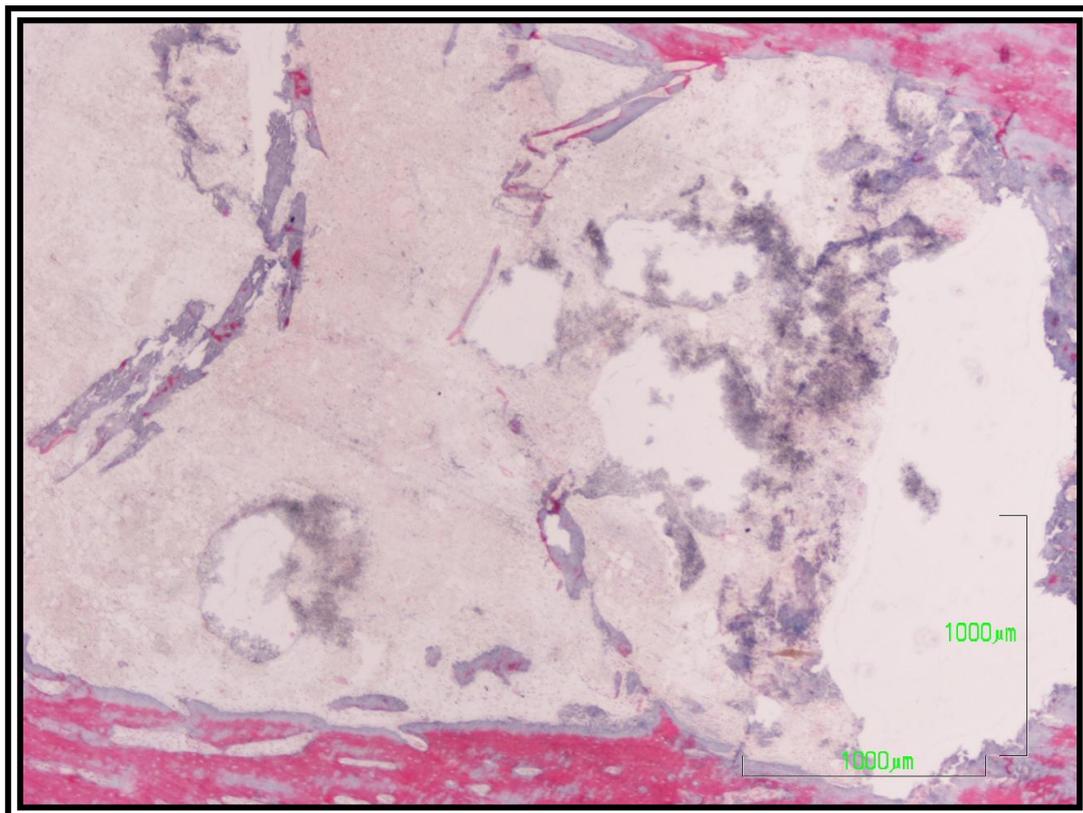


Fig. 52. Tricrómico de Goldner (2x). Gránulos de cemento con alendronato y finas trabéculas de hueso neoformado.

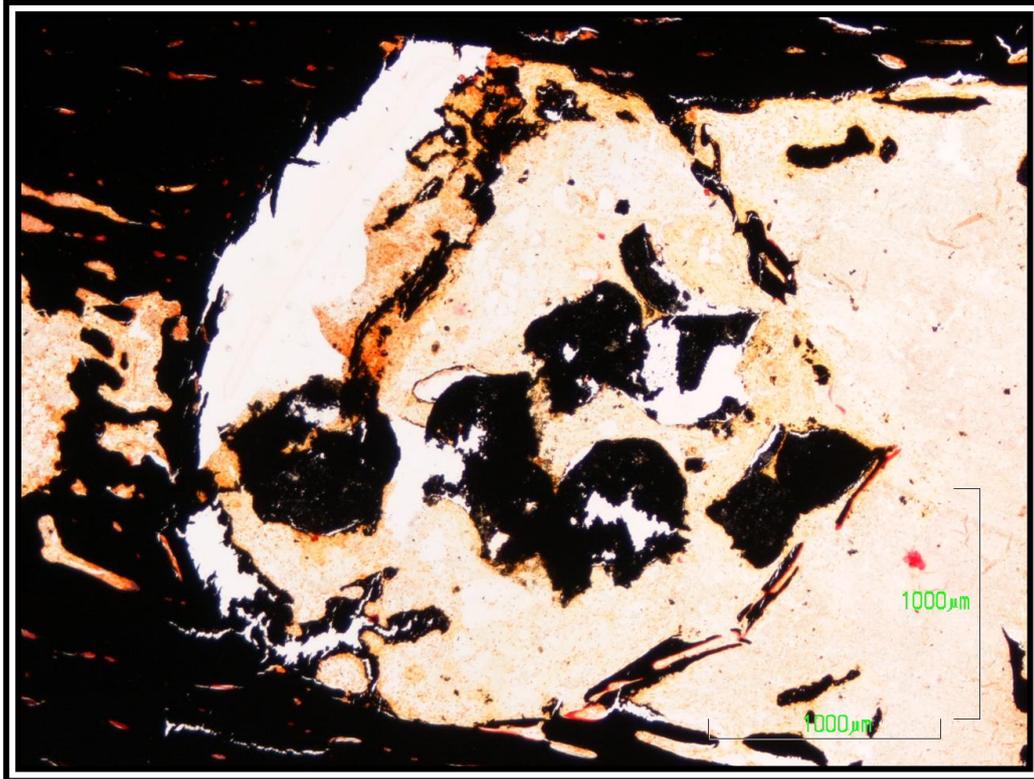
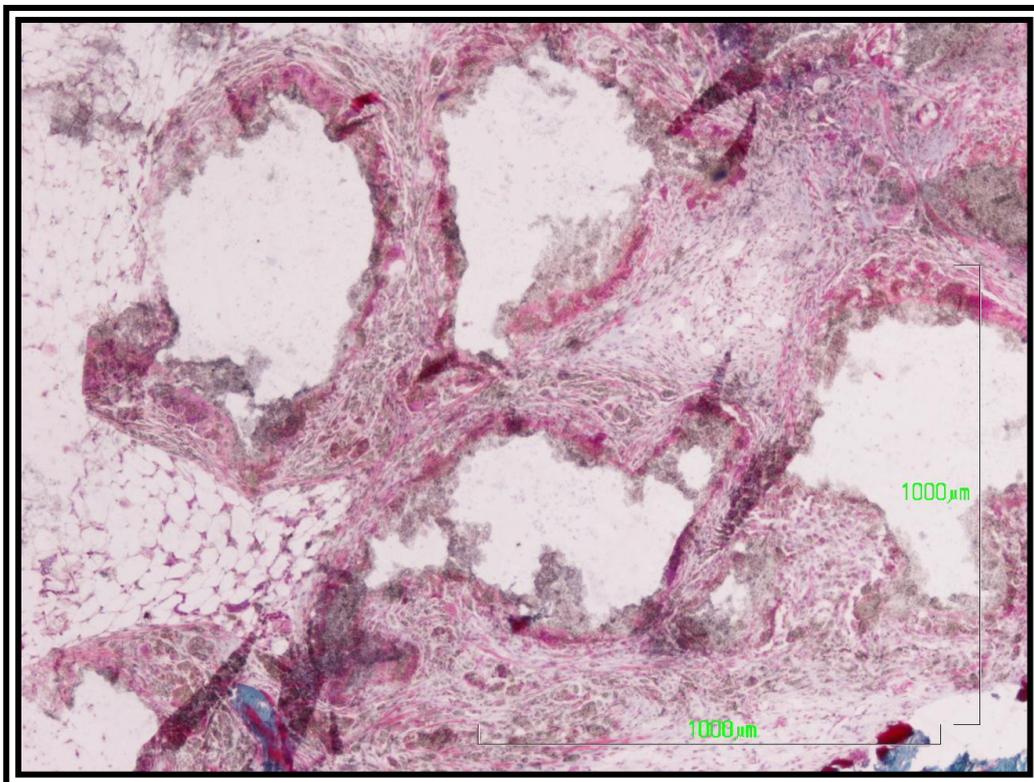
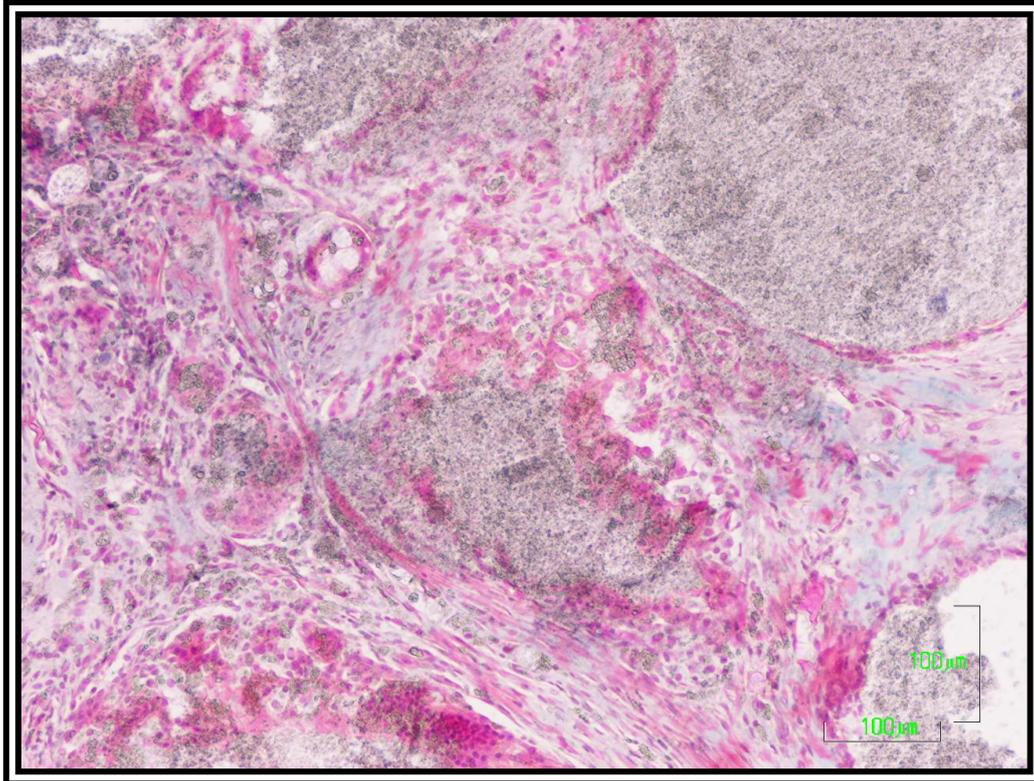


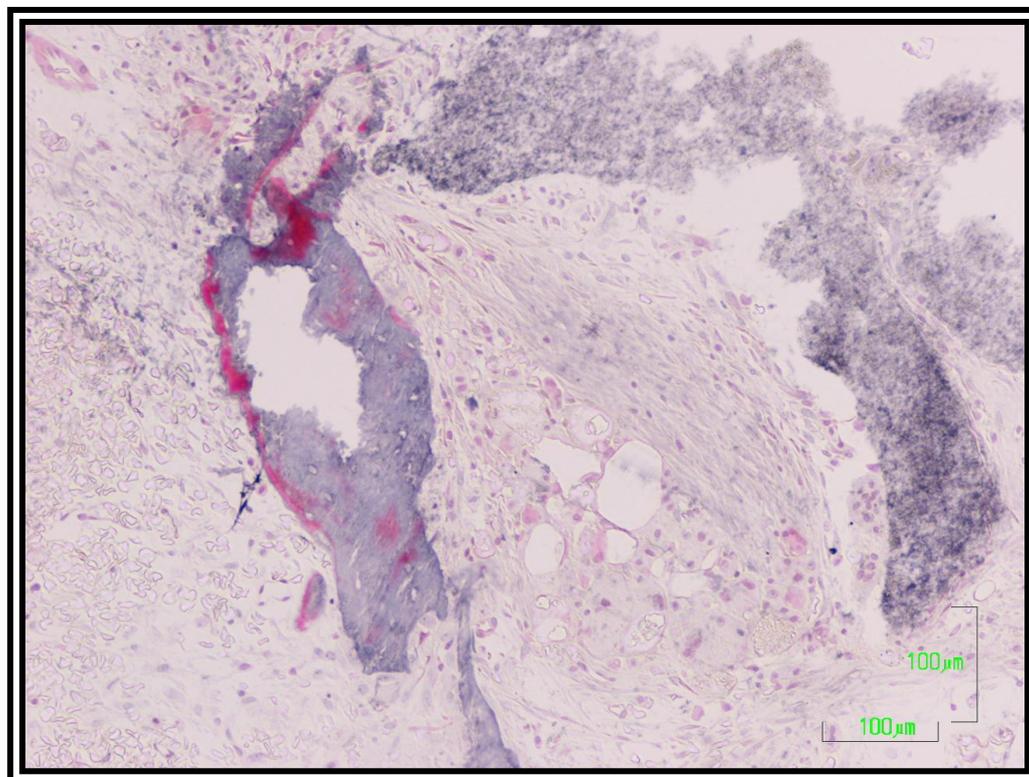
Fig. 53. Técnica de Von Kossa (2x). Finas trabéculas óseas neoformadas en la cavidad medular.



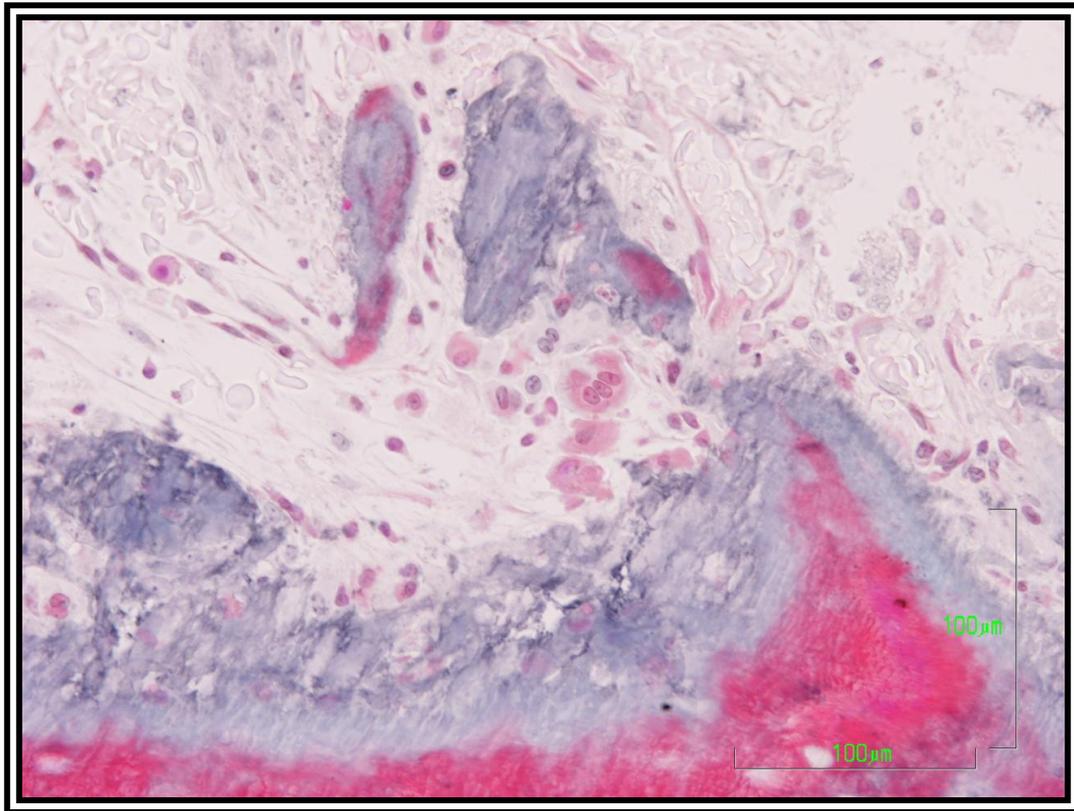
54. Tricrómico de Goldner (4x). Gránulos de cemento con alendronato rodeados de tejido conectivo.



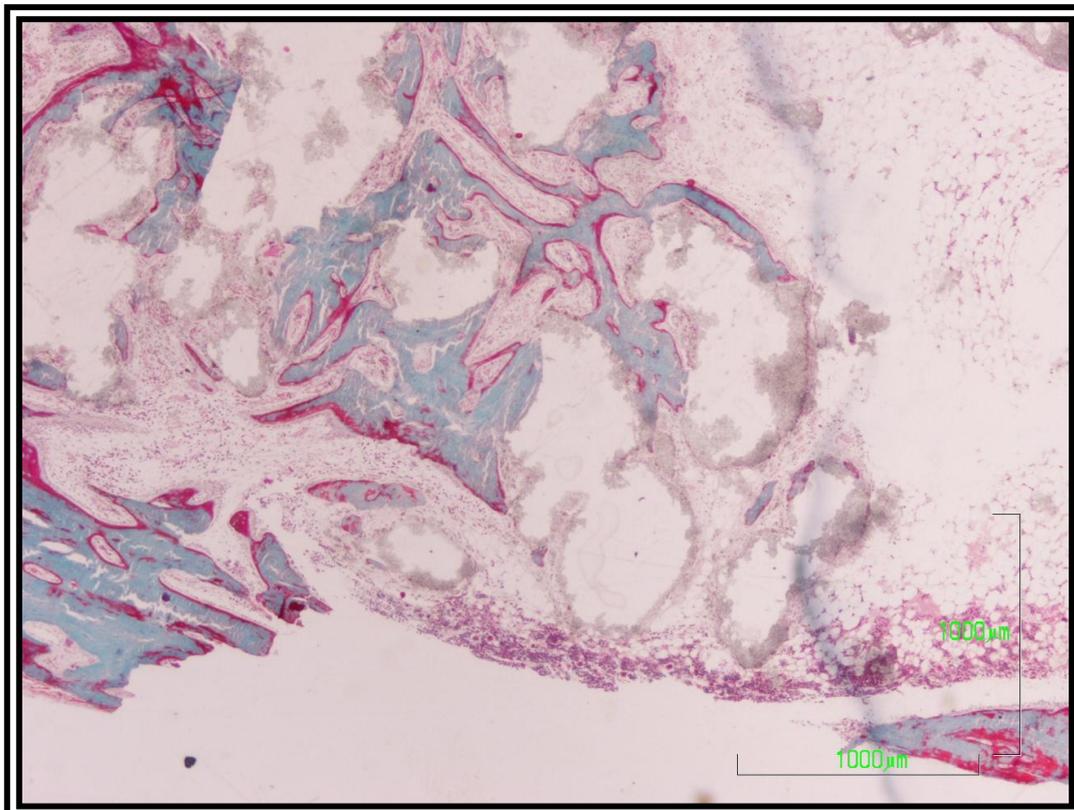
55. Tricrómico de Goldner (10x). Células multinucleadas.



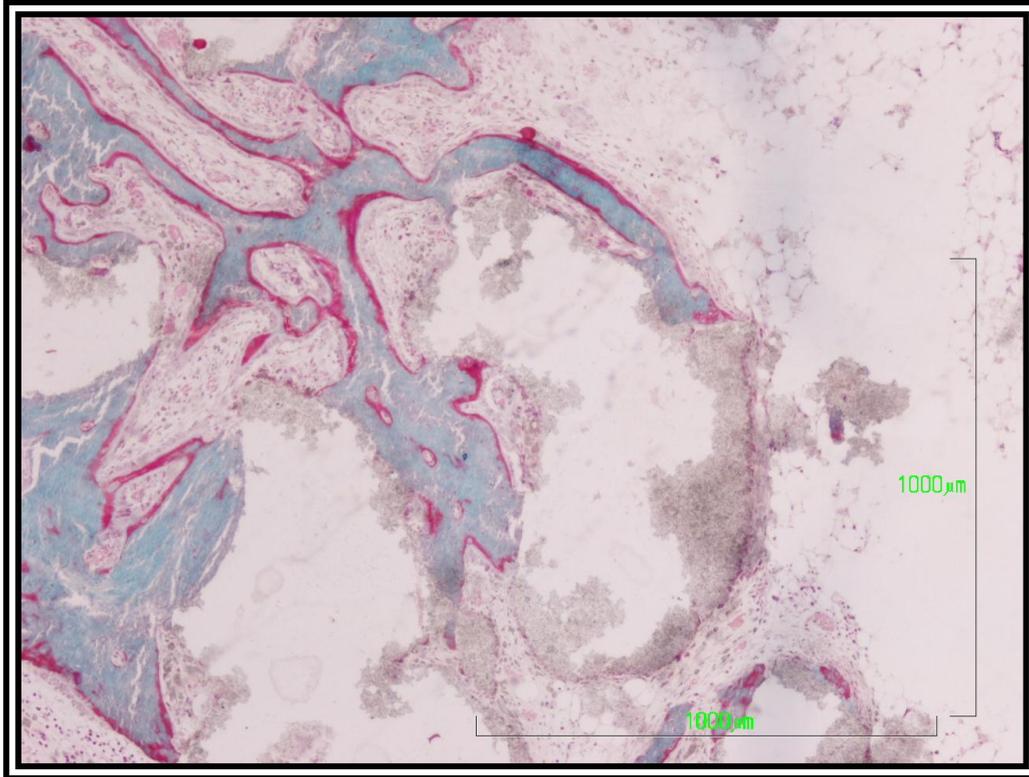
56. Tricrómico de Goldner (10x). Hueso neoformado alrededor del cemento con alendronato.



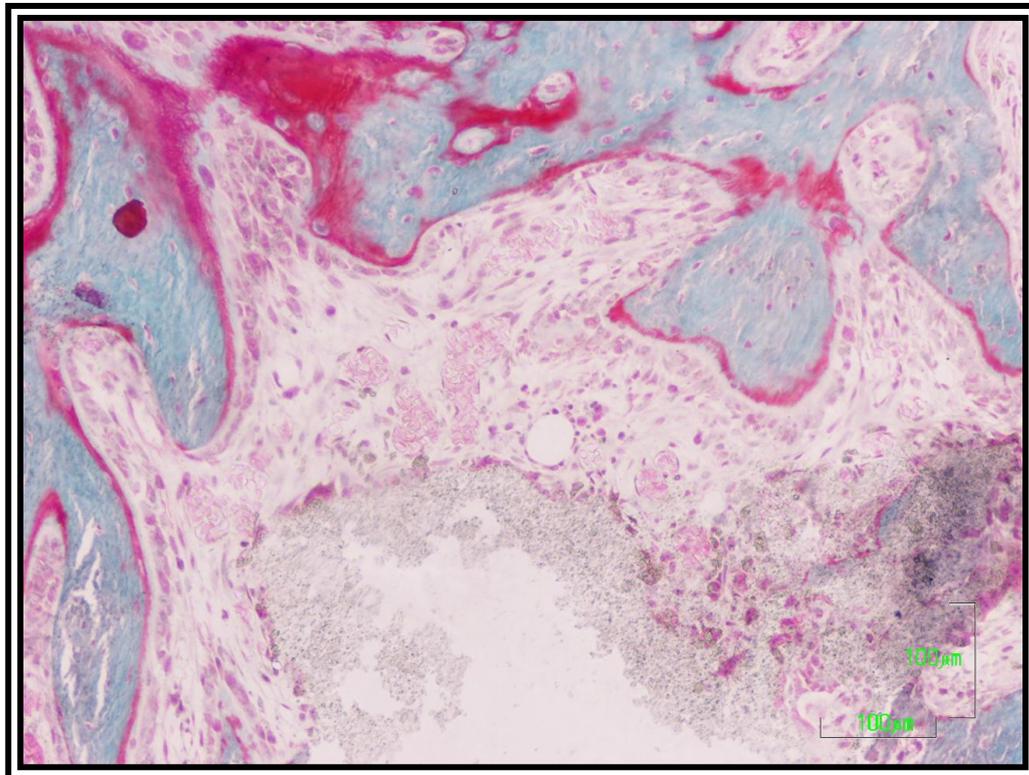
57. Tricrómico de Goldner (20x). Células multinucleadas de hábito osteoclástico.



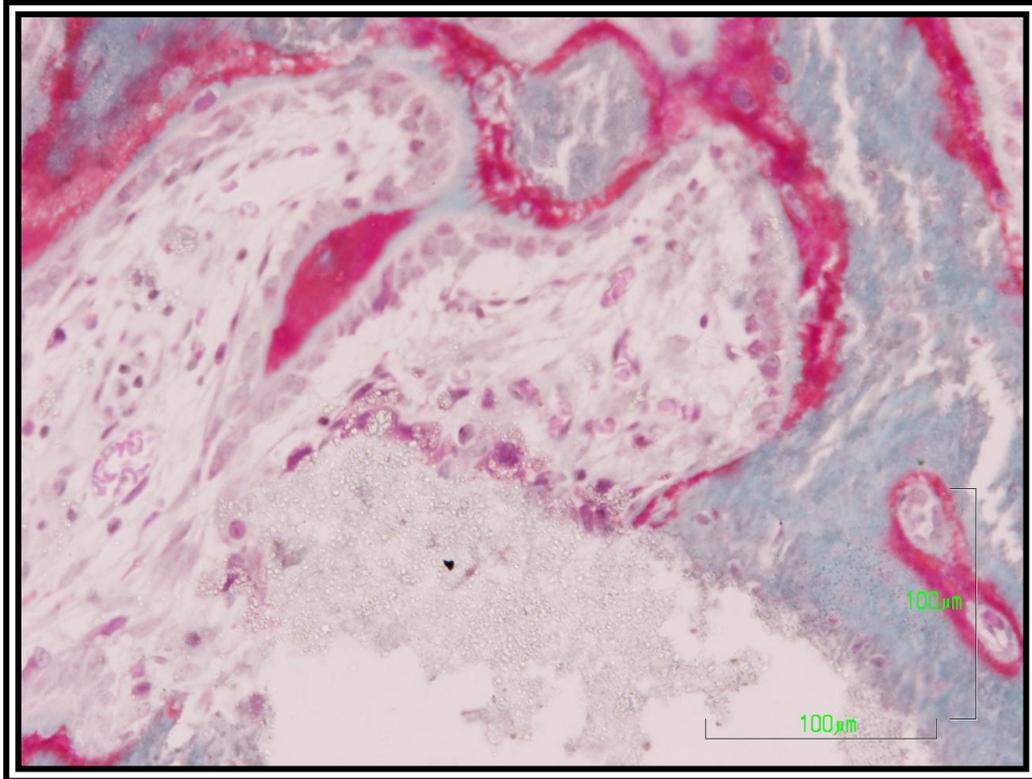
58. Tricrómico de Goldner (2x). Inducción de la formación de tejido óseo.



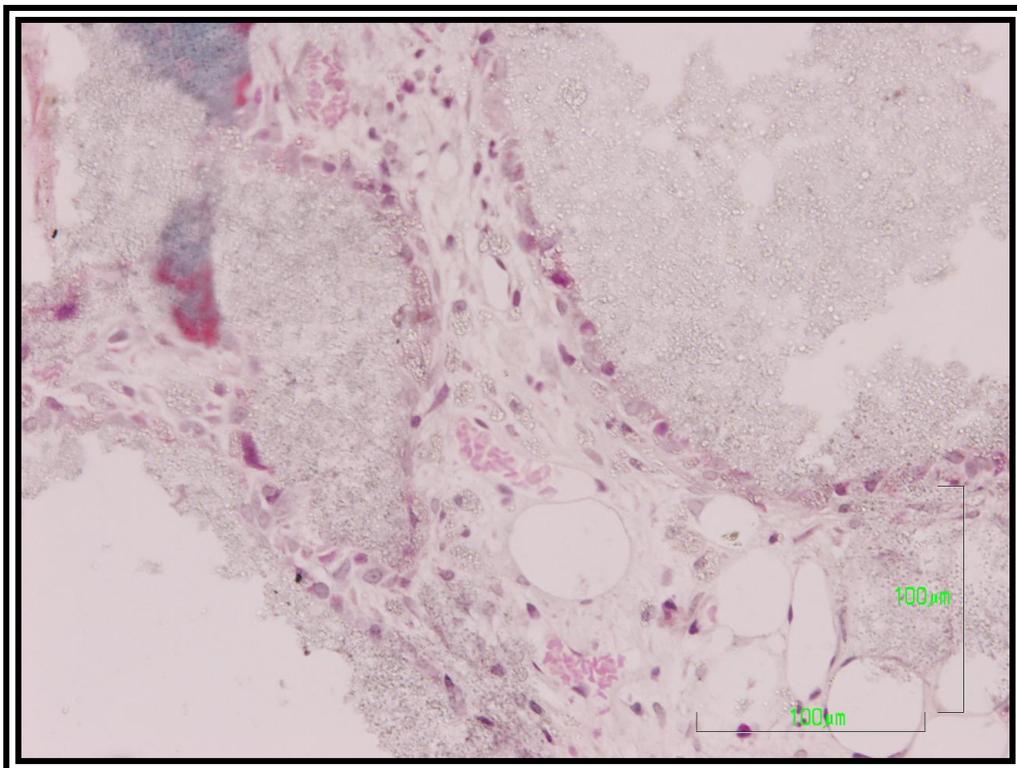
59. Tricrómico de Goldner (4x). Cemento y alendronato rodeado de tejido óseo neoformado.



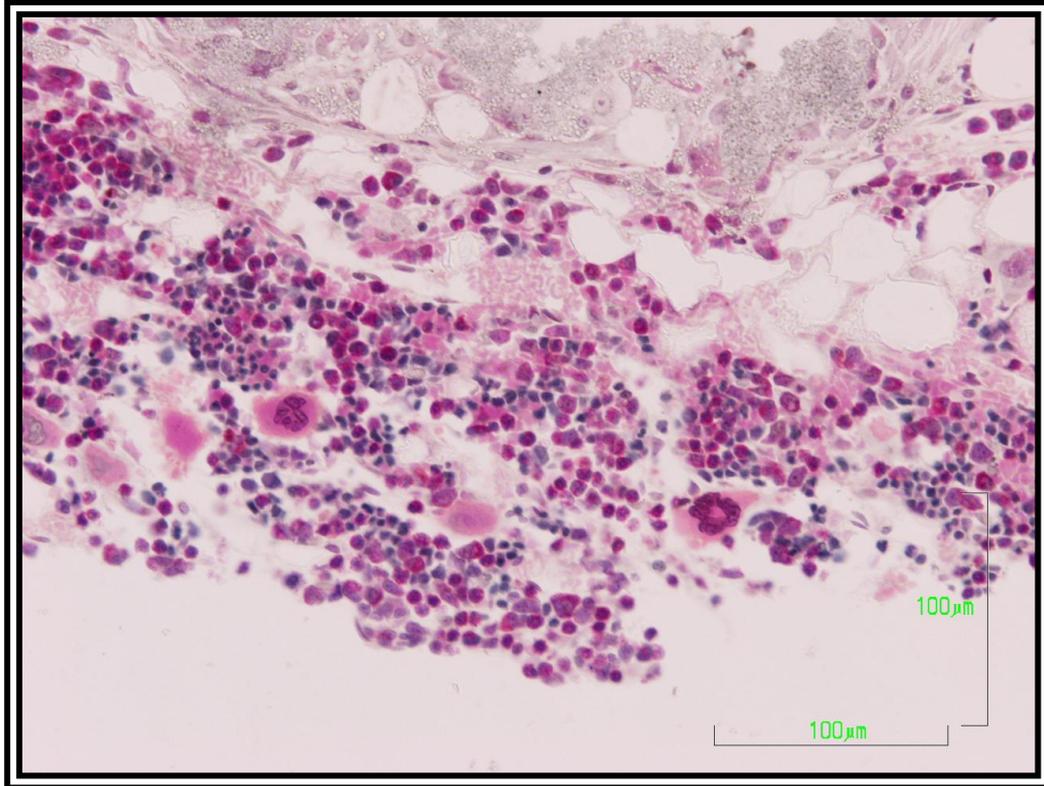
60. Tricrómico de Goldner (10x). Cemento y alendronato rodeado de tejido conectivo y fenómenos de remodelación ósea.



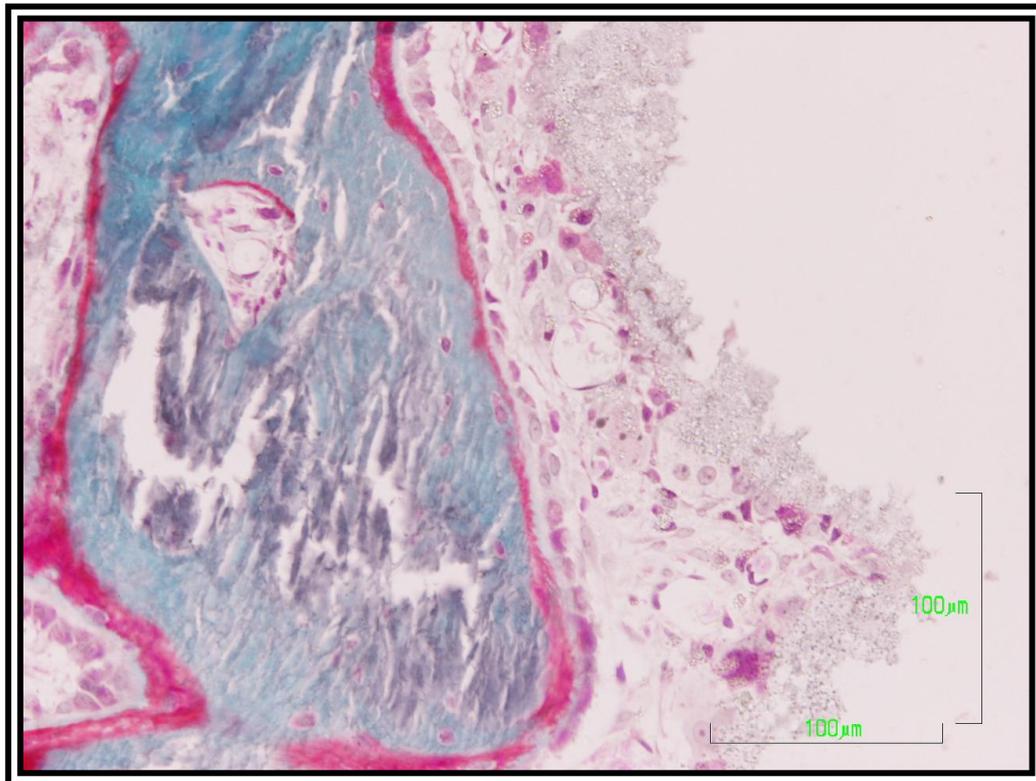
61. Tricrómico de Goldner (20x). Macrófagos en relación con el cemento y alendronato.



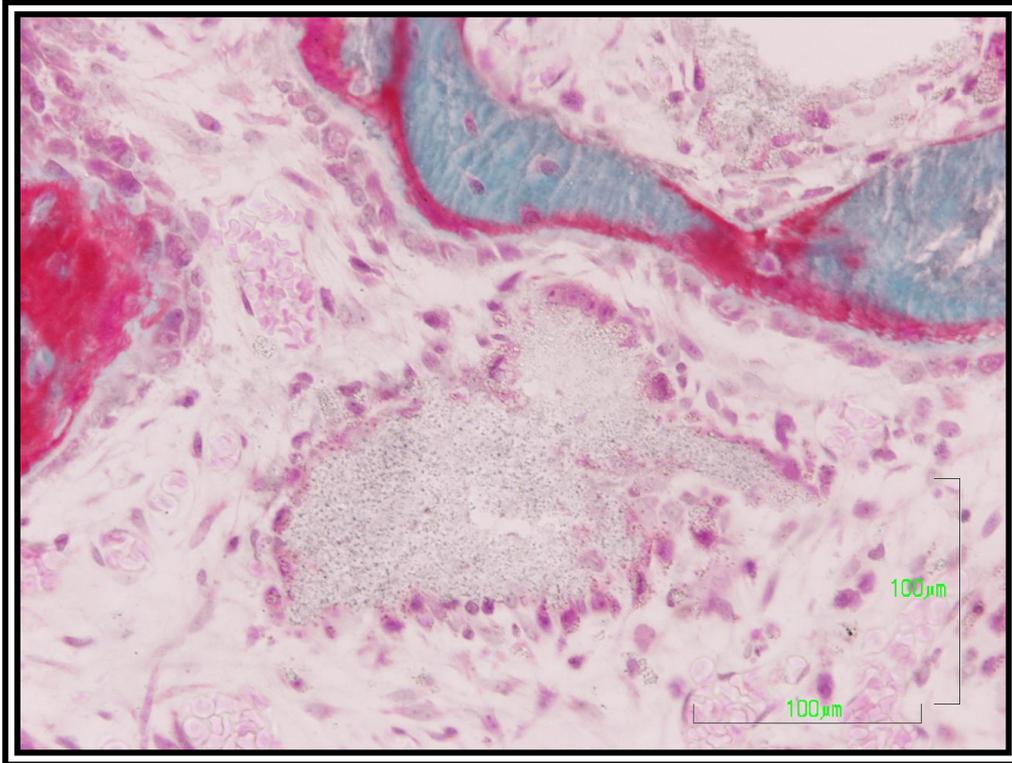
62. Tricrómico de Goldner (20x). Cemento y alendronato rodeado de tejido conectivo.



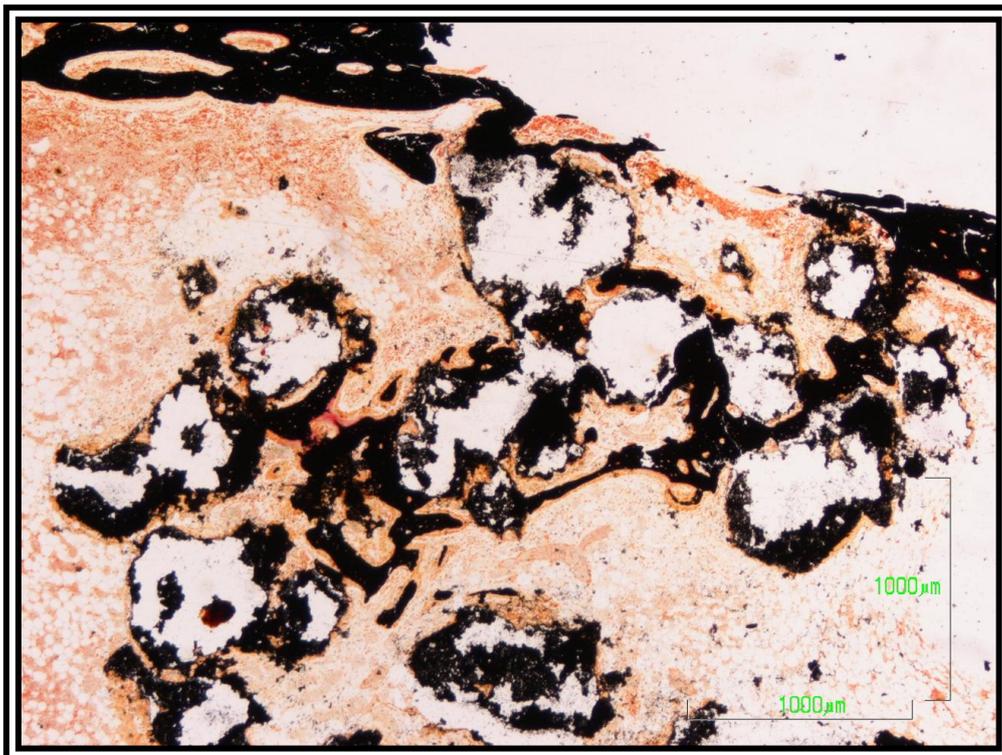
63. Tricrómico de Goldner (20x). Médula roja, hematopoyética con células gigantes multinucleadas.



64. Tricrómico de Goldner (20x). Trabécula ósea con síntesis de tejido óseo.



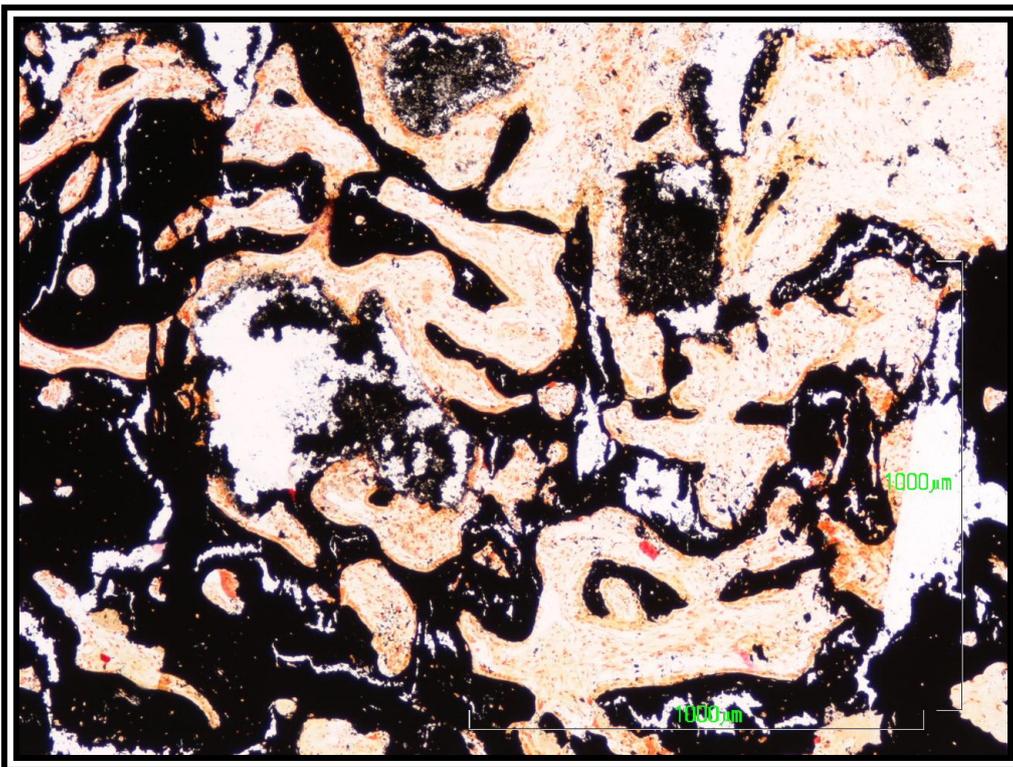
65. Tricrómico de Goldner (20x). Cemento y alendronato en el centro relacionado con macrófagos y células multinucleadas.



66. Técnica de Von Kossa (2x). Gránulos de material (cemento más alendronato) rodeados de una trama reticular.



67. Técnica de Von Kossa (2x). Zona de inyección del material con tejido óseo intentando obliterar dicha zona.



68. Técnica de Von Kossa (4x). Proliferación reticular con fenómenos de síntesis y remodelación ósea.

2.2 - Subgrupo 2B (6 - 7 semanas y n=10)

Este subgrupo está formado por los casos 30, 32, 35, 70 y 72; 49, 52, 84, 87 y 88, y está constituido por los animales a los que se les administró cemento más alendronato y se estudió la evolución de la lesión a las 6 (n=5) y 7 (n=5) semanas.

Radiológicamente la Figura 69 a las 7 semanas muestra el conjunto de gránulos de material presentando una densidad menor asociada a áreas de densidad similar a la que presenta la cortical diafisaria (Figura 69).

Histológicamente, la perforación cortical central, no presenta regeneración ósea con la excepción de un pequeño puente incompleto subperióstico (Figura 70). A bajo aumento (2x) (Figura 71), el área de colocación de material presenta los gránulos de aspecto heterogéneo rodeados por hueso constituido por robustas formaciones anastomosadas (Figura 71), con signos de síntesis activa (Figura 71). A mayor aumento (4x) se afirma la composición heterogénea de los gránulos constituidos por una parte más densa, minoritaria y otra menos densa, más abundante (Figura 72).

La neoformación ósea está muy desarrollada y las trabéculas son mucho más gruesas aunque siguen presentando fenómenos de síntesis (Figura 72). En la vecindad del material, se encuentran áreas de tejido conectivo, con macrófagos y células gigantes, y zonas de hueso opuestas directamente al material (Figura 73). Este hecho es evidente en algunas áreas (Figura 74) donde se observa hueso directamente situado sobre el material (Figura 74) y en la cara más alejada de ésta trabécula fenómenos de síntesis ósea (Figura 74). En áreas sin contacto evidente con el material se observa médula ósea

adiposa bien vascularizada (Figura 75) y fenómenos de síntesis ósea (Figura 75).

En conjunto en este subgrupo el tejido óseo se ha desarrollado notablemente englobando los gránulos de material (Figura 76). La cortical diafisaria presenta un pequeño puente incompleto subperióstico.

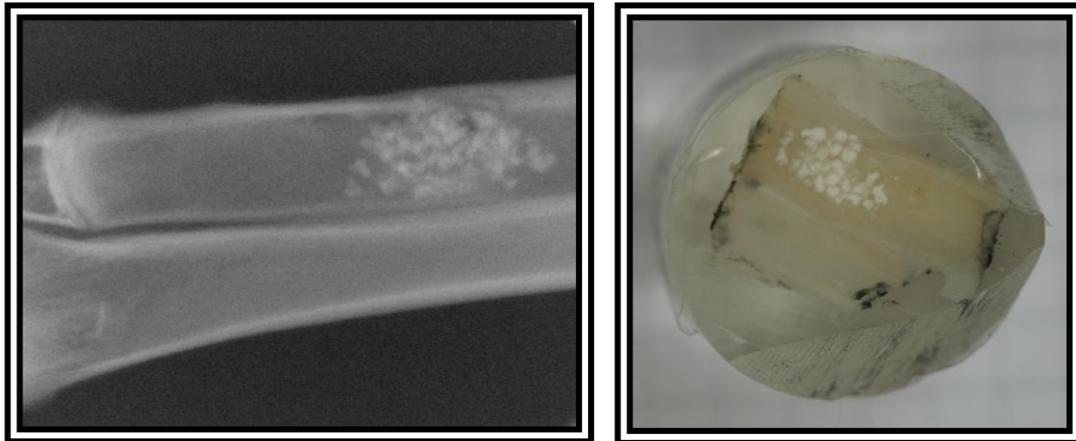


Fig. 69. RX. Gránulos de cemento y alendronato en animales de 6 - 7 semanas post colocación de biomaterial y alendronato (animal nº 84).

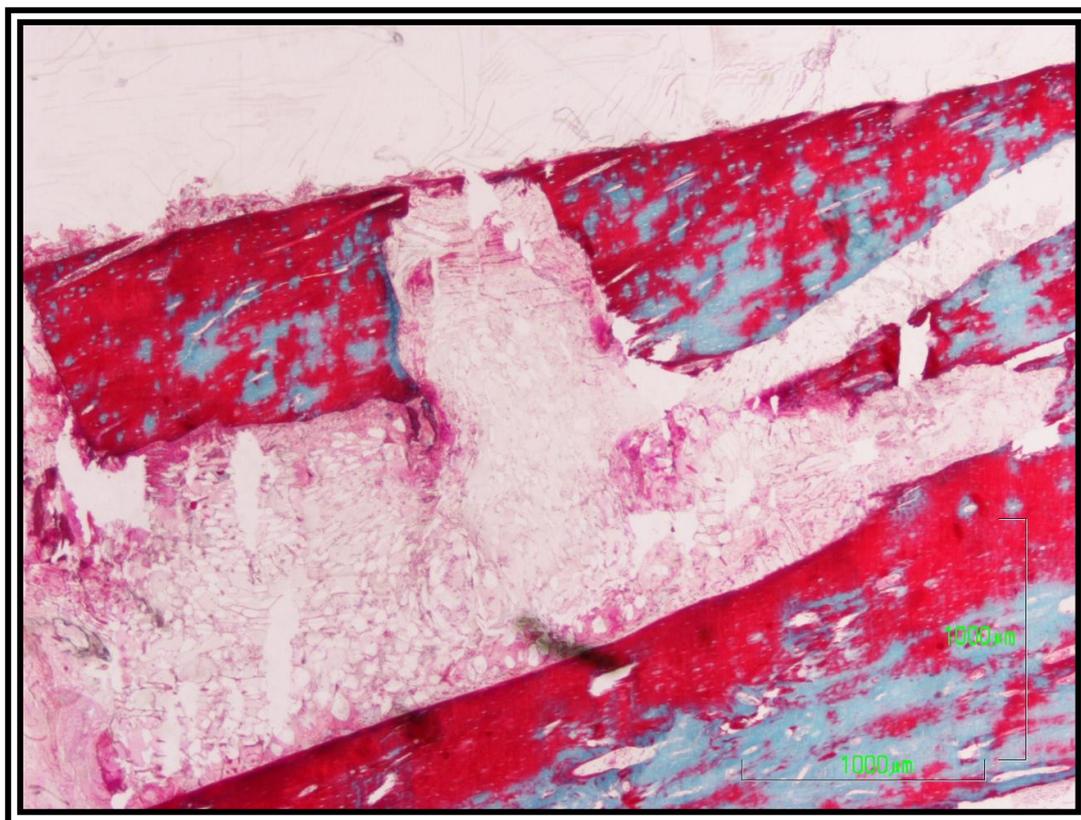


Fig. 70. Tricrómico de Goldner (4x). Perforación cortical central.

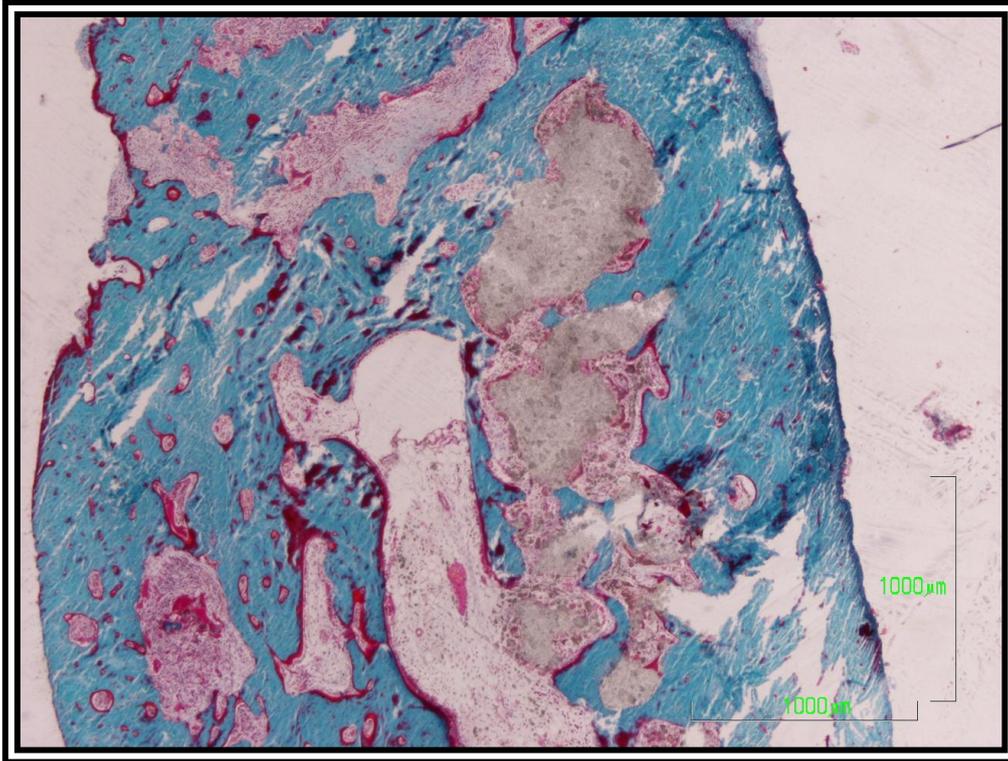


Fig. 71. Tricrómico de Goldner (2x). Gránulos de cemento con alendronato rodeados por hueso.

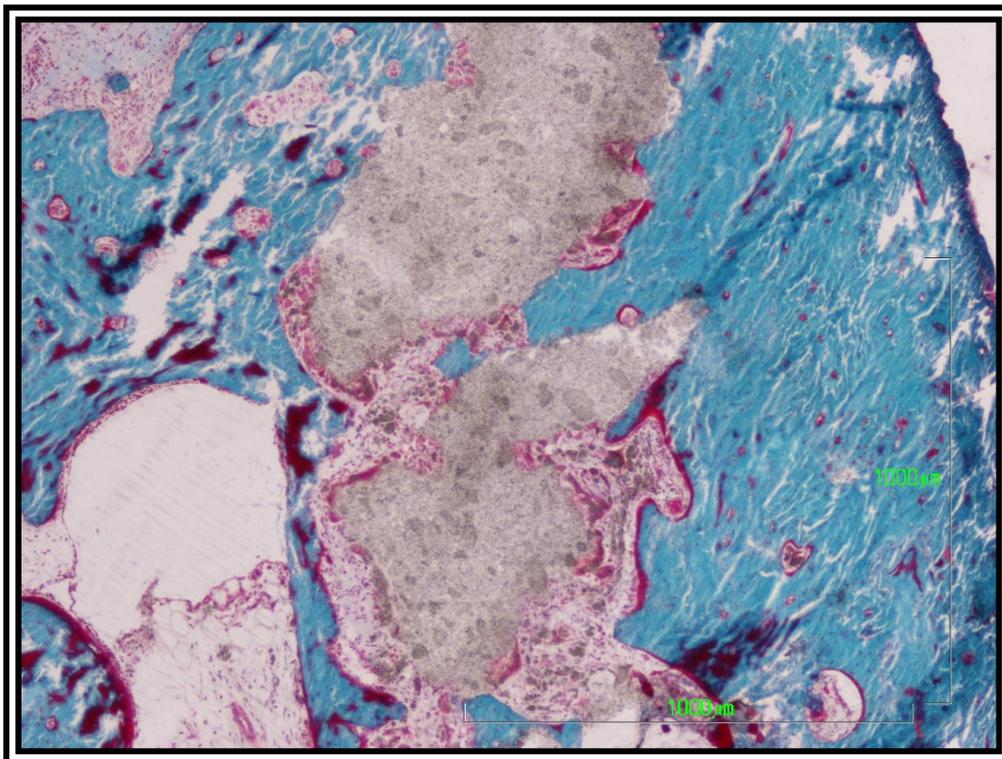


Fig. 72. Tricrómico de Goldner (4x). Gránulos con cemento y alendronato con diferentes densidades.

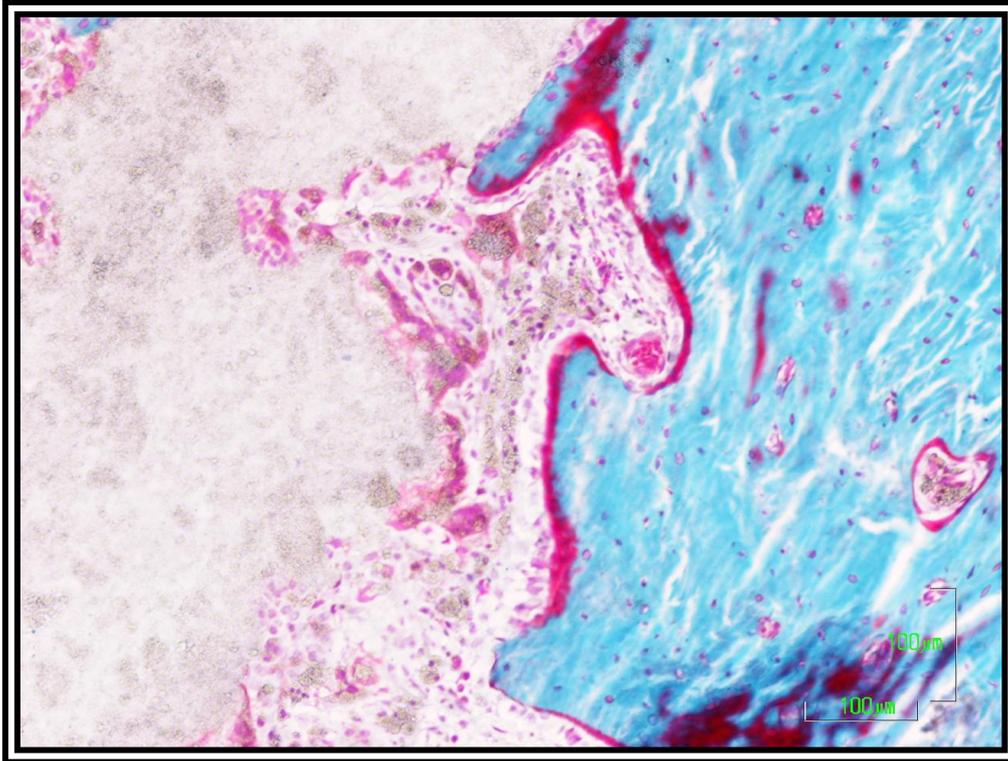


Fig. 73. Tricrómico de Goldner (10x). Tejido conectivo con macrófagos y células gigantes entre el material (cemento más alendronato) y tejido óseo.

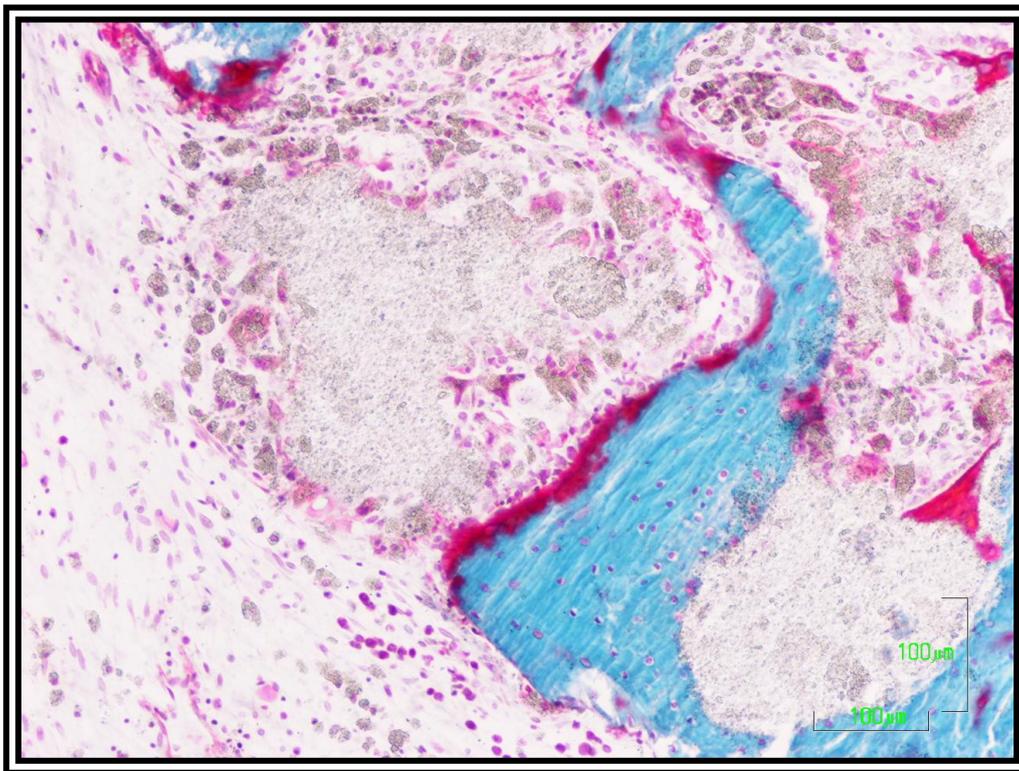


Fig. 74. Tricrómico de Goldner (10x). Síntesis ósea en la trabécula y material (cemento más alendronato) rodeado por tejido óseo.

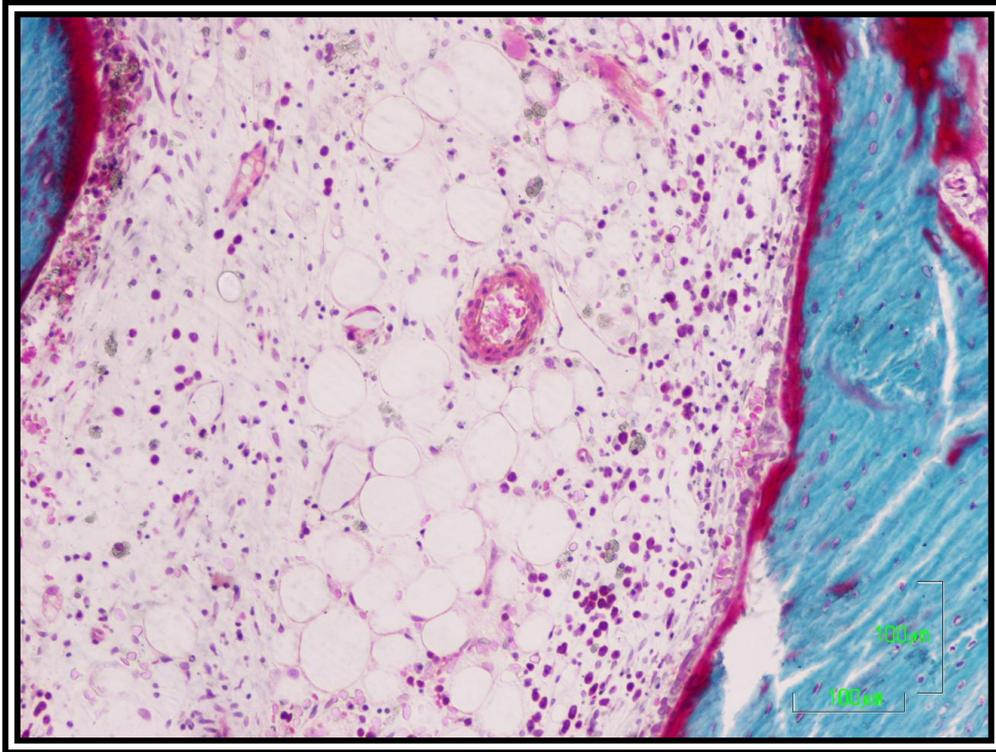


Fig. 75. Tricrómico de Goldner (10x). Médula ósea adiposa bien vascularizada y fenómenos de síntesis ósea.

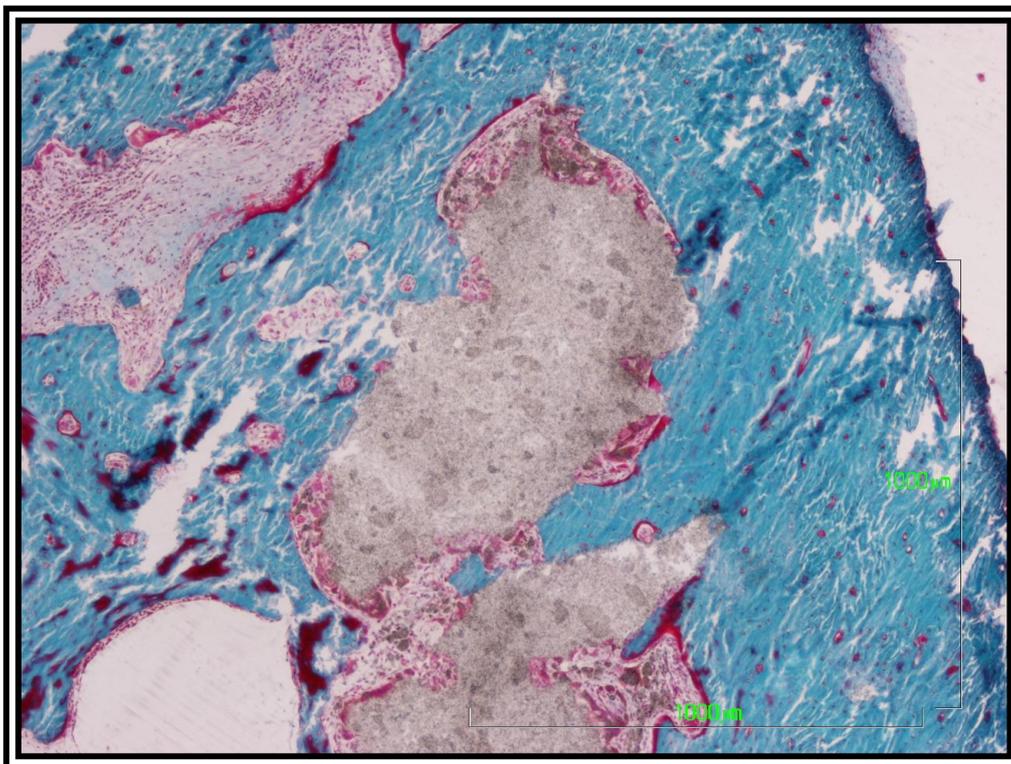


Fig. 76. Tricrómico de Goldner (4x). Gránulos de material (cemento más alendronato) rodeados de tejido óseo.

2.3 - Subgrupo 2C (9 semanas y n=3)

Este subgrupo está formado por los casos 29, 47 y 50, y por los animales a los que se les administró alendronato más cemento y se estudió la evolución a las 9 semanas (n=3).

El estudio radiológico muestra el conjunto de los gránulos de material de aspecto heterogéneo, como ya se evidencia en el subgrupo anterior, mostrando una densidad radiológica variable (Figura 77).

El estudio histológico muestra la zona de implantación del material (cemento más alendronato) y algunas zonas constituidas por gránulos rodeadas por tejido conectivo laxo y hueso (Figura 78) mientras que en otras al igual que se observó a las 6-7 semanas, se observan los restos de los gránulos de material rodeados por gruesas trabéculas óseas (Figura 79 y Figura 80). Los gránulos de material presentan un aspecto heterogéneo (Figura 79) y en las zonas no recubiertas por tejido óseo son frecuentes los macrófagos y las células gigantes (Figura 80). En la zona central del conjunto de gránulos estos se hallan englobados en una densa red de gruesas trabéculas óseas ribeteadas de sustancia osteoide (Figura 81 y Figura 82), signo de la persistencia de la síntesis ósea (Figura 82). En otras áreas el hueso neoformado presenta menos signos de síntesis ósea, signo que muestra la estabilización progresiva de la estructura ósea (Figura 83).

La técnica de Von Kossa, muestra la proliferación ósea abundante, aunque persisten los gránulos de material (Figura 84).

En resumen, en este subgrupo 2C, se muestra la estabilización progresiva de la estructura ósea. Una densa red de gruesas trabéculas óseas ribeteadas de sustancia osteoide, signo de la persistencia de la síntesis ósea.

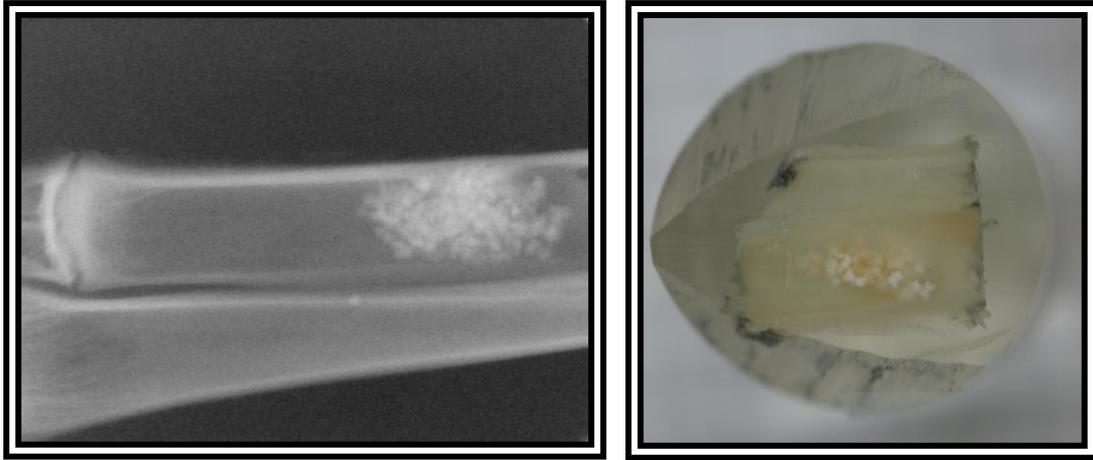


Fig. 77. RX. Gránulos de cemento más alendronato con densidad variable de animales de 9 semanas de evolución (animal nº 47).

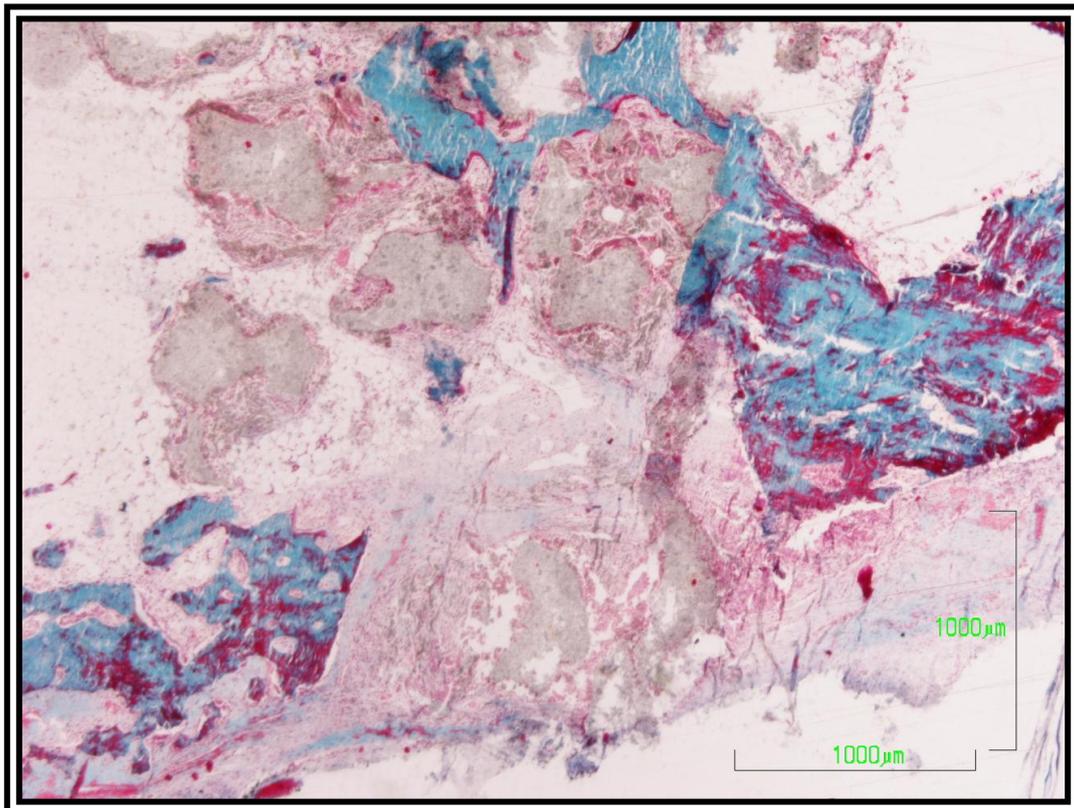
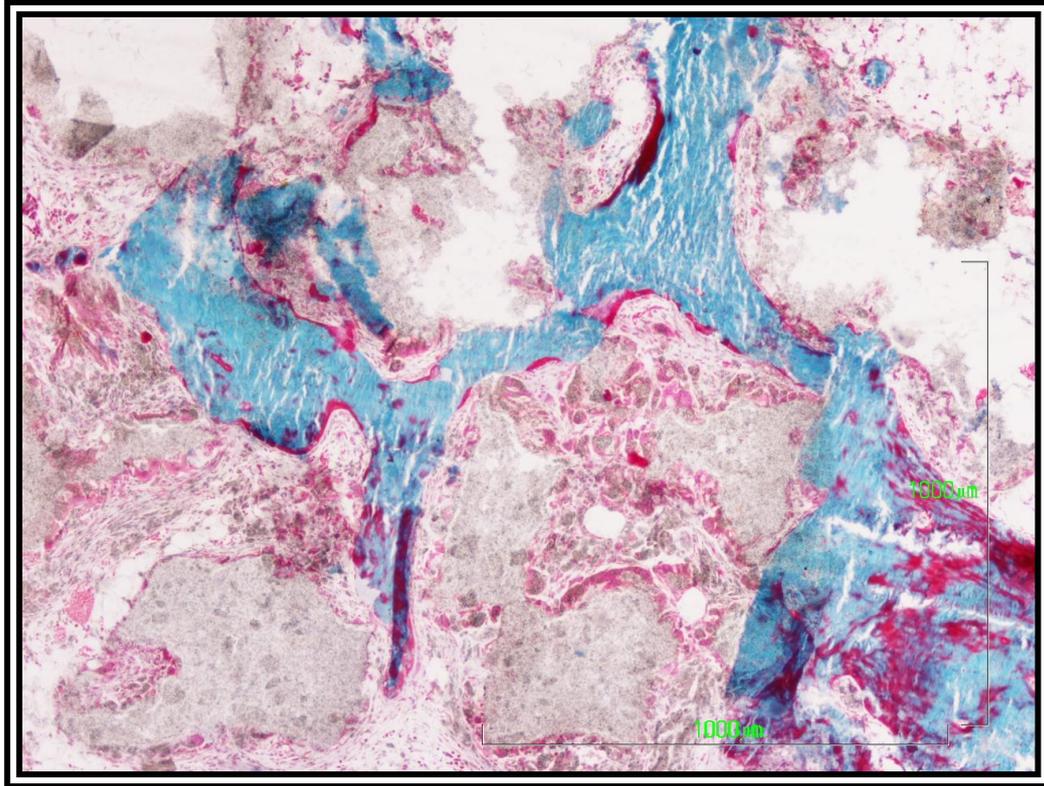
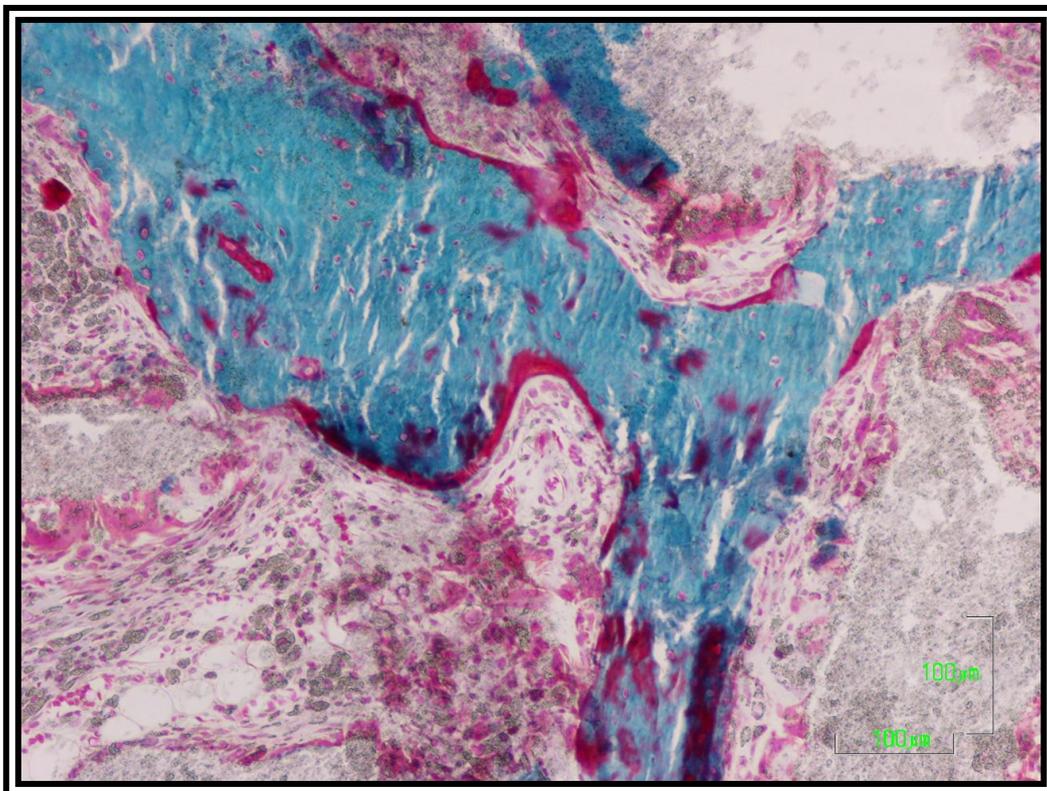


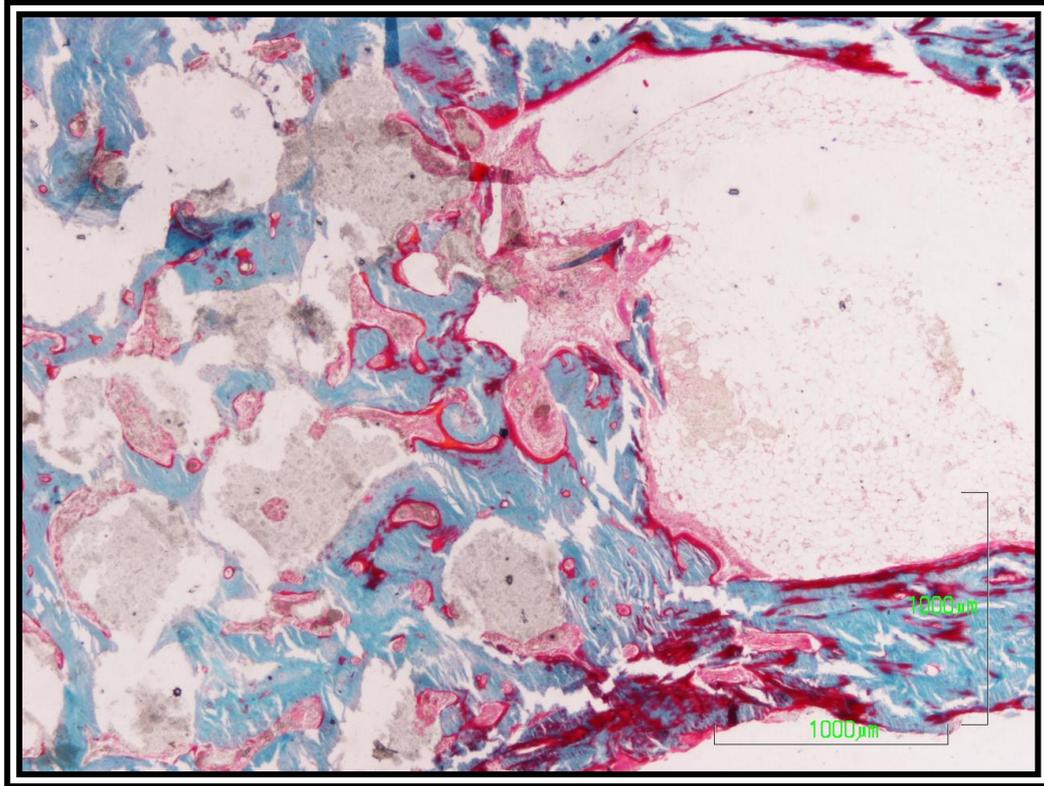
Fig. 78. Tricrómico de Goldner (2x). Zona de colocación del material (cemento más alendronato) y gránulos de dicho material rodeados por tejido conectivo.



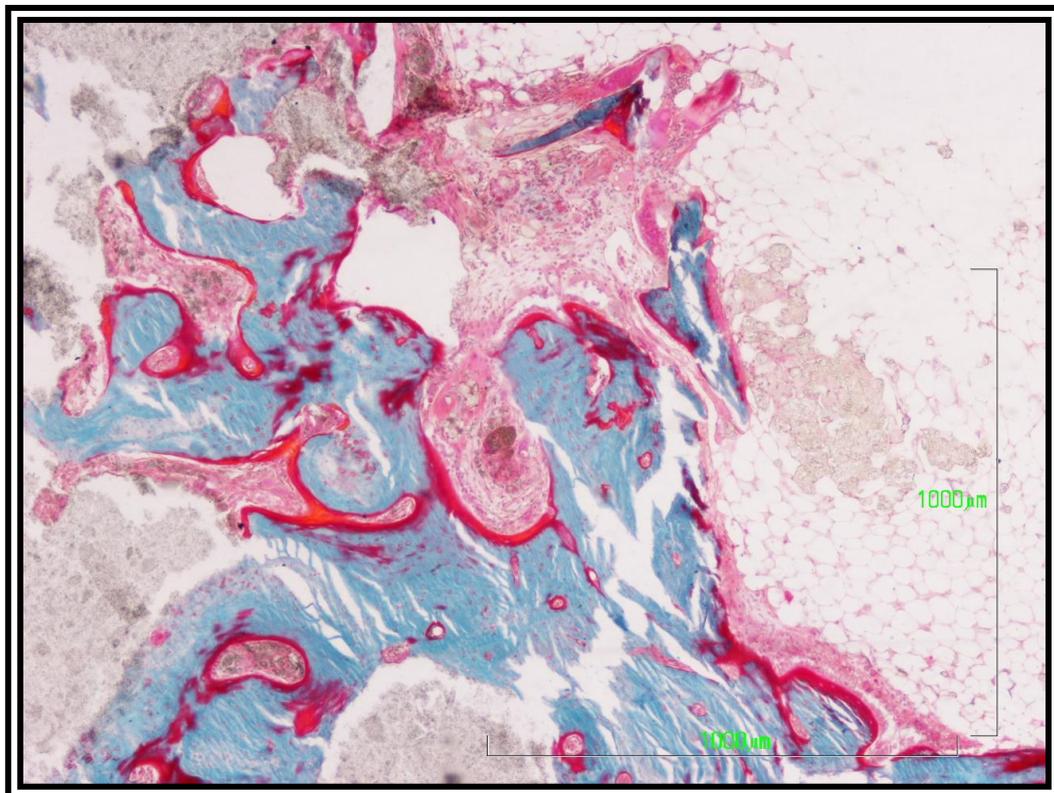
79. Tricrómico de Goldner (4x). Restos de material (cemento más alendronato) rodeados por gruesas trabéculas óseas.



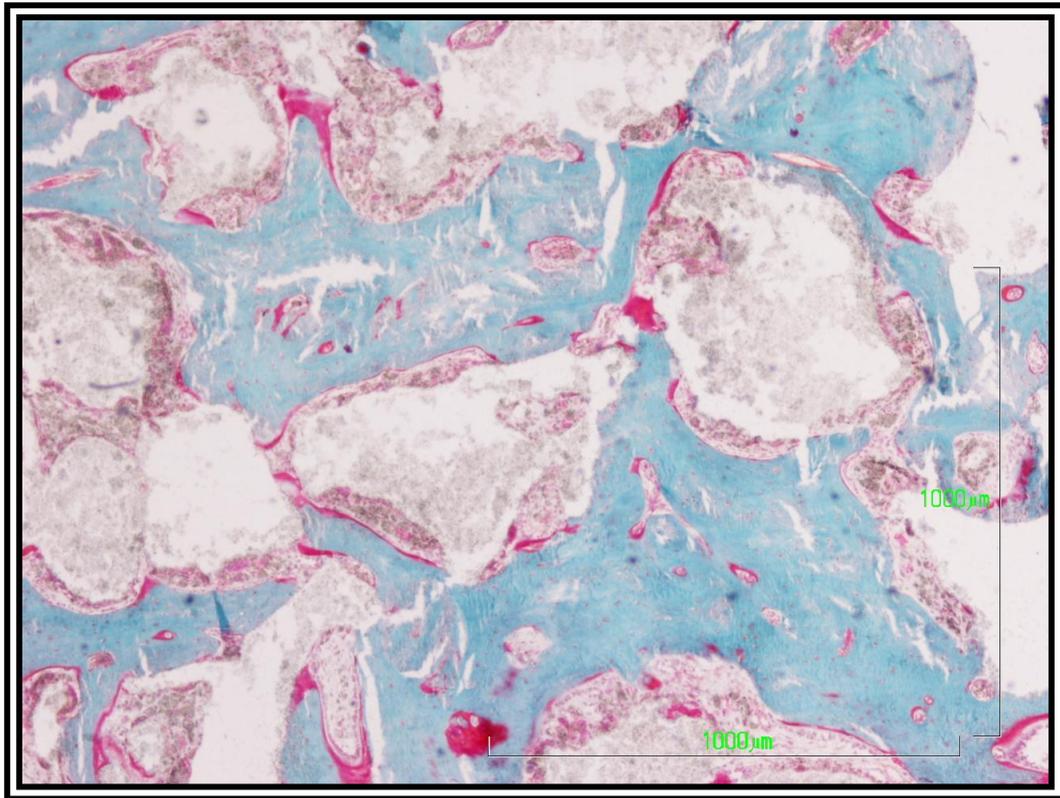
80. Tricrómico de Goldner (10x). Macrófagos y células gigantes cercanos al material (cemento y alendronato).



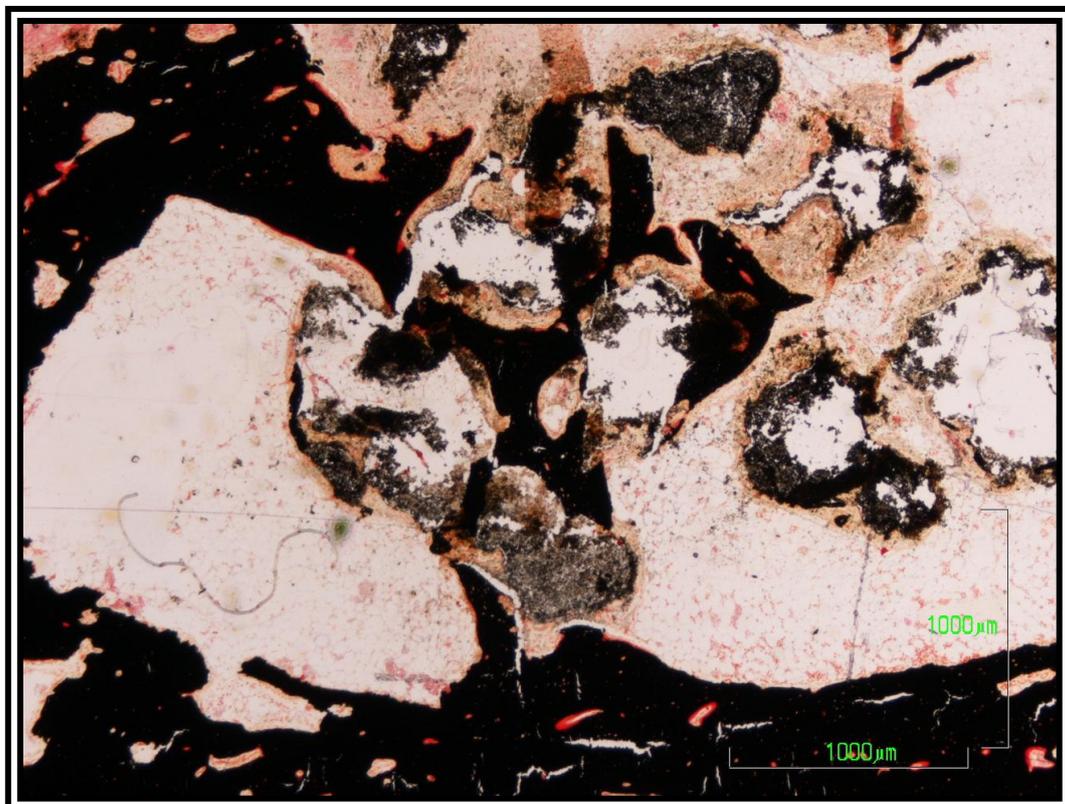
81. Tricrómico de Goldner (4x). Gránulos (cemento más alendronato) rodeados de trabéculas.



82. Tricrómico de Goldner (4x). Síntesis ósea entre el material (cemento más alendronato) y las trabéculas óseas.



83. Tricrómico de Goldner (4x). Hueso neoformado estabilizando la estructura ósea.



84. Técnica de Von Kossa (4x). Proliferación ósea y trabéculas óseas.

2.4 - Subgrupo 2D (12 - 13 semanas y n= 5)

Este subgrupo está formado por los casos 38, 41, 67 y 69; 37. Son animales a los que se le administró cemento más alendronato y fueron sacrificados a las 12 semanas (n=4) y 13 semanas (n=1).

Los signos radiológicos muestran la evolución del conjunto de gránulos, que en conjunto disminuyen en densidad (Figura 85).

En el estudio histológico con la técnica de Goldner existe el fenómeno consistente en la existencia de pequeños gránulos de unas 500 μ de diámetro (Figura 86 y Figura 87) que no han inducido la formación de hueso (Figura 86 y Figura 87) y se encuentran rodeadas por una cápsula de tejido fibroso externamente (Figura 87) e internamente por una capa de macrófagos y células gigantes multinucleadas. (Figura 88).

A mayor aumento (20x) se evidencia la estructura de la cápsula fibrosa (Figura 89), los macrófagos con el citoplasma cargado de cemento (Figura 89) y entre estas formaciones encapsuladas se observa médula ósea rica en adipocitos, bien vascularizadas (Figura 89).

Con la técnica de Von Kossa se observan estas formaciones (Figura 90) que presentan una marcada argirofilia (Figura 90) y un contorno irregular atribuible a la actividad fagocítica de los macrófagos y células multinucleadas que las rodean (Figura 91).

Para concluir este subgrupo se observa con la técnica de Von Kossa, la proliferación ósea, confirmando la tendencia evolutiva de los subgrupos precedentes (Figura 92) y por tanto en este subgrupo se afirman todos los hechos de proliferación, síntesis y remodelado óseo descritos en los otros

subgrupos de esta serie (Figura 92). Siendo éste el único subgrupo en el que aparecen gránulos de cemento encapsulados por tejido conectivo, lo que nos indica una regeneración ósea más rápida que la reabsorción del cemento.

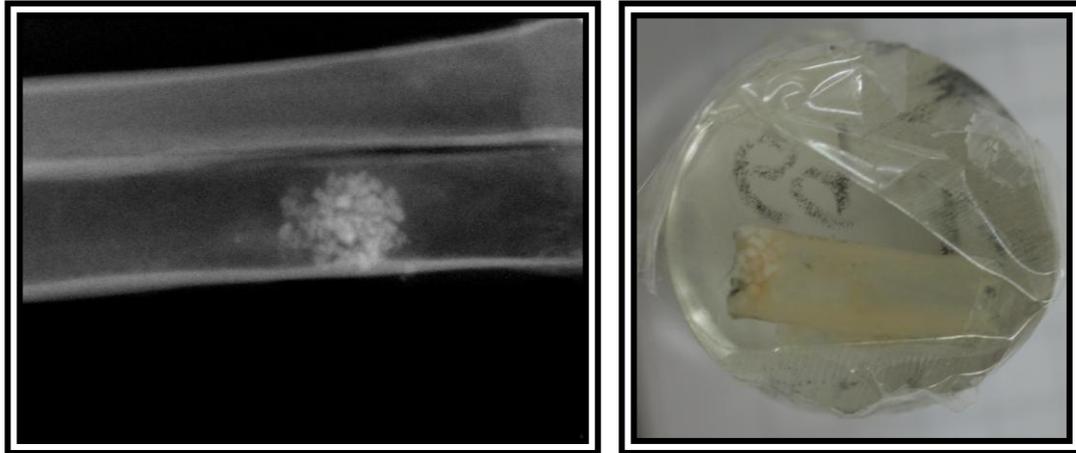


Fig. 85. RX. Gránulos de cemento y alendronato de animales de 12 y 13 semanas de evolución después de la inyección (animal nº 69).

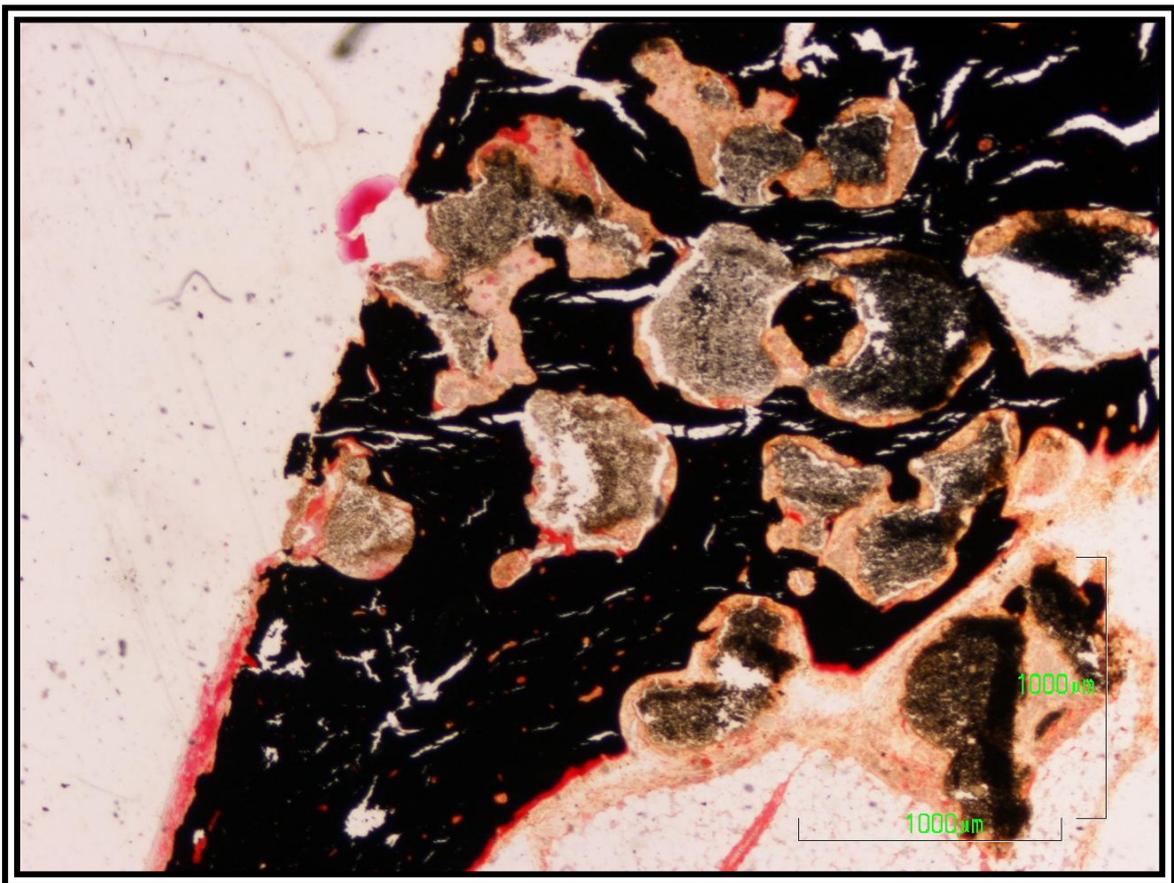


Fig. 86. Técnica de Von Kossa (2x). Proliferación, síntesis y remodelado óseo.

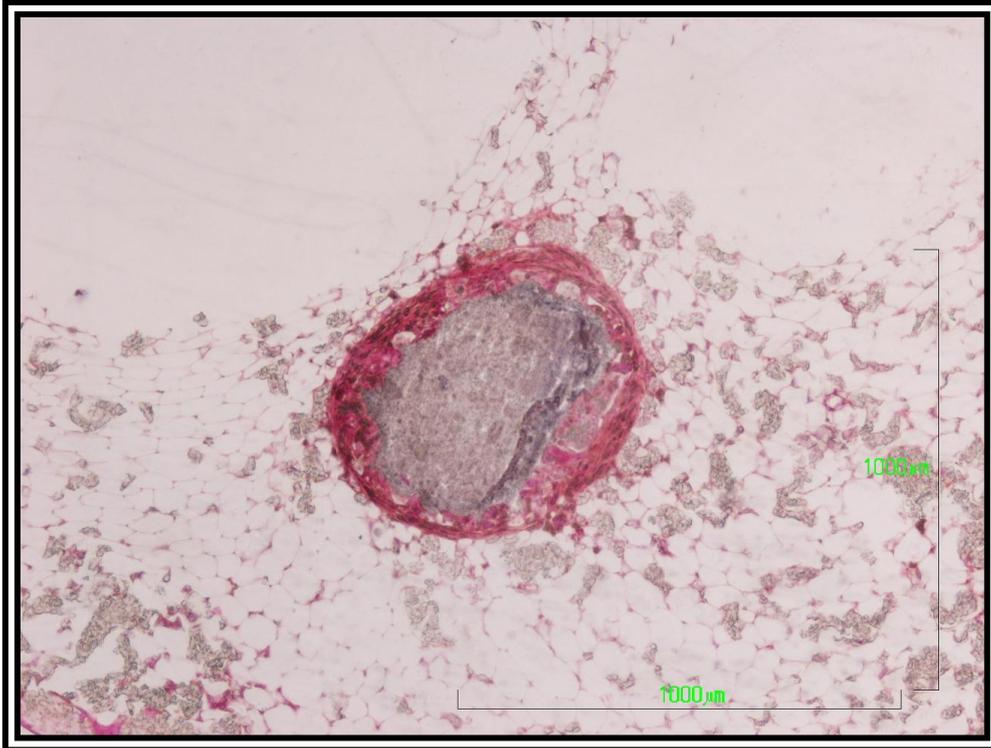


Fig. 87. Tricrómico de Goldner (4x). Pequeño gránulo (cemento más alendronato) rodeado de tejido conectivo.

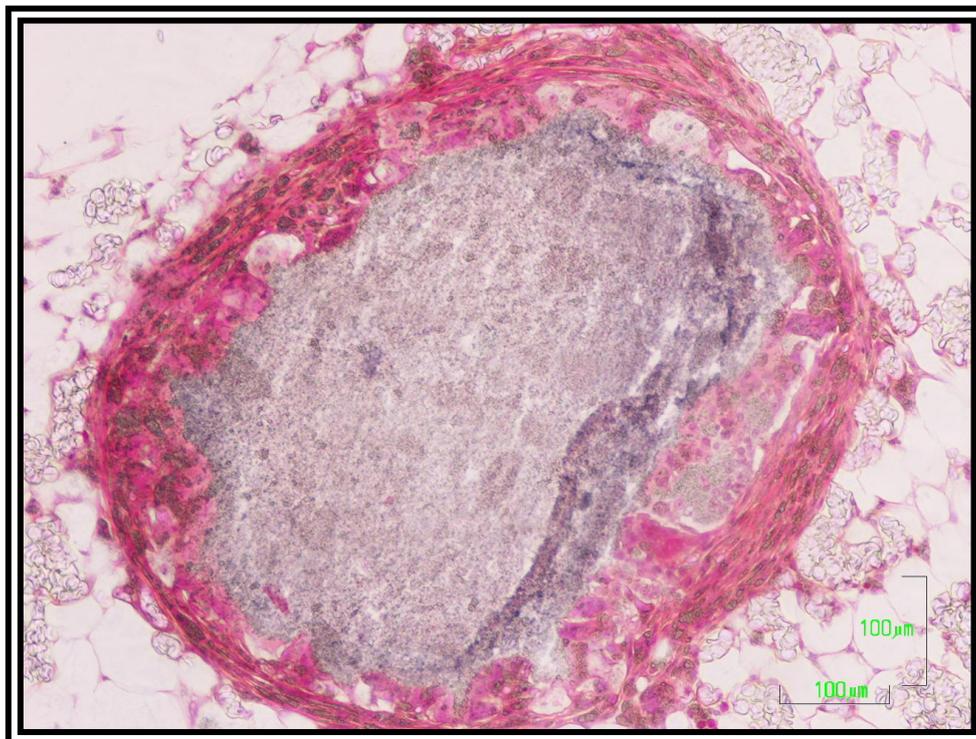


Fig. 88. Tricrómico de Goldner (10x). Detalle de la anterior, observándose macrófagos y células gigantes.

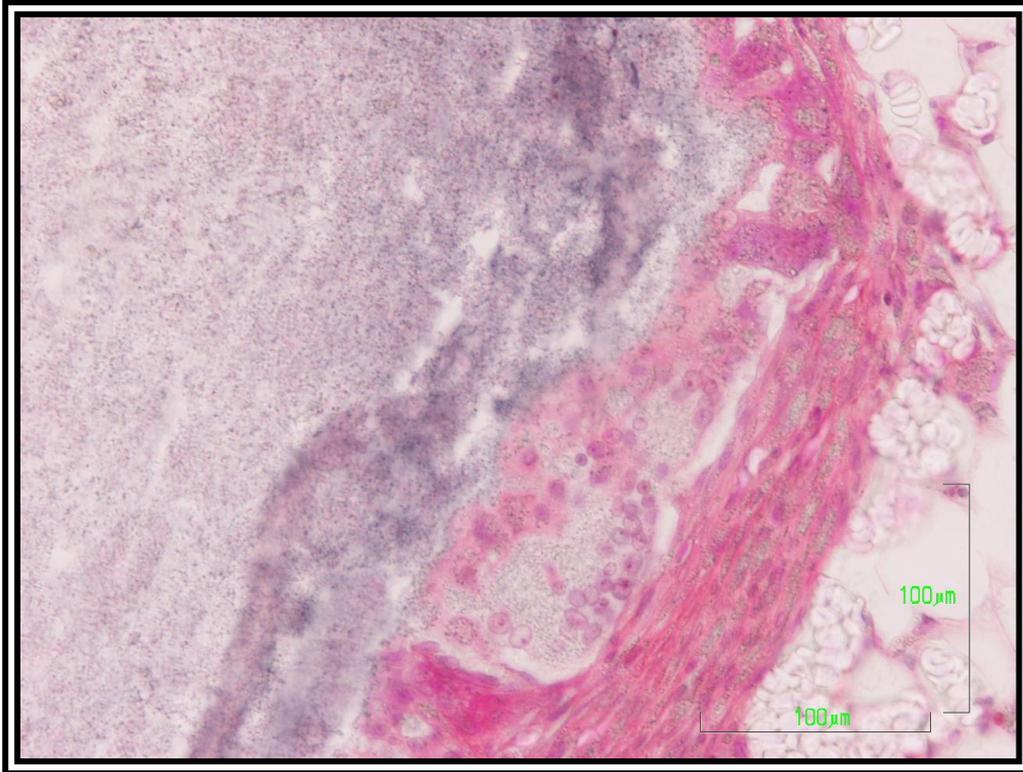


Fig. 89. Tricrómico de Goldner (20x). Macrófagos y células gigantes en el tejido conectivo.

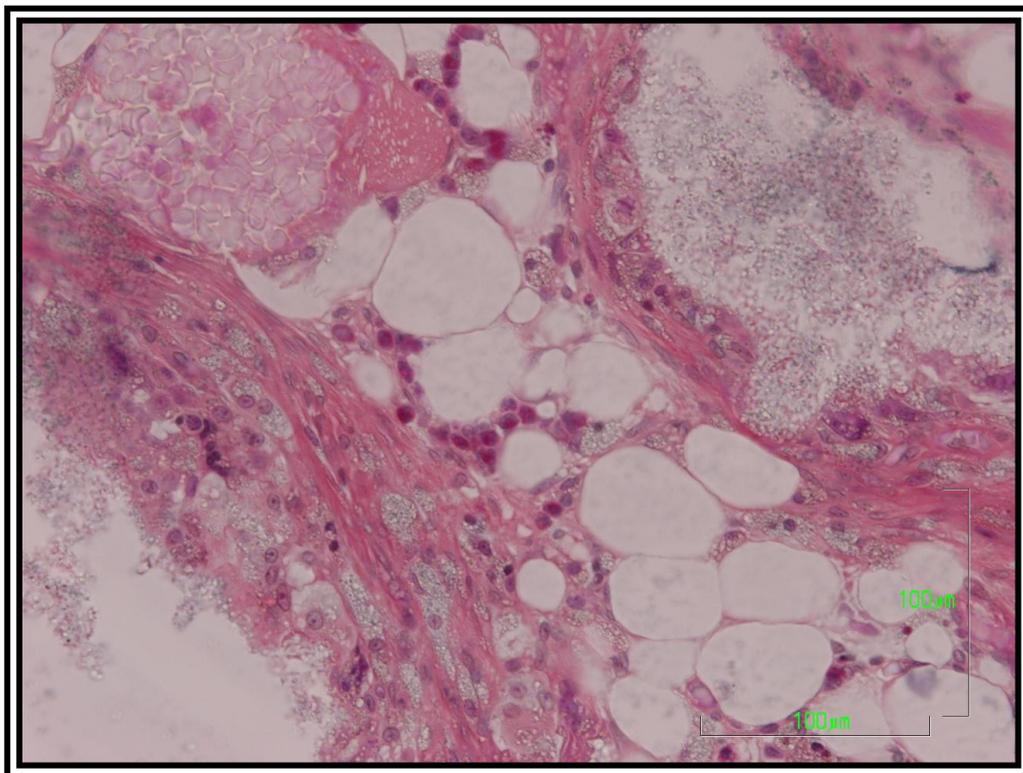


Fig. 90. Tricrómico de Goldner (10x). Médula ósea rica en adipocitos bien vascularizada.

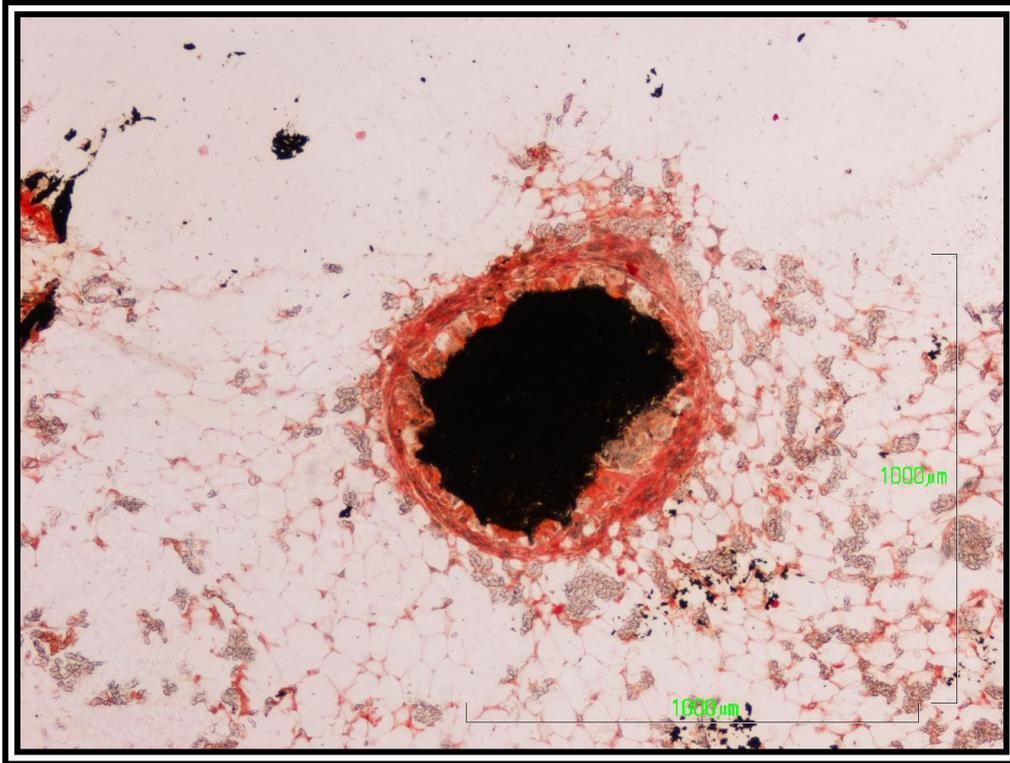


Fig. 91. Tinción de Von Kossa (4x). Gránulo con material (cemento más alendronato) que presenta una marcada argirofilia.

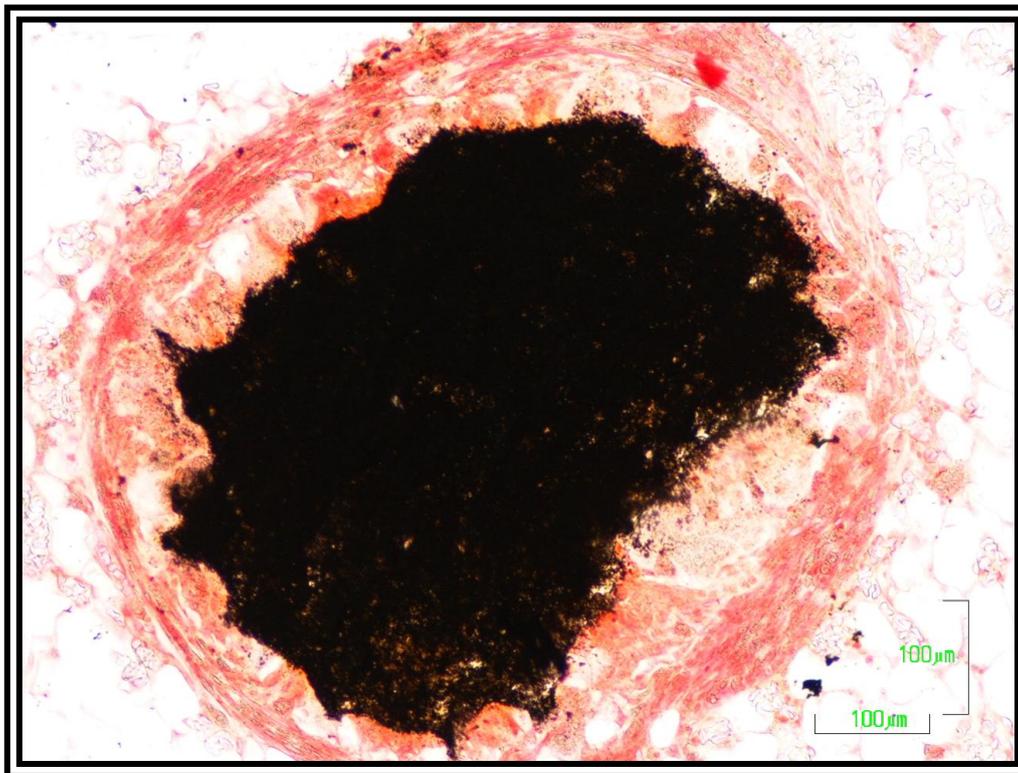


Fig. 92. Tinción de Von Kossa (10x). Detalle de la anterior observándose contornos irregulares en el gránulo rodeado de macrófagos y células multinucleadas.

3 ~ RESUMEN DE RESULTADOS

Desde el punto de vista histológico se produjeron diferencias entre los dos grupos desde el primer subgrupo de seguimiento a las cuatro semanas.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se resumen todos los hallazgos descritos anteriormente.

HALLAZGOS HISTOLÓGICOS								
PARÁMETROS ESTUDIADOS	GRUPO 1				GRUPO 2			
	1A	1B	1C	1D	2A	2B	2C	2D
Presencia de restos de los materiales implantados	**	**	*	*	**	**	*	*
Presencia de signos de inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Presencia de signos de necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Regeneración de la cortical diafisaria	-	-	-	-	*	*	**	**
Líneas de osteoide	**	**	*	*	***	**	*	*
Presencia de macrófagos con restos de material	-	-	*	*	*	-	**	**
Presencia de células gigantes	-	-	-	-	*	*	*	*
Calcificación del tejido óseo neoformado	-	-	-	*	-	-	*	**
Presencia de gránulos de material encapsulados	-	-	-	-	-	-	-	**

Tabla 1. Hallazgos histológicos.
 Leyenda: - ausencia, * escaso, ** moderado, *** abundante.

En la siguiente Tabla (Tabla 2) se resumen las principales imágenes histológicas de los resultados de cada subgrupo. En ella se visualizan las diferencias existentes en las panorámicas a los aumentos 2x y 4x.

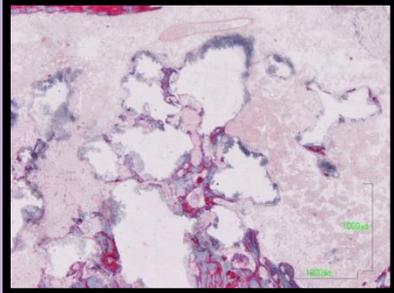
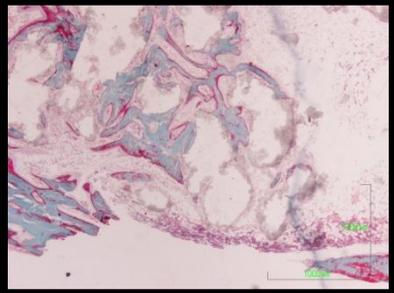
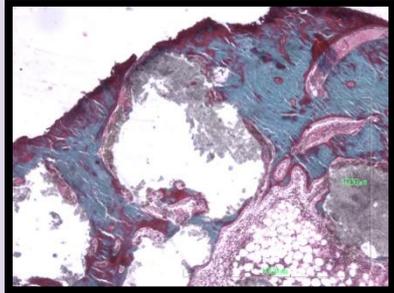
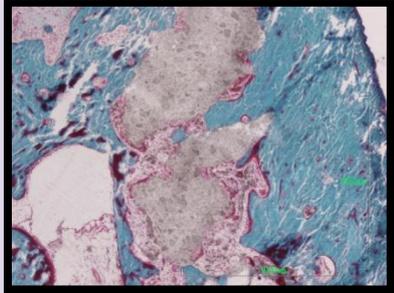
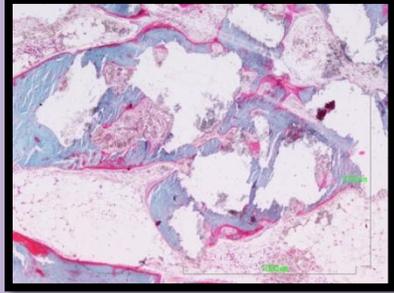
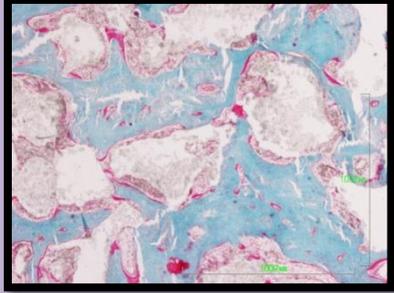
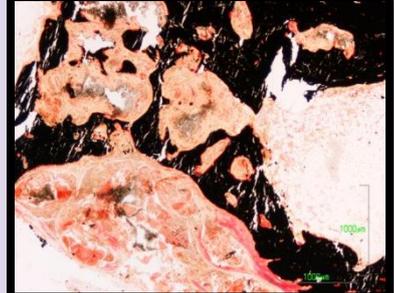
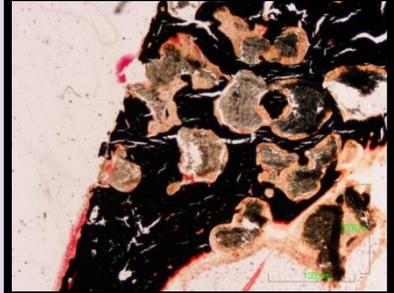
	GRUPO 1	GRUPO 2
4 semanas (subgrupos A)		
6 semanas (subgrupos B)		
9 semanas (subgrupos C)		
12 semanas (subgrupos D)		

Tabla 2. Imágenes histológicas que resumen los hallazgos obtenidos.

Debemos especificar que no se han analizado las que contenían sólo alendronato, ni las muestras control que no contenían ningún material, al no haberse objetivado regeneración ósea en ninguno de los subgrupos de seguimiento.

En la Figura 93, que corresponde al subgrupo de menor tiempo de seguimiento, podemos observar que no existe regeneración y que la cortical ósea se ve interrumpida en la zona donde se realizó el defecto (tinción de Tricrómico de Goldner). En la Figura 94, que corresponde al segundo subgrupo de seguimiento, se observa igualmente que no hay fenómenos de síntesis ósea, y la cortical sigue interrumpida en la zona de la ostectomía.

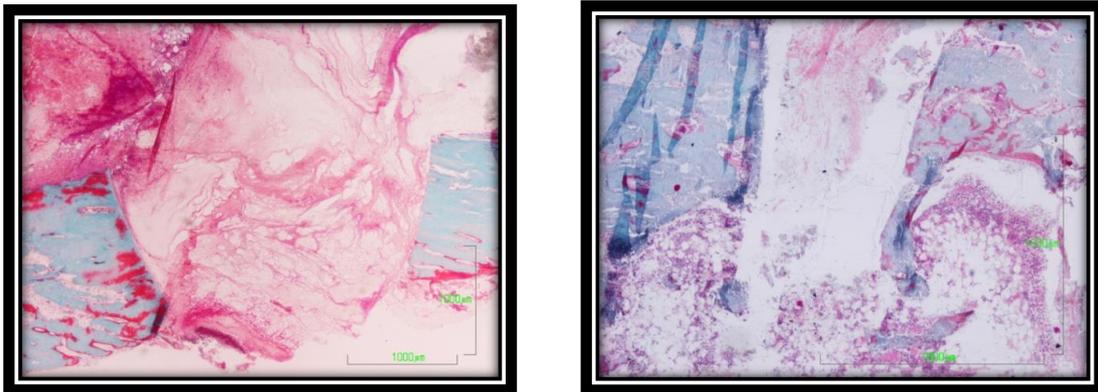


Fig.93. y Fig. 94. Tricrómico de Goldner (2x) a las 4 y 7 semanas, que muestra como la cortical se ve interrumpida en la zona del defecto.

Si analizamos el último subgrupo de seguimiento (Figura 95) obtenemos las mismas imágenes que en los anteriores, pues no se aprecia ningún tipo de regeneración en la zona de estudio.

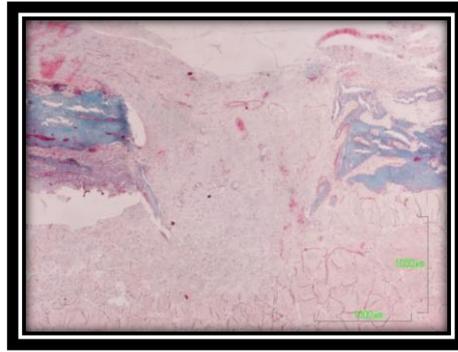


Fig. 95. Tricrómico de Goldner (2x) a las 12 semanas de seguimiento sin regeneración del defecto.

En las Figuras 96 y 97 también se observa con una tinción diferente, Von Kossa, que el defecto es crítico y no se regenera en ninguno de los subgrupos de seguimiento.

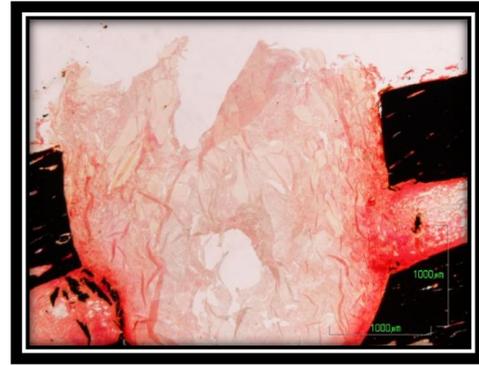
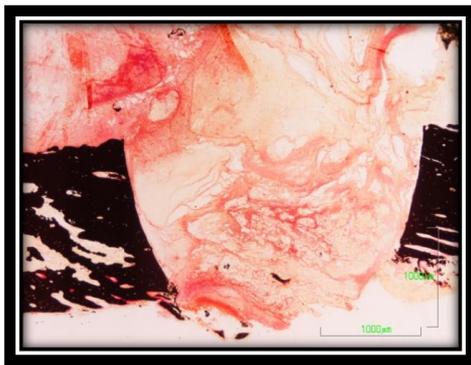


Fig. 96 y Fig. 97. Tinción de Von Kossa (2x) sobre el mismo animal de la Fig.13, a las 4 y 7 semanas de seguimiento, donde se constata que no existe regeneración de la cortical.

En el último subgrupo de seguimiento, a las 12 semanas (Figura 98) tampoco se observan fenómenos de síntesis ósea, con la técnica de Von Kossa.



Fig. 98. Técnica de Von Kossa (2x) a las 12 semanas de seguimiento.



V. DiSCVSiÓN

En este trabajo hemos evaluado la regeneración ósea tras la realización de un defecto cilíndrico en cúbitos de conejos de Nueva Zelanda albinos, mediante pruebas radiológicas e histológicas, tras la aplicación tópica de alendronato de sodio gelificado combinado con un biomaterial sintético formado por beta fosfato tricálcico (KeraOs[®]).

El alendronato es un potente inhibidor de la resorción ósea, siendo habitualmente empleado en el tratamiento de enfermedades sistémicas con aumento de la destrucción del mismo, tales como la enfermedad de Paget (Sahni M, 1993; Yaffe A, 1995), la hipercalcemia tumoral, las metástasis óseas (Cohen H, 1988; Fleisch H, 1991) y la osteoporosis (Siris E, 1999). La administración tópica de alendronato a una concentración de 20mg/ml, tras cirugía mucoperióstica en maxilar en un modelo experimental en ratas consigue una reducción de la resorción ósea alveolar a nivel de los maxilares, tal y como describieron Yaffe *et al.* (Yaffe A, 2000).

Por otra parte el alendronato aumenta la formación ósea mediante la inhibición de la remodelación mediada por los osteoclastos (Rogers MJ, 2003; Russell RGG, 2007). Según Mathov el alendronato puede también aumentar la proliferación de los osteoblastos (Mathov I, 2001; Von Knoch F; 2005; Im GI, 2004), así como prevenir su apoptosis (Plotkin LI, 1999; Plotkin LI, 2005), lo que tiene efectos favorables en la formación de nuevo tejido óseo.

La elección de la concentración del bifosfonato empleado en nuestro estudio se basa en la patente de Binderman y Yaffe del año 2002 (Binderman I, 2002), comercializada por el Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Este trabajo cuenta con el apoyo institucional de la Universidad de Salamanca, habiendo sido subvencionada por el Plan Propio de Ayudas a la Investigación.

El estudio experimental se ha realizado en las instalaciones del Animalario Departamental y los laboratorios del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

La utilización del conejo de Nueva Zelanda albino como animal de experimentación es ampliamente aceptada y utilizada para este tipo de investigaciones (Chacon GE, 2006; Tekin U, 2008; Kügük D, 2011; Tsetsenekou E, 2012), debido a que sus costes son razonables, requiere una infraestructura que generalmente se encuentra disponible en los laboratorios de cirugía experimental y su intervención y manipulación resultan sencillas. Su tamaño y estructura ósea cubital permiten el uso de materiales comercializados y utilizados en odontología humana (fresas de implantes, trefinas...), si bien existe controversia sobre la extrapolación de resultados ya que el entorno en el que se practica la cirugía en este modelo animal, no está en continuo contacto con una flora bacteriana, como sucede a nivel de los maxilares humanos. El cúbito de conejo presenta facilidades operatorias de acceso quirúrgico, aunque la medula ósea dificulta la colocación y fijación del biomaterial, ya que tiene poca consistencia y los gránulos de material pueden perder la localización deseada.

Existe un posible efecto sistémico del alendronato cuando se emplea de manera tópica, debido a una absorción a nivel de la médula ósea, si bien consideramos que la mayor parte del alendronato es absorbida localmente, como demuestra Yaffe en un estudio precedente en el que describe su gran afinidad por el hueso (Yaffe A, 1999). En ese trabajo, Yaffe objetivó que tras la aplicación tópica en la zona de los molares de mandíbula de rata mediante esponjas embebidas en la solución del bifosfonato, la mayor absorción de

alendronato (10%) se produce en el lecho quirúrgico, mientras que únicamente el 0,2% se encuentra en la tibia, probablemente como consecuencia de la extravasación y la difusión del alendronato a través de la herida quirúrgica, tal y como describe su autor.

Los principales hallazgos de nuestro trabajo muestran que tras 12 semanas de seguimiento no se objetiva una reparación completa de los defectos realizados, independientemente del material empleado, ya sea beta fosfato tricálcico, alendronato o la combinación de ambos.

El beta fosfato tricálcico contribuye a la formación de hueso desde la cuarta semana de seguimiento, observándose la mayor calcificación a partir de las 12 semanas.

La combinación de alendronato de sodio y beta fosfato tricálcico acelera la regeneración de los defectos, apreciándose una mayor calcificación del hueso neoformado a partir de las 9 semanas.

En los defectos óseos en los que no se colocó biomaterial sintético no se aprecia ningún tipo de regeneración ósea, permaneciendo la cortical diafisaria interrumpida hasta las 12 semanas, siendo este el último grupo de seguimiento analizado en nuestro estudio. Podemos por lo tanto considerar que el defecto cilíndrico de 3 mm de diámetro y 3 mm de profundidad es un defecto crítico en este modelo de estudio. Algunos autores han obtenido este mismo rango de defecto crítico en estudios sobre cortical de tibia de conejos de Nueva Zelanda (Monjo M, 2010), mientras que otros investigadores describen tamaños superiores en el mismo modelo animal, 5 mm en fémures (Sarahrudi K, 2008) y 6 mm en tibias (Calvo-Guirado JL, 2012).

La eficacia de la aplicación del alendronato de manera local ha sido valorada por varios autores. Omi, estudiando tibias de conejos Japoneses blancos (Omi H, 2007) compara dos vías de administración del alendronato, sistémica y local, demostrando que con la aplicación local se obtienen mejores resultados tanto en la formación de hueso como en la disminución de la resorción ósea, probablemente ya que el alendronato es captado directamente por los osteoclastos.

Otros investigadores preconizan la aplicación del alendronato en solución salina inoculada subcutáneamente, objetivando una mayor formación ósea debido a la gran afinidad de esta sustancia con el hueso, a la vez que se reduce la resorción en el lecho quirúrgico (Van Beek ER, 1997; Altundal H, 2004; Altundal H, 2005; Altundal H, 2007).

La aplicación de este bifosfonato mediante la impregnación de implantes dentales con una solución de alendronato colocados directamente en contacto con el hueso, ha sido también estudiada por otros autores en distintos modelos animales, como tibias de ratas (Aspenberg P, 2008) y mandíbulas de perros (Meraw SJ, 1999). Los resultados de estos estudios revelan que hay un aumento de la cantidad y densidad del hueso en la zona de contacto con dichos implantes.

Trabajos publicados con posterioridad al inicio de nuestra investigación han corroborado que el alendronato puede ser administrado en formato gel de manera local, tal y como hemos realizado en nuestro proyecto, obteniendo resultados favorables en el aumento de la formación ósea (Praddeep AR, 2012; Sharma A, 2012).

Las ventajas de esta presentación en gel son, en primer lugar la facilidad en el manejo del producto, favoreciendo la aplicación del mismo, ya que se adhiere mejor a los tejidos. Permite administrar en dosis única el alendronato en el momento de la cirugía, sin necesidad de realizar infiltraciones subcutáneas posteriores, que condicionan la aparición de dolor, a la vez que dañan los tejidos circundantes en los días siguientes a la intervención, y evitando así los efectos adversos de la administración sistémica que necesita el empleo de dosis más altas (Astrand J, 2004).

Trabajos similares al nuestro (Niu S, 2012), que han empleado como modelo animal el conejo de Nueva Zelanda, y combinado el alendronato con un biomaterial cerámico a base de hidroxapatita, evidencian que la aplicación local tiene muchas ventajas frente al tratamiento sistémico, ya que permite la utilización de dosis iniciales más bajas (Omi H, 2007). Omi al comparar en un estudio de distracción ósea en conejos, tres dosis distintas de alendronato (baja, media y alta), demostró que la aplicación local en bajas dosis era la más efectiva en la formación ósea (Omi H, 2007). En el estudio de Niu, que utiliza implantes impregnados en diferentes soluciones, se comparan dos tipos de bifosfonatos según su afinidad por el hueso (alta afinidad: alendronato y baja afinidad: risendronato), objetivándose diferencias significativas entre ambos, ya que los implantes impregnados en alendronato mejoran la osteointegración, la estabilidad y aumentan la densidad ósea alrededor del implante, respecto al grupo control y al grupo de risendronato (Niu S, 2012).

Publicaciones recientes han evidenciado que la aplicación local de alendronato, tal y como la hemos realizado en nuestro trabajo, reduce el riesgo de osteonecrosis mandibular, grave complicación habitualmente objetivada tras

la cirugía bucal, cuando el paciente ha sido previamente tratado con bifosfonatos de forma sistémica durante largos periodos de tiempo (Abtahi J, 2013).

La concentración de alendronato empleada varía mucho de unos trabajos a otros dependiendo de la vía de administración, del modelo animal utilizado y de los objetivos del estudio. En los estudios en los que la aplicación es subcutánea, las dosis varían de 0,25 mg/kg/día, en ratones (Van Beek ER, 1997) y en ratas Wistar (Altundal H, 2004; Altundal H, 2005; Altundal H, 2007) a 0,5 mg/Kg/día en mandíbula de ratas (Kaynak D, 2003).

La utilización en gel de alendronato es más reciente y los estudios existentes al respecto emplean una concentración efectiva al 1% en pacientes con enfermedad periodontal (Pradeep AR, 2012; Sharma A, 2012). En su trabajo clínico Sharma describe una serie de 66 defectos intraóseos tratados con gel de ALN al 1% o el gel placebo, con unos tiempos de seguimiento de 2 y 6 meses, evaluando varios parámetros (índice de placa, índice de sangrado de surco, profundidad de sondaje y el nivel de inserción) y valorando la regeneración del defecto óseo mediante un software de análisis radiográfico. Objetivando una reducción de la profundidad de sondaje y una ganancia en el nivel de inserción, así como un mayor porcentaje de relleno óseo en los defectos (Sharma A, 2012). En el estudio de Pradeep utilizan una muestra de 70 defectos siguiendo el mismo protocolo de estudio que en el trabajo de Sharma y obteniendo resultados similares (Pradeep AR, 2012), Estos estudios se consideran experimentales y preliminares, por lo que los resultados obtenidos no son concluyentes ni respecto a la concentración utilizada ni a los

efectos, al no existir evidencia científica sobre la comparación de las distintas concentraciones.

Un estudio del año 2000 en ratas, en el que se emplean esponjas de gelatina embebidas de una solución con alendronato a diferentes concentraciones (0, 1, 5, 20, 40 mg/ml) aplicadas directamente sobre el hueso, reveló que la concentración más efectiva para la reducción de la pérdida ósea en cirugías periodontales de exposición ósea mediante colgajos era de 20 mg/ml (Binderman I, 2000). Dos años después, Binderman y Yaffe, patentaron un método para prevenir o minimizar la resorción ósea que se produce tras una cirugía periodontal, aplicando de manera tópica un bifosfonato impregnado en una esponja de gelatina (Binderman I, 2002). Esta patente describe alendronato sódico con una concentración de 20 mg/ml, misma concentración que hemos utilizado en este trabajo, corroborando con nuestros resultados, que la aplicación tópica en una dosis única a esa concentración acelera la formación de hueso.

En nuestro proyecto hemos empleado el beta fosfato tricálcico como biomaterial sintético para la regeneración ósea, comprobando que al aplicarlo en un defecto crítico produce un aumento del volumen óseo. Kaynak en dos estudios paralelos plantea la posibilidad de reducir la pérdida ósea combinando el alendronato con biomateriales de regeneración ósea (Kaynak D, 2000; Kaynak D, 2003). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que al ser combinado con el alendronato en gel, la regeneración del hueso es más rápida, extensa y efectiva (Tabla 2 *Resultados*).

El alendronato ha sido combinado con distintas sustancias y materiales, tratando de lograr con ello un efecto sinérgico. Tal es el caso del estudio

realizado por Aspenberg (Aspenberg P, 2008) en tibias de ratas en el que se emplearon implantes impregnados con alendronato y se realizaron inyecciones diarias de PTH, subdividiendo la serie en 4 grupos: control, BF, PTH y BF + PTH. Los resultados revelaron que la combinación de estas dos sustancias aumenta el efecto de regeneración ósea respecto a los resultados obtenidos tras la aplicación de cualquiera de los dos compuestos individualmente y del grupo control (Aspenberg P, 2008).

Otras publicaciones describen la combinación de tetracilinas y alendronato, para valorar la pérdida ósea en mandíbulas de ratas Wistar, demostrando que esta combinación tiene un efecto sinérgico sobre la reducción de la pérdida de hueso (Yaffe A, 2003).

Nuestro estudio ha evidenciado que la regeneración de los defectos óseos en las muestras con beta fosfato tricálcico comienza a realizarse en el primer subgrupo de seguimiento en la cuarta semana. Sin embargo en todas las muestras durante el seguimiento en nuestro estudio se objetivan restos de dicho cemento hasta pasadas 12 semanas, en el que éstos son irregulares y de pequeño tamaño. Existen trabajos que tratan de solucionar este hecho consecuencia de la lenta reabsorción del cemento, estudiando otros biomateriales a base de brushita o nuevos alfa fosfatos tricálcicos macroporosos (Miño-Fariña N, 2009), que presentan una mayor tasa de reabsorción.

Los resultados de nuestro estudio muestran una clara diferencia entre los dos grupos evaluados, siendo el grupo 2, tratado con la combinación de beta fosfato tricálcico y alendronato en gel de manera tópica, el que presenta mayor calcificación del tejido óseo neoformado desde la novena semana de

seguimiento. Al igual que describió Meraw, consideramos que la aplicación tópica del bifosfonato acelera la formación ósea (Meraw SJ, 1999), ya que el alendronato tiene una gran afinidad por el hueso mineralizado, y está demostrado que los efectos del mismo se ejercen sobre su superficie ósea (Van Beek ER, 1997).

Un reciente estudio de Escudero *et al.* (Escudero ND, 2012) revela que en los animales tratados con BFs se encuentran células gigantes o “giant or large osteoclasts”, que presentan numerosos núcleos en su interior, y que están separadas de la superficie ósea, objetivándose la presencia de células mononucleares entre estos osteoclastos y el perímetro del hueso. Estos datos concuerdan con dos estudios anteriores *in vivo*, uno de ellos en niños con osteogénesis imperfecta tratados con risendronato (Cheung MS, 2009) y el otro en pacientes osteoporóticos tratados con alendronato (Weinstein RS, 2009). Nuestros resultados corroboran estos hallazgos, al visualizar este tipo de células gigantes únicamente en el grupo 2, tratado con la alendronato (Figura 63).

Se observa también que en este grupo 2 la cortical diafisaria presenta fenómenos de síntesis ósea dirigidos a obliterar el defecto, sin llegar a cerrarlo, desde la cuarta semana, por lo que en este grupo la formación ósea es más rápida que en el grupo 1. En concordancia con estos resultados obtenidos sobre hueso cortical, estudios en distracción de mandíbula en conejos, objetivan que la aplicación de alendronato acelera la formación de hueso nuevo en el defecto óseo (Tekin U, 2008; Nüçük D, 2011).

En la última fase de seguimiento, realizada a las 12 semanas, se observaron en el grupo 2 restos de cemento encapsulados por tejido conectivo,

consecuencia de un aumento de la capacidad regenerativa del alendronato, ya que sólo se han encontrado en el grupo 2 (alendronato y beta fosfato tricálcico), lo que indicaría una regeneración ósea más rápida que la propia reabsorción del cemento, demostrando que el alendronato asociado al beta fosfato tricálcico aceleraba la formación ósea. Si bien se puede considerar que se trata de un secuestro del cemento, debido a la micro movilidad de los gránulos, ya que no están adecuadamente contenidos en una base sólida, si no que se trata de medula ósea hematopoyética.

Nuestros resultados entran en controversia con algunas investigaciones que demuestran que la aplicación de alendronato subcutáneo reduce la formación de hueso en los primeros 10 días de seguimiento (Aguirre JI, 2010). Estos resultados dispares pueden deberse a que en nuestro estudio no se realiza sobre alveolos post extracción en mandíbula de rata, si no de defectos provocados en cúbitos de conejo de Nueva Zelanda, por lo que el hueso que debe regenerarse no es del mismo origen ni tiene la misma vascularización, el modelo animal es diferente, y la administración del alendronato no es única y se realiza en dosis más elevadas, por lo que los efecto del bifosfonato puede ser menores (Omi H, 2007).

Otros trabajos realizados sobre implantes y utilizando el mismo modelo animal de experimentación que en nuestro estudio (Chacon GE, 2006; Tsetsenekou E, 2012) obtienen resultados que no evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos tratados con alendronato sistémico, si bien, dichos trabajos evalúan la osteointegración de los implantes colocados, no la regeneración ósea de un defecto.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos en el estudio de Bodde sobre implantes colocados en cóndilos femorales de conejos, (Bodde EW, 2008) con 6 y 12 semanas de seguimiento. En este trabajo no se encontraron efectos positivos del bifosfonato en el aumento de la densidad mineral y del volumen óseo alrededor del implante. A las 12 semanas, el grupo tratado con alendronato tuvo un porcentaje de hueso en contacto con el implante inferior que en el grupo control, con una capsula fibrosa a su alrededor, ya que el alendronato parece generar una respuesta tóxica que pudo contribuir a la falta de una correcta cicatrización ósea (Bodde EW, 2008). Esto sugiere que el efecto del alendronato sobre la actividad de los osteoblastos (Von Knoch F, 2005) puede ser más importante en el aumento de la formación ósea durante la cicatrización de defectos óseos, que los efectos inhibitorios de dicho bifosfonato sobre la actividad de los osteoclastos (Cottrell JA, 2010).

Los estudios futuros para caracterizar los tipos de células y cuantificar los factores relacionados con los osteoblastos y osteoclastos en el defecto óseo, deberían proporcionar una mejor comprensión de cómo estos fármacos alteran localmente la formación del hueso. Permitiendo elaborar un modelo de aplicación con características más específicas para lograr una regeneración ósea óptima.



VI. CONCLUSIONES

En relación con los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la regeneración ósea de los defectos cilíndricos de 3 mm de diámetro y 3 mm de profundidad en cúbitos de conejos de Nueva Zelanda albinos, concluimos que:

1. Para el periodo de seguimiento evaluado de doce semanas, no se consigue una *restitutio ad integrum*, ni de forma espontánea ni de forma inducida con beta fosfato tricálcico, alendronato o la combinación de ambos compuestos.
2. La aplicación del biomaterial de beta fosfato tricálcico en los defectos óseos realizados condiciona una actividad osteoconductora de la regeneración ósea desde la cuarta semana, alcanzando el mayor grado de calcificación a partir de las doce semanas de seguimiento.
3. La combinación del biomaterial con alendronato de sodio gelificado potencia la acción regeneradora, reduciendo el tiempo de la misma, que alcanza el mayor grado de calcificación a partir de la novena semana.



VII. BIBLIOGRAFÍA

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;55(3):287-99.

Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Effect of local vs. systemic bisphosphonate delivery on dental implant fixation in a model of osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*. 2013;92(3):279-83.

ADA American Dental Association Council on Scientific Affairs. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: Expert panel recommendations. *J Am Dent Assoc* 2006; 137:1144-1150.

Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit AC, Wronski TJ. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis*. 2010;16(7):674-85.

Aguirre Zorzano LA, Rodríguez Tojo MJ, Aguirre Urizar JM. Maxillary sinus lift with intraoral autologous bone and B-tricalcium phosphate: histological and histomorphometric clinical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(7):E532-6.

Alam S, Ueki K, Marukawa K, Ohara T, Hase T, Takazakura D, Nakagawa K. Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as onlay bone graft in rabbit mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103:16-26.

Albee FH. Studies in bone growth: Triple Calcium Phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg*. 1920;71(1):32-9.

Allegrini S Jr, Koenig B Jr, Allegrini MR, Yoshimoto M, Gedrange T, Fanghaenel J, Lipski M. Alveolar ridge sockets preservation with bone grafting-review. *Ann Acad Med Stetin*. 2008;54(1):70-81.

Altundal H, Güvener O. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(3):286-93.

Altundal H, Gursoy B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(3):285-91.

Altundal H, Sayrak H, Yurtsever E, Göker K. Inhibitory effect of alendronate on bone resorption of autogenous free bone grafts in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(3):508-16.

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969;27(3):309-18.

Andrades JA. Osteoinducción y osteoconducción. *Encuentros en la biología* 1999;75. Edición para internet de la revista impresa. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros57/oste.html>.

Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta- tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:357-68.

Asako I, Hirofumi M, Bunshi F, Erika N, Hiroko T, Saori T, Tsutomu S, Masamitsu K. Osteoconductivity and Biodegradability of Collagen Scaffold Coated with Nano- β -TCP and Fibroblast Growth Factor 2. *Journal of Nanomaterials.* Vol. 2013, Article ID 639502, 11 pages.

Asociación Española contra la Osteoporosis. AECO. 2013

Aspenberg P, Wermelin K, Tengwall P, Fahlgren A. Additive effects of PTH and bisphosphonates on the bone healing response to metaphyseal implants in rats. *Acta Orthop.* 2008;79(1):111-5.

Astrand J, Aspenberg P. Topical, single dose bisphosphonate treatment reduced bone resorption in a rat model for prosthetic loosening. *J Orthop Res.* 2004;22(2):244-9.

Atwood DA. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. *J Prosthet Dent.* 1971;26(3):266-79

Aybar B, Bilir A, Akçakaya H, Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Impl Res.* 2004;15(1):119-25.

B.O.E de 21 de octubre de 2005. Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE N° 252.

B.O.E. de 8 febrero 2013. Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE N° 34.

Bagán JV, Diz-Dios P, Gallego L, Infante-Cossío P, Jiménez Y, Junquera LM. Recomendaciones para la prevención de la osteonecrosis de los maxilares (ONM) en pacientes con cáncer tratados con bifosfonatos intravenosos . *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13:161-7.

Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. Primer on the metabolic bone disorder of mineral metabolism. Raven Press. New York, 1993; 3-9.

Barrère F, Blitterswijk C, Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine.* 2006;1(3):317- 32.

Bascones Martínez A. Periodoncia clínica e implantología oral. 2o ed. Avances. Madrid; 2001:655-65.

Bashoor-Zadeh M, Baroud G, Bohner M. Simulation of the in vivo resorption rate of β -tricalcium phosphate bone graft substitutes implanted in a sheep model. *Biomaterials*. 2011;32(27):6362-73.

Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop*, 2002; 395:11-22.

Becker BE, Becker W, Ricci A, Geurs N. A prospective clinical trial of endosseous screw-shaped implants placed at the time of tooth extraction without augmentation. *J Periodontol* 1998;69:920–926.

Becker W. Treatment of small defects adjacent to oral implants with various biomaterials. *Periodontology* 2003;33:26-35.

Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005.1;102(9):3324-9.

Binderman I & Yaffe A, inventors; Merck & Co., Inc., assignee. Topical bisphosphonates for prevention of bone resorption. United States patent US 2002/0107228. 2002, Aug 8.

Bodde EWH, Kowalski RSZ, Spauwen PHM, Jansen JA. No increased bone formation around alendronate or omeprazole loaded bioactive bone cements in a femoral defect. *Tissue Engineering Part A*. 2008;14(1):29–39

Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31 Suppl 4:37-47.

Boix D, Weiss P, Gauthier O, Guicheux J, Bouler JM, Pilet P, Daculsi G, Grimandi G. Injectable bone substitute to preserve alveolar ridge resorption after tooth extraction : a study in dog. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:1145-52.

Bone HG, Greenspan SL, McKeever, Bell N, Davidson M, Downs RW, Emkey R, Meunier PJ, Miller SS, Mulloy AL, Recker RR, Weiss SR, Heyden N, Musliner T, Suryawanshi S, Yates AJ, Lombardi A. Alendronate and estrogen effects in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 720-726.

Boskey AL. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone and Mineral*. 1989;6(2):111-23.

Brown DL, Robbins R. Developments in the therapeutic applications of bisphosphonates. *J Clin Pharmacol* 1999; 39: 651-660.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 1996;45:371-86.

Burchardt H: The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983;174:28-42.

Byun H, Wang H. Sandwich bone augmentation using recombinant human platelet-derived growth factor and beta-tricalcium phosphate alloplast: case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28:83-7.

Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruíz RA, Ramírez-Fernández MP, Maté-Sánchez JE, Ortiz-Ruiz A, Marcus AHistomorphometric and mineral degradation study of Ossceram: a novel biphasic B-tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(6):667-75.

Calvo-Guirado JL, Ramírez-Fernández MP, Delgado-Ruíz RA, Maté-Sánchez JE, Velasquez P, de Aza PNInfluence of Biphasic β -TCP with and without the use of collagen membranes on bone healing of surgically critical size defects. A radiological, histological, and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Sep 12. doi: 10.1111/clr.12258. [Epub ahead of print]

Canettieri AC, Colombo CE, Chin CM, Faig-Leite H. Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. *Int J Exp Pathol* 2009;90(5):520-6.

Chacon GE, Stine EA, Larsen PE, Beck FM, McGlumphy EAEffect of alendronate on endosseous implant integration: an in vivo study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(7):1005-9.

Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *Journal of Cell Science* 1985;Vol. 76:155-65.

Chavassieux P, Meunier P: Histologie et cytologie de l'os normal. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris-France), Appareil locomoteur* 2003; 14-002-A-10, 6 p.

Cheung MS, Glorieux FH, Rauch F. Large osteoclasts in pediatric osteogenesis imperfecta patients receiving intravenous pamidronate. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009;24(4):669–674.

Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008;473(2):188-92.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American society of nephrology* 2008;3:S131-S9.

Clément J: Desarrollo y caracterización de un material compuesto totalmente biodegradable para aplicaciones quirúrgicas. PhD Thesis 2001; Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metallúrgica. Universitat Barcelona Politècnica de Catalunya.

Cohen H, Solomon V, Alferiev IS, Breuer R E. Bisphosphonates and tetracycline: experimental model for their evaluation in calcium-related disorders. *Pharmacolog Res* 1988;15:606-613.

Comuzzi L, Ooms E, Jansen JA. Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goats. *Clin Oral Impl Res* 2002;13:304-11.

Consejo de Dentistas. Organización colegial de Dentistas de España. Encuesta de salud oral en España 2010. Análisis de evolución de la salud oral. 1993 a 2010.

Cottrell JA, Vales FM, Schachter D, Wadsworth S, Gundlapalli R, Kapadia R, O'Connor JP. Osteogenic activity of locally applied small molecule drugs in a rat femur defect model. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:597641.

Daculsi G: Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998;19:1473-8.

Darby I, Chen S, De Poi R. Ridge preservation: what is it and when should it be considered. *Aust Dent J*. 2008;53(1):11-21.

Delloye C, Cnockaert N, Cornu O: Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthop Belg* 2003 69:1-8.

Denicolo PJ, Guyton MK, Cuenin M, Hokett S, Sharawy M, Borke JL, McPherson JC. Histologic Evaluation of Osseous Regeneration Following Combination Therapy with Platelet-Rich Plasma and BioOss in a Calvarial Critical Size Defect Model. *J Oral Implantol*. 2013 Sep 4. [Epub ahead of print]

Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 2002;23:4493-502.

Döri F, Huszár T, Nikolidakis D, Tihanyi D, Horváth A, Arweiler NB, Gera I, Sculean A. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with beta tricalcium phosphate and expanded polytetrafluoroethylene membranes. *J Periodontol* 2008;79:660-9.

Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcified tissue international* 1981;33:509-12.

Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clin Proc* 2008;83:1032-1045.

Elves MW, Pratt LM: The pattern of new bone formation in isografts of bone. *Acta Orthop Scand* 1975;46:549-57.

Erkan M, Bilgi O, Mutluoğlu M, Uzun G. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in Cancer Patients and Hyperbaric Oxygen Therapy. *J Pancreas (Online)* 2009;10(5):579-580.

Esbrit P, Alcaraz MJ. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(10):1417-23.

Escudero ND, Mandalunis PM. Influence of biphophonate treatment on medullary macrophages and osteoclasts: an experimental study. *Bone Marrow Res* 2012;2012:526236.

Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: A Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:696-710.

Estilo CL, Van Poznak CH, Williamz T, Bohle GC, Lwin PT, Zhou Q. Osteonecrosis of the maxilla and mandible in patients with advanced cancer treated with bisphosphonate therapy. *The Oncologist* 2008;13:911-920.

Fawcett DW, Bloom. *Tratado de histología*. McGraw-Hill Interamericana. 12ª Edición. Madrid, 1995;188-239.

Feng B, Jinkang Z, Zhen W, Jianxi L, Jiang C, Jian L, Guolin M, Xin D. The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo. *Biomed Mater* 2011;6:015007.

Fernández de Retana P: Osteointegración del homoinjerto óseo triturado en los defectos cavitarios. Estudio experimental en conejos. **PhD Thesis** 1993; Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques. Universitat de Barcelona.

Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E471-51.

Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E151-7.

Filleul O, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136(8):1117-24.

Finkemeier CG: Bone-grafting and bone- graft substitutes. J Bone Joint Surg 2002; 84 A: 454-64.

Fiorellini JP, Kim DM, Nakajima Y, Weber HP. Osseointegration of titanium implants following guided bone regeneration using expanded polytetrafluoroethylene membrane and various bone fillers. Int J Periodontics Restorative Dent 2007;27:287- 94.

Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C, Smeets R. Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy. J Craniomaxillofac Surg 2011;39(1):54-64.

Fleisch H. Bisphosphonates: Pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcemic and metastatic bone disease. Drug. 1991;42:919-944.

Fleisch H. New bisphosphonates in osteoporosis. Osteoporos Int. 1993;3 Suppl 2:S15-22.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev 1998;19(1):80-100.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev 2009 19(1): 80–100.

Foitzik C, Staus H. Le Fort I Osteotomy in atrophied maxilla and bone regeneration with pure-phase β -tricalcium phosphate and PRP. Implant Dent 2003;12:132-9.

Franch J, Díaz-Bertrana C, Lafuente P, Fontecha P, Durall I. Beta-tricalcium phosphate as a synthetic cancellous bone graft in veterinary orthopaedics. A retrospective study of 13 clinical cases. Vet Comp Orthop Traumatol 2006;19(4):196-204.

Franco J, Souto A, Rey P, Guitián F, Martínez-Ínsua A. Procesamiento cerámico de β -TCP para la fabricación de piezas implantables. Bol Soc Esp Ceram V 2006;45(4):265-70.

Friedlaender GE: Bone grafts: The basic science rationale of clinical applications. J Bone Joint Surg 1987;69 A:786-90.

Frota R, Da Silva-Júnior VA, Teixeira M, Sobral AP, Emanuel-Dias-de Oliveira e Silva, Da Silveira MM, Aragão-Neto AC. Histological evaluation of bone repair using β -tricalcium phosphate. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2011;16(2):e190-4.

Fujita R, Yokoyama A, Kawasaki T, Kohgo T. Bone augmentation osteogenesis using hydroxiapatite and β -tricalcium phosphate blocks. J Oral Maxillofac Surg 2003;61:1045-53.

Fujita R, Yokoyama A, Nodasaka Y, Kohgo T, Kawasaki T. Ultrastructure of ceramic- bone interface using hydroxiapatite and β -tricalcium phosphate ceramic and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone. *Tissue & Cell* 2003;35:427-40.

Furuzawa CZ, García RL, Furuzawa J. Estudio piloto sobre la eficacia del uso de la colágena-polivinilpirrolidona (clg-PVP) en la regeneración ósea en cirugía endodóncica. *Revista Odontológica Mexicana* 2005 Dic;9(4):191-196.

Gaasbeek RDA, Toonen HG, van Heerwaarden RJ, Buma P. Mechanism of bone incorporation of β -TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients. *Biomaterials* 2005;26:6713-9.

Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* 2008;29:3973-82.

Garbuz DS, Masri BA, Czitrom AA: Biology of allografting. *Orthop Clin North Am* 1998;29:199-20.

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005;280(39):33132-40.

Geneser F. Histología; sobre bases moleculares. Panamericana. 3ª Edición. 2000;263-297.

Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, Rasic A, Sader RA, Unger RE, Peters F, Kirkpatrick CJ. Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater* 2010;6(12):4476-87.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S20-7.

Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA: Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials* 2004;25:3453-62.

Goldberg VM, Stevenson S: Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop* 1987;225:7-16.

Goodship AE, Lanyon LE, McFie F. Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study. *J Bone Joint Surg. Am* 1979;61:539-546.

Green DW, Padula MP, Santos J, Chou J, Milthorpe B, Ben-Nissan B. A therapeutic potential for marine skeletal proteins in bone regeneration. *Mar Drugs* 2013;11:1203

Greenspan DC: Bioactive ceramic implant materials. *Science* 1999;4:389-93.

Greenspan SL, Emkey RD, Bone HG, Weiss SR, Bell NH, Downs RW, McKeever C, Miller SS, Davidson M, Bolognese MA, Mulloy AL, Heyden N, Wu M, Kaur A, Lombardi A. Significant differential effects of alendronate, estrogen, or combination therapy on the rate of bone loss after discontinuation of treatment of postmenopausal osteoporosis. A randomized, doubleblind, placebo- controlled trial. *Ann Intern Med* 2002;137:875-883.

Greenspan SL, Schneider DL, McClung MR, Miller PD, Schnitzer TJ, Bonin R, Smith ME, DeLucca P, Gormley GJ, Melton ME. Alendronate improves bone mineral density in elderly women with osteoporosis residing in longterm care facilities. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2002;136:742-746.

Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol* 2008;47:172- 92.

Hahn E, Sonis S, Gallagher G, Atwood D. Preservation of alveolar ridge with hydroxyapatite-collagen implants in rats. *J Prosthet Dent* 1988;60:729-734

Harris ST, Gertz BJ, Genant HK, Eyre DR, Survill TT, Ventura JN, DeBrock J, Ricerca E, Chesnut CH 3d. The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1399-406.

Hench LL: Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487-510.

Hench LL: Bioceramics. *J Am Ceram Soc* 1998;81:1705-28.

Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* 2009;44:1026-33.

Hert J. Growth of the epiphyseal plate in circumference. *Acta Anat* 1972;82:420-436.

Hiroi-Furuya E, Kameda T, Hiura K, Mano H, Miyazawa K, Nakamaru Y, Watanabe-Mano M, Okuda N, Shimada J, Yamamoto Y, Hakeda Y, Kumegawa M. Etidronate (EHDP) inhibits osteoclastic-bone resorption, promotes apoptosis and disrupts acting rings in isolate-mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 1999; 64:219-23.

Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D: Role of bone substitutes. *Clin Orthop* 1996;324:55-65.

Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta- tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35:708-13.

Hsu YH, Turner IG, Miles AW. Mechanical characterization of dense calcium phosphate bioceramics with interconnected porosity. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18:2319-29.

Hughes DE, Mian M, Guillard-Cumming DF, Russell RG. The cellular mechanism of action of bisphosphonates. *Drugs Exp Clin Res* 1991;17:109-14.

Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical journal* 1996;317:59-64.

Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25:4105-4115.

INE. Notas de prensa. 8 julio 2013.

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

Jee WS, Frost HM. Adaptations du squelette pendant la croissance. *Triangle* 1993;33:85-97.

Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:55-66.

Jensen SS, Broggini N, Wiebrich G, Hjørtting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:703-12.

Jensen SS, Broggini N, Horting-hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2006;17:237-43.

Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24 Suppl:218-36.

Johnson K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following closed face immediate denture treatment. *Aust Dent J* 1969;14:370-6.

Kalk VW, Raghoobar GM, Jansma J, Boering G. Morbidity from iliac crest bone harvesting. *J Oral Maxillofac Surgery* 1996;54:1424-9.

Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofacial Surg Clin Am* 2007;19:513-521.

Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Bohner M, Richter W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater* 2008;4:1904-15.

Kaynak D, Meffert R, Günhan M, Günhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol.* 2000;71:790-6.

Kaynak D, Meffert R, Bostanci H, Günhan O, Ozkaya OG. A histopathological investigation on the effect of systemic administration of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the rat mandible. *J Periodontol.* 2003;74:1348-54.

Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90 Suppl 1:36-42.

Khedgikar V, Kushwaha P, Gautam J, Verma A, Changkija B, Kumar A, Sharma S, Nagar GK, Singh D, Trivedi PK, Sangwan NS, Mishra PR, Trivedi R. Withaferin A: a proteasomal inhibitor promotes healing after injury and exerts anabolic effect on osteoporotic bone. *Cell Death Dis* 2013;22;4:e778.

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D. Bisphosphonate- Associated Osteonecrosis of the Jaw: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007;22:1479-1491.

Khosla S, Burr D, Cauley J, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007;22:1479-1491.

Kogianni G, Noble BS. The biology of osteocytes. *Current osteoporosis reports.* 2007;5:81-6.

Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N. Bone formation and resorption of highly purified β -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials* 2005;26:5600-8.

Küçük D, Ay S, Kara MI, Avunduk MC, Gümüş C. Comparison of local and systemic alendronate on distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40:1395-400.

Le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater* 2004;8:1-10; discussion 10-1.

Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Aguado E, Goyenvallée E, Gauthier O, Moreau F, Pilet P, Spaethe R, Daculsi G, Layrolle P. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:225-35.

Lee YH, Bhattarai G, Park IS, Kim GR, Kim GE, Lee MH, Yi HK. Bone regeneration around N-acetyl cysteine-loaded nanotube titanium dental implant in rat mandible. *Biomaterials* 2013 Sep 17. pii: S0142-9612(13)01058-2. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.080. [Epub ahead of print]

LeGeros RZ: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop* 2002;395:81-98.

Lekovic V, Kenney EB, Weinlander M, Han T, Klokkevold P, Nedic M, Orsini M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. *J Periodontol* 1997;68:563-70.

Lekowic V, Camargo PM, Klokkevold P, Weinlander M, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol* 1998;69:1044-1049.

Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW Jr, Dequeker J, Favus M. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;333:1437-1443.

Linovitz RJ, Peppers TA. Use of an advanced formulation of b-tricalcium phosphate as a bone extender in interbody lumbar fusion. *Orthopedics* 2002;25(5 Suppl):s585-9.

Liu G, Zhao L, Cui L, Liu W, Cao Y. Tissue-engineered bone formation using human bone marrow stromal cells and novel beta-tricalcium phosphate. *Biomed Mater* 2007;2:78-86.

Lourwood DL. The pharmacology and therapeutic utility of bisphosphonates. *Pharmacotherapy* 1998;18:4 779-89.

Mackie EJ: Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1301-5.

Mainard D, Zanardo D, Galois L, Delagoutte JP: Principes généraux et classification des substituts de l'os. *Rev Chir Orthop* 1997;84(Suppl 1):S52-S56.

Maréchal M, Eyckmans J, Schrooten J, Schepers E, Luyten FP, van Steenberghe D. Bone augmentation with autologous periosteal cells and two different calcium phosphate scaffolds under an occlusive titanium barrier: an experimental study in rabbits. *J Periodontol* 2008;79:896-904.

Marie PJ. Structure, organization and healing of bone. In: Cruss RL ed. The musculoskeletal system. Churchill livingstone. New York 1982:109-162.

Mariñoso ML, Serrano S. Biología del Hueso. Clin Invest Gin Obst 1999;26:13-21.

Markovid S , Veselinovid L , Lukid MJ , Karanovid L , Bračko I , Ignjatovid N, Uskokovid D. Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: a comparative study of cristal structure and morphology. Biomed Mater 2011;6:045005.

Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. Bone. 2000;26(1):1-6.
Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg 2003;61:1115-1118.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. J Oral Maxillofac Surg 2005;63:1567-1575.

Masago H, Shibuya Y, Munemoto S, Takeuchi J, Umeda M, Komori T, Kuboki Y. Alveolar ridge augmentation using various bone substitutes--a web form of titanium fibers promotes rapid bone development. Kobe J Med Sci 2007;53:257-63.

Mathov I, Plotkin LI, Sgarlata CL, Leoni J, Bellido T. Extracellular signal-regulated kinases and calcium channels are involved in the proliferative effect of bisphosphonates on osteoblastic cells in vitro. Journal of Bone and Mineral Research 2001;16:2050–2056.

McAllister BS, Haghghat K. Bone augmentation techniques. J Periodontol 2007;78:377-96.

Melo MD, Obeid G. Osteonecrosis of the Maxilla in a Patient with a History of Bisphosphonate Therapy. J Can Dent Assoc 2005;71:111-113.

Melton LJ 3rd. How many women have osteoporosis now? J Bone Miner Res 1995;10:175-7.

Mendes SC, De Bruijn JD, Bakker K et al. Human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering: in Vitro in vivo characterization. En: J.E. Davis, coodinador. Bone engineering. 1a Ed Toronto: em2; 2000;190-195,442-446.

Meraw SJ, Reeve CM. Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. J Periodontol 1999;70:1228-33.

Minsk L. Bone replacement grafts for periodontal regeneration. Compend Contin Educ Dent 2005;26(9):676,678,680.

Miño-Fariña N, Muñoz-Guzón F, López-Peña M, Ginebra MP, Del Valle-Fresno S, Ayala D, González-Cantalapiedra A. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. *Vet J* 2009;179:264-72.

Mohan BG, Suresh Babu S, Varma HK, John A. In vitro evaluation of bioactive strontium-based ceramic with rabbit adipose-derived stem cells for bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2013 Aug 29. [Epub ahead of print]

Momma F, Nakazawa T, Amagasa M. Repair and regeneration of vertebral body after antero-lateral partial vertebrectomy using beta-tricalcium phosphate. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2008;48:337-42.

Monjo M, Rubert M, Wohlfahrt JC, Rønold HJ, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. In vivo performance of absorbable collagen sponges with rosuvastatin in critical-size cortical bone defects. *Acta Biomater* 2010;6:1405-12.

Montoya JM, Parra P, Ramírez P, Morata IM, Mompeán MC, Calvo JL. Dental implants in patients treated with oral bisphosphonates. A bibliographic Review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15:e65-9.

Mundy GR. Bone Resorbing Cells. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Second Edition. Favus MJ, ed. Nueva York: Raven Press, 1993;25-32.

Nakahama K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67:4001-9.

Nakajima Y, Fiorellini JP, Kim DM, Weber HP. Regeneration of standardized mandibular bone defects using expanded polytetrafluoroethylene membrane and various bone fillers. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2007;27:151-9.

Nath SD, Son S, Sadiasa A, Min YK, Lee BT. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. *Int J Pharm.* 2013;443(1-2):87-94.

National Institutes of Health. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. NIH Consens Statement Online 2000 March 27-29; [2009, august, 15]; 17(1):1-36.

Niu S, Cao X, Zhang Y, Zhu Q, Zhu J, Zhen P. Peri-implant and systemic effects of high-/low-affinity bisphosphonate-hydroxyapatite composite coatings in a rabbit model with peri-implant high bone turnover. *BMC Musculoskelet Disord* 2012;13:97.

Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Tröger M, Kloss F, Neukam FW. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(5):495-502.

Nkenke E, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, Neukam FW. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:514-21.

Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:157-63.

Norton MR, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:249-57.

Ogose A, Hotta H, Kawashima H, Tokunaga K, Endo N, Umezu H. Histological examination of β -tricalcium phosphate graft in human femur. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2002;63:601-4.

Ogose A, Hotta H, Kawashima H, Kondo N, Gu W, Kamura T, Endo N. Comparison of hydroxiapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005;72B:94-101.

Ogose A, Kondo N, Umezu H, Hotta T, Kawashima H, Tokunaga K, Ito T, Kudo N, Hoshino M, Gu W, Endo N. Histological assessment in grafts of highly purified beta- tricalcium phosphate (OSferion®) in human bones. *Biomater* 2006;27:1542-9.

Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawachi G, Gonda Y, Murayama H, Shibata Y, Minami S, Kamihira S, Kurosawa H, Ikeda T. The effect of the microstructure of β - tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomater* 2007;28:2612-21.

Omi H, Kusumi T, Kijima H, Toh S. Locally administered low-dose alendronate increases bone mineral density during distraction osteogenesis in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:984-8.

Ono D, Jimbo R, Kawachi G, Ioku K, Ikeda T, Sawase T. Lateral bone augmentation with newly developed β -tricalcium phosphate block: an experimental study in the rabbit mandible. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:1366-71.

Ormianer Z, Palti A, Shifman A. Survival of immediately loaded dental implants in deficient alveolar bone sites augmented with beta-tricalcium phosphate. *Implant Dent* 2006;15:395-403.

Ortega AJJ, Saldago SNC. Preprosthetic surgery: preservation of the alveolar process using retained tooth roots. *Pract Odontol* 1991;12:13-15.

Palti A, Hoch T. A concept for the treatment of various dental bone defects. *Implant Dent* 2002;11:73-8.

Parfitt AM. Microconceptions (1): Epiphyseal fusion causes cessation of growth. *Bone* 2002;30:337-339.

Park AG, Paglia DN, Al-Zube L, Hreha J, Vaidya S, Breitbart E, Benevenia J, O'Connor JP, Lin SS. Local insulin therapy affects fracture healing in a rat model. *J Orthop Res* 2013;31:776-82.

Passutti N, Delécrin J, Daculsi G. Experimental data regarding macroporous biphasic calcium phosphate ceramics. *Eur J Orthop Sur Traumatol* 1997;7:79-84.

Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clin Ther* 2007;29:1548-58.

Pérez-López FR. Osteoporosis postmenopáusica y alendronato. La salud de la mujer climática En: Pérez-López FR, (ed). Instituto Ginecológico de Zaragoza, 2003;399-424.

Piatelli A, Scarano A, Mangano C. Clinical and histologic aspects of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) used in connection with implant placement. *Biomater* 1996;17:1767-70.

Plenk Jr H, Chyplik L, Lederer J. Unique bone substitution of TCP-granulates (Cerasorb®) during degradation in human sinus floor elevation. *Eur Cell Mater* 2007;14(Suppl1):24.

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson K, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999;104:1363-1374.

Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:7317-7325.

Porras AG, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:315-328.

Pradeep AR, Sharma A, Rao NS, Bajaj P, Naik SB, Kumari M. Local drug delivery of alendronate gel for the treatment of patients with chronic periodontitis with diabetes mellitus: a double-masked controlled clinical trial. *J Periodontol* 2012;83:1322-8.

Proubasta I, Gil J, Planell JA: *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. 1999; Madrid: Ed. Ergon.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry* 2010;285:25103-8.

Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem* 1999;274:3467-3473.

Ridgway HK, Mellonig JT, Cochran DL. Human histologic and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor and beta-tricalcium phosphate for the treatment of periodontal intraosseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28:171-9.

Rizzoli R, Buchs B, Bonjour JP. Effect of a single infusion of alendronate in malignant hypercalcaemia: dose dependency and comparison with clodronate. *Int J Cancer* 1992;12:5 706-12.

Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Current Pharmaceutical Design* 2003;9:2643–2658.

Rosen CJ. Postmenopausal osteoporosis. *N Eng J Med* 2005;353:595-603.

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527-34.

Russell RGG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics*. 2007;119:S150-S162.

Russell RGG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19:733–759.

Sahni M, Guenther H. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblast. *J.Clin Invest* 1993;91:2004-1.

Sansom LN, Necciari J, Thiercelin JF. Human pharmacokinetics of tiludronate. *Bone* 1995;17(5 Suppl):479S-483S.

Sahrudi K, Mousavi M, Grossschmidt K, Sela N, König F, Vécsei V, Aharinejad S. Combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite with binding peptide does not enhance bone healing in a critical-size defect in a rabbit model. *J Orthop Res* 2008;26:759-63.

Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW, Rupprecht S, Thorwarth M. Changes of mineralization of free autogenous bone grafts used for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:673-8.

Schnettler R, Stahl JP, Alt V, Pavlidis T, Dingeldein E. Calcium phosphate-based bone substitutes. *Eur J Trauma* 2004;30:219-29.

Schulten EA, Prins HJ, Overman JR, Helder MN, ten Bruggenkate CM, Klein-Nulend J. A novel approach revealing the effect of a collagenous membrane on osteoconduction in maxillary sinus floor elevation with β -tricalcium phosphate. *Eur Cell Mater* 2013;25:215-28.

Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000;82:1459-68.

Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, Gunhan O. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:385-91.

Sethi A, Kaus T. Maxillary ridge expansion with simultaneous implant placement: 5- year results of an ongoing clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:491-9.

Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2012 Jan;83:11-8.

Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a β -tricalcium phosphate/hydroxiapatite scaffold. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:203-9.

Shegarfi H, Reikeras O. Review article: bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2009;17:206-11.

Shimizu M, Sasaki T, Ishihara A, Furuya R, Kawawa T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1998;47:517-26.

Siris E. Alendronate in the treatment of osteoporosis a review of clinical trials. *J Womens Health Gend Based Med* 1999;9:599-606.

Stancoven BW, Lee J, Dixon DR, McPherson JC 3rd, Bisch FC, Wikesjö UM, Susin C. Effect of bone morphogenetic protein-2, demineralized bone matrix and systemic parathyroid hormone (1-34) on local bone formation in a rat calvaria critical-size defect model. *J Periodontal Res* 2013;48:243-51.

Stavropoulos A, Becker J, Capsius B, Açil Y, Wagner W, Terheyden H. Histological evaluation of maxillary sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5-coated β -tricalcium phosphate: results of a multicenter randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2011; doi: 10.1111/j.1600- 051X.2011.01754.x

- Stevens A, Lowe J. *Histología Humana*. Harcourt-Brace 2a Edición. 1998.
- Stevenson S: Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop* 1998; 355(Suppl):S239- S246.
- Stevenson S: Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:543-52.
- Suba Z, Takács D, Gyulai-Gaál S, Kovács K. Facilitation of beta-tricalcium phosphate- induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:832-8.
- Suba Z, Takács D, Matusovits D, Barabás J, Fazekas A, Szabó G. Maxillary sinus floor grafting with beta-tricalcium phosphate in humans : density and microarchitecture of the newly formed bone. *Clin Oral Impl Res* 2006;17:102-8.
- Suri S, Monkkonen J, Taskinen M, Pesonen J, Blank MA, Phipps RJ, Rogers MJ. Nitrogen- containing bisphosphonates induce apoptosis of Caco-2 cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway: a model of bisphosphonate- induced gastrointestinal toxicity. *Bone* 2001;29:336-343.
- Szabó G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabas J, Néemth Z, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta- tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:371-81.
- Takahashi K. Effect of new bone substitute materials consisting of collagen and tricalcium phosphate. *Bull Tokyo Dent Coll* 2009;50:1-11.
- Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomater* 2005;26:3587-96.
- Tanaka T, Saito M, Chazono M, Kumagae Y, Kikuchi T, Kitasato S, Marumo K. Effects of alendronate on bone formation and osteoclastic resorption after implantation of beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:469-74.
- Tekin U, Tüz HH, Onder E, Ozkaynak O, Korkusuz P. Effects of alendronate on rate of distraction in rabbit mandibles. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:2042-9.
- Ten Cate AR. *Histología oral. Desarrollo, estructura y función*. 2a ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 1986:146-70.
- Tetsch J, Tetsch P, Lysek DA. Long-term results after lateral and osteotome technique sinus floor elevation: a retrospective analysis of 2190 implants over a time period of 15 years. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:497-503.

Tonino RP, Meunier PJ, Emkey R, Rodriguez-Portales JA, Menkes CJ, Wasnich RD, Bone HG, Santora AC, Wu M, Desai R, Ross PD. Skeletal benefits of alendronate: 7- year treatment of postmenopausal osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3109-3115.

Tripplert RG, Schow SR, Laskin DM. Oral and maxillofacial surgery advances in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:47-55.

Tsetsenekou E, Papadopoulos T, Kalyvas D, Papaioannou N, Tangl S, Watzek G. The influence of alendronate on osseointegration of nanotreated dental implants in New Zealand rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:659-66.

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science* 2000;113:377-81.

Vaccaro AR . The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002;25(5 Suppl):s571-8.

Vallet-Regí M, Munuera L. *Biomateriales: Aquí y ahora*. 2000; Madrid: Ed. Dykinson.

van Beek ER, Löwik CW, Papapoulos SE. Effect of alendronate treatment on the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in mice. *Bone* 1997;20:335-40.

Velasco Ortega E, Pato Mourelo J, García Méndez A, Medel Soteras R, López Frías J. Estudio clínico e histológico del beta-fosfato tricálcico en la elevación del seno maxilar. *Av Periodon Implantol* 2008;20:147-54.

Velich N, Németh Z, Tóth C, Szabó G. Long-term results with different bone substitutes used for sinus floor elevation. *J Craniofac Surg* 2004;15:38-41.

von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G, Auer J. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomater* 2006;27:5186-98.

von Knoch F, Jaquiere C, Kowalsky M, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomater* 2005;26:6941-6949.

Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, Yu Y, Irie H, Bruce W. Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomater* 2008;29:266-71.

Wang CZ, Chen SM, Chen CH, Wang CK, Wang GJ, Chang JK, Ho ML. The effect of the local delivery of alendronate on human adipose-derived stem cell-based bone regeneration. *Biomater* 2010;31:8674-83.

Wang XM, Yu SF, Yang ZP. Apoptosis of osteoclast-like cells induced by alendronate is related to Fas gene expression. *Chin J Dent Res* 2000;3:26-32.

Watts NB. Bisphosphonates for treatment of osteoporosis. En: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Washington D.C.: American Society for Bone and Mineral Research 2003;336-341.

Wehrhan F, Amann K, Molenberg A, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Critical size defect regeneration using PEG-mediated BMP-2 gene delivery and the use of cell occlusive barrier membranes, the osteopromotive principle revisited. *Clin Oral Implants Res* 2013;24:910-20.

Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *The New England Journal of Medicine* 2009;360:53-62.

Wiesen M, Kitzis R. Preservation of the alveolar ridge at implant sides. *Periodontol Clin Investig* 1998;20:17-20.

Williams DF, Black J, Doherty PJ: Second consensus conference on definitions in biomaterials. In: *Biomaterials Tissue Interfaces*. Ed. by Doherty PJ, Williams RI, Williams DF, Lee AJC. 1992; Amsterdam: Elsevier. pp 525-33.

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. *Ann Intern Med* 2006;144:753-761.

Wuttke M, Müller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural Characterization of Human Recombinant and Bone-derived Bone Sialoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:36839-48.

Xia L, Xu Y, Chang Q, Sun X, Zeng D, Zhang W, Zhang X, Zhang Z, Jiang X. Maxillary sinus floor elevation using BMP-2 and Nell-1 gene-modified bone marrow stromal cells and TCP in rabbits. *Calcif Tissue Int* 2011;89:53-64.

Yaffe A, Fine N, . The effect of Bisphosphinates in Alveolar Bone Resorption following muciperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 1995;66:999-1003.

Yaffe A, Binderman I, Breuer E, Pinto T, Golomb G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. *J Periodontol* 1999;70:893-5.

Yaffe A, Golomb G, Breuer E , Binderman I. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat madel. *J Periodontol* 2000;69:1607-1612.

Yaffe A, Herman A, Bahar H, Binderman I. Combined local application of tetracycline and bisphosphonate reduces alveolar bone resorption in rats. *J Periodontol* 2003;74:1038-42.

Yamauchi K, Takahashi T, Funaki K, Hamada Y, Yamashita Y. Histological and histomorphometrical comparative study of β -tricalcium phosphate block grafts and periosteal expansion osteogenesis for alveolar bone augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:1000-6.

Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013 Jul 13. doi: 10.1002/jbm.b.32984. [Epub ahead of print].

Ye F, Lu X, Lu B, Wang J, Shi Y, Zhang L, Chen J, Li Y, Bu H. A long-term evaluation of osteoinductive HA/beta-TCP ceramics in vivo: 4.5 years study in pigs. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:2173-8.

Ylitalo P, Holli K, Monkkonen J, Elo HA, Juhakoski A, Liukko-Sipi L, Ylitalo R. Comparison of pharmacokinetics of clodronate after single and repeated doses. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1999;37:294-300.

Zafiroopoulos GG, Hoffmann O, Kasaj A, Willershausen B, Weiss O, Van Dyke TE. Treatment of intrabony defects using guided tissue regeneration and autogenous spongiosa alone or combined with hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate bone substitute or bovine-derived xenograft. *J Periodontol* 2007;78:2216-25.

Zamiri B, Shahidi S, Eslaminejad MB, Khoshzaban A, Gholami M, Bahramnejad E, Moghadasali R, Mardpour S, Aghdami N. Reconstruction of human mandibular continuity defects with allogenic scaffold and autologous marrow mesenchymal stem cells. *J Craniofac Surg* 2013;24:1292-7.

Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK, Kubota E, Abiko Y. Transcriptome analysis of β -TCP implanted in dog mandible. *Bone* 2011;48:864-77.

Zijderveld SA, Zerbo IR, van der Bergh JPA, Schulten EAJM, ten Bruggenkate CM. Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:432-40.

Zijderveld SA, Schulten EA, Aartman IH, ten Bruggenkate CM. Clin Long-term changes in graft height after maxillary sinus floor elevation with different grafting materials: radiographic evaluation with a minimum follow-up of 4.5 years. *Oral Implants Res* 2009;20:691-700.